



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.31

(21) Номер заявки
201690513

(22) Дата подачи заявки
2014.09.04

(51) Int. Cl. *A61K 31/435* (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/5025 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРА МЕК КОБИМЕНИНИБА И ИНГИБИТОРА ЕРК (S)-1-(1-(4-ХЛОР-3-ФТОРФЕНИЛ)-2-ГИДРОКСИЭТИЛ)-4-(2-((1-МЕТИЛ-1Н-ПИРАЗОЛ-5-ИЛ)АМИНО)ПИРИМИДИН-4-ИЛ)ПИРИДИН-2(1Н)-ОНА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 61/874,206

(32) 2013.09.05

(33) US

(43) 2016.07.29

(86) РСТ/ЕР2014/068776

(87) WO 2015/032840 2015.03.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ (СН)

(72) Изобретатель:
**Белвин Марсия, Моффэт Джон,
Мёрчант Марк (US)**

(74) Представитель:
**Липатова И.И., Хмара М.В.,
Новоселова С.В., Дощечкина В.В.,
Осипов К.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев
А.С. (RU)**

(56) HATZIVASSILIOU G. ET AL.: "ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK Inhibitors", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS 2012 AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH INC. USA, vol. 11, no. 5, 2012, pages 1143-1154, XP002730627, ISSN: 1535-7163 the whole document WO-A1-2012145503

HUYNH H. ET AL.: "AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma

(HCC)", JOURNAL OF HEPATOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 52, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 79-87, XP027246446, ISSN: 0168-8278 [retrieved on 2009-10-28] the whole document

E. W. JOSEPH ET AL.: "The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 33, 17 August 2010 (2010-08-17), pages 14903-14908, XP055098494, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1008990107 the whole document

BOGATCHEVA N. V. ET AL.: "Mechanism of fluoride-induced MAP kinase activation in pulmonary artery endothelial cells", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 200606 US, vol. 290, no. 6, June 2006 (2006-06), pages L1139-L1145, XP002730646, ISSN: 1040-0605 page L1141, right-hand column, line 11- page L1142, line 5

LI LIU ET AL.: "Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 66, no. 24, 18 December 2006 (2006-12-18), pages 11851-11858, XP008136574, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1377 the whole document

(57) Согласно изобретению предложены способ лечения, набор, а также применение комбинации ингибитора МЕК кобиметиниба и ингибитора ЕРК (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пириимидин-4-ил)пиридин-2(1Н)-она для лечения или получения лекарственного средства для лечения гиперпролиферативного расстройства, представляющего собой раковое заболевание.

Область изобретения

Изобретение, в общем, относится к фармацевтическим комбинациям ингибиторов MEK (MEKi) и ингибитора ERK (ERKi) с активностью против гиперпролиферативных расстройств, таких как рак. Изобретение также относится к способам применения данных соединений для лечения млекопитающих.

Предшествующий уровень техники

Путь RAS/RAF/MEK/ERK активируется при более чем 30% человеческих раковых заболеваний, чаще всего посредством мутации в онкогене K-ras и также посредством мутаций в BRAF. Данный путь, следовательно, привлек значительный интерес в качестве терапевтической мишени для лечения ракового заболевания (P. J. Roberts and C.J. Der, *Oncogene* 2007 26:3291-310)). Попытки непосредственного направленного действия на RAS до настоящего времени не были успешными, но недавние клинические испытания с ингибиторами BRAF и митогенактивируемой киназы, регулируемой внеклеточным сигналом (MEK) свидетельствовали о том, направленное действие на данные эффекторы RAS, действующие ниже, имеет потенциал в лечении раковых заболеваний, имеющих онкогенные мутации в данном пути (Flaherty et al., *Curr. Opin. Oncol.* 2010 22:178-83). Несмотря на то, что клинические ответы и противоопухолевая активность могут быть впечатляющими, в частности для ингибиторов BRAF при меланоме с мутацией BRAF, у большинства пациентов, в конечном счете, развивалась клиническая резистентность и прогрессирующее заболевание (Flaherty, выше; D.B. Solit and N. Rosen, *N. Engl. J. Med.* 2011 364:772-4). В доклинических исследованиях были идентифицированы многочисленные механизмы приобретенной устойчивости к ингибиторам BRAF, включающие переключение между изоформами RAF (J. Villaneuva et al., *Cancer Cell* 2010 18:683-95), повышающую регуляцию сигнализации RTK или NRAS (R. Nazarian et al., *Nature* 2010 468:973-7) и реактивацию сигнализации митогенактивируемой киназы (MAPK) через активацию COT (C.M. Johannessen et al., *Nature* 2010 468:968-72) или активирующую мутацию MEK киназы (N. Wagle et al., *J. Clin. Oncol.* 2011 29:3085-96). Аналогично, в доклинических исследованиях были идентифицированы отличные механизмы, посредством которых клетка приобретает резистентность к ингибированию MEK, включающие амплификацию мутантного BRAF (R.B. Corcoran et al., *Sci. Signal* 2011 3:ra84), повышающую регуляцию STAT3 (B. Dai et al., *Cancer Res.* 2011 71:3658-68) или мутации в аллостерическом кармане MEK, которые могут непосредственно связывать ингибиторы с активностью MEK киназы (H. Wang et al., *Cancer Res.* 2011 71:5535-45; C.M. Emery et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2009 106:20411-6). Мутации MEK были описаны в образцах опухолей от пациентов, которых лечили ингибиторами MEK (Emera, выше) или BRAF (Wagle, выше), демонстрируя клиническую релевантность. В то время как, по сравнению с ингибиторами RAF и MEK, были описаны селективные ингибиторы ERK 1/2 (киназа 1/2, регулируемая внеклеточным сигналом), и они в настоящее время находятся в клинической разработке, идентификация и разработка низкомолекулярных ингибиторов против ERK 1/2, которые действуют непосредственно ниже MEK, запоздала.

Краткое изложение сущности изобретения

Предложен способ лечения гиперпролиферативного расстройства, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества комбинации ингибитора MEK (митогенактивируемая киназа, регулируемая внеклеточным сигналом) или фармацевтически приемлемой соли и ингибитора ERK (киназа, регулируемая внеклеточным сигналом) или фармацевтически приемлемой соли либо в виде объединенной композиции, либо поочередно, в котором ингибитор MEK представляет собой кобиметиниб, ингибитор ERK представляет собой (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1H-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-он, а гиперпролиферативное расстройство представляет собой раковое заболевание.

Также предложено применение комбинации ингибитора MEK или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором ERK или его фармацевтически приемлемой солью для получения лекарственного средства для лечения гиперпролиферативного расстройства, в котором ингибитор MEK представляет собой кобиметиниб, ингибитор ERK представляет собой (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1H-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-он, а гиперпролиферативное расстройство представляет собой раковое заболевание.

В другом аспекте предложено применение комбинации ингибитора MEK или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором ERK или его фармацевтически приемлемой солью для лечения гиперпролиферативного расстройства, в котором ингибитор MEK представляет собой кобиметиниб, ингибитор ERK представляет собой (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1H-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-он, а гиперпролиферативное расстройство представляет собой раковое заболевание.

В одном воплощении раковое заболевание - это раковое заболевание млекопитающего.

В следующем воплощении млекопитающее представляет собой человека.

Раковое заболевание может быть выбрано из группы, состоящей из следующих: аденома, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак молочной железы, рак толстой кишки, эпидермальная карцинома, фолликулярная карцинома, рак мочевого тракта, глиобластома, лимфогранулематоз, раковые заболевания головы и шеи, гепатома, кератоакантома, рак почки, крупноклеточная карцинома, лейкозы, аденокарцинома легкого, рак легкого, лимфоидные расстройства, меланома и немеланомный рак кожи, миелодис-

пластический синдром, нейробластома, неходжкинская лимфома, рак яичника, папиллярная карцинома, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, саркома, мелкоклеточная карцинома, рак яичка, тетракарциномы, рак щитовидной железы и недифференцированная карцинома.

Например, раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, рак легкого, мезотелиома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, глиома, рак желудка, рак почки, рак яичника, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи.

В частности, раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы или меланомы.

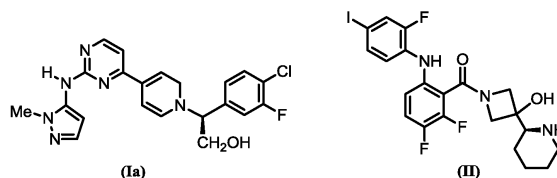
Предложен также набор для лечения ракового заболевания, содержащий кобиметиниб или его фармацевтически приемлемую соль и (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1Н)-он или его фармацевтически приемлемую соль, контейнер и листок-вкладыш в упаковке или этикетку, причем на вкладыше указано, что введение кобиметиниба и (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1Н)-она служит для лечения ракового заболевания.

Изобретение, в общем, относится к синергическим комбинациям ингибиторов MEK и ингибиторов ERK с противораковой активностью, которые, при введении в комбинации, ингибируют рост раковых клеток. Комбинации и способы по изобретению могут быть полезными в лечении гиперпролиферативных расстройств, таких как рак. Данные композиции могут ингибировать рост опухоли у млекопитающих и могут быть полезными для лечения пациентов-людей с раковым заболеванием.

В одном аспекте изобретение включает способ лечения гиперпролиферативного расстройства, включающий введение млекопитающему терапевтической комбинации в виде объединенной композиции или введение поочередно, где терапевтическая комбинация содержит терапевтически эффективное количество соединения MEK и терапевтически эффективное количество ERKi.

Ингибиторы ERK представляют собой (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1Н)-она (Ia, GDC-0994), 4-(3-((этилдиметилсилил)метил)-[1,2,4]триазоло[4,3-а]пиридин-7-ил)-N-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин (Ib), (S)-4-(3-(2-(4-хлорфенил)-2-метоксиэтил)-[1,2,4]триазоло[4,3-б]пиридазин-7-ил)-N-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин (Iв) или (S)-N-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)-4-(3-(2-метилбутил)-[1,2,3]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)пиримидин-2-амин (I г), а ингибитор MEK представляет собой кобиметиниб (II, GDC-0973) или 5-((2-фтор-4-йодфенил)амино)-N-(2-гидроксиэтокси)имидазо[1,5-а]пиридин-6-карбоксамид (IIa, GDC-0623).

Согласно изобретению, ингибитор MEK представляет собой (II), и ингибитор ERK представляет собой GDC-0994 (Ia).



Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана пролиферация клеток A549 немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) при дозировании GDC-0994, Ib, Iв или Iг и GDC-0973 индивидуально или при дозировании GDC-0994, Ib, Iв или Iг в сочетании с GDC-0973 с использованием протокола в примере 6. Клетки инкубировали с указанной максимальной концентрацией лекарственного средства с использованием серии 3-кратного разведения. Жизнеспособность клеток определяли с использованием анализа CellTiter-Glo® (CTG).

На фиг. 2 показана пролиферация клеток и степень апоптоза у клеток A549 немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) при дозировании дозами GDC-0994, Ib, Iв или Iг и GDC-0973 индивидуально или при дозировании дозами GDC-0994, Ib, Iв или Iг в сочетании с GDC-0973. Пролиферацию клеток определяли с использованием анализа BrdU. Апоптоз измеряли с использованием анализа пусELISA.

На фиг. 3 показаны фармакодинамические последствия лечения комбинацией ингибиторов MEK и ERK, одних или в комбинации. Фосфорилирование RSK посредством ERK ингибируется. Прогрессирование клеточного цикла значительно снижается, что подтверждается уменьшением циклина D1 и увеличением p27. Усиленная гибель клеток (апоптоз) подтверждается повышенными уровнями расщепленного PARP.

Фиг. 4. Поверхность избытка по Блисссу, описывающая ингибирование синтеза ДНК в асинхронных экспоненциально растущих клетках A549, определенное посредством обработки клеток в 384-луночных планшетах указанными концентрациями каждого лекарственного средства в течение 48 ч. Для последних 2 ч обработки клетки обрабатывали 1 мкМ 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) для мечення вновь синтезированной ДНК. Клетки затем фиксировали и пермеабилizировали добавлением 2% параформальдегида и 0,02% Triton X-100 в ростовую среду на тридцать минут, с последующим флуоресцентным мечением включенного EdU посредством Alexa-Fluor 635 азиды согласно инструкциям изготовителей (Life Technologies, Eugene, OR) или контрастного окрашивания ДНК с использованием Hoechst 33342.

Изображения флуоресцентной микроскопии получали многопараметрической системой визуализации Perkin Elmer Opera. Долю клеток, меченных Edu, относительно общего числа клеток определяли с использованием программы анализа изображений Acapella.

Для определения возможных взаимодействий между обработками лекарственным средством наблюдаемый ответ для каждой пары концентраций сравнивали с ожидаемым ответом для двух не взаимодействующих агентов на основе аддитивности по Блисссу ($F_{a+b}=F_a+F_b-F_a \cdot F_b$, где F_a и F_b представляют собой долевые эффекты агентов а и b). Разница между наблюдаемым и прогнозируемым долевым эффектом называется избытком по Блисссу.

Фиг. 5. Обработка клеток NSCLC комбинациями ингибиторов MEKi (GDC-0973) и ERKi (GDC-0994). 19/29 протестированных линий клеток демонстрируют некоторый комбинированный эффект при использовании ERK плюс MEK. Все линии, не являющиеся мутантами Q61H Kras, демонстрируют некоторую чувствительность к комбинации. Не наблюдали комбинированных эффектов в двух линиях в панели с мутацией Braf.

На фиг. 6 показан график изменения среднего объема опухоли со временем у самок мышей Taconic nu/nu (голые) с ксенотрансплантатами опухоли -немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) NCI-H2122, которым ежедневно дозировали: носитель MCT (0,5% метилцеллюлоза/0,2% Tween 80), 60 мг/кг Формулы Ia (GDG-0994) и 5 мг/кг Формулы II (GDG-0973) (Фиг. 5а) или ежедневно дозировали 60 мг/кг Формулы Ia (GDG-0994) и 15 мг/кг каждые трое суток (Q3D, т.е. прерывистое дозирование) Формулы II (GDG-0973) (Фиг. 5б). Дозирование мышам осуществляли пероральным зондовым питанием. Фармакодинамические маркеры подтверждают ослабленный рост клеток (Фиг. 6в и 6г), что подтверждается уменьшением уровней циклина D1 и Ki67 и повышенным апоптозом (Фиг. 6д), доказываемым увеличением расщепленной каспазы 3 в ксенорентгенографическом анализе NSCLC H2122 KRAS.

На фиг. 7 показан график изменения среднего объема опухоли со временем у самок мышей Taconic nu/nu (голые) с ксенотрансплантатами опухоли -немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) NCI-H2122, которым ежедневно дозировали: носитель MCT (0,5% метилцеллюлоза/0,2% Tween 80), 100 мг/кг GDG-0994 и 5 мг/кг GDG-0973 (Фиг. 7а), ежедневно дозировали 100 мг/кг GDG-0994 и 4 мг/кг GDG-0973 (Фиг. 7б) или ежедневно дозировали 100 мг/кг GDG-0994 и 15 мг/кг каждые трое суток (Q3D, т.е. прерывистое дозирование) GDG-0973 (Фиг. 7в). Дозирование мышам осуществляли пероральным зондовым питанием.

На фиг. 8 показан график изменения среднего объема опухоли со временем у самок мышей Taconic nu/nu (голые) с ксенотрансплантатами опухоли -немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) A549, которым ежедневно дозировали: носитель MCT (0,5% метилцеллюлоза/0,2% Tween 80), 60 мг/кг формулы GDG-0994 и 5 мг/кг GDG-0973 (фиг. 8а) или ежедневно дозировали 60 мг/кг Формулы GDG-0994 и 15 мг/кг каждые трое суток (Q3D, т.е. прерывистое дозирование) GDG-0973 (фиг. 8б). Дозирование мышам осуществляли пероральным зондовым питанием.

На фиг. 9 показано обобщение эффективности GDG-0994 и GDG-0973 в исследовании эффективности комбинации варьирующих доз в линии клеток колоректального рака, выраженной как процент ингибирования роста опухоли. Ячейки с серым фоном показывают наилучшую эффективность для переносимой схемы. Ячейки с черным фоном показывают непереносимую комбинацию. Дозирование осуществляли ежедневным (QD) пероральным зондовым питанием (PO).

На фиг. 10 описана надежная противоопухолевая активность кобиметиниба и GDG-0994 в моделях GEM с мутацией KRAS аденокарциномы протока поджелудочной железы (PDAC) MJ.

Модели GEM с мутацией Kras, имеющие опухоль, обрабатывали носителем, GDC-0973 (5 мг/кг, PO, QD), GDC-0994 (60 мг/кг, PO, QD) или комбинацией GDC-0973 и GDC-0994. На фиг. 10а показаны каскадные диаграммы, описывающие процентное изменение объема опухоли от исходного уровня, основанное на ультразвуковой визуализации (сутки 0, сутки 7) в модели PDAC после 7-суточной обработки носителем (черный, n равно 8), кобиметинибом (зеленый, n равно 8), GDC-0994 (синий, n равно 8) и комбинацией (красный, n равно 9). Фиг. 10б - график Каплана-Майера общей выживаемости из модели PDAC от когорт обработки носителем (черный, n равно 13), гемцитабином (оранжевый, n равно 10), Мб (зеленый, n равно 9), GDC-0994 (синий, n равно 8) и комбинацией GDC-0994 и GDC-0973 (красный, n равно 13). Эффект обработки комбинацией является значимым относительно носителя, ** p меньше 0,0001, и гемцитабина, * p равно 0,0159, логранговый критерий.

