(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191415 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.26

(22) Дата подачи заявки
2019.11.18

(51) Int. Cl. ***A61K 31/555*** (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ИНГИБИТОР $KRAS^{G12C}$ И ОДНО ИЛИ НЕСКОЛЬКО ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СРЕДСТВ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИДОВ РАКА

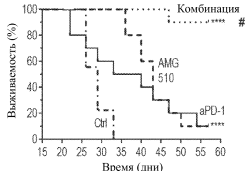
(31) **62/769,355; 62/821,376; 62/865,819**
(32) **2018.11.19; 2019.03.20; 2019.06.24**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/062064**
(87) **WO 2020/106647 2020.05.28**
(88) **2020.11.26**

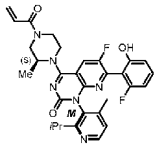
(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Липфорд Джеймс Расселл, Кэнон Джуд Роберт, Саики Анн Й., Рекс Карен Луиз (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии, которая включает ингибитор $KRAS^{G12C}$, такой как (см. формулу) или его фармацевтически приемлемая соль, и одно или несколько дополнительных фармацевтически активных средств, в частности, для лечения видов рака. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат ингибитор $KRAS^{G12C}$ и одно или несколько дополнительных фармацевтически активных средств, для лечения видов рака.





(I)

202191415 A1

202191415 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568466EA/022

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ИНГИБИТОР $KRAS^{G12C}$ И ОДНО ИЛИ НЕСКОЛЬКО ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СРЕДСТВ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИДОВ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество на основании предварительной заявки на патент США № 62/865819, поданной 24 июня 2019 года, предварительной заявки на патент США № 62/821376, поданной 20 марта 2019 года, и предварительной заявки на патент США № 62/769355, поданной 19 ноября 2018 года, все из которых включены в данный документ посредством ссылки в их полных объемах для всех целей.

ПЕРЕЧНИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронной форме. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием A-2326-US-NP_SeqList_102919_ST25.txt, созданного 29 октября 2019 года, размер которого составляет 15,4 КБ. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

В настоящем изобретении предусмотрена комбинированная терапия, которая включает ингибитор $KRAS^{G12C}$ и одно или несколько дополнительных фармацевтически активных средств, в частности, для лечения видов рака. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, которые содержат ингибитор $KRAS^{G12C}$ и одно или несколько дополнительных фармацевтически активных средств, для лечения видов рака.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Мутации гена KRAS распространены при раке поджелудочной железы, аденокарциноме легкого, колоректальном раке, раке желчного пузыря, раке щитовидной железы и раке желчных протоков. Мутации KRAS также наблюдаются у приблизительно 25% пациентов с NSCLC, и некоторые исследования указывают на то, что мутации KRAS являются негативным прогностическим фактором у пациентов с NSCLC. Недавно было обнаружено, что мутации гомолога вирусного онкогена V-Ki-ras2 саркомы крыс Кирстен (KRAS) придают устойчивость к видам терапии, целенаправленно воздействующим на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), при колоректальном раке; соответственно, мутационный статус KRAS может предоставлять важную информацию перед назначением терапии с использованием TKI. В совокупности, в медицине существует необходимость в новых способах лечения пациентов с раком поджелудочной железы, аденокарциномой легкого или колоректальным раком, особенно для тех, у кого были диагностированы такие виды рака, характеризующиеся мутацией *KRAS*, и в том числе для тех, у кого наблюдалось прогрессирование после химиотерапии. Онкогенные

мутации *KRAS* по остаткам G12, G13 и Q61 представляют собой наиболее распространенные мутации RAS, обнаруженные в солидных злокачественных опухолях. Недавно было продемонстрировано, что на $KRAS^{G12C}$ можно нацеливать ковалентные низкомолекулярные ингибиторы, которые вступают в реакцию с мутантным цистеином, прилегающим к карману связывания II (SIIP), блокируя *KRAS* в его неактивном состоянии, связанном с GDP.

KRAS является наиболее часто мутируемым онкогеном при раке человека и кодирует ключевой сигнальный белок в опухолях. Мутантная форма $KRAS^{G12C}$ содержит цистеин, который был использован для создания ковалентных ингибиторов с многообещающей доклинической активностью. Авторы настоящего изобретения оптимизировали серию ингибиторов с новыми связывающими взаимодействиями и заметно повысили эффективность и селективность. Эти усилия привели к открытию AMG 510, первого ингибитора $KRAS^{G12C}$, находящегося в стадии клинической разработки. В доклинических исследованиях лечение с помощью AMG 510 привело к регрессии опухолей с *KRAS p.G12C* и значительно улучшило противоопухолевую эффективность химиотерапии и средств направленного действия. У иммунокомпетентных мышей лечение с помощью AMG 510 привело к провоспалительному микроокружению опухоли и обеспечило излечение на длительное время в сочетании с ингибированием иммунных контрольных точек. У вылеченных мышей не происходил рост изогенных опухолей с *KRAS p.G12D,*что свидетельствует об адаптивном иммунитете в отношении гетерологичных антигенов. AMG 510 продемонстрировал предварительное доказательство клинической противоопухолевой активности в первой когорте с введением дозы и представляет собой потенциально трансформирующую терапию для пациентов, для которых отсутствует эффективные виды лечения.

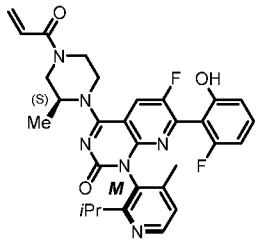
Онкопротеин KRAS представляет собой GTPазу, которая является важным медиатором внутриклеточных сигнальных путей, вовлеченных в рост и выживание опухолевых клеток. В нормальных клетках KRAS функционирует как молекулярный переключатель, обеспечивающий чередование неактивного GDP-связанного и активного GTP-связанного состояний. Переходу между этими состояниями способствуют факторы обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF), которые загружают GTP и активируют KRAS, и гидролиз GTP, который катализируется активирующими GTPазу белками (GAP), для инактивации KRAS. Связывание GTP с KRAS способствует связыванию эффекторов, запускающих пути передачи сигнала, включающие RAF-MEK-ERK (MAPK). Соматические активирующие мутации в KRAS являются признаком рака и предотвращают ассоциацию GAP, тем самым стабилизируя связывание эффекторов и усиливая передачу сигнала KRAS. Пациенты с опухолями, содержащими мутантную форму *KRAS*, характеризуются значительно худшими исходами и худшим прогнозом. Хотя существуют клинически одобренные ингибиторы нескольких белков пути MAPK (например, MEK, BRAF, EGFR) для подгруппы типов опухолей, на сегодняшний день не существует клинических молекул, селективных в отношении опухолей, содержащих

мутантную форму *KRAS*. Более того, несколько нацеленных на путь MAPK терапевтических средств противопоказаны для лечения опухолей, содержащих мутантную форму *KRAS*, из-за отсутствия клинической эффективности. Кроме того, не селективные в отношении опухоли или мутанта терапевтические средства могут вызывать токсичность в отношении мишени из-за ингибирования передачи сигнала MAPK в нормальных клетках. Это может ограничивать применимость комбинации таких средств со стандартным лечением или иммунотерапией. Таким образом, существует острая неудовлетворенная потребность в разработке селективных в отношении опухоли терапевтических средств, которые не создают препятствий для нормальных клеток.

KRAS p.G12C присутствует в приблизительно 13% случаев аденокарциномы легкого, 3% случаев колоректального рака и 2% случаев других солидных опухолей. Мутантный цистеин остатков $KRAS^{G12C}$, прилегающий к карману (P2) находится в неактивной связанной с GDP форме KRAS. Близость P2 и мутантного цистеина обуславливает обширный поиск ковалентных ингибиторов. Первый зарегистрированный электрофильный скрининг $KRAS^{G12C}$ привел к возможной идентификации ARS-1620, который демонстрирует эффективность in vivo на доклинических моделях с *KRAS p.G12C*. При этом ARS-1620 от компании Araxes Pharma стал важной вехой в доказательстве концепции селективного в отношении мутанта ингибирования KRAS, он был позиционирован как соединение-инструмент для доклинических исследований. Ученые из Amgen, Inc. идентифицировали серию новых молекул на основе акриламида, которые используют ранее не использовавшуюся бороздку на поверхности $KRAS^{G12C}$, как молекулы, характеризующиеся значительным повышением эффективности и селективности. Интенсивный электрофильный скрининг и дизайн на основе структуры привели к открытию AMG 510, первого ингибитора $KRAS^{G12C}$, который прошел клиническое тестирование на людях (см. www.clinicaltrials.gov NCT03600883). В настоящем изобретении предусмотрена убедительная доклиническая активность AMG 510, его способность усиливать уничтожение опухолевых клеток в виде монотерапии или в комбинации с другими терапевтическими средствами, а также сильное влияние на инфильтрацию иммунных клеток, что делает микроокружение опухоли чрезвычайно чувствительным к иммунотерапии. В данном документе также представлено предварительное доказательство клинической эффективности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую



AMG 510 или его фармацевтически приемлемую соль, и одно или несколько терапевтических или фармацевтически активных средств и фармацевтически

приемлемое вспомогательное вещество.

Настоящее изобретение дополнительно включает способ лечения видов рака, таких как солидные опухоли, включая без ограничения рак легкого, толстой кишки и поджелудочной железы, с помощью комбинации AMG 510 или фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере одного терапевтического средства, при этом терапевтическое средство выбрано из антитела к PD-1, химиотерапевтического средства, ингибитора MEK, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2, ингибитора PI3K и ингибитора AKT.

Настоящее изобретение дополнительно включает выделенную линию клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12C}$, при этом линия клеток представляет собой CT-26 *KRAS p.G12C*.

Настоящее изобретение дополнительно включает способ создания линии клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12C}$, при этом способ включает

a) инкубирование линии клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12D}$, с конструкцией CRISPR, которая индуцирует замещение нуклеотида в каждом из двух аллелей KRAS, таким образом образуются два аллеля $KRAS^{G12C}$; и

b) выделение линии клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12C}$.

ПЕРВЫЙ РЯД ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака поджелудочной железы, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и по меньшей мере одного химиотерапевтического средства.

2. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака толстой кишки, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и по меньшей мере одного химиотерапевтического средства.

3. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 2, где рак толстой кишки характеризуется мутацией *KRAS p.G12C*.

4. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака легкого, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и химиотерапевтического средства.

В некоторых таких вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

5. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 1, где рак поджелудочной железы характеризуется мутацией *KRAS p.G12C* .

6. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее

изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 1-5, где химиотерапевтическое средство представляет собой карбоплатин.

7. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака поджелудочной железы, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора MEK.

8. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака толстой кишки, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора MEK.

9. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака легкого, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора MEK.

10. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 9, где рак легкого характеризуется мутацией p.*KRAS G12C*.

11. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 7-10, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

12. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 7-10, где ингибитор MEK представляет собой пимасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 или AZD8330.

13. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака поджелудочной железы, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора EGFR.

14. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака толстой кишки, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора EGFR.

15. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака легкого, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора EGFR.

16. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 13-15, где ингибитор EGFR представляет собой афатиниб.

17. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее

изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 13 и 15, где ингибитор EGFR представляет собой эрлотиниб.

18. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 15, где ингибитор EGFR представляет собой лапатиниб.

19. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака поджелудочной железы, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора SHP2.

20. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака толстой кишки, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора SHP2.

21. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака легкого, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора SHP2.

22. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 19-21, где ингибитор SHP2 выбран из RMC-4550

23. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 22, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4550.

24. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака поджелудочной железы, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора PI3K.

25. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака толстой кишки, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора PI3K.

26. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака легкого, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора PI3K.

27. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 24-26, где ингибитор PI3K представляет собой AMG 511.

28. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 26, где ингибитор PI3K

представляет собой бупарлисиб.

29. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака поджелудочной железы, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора AKT.

30. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака легкого, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и ингибитора AKT.

31. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 29-30, где ингибитор AKT представляет собой AZD5363.

32. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака толстой кишки, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и антитела к EGFR.

33. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 32, где антитело к EGFR представляет собой цетуксимаб.

32. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака толстой кишки, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и антитела к PD-1.

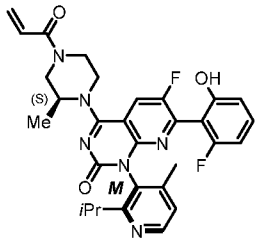
33. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 32, где антитело к PD-1 выбрано из AMG 404, пембролизумаба и ниволумаба.

34. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 33, где антитело к PD-1 представляет собой пембролизумаб.

35. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 33, где антитело к PD-1 представляет собой AMG 404.

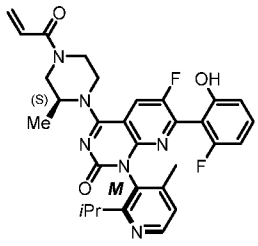
36. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 33, где антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб.

37. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



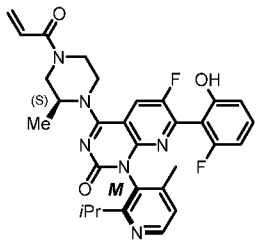
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, карбоплатин и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

38. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



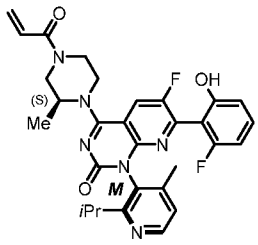
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, траметиниб и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

39. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



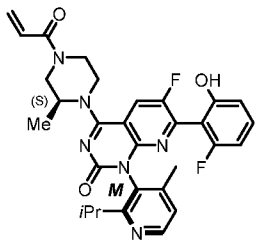
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, афатиниб и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

40. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



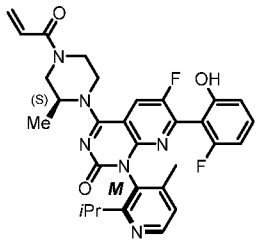
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, эрлотиниб и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

41. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



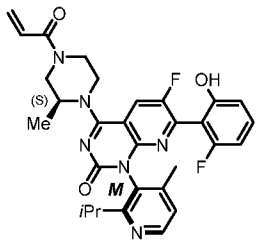
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, лапатиниб и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

42. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



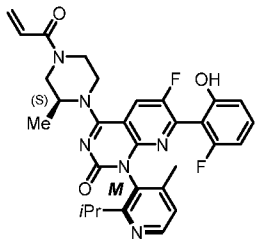
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, RMC-4550 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

43. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



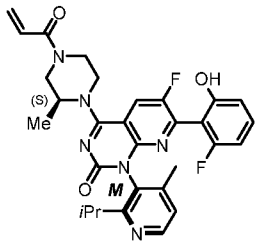
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, AMG 511 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

44. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



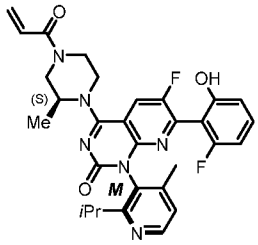
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, бупарлисиб и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

45. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



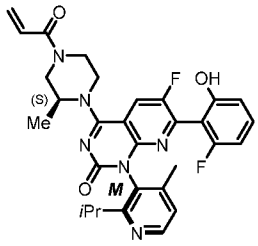
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, AZD5363 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

46. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



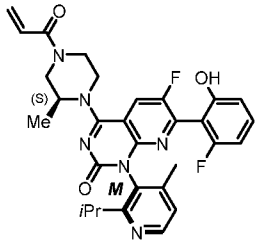
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, цетуксимаб и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

47. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее



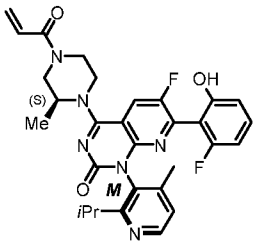
изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, антитело к PD-1 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

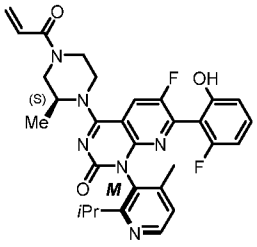
48. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее

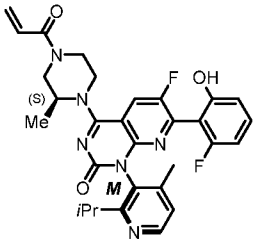


изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую или его фармацевтически приемлемую соль, AMG 404 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

49. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее

изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую  или его фармацевтически приемлемую соль, пембролизумаб и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

50. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую  или его фармацевтически приемлемую соль, ниволумаб и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

51. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по любому из вариантов осуществления 1-4 или 7-36, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой  или его фармацевтически приемлемую соль.

52. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе ингибитора MEK для лечения солидной опухоли.

53. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе ингибитора MEK для лечения рака легкого.

54. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе ингибитора MEK для лечения рака толстой кишки.

55. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора

$KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе ингибитора MEK для лечения рака поджелудочной железы.

56. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе химиотерапевтического средства для лечения солидной опухоли.

57. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе химиотерапевтического средства для лечения рака легкого.

58. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе химиотерапевтического средства для лечения рака толстой кишки.

59. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе химиотерапевтического средства для лечения рака поджелудочной железы.

60. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе ингибитора EGFR для лечения солидной опухоли.

61. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе ингибитора EGFR для лечения рака легкого.

62. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и на основе ингибитора EGFR для лечения рака толстой кишки.

63. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе ингибитора EGFR для лечения рака поджелудочной железы.

64. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе антитела к PD-1 для лечения солидной опухоли.

65. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе антитела к PD-1 для лечения рака

легкого.

66. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе антитела к PD-1 для лечения рака толстой кишки.

67. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе антитела к PD-1 для лечения рака поджелудочной железы.

68. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает применение ингибитора $KRAS^{G12C}$ в комбинации с химиотерапевтическим средством для изготовления лекарственного препарата для контроля или лечения рака поджелудочной железы, рака легкого или рака толстой кишки у субъекта.

69. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает применение ингибитора $KRAS^{G12C}$ в комбинации с ингибитором MEK для изготовления лекарственного препарата для контроля или лечения рака поджелудочной железы, рака легкого или рака толстой кишки у субъекта.

70. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает применение ингибитора $KRAS^{G12C}$ в комбинации с ингибитором EGFR для изготовления лекарственного препарата для контроля или лечения рака поджелудочной железы, рака легкого или рака толстой кишки у субъекта.

71. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает применение ингибитора $KRAS^{G12C}$ в комбинации с антителом к PD-1 для изготовления лекарственного препарата для контроля или лечения рака поджелудочной железы, рака легкого или рака толстой кишки у субъекта.

72. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает выделенную линию клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12C}$.

73. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает линию клеток по варианту осуществления 68, где линия клеток представляет собой CT-26 *KRAS p.G12C*.

74. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ создания линии клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12C}$, при этом способ включает

a) инкубирование линии клеток, содержащих два аллеля KRAS G12D, с конструкцией CRISPR, которая индуцирует замещение нуклеотида в каждом из двух аллелей KRAS, таким образом образуются два аллеля $KRAS^{G12C}$; и

b) выделение линии клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12C}$.

75. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 70, где конструкция CRISPR

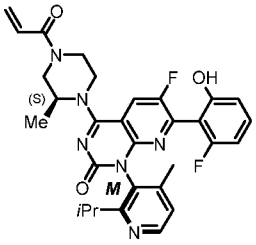
содержит последовательность CTTGTGATGGTTGGAGCTGA (SEQ ID NO.: 21).

76. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ лечения рака, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и по меньшей мере одного дополнительного химиотерапевтического средства.

77. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию лекарственного препарата на основе ингибитора $KRAS^{G12C}$ и лекарственного препарата на основе антитела к PD-1 для лечения солидной опухоли.

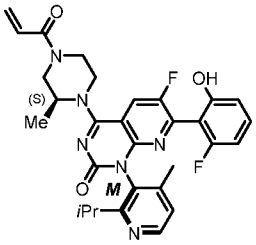
78. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает применение ингибитора $KRAS^{G12C}$ в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным химиотерапевтическим средством для изготовления лекарственного препарата для контроля или лечения рака поджелудочной железы, рака легкого или рака толстой кишки у субъекта.

79. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает способ по варианту осуществления 76, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой



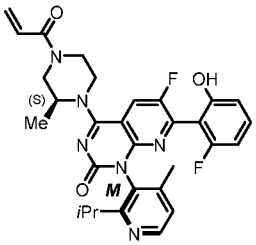
или его фармацевтически приемлемую соль.

80. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает комбинацию по варианту осуществления 77, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

81. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает применение по варианту осуществления 78, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой



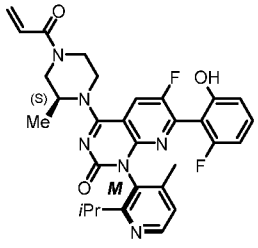
или его фармацевтически приемлемую соль.

82. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение включает применение по варианту осуществления 78, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

ВТОРОЙ РЯД ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение относится к способу лечения рака, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и по меньшей мере одного дополнительного фармацевтически активного средства.

2. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 1, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

3. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 1, где рак характеризуется мутацией *KRAS p.G12C*.

4. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 1, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легкого, аппендикса, эндометрия или тонкого кишечника.

5. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 4, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

6. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 4, где рак представляет собой колоректальный рак.

7. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 4, где рак представляет собой рак легкого.

8. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 7, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

9. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 4, где рак представляет собой рак аппендикса.

10. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 4, где рак представляет собой рак эндометрия.

11. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 4, где рак представляет собой рак тонкого кишечника.

12. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 1, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин, ингибитор на основе антитела к PD-1,

ингибитор MEK, ингибитор EGFR, ингибитор TOR, ингибитор SHP2, ингибитор PI3K или ингибитор AKT.

13. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин.

14. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор на основе антитела к PD-1.

15. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 14, где ингибитор на основе антитела к PD-1 выбран из AMG 404, пембролизумаба и ниволумаба.

16. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 15, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой пембролизумаб.

17. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 15, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой AMG 404.

18. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 15, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой ниволумаб.

19. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор MEK.

20. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 19, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб, пимасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 или AZD8330.

21. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 20, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

22. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор EGFR.

23. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 22, где ингибитор EGFR представляет собой афатиниб, эрлотиниб, лапатиниб или цетуксимаб.

24. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 23, где ингибитор EGFR представляет собой афатиниб.

25. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 23, где ингибитор EGFR представляет собой цетуксимаб.

26. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное

средство представляет собой ингибитор SHP2.

27. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 26, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4550.

28. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 26, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4630.

29. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор PI3K.

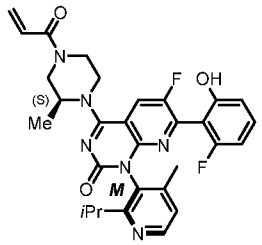
30. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 29, где ингибитор PI3K представляет собой AMG 511 или бупарлисиб.

31. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 30, где ингибитор PI3K представляет собой AMG 511.

32. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 30, где ингибитор PI3K представляет собой бупарлисиб.

33. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор AKT.

34. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 33, где ингибитор AKT представляет собой AZD5363.

35. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая  или его фармацевтически приемлемую соль, по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

36. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 35, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин, ингибитор на основе антитела к PD-1, ингибитор MEK, ингибитор EGFR, ингибитор TOR, ингибитор SHP2, ингибитор PI3K или ингибитор AKT.

37. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 36, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин.

38. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 36, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор на основе антитела к PD-1.

39. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по

варианту осуществления 38, где ингибитор на основе антитела к PD-1 выбран из AMG 404, пембролизумаба и ниволумаба.

40. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 39, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой пембролизумаб.

41. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 39, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой AMG 404.

42. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 39, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой ниволумаб.

43. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 36, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор MEK.

44. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 43, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб, пимасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 или AZD8330.

45. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 44, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

46. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 36, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор EGFR.

47. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 46, где ингибитор EGFR представляет собой афатиниб, эрлотиниб, лапатиниб или цетуксимаб.

48. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 47, где ингибитор EGFR представляет собой афатиниб.

49. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 47, где ингибитор EGFR представляет собой цетуксимаб.

50. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 36, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор SHP2.

51. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 50, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4550.

52. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 50, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4630.

53. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 36, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор PI3K.

54. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по

варианту осуществления 53, где ингибитор PI3K представляет собой AMG 511 или бупарлисиб.

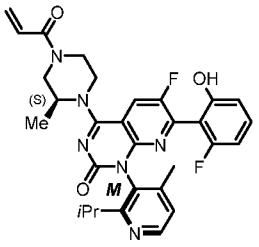
55. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 54, где ингибитор PI3K представляет собой AMG 511.

56. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 54, где ингибитор PI3K представляет собой бупарлисиб.

57. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 36, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор AKT.

58. В дополнительном варианте осуществления предусмотрена композиция по варианту осуществления 57, где ингибитор AKT представляет собой AZD5363.

59. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор, содержащий ингибитор $KRAS^{G12C}$ или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство.

60. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 59, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой  или его фармацевтически приемлемую соль.

61. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 59, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин, ингибитор на основе антитела к PD-1, ингибитор MEK, ингибитор EGFR, ингибитор TOR, ингибитор SHP2, ингибитор PI3K или ингибитор AKT.

62. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 59, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин.

63. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 59, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор на основе антитела к PD-1.

64. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 63, где ингибитор на основе антитела к PD-1 выбран из AMG 404, пембролизумаба и ниволумаба.

65. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 64, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой пембролизумаб.

66. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту

осуществления 64, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой AMG 404.

67. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 64, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой ниволумаб.

68. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 61, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор MEK.

69. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианте осуществления 68, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб, пимасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 или AZD8330.

70. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 69, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

71. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 61, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор EGFR.

72. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 61, где ингибитор EGFR представляет собой афатиниб, эрлотиниб, лапатиниб или цетуксимаб.

73. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 62, где ингибитор EGFR представляет собой афатиниб.

74. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 62, где ингибитор EGFR представляет собой цетуксимаб.

75. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 61, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор SHP2.

76. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 75, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4550.

77. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 75, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4630.

78. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 61, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор PI3K.

79. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 78, где ингибитор PI3K представляет собой AMG 511 или бупарлисиб.

80. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 79, где ингибитор PI3K представляет собой AMG 511.

81. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 79, где ингибитор PI3K представляет собой бупарлисиб.

82. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту

осуществления 61, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор AKT.

83. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 82, где ингибитор AKT представляет собой AZD5363.

84. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 59, где набор предназначен для лечения рака.

85. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 84, где рак характеризуется мутацией *KRAS p.G12C*.

86. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 84, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легкого, аппендикса, эндометрия или тонкого кишечника.

87. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 86, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

88. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 86, где рак представляет собой колоректальный рак.

89. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 86, где рак представляет собой рак легкого.

90. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 89, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

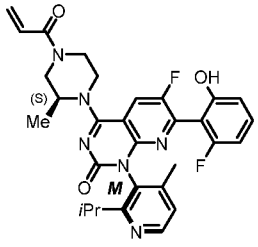
91. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 86, где рак представляет собой рак аппендикса.

92. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 86, где рак представляет собой рак эндометрия.

93. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен набор по варианту осуществления 86, где рак представляет собой рак тонкого кишечника.

94. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено применение ингибитора $KRAS^{G12C}$ в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным химиотерапевтическим средством для изготовления лекарственного препарата для контроля или лечения рака у субъекта.

95. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено применение по варианту осуществления 94, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой

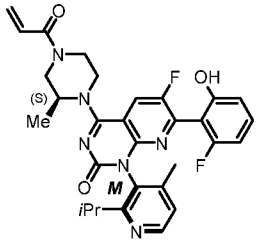


или его фармацевтически приемлемую соль.

96. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение, которое представляет собой ингибитор $KRAS^{G12C}$, для применения в лечении рака по

меньшей мере с одним дополнительным фармацевтически активным средством.

97. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 96, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

98. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 96, где рак характеризуется мутацией *KRAS p.G12C*.

99. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 96, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легкого, аппендикса, эндометрия или тонкого кишечника.

100. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 99, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

101. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 99, где рак представляет собой колоректальный рак.

102. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 99, где рак представляет собой рак легкого.

103. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 102, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

104. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 99, где рак представляет собой рак аппендикса.

105. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 99, где рак представляет собой рак эндометрия.

106. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 99, где рак представляет собой рак тонкого кишечника.

107. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 96, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин, ингибитор на основе антитела к PD-1, ингибитор MEK, ингибитор EGFR, ингибитор TOR, ингибитор SHP2, ингибитор PI3K или ингибитор AKT.

108. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 107, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин.

109. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 107, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор на основе антитела к

PD-1.

110. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 109, где ингибитор на основе антитела к PD-1 выбран из AMG 404, пембролизумаба и ниволумаба.

111. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 110, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой пембролизумаб.

112. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 110, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой AMG 404.

113. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 110, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой ниволумаб.

114. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 107, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор MEK.

115. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 114, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб, пимасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 или AZD8330.

116. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 115, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

117. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 107, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор EGFR.

118. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 117, где ингибитор EGFR представляет собой афатиниб, эрлотиниб, лапатиниб или цетуксимаб.

119. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 118, где ингибитор EGFR представляет собой афатиниб.

120. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 118, где ингибитор EGFR представляет собой цетуксимаб.

121. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 107, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор SHP2.

122. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 121, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4550.

123. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 121, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4630.

124. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 107, где по меньшей мере одно дополнительное

фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор PI3K.

125. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 124, где ингибитор PI3K представляет собой AMG 511 или бупарлисиб.

126. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 125, где ингибитор PI3K представляет собой AMG 511.

127. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 125, где ингибитор PI3K представляет собой бупарлисиб.

128. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 107, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор AKT.

129. В дополнительном варианте осуществления предусмотрено соединение по варианту осуществления 128, где ингибитор AKT представляет собой AZD5363.

130. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 1, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ и по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство вводят одновременно.

131. В дополнительном варианте осуществления предусмотрен способ по варианту осуществления 1, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ и по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство вводят отдельно.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает применение комбинации, включающей ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора Pi3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT. Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает применение комбинации для лечения рака, при этом комбинация включает ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора Pi3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT. Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает способ применения комбинации, включающей ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора Pi3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT, для лечения рака. Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает применение комбинации для лечения рака, при этом комбинация включает ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора Pi3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT, при этом применение включает самостоятельное введение комбинации.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает способ

лечения рака, включающий назначение комбинации, дополнительно включающей ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора Pi3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT. Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает способ лечения рака, предусматривающий назначение субъекту, нуждающемуся в этом, комбинации, дополнительно включающей ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора Pi3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает способ лечения рака с использованием комбинации, включающей ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора Pi3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT, при этом такой способ дополнительно включает описание указанной комбинации в формуляре и предписание пациенту, нуждающемуся в таком лечении рака.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает способ применения комбинации, включающей ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора Pi3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT, для лечения рака, при этом такой способ включает приобретение указанной комбинации для самостоятельного введения пациентом, нуждающимся в таком лечении рака.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает способ лечения рака, включающий инструктирование субъекта, нуждающегося в таком лечении, в отношении введения комбинации, включающей ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора на основе антитела к PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора Pi3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает способ лечения рака, включающий

A] назначение,

B] продажу или рекламу для продажи,

C] приобретение,

D] инструктирование в отношении самостоятельного введения или

E] введение

комбинации, описанной в данном документе, при этом комбинация была одобрена регулирующим органом для лечения рака у субъекта, нуждающегося в лечении рака.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения включает способ

обеспечения комбинации, включающей ингибитор $KRAS^{G12C}$ с другим терапевтическим средством, выбранным из химиотерапевтического средства, ингибитора PD-1, ингибитора MEK, селективного ингибитора PI3K, ингибитора EGFR, ингибитора TOR, ингибитора SHP2 или ингибитора AKT, для лечения рака, при этом указанный способ предусматривает возмещение затрат врачу, фармацевту, пациенту или страховой компании за продажу указанной комбинации.

Для ясности термин «инструктирование» предназначен для включения информации на этикетке, одобренной регулирующим органом, в дополнение к его общепринятому определению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1 показано, что AMG 510 в комбинации с карбоплатином усиливает супрессию роста опухоли NCI-H358 NSCLC.

На фигуре 2 показано, что AMG 510, объединенный с ингибитором MEK PD-325901, приводит к повышенной эффективности на модели ксенотрансплантата NSCLC NCI-H358.

На фигуре 3 показано, что AMG 510 подавляет *in vivo* рост опухолей CT-26 *KRAS p.G12C*.

На фигуре 4 показано, что AMG 510, объединенный с антителом к PD-1, приводит к повышению выживаемости и излечению на длительное время на мышиной модели рака с мутацией *KRAS p.G12C*.

На фигуре 5 показано, что обработка с помощью AMG 510 приводит к усилению инфильтрации CD8+ и CD4+ Т-клеток в опухоли CT-26 G12C-H10.

На фигуре 6 показано, что обработка с помощью AMG 510 приводит к повышению PD-L1-положительных нейтрофилов в опухолях CT-26 G12C-H10.

На фигуре 7 показано, что матрица избытка величины аддитивности идентифицирует области синергетического взаимодействия.

На фигуре 8 показана экспериментально полученная аддитивность на модели матриц самопересечения.

На фигуре 9 показано, что AMG 510 синергирует как с RMC-4550 (SHP2i), так и с траметинибом (MEKi) с достижением уничтожения клеток в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 10 показано, что отсутствие активности отдельного средства с афатинибом или RMC-4550 может способствовать более слабому синергизму в линии клеток MIA PaCA-2.

На фигуре 11 показано, что комбинации в 3D культуре могут демонстрировать повышенный синергизм.

На фигуре 12 показано, что комбинация AMG 510 X траметиниб действуют синергетически в NCI-H358.

На фигуре 13 показано самопересечение AMG в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 14 показано самопересечения траметиниба в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 15 показано, что комбинация AMG 510 X траметиниб демонстрирует

слабый синергизм в линии клеток MIA PaCa-2.

На фигуре 16 показано, что 3D культура улучшает синергизм комбинации AMG 510 X траметиниб в MIA PaCa-2.

На фигуре 17 показана комбинация AMG 510 X траметиниб (3D) в линии клеток NCI-H1373.

На фигуре 18 показано, что комбинация AMG 510 X траметиниб демонстрирует слабый синергизм из-за высокой эффективности каждого отдельного средства в CT-26 *KRAS p.G12C*.

На фигуре 19 показано, что комбинация AMG 510 X PD-325901 демонстрирует слабый синергизм в MIA PaCa-2.

На фигуре 20 показано, что комбинация AMG 510 X траметиниб оказывает синергетическое действие в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 21 показано, что комбинация AMG 510 X афатиниб оказывает слабое синергетическое действие в линии клеток MIA PaCa-2.

На фигуре 22 показано, что 3D культура не улучшает синергизм комбинации AMG 510 X афатиниб в линии клеток MIA PaCa-2.

На фигуре 23 показана комбинация AMG 510 X афатиниб (3D) в линии клеток NCI-H1373.

На фигуре 24 показано, что комбинация AMG 510 X афатиниб оказывает умеренное синергетическое действие в CT-26 *KRAS p.G12C*.

На фигуре 25 показано, что комбинация AMG 510 X лапатиниб оказывает синергетическое действие в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 26 показано, что комбинация AMG X эрлотиниб оказывает умеренное синергетическое действие в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 27 показано, что синергизм комбинации AMG 510 X эрлотиниб не наблюдается в линии клеток MIA PaCa-2 из-за отсутствия активности эрлотиниба.

На фигуре 28 показано, что синергизм комбинации AMG 510 X цетуксимаб не наблюдается в SW837 из-за отсутствия активности цетуксимаба *in vivo*.

На фигуре 29 показано, что комбинация AMG 510 X RMC-4550 оказывает синергетическое действие в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 30 показано, что комбинация AMG 510 X RMC-4550 оказывает слабое синергетическое действие в линии клеток MIA PaCa-2.

На фигуре 31 показано, что комбинация AMG 510 X RMC-4550 оказывает умеренное синергетическое действие в CT-26 *KRAS p.G12C*.

На фигуре 32 показано, что комбинация AMG 510 X AMG 511 оказывает умеренное синергетическое действие в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 33 показано, что комбинация AMG 510 X AMG 511 оказывает слабое синергетическое действие в линии клеток MIA PaCa-2.

На фигуре 34 показано, что комбинация AMG 510 X AMG 511 оказывает умеренное синергетическое действие в CT-26 *KRAS p.G12C*.

На фигуре 35 показано, что комбинация AMG 510 X бупарлисиб (BKM120) оказывает умеренное синергетическое действие в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 36 показано, что AMG 510 X AZD5363 оказывает слабое синергетическое действие в линии клеток NCI-H358.

На фигуре 37 показано, что AMG 5120 X AZD5363 оказывает слабое синергетическое действие в MIA PaCa-2.

На фигуре 38 показано, что AMG 510 подавляет передачу сигнала KRAS в CT-26 *KRAS p.G12C* в 2D культуре.

На фигуре 39 показано, что клетки CT-26 *KRAS p.G12C* чувствительны к AMG 510 в 3D культуре.

На фигуре 40a показана рентгеновская сокристаллическая структура $KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$, связанная с GDP и ARS-1620 (PDB ID: 5V9U).

На фигуре 40b показана рентгеновская сокристаллическая структура $KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$, связанная с GDP и AMG 510 при разрешении 1,65 Å (PDB ID: еще не назначен).

На фигуре 40c показана биохимическая активность AMG 510 и ARS-1620, измеренная в анализе катализируемого SOS1 обмена нуклеотидов с очищенным белком $KRAS^{G12C/C118A}$ или $KRAS^{C118A}$, n=4.

На фигуре 40d показаны кинетические свойства AMG 510 и ARS-1620, определяемые с помощью масс-спектрометрии ($n \geq 2$)

На фигуре 40e показана клеточная активность AMG 510 и ARS-1620 в NCI-H358 и MIA PaCa-2, измеренная с помощью ингибирования фосфорилирования ERK1/2 после 2-часовой обработки (n=2).

На фигуре 40f показано ингибирование фосфорилирования ERK и занятость $KRAS^{G12C}$ AMG 510 в клетках NCI-H358 и MIA PaCa-2 после 2-часовой обработки (n=3).

На фигуре 40g показана клеточная активность AMG 510 и ARS-1620 в NCI-H358 и MIA PaCa-2, измеренная с помощью эффектов в отношении жизнеспособности клеток после 72-часовой обработки (n=3).

На фигуре 40h показаны кинетические свойства AMG 510 и ARS-1620, определяемые с помощью ингибирования фосфорилирования ERK ($n \geq 2$).

На фигуре 41a показан эффект в отношении клеточной передачи сигнала в NCI-H358 или MIA PaCa-2 после 4- или 24-часовой обработки зависимым от дозы AMG 510.

На фигуре 41b показан эффект в отношении клеточной передачи сигнала в NCI-H358 или MIA PaCa-2 после обработки с помощью 0,1 мкМ AMG 510 в моменты времени до 24 часов.

На фигуре 41c показана клеточная активность AMG 510 на панели линий клеток с мутантом *KRAS p.G12C* и линий клеток без мутанта *KRAS p.G12C*, измеренная с помощью ингибирования фосфорилирования ERK1/2 после 2-часовой обработки ($n \geq 2$).

На фигуре 41d показана клеточная активность AMG 510 на панели линий клеток с мутантом *KRAS p.G12C* и линий клеток без мутанта *KRAS p.G12C*, измеренная с помощью

эффектов в отношении жизнеспособности клеток после 72-часовой обработки.

На фигуре 41e показаны кривые зависимости жизнеспособности от дозы, которые являются иллюстративными примерами по меньшей мере *n*=2 экспериментов. Эффект 72-часовой обработки с помощью AMG 510 в отношении жизнеспособности клеток в условиях адгерентного монослоя или сфероидной культуры (*n*=2).

На фигуре 41f показан анализ цистеинового протеома лизатов цельных клеток NCI-H358 после 4-часовой обработки с помощью 1 мкМ AMG 510 (*n*=5).

На фигурах 42a-d показано, что AMG 510 подавляет фосфорилирование ERK1/2 в опухолях с мутантом *KRAS p.G12C* in vivo. Мышам, несущим опухоли MIA PaCa-2 T2 (фигуры 42a, c, d) или NCI-H358 (фигура 42b) давали однократную дозу либо среды-носителя перорально, либо AMG 510 перорально (все другие столбики) и собирали через 2 часа (фигуры 42a, b) или через указанное время (фигуры 42c, d) и оценивали по уровням p-ERK, измеренным с помощью иммуноанализа MSD. Собирали образцы плазмы крови и опухоли и анализировали в отношении концентраций AMG 510 (красные треугольники, черные незаштрихованные кружочки соответственно). Данные представлены как процент контроля по сравнению со средой-носителем. Данные представляют среднее значение объема опухоли ± SEM (*n*=3/группа). Фигуры 42a-d: **** $P < 0{,}0001$; * $P < 0{,}05$ по Даннетту.

На фигуре 42e показаны результаты обработки с помощью AMG 510 по режиму введения дозы в ковалентной модификации $KRAS^{G12C}$ с использованием масс-спектрометрии с корреляцией по ингибированию p-ERK у мышей, несущих MIA PaCa-2 T2.

На фигуре 42f показаны результаты обработки с помощью AMG 510 по режиму введения дозы в ковалентной модификации $KRAS^{G12C}$ с использованием масс-спектрометрии с корреляцией по ингибированию p-ERK у мышей, несущих NCI-H358.

На фигуре 42g показаны результаты обработки с помощью AMG 510 в течение некоторого времени в ковалентной модификации $KRAS^{G12C}$ с использованием масс-спектрометрии с корреляцией по ингибированию p-ERK у мышей, несущих MIA PaCa-2 T2.

На фигуре 43a показано, что мышам с установленными опухолями MIA PaCa-2 T2 *KRAS p.G12C,* вводили дозу либо среды-носителя, либо AMG 510. AMG 510 селективно ингибирует рост опухолей с мутантом *KRAS p.G12C* in vivo.

На фигуре 43b показано, что мышам с установленными опухолями NCI-H358 *KRAS p.G12C* вводили дозу либо среды-носителя, либо AMG 510. AMG 510 селективно ингибирует рост опухолей с мутантом *KRAS p.G12C* in vivo.

На фигуре 43c показано, что мышам с установленными опухолями CT-26 *KRAS p.G12C* вводили дозу либо среды-носителя, либо AMG 510. AMG 510 селективно ингибирует рост опухолей с мутантом *KRAS p.G12C* in vivo.

На фигуре 43d показаны эффекты роста опухоли на модели $KRAS^{G12C}$ NSCLC PDX с мышами, обработанными либо средой-носителем, либо AMG 510. AMG 510 селективно

ингибирует рост опухолей с мутантом *KRAS p.G12C* in vivo.

На фигурах 43a, b, c и d данные представляют среднее значение объема опухоли ± SEM (n=10/группа). Фигуры 43a, b и c: **** P < 0,0001, * P < 0,05 для сравнений получающей среду-носитель группы с обработанной группой по Даннетту, # P < 0,05 для регрессии, определяемой с помощью парного t-критерия, и **** P < 0,0001 по двухфакторному ANOVA с RM.