Фиг. 11а. Жизнеспособность линий клеток, происходящих от KRAS^{G12D}, p16/19^{FL/FL} PDX-CRE, в присутствии GDC-0973, GDC-0994 и комбинаций GDC-0994 и GDC-0973, обусловленная усиленным подавлением пути MAPK. Фиг. 11б. PD (фармакодинамические) маркеры в линиях клеток, происходящих от KRAS^{G12D}, p16/19^{FL/FL} PDX-CRE, в присутствии GDC-0973, GDC-0994 и комбинаций GDC-0994 и GDC-0973.

Фиг. 12. Активность роста клеток при развитии, наблюдаемая при использовании комбинаций GDC-0994 и многочисленных ингибиторов MEK.

Фиг. 13. Оценка синергического ингибирования синтеза ДНК. Экспоненциально растущие клетки HCT116 (А, Б) и А549 (В, Г) обрабатывали указанными концентрациями GDC-0994 и GDC-0973 в течение 47 часов перед добавлением 5-этинил-2'-дезоксисуридина (Edu) в течение 60 мин, с последующей

фиксацией параформальдегидом и мечением ДНК, содержащей EdU, Alexa Fluor 647 азидом (Life Technologies, Madison WI). Общее число ядер, меченных Hoechst 33342, и долю ядер, меченных EdU, определяли автоматизированной флуоресцентной микроскопией и анализом изображений с использованием прибора Perkin Elmer Opera и программы Asapella.

А, В, Графики-изоболограммы. Линии соединяют точки равного ингибирования синтеза ДНК, достигаемого посредством разных комбинаций двух лекарственных средств. Толстая пунктирная диагональная линия показывает ожидаемую изоболу 50%-ного ингибирования, если комбинации соединений демонстрировали простую аддитивность согласно модели Loewe (N.Geary, Understanding synergy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. doi:10.1152/ajpendo.00308.2012).

Б, Г, Матрица доз анализа синергии, демонстрирующая: 1- наблюдаемое процентное изменение доли клеток, позитивных в отношении EdU, относительно контролей, обработанных DMSO, 2 - прогнозируемый эффект комбинаций лекарственного средства на основе модели аддитивности Loewe, применяемой к кривым доза-ответ для одного агента, 3 - различие между наблюдаемыми данными и прогнозируемыми аддитивными эффектами, числа, меньшие, чем ноль, показывали большее ингибирование синтеза ДНК, чем ожидалось для аддитивных лекарственных средств.

Данные анализировали с использованием модуля Compound Synergy Extension программы Genedata Screener (Genedata AG, Базель).

Подробное описание изобретения

Определения

Подразумевается, что слова "содержать", "содержащий", "включать", "включающий" и "включает", при использовании в данном описании изобретения и формуле изобретения, определяют присутствие изложенных характеристик, целых чисел, компонентов или стадий, но они не исключают присутствия или добавления одной или более чем одной характеристики, целого числа, компонента, стадии или их групп.

Термины "лечить" и "лечение" относятся к терапевтическому лечению, где целью является предупреждение или замедление (ослабление) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как рост, развитие или распространение ракового заболевания. Для целей данного изобретения полезные или желательные клинические результаты включают облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, уменьшение интенсивности или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (либо частичную, либо полную), или выявляемую, или невыявляемую, но не ограничиваются ими. "Лечение" также может означать продление выживания по сравнению с ожидаемым выживанием при отсутствии получения лечения. Нуждающиеся в лечении включают тех, которые уже имеют состояние или расстройство, например, пациента с раковым заболеванием.

Термин "ингибировать" означает уменьшать или снижать активность, функцию и/или количество по сравнению с контролем.

Фраза "терапевтически эффективное количество" означает количество, которое (i) лечит конкретное заболевание, состояние или расстройство, (ii) ослабляет, уменьшает интенсивность или устраняет один или более чем один симптом конкретного заболевания, состояния или расстройства, или (iii) предупреждает или задерживает начало одного или более чем одного симптома конкретного заболевания, состояния или расстройства, описанных в данном документе. В случае ракового заболевания терапевтически эффективное количество может уменьшать число раковых клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (например, в некоторой степени замедлять или предпочтительно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (например, в некоторой степени замедлять или предпочтительно останавливать) развитие метастазов опухоли; в некоторой степени ингибировать рост опухоли; и/или в некоторой степени облегчать один или более чем один симптом, ассоциированный с раковым заболеванием. В зависимости от степени, в которой комбинация может предупреждать рост и/или умерщвлять существующие раковые клетки, она может быть цитостатической и/или цитотоксической. Для терапии рака эффективность можно измерять, например, оценкой времени до прогрессирования заболевания (ТТР) и/или определением частоты ответа (RR).

Помимо предоставления улучшенного лечения для данного гиперпролиферативного расстройства, введение определенных комбинаций по изобретению может улучшать качество жизни для пациента по сравнению с качеством жизни, которое имеет тот же самый пациент, получающий другое лечение. Например, введение комбинации пациенту может обеспечивать улучшенное качество жизни по сравнению с качеством жизни, которое имел бы тот же самый пациент, если бы он получал только один из индивидуальных агентов в качестве терапии. Например, комбинированная терапия комбинацией, описанной в данном документе, может уменьшать необходимую дозу терапевтических агентов. Комбинированная терапия также может уменьшать или устранять потребность в применении химиотерапевтических агентов и побочные эффекты, ассоциированные с химиотерапевтическими агентами в высокой дозе (например, тошнота, рвота, потеря волос, сыпь, пониженный аппетит, потеря массы и т.д.). Комбинация также может вызывать уменьшение опухолевой массы и ассоциированных нежелательных явлений, таких как боль, дисфункция органа, потеря массы и т.д. Соответственно, в одном аспекте изобретения предложена

комбинация для терапевтического применения для улучшения качества жизни пациента, которого лечат от гиперпролиферативного расстройства агентом, описанным в данном документе.

Термины "рак" и "раковый" относятся к или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое типично характеризуется нерегулируемым ростом клеток. "Опухоль" содержит одну или более чем одну раковую клетку. Примеры ракового заболевания включают карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкозные или лимфоидные злокачественные заболевания, но не ограничиваются ими. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого ("NSCLC"), аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, печеночно-клеточный рак, рак желудочно-кишечного тракта или желудка, включая желудочно-кишечный рак, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки или почечный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, карциному ануса, саркому пениса, а также рак головы и шеи. Рак желудочно-кишечного тракта в том виде, в котором этот термин используется в данном документе, включает рак желудка, который может развиваться в любой части желудка и может распространяться по всему желудку и в другие органы, в частности, в пищевод, легкие, лимфатические узлы и в печень.

Термин "млекопитающее" включает людей, мышей, крыс, морских свинок, обезьян, собак, кошек, лошадей, коров, свиней, овец и домашнюю птицу, но не ограничивается ими. Термин "пациент" относится к млекопитающему и, в одном воплощении, пациент представляет собой человека мужского или чело- века женского пола.

Термин "синергический" в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к терапевтической комбинации, которая является более эффективной, чем аддитивные эффекты двух или более чем двух одиночных агентов. Определение синергического взаимодействия может быть основано на результатах, полученных из анализов, известных в данной области. Результаты данных анализов можно анализировать с использованием комбинированного способа Чоу (Chou) и Талалая (Talalay) и анализа доза-эффект программой CalcuSyn для того, чтобы получить показатель аддитивности (Chou and Talalay, Adv. Enzyme Regul. 1984 22:27-55). Комбинации, предложенные в данном документе, можно анализировать с использованием стандартной программы для количественного измерения синергии, аддитивности и антагонизма среди противораковых агентов. Типичной программой является программа, описанная Чоу и Талалаем, в "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy," Academic Press, 1987, глава 2. Значения показателя аддитивности меньше чем 0,8 указывают на синергию, значения больше чем 1,2 указывают на антагонизм, и значения от 0,8 до 1,2 указывают на аддитивные эффекты. Комбинированная терапия может обеспечивать "синергию" и оказываться "синергической", т.е. эффект, достигаемый при совместном применении активных ингредиентов больше, чем сумма эффектов, которые возникают из-за раздельного применения соединений. Синергический эффект может достигаться, когда активные ингредиенты: (1) совместно готовят в виде препарата и вводят или доставляют одновременно в комбинированной стандартной лекарственной форме; (2) доставляют поочередно или параллельно в виде отдельных композиций; или (3) посредством некоторой другой схемы. При доставке в поочередной терапии синергический эффект может достигаться, когда соединения вводятся или доставляются последовательно, например, посредством разных инъекций в отдельных шприцах. В общем, во время поочередной терапии эффективная дозировка каждого активного ингредиента вводится последовательно, т.е. серийно, тогда как при комбинированной терапии эффективные дозировки двух или более чем двух активных ингредиентов вводятся совместно. Комбинированные эффекты оценивали как с использованием модели независимости Бласса, так и модели наиболее эффективного одиночного агента (HSA) (Lehar et al. 2007, Molecular Systems Biology 3:80). Баллы по Блассу количественно оценивают степень потенцирования от одиночных агентов, и положительный балл по Блассу (большой чем 0) свидетельствует о более чем простой аддитивности. Совокупный положительный балл по Блассу, большой чем 250, считается сильной синергией, наблюдаемой в пределах протестированных концентрационных интервалов. Балл HSA (большой чем 0) свидетельствует об эффекте комбинации, большем, чем максимальные ответы на одиночные агенты в соответствующих концентрациях.

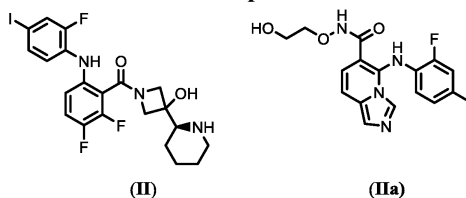
Способы измерения TGI (ингибирование роста опухоли) известны в данной области. В одном типичном способе измеряются средние объемы опухолей и сравниваются у пациента до и после лечения. Объемы опухолей можно измерять в двух измерениях (длина и ширина) с использованием любого способа, известного в данной области, например, циркулей UltraCal IV (компания Fred V. Fowler) или посредством PET (позитронно-эмиссионная томография), или некоторым другим способом. Можно использовать следующую формулу: объем опухоли (мм³) = (длина × ширина²) × 0,5. Измерения объемов опухоли на протяжении многих периодов времени можно делать с использованием подхода по смешанному моделированию линейных смешанных эффектов (LME) (Pinheiro et al. 2009). В данном подходе могут рассматриваться и повторные измерения (и многие пациенты). Для аппроксимации нелинейного профиля к ходу изменения объема опухоли во времени при каждом уровне дозы можно использовать полиноми-

альные кривые кубической регрессии. Данные нелинейные профили можно затем связывать с дозой в пределах смешанной модели. Ингибирование роста опухоли в зависимости от процента содержания носителя можно рассчитывать как процент площади под аппроксимированной кривой (AUC) в сутки в связи с носителем, используя следующую формулу:

$$\% \text{ TGI} = 100 \left[1 - \left(\frac{\text{AUC}_{\text{обработка/сутки}}}{\text{AUC}_{\text{носитель/сутки}}} \right) \right]$$

При использовании данной формулы значение TGI 100% указывает на стаз опухоли, большее чем примерно 1%, но меньшее, чем примерно 100% указывает на ингибирование роста опухоли, и большее чем примерно 100% указывает на регрессию опухоли.

Ингибиторы MEK



Настоящее изобретение относится к ингибиторам MEK и их применению в комбинированной терапии с ингибиторами HER3 и ингибиторами EGFR (рецептор эпидермального фактора роста). Ингибиторы MEK всесторонне рассматривались в обзорах (S. Price, Putative Allosteric MEK1 and MEK 2 inhibitors, Expert Opin. Ther. Patents, 2008 18(6):603; J.I. Trujillo, MEK Inhibitors: a patent review 2008-2010 Expert Opin. Ther. Patents 2011 21(7): 1045. Предпочтительно ингибитор MEK мог бы быть выбран из GDC-0973 (кобиметиниб), GDC-0623, AZD6244 (селуметиниб), AZD8330, BAY 86-9766 (рефаметиниб), GSK-1120212 (траметиниб), ARRY-162, MSC1936369, MK162, TAK733 и PD-325901. Наиболее предпочтительно ингибитор MEK представляет собой GDC-0973 (кобиметиниб) или GDC-0623.

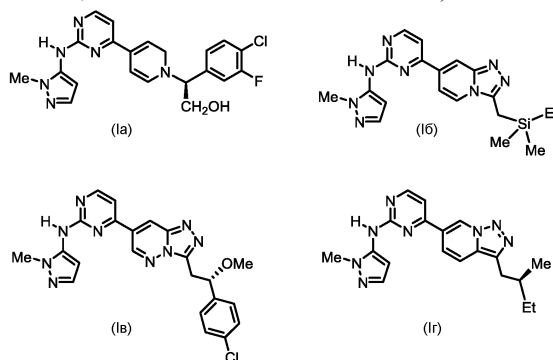
Кобиметиниб (GDC-0973, также именуемый в данном документе "Соединение II") представляет собой перорально доступный мощный и высокоселективный ингибитор MEK1 и MEK2, центральных компонентов пути RAS/RAF, и имеет противоопухолевую активность одного агента во многих моделях человеческого рака. GDC-0973 имеет химическое название [3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодфенил)амино]фенил][3-гидрокси-3-[(2S)-2-пиперидинил]-1-азетидинил]метанон. Кобиметиниб имеет следующий регистрационный номер CAS (Химическая реферативная служба): 934660-93-2.

GDC-0623 (также именуемый в данном документе соединение Ma) представляет собой перорально доступный, мощный и высокоселективный ингибитор MEK1 и MEK2, центральных компонентов пути RAS/RAF, и имеет противоопухолевую активность одного агента во многих моделях человеческого рака. GDC-0623 имеет химическое название 5-[(2-фтор-4-йодфенил)амино]-N-(2-гидроксиэтокси)-имидазо[1,5-a]пиридин-6-карбоксамид и имеет следующий регистрационный номер CAS 1168091-68-6.

Ингибиторы ERK

Ингибиторы ERK используются для лечения раковых заболеваний и гиперпролиферативных заболеваний. Соединения Ia-Ig ингибируют фосфорилирование ERK1 и ERK2 и имеют противоопухолевую активность одного агента во многих моделях человеческого рака. ERK является единственным известным субстратом для MEK1 и MEK2. Фосфорилирование ERK приводит к транслокации в ядро, где она фосфорилирует ядерные мишени и регулирует разные клеточные процессы, такие как пролиферация, дифференциация и прогрессия клеточного цикла (J. L. Yap et al., Chem. Med. Chem. 2011 6:38).

Приводился обзор ингибиторов ERK (K. Burkhard et al., Curr. Top. Med. Chem. 2009 9(8):678-689). Также были раскрыты пиразольные и индазольные ингибиторы ERK (D. Fairfax et al., WO2012094313; G.W. Shipps, Jr. et al., WO2012087772; G.W. Shipps, Jr. et al., WO2012036997 and Y. Deng et al., WO2012030685; A. M. Aronov et al., J. Med. Chem. 2009 52:6362-68).



Несмотря на недавние успехи в профилировании человеческих опухолей и конструировании низко- и высокомолекулярных лекарственных средств, приводящие к открытию направленно действующих те-

рапевтических средств, которые изменили историю заболеваний, против которых они были исходно разработаны, общие показатели успеха направленно действующих агентов в онкологии, однако, все еще довольно низкие, что может частично объясняться гетерогенностью многих раковых заболеваний, а также сложными путями, в которых задействованы мишени, которые включают многочисленные избыточные пути и взаимовлияние среди многих молекулярных путей.

Одним подходом к решению данной проблемы является лечение опухолей комбинацией направленно действующих агентов или комбинациями направленно действующих агентов и химиотерапевтических агентов. Это служит в качестве попытки достижения направленного действия на многие пути, которые независимо и совместно управляют пролиферацией во многих опухолях и обычно активируются в опухолях целым рядом геномных событий. Данный подход имеет двойную пользу: он имеет потенциал увеличивать исходную частоту ответа опухоли в опухолях, управляемых многими онкогенными событиями, а также снижать частоты приобретенной резистентности, которая могла бы происходить при использовании каждого агента поодиночке. Это обусловлено ингибированием активации компенсаторных путей, что в таком случае продлило бы активность комбинации по сравнению с активностью, наблюдаемой под влиянием каждого агента поодиночке.

Комбинированная обработка мутантных клеток K-ras ингибиторами MEK и ERK ингибировала разрастание резистентных клеток, тогда как обработка клеток с приобретенной резистентностью к ингибитору MEK ингибитором ERK эффективно блокировала пролиферацию (G Hatzivassiliou et al., *Mol. Cancer Ther.* 2012 11:1143-1154). В данном документе авторы изобретения продемонстрировали то, что одновременное ингибирование двух киназ в том же самом пути приводило к улучшенному ингибированию клетки.

Комбинация GDC-0994 и GDC-0973 приводила к синергическому подавлению роста клеток NSCLC KRAS A549 (Фиг. 5). Комбинация MEKi и ERKi приводила к замедлению клеточного цикла (пониженные уровни циклина D1 и повышенные уровни p27) и к усилению апоптоза (повышенные уровни расщепленного PARP и уровней в анализе пусELISA) (фиг. 2 и 3). Совместное введение двух агентов приводило к синергическому уменьшению пролиферации клеток, измеренной по сниженному синтезу ДНК (фиг. 4). Данный ингибирующий эффект также наблюдали *in vivo* в ксенотрансплантатах с клетками NSCLC H2122 (что также демонстрировало значимое уменьшение пролиферации клеток и увеличение апоптоза) (Фиг. 6в-6д) и NSCLC A549 (фиг. 6а и 6б, и 7а, 7б и 7в). Синергия также была продемонстрирована в модели GEMM (гранулоциты-эритроциты-макрофаги-мегакарициты) аденокарциномы протока поджелудочной железы с мутацией KRAS (Фиг. 10а и 10б), в которой были очевидными те же самые фармакодинамические маркеры (Фиг. 11а и 11б).

Синергию наблюдали со всеми ингибиторами MEKi, совместно введенными с GDC-0994 (Фиг. 12) и со всеми ERKi, совместно введенными с GDC-0973 (фиг. 1).

Согласно одному аспекту изобретения предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, с использованием комбинированной терапии, включающей введение ингибитора MEK и ингибитора ERK или фармацевтически приемлемой соли одного из них.

В одном воплощении ингибитор MEK комбинированной терапии представляет собой один из GDC-0973 или GDC-0623. GDC-0973 и GDC-0623 являются мощными и высокоселективными низкомолекулярными аллостерическими ингибиторами MEK 1/2, киназ, которые активируют ERK 1/2. Ингибирование MEK 1/2 представляет собой стратегию контроля роста опухолей, которые являются зависимыми от нарушенной сигнализации в пути MEK/ERK. Доклинические исследования продемонстрировали то, что оба ингибитора являются эффективными в ингибировании роста опухолевых клеток, имеющих активирующие мутации B-RAF, которые ассоциированы со многими типами опухолей, причем GDC-0973 демонстрирует большую активность в данной модели. Доклинические исследования продемонстрировали то, что оба ингибитора являются эффективными в ингибировании роста опухолевых клеток, имеющих активирующие мутации Ras, которые ассоциированы со многими типами опухолей, причем GDC-0623 демонстрирует большую активность в данной модели. Введение ингибитора MEK объединяют с ингибитором ERK. В конкретном воплощении ингибитор ERK выбран из Ia, Ib, Ic или Id.

Данная комбинированная терапия также служила бы для предупреждения или задержки проявления врожденной или приобретенной резистентности, приписываемой к активации пути RAS/RAF/MEK/ERK, наблюдаемой при ингибировании MEK, и для предупреждения или задержки проявления врожденной или приобретенной резистентности, опосредованной активацией пути RAS.

Данную комбинацию можно использовать в комбинации с химиотерапевтическими агентами для лечения гиперпролиферативного заболевания или расстройства, включающего опухоли, раковые заболевания и ткань новообразования, наряду с предзлокачественными и неопластическими или незлокачественными гиперпролиферативными расстройствами.

В некоторых воплощениях комбинацию объединяют в схеме дозировки в виде комбинированной терапии с другим соединением, которое имеет антипролиферативные свойства, или которое является полезным для лечения гиперпролиферативного расстройства. Дополнительное соединение схемы дозировки предпочтительно имеет дополнительные активности по отношению к комбинации, и такие, что они не оказывают вредного влияния друг на друга. Такие соединения могут вводиться в количествах,

которые являются эффективными для намеченной цели.

В одном воплощении терапевтическая комбинация вводится схемой дозировки, в которой терапевтически эффективное количество соединения-ингибитора MEK (такого как GDC-0973 или GDC-0623) или его фармацевтически приемлемой соли вводится в интервале от одного раза в сутки в течение трех недель до одного раза каждые трое суток (Q3D) в течение трех недель, и терапевтически эффективное количество соединения формулы Ia-Ig - один раз в сутки в течение трех недель.

Комбинированную терапию можно вводить в виде одновременной или последовательной схемы. При введении последовательно данную комбинацию можно вводить в двух или более чем двух введениях. Объединенное введение включает совместное введение с использованием отдельной композиции и последовательное введение в любом порядке, при котором предпочтительно имеет место период, когда оба (или все) активные агенты одновременно оказывают их биологические активности.

В одном воплощении изобретения гиперпролиферативное расстройство представляет собой рак.

В другом воплощении изобретения при раковом заболевании экспрессируется мутантный KRAS.

В другом воплощении настоящего изобретения MEKi представляет собой GDC-0973 (II).

В другом воплощении настоящего изобретения MEKi представляет собой GDC-0623 (IIa).

В другом воплощении настоящего изобретения MEKi представляет собой GSK-1120212 (траметиниб).

В другом воплощении настоящего изобретения MEKi представляет собой AZD-6244 (селуметиниб).

В другом воплощении настоящего изобретения MEKi представляет собой BAY 86-9766 (рефаметиниб).

В другом воплощении настоящего изобретения ERKi представляет собой соединение формулы Ia.

В другом воплощении настоящего изобретения ERKi представляет собой соединение формулы Ib.

В другом воплощении настоящего изобретения ERKi представляет собой соединение формулы Iv.

В другом воплощении настоящего изобретения ERKi представляет собой соединение формулы Ig.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения ракового заболевания комбинацией MEKi и ERKi, где указанное раковое заболевание или гиперпролиферативное расстройство выбрано из группы, состоящей из следующих: аденома, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак молочной железы, рак толстой кишки, эпидермальная карцинома, фолликулярная карцинома, рак мочевого тракта, глиобластома, лимфогранулематоз, раковые заболевания головы и шеи, гепатома, кератоакантома, рак почки, крупноклеточная карцинома, лейкозы, аденокарцинома легкого, рак легкого, лимфоидные расстройства, меланома и немеланомный рак кожи, миелодиспластический синдром, нейробластома, неходжкинская лимфома, рак яичника, папиллярная карцинома, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, саркома, мелкоклеточная карцинома, рак яичка, тетракарциномы, рак щитовидной железы и недифференцированная карцинома.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения ракового заболевания комбинацией MEKi и ERKi, где указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, рак легкого, мезотелиома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, глиома, рак желудка, рак почки, рак яичника, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения ракового заболевания комбинацией MEKi II и ERKi Ia, где указанное раковое заболевание или гиперпролиферативное расстройство выбрано из группы, состоящей из следующих: аденома, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак молочной железы, рак толстой кишки, эпидермальная карцинома, фолликулярная карцинома, рак мочевого тракта, глиобластома, лимфогранулематоз, раковые заболевания головы и шеи, гепатома, кератоакантома, рак почки, крупноклеточная карцинома, лейкозы, аденокарцинома легкого, рак легкого, лимфоидные расстройства, меланома и немеланомный рак кожи, миелодиспластический синдром, нейробластома, неходжкинская лимфома, рак яичника, папиллярная карцинома, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, саркома, мелкоклеточная карцинома, рак яичка, тетракарциномы, рак щитовидной железы и недифференцированная карцинома.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения ракового заболевания комбинацией MEKi II и ERKi Ia, где указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, рак легкого, мезотелиома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, глиома, рак желудка, рак почки, рак яичника, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения ракового заболевания комбинацией MEKi IIa и ERKi Ia, где указанное раковое заболевание или гиперпролиферативное заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: аденома, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак молочной железы, рак толстой кишки, эпидермальная карцинома, фолликулярная карцинома, рак мочевого тракта, глиобластома, лимфогранулематоз, раковые заболевания головы и шеи, гепатома, кератоакантома, рак почки, крупноклеточная карцинома, лейкозы, аденокарцинома легкого, рак легкого, лимфоидные расстройства, меланома и немеланомный рак кожи, миелодиспластический синдром, нейробластома, неходжкинская лимфома, рак яичника, папиллярная карцинома, рак поджелудочной железы, рак

предстательной железы, рак прямой кишки, саркома, мелкоклеточная карцинома, рак яичка, тетракарциномы, рак щитовидной железы и недифференцированная карцинома.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения ракового заболевания комбинацией MEK_i IIa и ERK_i Ia, где указанное раковое заболевание выбрано из группы состоящей из следующих: колоректальный рак, рак легкого, мезотелиома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, глиома, рак желудка, рак почки, рак яичника, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи.

В другом воплощении предложен способ лечения рака комбинацией II или IIa и Ia, которые вводятся сопутствующе.

В другом воплощении предложен способ лечения рака комбинацией II или IIa и Ia, которые вводятся последовательно.

В другом воплощении настоящего изобретения предложена композиция для лечения рака, содержащая GDC-0973 (II) или GDC-0623 (IIa), или их фармацевтически приемлемую соль, и ингибитор ERK, выбранный из Ia, Ib, Iv или Ig, или их фармацевтически приемлемой соли для лечения рака.

В другом воплощении настоящего изобретения предложена композиция для лечения рака, содержащая GDC-0973 (II) или его фармацевтически приемлемую соль, и ингибитор ERK, выбранный из Ia, Ib, Iv или Ig, или их фармацевтически приемлемой соли для лечения рака.

В другом воплощении настоящего изобретения предложена композиция для лечения рака, содержащая GDC-0973 (II) или GDC-0623 (IIa), или их фармацевтически приемлемую соль, и ингибитор ERK, выбранный из Ia, Ib, Iv или Ig, или их фармацевтически приемлемой соли для лечения ракового заболевания, где указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, рак легкого, мезотелиома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, глиома, рак желудка, рак почки, рак яичника, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи.

В другом воплощении настоящего изобретения предложена композиция для лечения рака, содержащая GDC-0973 (II) или его фармацевтически приемлемую соль, и ингибитор ERK, выбранный из Ia, Ib, Iv или Ig, или их фармацевтически приемлемой соли для лечения ракового заболевания, где указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, рак легкого, мезотелиома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, глиома, рак желудка, рак почки, рак яичника, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи.

В другом воплощении настоящего изобретения предложено применение MEK_i формулы II и ингибитора ERK формулы Ia для изготовления лекарственного средства для лечения рака или гиперпролиферативного заболевания.

В другом воплощении настоящего изобретения предложено применение MEK_i формулы II и ингибитора ERK формулы Ia для изготовления лекарственного средства для лечения рака.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен набор, содержащий GDC-0973 или GDC-0623, или их фармацевтически приемлемую соль, GDC-0994 или его фармацевтически приемлемую соль, контейнер и листок-вкладыш в упаковке или этикетку, на которых указано, что введение GDC-0973 или GDC-0623, или их фармацевтически приемлемой соли и GDC-0994 предназначено для лечения рака.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен продукт, содержащий GDC-0973 или GDC-0623, или их фармацевтически приемлемую соль, и GDC-0994 или его фармацевтически приемлемую соль, в виде комбинированного препарата для раздельного, одновременного или последовательного применения в лечении рака.

В другом воплощении настоящего изобретения предложена комбинация GDC-0973 или GDC-0623, или их фармацевтически приемлемой соли и ингибитора ERK для терапевтического лечения рака.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения рака или гиперпролиферативного заболевания, где каждый из GDC-0973 или его фармацевтически приемлемой соли, или GDC-0623, или его фармацевтически приемлемой соли и GDC-0994 вводится в количестве от примерно 1 мг до примерно 1000 мг на стандартную лекарственную форму.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения рака или гиперпролиферативного заболевания, в котором GDC-0973 или его фармацевтически приемлемая соль вводится в дозе 60 мг в сутки 1-21 28-суточного цикла, и GDC-0994 или его фармацевтически приемлемая соль вводится в количестве от примерно 1 мг до примерно 1000 мг на стандартную лекарственную форму.

В другом воплощении настоящего изобретения предложен способ лечения ракового или гиперпролиферативного заболевания комбинацией GDC-0973 и GDC-0994, в котором GDC-0973 вводится один раз или дважды в сутки в течение трех недель четырехнедельного цикла в дозе от 3 мг/кг до 7,5 мг/кг, и GDC-0994 вводится один раз или дважды в сутки в течение трех недель четырехнедельного цикла в дозе от 25 мг/кг до 75 мг/кг.

Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции или препараты по настоящему изобретению включают комбинации, описанные в данном документе.

Соединение или его фармацевтически приемлемая соль также могут существовать в разных таутомерных формах, и все такие формы охвачены в пределах объема изобретения. Термин "таутомер" или

"таутомерная форма" относится к структурным изомерам разных энергий, которые взаимопревращаются через малый энергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают взаимопревращения через миграцию протона, такие как кето-енольные и имин-енаминные изомеризации. Валентные таутомеры включают взаимопревращения посредством реорганизации некоторых связывающих электронов.

Фармацевтические композиции охватывают и объемную композицию, и индивидуальные единицы дозирования, состоящие из более чем одного (например, двух) фармацевтически активных агентов, наряду с любыми фармацевтически неактивными эксципиентами, разбавителями, носителями или скользящими веществами. Объемная композиция и каждая индивидуальная единица дозирования может содержать фиксированные количества вышеуказанных фармацевтически активных агентов. Объемная композиция представляет собой вещество, которое еще не было превращено в индивидуальные единицы дозирования. Иллюстративной единицей дозирования является пероральная единица дозирования, такая как таблетки, пилюли, капсулы и тому подобное. Аналогичным образом, также подразумевается, что описанный в данном документе способ лечения пациента путем введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению охватывает введение объемной композиции и индивидуальных единиц дозирования.

Фармацевтически приемлемые соли соединений готовят согласно стандартной фармацевтической практике для применения в терапевтической комбинации для терапевтического лечения гиперпролиферативных расстройств (таких как рак, таких как тройной негативный рак молочной железы) у млекопитающих, включая человека (таких как люди мужского и женского пола). Согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, как описано в данном документе, в ассоциации с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым носителем, скользящим веществом, разбавителем или эксципиентом.

Подходящие носители, разбавители и эксципиенты хорошо известны специалистам в данной области и включают такие вещества, как углеводы, воска, водорастворимые и/или набухающие полимеры, гидрофильные или гидрофобные вещества, желатин, масла, растворители, воду и тому подобное. Конкретный используемый носитель, разбавитель или эксципиент будет зависеть от средств и цели, для которой применяется соединение по настоящему изобретению. Растворители обычно выбирают на основе растворителей, известных специалистам в данной области как безопасные (GRAS), подлежащие введению млекопитающему. В общем, безопасными растворителями являются нетоксичные водные растворители, такие как вода и другие нетоксичные растворители, которые являются растворимыми в воде или смешиваются с водой. Подходящие водные растворители включают воду, этанол, пропиленгликоль, полиэтиленгликоли (например, PEG 400, PEG 300) и т.д., и их смеси. Композиции также могут включать один или более чем один буфер, стабилизирующий агент, поверхностно-активное вещество, увлажнитель, смазывающий агент, эмульгатор, суспендирующий агент, консервант, антиоксидант, агент, обеспечивающий непрозрачность, скользящее вещество, вспомогательное вещество для переработки, краситель, подсластитель, ароматизирующую добавку, корригент и другие известные добавки для обеспечения привлекательного вида лекарственного средства (т.е. соединения по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции) или содействия в изготовлении фармацевтического продукта (т.е. лекарственного средства).

Фармацевтическая композиция (или препарат) для введения может быть упакована целым рядом способов, в зависимости от способа, используемого для введения лекарственного средства. В общем, распространяемое изделие включает контейнер, содержащий помещенную в него фармацевтическую композицию в подходящей форме. Подходящие контейнеры хорошо известны специалистам в данной области и включают такие материалы, как бутылки (пластмассовые и стеклянные), пакетики, ампулы, пластмассовые мешки, металлические цилиндры и тому подобное. Контейнер также может включать блок, предохраняющий от неумелого обращения, для предотвращения неосторожного доступа к содержимому упаковки. Кроме того, контейнер имеет этикетку, наложенную на него, на которой описано содержание контейнера. Этикетка также может включать подходящие предупреждения.

Фармацевтические композиции будут дозироваться и вводиться способом, например, в количествах, концентрациях, схемах, курсе, носителях и пути введения, согласующихся с надлежащей медицинской практикой. Факторы для рассмотрения в данном контексте включают конкретное расстройство, которое лечат, конкретного млекопитающего, которого лечат, клиническое состояние индивидуального пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим врачам. "Терапевтически эффективное количество", подлежащее введению, будет определяться такими соображениями, и представляет собой минимальное количество, необходимое для предупреждения, уменьшения интенсивности или лечения расстройства, опосредованного фактором свертывания. Такое количество предпочтительно меньше количества, которое является токсичным для хозяина или делает хозяина значительно более чувствительным к кровотечению.

Композиции комбинаций, подходящие для перорального введения, можно получать в виде дискретных единиц, таких как пилюли, твердые или мягкие, например, желатиновые капсулы, крахмальные облатки, лепешки, леденцы, водные или масляные суспензии, диспергируемые порошки или гранулы,

эмульсии, сиропы или эликсиры, причем каждый содержит заданное количество GDC-0973 и GDC-0623 или его фармацевтически приемлемой соли; и ингибитор ERK формулы Ia-Ig. Количество GDC-0973 или GDC-0623 и Ia-Ig или их фармацевтически приемлемой соли может быть приготовлено в пилюле, капсуле, растворе или суспензии в виде объединенной композиции. В качестве альтернативы, данная комбинация может быть приготовлена по отдельности в пилюле, капсуле, растворе или суспензии для введения поочередно.