На фигуре 43e показаны изображения CT двух пациентов с карциномой легкого с *KRAS p.G12C*, которых лечили с помощью AMG 510. Иллюстративные изображения до обработки ("исходный уровень") и поле обработки (R_x). Крайний слева: верхние панели представляют верхнюю левую долю легкого, а нижние панели представляют нижнюю правую долю легкого. Крайний справа: верхняя панель представляет верхнюю левую долю легкого; нижняя панель представляет плевру. AMG 510 селективно ингибирует рост опухолей с мутантом *KRAS p.G12C* in vivo.

На фигуре 43f и фигуре 47 показано, что мышам, несущим опухоли CT-26 KRAS p.G12C, вводили дозу среды-носителя или AMG 510. Отдельные графики опухоли CT-26 KRAS p.G12C 510 мышей, обработанных с помощью AMG (100 мг/кг).

На фигуре 43g и фигуре 47 проиллюстрировано, что мышам, несущим опухоли CT-26 KRAS p.G12C, вводили дозу среды-носителя или AMG 510. Отдельные графики опухоли CT-26 KRAS p.G12C 510 мышей, обработанных с помощью AMG (200 мг/кг). Продолжающаяся обработка получающей 100 мг/кг группы показало, что регрессия не была устойчивой (фиг. 43f), возможно, из-за неполного ингибирования p-ERK (фигура 47a). Поэтому оценивали дозу 200 мг/кг AMG 510, которая привела к почти полному ингибированию p-ERK (фиг. 47a) и привела к длительному излечению в восьми из десяти случаях (фиг. 43g), при этом уровни AMG 510 в плазме крови были чуть ниже клеточной IC90 (фигура 47h).

На фигуре 44a показан AMG 510 в комбинации с карбоплатином на ксенотрансплантатах опухоли NCI-H358.

На фигуре 44b показаны баллы синергизма для комбинаций AMG 510 с нацеливаемыми средствами, рассчитанные с использованием алгоритма избытка величины аддитивности Loewe и представленные в виде тепловой карты, при этом более высокие баллы (темный красный цвет) обозначают более сильные синергетические взаимодействия.

На фигуре 44c показан AMG 510 в комбинации с ингибитором MEK (PD-0325901) на ксенотрансплантатах опухоли NCI-H358.

На фигурах 44a и c данные представляют среднее значение объема опухоли ± SEM (n=10/группа). a: *** P < 0,001 для сравнения комбинированного лечения с каждым отдельным средством по Даннетту, # P < 0,001 для регрессии, определяемой с помощью парного t-критерия. c: **** P < 0,001 для комбинированного лечения по сравнению с каждым отдельным средством по Даннетту, #P < 0,001 для регрессии, определяемой с помощью парного t-критерия. Результаты для всех обработанных групп были значимыми

по сравнению с получающими среду-носитель (**** P < 0,0001 по Даннетту).

На фигуре 45a показан рост опухоли CT-26 *KRAS p.G12C* у отдельных мышей, обработанных одним из среды-носителя, AMG 510, антитела к PD-1 или AMG 510 в комбинации с антителом к PD-1 (*n*=10/группа). Линии с кружками показывают мышей без опухолей.

На фигуре 45b показан анализ Каплана-Мейера суррогатной конечнойточки выживаемости (размер опухоли > 800 мм^3). **** P < 0,001 по Коксу-Мантелю для контроля средой-носителем; # P < 0,005 для комбинации по сравнению с AMG 510 или антителом к PD-1 отдельно.

На фигуре 45c показаны опухоли CT-26 *KRAS p.G12C* мышей, обрабатываемых на протяжении четырех дней одним из среды-носителя, AMG 510, антитела к PD-1 или AMG 510 в комбинации с антителом к PD-1, или MEKi и иммунофенотипированных с помощью проточной цитометрии (*n*=8/группа). ****P < 0,0001, ***P < 0,001, **P < 0,01, *P < 0,05 по Тьюки по сравнению с контролем средой-носителем; NS=не значимое.

На фигуре 45d показана РНК, которая была выделена из опухолей CT-26 *KRAS p.G12C* после двух дней обработки (*n*=5/группа). Экспрессию генов и баллы рассчитывали с помощью технологии NanoString (см. способы). **** P < 0,0001, ***P < 0,001 по Тьюки.

На фигуре 45e показана экспрессия на клеточной поверхности антигена H-2K^d MHC класса I на клетках CT-26 *KRAS p.G12C* после 24-часовой обработки с помощью AMG 510 в присутствии или в отсутствие интерферона гамма ("IFNγ"), измеренная с помощью проточной цитометрии. Уровни секретируемого IFN-γ измеряли с помощью анализа ELISpot (n=4-5/группа).

На фигуре 45f показан рост отдельных опухолей у мышей, которых подвергали обработке с помощью AMG 510 плюс обработка антителом к PD-1 и повторно сенсибилизировали клетками CT-26 *KRAS p.G12C*, CT-26 или 4T1.

На фигуре 45g показано, что спленоциты собирали и заражали указанными клетками CT-26, CT-26 *KRAS p.G12C* или 4T1. * P=0,0269 для сравнения контроля с комбинацией с помощью непарного t-критерия.

На фигуре 45h показано, что обработка с помощью AMG 510 индуцирует провоспалительное микроокружение опухоли. Опухоли CT-26 KRAS p.G12C мышей, обрабатываемых на протяжении четырех дней одним из среды-носителя, AMG 510, антитела к PD-1 или AMG 510 в комбинации с антителом к PD-1 или MEKi, иммунофенотипировали с помощью иммуногистохимии (n=5/группа), иммуногистохимического окрашивания в отношении CD3/Ki67. Иммунопозитивное окрашивание в отношении Ki67 является синим и окрашивает ядра, а иммунопозитивное окрашивание в отношении CD3 и CD8 является коричневым и окрашивает цитоплазму. Стрелки в h указывают на примеры клеток с двойной иммунопозитивностью в отношении CD3 и Ki67.

На фигуре 45i показано, что обработка с помощью AMG 510 индуцирует провоспалительное микроокружение опухоли, опухоли CT-26 KRAS p.G12C мышей,

обрабатываемых на протяжении четырех дней одним из среды-носителя, AMG 510, антитела к PD-1 или AMG 510 в комбинации с антителом к PD-1 или MEKi, иммунофенотипировали с помощью иммуногистохимии (n=5/группа), иммуногистохимического окрашивания в отношении CD8. Иммунопозитивное окрашивание в отношении Ki67 является синим и окрашивает ядра, а иммунопозитивное окрашивание в отношении CD3 и CD8 является коричневым и окрашивает цитоплазму.

На фигуре 46a показана биохимическая активность AMG 510 и его реакционноспособного пропионамидного аналога, измеренная в анализе катализируемого SOS1 обмена нуклеотидов с очищенным белком $KRAS^{G12C/C118A}$ или $KRAS^{C118A}$ ($n \geq 2$). На всех фигурах 46a-e данные представляют среднее значение ± SD для числа указанных независимых повторностей.

На фигуре 46b показаны вычисленные максимальные скорости реакции и концентрации, при которых достигается полумаксимальная скорость AMG 510 и ARS-1620.

На фигуре 46c показано ингибирование фосфорилирования ERK с помощью RMC-4550 в клетках NCI-H358 с $t_{1/2}$=12,2 минуты (n=2).

На фигуре 46d показан эффект 72-часовой обработки с помощью AMG 510 в отношении жизнеспособности клеток в условиях адгерентного монослоя или сфероидной культуры в MIA PaCa-2 и NCI-H1373 (n=2).

На фигуре 46e показано определение периода полувыведения KRAS в клетках MIA PaCa-2 и NCI-H358 с помощью введение метки стабильного изотопа в клеточную культуру с помощью аминокислот (SILAC).

На фигуре 47a-c показано, что несущих опухоль CT-26 *KRAS p.G12C* мышей обрабатывали однократной дозой среды-носителя перорально или указанными дозами AMG 510 перорально и собирали через 2 часа. Уровни p-ERK измеряли с помощью иммуноанализа MSD. Собирали образцы плазмы крови и опухоли и анализировали в отношении концентраций AMG 510 (красные треугольники, черные незаштрихованные кружочки соответственно). Данные представлены как процент контроля (POC) по сравнению со средой-носителем. ****$P < 0,0001$, *$P < 0,05$ по Даннетту по сравнению со средой-носителем.

На фигуре 47d показано, что обработка с помощью AMG 510 приводит к ковалентной модификации KRASG12C, обратно коррелирующей с ингибированием p-ERK.

На фигуре 47e показан эффект AMG 510 в отношении роста опухоли на модели ксенотрансплантата SW480-1AC.

На фигуре 47f показан эффект обработки с помощью AMG 510 в отношении роста опухоли на модели $KRAS^{G12C}$ SCLC PDX. На фигурах 47e и f показано, что обработку начинали, когда опухоль достигала приблизительно 200 $мм^3$. ****P < 0,0001 по двухфакторному ANOVA с RM.

На фигуре 47g показаны уровни AMG 510 в плазме крови особей с

ксенотрансплантатом MIA PaCa-2 T2, NCI-H358.

На фигуре 47h показаны уровни AMG 510 в плазме крови особей с ксенотрансплантатом CT-26 *KRASp.G12C*.

На фигуре 47i показаны отдельные графики для опухоли CT-26 *KRAS p.G12C* обработанных с помощью AMG 510 мышей (200 мг/кг) среди голых мышей BALB/c от дня 14 до дня 32.

На фигуре 47j показаны изображения CT двух пациентов с карциномой легкого с *KRAS p.G12C*, которых подвергали обработке с помощью AMG 510. Дополнительные иллюстративные изображения до обработки ("исходный уровень") и после обработки (R_x) пациентов, ранее описанные на фигуре 43d (крайние левые слева сверху вниз): верхняя левая доля легкого, нижняя левая доля легкого, лимфатический узел, верхняя левая доля легкого, верхняя левая доля легкого. Крайние правые сверху вниз: нижняя левая доля легкого, нижняя левая доля легкого, плевра и надпочечник.

На фигуре 47k показан AMG 510 в качестве отдельного средства или в комбинации с карбоплатином на ксенотрансплантатах опухоли NCI-H358. **** $P < 0,0001$ по Даннетту для сравнения с контролем средой-носителем, # $P < 0,001$ для регрессии, определяемой с помощью парного t-критерия.

На фигуре 48 показаны матрицы ингибирования роста и избытка величины аддитивности Loewe для AMG 510, вводимого дозой в комбинации с нацеливаемыми средствами в указанной линии клеток, при этом более темными цветами обозначены более сильное уничтожение клеток (ингибирование роста) и более сильное синергетическое взаимодействие (избыток Loewe). Приведены максимальная тестируемая концентрация ингибиторов и диапазон доз, охватываемый матрицами в каждой комбинации. Отдельные гетерологичные комбинации (AxB) оценивали путем сравнения их соответствующих баллов синергизма с баллами их компонентов в самопересечении (AxA или BxB). Гетерологические комбинации считали синергическими только тогда, когда их балл синергизма в три раза превышал балл синергизма любого компонента в самопересечении.

На фигуре 49a показана клеточная активность AMG 510 и ингибитора MEK траметиниба в линии клеток CT-26 *KRAS p.G12C* и родительской линии клеток CT-26, измеренная с помощью ингибирования фосфорилирования ERK1/2 после 2-часовой обработки ($n \geq 2$).

На фигуре 49b показана клеточная активность AMG 510 и ингибитора MEK траметиниба в линии клеток CT-26 *KRAS p.G12C* и родительской линии клеток CT-26, измеренная с помощью эффектов в отношении жизнеспособности клеток после 72-часовой обработки в сфероидной культуре (n=2).

На фигуре 50a показаны опухоли CT-26 *KRAS p.G12C* мышей, обрабатываемых в течение четырех дней одним из среды-носителя, AMG 510, антитела к PD-1, AMG 510 плюс антитело к PD-1 или MEKi, и иммунофенотипированных с помощью проточной цитометрии (n=8/группа).

На фигуре 50b показано, что несущих опухоль CT-26 *KRAS p.G12C* мышей обрабатывали однократной дозой среды-носителя перорально (черный столбик) или указанной дозой MEKi перорально (синий столбик) и собирали через 2 часа. Уровни p-ERK измеряли с помощью иммуноанализа MSD. Собирали образцы плазмы крови и опухоли и анализировали в отношении концентрации MEKi (красные треугольники, черный незаштрихованный кружок соответственно). Данные представлены как процент контроля (POC) по сравнению со средой-носителем.

На фигуре 50c показано, что эффект обработки с помощью MEKi в отношении роста опухоли в течение некоторого времени измеряли у несущих опухоль CT-26 *KRAS p.G12C* мышей. Данные представляют среднее значение объема опухоли ± SEM (n=10/группа).

На фигуре 50d показаны объемы опухоли у несущих опухоль CT-26 *KRAS p.G12C* мышей, которых лечили в течение четырех дней одним из среды-носителя, AMG 510, антитела к PD-1, AMG 510 плюс антитело к PD-1 или MEKi. Данные представляют среднее значение объема опухоли ± SEM (n=8/группа).

На фигуре 50e показана РНК, которая была выделена из опухолей CT-26 *KRAS p.G12C* через два дня обработки. Экспрессию генов и баллы рассчитывали с помощью технологии NanoString (n=5/группа).

На фигуре 50f показана экспрессия на клеточной поверхности антигенов MHC класса I (H-2D^d и H-2L^d) на клетках CT-26 *KRAS p.G12C* после 24-часовой обработки с помощью AMG 510 в присутствии или в отсутствие IFNγ, измеренная с помощью проточной цитометрии.

На фигуре 50g показаны кривые роста у мышей Balb/c, несущих опухоли либо CT-26, либо CT-26 *KRAS p.G12C*.

На фигуре 50h показано количественное определение транскрипта CXCL10 или CXCL11, а также секретируемого белка IP-10 после 24-часовой обработки родительских клеток CT-26 или CT-26 KRAS p.G12C с помощью AMG 510 или MEKi.

На фигуре 50i показана экспрессия на клеточной поверхности антигенов MHC класса I (HLA, H-2D^d и H-2K^d) на клетках CT-26 KRAS p.G12C после 24-часовой обработки с помощью SW-1573, после 48-часовой обработки с помощью MIA PaCA-2 и после 48-часовой обработки с помощью AMG 510 в присутствии или в отсутствие IFNγ, измеренная с помощью проточной цитометрии.

На фигурах 50a, b, c и e * P < 0,05 по Тьюки для контроля средой-носителем; NS представляет собой отсутствие значимости; *** P < 0,001 по Даннетту по сравнению со средой-носителем и ****P < 0,0001 по Даннетту по сравнению с контролем средой-носителем.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предусмотрена комбинированная терапия, которая включает ингибитор KRAS^{G12C} и одно или несколько дополнительных фармацевтически активных средств, в частности, для лечения видов рака. Настоящее изобретение также

относится к фармацевтическим композициям, которые содержат ингибитор $KRAS^{G12C}$ и одно или несколько дополнительных фармацевтически активных средств, для лечения видов рака. Соединения, раскрытые в данном документе, включают все фармацевтически приемлемые меченные изотопами соединения, при этом один или несколько атомов соединений, раскрытых в данном документе, заменены атомами, имеющими такое же атомное число, но атомную массу или массовое число, отличные от атомной массы или массового числа, обычно обнаруживаемых в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в раскрытые соединения, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора, хлора и йода, такие как 2H, 3H, 11C, 13C, 14C, 13N, 15N, 15O, 17O, 18O, 31P, 32P, 35S, 18F, 36Cl, 123I и 125I соответственно. Такие меченные радиоактивным изотопом соединения могут применяться для способствования определению или измерению эффективности соединений посредством описания, например, места или механизма действия или аффинности связывания с фармакологически важным местом действия. Некоторые меченные изотопами соединения по настоящему изобретению, например, соединения, в которые включен радиоактивный изотоп, являются применимыми в исследованиях распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Радиоактивные изотопы тритий, т. е. 3H, и углерод-14, т. е. 14C, являются, в частности, применимыми для данной цели с учетом легкости их введения и готовых средств для их обнаружения.

Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, т. е. 2H, может предоставлять некоторые терапевтические преимущества, возникающие вследствие более высокой устойчивости к инактивации в процессе метаболизма, например, повышенный период полувыведения in vivo или сниженные требования к дозировке, и, следовательно, является более предпочтительным в некоторых обстоятельствах.

Замещение позитронно-активными изотопами, такими как 11C, 18F, 15O и 13N, может применяться в исследованиях с использованием позитронно-эмиссионной топографии (PET) для определения степени занятости рецептора субстратом. Меченные изотопами соединения со структурой (I), как правило, могут быть получены с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, или с помощью способов, аналогичных способам, описанным в разделах Препараты и Примеры, как изложено ниже, с применением соответствующего меченного изотопом реагента вместо немеченого реагента, используемого ранее.

Меченные изотопами соединения, раскрытые в данном документе, как правило, могут быть получены с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, или с помощью способов, аналогичных способам, описанным в прилагаемых примерах и схемах, с применением соответствующего меченного изотопом реагента вместо немеченого реагента, используемого ранее.

Некоторые из соединений, раскрытые в данном документе, могут существовать в виде стереоизомеров (т. е. изомеров, которые отличаются лишь пространственным расположением атомов), включая оптические изомеры и конформационные изомеры (или

конформеры). Соединения, раскрытые в данном документе, включают все стереоизомеры как в виде чистых препаратов отдельных стереоизомеров, так и в виде обогащенных препаратов каждого стереоизомера, и как рацемические смеси таких стереоизомеров, так и отдельные диастереомеры и энантиомеры, которые могут быть разделены в соответствии со способами, которые известны специалистам в данной области техники. Кроме того, соединения, раскрытые в данном документе, включают все таутомерные формы соединений.

Некоторые из соединений, раскрытых в данном документе, могут существовать в виде атропоизомеров, которые являются конформационными стереоизомерами, которые возникают, когда вращение вокруг одинарной связи в молекуле предотвращается или сильно замедляется в результате стерических взаимодействий с другими частями молекулы. Соединения, раскрытые в данном документе, включают все атропоизомеры как в виде чистых препаратов отдельных атропоизомеров, так и в виде обогащенных препаратов каждого атропоизомера или неспецифическую смесь каждого атропоизомера. В тех случаях, если вращательный барьер вокруг одинарной связи достаточно высок, и взаимопревращение между конформациями является достаточно медленным, то могут допускаться разделение и выделение изомерных видов молекул. Разделение и выделение изомерных видов молекул соответственно обозначается хорошо известными и общепринятыми символами «M» или «P».

В другом варианте осуществления такие соединения могут использоваться в качестве промежуточных соединений в способе получения соединений в настоящей заявке.

В другом варианте осуществления такие соединения могут находиться в форме фармацевтически приемлемой соли и в фармацевтическом составе с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом.

Также в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, которые содержат соединение, раскрытое в данном документе, вместе с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, таким как, например, разбавитель или носитель. Соединения и фармацевтические композиции, подходящие для применения в настоящем изобретении, предусматривают таковые, где соединение может быть введено в эффективном количестве для достижения своего предназначения. Введение соединения описано более подробно ниже.

В другом варианте осуществления такие соединения могут использоваться в качестве промежуточных соединений в способе получения соединений в настоящей заявке.

В другом варианте осуществления такие соединения могут находиться в форме фармацевтически приемлемой соли и в фармацевтическом составе с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом.

Также в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, которые содержат соединение, раскрытое в данном документе, вместе с фармацевтически

приемлемым вспомогательным веществом, таким как, например, разбавитель или носитель. Соединения и фармацевтические композиции, подходящие для применения в настоящем изобретении, предусматривают таковые, где соединение может быть введено в эффективном количестве для достижения своего предназначения. Введение соединения описано более подробно ниже.

Подходящие фармацевтические составы могут быть определены специалистом в данной области техники в зависимости от пути введения и необходимой дозы. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1435-712 (18th ed., Mack Publishing Co, Истон, Пенсильвания, 1990 г.). Составы могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость in vivo высвобождения и скорость in vivo выведения введенных средств. В зависимости от пути введения подходящая доза может быть рассчитана в соответствии с весом тела, площадью поверхности тела или размером органов. Специалисты в данной области техники обычно проводят дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения соответствующей лечебной дозы, без излишних экспериментов, особенно с учетом информации о дозе и анализов, раскрытых в данном документе, а также фармакокинетических данных, которые можно получить в клинических испытаниях на животных или людях.

Фразы "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают побочных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животному или человеку. Применяемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" включает все возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и т. п. Применение таких вспомогательных веществ для фармацевтически активных веществ широко известно в уровне техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство несовместимы с терапевтическими композициями, предполагается их применение в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции. В иллюстративных вариантах осуществления состав может содержать сухую кукурузную патоку, высокоолеиновое сафлоровое масло, кокосовое масло, соевое масло, L-лейцин, трехосновный фосфат кальция, L-тирозин, L-пролин, L-лизина ацетат, DATEM (эмульгатор), L-глутамин, L-валин, двухосновный фосфат калия, L-изолейцин, L-аргинин, L-аланин, глицин, L-аспарагин моногидрат, L-серин, цитрат калия, L-треонин, цитрат натрия, хлорид магния, L-гистидин, L-метионин, аскорбиновую кислоту, карбонат кальция, L-глутаминовую кислоту, L-цистина дигидрохлорид, L-триптофан, L-аспарагиновую кислоту, холинхлорид, таурин, м-инозитол, сульфат железа(II), аскорбилпальмитат, сульфат цинка, L-карнитин, альфа-токоферилацетат, хлорид натрия, ниацинамид, смешанные токоферолы, пантотенат кальция, сульфат меди(II), тиаминхлорид гидрохлорид, витамин А пальмитат, сульфат марганца, рибофлавин, пиридоксин гидрохлорид, фолиевую кислоту, бета-каротин, иодид калия, филлохинон,

биотин, селенат натрия, треххлористый хром, молибдат натрия, витамин D3 и цианокобаламин.

Соединение может присутствовать в фармацевтической композиции в виде фармацевтически приемлемой соли. Применяемая в данном документе фраза "фармацевтически приемлемые соли" включает, например, соли присоединения основания и соли присоединения кислоты.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания могут быть образованы с помощью металлов или аминов, таких как щелочные и щелочноземельные металлы или органические амины. Фармацевтически приемлемые соли соединений также могут быть получены с помощью фармацевтически приемлемого катиона. Подходящие фармацевтически приемлемые катионы широко известны специалистам в данной области техники и включают щелочной, щелочноземельный, аммонийный катионы и катионы четвертичного аммония. Также возможным является использование карбонатов или гидрокарбонатов. Примеры металлов, применяемых в качестве катионов, представляют собой натрий, калий, магний, аммоний, кальций или трехвалентное железо и т. п. Примеры подходящих аминов включают изопропиламин, триметиламин, гистидин, N, N'-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, дициклогексиламин, этилендиамин, N-метилглюкамин и прокаин.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты включают соли неорганических или органических кислот. Примеры подходящий солей присоединения кислоты включают гидрохлориды, формиаты, ацетаты, цитраты, салицилаты, нитраты, фосфаты. Другие подходящие фармацевтически приемлемые соли широко известны специалистам в данной области техники и включают, например, соли, образованные с помощью муравьиной, уксусной, лимонной, щавелевой, винной или миндальной кислот, с помощью хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты или фосфорной кислоты; с помощью органических карбоновых, сульфоновых, сульфо- или фосфокислот или N-замещенных сульфаминовых кислот, например, уксусной кислоты, трифторуксусной кислоты (TFA), пропионовой кислоты, гликолевой кислоты, янтарной кислоты, малеиновой кислоты, гидроксималеиновой кислоты, метилмалеиновой кислоты, фумаровой кислоты, яблочной кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, щавелевой кислоты, глюконовой кислоты, глюкаровой кислоты, глюкуроновой кислоты, лимонной кислоты, бензойной кислоты, коричной кислоты, миндальной кислоты, салициловой кислоты, 4-аминосалициловой кислоты, 2-феноксибензойной кислоты, 2-ацетоксибензойной кислоты, эмбоновой кислоты, никотиновой кислоты или изоникотиновой кислоты и с помощью аминокислот, таких как 20 альфа-аминокислот, вовлеченные в синтез белков в природе, например, глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота, а также с помощью фенилуксусной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, 2-гидроксиэтансульфоновой кислоты, этан-1,2-дисульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты, 4-метилбензолсульфоновой кислоты, нафталин-2-сульфоновой кислоты, нафталин-1,5-дисульфоновой кислоты, 2- или

3-фосфоглицерата, глюкозо-6-фосфата, N-циклогексилсульфаминовой кислоты (с образованием цикламатов) или с помощью других кислотных органических соединений, таких как аскорбиновая кислота.

Фармацевтические композиции, содержащие соединения, раскрытые в данном документе, могут быть изготовлены традиционным способом, например, посредством способов традиционного смешивания, растворения, гранулирования, изготовления драже, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсуляции, захвата или лиофилизации. Надлежащий состав зависит от выбранного пути введения.

Подходящие композиции для перорального введения могут быть легко составлены путем объединения соединения, раскрытого в данном документе, с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, такими как носители, широко известные в уровне техники. Такие вспомогательные вещества и носители позволяют составлять соединения по настоящему изобретению в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и т. п. для перорального приема внутрь пациентом, который подлежит лечению. Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены путем добавления к соединению, раскрытому в данном документе, твердого вспомогательного вещества, необязательно измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления при необходимости подходящих вспомогательных средств с получением таблеток или ядер драже. Подходящие вспомогательные вещества включают, например, наполнители и целлюлозные препараты. При необходимости могут быть добавлены вещества для улучшения распадаемости таблеток. Фармацевтически приемлемые ингредиенты хорошо известны для различных типов составов и могут представлять собой, например, связующие (например, природные или синтетические полимеры), смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества, подсластители и ароматизирующие средства, материалы для нанесения покрытия, консерванты, красители, загустители, вспомогательные вещества, антимикробные средства, антиоксиданты и носители для различных типов составов.

Если терапевтически эффективное количество соединения, раскрытого в данном документе, вводят перорально, то композиция, как правило, находится в форме твердого состава (например, таблетки, капсулы, пилюли, порошка или пастилки) или жидкого состава (например, водной суспензии, раствора, настойки или сиропа).

При введении в форме таблетки композиция может дополнительно содержать функциональное твердое вещество и/или твердый носитель, такой как желатин или вспомогательное средство. Таблетка, капсула и порошок могут содержать от приблизительно 1 до приблизительно 95% соединения и предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 90% соединения.

При введении в форме жидкости или суспензии могут быть добавлены функциональная жидкость и/или жидкий носитель, такой как вода, углеводородный носитель или масла животного или растительного происхождения. Жидкая форма композиции может дополнительно содержать физиологический раствор, растворы

сахарных спиртов, растворы декстрозы или других сахаридов или гликоли. При введении в форме жидкости или суспензии композиция может содержать от приблизительно 0,5 до приблизительно 90% по весу соединения, раскрытого в данном документе, и предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 50% соединения, раскрытого в данном документе. В одном варианте осуществления предусмотрено, что жидкий носитель является неводным или по сути неводным. Композиция, предназначенная для введения в форме жидкости, может поставляться в виде быстрорастворимого твердого состава или суспензии для растворения непосредственно перед введением.

Если терапевтически эффективное количество соединения, раскрытого в данном документе, вводят посредством внутривенной, кожной или подкожной инъекции, композиция находится в форме апирогенного, приемлемого для парентерального введения водного раствора. Получение таких приемлемых для парентерального введения растворов, имеющих соответствующие pH, изотоничность, стабильность и т. п., находится в пределах квалификации специалиста в данной области. Предпочтительная композиция для внутривенной, кожной или подкожной инъекции, как правило, содержит в дополнение к соединению, раскрытому в данном документе, изотоническую среду-носитель. Такие композиции могут быть получены для введения в виде растворов свободного основания или фармакологически приемлемых солей в воде, соответствующим образом смешанных с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. В обычных условиях хранения и применения такие препараты могут необязательно содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Инъекционные композиции могут включать стерильные водные растворы, суспензии или дисперсии и стерильные порошки для немедленного получения стерильных инъекционных растворов, суспензий или дисперсий. Во всех вариантах осуществления форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она должна быть устойчивой в условиях изготовления и хранения и должна противостоять загрязняющему действию микроорганизмов, таких как бактерии и грибы, благодаря необязательному включению консерванта. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси, а также растительные масла. В одном варианте осуществления предусмотрено, что носитель является неводным или по сути неводным. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц соединения в варианте осуществления в виде дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть вызвано различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тиомерсалом и т. п. Во множестве вариантов осуществления будет

предпочтительным включение изотонических средств, например, сахаров или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута путем применения в композициях средств замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы получают путем дополнения по мере необходимости активных соединений в требуемом количестве в соответствующем растворителе различными другими ингредиентами, перечисленными выше, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В варианте осуществления, представляющем собой стерильные порошки, предназначенные для получения стерильных инъекционных растворов, предпочтительные способы получения представляют собой методики вакуумной сушки и лиофильной сушки, которые обеспечивают получение порошка активного ингредиента плюс любого дополнительного необходимого ингредиента из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

Составы с медленным высвобождением или замедленным высвобождением также могут быть получены с целью достижения контролируемого высвобождения активного соединения в контакте с жидкостями организма в желудочно-кишечном тракте и для обеспечения по сути постоянного и эффективного уровня активного соединения в плазме крови. Например, высвобождение может контролироваться одним или несколькими из растворения, диффузии и ионного обмена. Кроме того, подход с медленным высвобождением может усиливать абсорбцию через насыщаемые или ограничивающие пути в желудочно-кишечном тракте. Например, для данной цели соединение может быть встроено в полимерную матрицу из биологически разлагаемого полимера, водорастворимого полимера или смеси обоих и необязательно подходящих поверхностно-активных веществ. В данном контексте встраивание может означать включение микрочастиц в матрицу полимеров. Составы с контролируемым высвобождением также получают путем инкапсуляции диспергированных микрочастиц или эмульгированных микрокапель с помощью известных технологий дисперсионного или эмульсионного покрытия.

Для введения путем ингаляции соединения по настоящему изобретению удобно доставлять в форме подачи распыляемого аэрозоля из упаковок под давлением или с помощью небулайзера с использованием подходящего пропеллента. В варианте осуществления аэрозоля под давлением единица дозирования может быть определена путем предоставления клапана для доставки отмеренного количества. Для применения в ингаляторе или инсуффляторе могут быть составлены капсулы и картриджи, например, из желатина, содержащие порошковую смесь соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Соединения, раскрытые в данном документе, могут быть составлены для

парентерального введения путем инъекции (например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии). Составы для инъекции могут быть представлены в стандартной лекарственной форме (например, в ампулах или в многодозовых контейнерах) с добавленным консервантом. Композиции могут принимать формы, такие как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных средах-носителях, и могут содержать вспомогательные средства для составления, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства.

Фармацевтические составы, предназначенные для парентерального введения, включают водные растворы соединений в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии соединений могут быть получены в виде соответствующих масляных инъекционных суспензий. Подходящие липофильные растворители или среды-носители включают жирные масла или синтетические сложные эфиры жирной кислоты. Водные инъекционные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии. Необязательно суспензия также может содержать подходящие стабилизаторы или средства, которые повышают растворимость соединений и обеспечивают получение высококонцентрированных растворов. Альтернативно композиция по настоящему изобретению может находиться в форме порошка, предназначенного для разбавления подходящей средой-носителем (например, стерильной апирогенной водой) перед применением.

Соединения, раскрытые в данном документе также могут быть составлены в композиции для ректального введения, такие как суппозитории или удерживающие клизмы (например, содержащие традиционные суппозиторные основы). В дополнение к составам, описанным ранее, соединения также могут быть составлены в виде депо-препарата. Такие составы длительного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Так, например, соединения могут быть составлены с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменных смол или в виде умеренно растворимых производных, например, в виде умеренно растворимой соли.

В частности, соединение, раскрытое в данном документе, можно вводить перорально, буккально или сублингвально в форме таблеток, содержащих вспомогательные вещества, такие как крахмал или лактоза, или в капсулах или вагинальных суппозиториях, либо отдельно, либо в смеси со вспомогательными веществами, или в форме настоек или суспензий, содержащих ароматизирующие или красящие средства. Такие жидкие препараты могут быть получены с использованием фармацевтически приемлемых добавок, таких как суспендирующие средства. Соединение также можно вводить парентерально, например внутривенно, внутримышечно, подкожно или интракоронарно. Для парентерального введения соединение лучше всего применять в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например соли или сахарные спирты, такие как маннит или глюкоза, для придания

раствору изотоничности с кровью.

Для ветеринарного применения соединение, раскрытое в данном документе, вводят в виде подходящего приемлемого состава в соответствии с обычной ветеринарной практикой. Ветеринарный врач может легко определить режим дозирования и путь введения, который наиболее подходит для конкретного животного.

В некоторых вариантах осуществления все необходимые компоненты для лечения нарушения, связанного с KRAS, с применением соединения, раскрытого в данном документе, либо отдельно, либо в комбинации с другим средством, или для вмешательства, традиционно выполняемого для лечения такого заболевания, могут быть упакованы в набор. Конкретно, в настоящем изобретении предусмотрен набор для применения при терапевтическом вмешательстве при заболевании, содержащий упакованный комплект лекарственных препаратов, которые включают соединение, раскрытое в данном документе, а также буферы и другие компоненты, предназначенные для получения доставляемых форм указанных лекарственных препаратов, и/или устройства для доставки таких лекарственных препаратов, и/или любые средства, которые применяют в комбинированной терапии с соединением, раскрытым в данном документе, и/или инструкции для лечения заболевания, находящиеся в упаковке с лекарственными препаратами. Инструкции могут быть зафиксированы на любом материальном носителе, таком как печатная бумага или считываемый компьютером магнитный или оптический носитель, или инструкции могут предоставляться в виде ссылки на удаленный компьютерный источник данных, такой как страница всемирной компьютерной сети, доступная через интернет.

"Терапевтически эффективное количество" означает количество, эффективное для лечения или предупреждения развития или для ослабления существующих симптомов у субъекта, лечение которого осуществляют. Определение эффективных количеств находится в пределах компетенции специалистов в данной области, особенно в свете подробного раскрытия, представленного в данном документе. Как правило, "терапевтически эффективная доза" относится к такому количеству соединения, которое приводит к достижению необходимого эффекта. Например, в одном предпочтительном варианте осуществления терапевтически эффективное количество соединения, раскрытого в данном документе, снижает активность KRAS на по меньшей мере 5% по сравнению с контролем, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или на по меньшей мере 90%.

Количество вводимого соединения может зависеть от субъекта, лечение которого осуществляют, от возраста, состояния здоровья, пола и веса субъекта, вида одновременного лечения (если оно применяется), тяжести заболевания, характера необходимого эффекта, способа и частоты лечения и решения лечащего врача. Частота

введения доз также может зависеть от фармакодинамических эффектов в отношении давления кислорода в артериальной крови. Однако наиболее предпочтительная доза может быть адаптирована в отношении отдельного субъекта, как это понятно и может быть определено специалистом в данной области без излишних экспериментов. Обычно это предусматривает корректировку стандартной дозы (например, снижение дозы, если пациент имеет низкий вес тела).

Хотя индивидуальные потребности варьируются, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств соединения находится в пределах квалификации специалистов в данной области. Для введения человеку при радикальном или профилактическом лечении состояний и нарушений, идентифицированных в данном документе, например, типичные дозы соединений по настоящему изобретению могут составлять от приблизительно 0,05 мг/кг/сутки до приблизительно 50 мг/кг/сутки, например по меньшей мере 0,05 мг/кг, по меньшей мере 0,08 мг/кг, по меньшей мере 0,1 мг/кг, по меньшей мере 0,2 мг/кг, по меньшей мере 0,3 мг/кг, по меньшей мере 0,4 мг/кг или по меньшей мере 0,5 мг/кг и предпочтительно 50 мг/кг или меньше, 40 мг/кг или меньше, 30 мг/кг или меньше, 20 мг/кг или меньше или 10 мг/кг или меньше, что может составлять, например, от приблизительно 2,5 мг/сутки (0,5 мг/кг x 5 кг) до приблизительно 5000 мг/сутки (50 мг/кг x 100 кг). Например, дозы соединений могут составлять от приблизительно 0,1 мг/кг/сутки до приблизительно 50 мг/кг/сутки, от приблизительно 0,05 мг/кг/сутки до приблизительно 10 мг/кг/сутки, от приблизительно 0,05 мг/кг/сутки до приблизительно 5 мг/кг/сутки, от приблизительно 0,05 мг/кг/сутки до приблизительно 3 мг/кг/сутки, от приблизительно 0,07 мг/кг/сутки до приблизительно 3 мг/кг/сутки, от приблизительно 0,09 мг/кг/сутки до приблизительно 3 мг/кг/сутки, от приблизительно 0,05 мг/кг/сутки до приблизительно 0,1 мг/кг/сутки, от приблизительно 0,1 мг/кг/сутки до приблизительно 1 мг/кг/сутки, от приблизительно 1 мг/кг/сутки до приблизительно 10 мг/кг/сутки, от приблизительно 1 мг/кг/сутки до приблизительно 5 мг/кг/сутки, от приблизительно 1 мг/кг/сутки до приблизительно 3 мг/кг/сутки, от приблизительно 1 мг/сутки до приблизительно 1000 мг/сутки, от приблизительно 20 мг/сутки до приблизительно 750 мг/сутки, от приблизительно 3 мг/сутки до приблизительно 500 мг/сутки, от приблизительно 5 мг/сутки до приблизительно 250 мг/сутки, от приблизительно 10 мг/сутки до приблизительно 100 мг/сутки, от приблизительно 3 мг/сутки до приблизительно 10 мг/сутки или от приблизительно 100 мг/сутки до приблизительно 250 мг/сутки. Такие дозы могут быть введены в однократной дозе или они могут быть поделены на несколько доз.

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ $KRAS^{G12C}$

В настоящем изобретении предусмотрен способ ингибирования RAS-опосредованной сигнальной системы клетки, предусматривающий приведение клетки в контакт с эффективным количеством одного или нескольких соединений, раскрытых в данном документе. Ингибирование RAS-опосредованной передачи сигнала может быть оценено и продемонстрировано широким спектром путей, известных из уровня техники.

Неограничивающие примеры включают демонстрацию (a) снижения GTPазной активности RAS; (b) снижения аффинности связывания GTP или повышения аффинности связывания GDP; (c) повышения Koff GTP или снижения Koff GDP; (d) снижения уровней молекул, опосредующих передачу сигнала, расположенных ниже в пути RAS, например, снижения уровней pMEK, pERK или pAKT; и/или (e) снижения степени связывания комплекса RAS с расположенными ниже в пути сигнальными молекулами, включая без ограничения Raf. Наборы и коммерчески доступные анализы могут быть использованы для определения одного или нескольких из вышеуказанных.

В раскрытии также предусмотрены способы применения соединений или фармацевтических композиций по настоящему изобретению для лечения болезненных состояний, включая без ограничения состояния, связанные с мутацией G12C KRAS, HRAS или NRAS (например, рак).

В некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ лечения рака, причем способ предусматривает введение эффективного количества любой из вышеуказанных фармацевтических композиций, содержащих соединение, раскрытое в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления рак опосредован мутацией G12C KRAS, HRAS или NRAS. В различных вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак или рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желчного пузыря, рак щитовидной железы и рак желчных протоков.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ предусматривает определение того, есть ли у субъекта мутация G12C KRAS, HRAS или NRAS, и, если у субъекта определено наличие мутации G12C KRAS, HRAS или NRAS, то - введение субъекту терапевтически эффективной дозы по меньшей мере одного соединения, раскрытого в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Раскрытые соединения ингибируют независимый от якорных белков рост клеток и, следовательно, имеют потенциал к ингибированию метастаз опухолей. Соответственно, в другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ ингибирования метастаз опухолей, причем способ предусматривает введение эффективного количества соединения, раскрытого в данном документе.

Мутации G12C KRAS, HRAS или NRAS также были идентифицированы при гемобластозах (например, виды рака, при которых поражается кровь, костный мозг и/или лимфатические узлы). Соответственно, некоторые варианты осуществления направлены на введение раскрытых соединений (например, в форме фармацевтической композиции) пациенту, нуждающемуся в лечении гемобластоза. Такие формы рака включают без ограничения лейкозы и лимфомы. Например, раскрытые в настоящем документе соединения могут использоваться для лечения заболеваний, таких как острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфома из малых лимфоцитов (SLL), хронический

миелолейкоз (CML), острый моноцитарный лейкоз (AMoL) и/или другие виды лейкоза. В других вариантах осуществления соединения применимы для лечения лимфом, таких как все подтипы лимфомы Ходжкина или неходжкинских лимфом. В различных вариантах осуществления соединения применимы для лечения злокачественных новообразований из плазматических клеток, таких как множественная миелома, лимфома из клеток мантийной зоны и макроглобулинемия Вальденстрема.

Определение того, предусматривает ли опухоль или рак мутацию G12C KRAS, HRAS или NRAS, может быть выполнено путем оценки нуклеотидной последовательности, кодирующей белок KRAS, HRAS или NRAS, путем оценки аминокислотной последовательности белка KRAS, HRAS или NRAS или путем оценки характеристик предполагаемого мутантного белка KRAS, HRAS или NRAS. Последовательность дикого типа KRAS, HRAS или NRAS человека известна в уровне техники (например № доступа NP203524).

Способы выявления мутации в нуклеотидной последовательности KRAS, HRAS или NRAS известны специалистам в данной области техники. Такие способы включают без ограничения анализы, в которых используется полимеразная цепная реакция-полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP), анализы, в которых используется полимеразная цепная реакция-одноцепочечный конформационный полиморфизм (PCR-SSCP), анализы в которых используется ПЦР в режиме реального времени, секвенирование продуктов ПЦР, анализы, в которых используется проводимая в отношении мутантного аллеля специфическая ПЦР-амплификация (MASA), прямое секвенирование, реакции удлинения праймера, электрофорез, лигирование олигонуклеотидных зондов, гибридизационные анализы, анализы TaqMan, SNP-генотипирование, анализы плавления с высокой разрешающей способностью и микроматричные анализы. В некоторых вариантах осуществления образцы оценивают в отношении мутаций G12C KRAS, HRAS или NRAS с помощью ПЦР в режиме реального времени. При ПЦР в режиме реального времени применяют флуоресцентные зонды, специфичные в отношении мутаций G12C KRAS, HRAS или NRAS. Когда присутствует мутация, зонд связывается и выявляется флуоресценция. В некоторых вариантах осуществления мутацию G12C KRAS, HRAS или NRAS идентифицируют с применением способа прямого секвенирования специфических участков (например, экзон 2 и/или экзон 3) в гене KRAS, HRAS или NRAS. Данная методика позволит идентифицировать все возможные мутации в секвенированном участке.