Композиции могут быть получены согласно любому способу, известному в области изготовления фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или более чем один агент, включающий подсластители, корригенты, красители и консерванты, для получения препарата с привлекательным вкусом. Прессованные таблетки можно получать прессованием в подходящей машине активного ингредиента в свободно сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, возможно в смеси со связующим веществом, смазкой, инертным разбавителем, консервантом, поверхностно-активным веществом или диспергирующим агентом. Отлитые таблетки можно делать путем отливки в подходящей машине смеси порошкового активного ингредиента, увлажненного инертным жидким разбавителем. Таблетки возможно можно покрывать или наносить на них риски и возможно готовить так, чтобы обеспечивать медленное или контролируемое высвобождение из них активного ингредиента. Эксципиенты таблеток фармацевтической композиции могут включать: наполнитель (или разбавитель) для увеличения сыпного объема порошкового лекарственного средства, составляющего таблетку; разрыхлители для стимуляции распада таблетки на маленькие фрагменты, в идеале - индивидуальные частицы лекарственного средства, при ее проглатывании и стимуляции быстрого растворения и поглощения лекарственного средства; связующее вещество для обеспечения того, чтобы могли образоваться гранулы и таблетки с требующейся механической прочностью и сохранения целостной таблетки после ее прессования, предупреждая ее распад на составляющие ее порошки во время упаковки, доставки и обычного обращения с ней; скользящее вещество для улучшения сыпучести порошка, составляющего таблетку, во время производства; смазывающее вещество для обеспечения того, чтобы таблетлируемый порошок не прилипал к оборудованию, используемому для прессования таблетки во время изготовления. Они улучшают сыпучесть порошковых смесей через прессы и минимизируют трение и распад, когда готовые таблетки выбрасываются из оборудования; противоадгезивное средство с функцией, аналогичной функции скользящего вещества, уменьшающее прилипание между порошком, составляющим таблетку, и машиной, которая используется для выштамповывания формы таблетки во время изготовления; корригент, включенный в таблетки для придания им более приятного вкуса или для маскировки неприятного вкуса, и краситель для помощи в идентификации и соблюдении пациентом схемы и режима лечения.

Приемлемыми являются таблетки, содержащие активный ингредиент в смеси с нетоксичным фармацевтически приемлемым эксципиентом, который подходит для изготовления таблеток. Данные эксципиенты могут представлять собой, например, инертные разбавители, такие как карбонат кальция или натрия, лактозу, фосфат кальция или натрия; грануляторы и разрыхлители, такие как кукурузный крахмал или альгиновая кислота; связующие агенты, такие как крахмал, желатин или аравийская камедь; и смазывающие агенты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота или тальк. Таблетки могут быть непокрытыми или могут быть покрыты известными методиками, включающими микроинкапсулирование для задержки распада и поглощения в желудочно-кишечном тракте и, посредством этого, обеспечения длительного действия на протяжении более длительного периода. Например, может быть использовано вещество, обеспечивающее задержку высвобождения во времени, такое как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, одно или с воском.

Масляная фаза эмульсий по данному изобретению может быть составлена из известных ингредиентов известным способом, включающим получение смеси по меньшей мере одного эмульгатора с жиром или маслом, или как с жиром, так и с маслом. Предпочтительно гидрофильный эмульгатор включен совместно с липофильным эмульгатором, который действует в качестве стабилизатора. Совместно эмульгатор(ы) с или без стабилизатора(ров) составляют эмульгирующий воск, и данный воск совместно с маслом и жиром составляют эмульгирующую основу мази, которая образует масляную дисперсную фазу композиций в виде крема. Эмульгаторы и стабилизаторы эмульсий, подходящие для применения в композиции, включают Tween® 60, Span® 80, цетостеариловый спирт, бензиловый спирт, миристиловый спирт, глицерилмоностеарат и лаурилсульфат натрия.

Водные суспензии фармацевтических композиций содержат активные вещества в смеси с подходящими эксципиентами для изготовления водных суспензий. Такие эксципиенты включают суспендирующий агент, такой как натрия карбоксиметилцеллюлоза, кроскармеллоза, повидон, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь, и диспергирующий агент или увлажнитель, такой как встречающийся в природе фосфатид (например, лецитин), продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой (например, полиоксиэтиленстеарат), продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим спиртом (например, гептадекаэтиленоксицетанол), продукт конденсации этиленоксида с частичным сложным эфиром, происходящим из жирной кислоты и ангидрида гексита (например, полиоксиэтиленсорбитана моноолеат). Водная суспензия также может содержать один или более чем один консервант, такой как этил-

или н-пропил-п-гидроксibenзоат, один или более чем один краситель, один или более чем один корригент и один или более чем один подсластитель, такой как сахароза или сахарин.

Количество(ва) активного(ных) ингредиента(тов), которое(рые) можно объединять с веществом-носителем с получением одной лекарственной формы, будет варьировать, в зависимости от хозяина, которого лечат, и конкретного способа введения. Например, композиция с регулируемым во времени высвобождением, предназначенная для перорального введения человеку, может содержать приблизительно от 1 до 1000 мг активного вещества, приготовленного с подходящим и удобным количеством вещества-носителя, которое может варьировать от примерно 5 до примерно 95% от полных композиций (масс/масс). Фармацевтическую композицию можно приготовить так, чтобы она давала легко измеримые количества для введения. Например, водный раствор, предназначенный для внутривенной инфузии, может содержать от примерно 3 до 500 мкг активного ингредиента на миллилитр раствора для того, чтобы могла происходить инфузия подходящего объема со скоростью примерно 30 мл/ч.

Изделия

В другом воплощении изобретения предложено изделие или "набор", содержащий полезную комбинацию для лечения заболеваний и расстройств, описанных выше. В одном воплощении набор содержит контейнер и комбинацию, описанную в данном документе.

Данный набор может дополнительно содержать этикетку или листок-вкладыш в упаковке на или ассоциированный с контейнером. Термин "листок-вкладыш в упаковке" используется для названия инструкций, традиционно включаемых в имеющиеся в продаже упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждения относительно применения таких терапевтических продуктов. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, блистерную упаковку и т.д. Контейнер может быть образован из целого ряда материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер может вмещать комбинацию или ее препарат, которая является эффективной для лечения состояния, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой мешок с внутривенным раствором или флакон, имеющий пробку, проницаемую подкожной инъекционной иглой). На этикетке или листке-вкладыше в упаковке указано то, что композиция используется для лечения выбранного состояния, такого как рак. В одном воплощении на этикетке или листках-вкладышах в упаковке указано то, что композицию, содержащую комбинацию, можно использовать для лечения расстройства, возникающего из-за ненормального роста клеток. На этикетке или листке-вкладыше в упаковке также может быть указано то, что композицию можно использовать для лечения других расстройств. В качестве альтернативы или дополнительно, изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекции (BFWI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Оно может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой или пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Данный набор может дополнительно содержать указания для введения комбинации и, при ее наличии, второй фармацевтической композиции. Например, если набор содержит первую композицию, содержащую GDC-0973 или GDC-0623 или их фармацевтически приемлемую соль, и вторую фармацевтическую композицию, содержащую ингибитор ERK или его фармацевтически приемлемую соль, данный набор может дополнительно содержать указания для одновременного, последовательного или раздельного введения первой и второй фармацевтических композиций пациенту, нуждающемуся в этом.

В другом воплощении наборы подходят для доставки твердых пероральных форм комбинации, таких как таблетки или капсулы. Такой набор предпочтительно включает целый ряд единичных дозровок. Такие наборы могут включать карточку, на которой имеются дозировки, указанные в порядке их назначенного применения. Примером такого набора является "блистерная упаковка". Блистерные упаковки хорошо известны в упаковочной промышленности и широко используются для упаковки фармацевтических стандартных лекарственных форм. Если это желательно, может быть предоставлена памятка, например, в виде чисел, букв или других отметок, или со вставкой календаря, с обозначением суток в схеме лечения, в которые можно вводить дозировки.

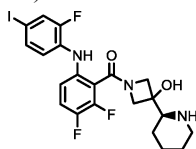
Согласно одному воплощению набор может содержать: (а) первый контейнер с GDC-0973 или GDC-0623, (б) второй контейнер с ингибитором ERK или его фармацевтически приемлемой солью, содержащейся в нем, и (в) третий контейнер с третьей фармацевтической композицией, содержащейся в нем, где третья фармацевтическая композиция содержит другое соединение с антигиперпролиферативной активностью. В качестве альтернативы или дополнительно данный набор может дополнительно содержать третий контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекции (BFWI), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой или пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Когда набор содержит композицию GDC-0973 или GDC-0623, или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор ERK или его фармацевтически приемлемую соль, данный набор может включать контейнер для содержания отдельных композиций, такой как разделенная бутылка или разделенный пакет

из фольги, однако, отдельные композиции также могут содержаться в одном, неразделенном контейнере. Типично данный набор содержит указания для введения отдельных компонентов. Форма набора является особенно полезной, когда отдельные компоненты предпочтительно вводятся в разных лекарственных формах (например, пероральной и парентеральной), вводятся с разными интервалами дозирования, или когда согласно выписавшему рецепт врачу желательным является титрование индивидуальных компонентов комбинации.

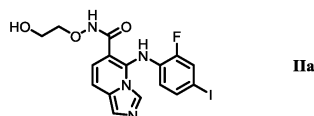
Фраза "фармацевтически приемлемая соль" в том виде, в котором она используется в данном документе, относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по изобретению. Типичные соли включают сульфатные, цитратные, ацетатные, оксалатные, хлоридные, бромидные, йодидные, нитратные, бисульфатные, фосфатные, кислые фосфатные, изоникотинатные, лактатные, салицилатные, кислые цитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, фумаратные, глюконатные, глюкуро-натные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные "мезилатные", этансульфонатные, бензолсульфонатные, п-толуолсульфонатные и памоатные (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли, но не ограничиваются ими. Фармацевтически приемлемая соль может включать включение другой молекулы, такой как ацетатный ион, сукцинатный ион или другой противоион. Противоион может представлять собой любую органическую или неорганическую группировку, которая стабилизирует заряд на родительском соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более чем один заряженный атом в ее структуре. Примеры, когда многие заряженные атомы являются частью фармацевтически приемлемой соли могут иметь многочисленные противоионы. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более чем один заряженный атом и/или один или более чем один противоион.

Справочный пример 1. (S)-(3,4-Дифтор-2-((2-фтор-4-йодфенил)амино)фенил)(3-гидрокси-3-(пиперидин-2-ил)азетидин-1-ил)метанон (GDC-0973)



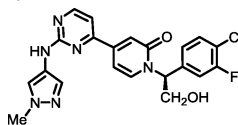
Соединение, указанное в заголовке, можно получать, как описано К. D. Rice, et al., ACS Med. Chem. Lett. 2012 3:416-421 в примере 22 WO2007044515 или, в качестве альтернативы, как описано К. D. Rice et al., Novel Carboxamide-Based Allosteric MEK inhibitors: Discovery and Optimization Efforts toward XL518 (GDC-0973), Med. Chem. Lett. 2012 3:416.

Справочный пример 2. 5-[(2-Фтор-4-йодфенил)амино]-N-(2-гидроксиэтокси)имидазо[1,5-a]пиридин-6-карбоксамид



Соединение, указанное в заголовке, можно получать, как описано в примере 5 WO2009085983.

Справочный пример 3. (S)-1-(1-(4-Хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-4-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-он



4-(2-(Метилтио)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-он.

Стадия 1. Суспензию 4-бром-2-(метилтио)пиримидина (7,00 г, 34,1 ммоль), 2-фторпиридин-4-илбороновой кислоты (5,05 г, 35,8 ммоль), Na₂CO₃ (10,9 г, 102 ммоль) и Pd(dppf)Cl₂ CH₂Cl₂ (1,40 г, 1,71 ммоль) в диоксане/H₂O (100 мл; 1:1) нагревали до 85°C под баллоном с Ar в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до RT (комнатная температура) и концентрировали. Остаток разбавляли этилацетатом (200 мл) и водой (100 мл). Слои разделяли, и водный слой экстрагировали этилацетатом (1X). Органические соединения сушили, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии, элюируя гексанами/этилацетатом (3:1), с получением 4-(2-фторпиридин-4-ил)-2-(метилтио)пиримидина (6,83 г, 90%) в виде твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, (CD₃)₂SO) δ 8.85 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8.46 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8.11 (m, 1H), 7.96 (d, J=5,2 Гц, 1H), 7.92 (s, 1H), 2.62 (s, 3H); m/z (ХИАД-пол.) (химическая ионизация при атмосферном давлении в режиме определения положительных ионов) M+1 = 222,1.

Стадия 2. Суспензию 4-(2-фторпиридин-4-ил)-2-(метилтио)пиримидина (6,83 г, 30,9 ммоль) в 2 н. HCl (100 мл) нагревали до температуры флегмообразования в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и помещали в баню со льдом. pH подвели примерно до 7 2 н. NaOH

(примерно 100 мл). Образующиеся твердые вещества собирали фильтрованием, промывали водой и сушили с получением 4-(2-(метилтио)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-она (5,07 г) в виде твердого вещества. Данное вещество помещали в муфту установки Soxhlet и присоединяли к 1 л колбе, загруженной этилацетатом (500 мл). Вещество непрерывно экстрагировали в течение 3 суток. Образующийся белый осадок из слоя этилацетата собирали фильтрованием (3,3 грамма, выход 49%). ^1H ЯМР (400 МГц, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 11.85 (br, s, 1H), 8.75 (d, $J=5,0$ Гц, 1H), 7.79 (d, $J=5,0$ Гц, 1H), 7.54 (d, $J=7,0$ Гц, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.86 (d, $J=7,0$ Гц, 1H), 2.58 (s, 3H); m/z (ХИАД-пол.) $M+1 = 220,0$.

(R)-2-(трет-Бутилдиметилсилилокси)-1-(4-хлор-3-фторфенил) этилметансульфонат.

Стадия 1. Гидрид натрия (8,549 г, 213,7 ммоль, 60%-ная суспензия в минеральном масле) добавляли частями в холодный (0°C) раствор 4-хлор-3-фторбензальдегида (26,07 г, 164,4 ммоль) и метилтрифенилфосфония бромида (70,48 г, 197,3 ммоль) в THF (тетрагидрофуран) (400 мл). Реакционной смеси давали нагреться до RT в течение ночи. Твердые вещества удаляли фильтрованием, и осадок на фильтре промывали эфиром. Фильтрат концентрировали (водная баня с температурой примерно 20°C), и остаток суспендировали в гексанах и перемешивали в течение 30 мин. Твердые вещества (главным образом PPh_3O) удаляли фильтрованием, и осадок на фильтре промывали гексанами. Фильтрат концентрировали, и неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией, элюируя гексанами/этилацетатом (25:1) с получением 1-хлор-2-фтор-4-винилбензола (12,1 г, 47%) в виде масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7.33 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 7.10 (m, 1H), 6.63 (m, 1H), 5.74 (d, $J=17,4$ Гц, 1H), 5.32 (d, $J=10,8$ Гц, 1H).

Стадия 2. 1-Хлор-2-фтор-4-винилбензол (12,1 г, 77,3 ммоль) добавляли в холодный (0°C) раствор AD-mix-p (108 г, 139 ммоль) в $m\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (600 мл, 1:1), и давали данной смеси нагреться до RT в течение ночи. На следующие сутки реакционную смесь помещали в баню со льдом и гасили твердым Na_2SO_3 (114 г). Данную смесь перемешивали в течение 1 ч и затем экстрагировали этилацетатом (3×500 мл). Объединенные органические соединения сушили, фильтровали и концентрировали с получением (R)-1-(4-хлор-3-фторфенил)этан-1,2-диола в виде масла. Неочищенный продукт использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия 3. Имидазол (13,1 г, 193 ммоль) добавляли в холодный (0°C) раствор (R)-1-(4-хлор-3-фторфенил)этан-1,2-диола (14,7 г, 77,1 ммоль) в DCM (дихлорметан) (100 мл), с последующим добавлением TBSCl (12,8 г, 84,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и затем гасили водой (50 мл). Слои разделяли, и органические соединения сушили, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией, элюируя гексанами/этилацетатом (100:1) с получением (R)-2-(трет-бутилдиметилсилилокси)-1-(4-хлор-3-фторфенил)этанола (11,0 г, 47% за два этапа). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7.36 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.08 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 2.96 (d, $J=2,6$ Гц, 1H), 0.90 (s, 9H), 0.07 (s, 3H), 0.06 (s, 3H).

Стадия 4. Триэтиламин (2,09 мл, 15,0 ммоль) добавляли в холодный (0°C) раствор (R)-2-(трет-бутилдиметилсилилокси)-1-(4-хлор-3-фторфенил)этанола (3,05 г, 10,0 ммоль) в DCM (100 мл), с последующим добавлением метансульфонилхлорида (0,929 мл, 12,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин и затем гасили водой (50 мл). Слои разделяли, и органический слой промывали насыщенным NaHCO_3 , сушили, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии, элюируя гексанами/этилацетатом (25:1) с получением (R)-2-(трет-бутилдиметилсилилокси)-1-(4-хлор-3-фторфенил) этилметансульфоната (3,80 г, 99%) в виде масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7.42 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 5.50 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 2.98 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H), 0.04 (s, 3H).