Способы выявления мутации в белке KRAS, HRAS или NRAS известны специалистам в данной области техники. Такие способы включают без ограничения выявление мутантных KRAS, HRAS или NRAS с применением связывающего средства (например, антитела), специфичного в отношении мутантного белка, электрофорез белков и Вестерн-блоттинг, а также прямое секвенирование пептида.

В способах определения того, предусматривает ли опухоль или рак мутацию G12C KRAS, HRAS или NRAS, может использоваться ряд образцов. В некоторых вариантах

осуществления образец отбирают у субъекта, имеющего опухоль или рак. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой свежий образец опухоли/рака. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой замороженный образец опухоли/рака. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой фиксированный в формалине образец, залитый в парафин. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец циркулирующих опухолевых клеток (CTC). В некоторых вариантах осуществления образец перерабатывается в клеточный лизат. В некоторых вариантах осуществления образец перерабатывается в ДНК или РНК.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения гиперпролиферативного нарушения у млекопитающего, который предусматривает введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения, раскрытого в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления указанный способ относится к лечению субъекта, который страдает от рака, такого как острый миелоидный лейкоз, рак у подростков, рак надпочечников в детском возрасте, виды рака, связанные со СПИДом (например, лимфома и саркома Капоши), рак анального канала, рак червеобразного отростка, астроцитомы, атипичный тератоид, базально-клеточный рак, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, глиома ствола головного мозга, опухоль головного мозга, рак молочной железы, бронхиальные опухоли, лимфома Беркитта, карциноидная опухоль, атипичный тератоид, эмбриональные опухоли, эмбрионально-клеточная опухоль, первичная лимфома, рак шейки матки, виды рака в детском возрасте, хордома, опухоли сердца, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелолейкоз (CML), хронические миелопролиферативные нарушения, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиома, кожная Т-клеточная лимфома, внепеченочная протоковая карцинома in situ (DCIS), эмбриональные опухоли, рак CNS, рак эндометрия, эпендимома, рак пищевода, эстезионейробластома, саркома Юинга, внечерепная эмбрионально-клеточная опухоль, внегонадная эмбрионально-клеточная опухоль, рак глаза, фиброзная гистиоцитома кости, рак желчного пузыря, рак ЖКТ, карциноидная опухоль ЖКТ, желудочно-кишечные стромальные опухоли (GIST), эмбрионально-клеточная опухоль, гестационная трофобластическая опухоль, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, рак печени, лимфома Ходжкина, гипофарингеальный рак, внутриглазная меланома, опухоли островков поджелудочной железы, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы, рак почки, рак гортани, рак губ и полости рта, рак печени, лобулярная карцинома in situ (LCIS), рак легкого, лимфома, метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным заболеванием, срединная карцинома, рак ротовой полости, синдромы множественных эндокринных неоплазий, множественная миелома/неоплазия плазматических клеток, фунгоидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелопролиферативные неоплазии, множественная миелома, карцинома из клеток Меркеля, злокачественная мезотелиома, злокачественная фиброзная гистиоцитома кости и остеосаркома, рак полости носа и околоносовых пазух,

рак носоглотки, нейробластома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак полости рта, рак губ и полости рта, рак ротоглотки, рак яичников, рак поджелудочной железы, папилломатоз, параганглиома, рак околоносовых пазух и полости носа, рак околощитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, плевропульмональная бластома, первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС), рак предстательной железы, рак прямой кишки, переходно-клеточный рак, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак слюнной железы, рак кожи, рак желудка (ЖКТ), мелкоклеточный рак легкого, рак тонкого кишечника, саркома мягких тканей, Т-клеточная лимфома, рак яичка, рак горла, тимома и рак вилочковой железы, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, трофобластическая опухоль, необычные виды рака у детей, рак мочеиспускательного канала, саркома матки, рак влагалища, рак вульвы или вирус-индуцированный рак. В некоторых вариантах осуществления указанный способ относится к лечению неракового гиперпролиферативного нарушения, такого как доброкачественная гиперплазия кожи (например, псориаз), рестеноз или нарушение, связанное с предстательной железой (например, доброкачественная гипертрофия предстательной железы (BPH)).

В некоторых вариантах осуществления способы лечения направлены на лечение видов рака легкого, причем способы предусматривают введение эффективного количества любого из вышеописанных соединений (или фармацевтической композиции, содержащей его) субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), например аденокарциному, плоскоклеточный рак легкого или крупноклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого. Другие виды рака легкого, которые можно лечить с помощью раскрытых соединений, включают без ограничения железистые опухоли, карциноидные опухоли и недифференцированные виды рака.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы модулирования активности G12C-мутантного белка KRAS, HRAS или NRAS, осуществляемые путем приведения белка в контакт с эффективным количеством соединения по настоящему изобретению. Модуляция может представлять собой ингибирование или активирование активности белка. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования активности белка, осуществляемые путем приведения G12C-мутантного белка KRAS, HRAS или NRAS в контакт с эффективным количеством соединения по настоящему изобретению в растворе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования активности G12C-мутантного белка KRAS, HRAS или NRAS, осуществляемые путем приведения клетки, ткани или органа, которые экспрессируют белок, представляющий интерес, в контакт. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования активности белка у субъекта, включая без ограничения грызунов и млекопитающих (например, человека), осуществляемые путем

введения субъекту эффективного количества соединения по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления процент модуляции превышает 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%. В некоторых вариантах осуществления процент ингибирования превышает 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90%.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS в клетке, осуществляемые путем приведения указанной клетки в контакт с количеством соединения по настоящему изобретению, достаточным для ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS в указанной клетке. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS в ткани, осуществляемые путем приведения указанной ткани в контакт с количеством соединения по настоящему изобретению, достаточным для ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS в указанной ткани. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS в организме, осуществляемые путем приведения указанного организма в контакт с количеством соединения по настоящему изобретению, достаточным для ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS в указанном организме. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS у животного, осуществляемые путем приведения указанного животного в контакт с количеством соединения по настоящему изобретению, достаточным для ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS у указанного животного. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS у млекопитающего, осуществляемые путем приведения указанного млекопитающего в контакт с количеством соединения по настоящему изобретению, достаточным для ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS у указанного млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS у человека, осуществляемые путем приведения указанного человека в контакт с количеством соединения по настоящему изобретению, достаточным для ингибирования активности G12C KRAS, HRAS или NRAS у указанного человека. В настоящем изобретении предусмотрены способы лечения заболевания, опосредованного активностью G12C KRAS, HRAS или NRAS у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

Комбинированная терапия

В настоящем изобретении также предусмотрены способы осуществления вариантов комбинированной терапии, в которых средство, о котором известно, что оно модулирует другие пути, или другие компоненты того же пути, или даже перекрывающиеся наборы целевых ферментов применяются в комбинации с соединением по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой солью. В одном

аспекте такая терапия включает без ограничения комбинацию одного или нескольких соединений по настоящему изобретению с химиотерапевтическими средствами, терапевтическими антителами и лучевой терапией, предназначенную для обеспечения синергетического или аддитивного терапевтического эффекта.

Множество химиотерапевтических веществ в настоящее время известны в уровне техники и могут быть применены в комбинации с соединениями по настоящему изобретению. Соединения или фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть использованы в комбинации по меньшей мере с одним или несколькими химиотерапевтическими средствами. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое вещество выбрано из группы, состоящей из ингибиторов митоза, алкилирующих средств, антиметаболитов, интеркалирующих антибиотиков, ингибиторов факторов роста, ингибиторов клеточного цикла, ферментов, ингибиторов топоизомеразы, модификаторов биологического ответа, антигормонов, ингибиторов ангиогенеза и антиандрогенов. Неограничивающими примерами являются химиотерапевтические средства, цитотоксические средства и непептидные малые молекулы, такие как Gleevec® (иматиниб мезилат), Kyprolis® (карфилзомиб), Velcade® (бортезомиб), Casodex (бикалутамид), Iressa® (гефитиниб), Venclexta™ (венетоклакс) и Adriamycin™ (докорубицин), а также носитель химиотерапевтических средств. Неограничивающие примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytoxan™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилоломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорциклофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамина оксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихимицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, Casodex™, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; ингибиторы синтеза гормонов коры надпочечников, такие как

аминоглютетимид, митотан, трилостан; компенсаторы фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфомитин; эллиптиния ацетат; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например паклитаксел и доцетаксел; ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из приведенных выше.

Также в качестве подходящих химиотерапевтических веществ, улучшающих состояние клеток, включены антигормональные средства, которые действуют для регулирования или ингибирования действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, в том числе, например, тамоксифен, (Nolvadex™), ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (фарестон); а также антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; камптотецин-11 (CPT-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO).

При необходимости соединения или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно применять в комбинации с обычно прописываемыми противораковыми лекарственными средствами, такими как Herceptin®, Avastin®, Erbitux®, Rituxan®, Taxol®, Arimidex®, Taxotere®, ABVD, авицин, абаговомаб, акридина карбоксамид, адекатумумаб, 17-N-аллиламино-17-деметоксигелданамицин, альфарадин, альвоцидиб, 3-аминопиридин-2-карбоксальдегид тиосемикарбазон, амонафид, антрацендион, иммунотоксины к CD22, противоопухолевые, антитуморогенные травы, апазиквон, атипримод, азатиоприн, белотекан, бендамустин, BIBW 2992, бирикодар, бросталлицин, бриостатин, бутионин сульфоксимин, CBV (химиотерапия), каликулин, неспецифические противоопухолевые средства клеточного цикла, дихлоруксусная кислота, дискодермолид, эльсамитруцин, эноцитабин, эпотилон, эрибулин, эверолимус, эксатекан, эксисулинд, ферругинол, фородезин, фосфэстрол, режим химиотерапии ICE, IT-101, имексон, имиквимод, индолокарбазол, ирофулвен, ланиквидар, ларотаксел, леналидомид, лукантон, луртотекан, мафосфамид, митозоломид, нафоксидин, недаплатин, олапариб, ортатаксел, PAC-1, экстракт азимины, пиксантрон, ингибитор протеасомы, ребеккамицин, резиквимод, рубитекан, SN-38, салиноспорамид A, сапацитабин, Stanford

V, свайнсонин, талапорфин, тариквидар, тегафур-урацил, темодар, тесетаксел, триплатины тетранитрат, трис(2-хлорэтил)амин, троксацитабин, урамустин, вадимезан, винфлунин, ZD6126 или зосуквидар.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу применения соединений или фармацевтических композиций, предусмотренных в данном документе, в комбинации с лучевой терапией для ингибирования аномального роста клеток или лечения гиперпролиферативного нарушения у млекопитающего. Методики применения лучевой терапии известны из уровня техники, и данные методики можно применять в комбинированной терапии, описанной в данном документе. Введение соединения по настоящему изобретению в данной комбинированной терапии может быть определено, как описано в данном документе.

Лучевую терапию можно применять посредством одного из нескольких способов или комбинации способов, включая без ограничения наружную лучевую терапию, внутреннюю лучевую терапию, лучевую терапию, обеспечиваемую имплантатом, стереотаксическую радиохирургию, системную лучевую терапию, радиотерапию и постоянную или временную внутритканевую брахитерапию. Применяемый в данном документе термин "брахитерапия" относится к лучевой терапии, осуществляемой посредством пространственно ограниченного радиоактивного материала, вводимого в организм в опухоль или около опухоли или в другое место пролиферативной вследствие заболевания ткани. Термин без ограничения предназначен для включения воздействия радиоактивных изотопов (например, At-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32 и радиоактивных изотопов Lu). Подходящие источники излучения для применения в качестве средства, улучшающего состояние клеток, по настоящему изобретению включают как твердые вещества, так и жидкости. В качестве неограничивающего примера источником излучения может быть радионуклид, такой как I-125, I-131, Yb-169, Ir-192 в качестве твердого источника, I-125 в качестве твердого источника, или другие радионуклиды, которые излучают фотоны, бета-частицы, гамма-излучение или другие лучи, оказывающие терапевтическое действие. Радиоактивный материал также может представлять собой текучую среду, полученную из любого раствора радионуклида(радионуклидов), например, раствора I-125 или I-131, или радиоактивная текучая среда может быть получена с использованием взвеси подходящей текучей среды, содержащей небольшие частицы твердых радионуклидов, таких как Au-198, Y-90. Более того, радионуклид(радионуклиды) может(могут) быть включен(включены) в состав геля или радиоактивных микросфер.

Соединения или фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно применять в комбинации с количеством одного или нескольких веществ, выбранных из химиотерапевтических средств, антиангиогенных средств, ингибиторов передачи сигнала, антипролиферативных средств, ингибиторов гликолиза или ингибиторов аутофагии.

Антиангиогенные средства, такие как ингибиторы ММР-2 (матриксной

металлопротеиназы 2), ингибиторы MMP-9 (матриксной металлопротеиназы 9) и ингибиторы COX-11 (циклооксигеназы 11), можно применять в сочетании с соединением по настоящему изобретению и фармацевтическими композициями, описанными в данном документе. Антиангиогенные средства включают, например, рапамицин, темсиролимус (CCI-779), эверолимус (RAD001), сорафениб, сунитиниб и бевацизумаб. Примеры применимых ингибиторов COX-II включают алекоксиб, валдекоксиб и рофекоксиб. Примеры применимых ингибиторов матриксной металлопротеиназы описаны в WO 96/33172, WO 96/27583, публикации заявки на европейский патент EP0818442, публикации заявки на европейский патент EP1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, публикации заявки на европейский патент 606046, публикации заявки на европейский патент 931788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO1999007675, публикации заявки на европейский патент EP1786785, публикации заявки на европейский патент № EP1181017, публикации заявки на патент США № US20090012085, публикации заявки на патент США US5863949, публикации заявки на патент США US5861510 и публикации заявки на европейский патент EP0780386, все из которых включены в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки. Предпочтительными ингибиторами MMP-2 и MMP-9 являются таковые, которые имеют небольшую активность ингибирования MMP-1 или не имеют ее. Более предпочтительными являются ингибиторы, которые селективно ингибируют MMP-2 и/или AMP-9 по сравнению с другими матриксными металлопротеиназами (т. е. MAP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 и MMP-13). Некоторыми конкретными примерами ингибиторов MMP, применимых в настоящем изобретении, являются AG-3340, RO 32-3555 и RS 13-0830.

Соединения по настоящему изобретению также можно применять в вариантах совместной терапии с другими противораковыми средствами, такими как ацеманнан, акларубицин, альдеслейкин, алемтузумаб, алитретиноин, альтретамин, амифостин, аминолевулиновая кислота, амрубицин, амсакрин, анагрелид, анастрозол, ANCER, анцестим, арглабин, триоксид мышьяка, BAM 002 (Novelos), бексаротен, бикалутамид, броксуридин, капецитабин, целмолейкин, цетрореликс, кладрибин, клотримазол, цитарабин окфосфат, DA 3030 (Dong-A), даклизумаб, денилейкин дифтитокс, деслорелин, дексразоксан, дилазеп, доцетаксел, докозанол, доксеркальциферол, доксифлуридин, доксорубицин, бромокриптин, кармустин, цитарабин, фторурацил, HIT-диклофенак, интерферон альфа, даунорубицин, доксорубицин, третиноин, эдельфозин, эдреколомаб, эфлорнитин, эмитефур, эпирубицин, эпоэтин бета, этопозида фосфат, экземестан, экзисулинд, фадрозол, филграстим, финастерид, флударабина фосфат, форместан, фотемустин, нитрат галлия, гемцитабин, гемтузумаб зогамицин, комбинация гимерацил/отерацил/тегафур, гликопин, гозерелин, гептаплатин, хорионический гонадотропин человека, зародышевый альфа-фетопротеин человека, ибандроновая кислота, идарубицин, (имиквимод, интерферон альфа, интерферон альфа природный, интерферон альфа-2, интерферон альфа-2a, интерферон альфа-2b, интерферон альфа-N1,

интерферон альфа-$_{n3}$, интерферон альфакон-1, интерферон-альфа, природный интерферон-бета, интерферон-бета-1a, интерферон бета-1b, интерферон-гамма, природный интерферон гамма-1a, интерферон гамма-1b, интерлейкин-1 бета, йобенгуан, иринотекан, ирсогладин, ланреотид, LC 9018 (Yakult), лефлуномид, ленограстим, лентинана сульфат, летрозол, лейкоцитарный альфа-интерферон, лейпрорелин, левамизол+фторурацил, лиарозол, лобаплатин, лонидамин, ловастатин, мазопрокол, меларсопрол, метоклопрамид, мифепристон, милтефозин, миримостим, некомплементарная двухцепочечная РНК, митогуазон, митолактол, митоксантрон, молграмостим, нафарелин, налоксон+пентазоцин, нартограстим, недаплатин, нилутамид, носкапин, новый эритропоэз-стимулирующий белок, октреотид NSC 631570, опрелвекин, озатерон, оксалиплатин, паклитаксел, памидроновая кислота, пегаспаргаза, пегинтерферон-альфа-2b, натрия пентозана полисульфат, пентостатин, пицибанил, пирарубицин, антитимоцитарные поликлональные антитела кролика, полиэтиленгликоль интерферон-альфа-2a, порфимер натрия, ралоксифен, ралтитрексед, разбуриказа, рения Re 186 этидронат, RII ретинамид, ритуксимаб, ромуртид, самария (153 Sm) лексидронам, сарграмостим, сизофиран, собузоксан, сонермин, стронция-89 хлорид, сурамин, тазонермин, тазаротен, тегафур, темопорфин, темозоломид, тенипозид, тетрахлордекаоксид, талидомид, тимальфазин, тиротропин альфа, топотекан, торемифен, тоситумомаб-иод 131, трастузумаб, треосульфан, третиноин, трилостан, триметрексат, трипторелин, фактор некроза опухоли альфа, природный, убенимекс, вакцина от рака мочевого пузыря, вакцина Маруямы, вакцина на основе лизата меланомы, валрубицин, вертепорфин, винорелбин, вирулизин, зиностатин стималамер или золедроновая кислота; абареликс; AE 941 (Aetema), амбамустин, антисмысловой олигонуклеотид, bcl-2 (Genta), APC 8015 (Dendreon), цетуксимаб, децитабин, дексаминоглутетимид, диазиквон, EL 532 (Elan), EM 800 (Endorecherche), энилурацил, этанидазол, фенретинид, филграстим SD01 (Amgen), фулвестрант, галоцитабин, гастрин 17 иммуноген, HLA-B7 для генной терапии (Vical), гранулоцитный макрофаговый колониестимулирующий фактор, гистамин дигидрохлорид, ибритумомаб тиуксетан, иломастат, IM 862 (Cytran), интерлейкин-2, ипроксифен, LDI 200 (Milkhaus), леридистим, линтузумаб, моноклональное антитело CA 125 (Biomira), противораковые моноклональные антитела (Japan Pharmaceutical Development), моноклональные антитела HER-2 и Fc (Medarex), идиотипическое моноклональное антитело 105AD7 (CRC Technology), идиотипическое моноклональное антитело CEA (Trilex), моноклональное антитело LYM-1-иод 131 (Techniclone), моноклональное антитело к полиморфному эпителиальному муцину, меченное иттрием 90 (Antisoma), маримастат, меногарил, митумомаб, мотексафин гадолиний, MX 6 (Galderma), неларабин, нолатрексед, белок P 30, пегвизомант, пеметрексед, порфиромицин, приномастат, RL 0903 (Shire), рубитекан, сатраплатин, фенилацетат натрия, спарфозиновая кислота, SRL 172 (SR Pharma), SU 5416 (SUGEN), TA 077 (Tanabe), тетратиомолибдат, талибластин, тромбопоэтин, этилэтиопурпурин олова, тирапазамин, противораковая вакцина (Biomira), противомеланомная вакцина (Нью-Йоркский университет), противомеланомная вакцина

(институт Слоуна-Кеттеринга), вакцина на основе онколизата меланомы (Нью-Йоркский медицинский колледж), вакцина на основе лизатов клеток вирусной меланомы (Королевская больница Ньюкасла) или валсподар.

Соединения по настоящему изобретению можно дополнительно применять с ингибиторами VEGFR. Другие соединения, описанные в следующих патентах и заявках на патенты, можно применять в комбинированной терапии: US 6258812, US 2003/0105091, WO 01/37820, US 6235764, WO 01/32651, US 6630500, US 6515004, US 6713485, US 5521184, US 5770599, US 5747498, WO 02/68406, WO 02/66470, WO 02/55501, WO 04/05279, WO 04/07481, WO 04/07458, WO 04/09784, WO 02/59110, WO 99/45009, WO 00/59509, WO 99/61422, US 5990141, WO 00/12089 и WO 00/02871.

В некоторых вариантах осуществления комбинация предусматривает композицию по настоящему изобретению в комбинации с по меньшей мере одним антиангиогенным средством. К таким средствам относятся без ограничения полученные *in vitro* синтетическим путем химические композиции, антитела, антигенсвязывающие участки, радионуклиды, а также их комбинации и конъюгаты. Средство может представлять собой агонист, антагонист, аллостерический модулятор, токсин или, более широко, может действовать ингибирующим или стимулирующим образом на свою мишень (например, активация или ингибирование рецептора или фермента) и тем самым способствует гибели клеток или останавливает клеточный рост.

В совокупности антитела образуют семейство белков плазмы крови, известных как иммуноглобулины, и содержат домены иммуноглобулинов. (Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed., Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, 1999). Используемый в данном документе термин "антитело" относится к белку в общепринятом формате иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему вариабельные и константные области. Например, антитело может представлять собой IgG, который характеризуется "Y-образной" структурой из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну "легкую" (как правило, имеющую молекулярный вес, составляющий приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, имеющую молекулярный вес, составляющий приблизительно 50-70 кДа). Антитело имеет вариабельную область и константную область. В форматах IgG вариабельная область обычно содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается среди других антител, которые связываются с различными антигенами. Константная область позволяет антителу рекрутировать клетки и молекулы иммунной системы. Вариабельная область состоит из N-концевых областей каждой легкой цепи и тяжелой цепи, тогда как константная область состоит из С-концевых частей каждой из тяжелых и легких цепей. (Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

Общая структура и свойства CDR антител были описаны в уровне техники. Вкратце, в остове антитела CDR встроены в каркас вариабельной области тяжелой и легкой цепей, где они составляют области, главным образом отвечающие за связывание и распознавание антигена. Как правило, вариабельная область содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепей (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; см. также Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883) в пределах каркасной области (обозначенные как каркасные области 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4 согласно Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше).

Антитела могут содержать любую константную область, известную в уровне техники. Человеческие легкие цепи классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эпсилон-цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая без ограничения IgM1 и IgM2. Варианты осуществления настоящего изобретения включают все такие классы или изотипы антител. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, человеческую константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эпсилон-, гамма- или мю-типа, например, человеческую константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эпсилон-, гамма- или мю-типа. Соответственно, в иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, включая любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая в значительное степени сходна с встречающимся в природе антителом, продуцируемым млекопитающим, например, мышью, кроликом, козой, лошадью, курицей, хомяком, человеком и т. п. В этом отношении антитело можно рассматривать как антитело млекопитающего, например, антитело мыши, антитело кролика, антитело козы, антитело лошади, антитело курицы, антитело хомяка, антитело человека и т. п. В определенных аспектах антитело представляет собой человеческое антитело. В определенных аспектах антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Термин "химерное антитело" относится к антителу, содержащему домены из двух или более различных антител. Химерное антитело может, например, содержать константные домены от одного вида и вариабельные домены от второго или, в более общем случае, может содержать фрагменты аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Химерное антитело также может содержать домены двух или больше различных антител от одного и того же вида. Термин "гуманизированное" при использовании в отношении антител относится к антителам,

содержащим по меньшей мере области CDR из источника, отличного от человека, сконструированные таким образом, чтобы они имели структуру и иммунологическую функцию, более сходные с таковыми у настоящих человеческих антител, чем у антител из исходного источника. Например, гуманизация может включать прививание CDR из антитела, отличного от человеческого, такого как мышиное антитело, на человеческое антитело. Гуманизация также может включать селективные аминокислотные замены для получения отличной от человеческой последовательности, более сходной с человеческой последовательностью..

Антитело можно расщеплять на фрагменты с помощью ферментов, таких как, например, папаин и пепсин. Папаин расщепляет антитело с образованием двух Fab-фрагментов и одного Fc-фрагмента. Пепсин расщепляет антитело с образованием F(ab')2-фрагмента и pFc'-фрагмента. Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент антитела" относится к части молекулы антитела, которая способна к связыванию антигена антитела и также известна как "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающая часть". В иллюстративных примерах антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент или F(ab')2-фрагмент.

Архитектуру антител использовали для создания растущего спектра альтернативных форматов, который охватывает диапазон молекулярных масс по меньшей мере приблизительно 12-150 кДа и характеризуется диапазоном валентности (n) от мономерных (n=1), до димерных (n=2), до тримерных (n=3), до тетрамерных (n=4) и потенциально более высокого порядка; такие альтернативные форматы в данном документе называются "белковыми продуктами на основе антител". Белковые продукты на основе антител включают белковые продукты на основе структуры полного антитела и белковые продукты, которые имитируют фрагменты антитела, сохраняющие полную антигенсвязывающую способность, например, scFv, Fab и VHH/VH (обсуждаемые ниже). Наименьшим антигенсвязывающим фрагментом антитела, который сохраняет свой полный антигенсвязывающий участок, является Fv-фрагмент, который полностью состоит из вариабельных (V) областей. Растворимый гибкий аминокислотный пептидный линкер применяют для присоединения V-областей к scFv-фрагменту (одноцепочечный вариабельный фрагмент) для стабилизации молекулы, или константные (C) домены добавляют к V-областям с получением Fab-фрагмента [антигенсвязывающего фрагмента]. Как scFv-, так и Fab-фрагменты могут быть легко получены в клетках-хозяевах, например, прокариотических клетках-хозяевах. Другие белковые продукты на основе антитела включают scFv, стабилизированный дисульфидными связями (ds-scFv), одноцепочечный Fab (scFab), а также ди- и мультимерные форматы антител, такие как диа-, триа- и тетратела, или миниантитела (мини-Ab), которые включают различные форматы, состоящие из scFv, связанных с олигомеризующимися доменами. Наименьшие фрагменты представляют собой VHH/VH из тяжелой цепи Ab верблюдовых, а также однодоменные Ab (sdAb). Структурным элементом, который чаще всего используется для создания

новых форматов антитела, является фрагмент антитела, представляющий собой одноцепочечный вариабельный (V) домен (scFv), который содержит V-домены из тяжелой и легкой цепей (VH- и VL-домен), связанные с помощью пептидного линкера из ~ 15 аминокислотных остатков. Пептитело или продукт слияния пептида и Fc представляет собой еще один белковый продукт на основе антитела. Структура пептитела состоит из биологически активного пептида, привитого на Fc-домен. Пептитела хорошо описаны в уровне техники. См., например, Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012).

Другие белковые продукты на основе антител включают одноцепочечное антитело (SCA); диатело; триатело; тетратело; биспецифические или триспецифические антитела и т. п. Биспецифические антитела можно разделить на пять основных классов: BsIgG, дополненные IgG, фрагменты BsAb, биспецифические слитые белки и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., Molecular Immunology 67(2) Part A: 97-106 (2015).

Иллюстративные антиангиогенные средства включают ERBITUX™ (IMC-C225), средства, ингибирующие KDR (рецептор домена киназы) (например, антитела и антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с рецептором домена киназы), средства, представляющие собой антитела к VEGF (например, антитела и антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с VEGF, или растворимые рецепторы VEGF или их лигандсвязывающий участок), такие как AVASTIN™ или VEGF-TRAP™, и средства, представляющие собой антитела к рецептору VEGF (например, антитела или антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с ним), средства, ингибирующие EGFR (например, антитела или антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с ним), такие как Vectibix (панитумумаб), IRESSA™ (гефитиниб), TARCEVA™ (эрлотиниб), средства, представляющие собой антитела к Ang1 и Ang2 (например, антитела или антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с ним или с их рецепторами, например, Tie2/Tek), а также ингибирующие средства, представляющие собой антитела к Tie2-киназе (например, антитела или антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с ней). Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут содержать одно или несколько средств (например, антитела, антигенсвязывающие участки или растворимые рецепторы), которые специфически связываются и ингибируют активность факторов роста, таких как антагонисты фактора роста гепатоцитов (HGF, также известного как рассеивающий фактор) и антитела или антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с его рецептором "c-met".

Другие антиангиогенные средства включают кампат, IL-8, B-FGF, антагонисты Tek (Ceretti et al., публикация заявки на патент США № 2003/0162712, патент США № 6413932), средства, представляющие собой антитела к TWEAK (например, специфически связывающиеся антитела или антигенсвязывающие участки или антагонисты растворимого рецептора TWEAK, см. Wiley, патент США № 6727225), домен дизинтегрина ADAM в качестве антагониста связывания интегрина с его лигандами

(Fanslow et al., публикация заявки на патент США № 2002/0042368), специфически связывающиеся антитела к eph-рецептору и/или антитела к эфрину или антигенсвязывающие участки (патенты США №№ 5981245, 5728813, 5969110, 6596852, 6232447, 6057124 и члены их патентного семейства) и антагонисты, представляющие собой антитела к PDGF-BB (например, специфически связывающиеся антитела или антигенсвязывающие участки), а также антитела или антигенсвязывающие участки, специфически связывающиеся с PDGF-BB-лигандами, и средства, представляющие собой ингибиторы PDGFR-киназы (например, антитела или антигенсвязывающие участки, которые специфически связываются с ней).

Дополнительные антиангиогенные/противоопухолевые средства включают: SD-7784 (Pfizer, США); циленгитид (Merck KGaA, Германия, EPO 770622); пегаптаниб октанатрия (Gilead Sciences, США); альфастатин (BioActa, Великобритания); M-PGA (Celgene, США, US 5712291); иломастат (Arriva, США, US 5892112); эмаксаниб (Pfizer, США, US 5792783); ваталаниб (Novartis, Швейцария); 2-метоксиэстрадиол (EntreMed, США); TLC ELL-12, (Elan, Ирландия); анекортав ацетат (Alcon, США); моноклональное антитело альфа-D148 (Amgen, США); CEP-7055 (Cephalon, США); моноклональное антитело к Vn (Crucell, Нидерланды) DAC:антиангиоген (ConjuChem, Канада); ангиоцидин (InKine Pharmaceutical, США); KM-2550 (Kyowa Hakko, Япония); SU-0879 (Pfizer, США); CGP-79787 (Novartis, Швейцария, EP 970070); технология ARGENT (Ariad, США); YIGSR-Stealth, (Johnson & Johnson, США); фрагмент фибриногена-E (BioActa, Великобритания); ингибитор ангиогенеза (Trigen, Великобритания); TBC-1635 (Encysive Pharmaceuticals, США); SC-236 (Pfizer, США); ABT-567 (Abbott, США); метастатин (EntreMed, США); ингибитор ангиогенеза (Tripep, Швеция); маспин (Sosei, Япония); 2-метоксиэстрадиол (Oncology Sciences Corporation, США); ER-68203-00 (IVAX, США); бенефин (Lane Labs, США); Tz-93 (Tsumura, Япония); TAN-1120 (Takeda, Япония); FR-111142 (Fujisawa, Япония, JP 02233610); тромбоцитарный фактор 4 (RepliGen, США, EP 407122); антагонист фактора роста сосудистого эндотелия (Borean, Denmark); бевацизумаб (pINN), (Genentech, США); ингибиторы ангиогенеза (SUGEN, США); XL 784 (Exelixis, США); XL 647 (Exelixis, США); моноклональное антитело, альфа5бета3 интегрин второго поколения (Applied Molecular Evolution, США, и MedImmune, США); средство для генной терапии ретинопатии (Oxford BioMedica, Великобритания); энзастаурина гидрохлорид (USAN), (Lilly, США); CEP 7055, (Cephalon, США, и Sanofi-Synthelabo, Франция); BC 1 (Genoa Institute of Cancer Research, Италия); ингибитор ангиогенеза (Alchemia, Австралия); антагонист VEGF (Regeneron, США); антиангиогенные препараты на основе rBPI 21 и BPI (XOMA, США); PI 88 (Progen, Австралия); циленгитид (pINN), (Merck KGaA, Германия; Мюнхенский технический университет, Германия, Scripps Clinic and Research Foundation, США); цетуксимаб (INN), (Aventis, Франция); AVE 8062 (Ajinomoto, Япония); AS 1404 (Cancer Research Laboratory, Новая Зеландия); SG 292 (Telios, США); эндостатин (Бостонский детский госпиталь, США); ATN 161 (Attenuon, США); ангиостатин (Бостонский детский госпиталь, США); 2-метоксиэстрадиол (Бостонский детский

госпиталь, США); ZD 6474 (AstraZeneca, Великобритания); ZD 6126 (Angiogene Pharmaceuticals, Великобритания); PPI 2458 (Praecis, США); AZD 9935 (AstraZeneca, Великобритания); AZD 2171 (AstraZeneca, Великобритания); ваталаниб (pINN), (Novartis, Швейцария и Schering AG, Германия); ингибиторы пути тканевого фактора (EntreMed, США); пегаптаниб (Pinn), (Gilead Sciences, США); ксанторизол, (Yonsei University, Южная Корея); генноинженерная вакцина, VEGF-2, (Scripps Clinic and Research Foundation, США); SPV5.2 (Supratek, Канада); SDX 103 (Калифорнийский университет в Сан-Диего, США); PX 478 (ProlX, США); метастатин, (EntreMed, США); тропонин I, (Гарвардский университет, США); SU 6668 (SUGEN, США); OXI 4503 (OXiGENE, США); о-гуанидины (Dimensional Pharmaceuticals, США); мотупорамин С (Университет Британской Колумбии, Канада); CDP 791 (Celltech Group, Великобритания); атипримод (pINN), (GlaxoSmithKline, Великобритания); E 7820 (Eisai, Япония); CYC 381 (Гарвардский университет, США); AE 941 (Aeterna, Канада); вакцина от ангиогенеза (EntreMed, США); ингибитор активатора плазминогена урокиназы (Dendreon, США); оглуфанид (pINN), (Melmotte, США); ингибиторы HIF-1 альфа (Xenova, Великобритания); CEP 5214 (Cephalon, США); BAY RES 2622 (Bayer, Германия); ангиоцидин (InKine, США); A6 (Angstrom, США); KR 31372 (Корейский исследовательский институт химической технологии, Южная Корея); GW 2286 (GlaxoSmithKline, Великобритания); EHT 0101 (ExonHit, Франция); CP 868596 (Pfizer, США); CP 564959 (OSI, США); CP 547632 (Pfizer, США); 786034 (GlaxoSmithKline, Великобритания); KRN 633 (Kirin Brewery, Япония); система внутриглазной доставки лекарственных средств, 2-метоксиэстрадиол (EntreMed, США); ангинекс, (Маастрихтский университет, Нидерланды, и Миннесотский университет, США); ABT 510 (Abbott, США); AAL 993 (Novartis, Швейцария); VEGI (ProteomTech, США); ингибиторы фактора некроза опухоли альфа (Национальный институт старения, США); SU 11248 (Pfizer, США и SUGEN, США); ABT 518 (Abbott, США); YH16 (Yantai Rongchang, Китай); S-3APG (Бостонский детский госпиталь, США, и EntreMed, США); моноклональное антитело, KDR (ImClone Systems, США); моноклональное антитело, альфа5бета1 (Protein Design, США); ингибитор киназы KDR (Celltech Group, Великобритания, и Johnson & Johnson, США); GFB 116 (Южно-Флоридский университет, США, и Йельский университет, США); CS 706 (Sankyo, Япония); пролекарство комбретастатин A4 (Университет штата Аризона, США); хондроитиназа AC (IBEX, Канада); BAY RES 2690 (Bayer, Германия); AGM 1470 (Гарвардский университет, США; Takeda, Япония, и TAP, США); AG 13925 (Agouron, США); тетратиомолибдат (Мичиганский университет, США); GCS 100 (Университет Уэйна, США), CV 247 (Ivy Medical, Великобритания); CKD 732 (Chong Kun Dang, Южная Корея); моноклональное антитело, фактор роста сосудистого эндотелия (Xenova, Великобритания); ирсогладин (INN), (Nippon Shinyaku, Япония); RG 13577 (Aventis, Франция); WX 360 (Wilex, Германия); скваламин (pINN), (Genaera, США); RPI 4610 (Sirna, США); средство терапии рака (Marinova, Австралия); ингибиторы гепараназы (InSight, Израиль); KL 3106 (Kolon, Южная Корея); хонокиол (Университет Эмори, США); ZK CDK (Schering AG, Германия);

ZK Angio (Schering AG, Германия); ZK 229561 (Novartis, Швейцария, и Schering AG, Германия); XMP 300 (XOMA, США); VGA 1102 (Taisho, Япония); модуляторы рецепторов VEGF (Pharmacopeia, США); антагонисты VE-кадгерина-2 (ImClone Systems, США); вазостатин (Национальный институт здоровья, США); вакцина Flk-1 (ImClone Systems, США); TZ 93 (Tsumura, Япония); тумстатин (Beth Israel Hospital, США); укороченный растворимый FLT 1 (рецептор 1 фактора роста сосудистого эндотелия), (Merck & Co, США); лиганды Tie-2 (Regeneron, США) и ингибитор тромбоспондина 1 (Allegheny Health, Education and Research Foundation, США).

Ингибиторы аутофагии включают без ограничения хлорохин, 3-метиладенин, гидроксихлорохин (Plaquenil™), бафиломицин A1, 5-амино-4-имидазолкарбоксамидрибозид (AICAR), токсины водорослей, подавляющие аутофагию, которые ингибируют протеинфосфатазы типа 2A или типа 1, аналоги cAMP и лекарственные средства, которые повышают уровни cAMP, такие как аденозин, LY204002, N6-меркаптопуринрибозид и винбластин. Кроме того, также можно применять антисмысловую или siRNA, которая ингибирует экспрессию белков, в том числе без ограничения ATG5 (которые вовлечены в аутофагию).

Дополнительные фармацевтически активные соединения/средства, которые можно применять в лечении видов рака и которые можно применять в комбинации с одним или несколькими соединениями по настоящему изобретению включают эпоэтин альфа, дарбэпоэтин альфа, панитумумаб, пэгфилграстим, палифермин, филграстим, деносумаб, анцестим, AMG 102, AMG 176, AMG 386, AMG 479, AMG 655, AMG 745, AMG 951 и AMG 706 или их фармацевтически приемлемые соли.

В некоторых вариантах осуществления композицию, представленную в данном документе, вводят совместно с химиотерапевтическим средством. Подходящие химиотерапевтические средства могут включать природные продукты, такие как алкалоиды барвинка (например, винбластин, винкристин и винорелбин), паклитаксел, эпидиподофиллотоксины (например, этопозид и тенипозид), антибиотики (например, дактиномицин (актиномицин D), даунорубицин, доксорубицин и идарубицин), антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин), митомицин, ферменты (например, L-аспарагиназа, которая системно метаболизирует L-аспарагин и лишает его клетки, которые не обладают способностью синтезировать собственный аспарагин), антитромбоцитарные средства, антипролиферативные/антимитотические алкилирующие средства, такие как азотистые иприты (например, мехлорэтамин, циклофосфамид и аналоги, мелфалан и хлорамбуцил), этиленимины и метилмеламины (например, гексаметилмеламин и тиотепа), ингибиторы CDK (например, селициклиб, UCN-01, P1446A-05, PD-0332991, динациклиб, P27-00, AT-7519, RGB286638 и SCH727965), алкилсульфонаты (например, бусульфан), производные нитрозомочевины (например, кармустин (BCNU) и аналоги, а также стрептозоцин), тразенес-дакарбазинин (DTIC), антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (например, метотрексат), пиримидиновые аналоги (например,

фторурацил, флоксуридин и цитарабин), пуриновые аналоги и родственные ингибиторы (например, меркаптопурин, тиогуанин, пентостатин и 2-хлордезоксиаденозин), ингибиторы ароматазы (например, анастрозол, экземестан и летрозол) и координационные комплексы платины (например, цисплатин и карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан, аминоглутетимид, ингибиторы гистондезацетилазы (HDAC) (например, трихостатин, натрия бутират, апицидан, субероиланилидгидроаминовая кислота, вориностат, LBH 589, ромидепсин, ACY-1215 и панобиностат), ингибиторы mTor (например, темсиролимус, эверолимус, ридафоролимус и сиролимус), ингибиторы KSP(Eg5) (например, Array 520), связывающиеся с ДНК средства (например, Zalypsis), ингибитор PI3K дельта (например, GS-1101 и TGR-1202), ингибитор PI3K дельта и гамма (например, CAL-130), ингибитор мультикиназы (например, TG02 и сорафениб), гормоны (например, эстроген) и агонисты гормонов, такие как агонисты рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LHRH) (например, гозерелин, лейпролид и трипторелин), BAFF-нейтрализующее антитело (например, LY2127399), ингибиторы IKK, ингибиторы p38MAPK, антитела к IL-6 (например, CNTO328), ингибиторы теломеразы (например, GRN 163L), ингибиторы авроракиназы (например, MLN8237), моноклональные антитела поверхности клеток (например, антитела к CD38 (HUMAX-CD38), антитела к CS1 (например, элотузумаб), ингибиторы HSP90 (например, 17 AAG и KOS 953), ингибиторы P13K/Akt (например, перифозин), ингибитор Akt (например, GSK-2141795), ингибиторы PKC (например, энзастаурин), разновидности FTI (например, Zarnestra™), антитела к CD138 (например, BT062), ингибитор специфичной киназы Torc1/2 (например, INK128), ингибитор киназы (например, GS-1101), ER/UPR нацеливающее средство (например, MKC-3946), ингибитор cFMS (например, ARRY-382), ингибитор JAK1/2 (например, CYT387), ингибитор PARP (например, олапариб и велипариб (ABT-888)), антагонист BCL-2. Другие химиотерапевтические средства могут включать мехлорэтамин, камптотецин, ифосфамид, тамоксифен, ралоксифен, гемцитабин, навелбин, сорафениб или любой аналог или производный вариант вышеуказанных.

Соединения по настоящему изобретению также можно применять в комбинации с лучевой терапией, гормональной терапией, хирургией и иммунотерапией, при этом такие виды терапии широко известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, представленную в данном документе, вводят совместно со стероидом. Подходящие стероиды могут включать без ограничения 21-ацетоксипрегненолон, алклометазон, алгестон, амцинонид, беклометазон, бетаметазон, будесонид, хлорпреднизон, клобетазол, клокортолон, клопреднол, кортикостерон, кортизон, кортивазол, дефлазакорт, десонид, дезоксиметазон, дексаметазон, дифлоразон, дифлукортолон, дифупреднат, эноксолон, флуазакорт, флуклоронид, флуметазон, флунизолид, флуопинолон ацетонид, флуоцинонид, флуокортин бутил, флуокортолон, флуорометолон, флуперолона ацетат, флупреднидена ацетат, флупреднизолон, флурандренолид, флутиказона пропионат, формокортал, галцинонид, галобетазола пропионат, галометазон, гидрокортизон,

лотепреднол этабонат, мазипредон, медризон, мепреднизон, метилпреднизолон, мометазона фуроат, параметазон, предникарбат, преднизолон, преднизолон 25-диэтиламиноацетат, преднизолон натрия фосфат, преднизон, преднивал, преднилиден, римексолон, тиксокортол, триамцинолон, триамцинолон ацетонид, триамцинолон бенетонид, триамцинолон гексацетонид, а также их соли и/или производные. В конкретном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению также можно применять в комбинации с дополнительными фармацевтически активными средствами, которые лечат тошноту. Примеры средств, которые можно применять для лечения тошноты, включают дронабинол, гранисетрон, метоклопрамид, ондансетрон и прохлорпемазин или их фармацевтически приемлемые соли.