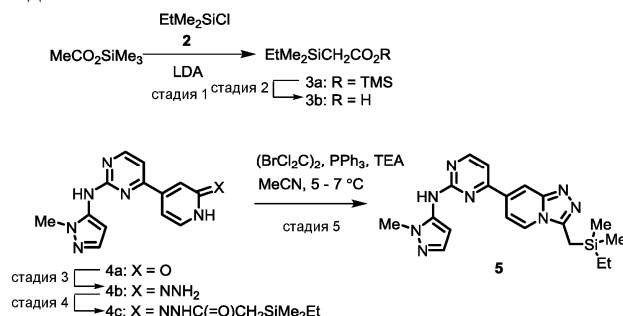
(S)-1-(2-(трет-Бутилдиметилсилилокси)-1-(4-хлор-3-фторфенил)этил)-4-(2-(метилсульфонил)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-он.

Стадия 1. 1,0 M KHMDS (бис(триметилсилил)амид калия) (5,09 мл, 5,09 ммоль) в виде раствора в THF добавляли в холодную (0°C) суспензию 4-(2-(метилтио)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-она (0,93 г, 4,24 ммоль) в THF (тетрагидрофуран) (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 мин перед добавлением (R)-2-(трет-бутилдиметилсилилокси)-1-(4-хлор-3-фторфенил)этилметансульфоната (2,44 г, 6,36 ммоль) в виде раствора в THF (5 мл). Реакционную смесь нагревали до температуры флегмообразования в течение 30 ч и затем охлаждали до RT и концентрировали. Остаток отбирали в этилацетат (200 мл) и промывали водой. Органические вещества сушили, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии, элюируя гексанами/этилацетатом (4:1) с получением (S)-1-(2-(трет-бутилдиметилсилилокси)-1-(4-хлор-3-фторфенил)этил)-4-(2-(метилтио)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-она (1,35 г, 63%) в виде твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8.66 (d, $J=5,0$ Гц, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.34 (d, $J=5,0$ Гц, 1H), 7.32-7.28 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.24 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 2.65 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), -0.03 (s, 3H); m/z (ХИАД-пол.) $M+1 = 506,1$, 508,1.

Стадия 2. mCPBA (мета-хлорпербензойная кислота) (7,1 г, 29 ммоль) добавляли в холодный (0°C) раствор (S)-1-(2-(трет-бутилдиметилсилилокси)-1-(4-хлор-3-фторфенил)этил)-4-(2-(метилтио)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-она (5,8 г, 11 ммоль) в DCM (100 мл), и перемешивали данную смесь в течение 2 ч. Реакционную смесь промывали насыщенным $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 $\times$), NaHCO_3 (1 $\times$), сушили, фильтровали и

упаривали. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии, элюируя гексанами/этилацетатом (1:1) с получением (S)-1-(2-(трет-бутилдиметилсилилокси)-1-(4-хлор-3-фторфенил)этил)-4-(2-(метилсульфонил)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-она (5,5 г, 89%) в виде твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9.06 (d, $J=5,2$ Гц, 1H), 7.91 (d, $J=5,4$ Гц, 1H), 7.55 (d, $J=7,4$ Гц, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.32 (d, $J=2,4$ Гц, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.22 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.24 (m, 1H), 3.45 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), -0.03 (s, 3H); m/z (ХИАД-пол.) $M+1 = 538, 1, 540, 0$.

Справочный пример 4. 4-[3-[[Этил(диметил)силил]метил]-[1,2,4]триазоло[4,3-а]пиридин-7-ил]-N-(2-метилпиразол-3-ил)пиримидин-2-амин



2-(Этилдиметилсилил)уксусная кислота (4).

В раствор THF (40 мл) и LDA (диизопропиламид лития) (8,8 мл, 17,5 ммоль), охлажденный до -78°C , медленно добавляли триметилсилилацетат (2,0 г, 15,1 ммоль). Данную смесь перемешивали при -78°C в течение 2 ч. Добавляли хлор(этил)диметилсилан (2,1 г, 17,5 ммоль), и образующийся раствор перемешивали в течение 2 ч. Смесь гасили рассолом (10 мл), затем медленно добавляли HCl (10 мл, 1н.), и образующийся раствор экстрагировали MTBE (метил-трет-бутиловый эфир) (3×20 мл). Объединенные экстракты сушили, концентрировали и остаток очищали SiO_2 хроматографией, элюируя EtOAc/гексаном (1:10) с получением 1,0 г (45%) 2-(этилдиметилсилил)уксусной кислоты в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ = 1.80 (s, 1H), 0.84 (t, $J=8,0$ Гц, 3H), 0.50 (q, $J=8,0$ Гц, 2H), 0.00 (s, 6H).

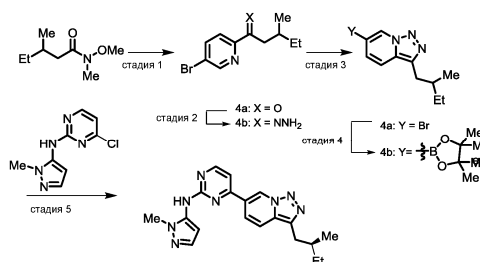
(Z)-2-(Этилдиметилсилил)-N'-(4-(2-((1-метил-1H-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-илиден)ацетогидразид (7).

К 2-хлор-1-метилпиридин-1-ил (1,36 г, 5,3 ммоль) в DCM (10 мл) добавляли (Z)-4-(2-гидразоно-1,2-дигидропиридин-4-ил)-N-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин (1,3 г, 4,6 ммоль) и 2-(этилдиметилсилил)уксусную кислоту (0,67 г, 4,6 ммоль), с последующим добавлением трибутиламина (1,96 г, 10,6 ммоль). Данную смесь перемешивали при $60-80^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Смесь концентрировали, очищали на колонке SiO_2 , элюируя EtOAc, затем DCM/MeOH (10:1), с получением (Z)-2-(этилдиметилсилил)-N'-(4-(2-((1-метил-1H-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-илиден)ацетогидразида (1,1 г, 44%) в виде желтого твердого вещества.

4-(3-((Этилдиметилсилил)метил)-[1,2,4]триазоло[4,3-а]пиридин-7-ил)-N-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин (GNT D379 285-1).

Колбу загружали (Z)-2-(этилдиметилсилил)-N'-(4-(2-((1-метил-1H-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-илиден)ацетогидразидом (7) (500 мг, 1,22 ммоль) и 1,2-дибромтетрахлорэтаном (793 мг, 2,44 ммоль), затем добавляли CH_3CN (20 мл), с последующим порционным добавлением PPh_3 (798 мг, 3,0 ммоль). Данную смесь перемешивали при $5-7^\circ\text{C}$ в течение 1 ч, затем добавляли по каплям TEA (триэтиламин) (1,0 мл), и образующуюся смесь перемешивали при $5-7^\circ\text{C}$ в течение 2 ч. Смесь фильтровали, фильтрат концентрировали, очищали SiO_2 хроматографией, элюируя EtOAc, затем MeOH/DCM (1:20), с получением неочищенного вещества (200 мг), которое промывали EtOAc и MeOH (три раза) с получением 4-(3-((Этилдиметилсилил)метил)-[1,2,4]триазоло[4,3-а]пиридин-7-ил)-N-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин (GNT_D379_285-1) (73 мг, 15%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 9.58 (s, 1H), 8.60 (d, $J=5,2$ Гц, 1H), 8.56 (d, $J=7,6$ Гц, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.68 (d, $J=5,2$ Гц, 1H), 7.59 (d, $J=7,6$ Гц, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.60 (s, 2H), 0.88 (t, $J=8,0$ Гц, 3H), 0.58 (t, $J=8,0$ Гц, 2H), 0.05 (s, 6H); МС (масс-спектрометрия) $[M+H]^+ = 392, 19$.

Справочный пример 5. 4-[3-(2-Метилбутил)триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил]-N-(2-метилпиразол-3-ил)пиримидин-2-амин



1-(5-Бромпиридин-2-ил)-3-метилпентан-1-он.

Раствор 2,5-дибромпиридина (3,72 г, 15,8 ммоль) в толуоле (30 мл) охлаждали до -40°C , и добавляли по каплям $n\text{-BuLi}$ (6,32 мл, 15,8 ммоль). Данную смесь перемешивали при -40°C в течение 1 ч, и затем добавляли по каплям раствор N -метокси- N ,3-диметилпентанамид (2,1 г, 13,2 ммоль, CASRN (регистрационный номер CAS 1051483-44-3) и толуола (5 мл). Смесь перемешивали в течение еще 2 ч, затем гасили водным NH_4Cl (водн.) и экстрагировали EtOAc (2×50 мл). Органическую фазу сушили, концентрировали и очищали на SiO_2 колонке, элюируя EtOAc /гексаном (1:10) с получением соединения, указанного в заголовке (2 г, 59%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, MeOH-d_4) δ : 8.75 (d, $J = 2,0$ Гц, 1H), 8.13 (dd, $J = 8,4, 2,4$ Гц, 1H), 7.92 (d, $J = 8,4$ Гц, 1H), 3.17-3.12 (m, 1H), 2.98-2.92 (m, 1H), 2.02-2.00 (m, 1H), 1.41-1.21 (m, 2H), 0.93-0.89 (m, 6H).

(Z)-5-Бром-2-(1-гидразино-3-метилпентил)пиридин.

1-(5-Бромпиридин-2-ил)-3-метилпентан-1-он (2,0 г, 6,2 ммоль) растворяли в MeOH (50 мл), и добавляли NH_2NH_2 (5 мл). Данную смесь перемешивали при температуре флегмообразования в течение 4 ч. Добавляли 2 н. NaOH (5 мл) и H_2O (20 мл), и образующуюся смесь экстрагировали EtOAc (3×50 мл). Органическую фазу сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали. Остаток использовали непосредственно на следующей стадии без дальнейшей очистки: $\text{MS} [\text{M}+\text{H}]^+ = 269,7$.

6-Бром-3-(2-метилбутил)-[1,2,3]триазоло[1,5-а]пиридин.

К раствору неочищенного (Z)-5-бром-2-(1-гидразино-3-метилпентил)пиридина (1,9 г, 7,1 ммоль) в CHCl_3 (30 мл) добавляли активный MnO_2 (3 г, 35,3 ммоль). Данную смесь нагревали до температуры флегмообразования и перемешивали в течение 16 ч. Смесь фильтровали, фильтрат концентрировали и очищали SiO_2 хроматографией с получением 1,6 г соединения, указанного в заголовке: $\text{MS} [\text{M}+\text{H}]^+ = 267,7$.

3-(2-Метилбутил)-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-[1,2,3]триазоло[1,5-а]пиридин.

Раствор 6-бром-3-(2-метилбутил)-[1,2,3]триазоло[1,5-а]пиридина (0,8 г, 3 ммоль), 4,4,4',4'',5,5,5',5''-октаметил-2,2'-би(1,3,2-диоксаборолана) (838 мг, 3,3 ммоль), KOAc (294 мг, 9 ммоль) и $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (329 мг, 0,45 ммоль) в диоксане (30 мл) нагревали при 100°C с перемешиванием под N_2 в течение 3 ч. Затем неочищенный продукт использовали на следующей стадии без дальнейшей очистки: $\text{MS} [\text{M}+\text{H}]^+ = 233,7$.

N -(1-Метил-1H-пиразол-5-ил)-4-(3-(2-метилбутил)-[1,2,3]триазоло[1,5-а]пиридин-6-ил)пиримидин-2-амин (GNT D379 260).

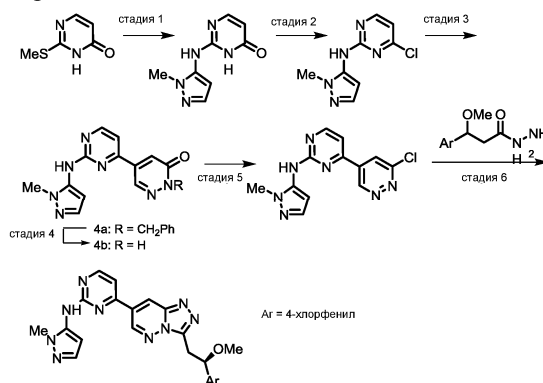
К продукту - неочищенному сложному эфиру бороновой кислоты, добавляли 4-хлор- N -(1-метил-1H-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин (755 мг, 3,6 ммоль), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (329 мг, 0,45 ммоль) и Cs_2CO_3 (2,9 г, 9 ммоль) и воду - H_2O (5 мл). Данную смесь перемешивали при 100°C в течение 4 ч. Смесь фильтровали.

Фильтрат концентрировали и очищали на SiO_2 колонке, посредством колонки с силикагелем, с последующей очисткой пред-ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) с получением соединения, указанного в заголовке (250 мг). ^1H ЯМР (400 МГц, MeOH-d_4) δ : 9.58 (s, 1H), 8.54 (d, $J = 5,2$ Гц, 1H), 8.00-7.90 (m, 2H), 7.50-7.47 (m, 2H), 6.36 (d, $J = 2$ Гц, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.03-2.99 (m, 1H), 2.87-2.81 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.46-1.42 (m, 1H), 1.28-1.24 (m, 1H), 0.98-0.91 (m, 6H); $\text{MS} [\text{M}+\text{H}]^+ = 362,9$.

(S)-энантиомер получали посредством SFC (сверхкритическая жидкостная хроматография) на хиральной подложке.

^1H ЯМР (400 МГц, MeOH-d_4) δ : 9.58 (s, 1H), 8.53 (d, $J = 5,2$ Гц, 1H), 8.00-7.90 (m, 2H), 7.50-7.46 (m, 2H), 6.36 (d, $J = 2$ Гц, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.05-2.99 (m, 1H), 2.87-2.81 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.46-1.27 (m, 1H), 1.26-1.24 (m, 1H), 0.98-0.91 (m, 6H).

Справочный пример 6. 4-[3-[2-(4-Хлорфенил)-2-метокси-этил]-[1,2,4]триазоло[4,3- b]пиридазин-7-ил]- N -(2-метилпиразол-3-ил)пиримидин-2-амин



Стадия 1. 2-((1-Метил-1H-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4(3H)-он (6).

Смесь 2-(метилтио)пиримидин-4(3H)-она (10 г, 70 ммоль, CASRN 5751-20-2) и 1-метил-1H-пиразол-5-амин (10 г, 103 ммоль) в $\text{Me}_3\text{CCO}_2\text{H}$ (50 г) нагревали до 160°C в течение 48 ч. Данной смеси давали охладиться до $40\text{-}50^{\circ}\text{C}$, и добавляли DCM (30 мл). После перемешивания в течение 10 мин рас-

твор разбавляли н-гексаном (200 мл), что приводило к образованию красной суспензии. Смеси давали постоять в течение 0,5 ч, после чего декантировали верхнюю прозрачную органическую фазу. Красную суспензию растворяли в DCM (50 мл) и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта 2 (16,5 г), который использовали на следующей стадии без какой-либо очистки.

Стадия 2. 4-Хлор-N-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин (7).

К раствору 2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4(3Н)-она (16,5 г, неочищенный) в MeCN (200 мл) добавляли POCl₃ (30 мл, 0,33 моль). Данную смесь нагревали до температуры флегмообразования в течение 15 мин. Смесь гасили льдом-водой (100 г), и pH доводили до 10 порошком Na₂CO₃. Смесь экстрагировали EtOAc (3×100 мл), сушили (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали SiO₂ хроматографией, элюируя петролейным эфиром/EtOAc (1:1) с получением 7,5 г (51% за 2 стадии) соединения, указанного в заголовке. ¹H ЯМР (MeOH-d₄, 400 МГц) δ: 8.30 (d, J = 5,2, 1H), 7.42 (d, J = 1,6, 1H), 6.90 (d, J = 5,2, 1H), 6.28 (d, J = 1,6, 1H), 3.72 (s, 3H).

Стадия 3. 2-Бензил-5-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридазин-3(2Н)-он (9).

К раствору 4-хлор-N-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин (25,0 г, 119 ммоль) в диоксане (300 мл) добавляли Me₃SnSnMe₃ (46,9 г, 143,11 ммоль) и Pd(PPh₃)₄ (13,8 г, 11,93 ммоль), данную смесь нагревали при 125 °C в атмосфере N₂ в течение 3 ч. К приведенному выше раствору добавляли 2-бензил-5-йодпиридазин-3(2Н)-он 3 (44,7 г, 143,1 ммоль, CASRN 825633-93-0), LiCl (10,1 г, 238,5 ммоль), CuI (11,4 г, 59,6 ммоль) и Pd(PPh₃)₄ (13,8 г, 11,93 ммоль). Данную смесь нагревали при 125 °C в атмосфере N₂ в течение 16 ч. Смесь охлаждали до RT и фильтровали через Celite®. Осадок на фильтре промывали DCM (3 × 200 мл). Растворы, объединенные с DCM, концентрировали, очищали SiO₂ хроматографией, элюируя градиентом MeOH/DCM (1-5% MeOH) с получением соединения 9 (34 г, 84%) в виде желтого твердого вещества.

Стадия 4. 5-(2-((1-Метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридазин-3(2Н)-он (10).

К раствору безводного толуола (500 мл) и 2-бензил-5-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридазин-3(2Н)-она (34 г, 94,6 ммоль) добавляли AlCl₃ (63 г, 473 ммоль). Данную смесь нагревали при 120°C в атмосфере N₂ в течение 1 ч. Смесь охлаждали до RT, и верхний прозрачный слой декантировали. Остаточное твердое вещество добавляли в ледяную воду (200 г) и перемешивали при RT до тех пор, пока исходное твердое вещество не распалось и не появлялось желтое твердое вещество. Твердое вещество фильтровали и промывали ледяной водой (3×100 мл). После сушки получали примерно 35 г неочищенного желтого твердого продукта.