Ингибиторы $KRAS^{G12C}$ по настоящему изобретению могут быть использованы в комбинации с ингибиторами киназы Aurora, такими как обнаруженные в опубликованной PCT заявке WO2011/031842. Конкретным соединением является AMG 900 (пример 1 из WO2011/031842, включенной в данный документ посредством ссылки для всех целей).

Ингибиторы $KRAS^{G12C}$ по настоящему изобретению могут быть использованы в комбинации с ингибиторами пути MAP-киназы. Примерами белков в пути MAP-киназы, который может быть ингибирован, и ингибиторы таких белков, используемые в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$, являются ингибиторы BRAF, ингибиторы Pan-RAF и ингибиторы MEK. Существуют три основных изоформы RAF: ARAF, BRAF и CRAF. Ингибитор всех типов RAF демонстрирует ингибиторную активность в отношении более чем одной изоформы RAF. Напротив, ингибитор BRAF демонстрирует более высокую ингибиторную активность (или селективность) в отношении BRAF, чем других белков RAF.

Соединения по настоящему изобретению также можно применять в комбинации с дополнительным фармацевтически активным соединением, которое нарушает или ингибирует пути передачи сигнала RAS-RAF-ERK или PI3K-AKT-TOR. В других таких комбинациях дополнительным фармацевтически активным соединением является антагонист PD-1 и PD-L1. Соединения или фармацевтические композиции по настоящему изобретению также можно применять в комбинации с количеством одного или нескольких веществ, выбранных из ингибиторов EGFR, ингибиторов MEK, ингибиторов PI3K, ингибиторов AKT, ингибиторов TOR, ингибиторов Mcl-1, ингибиторов BCL-2, ингибиторов SHP2, ингибиторов протеасом и иммунных терапевтических средств, включая моноклональные антитела, иммуномодуляторные имиды (IMiD), средства, представляющие собой антитела к PD-1 (или в качестве альтернативы ингибитора PD-1), антитела к PDL-1, антитела к CTLA4, антитела к LAG1 и антитела к OX40, агонисты GITR, CAR-T-клеток и BiTE.

Ингибиторы EGFR включают без ограничения низкомолекулярные антагонисты, ингибиторы на основе антител или специфические антисмысловые нуклеотид или siRNA. Ингибиторы EGFR, которые могут быть использованы в комбинациях по настоящему изобретению, включают без ограничения афатиниб (торговая марка Gilotrif®, коммерчески

доступный от компании Boehringer Ingelheim), эрлотиниб (торговая марка Tarceva®, коммерчески доступный от компании Genetech/Astellas) и лапатиниб (торговая марка Tykerb®, коммерчески доступный от компании Novartis). Ингибиторы $KRAS^{G12C}$ также можно применять в комбинации с антителами к EGFR в настоящем изобретении. Антитела к EGFR, которые можно применять в комбинациях по настоящему изобретению, включают без ограничения цетуксимаб (торговая марка Erbitux® от компании Lilly). Применимые ингибиторы EGFR на основе антител включают панитумумаб (Vectibix), залутумумаб, нимотузумаб и матузумаб.

Неограничивающие примеры низкомолекулярных ингибиторов EGFR включают любой из ингибиторов EGFR, описанных в следующих патентных публикациях, и все фармацевтически приемлемые соли и сольваты указанных ингибиторов EGFR: заявка на европейский патент EP 520722, опубликованная 30 декабря 1992 г.; заявка на европейский патент EP 566226, опубликованная 20 октября 1993 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 96/33980, опубликованная 31 октября 1996 г.; патент США № 5747498, выданный 5 мая 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 96/30347, опубликованная 3 октября 1996 г.; заявка на европейский патент EP 787772, опубликованная 6 августа 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/30034, опубликованная 21 августа 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/30044, опубликованная 21 августа 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/38994, опубликованная 23 октября 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/49688, опубликованная 31 декабря 1997 г.; заявка на европейский патент EP 837063, опубликованная 22 апреля 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 98/02434, опубликованная 22 января 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/38983, опубликованная 23 октября 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 95/19774, опубликованная 27 июля 1995 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 95/19970, опубликованная 27 июля 1995 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/13771, опубликованная 17 апреля 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 98/02437, опубликованная 22 января 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 98/02438, опубликованная 22 января 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/32881, опубликованная 12 сентября 1997 г.; заявка на патент Германии DE 19629652, опубликованная 29 января 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 98/33798, опубликованная 6 августа 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/32880, опубликованная 12 сентября 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/32880, опубликованная 12 сентября 1997 г.; заявка на европейский патент EP 682027, опубликованная 15 ноября 1995 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/02266, опубликованная 23 января 197 г.; публикация

поданной согласно PCT международной заявки WO 97/27199, опубликованная 31 июля 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 98/07726, опубликованная 26 февраля 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/34895, опубликованная 25 сентября 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 96/31510′, опубликованная 10 октября 1996 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 98/14449, опубликованная 9 апреля 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 98/14450, опубликованная 9 апреля 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 98/14451, опубликованная 9 апреля 1998 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 95/09847, опубликованная 13 апреля 1995 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 97/19065, опубликованная 29 мая 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 98/17662, опубликованная 30 апреля, 1998 г.; патент США № 5789427, выданный 4 августа 1998 г.; патент США № 5650415, выданный 22 июля 1997 г.; патент США № 5656643, выданный 12 августа 1997 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 99/35146, опубликованная 15 июля 1999 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 99/35132, опубликованная 15 июля 1999 г.; публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 99/07701, опубликованная 18 февраля 1999 г.; и публикация поданной согласно PCT международной заявки WO 92/20642, опубликованная 26 ноября 1992 г. Дополнительные неограничивающие примеры низкомолекулярных ингибиторов EGFR включают любой из ингибиторов EGFR, описанный в Traxler, P., 1998, Exp. Opin. Ther. Patents 8(12):1599-1625.

Ингибиторы EGFR на основе антител включают любое антитело к EGFR или фрагмент антитела, которые могут частично или полностью блокировать активацию EGFR с помощью его природного лиганда. Неограничивающие примеры ингибиторов EGFR на основе антител включают таковые, описанные в Modjtahedi, H., et al., 1993, Br. J. Cancer 67:247-253; Teramoto, T., et al., 1996, Cancer 77:639-645; Goldstein et al., 1995, Clin. Cancer Res. 1:1311-1318; Huang, S. M., et al., 1999, Cancer Res. 15:59(8):1935-40 и Yang, X., et al., 1999, Cancer Res. 59:1236-1243. Таким образом, ингибитор EGFR может представлять собой моноклональное антитело Mab E7.6.3 (Yang, 1999 выше) или Mab C225 (№ доступа ATCC HB-8508) или антитело или фрагмент антитела, характеризующиеся специфичностью связывания с ним.

Ингибиторы $KRAS^{G12C}$ по настоящему изобретению могут быть использованы в комбинации с ингибиторами MEK, такими как обнаруженные в опубликованной PCT заявке WO2002/006213. Конкретным соединением является N-(((2R)-2,3-дигидроксипропил)окси)-3,4-дифтор-2-((2-фтор-4-йодфенил)амино)бензамид, также известный как AMG 1009089 или 1009089 (пример 39).

Ингибиторы $KRAS^{G12C}$ по настоящему изобретению можно применять в комбинации с ингибиторами BRAF, такими как обнаруженные в опубликованной PCT заявке WO2008/153947. Конкретным соединением является AMG 2112819 (также

известный как 2112819) (пример 56). Другим конкретным ингибитором BRAF, который можно применять в комбинациях по настоящему изобретению, является дабрафениб. Другим ингибитором BRAF, который можно применять в комбинациях по настоящему изобретению, является вемурафениб.

Ингибиторы всех типов RAF также можно применять вместе с ингибиторами $KRAS^{G12C}$ в комбинациях по настоящему изобретению. Конкретный ингибитор всех типов RAF включает RAF265 и MLN-2480.

Ингибиторы $KRAS^{G12C}$ по настоящему изобретению можно применять в комбинации с ингибиторами MEK. Конкретные ингибиторы MEK, которые можно применять в комбинациях по настоящему изобретению, включают PD-325901, траметиниб, пимасертиб, MEK162 [также известный как биниметиниб], TAK-733, GDC-0973 и AZD8330. Конкретный ингибитор MEK, который можно применять вместе с ингибитором $KRAS^{G12C}$ в комбинациях по настоящему изобретению, представляет собой траметиниб (торговая марка Mekinist®, коммерчески доступный от компании Novartis Pharmaceuticals Corp.). Другой конкретный ингибитор MEK представляет собой N-(((2R)-2,3-дигидроксипропил)окси)-3,4-дифтор-2-((2-фтор-4-йодфенил)амино)бензамид, также известный как AMG 1009089, 1009089 или PD-325901. Другой конкретный ингибитор MEK, который можно применять в комбинациях по настоящему изобретению, включает кобиметиниб.

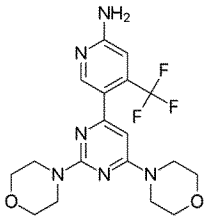
Ингибиторы MEK включают без ограничения CI-1040, AZD6244, PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119, ARRY-142886 и ARRY-438162.

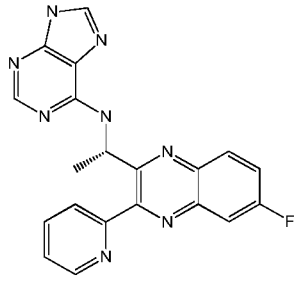
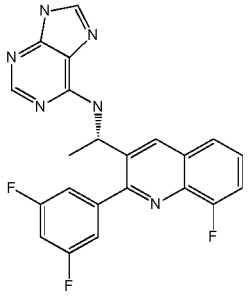
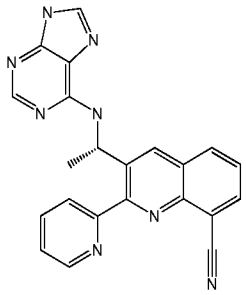
В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими фармацевтическими средствами, которые являются ингибитором белка в пути фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Примеры белков в пути PI3K включают PI3K, mTOR и PKB (также известный как Akt или AKT). Белок PI3K существует в нескольких изоформах, включая α, β, δ или γ. Предполагается, что ингибитор PI3K, который может быть использован в настоящем изобретении, может быть селективным в отношении одной или нескольких изоформ. Под «селективным» подразумевается, что соединения ингибируют одну или несколько изоформ в большей степени, чем другие изоформы. Селективность представляет собой концепцию, хорошо известную специалистам в данной области, и ее можно измерить с помощью хорошо известных *in vitro* или клеточных анализов активности. Предпочтительная селективность включает селективность, которая более чем в 2 раза, предпочтительно в 10 раз или более предпочтительно в 100 раз больше в отношении одной или нескольких изоформ, чем других изоформ. В одном аспекте ингибиторы PI3K, которые могут быть использованы в комбинации с соединениями по настоящему изобретению, являются селективными ингибиторами PI3K α. В другом аспекте соединение представляет собой селективный ингибитор PI3K δ. В еще одном аспекте соединение представляет собой селективный ингибитор PI3K β.

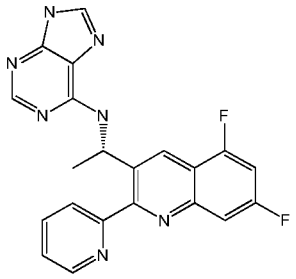
Примеры ингибиторов PI3K, которые можно применять в комбинации с одним или

несколькими соединениями по настоящему изобретению, включают раскрытые в следующих документах: опубликованная согласно PCT заявка № WO2010/151791; опубликованная согласно PCT заявка № WO2010/151737; опубликованная согласно PCT заявка №WO2010/151735; опубликованная согласно PCT заявка № WO2010151740; опубликованная согласно PCT заявка № WO2008/118455; опубликованная согласно PCT заявка № WO2008/118454; опубликованная согласно PCT заявка № WO2008/118468; опубликованная заявка на патент США № US20100331293; опубликованная заявка на патент США № US20100331306; опубликованная заявка на патент США № US20090023761; опубликованная заявка на патент США № US20090030002; опубликованная заявка на патент США № US20090137581; опубликованная заявка на патент США № US2009/0054405; опубликованная заявка на патент США № US2009/0163489; опубликованная заявка на патент США № US2010/0273764; опубликованная заявка на патент США № US2011/0092504 или опубликованная согласно PCT заявка № WO2010/108074. PI3K ингибиторы включают без ограничения вортманнин, 17-гидроксивортманниновые аналоги, описанные в WO 06/044453, 4-[2-(1H-индазол-4-ил)-6-[[4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил]метил]тиено[3,2-d]пиримидин-4-ил]морфолин (также известный как GDC 0941 и описанный в PCT-публикациях №№ WO 09/036082 и WO 09/055730), 2-метил-2-[4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидроимидазо[4,5-c]хинолин-1-ил]фенил]пропионитрил (также известный как BEZ 235 или NVP-BEZ 235 и описанный в PCT-публикации № WO 06/122806), (S)-1-(4-((2-(2-аминопиримидин-5-ил)-7-метил-4-морфолинотиено[3,2-d]пиримидин-6-ил)метил)пиперазин-1-ил)-2-гидроксипропан-1-он (описанный в PCT-публикации № WO 2008/070740), LY294002 (2-(4-морфолинил)-8-фенил-4H-1-бензопиран-4-он, доступный от Axon Medchem), PI 103 гидрохлорид (3-[4-(4-морфолинилпиридо-[3′,2′:4,5]фуро[3,2-d]пиримидин-2-ил]фенол гидрохлорид, доступный от Axon Medchem), PIK 75 (N′-[(1E)-(6-бромимидазо[1,2-a]пиридин-3-ил)метилен]-N,2-диметил-5-нитробензолсульфоно-гидразид гидрохлорид, доступный от Axon Medchem), PIK 90 (N-(7,8-диметокси-2,3-дигидро-имидазо[1,2-c]хиназолин-5-ил)-никотинамид, доступный от Axon Medchem), GDC-0941 бисмезилат (2-(1H-индазол-4-ил)-6-(4-метансульфонил-пиперазин-1-илметил)-4-морфолин-4-ил-тиено[3,2-d]пиримидинбисмезилат, доступный от Axon Medchem), AS-252424 (5-[1-[5-(4-фтор-2-гидроксифенил)-фуран-2-ил]-мет-(Z)-илиден]-тиазолидин-2,4-дион, доступный от Axon Medchem) и TGX-221 (7-метил-2-(4-морфолинил)-9-[1-(фениламино)этил]-4H-пиридо-[1,2-a]пиримидин-4-он, доступный от Axon Medchem), XL-765 и XL-147. Другие ингибиторы PI3K включают деметоксивиридин, перифосин, CAL101, PX-866, BEZ235, SF1126, INK1117, IPI-145, BKM120, XL147, XL765, паломид 529, GSK1059615, ZSTK474, PWT33597, IC87114, TG100-115, CAL263, PI-103, GNE-477, CUDC-907 и AEZS-136.

Предпочтительные ингибиторы PI3K для применения в комбинации с соединением

по настоящему изобретению включают  , также известный как бупарлисиб, исследуемую малую молекулу от компании Novartis Pharmaceuticals,

 ,  ,  или

 , или их фармацевтически приемлемую соль.

Также предпочтительным является соединение приведенной ниже формулы IIa или его фармацевтически приемлемая соль,



IIa

где X^1 представляет собой фтор или водород; Y^1 представляет собой водород или метил; и Z^1 представляет собой водород или метил. Конкретный ингибитор PI3K, который можно применять в комбинациях по настоящему изобретению, представляет собой AMG 511 (также известный как AMG 2539965 или 2539965), который представлен в примере 148 из опубликованной согласно PCT заявки WO2010/126895.

Другие ингибиторы PI3K, которые можно применять в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$ в комбинациях по настоящему изобретению, включая ингибиторы всех типов PI3K, такие как BKM120 и GDC-0941; селективные ингибиторы PI3Kα, такие как BYL719; и селективные ингибиторы PI3K β, такие как GSK-2636771.

Известны соединения, которые ингибируют как PI3K, так и mTOR (двойные ингибиторы). В еще одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено применение

двойных и ингибиторов PI3K и mTOR для применения в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$. Примером конкретного двойного ингибитора является GDC-0980.

Ингибиторы $KRAS^{G12C}$ также можно применять в комбинации с ингибиторами SHP2 в настоящем изобретении. Ингибиторы SHP2, которые можно применять в комбинациях по настоящему изобретению, включают без ограничения SHP099 и RMC-4550 или RMC-4630 от компании Revolutions Medicines в Редвуд-Сити, Калифорния.

mTOR является белком в пути PI3K. Другим аспектом настоящего изобретения является применение ингибитора mTOR в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$. Ингибиторы mTOR, которые можно применять в комбинации с соединением по настоящему изобретению, включают раскрытые в следующих документах: опубликованная согласно PCT заявка № WO2010/132598 и опубликованная согласно PCT заявка № WO2010/096314. Ингибиторы mTOR, которые можно применять в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$ в комбинациях по настоящему изобретению, включают AZD2014 и MLN0128.

Ингибиторы TOR включают без ограничения AP-23573, CCI-779, эверолимус, RAD-001, рапамицин, темсиролимус, ATP-конкурентные ингибиторы TORC1/TORC2, включая PI-103, PP242, PP30 и Torin 1. Другие ингибиторы TOR в энхансере FKBP12; рапамицины и их производные, включая: CCI-779 (темсиролимус), RAD001 (эверолимус; WO 9409010) и AP23573; рапалоги, например, как раскрыто в WO 98/02441 и WO 01/14387, например, AP23573, AP23464 или AP23841; 40-(2-гидроксиэтил)рапамицин, 40-[3-гидрокси(гидроксиметил)метилпропаноат]-рапамицин (также называемый CC1779), 40-эпи-(тетразолит)-рапамицин (также называемый ABT578), 32-деоксорапамицин, 16-пентинилокси-32(S)-дигидрорапамицин и другие производные, раскрытые в WO 05005434; производные, раскрытые в патенте США № 5258389, WO 94/090101, WO 92/05179, патенте США № 5118677, патенте США № 5118678, патенте США № 5100883, патенте США № 5151413, патенте США № 5120842, WO 93/111130, WO 94/02136, WO 94/02485, WO 95/14023, WO 94/02136, WO 95/16691, WO 96/41807, WO 96/41807 и патенте США № 5256790; фосфор-содержащие рапамициновые производные (например, WO 05016252); 4H-1-бензопиран-4-оновые производные (например, предварительная заявка на патент США № 60/528340).

PKB (AKT) также является белком в пути PI3K. Другим аспектом настоящего изобретения является применение ингибитора AKT в комбинации с ингибитором $KRAS^{G12C}$. Ингибиторы AKT, которые можно применять в комбинации с соединением по настоящему изобретению, включают раскрытые в следующих документах: патент США № 7354944. патент США № 7700636. патент США № 7919514. патент США № 7514566. публикация заявки на патент США № US 2009/0270445 A1. патент США № 7919504. патент США № 7897619 или опубликованная согласно PCT заявка № WO 2010/083246 A1. Конкретные ингибиторы AKT, которые можно применять в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$ в комбинациях по настоящему изобретению, включают MK-2206, GDC-0068 и AZD5363.

Ингибиторы AKT включают без ограничения Akt-1-1 (ингибирует Akt1) (Barnett et al. (2005) *Biochem. J.,* 385 (Pt. 2), 399-408); Akt-1-1,2 (ингибирует Ak1 и 2) (Barnett et al. (2005) *Biochem. J.* 385 (Pt. 2), 399-408); API-59CJ-Ome (например, Jin et al. (2004) *Br. J. Cancer* 91, 1808-12); 1-H-имидазо[4,5-c]пиридиниловые соединения (например, WO 05011700); индол-3-карбинол и его производные (например, патент США № 6656963; Sarkar and Li (2004) *J Nutr.* 134(12 Suppl), 3493S-3498S); перифосин (например, мешает мембранной локализации Akt; Dasmahapatra et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10(15), 5242-52, 2004); эфир фосфатидилинозитола, липидные аналоги (например, Gills and Dennis (2004) *Expert. Opin. Investig. Drugs* 13, 787-97); и трицирибин (TCN или API-2 или NCI идентификатор: NSC 154020; Yang et al. (2004) *Cancer Res.* 64, 4394-9).

Ингибиторы MCl-1 включают без ограничения AMG-176, MIK665 и S63845. Белок миелоидноклеточного лейкоза-1 (MCL-1) является одним из ключевых антиапоптотических представителей семейства белков B-клеточной лимфомы-2 (BCL-2). Сверхэкспрессия MCL-1 была тесно связана с прогрессированием опухоли, а также с устойчивостью не только к традиционным химиотерапевтическим средствам, но также и к нацеливаемым терапевтическим средствам, включая ингибиторы BCL-2, такие как ABT-263.