Стадия 5. 4-(6-Хлорпиридазин-4-ил)-N-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин.

К перемешиваемому POCl₃ (200 мл) добавляли 5-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридазин-3(2Н)-он (10) (35 г неочищенного соединения, 0,13 моль) при RT. Данную смесь нагревали при 80°C в течение 2 ч. Смесь концентрировали досуха, растворяли CHCl₃ (200 мл) и затем выливали в ледяную воду (500 г) с перемешиванием. Образующуюся смесь доводили примерно до pH 8. Данную смесь экстрагировали DCM (5×300 мл). Объединенный органический слой концентрировали и очищали SiO₂ хроматографией, элюируя градиентом петролейного эфира/EtOAc (от 1 до 50% EtOAc) с получением 13 г (47% за два этапа) соединения, указанного в заголовке, в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц) δ: 9.80 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 8.70 (d, J = 4,8, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.72 (d, J = 5,2, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.68 (s, 3H).

Стадия 6. 4-(3-(2-(4-Хлорфенил)-2-метоксиэтил)-[1,2,4]триазоло[4,3-b]пиридазин-7-ил)-N-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин.

К перемешиваемому раствору 4-(6-хлорпиридазин-4-ил)-N-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин (200 мг, 0,758 ммоль) в IPA (3 мл) добавляли 3-(4-хлорфенил)-3-метоксипропангидразид (200 мг, 0,834 ммоль) и метансульфоновую кислоту (1,2 мг, 1,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 3 ч. Растворитель выпаривали досуха и очищали препаративной ВЭЖХ (FA) с получением 40 мг (7%) желательного продукта. ¹H ЯМР (400 МГц, MeOH-d₄) δ: 9.24 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.63 (d, J = 5,2, 1H), 7.63 (d, J = 5,2, 1H), 7.51 (d, J = 2,0, 1H), 7.36 (s, 4H), 6.39 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.81-3.74 (m, 1H), 3.59-3.54 (m, 1H), 3.20 (s, 3H); MS [M+H]⁺ = 461,9.

Разделение энантиомера (R)-4-(3-(2-(4-хлорфенил)-2-метоксиэтил)-[1,2,4]триазоло[4,3-b]пиридазин-7-ил)-N-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)пиримидин-2-амин осуществляли SFC с получением желательного продукта (13,8 мг). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₄) δ: 9.70 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 9.00 (d, J = 2, 1H), 8.67 (d, J = 4,8, 1H), 7.23 (d, J = 4,8, 1H), 7.42-7.35 (m, 4H), 6.33 (s, 1H), 4.93-4.89 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.72-3.64 (m, 1H), 3.50-3.44 (m, 1H), 3.10 (s, 3H); MS [M+H]⁺ = 461,9.

Биологический пример 1. Культура клеток и анализы жизнеспособности.

Для CellTiterGlo (Promega): клетки A549 переносили на планшет в нормальную ростовую среду (Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) с 10% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ/л глутамином и 100 единицами/мл пенициллина и стрептомицина) в количестве 1500 клеток на лунку в 384-луночный черный планшет с прозрачным дном. На следующие сутки соединения серийно разводили 1:2, начиная с указанных концентраций, затем добавляли к клеткам в четверных повторностях. Через 96 ч

после добавления соединения добавляли люминисцентный реактив для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo согласно протоколу изготовителя.

Для ELISA на BrdU (Roche): клетки A549 переносили на планшет в нормальную ростовую среду в количестве 3000 клеток на лунку в 96-луночный черный планшет с прозрачным дном. На следующие сутки добавляли соединения в тройной повторности в указанных концентрациях на основе результатов CTG. Через 48 и 72 ч после добавления соединения проводили хемилюминисцентный ELISA для определения пролиферации клеток с BrdU согласно протоколу изготовителя.

Для пусcELISA для определения гибели клеток (Roche): клетки A549 переносили на планшет в нормальную ростовую среду в количестве 3000 клеток на лунку в 96-луночный черный планшет с прозрачным дном. На следующие сутки добавляли соединения в тройной повторности в указанных концентрациях на основе результатов CTG. Через 48 и 72 ч после добавления соединения проводили ELISA^{PLUS} для определения гибели клеток согласно протоколу изготовителя.

Биологический пример 2. Модели ксенотрансплантатов опухолей.

Культивируемые клетки NCI-H520.X1 и EBC1 удаляли из культуры, суспендировали в буферизованном солевом растворе Хэнкса (HBSS), смешанном 1:1 с Matrigel (BD Biosciences, США), и подкожно имплантировали в правый бок наивных самок голых мышей NCR (Taconic Farms, Hudson, NY). Мышей с опухолями среднего объема приблизительно 250 мм³ группировали в когорты обработки по 10 мышей в каждой. Мыши получали только 5%-ную сахарозу или 5%-ную сахарозу плюс 1 мг/мл доксициклина (Clontech, Mountain View, CA) для контрольной когорты и когорты нокдауна соответственно. Все бутылки с водой заменяли 3 раза в неделю. На протяжении исследования измерения масс тела и объема опухоли (полученного по измерениям длины и ширины циркулем) производили дважды в неделю. Все экспериментальные методики соответствовали руководящим принципам Американского физиологического общества и были одобрены институциональным комитетом по уходу и использованию животных Genentech. Объемы опухолей рассчитывали по следующей формуле: объем опухоли = $0,5 \cdot (a \cdot b^2)$, где "a" представляет собой наибольший диаметр опухоли, и "b" представляет собой перпендикулярный диаметр опухоли. Результаты по объему опухоли представлены как средние объемы опухоли плюс/минус стандартная ошибка среднего (SEM). Процент ингибирования роста (%INH) в конце исследования (EOS) рассчитывали как: % INH = $100 \cdot [\text{Носитель EOS} - \text{Обработка EOS}] / (\text{Носитель EOS})$. Анализ данных и получение значений p с использованием t-критерия Даннета осуществляли с использованием программы JMP (SAS Institute, Cary, NC).

Ia получали в виде раствора в разных концентрациях (выраженных в виде эквивалентов свободного основания) в 40% PEG400 (полиэтиленгликоль 400)/60% [10% HP-β-CD (гидроксипропил-β-циклодекстрин)]. Контроль в виде носителя представлял собой 40% PEG400/60% (10% HP-β-CD) или МСТ. II получали в виде суспензии в разных концентрациях в метилцеллюлозе-Tween (МСТ). Дозируемые растворы Ia, II и контроля в виде носителя получали один раз в неделю в течение трех недель. Данные композиции хорошо перемешивали на вихревой мешалке перед дозированием. Опытные образцы хранили в холодильнике с установкой для поддержания температурного интервала 4°C-7°C.

Биологический пример 3. Модели генетически модифицированных мышей.

Авторы изобретения получали мышей из следующих организаций: мыши Kras^{LSL-G12D} были получены от Тайлера Джекса (Tyler Jacks) (Массачусетский технологический институт), мыши p16/p19^{fl/fl} были получены от Антона Бернса (Anton Berns) (NKI, Нидерланды), мыши p53^{fl/fl}/fit были получены от Exelixis, Inc., и мыши Pdx1-Cre были получены от Энди Лови (Andy Lowy) (Университет Огайо). Для экспериментальных когорт использовали равное число самцов и самок животных, дозирование начиналось после подтверждения опухолевой массы либо посредством ультразвуковой визуализации для PDAC, либо микроСТ (компьютерная микротомография) для модели NSCLC. Дозирование и наблюдение за животными осуществляли согласно руководствам Институционального комитета по уходу и использованию животных (IACUC) в Genentech, Inc. Все выбранные схемы дозирования хорошо переносились в GEMM. Неинвазивную визуализацию и оценку общего выживания проводили, как описано ранее в {Singh:2010hv}. В моделях GEM кобиметиниб и Ia дозировали в дозировке 5 мг/кг и 60 мг/кг посредством перорального зондового питания (PO), ежедневно (QD).

Статистические анализы данных, показанных в виде оценок выживания Каплана-Майера, и наборов данных по визуализации проводили, как описано ранее (M. Singh et al., Nature Biotechnol., 2010, 28(6):585-593). Образцы опухоли модели GEM отбирали и хранили в RNALater (Qiagen, Valencia, CA). Общую РНК экстрагировали набором RNeasy Plus Mini (Qiagen), следуя инструкциям изготовителей. Качество РНК определяли с использованием Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Характеристики, раскрытые в приведенном выше описании или в следующей формуле изобретения, выраженные в их конкретных формах или в показателях средних значений для осуществления раскрытой функции, или способ, или процесс получения раскрытого результата, сообразно обстоятельствам, могут использоваться для осуществления изобретения в его разных формах по-отдельности или в любой комбинации таких характеристик.

Описанное выше изобретение было описано в некоторых подробностях посредством иллюстрации

и примера с целью ясности и понимания. Специалисту в данной области будет очевидно, что могут воплощаться на практике изменения и модификации, находящиеся в пределах объема приложенной формулы изобретения. Следовательно, следует понимать, что приведенное выше описание предназначено для того, чтобы быть иллюстративным, а не ограничивающим.

Следовательно, объем изобретения следует определять не со ссылкой на приведенное выше описание, но, вместо того, должен определяться со ссылкой на следующую приложенную формулу изобретения, наряду с полным объемом эквивалентов, которым дает право такая формула изобретения.

Патенты, опубликованные заявки и научная литература, на которую дается ссылка в данном документе, устанавливают знания специалистов в данной области и, тем самым, являются включенными посредством ссылки во всей их полноте в той же самой степени, как если бы каждая была конкретно и индивидуально указана как включенная посредством ссылки. Любой конфликт между любой ссылкой, процитированной в данном документе, и конкретными идеями данных описаний изобретения должен быть разрешен в пользу последних. Подобным образом, любой конфликт между понятным в данной области определением слова или фразы и определением слова или фразы, конкретно изложенным в данном описании изобретения, должен быть разрешен в пользу последнего.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения гиперпролиферативного расстройства, включающий введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества комбинации ингибитора MEK (митогенаактивируемая киназа, регулируемая внеклеточным сигналом) или фармацевтически приемлемой соли и ингибитора ERK (киназа, регулируемая внеклеточным сигналом) или фармацевтически приемлемой соли, либо в виде объединенной композиции, либо поочередно, в котором ингибитор MEK представляет собой кобиметиниб, ингибитор ERK представляет собой (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1Н)-он, а гиперпролиферативное расстройство представляет собой раковое заболевание.

2. Способ по п.1, в котором указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: аденома, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак молочной железы, рак толстой кишки, эпидермальная карцинома, фолликулярная карцинома, рак мочеполового тракта, глиобластома, лимфогранулематоз, раковые заболевания головы и шеи, гепатома, кератоакантома, рак почки, крупноклеточная карцинома, лейкозы, аденокарцинома легкого, рак легкого, лимфоидные расстройства, меланома и немеланомный рак кожи, миелодиспластический синдром, нейробластома, неходжкинская лимфома, рак яичника, папиллярная карцинома, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, саркома, мелкоклеточная карцинома, рак яичка, тетракарциномы, рак щитовидной железы и недифференцированная карцинома.

3. Способ по п.2, в котором указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, рак легкого, мезотелиома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, глиома, рак желудка, рак почки, рак яичника, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи.

4. Способ по п.3, в котором раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы или меланома.

5. Применение комбинации ингибитора MEK или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором ERK или его фармацевтически приемлемой солью для получения лекарственного средства для лечения гиперпролиферативного расстройства, в котором ингибитор MEK представляет собой кобиметиниб, ингибитор ERK представляет собой (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1Н)-он, а гиперпролиферативное расстройство представляет собой раковое заболевание.

6. Применение комбинации ингибитора MEK или его фармацевтически приемлемой соли с ингибитором ERK или его фармацевтически приемлемой солью для лечения гиперпролиферативного расстройства, в котором ингибитор MEK представляет собой кобиметиниб, ингибитор ERK представляет собой (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1Н)-он, а гиперпролиферативное расстройство представляет собой раковое заболевание.

7. Применение по пп.5-6, где раковое заболевание - это раковое заболевание млекопитающего.

8. Применение по п.7, где млекопитающее представляет собой человека.

9. Применение по любому из пп.5-8, в котором указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: аденома, рак мочевого пузыря, рак мозга, рак молочной железы, рак толстой кишки, эпидермальная карцинома, фолликулярная карцинома, рак мочеполового тракта, глиобластома, лимфогранулематоз, раковые заболевания головы и шеи, гепатома, кератоакантома, рак почки, крупноклеточная карцинома, лейкозы, аденокарцинома легкого, рак легкого, лимфоидные расстройства, меланома и немеланомный рак кожи, миелодиспластический синдром, нейробластома, неходжкинская лимфома, рак яичника, папиллярная карцинома, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, саркома, мелкоклеточная карцинома, рак яичка, тетракарциномы, рак щитовидной желе-

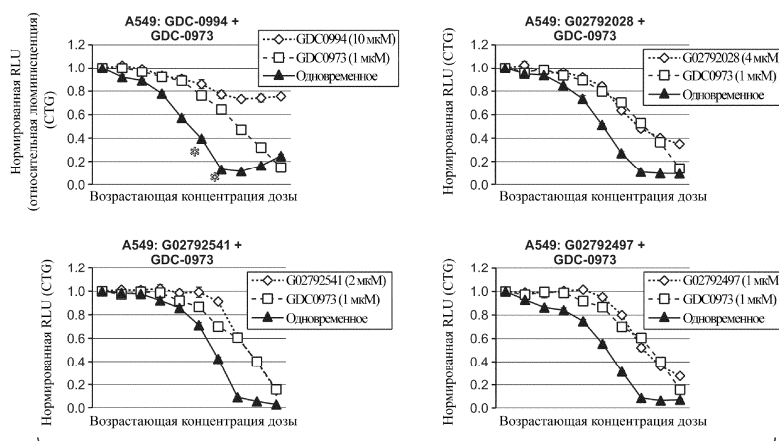
зы и недифференцированная карцинома.

10. Применение по любому из пп.5-9, в котором указанное раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, рак легкого, мезотелиома, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, глиома, рак желудка, рак почки, рак яичника, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и рак головы и шеи.

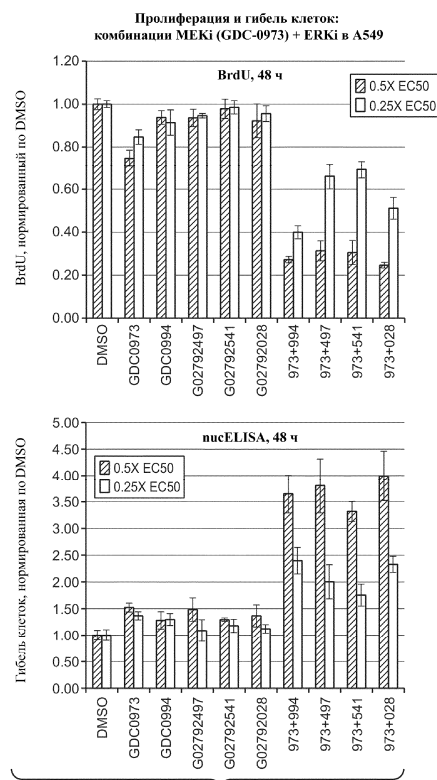
11. Применение по любому из пп.5-10, в котором раковое заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы или меланома.

12. Набор для лечения ракового заболевания, содержащий кобиметиниб или его фармацевтически приемлемую соль и (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-он или его фармацевтически приемлемую соль, контейнер и листок-вкладыш в упаковке или этикетку, причем на вкладыше указано, что введение кобиметиниба и (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфенил)-2-гидроксиэтил)-4-(2-((1-метил-1Н-пиразол-5-ил)амино)пиримидин-4-ил)пиридин-2(1H)-она служит для лечения ракового заболевания.

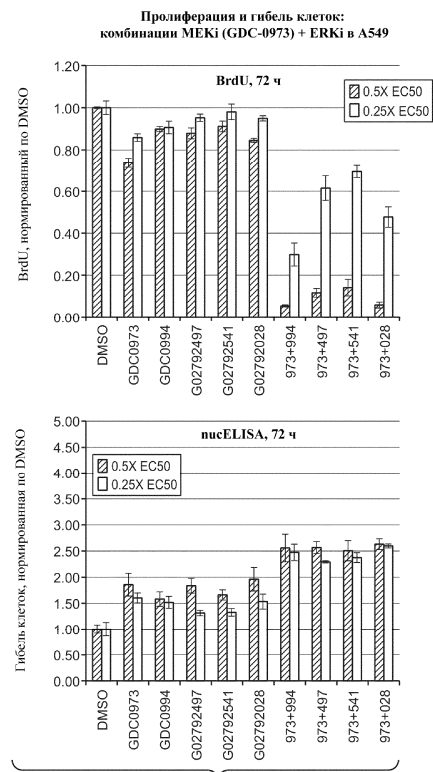
CTG 4-суточных: комбинации ERKi + MEKi (GDC-0973) в A549 (NSCLC KRAS)



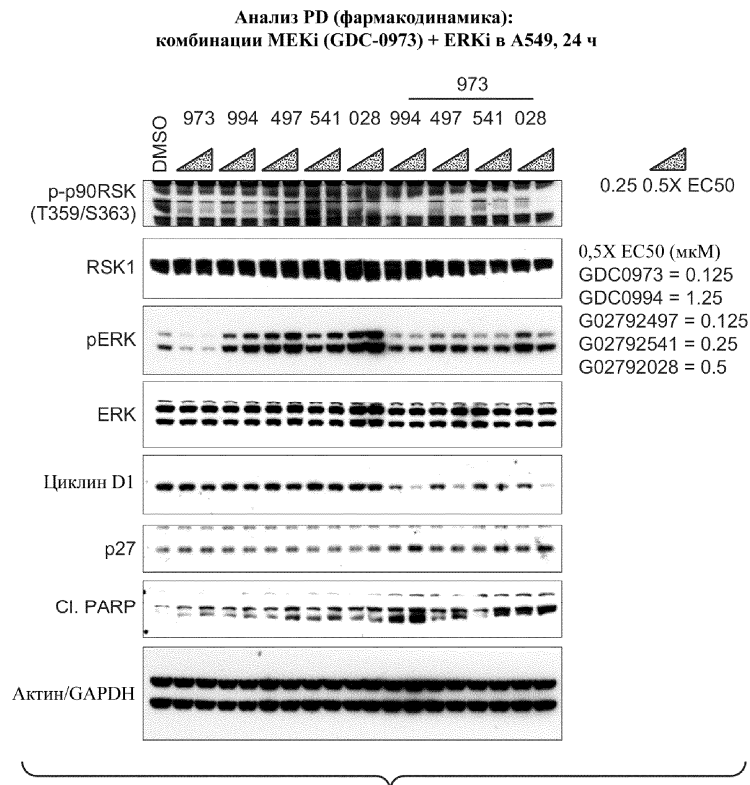
Фиг. 1



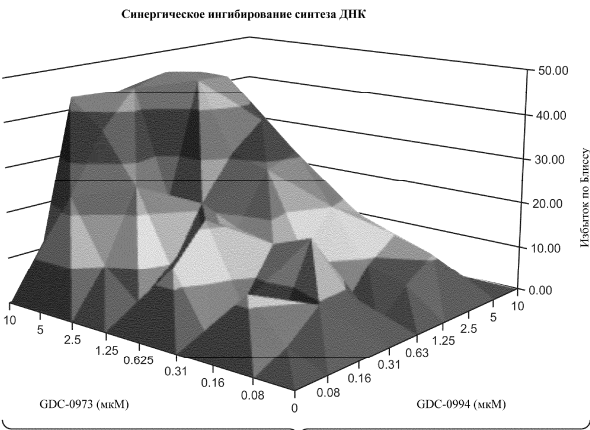
Фиг. 2А



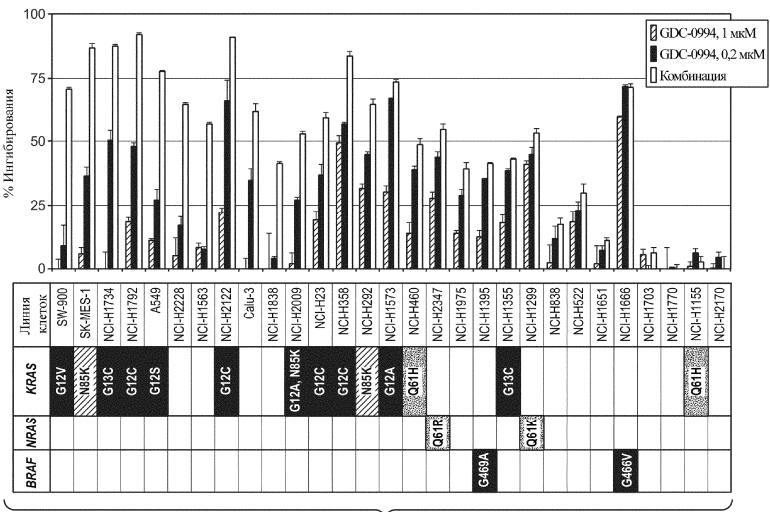
Фиг. 2В



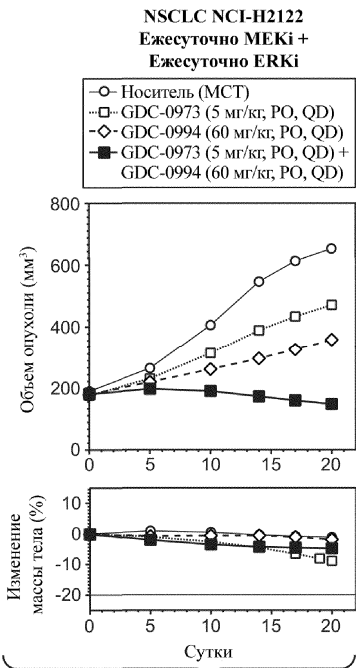
Фиг. 3



Фиг. 4

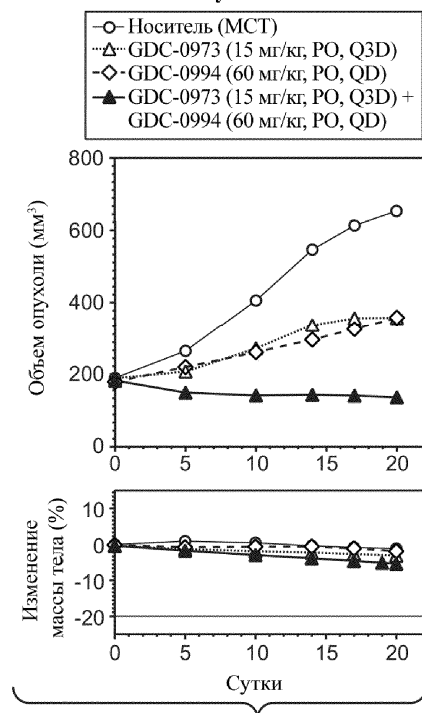


Фиг. 5



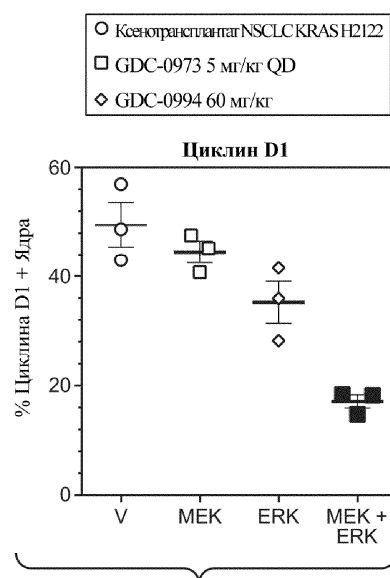
Фиг. 6А

NSCLC NCI-H2122
Периодически MEK1 +
Ежесуточно ERK1



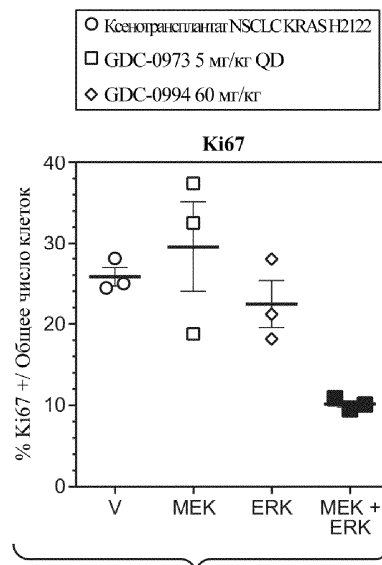
Фиг. 6В

ИНС (иммуногистохимия) демонстрирует
эффекты комбинации на опухолевые
маркеры пролиферации и апоптоза



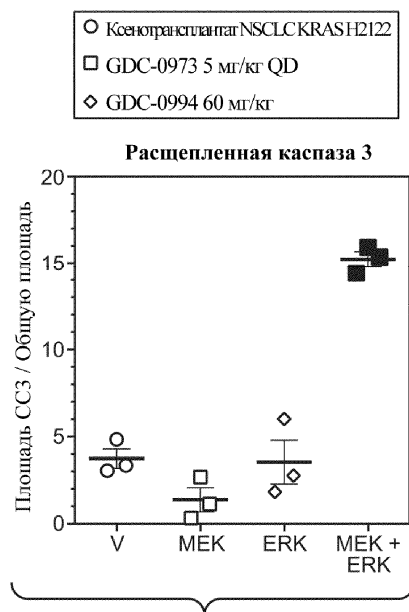
Фиг. 6С

ПНС демонстрирует эффекты комбинации на опухолевые маркеры пролиферации и апоптоза



Фиг. 6D

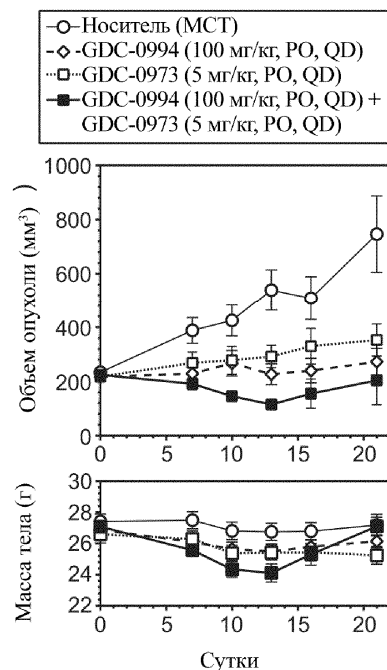
ПНС демонстрирует эффекты комбинации на опухолевые маркеры пролиферации и апоптоза



Фиг. 6E

NCI-H2122

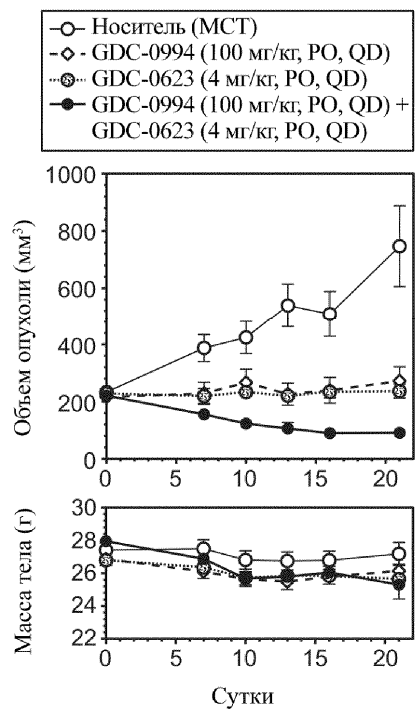
**Ежесуточно MEKi (GDC-0973) +
Ежесуточно ERKi (GDC-0994)**



Фиг. 7А

NCI-H2122

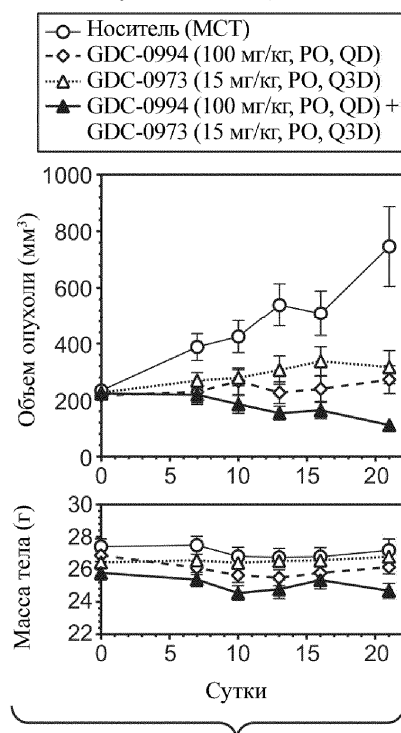
**Ежесуточно MEKi (GDC-0623) +
Ежесуточно ERKi (GDC-0994)**



Фиг. 7В

NCI-H2122

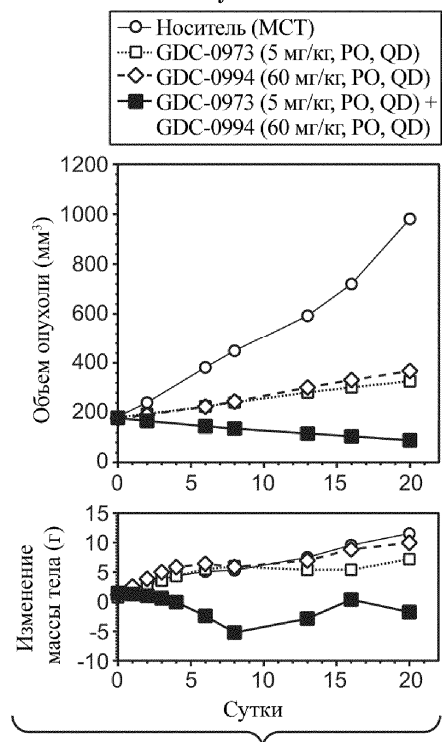
**Периодически MEKi (GDC-0973) +
Ежесуточно ERKi (GDC-0994)**



Фиг. 7С

A549 NSCLC

**Ежесуточно GDC-0973 +
Ежесуточно GDC-0994**

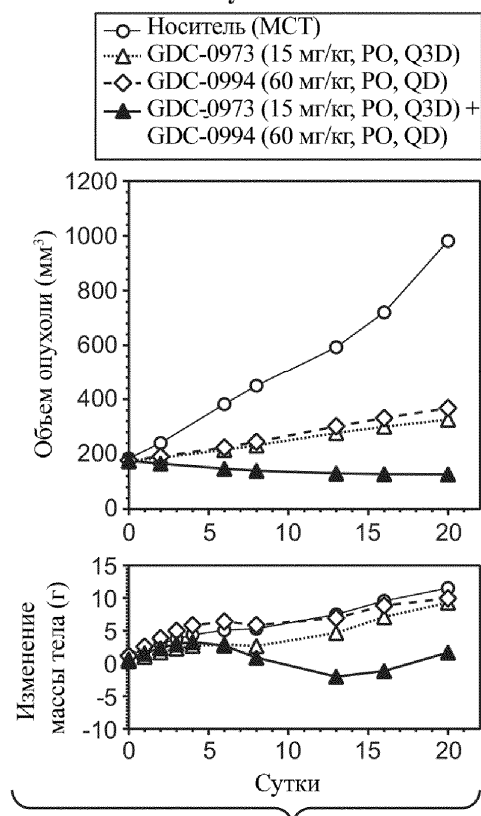


Фиг. 8А

A549 NSCLC

Периодически GDC-0973 +

Ежесуточно GDC-0994



Фиг. 8В

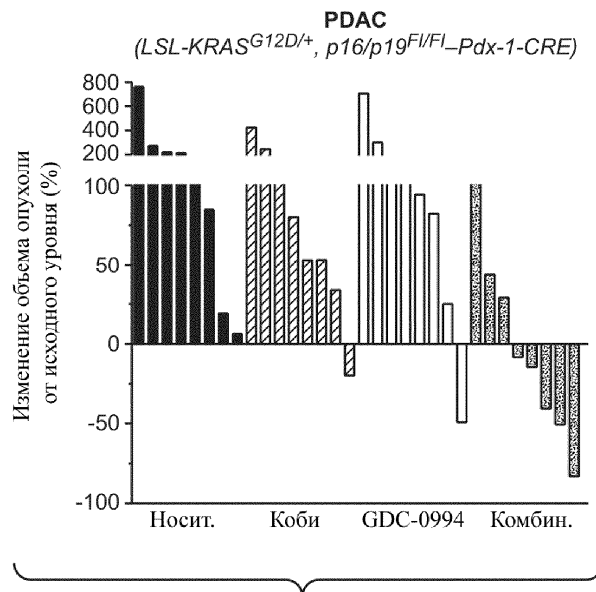
Эффективность комбинации при переносимых дозах наблюдается в клетках HCT116 при использовании комбинаций GDC-0973 и GDC-0994

%TGI(низкий, средний, ДИ (доверительный интервал))		GDC-0994 (мг/кг)						
		0	25	37.5	50	62.5	75	150
GDC-0973 (мг/кг)	0	0 (0,0)	38 (-49,80)	н.о. (не определяется)	79 (52,99)	н.о. (не определяется)	66 (22,87)	104 (90,119)
	1	48 (-5,77)	57 (11,81)	н.о. (не определяется)	73 (39,90)	н.о. (не определяется)	74 (42,95)	н.о. (не определяется)
	2	н.о. (не определяется)	н.о. (не определяется)	81 (53,97)	н.о. (не определяется)	93 (72,110)	0 (0,0)	н.о. (не определяется)
	3	41 (-18,72)	73 (43,91)	н.о. (не определяется)	68 (35,89)	н.о. (не определяется)	97 (79,113)	н.о. (не определяется)
	5	62 (19,86)	85 (61,102)	80 (55,98)	н.о. (не определяется)	98 (80,113)	112 (100,131)	н.о. (не определяется)
	7.5	72 (39,92)	100 (86,116)	н.о. (не определяется)	111 (99,126)	н.о. (не определяется)	117 (106,138)	н.о. (не определяется)
	10	87 (68,101)	н.о. (не определяется)	н.о. (не определяется)	н.о. (не определяется)	н.о. (не определяется)	н.о. (не определяется)	н.о. (не определяется)

- Серые ячейки указывают наилучшую эффективность комбинации для переносимой схемы
- Черные ячейки указывают непереносимые комбинации
- Дозирование представляло собой ежесуточное (QD) пероральное зондовое питание (PO)
- Числа представляют % ингибирования роста опухоли (%TGI) относительно носителя (0,0) +/- 95-процентные доверительные интервалы (ДИ). н.о. = не определяется

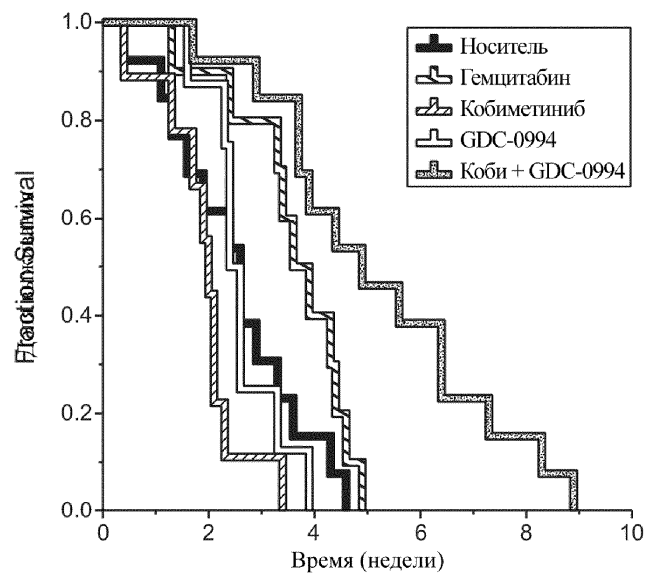
Фиг. 9

**Обработка кобиметинибом + ERK1
модели GEM PDAC с мутацией KRAS**



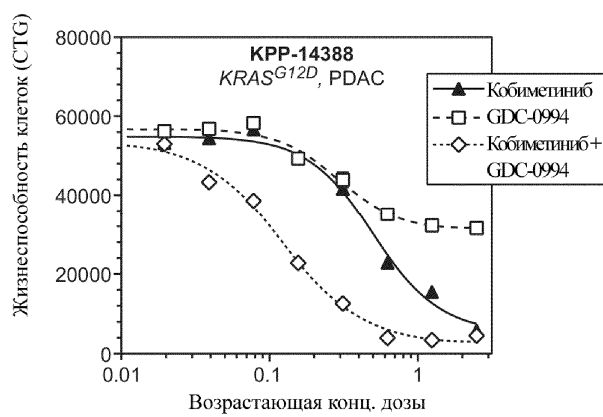
Фиг. 10А

**Обработка кобиметинибом + ERKi
модели GEM PDAC с мутацией KRAS**

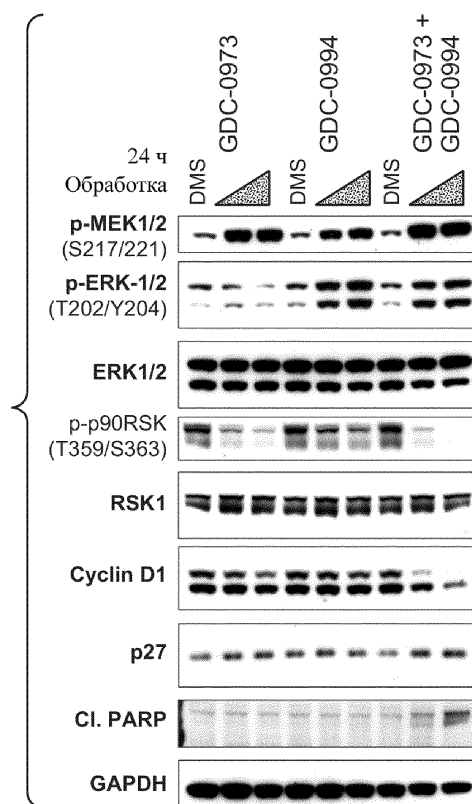


Обработка	Медиана выживания
Носитель (n = 13)	2.6
MEKi (кобиметиниб) (n = 9)	2
ERKi (GDC-0994) (n = 8)	2.5
MEKi + ERKi (n = 13)	4.9
Гемцитабин (n = 10)	3.7

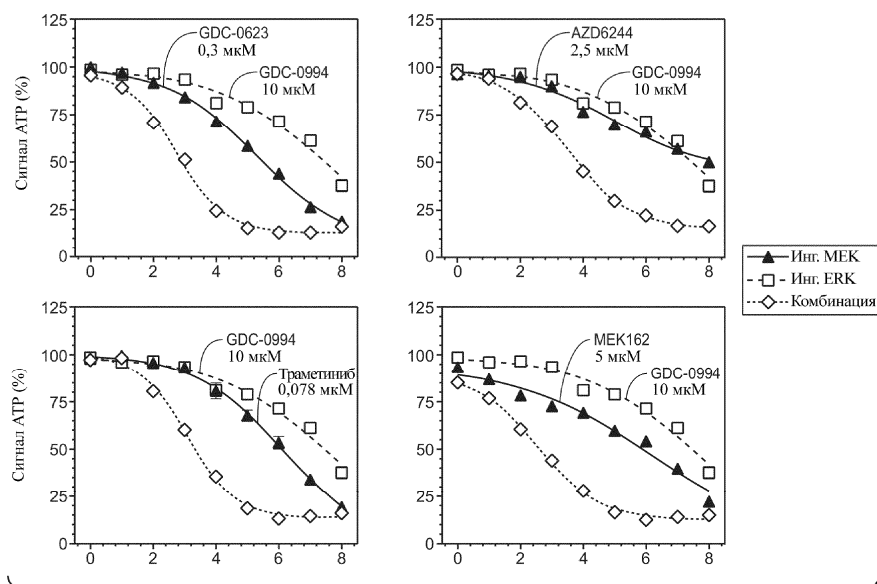
Фиг. 10В



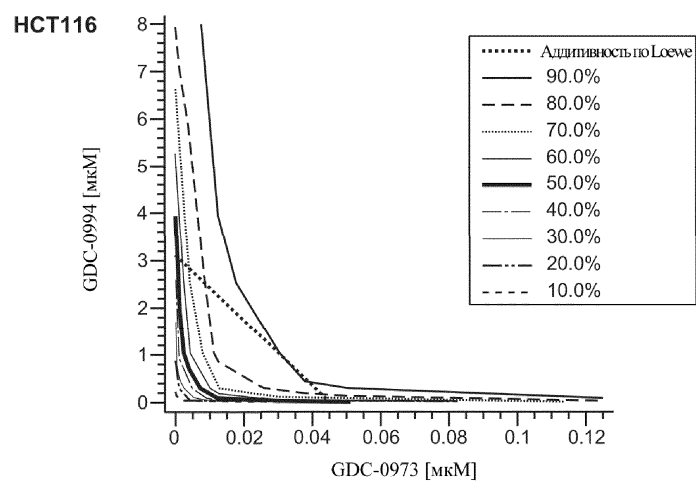
Фиг. 11А



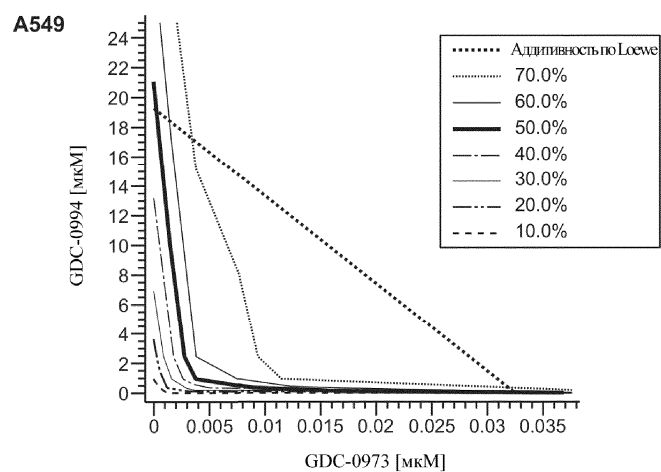
Фиг. 11В



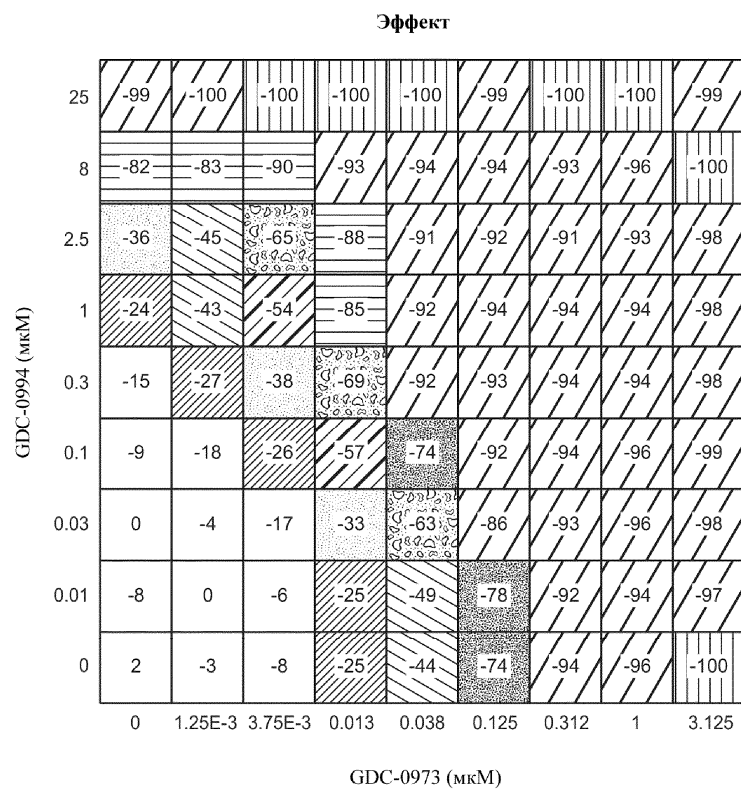
Фиг. 12



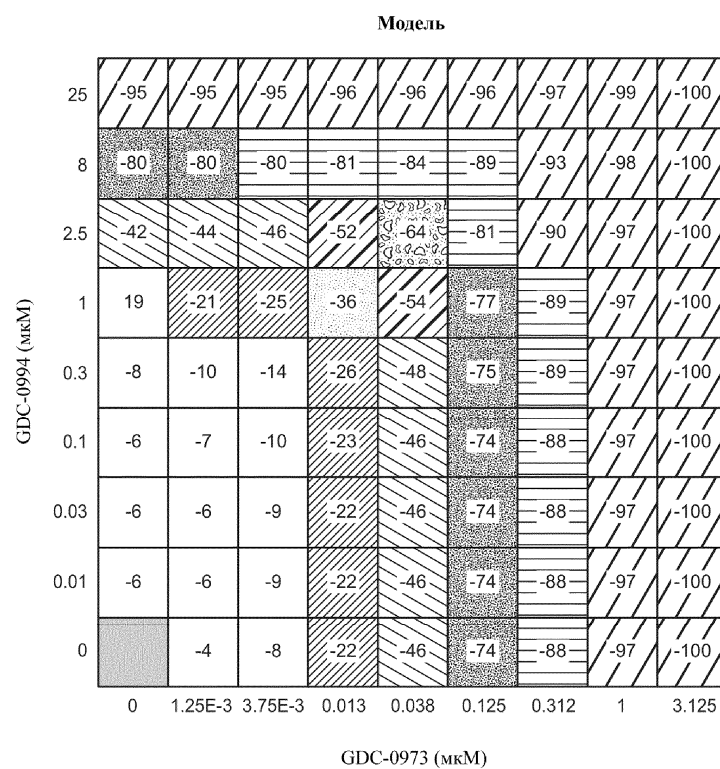
Фиг. 13А



Фиг. 13С



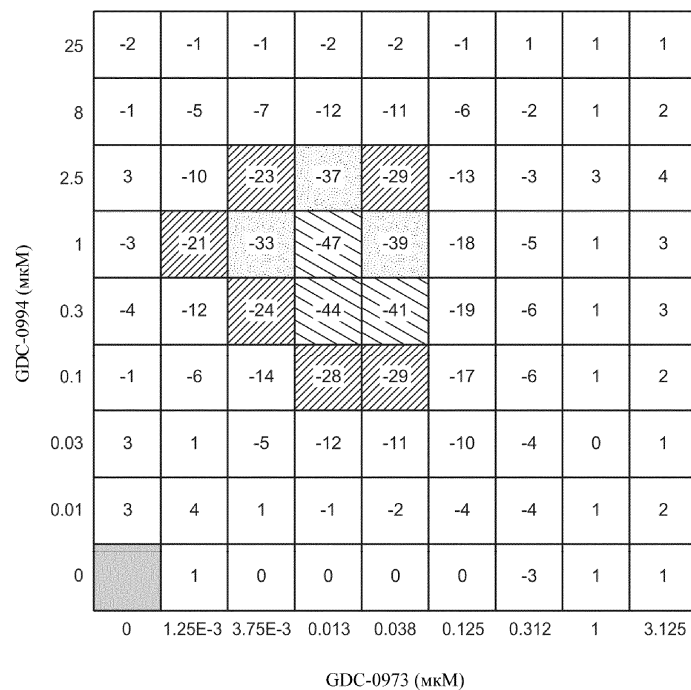
Фиг. 13В-1



Фиг. 13В-2

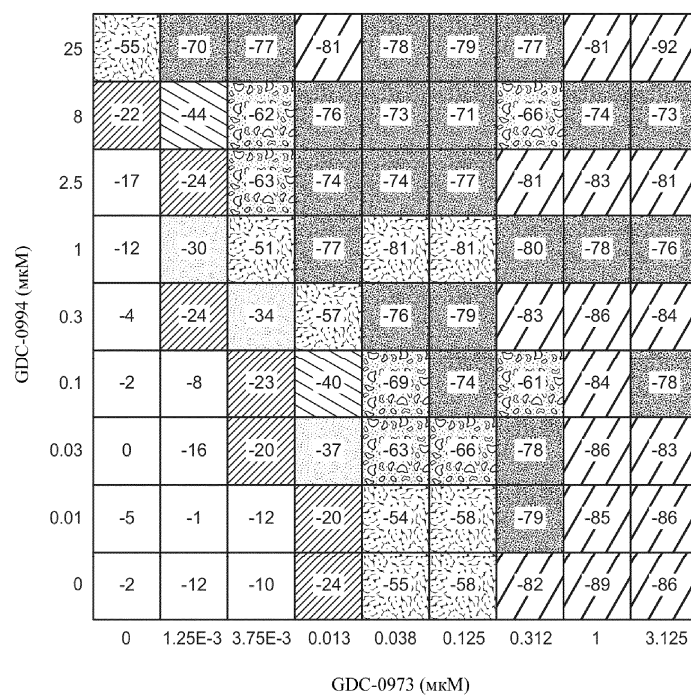
034872

Избыток

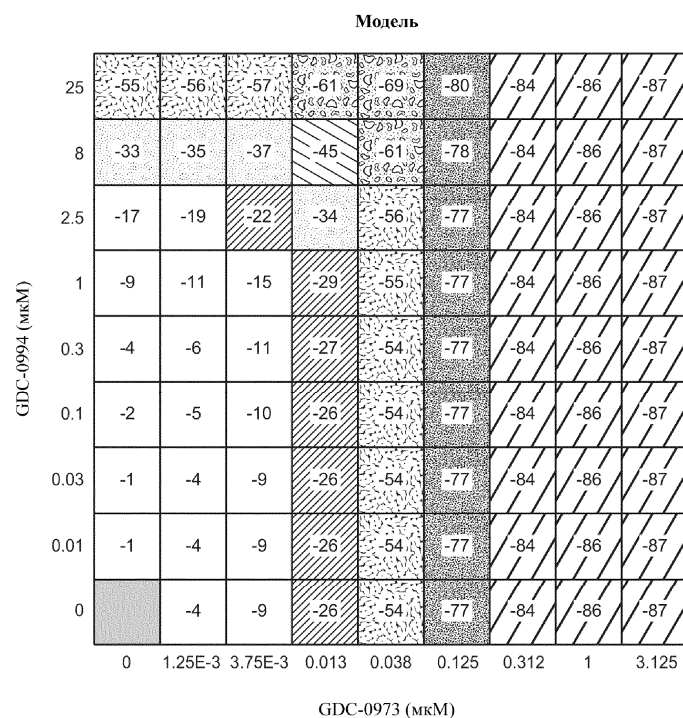


Фиг. 13В-3

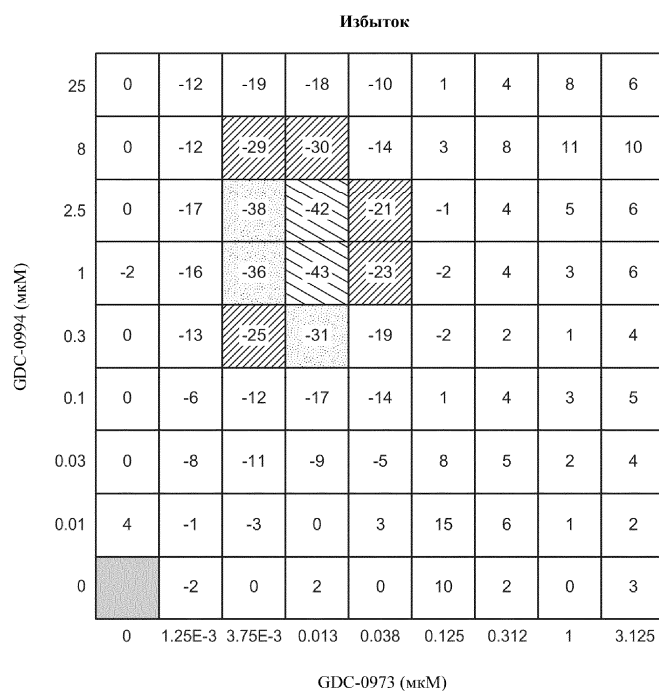
Эффект



Фиг. 13D-1



Фиг. 13D-2



Фиг. 13D-3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2