Ингибиторы протеасом включают без ограничения Kyprolis®(карфилзомиб), Velcade®(бортезомиб) и опрозомиб.

Иммунные терапевтические препараты включают без ограничения средства, представляющие собой антитела к PD-1, средства, представляющие собой антитела к PDL-1, средства, представляющие собой антитела к CTLA-4, средства, представляющие собой антитела к LAG1, и средства, представляющие собой антитела к OX40.

Моноклональные антитела включают без ограничения Darzalex® (даратумумаб), Herceptin® (трастузумаб), Avastin® (бевацизумаб), Rituxan® (ритуксимаб), Lucentis® (ранибизумаб) и Eylea® (афлиберцепт).

Иммуномодулирующие средства (IMiD) представляют собой класс иммуномодулирующих лекарственных средств (лекарственных средств, которые регулируют иммунные ответы), содержащих имидную группу. Класс IMiD включает талидомид и его аналоги (леналидомид, помалидомид и апремиласт).

Ингибиторы на основе антитела к PD-1, в том числе без ограничения антитела, включают без ограничения пембролизумаб (Keytruda®) и ниволумаб (Opdivo®). Иллюстративные антитела к PD-1 и способы их применения описаны Goldberg et al., *Blood* 110(1):186-192 (2007), Thompson et al., *Clin. Cancer Res.* 13(6):1757-1761 (2007) и Korman et al., международная заявка № PCT/JP2006/309606 (публикация № WO 2006/121168 A1), каждый из которых прямо включен посредством ссылки в данном документе. Включают: Yervoy™ (ипилимумаб) или тремелимумаб (к CTLA-4), галиксимаб (к B7.1), BMS-936558 (к PD-1), MK-3475 (к PD-1), AMP224 (к B7DC), BMS-936559 (к B7-H1), MPDL3280A (к B7-H1), MEDI-570 (к ICOS), AMG557 (к B7H2), MGA271 (к B7H3), IMP321 (к LAG-3), BMS-663513 (к CD137), PF-05082566 (к CD137), CDX-1127 (к CD27), антитела к OX40

(Providence Health Services), huMAbOX40L (к OX40L), атацицепт (к TACI), CP-870893 (к CD40), лукатумумаб (к CD40), дацетузумаб (к CD40), муромонаб-CD3 (к CD3), ипилумумаб (к CTLA-4). Иммунные терапевтические препараты также включают генетически сконструированные Т-клетки (например, клетки CAR-T) и биспецифические антитела (например, BiTE).

В конкретном варианте осуществления соединения по настоящему изобретению применяют в комбинации с антителом к PD-1, таким как AMG 404. В определенном варианте осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 аминокислотных последовательностей CDR под SEQ ID NO: 1-6 (представляющие HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3, в этом порядке). В определенных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит все 6 из аминокислотных последовательностей CDR под SEQ ID NO: 1-6. В других вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит (a) аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 7 или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности, или (b) аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 8 или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности. В иллюстративном варианте осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 7 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 8. В других вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит (a) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 9 или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (b) аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 10 или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности. В иллюстративном варианте осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 9 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 10.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающую часть). В иллюстративных аспектах антитело содержит 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR,

кодируемых нуклеиновой(нуклеиновыми) кислотой(кислотами) под SEQ ID NO: 11-16 (представляющие HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 и LC CDR3, в этом порядке). В другом иллюстративном аспекте антитело содержит все 6 CDR, кодируемых нуклеиновыми кислотами под SEQ ID NO: 11-16. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающая часть) содержит (a) вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую SEQ ID NO: 17, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеиновыми кислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70%, 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности, или (b) вариабельную область легкой цепи, кодируемую SEQ ID NO: 18, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеиновыми кислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70%, 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности. В иллюстративном варианте осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающая часть) содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, кодируемую SEQ ID NO: 18. В других вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающая часть) содержит (a) тяжелую цепь, кодируемую SEQ ID NO: 19, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеиновыми кислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70%, 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности, или (b) легкую цепь, кодируемую SEQ ID NO: 20, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеиновыми кислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70%, 85%, 90% или 95% идентичностью последовательности. В иллюстративном варианте осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающая часть) содержит тяжелую цепь, кодируемую SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, кодируемую SEQ ID NO: 20. Клетки CT-26 KRAS p.G12C получали из мышиной колоректальной линии T-26 (ATCC) с использованием технологии CRISPR для замещения обоих аллелей KRAS p.G12D с помощью p.G12C (ThermoFisher Scientific), что кодируется SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO.	**Тип последовательности**	**Последовательность**
1	БЕЛОК	Ser Tyr Asp Met Ser
2	БЕЛОК	Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys
3	БЕЛОК	Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val
4	БЕЛОК	Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala

5	БЕЛОК	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
6	БЕЛОК	Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr
7	БЕЛОК	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
8	БЕЛОК	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
9	БЕЛОК	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

		Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

10	БЕЛОК	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
11	ДНК	agctatgaca tgagc
12	ДНК	cttattagtg gtggtggtag tcaaacatac tacgcagaat ccgtgaaggg c
13	ДНК	cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtc
14	ДНК	cgggcgagtc agggtattag caactggtta gcc
15	ДНК	gctgcatcca gtttgcaaag t
16	ДНК	caacaggctg aaagtttccc tcacact
17	ДНК	gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc

		ctgggggtc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgaca tgagctgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggaatg ggtctcactt attagtggtg gtggtagtca aacatactac gcagaatccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gtcccccagt ggccactact tctacgctat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca
18	ДНК	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc aactggttag cctggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcagcag cctgcagcct gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctgaaagtt tccctcacac tttcggcgga gggaccaagg tggagatcaa a
19	ДНК	atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg cgctgtgagg tgcagctgtt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgacatgag ctgggtccgc caggctccag ggaaggggct ggaatgggtc tcacttatta gtggtggtgg tagtcaaaca tactacgcag aatccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatattt ctgtgcgtcc cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttcccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt

		gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgtg cgaggagcag tacggcagca cgtaccgttg cgtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgtccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
20	ДНК	atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg cgctgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcttccgtgt ctgcatctgt tggagacaga gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcaact ggttagcctg gtatcagcag aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc tttgctgcat ccagtttgca aagtggggtc ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ccctcaccat cagcagcctg cagcctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggctg aaagtttccc tcacactttc ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaacga acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc

		ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt
21	БЕЛОК	Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala

Агонисты GITR включают без ограничения слитые белки GITR и антитела к GITR (например, бивалентные антитела к GITR), такие как белок слияния GITR, описанный в патенте США № 6111090box.c, европейском патенте № 090505B1, патенте США № 8586023, PCT-публикациях №№ WO 2010/003118 и 2011/090754, или антитело к GITR, описанное, например, в патенте США № 7025962, европейском патенте № 1947183B1, патенте США № 7812135, патенте США № 8388967, патенте США № 8591886, европейском патенте № EP 1866339, PCT-публикации № WO 2011/028683, PCT-публикации № WO 2013/039954, PCT-публикации № WO 2005/007190, PCT-публикации № WO 2007/133822, PCT-публикации № WO 2005/055808, PCT-публикации № WO 99/40196, PCT-публикации № WO 2001/03720, PCT-публикации № WO 99/20758, PCT-публикации № WO 2006/083289, PCT-публикации № WO 2005/115451, патенте США № 7618632 и PCT-публикации № WO 2011/051726.

Ингибиторы $KRAS^{G12C}$ также можно применять в комбинации с ингибиторами CDK4 и/или 6 в настоящем изобретении. Ингибиторы CDK 4 и/или 6, которые могут быть использованы в комбинациях по настоящему изобретению, включают без ограничения раскрытые в следующих документах: опубликованная согласно PCT заявка № WO 2009/085185 или публикация заявки на патент США № US2011/0097305.

Другие соединения, которые можно применять в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$ в комбинациях по настоящему изобретению, включая соединения, которые ингибируют белки, являющиеся частью врожденного пути апоптоза. Примеры таких соединений включают без ограничения ингибиторы Bcl2/BclxL, такие как навитоклакс, и ингибиторы Bcl2, такие как ABT-199.

Другие соединения, которые можно применять в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$ в комбинациях по настоящему изобретению, включают ингибиторы BCR-ABL, такие как без ограничения дасатиниб, и ингибиторы HDAC, такие как панобиностат.

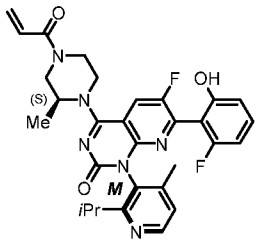
Другие соединения, которые могут быть использованы в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$ в комбинациях по настоящему изобретению, включают средства на основе платины, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин; ингибиторы топоизомеразы II, обычно из класса антрациклина, такие как доксорубицин, даунорубицин, идарубицин, эпирубицин, пэгилированный липосомный доксорубицин гидрохлорид, миоцет и этопозид; ингибиторы топоизомеразы I, такие как иринотекан (CPT-11); алкилирующие ДНК средства, такие как темозоломид; и нуклеозидные аналоги, такие как цитарабин и децитабин.

Другие соединения, которые могут быть использованы в комбинации с ингибиторами $KRAS^{G12C}$ в комбинациях по настоящему изобретению, включают ингибиторы рецепторной и нерецепторной киназы, включая ингибиторы тирозинкиназы. Пример таких соединений включает иматиниб, дасатиниб, понатиниб, босутиниб, нилотиниб, квизартиниб, мидостаурин, эрлотиниб и лапатиниб.

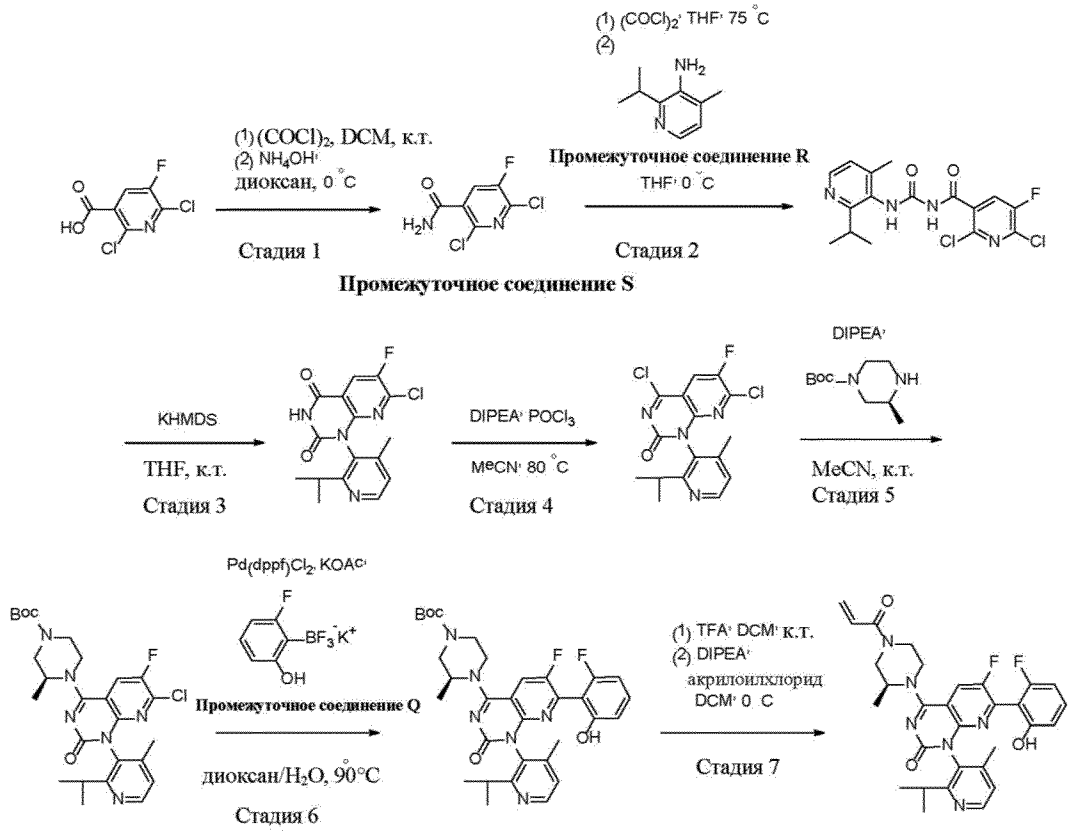
Соединения, описанные в данном документе, можно применять в комбинации со средствами, раскрытыми в данном документе, или другими подходящими средствами в зависимости от состояния, лечение которого осуществляют. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления одно или несколько соединений по настоящему изобретению будут вводить совместно с другими средствами, описанными выше. При применении в комбинированной терапии соединения, описанные в данном документе, вводят одновременно или раздельно со вторым средством. Данное введение в комбинации может включать одновременное введение двух средств в одной и той же лекарственной форме, одновременное введение в отдельных лекарственных формах и раздельное введение. То есть соединение, описанное в данном документе, и любое из средств, описанных выше, могут быть составлены вместе в одной и той же лекарственной форме и введены одновременно. Альтернативно соединение по настоящему изобретению и любое из средств, описанных выше, можно вводить одновременно, при этом оба средства присутствуют в отдельных составах. В другом альтернативном варианте за введением соединения по настоящему изобретению может сразу следовать введение любого из средств, описанных выше, или наоборот. В некоторых вариантах осуществления протокола раздельного введения соединение по настоящему изобретению и любое из средств, описанных выше, вводят с интервалом в несколько минут, или с интервалом в несколько часов, или с интервалом в несколько дней.

Поскольку в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено лечение заболевания/состояний с помощью комбинации фармацевтически активных соединений, которые можно вводить раздельно, настоящее изобретение дополнительно относится к объединению отдельных фармацевтических композиций в форме набора. Набор содержит две отдельные фармацевтические композиции: соединение по настоящему изобретению и второе фармацевтическое соединение. Набор содержит контейнер для содержания отдельных композиций, такой как разделенный на части флакон или пакет из фольги, разделенный на части. Дополнительные примеры контейнеров включают шприцы, коробки и мягкие резервуары. В некоторых вариантах осуществления набор содержит инструкции по применению отдельных компонентов. Форма набора особенно предпочтительна, когда отдельные компоненты предпочтительно вводят в разных лекарственных формах (например, перорально и парентерально), вводят с различными интервалами между введением лекарственного средства, или когда подбор дозы отдельных компонентов комбинации будет назначаться специалистом в области здравоохранения, который прописывает лечение.

СИНТЕЗ AMG 510

Ингибиторы $KRAS^{G12C}$ по настоящему изобретению включают раскрытые в опубликованной согласно PCT заявке WO 2018/119183. Синтез AMG 510, имеющего структуру , изложен в U.S.S.N. 15/984855, поданной 21 мая 2018 года, формула изобретения которой заявляет приоритет и преимущество предварительной заявки № 62/509629, поданной 22 мая 2017 года, как описано ниже.

6-Фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-1-(4-метил-2-(2-пропанил)-3-пиридинил)-4-((2*S*)-2-метил-4-(2-пропеноил)-1-пиперазинил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1H)-он получали с использованием следующего способа, в котором конечный продукт отделяли для выделения M-атропоизомера.



Стадия 1. 2,6-Дихлор-5-фторникотинамид (промежуточное соединение S). К смеси 2,6-дихлор-5-фтор-никотиновой кислоты (4,0 г, 19,1 ммоль, AstaTech Inc., Бристоль, Пенсильвания) в дихлорметане (48 мл) добавляли оксалилхлорид (2 М раствор в DCM, 11,9 мл, 23,8 ммоль) с последующим добавлением каталитического количества DMF (0,05 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, а затем концентрировали. Остаток растворяли в 1,4-диоксане (48 мл) и охлаждали до 0°C. Медленно добавляли раствор гидроксида аммония (основание 28,0-30% NH3, 3,6 мл, 28,6 ммоль) с помощью шприца. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин.,

а затем концентрировали. Остаток разбавляли с помощью смеси 1:1 EtOAc/гептан и встряхивали в течение 5 мин., затем фильтровали. Отфильтрованные твердые вещества удаляли и оставшийся исходный раствор частично концентрировали до половины объема и фильтровали. Отфильтрованные твердые вещества промывали с помощью гептана и высушивали в печи с пониженным давлением (45°C) в течение ночи с получением 2,6-дихлор-5-фторникотинамида. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 8,23 (d, J=7,9 Гц, 1 H) 8,09 (br s, 1 H) 7,93 (br s, 1 H). *масса/заряд* (ESI, +ve ион): 210,9 $(M+H)^+$.

Стадия 2. 2,6-Дихлор-5-фтор-*N*-((2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)карбамоил)никотинамид. К охлажденной льдом взвеси 2,6-дихлор-5-фторникотинамида (**промежуточное соединение S**, 5,0 г, 23,9 ммоль) в THF (20 мл) медленно добавляли оксалилхлорид (2 М раствор в DCM, 14,4 мл, 28,8 ммоль) с помощью шприца. Полученную смесь нагревали при 75°C в течение 1 ч., затем нагревание останавливали и реакционную смесь концентрировали до половины объема. После охлаждения до 0°C добавляли THF (20 мл) с последующим добавлением по каплям раствора 2-изопропил-4-метилпиридин-3-амина (**промежуточное соединение R**, 3,59 г, 23,92 ммоль) в THF (10 мл) с помощью канюли. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч., а затем гасили с помощью смеси 1:1 солевого раствора и насыщенного водного раствора хлорида аммония. Смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3x), и объединенные органические слои высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением 2,6-дихлор-5-фтор-*N*-((2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)карбамоил)никотинамида. Данный материал применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. *Масса/заряд* (ESI, +ve ион): 385,1 $(M+H)^+$.

Стадия 3. 7-Хлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2,4(1H,3H)-дион. К охлажденному льдом раствору 2,6-дихлор-5-фтор-*N*-((2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)карбамоил)никотинамида (9,2 г, 24,0 ммоль) в THF (40 мл) медленно добавляли KHMDS (1 М раствор в THF, 50,2 мл, 50,2 ммоль) с помощью шприца. Ледяную баню удаляли и полученную смесь перемешивали в течение 40 мин. при комнатной температуре. Реакционную смесь гасили с помощью насыщенного водного раствора хлорида аммония и экстрагировали с помощью EtOAc (3x). Объединенные органические слои высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле (элюент: 0-50% 3:1 EtOAc-EtOH/гептан) с получением 7-хлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2,4(1H,3H)-диона. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 12,27 (br s, 1H), 8,48-8,55 (m, 2 H), 7,29 (d, J=4,8 Гц, 1 H), 2,87 (quin, J=6,6 Гц, 1 H), 1,99-2,06 (m, 3 H), 1,09 (d, J=6,6 Гц, 3 H), 1,01 (d, J=6,6 Гц, 3 H). ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ: -126,90 (s, 1 F). *масса/заряд* (ESI, +ve ион): 349,1 $(M+H)^+$.

Стадия 4. 4,7-Дихлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1H)-он. К раствору 7-хлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2,4(1H,3H)-диона (4,7 г, 13,5 ммоль) и DIPEA (3,5 мл, 20,2 ммоль) в ацетонитриле (20 мл) по каплям добавляли оксихлорид фосфора (1,63 мл, 17,5

ммоль) с помощью шприца. Полученную смесь нагревали при 80°C в течение 1 ч., а затем охлаждали до комнатной температуры и концентрировали с получением 4,7-дихлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1H)-она. Данный материал применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. *Масса/заряд* (ESI, +ve ион): 367,1 $(M+H)^+$.

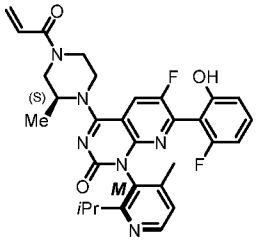
Стадия 5. (*S*)-*трет*-Бутил-4-(7-хлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)-3-метилпиперазин-1-карбоксилат. К охлажденному льдом раствору 4,7-дихлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1H)-она (13,5 ммоль) в ацетонитриле (20 мл) добавляли DIPEA (7,1 мл, 40,3 ммоль) с последующим добавлением (*S*)-4-*N*-Boc-2-метилпиперазина (3,23 г, 16,1 ммоль, Combi-Blocks, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Полученную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 ч., затем разбавляли с помощью холодного насыщенного водного раствора бикарбоната натрия (200 мл) и EtOAc (300 мл). Смесь перемешивали в течение дополнительных 5 мин., слои разделяли и водный слой экстрагировали с помощью дополнительного количества EtOAc (1x). Объединенные органические слои высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле (элюент: 0-50% EtOAc/гептан) с получением (*S*)-*трет*-бутил-4-(7-хлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)-3-метилпиперазин-1-карбоксилата. *Масса/заряд* (ESI, +ve ион): 531,2 $(M+H)^+$.

Стадия 6. (3*S*)-*трет*-Бутил-4-(6-фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)-3-метилпиперазин-1-карбоксилат. Смесь (*S*)-*трет*-бутил-4-(7-хлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)-3-метилпиперазин-1-карбоксилата (4,3 г, 8,1 ммоль), трифтор(2-фтор-6-гидроксифенил)бората калия (**промежуточное соединение Q**, 2,9 г, 10,5 ммоль), ацетата калия (3,2 г, 32,4 ммоль) и [1,1′-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия(II), комплекса с дихлорметаном (661 мг, 0,81 ммоль) в 1,4-диоксане (80 мл) дегазировали с помощью азота в течение 1 мин. Добавляли дезоксигенированную воду (14 мл) и полученную смесь нагревали при 90°C в течение 1 ч. Обеспечивали охлаждение реакционной смеси до комнатной температуры, гасили ее с помощью полунасыщенного водного раствора бикарбоната натрия и экстрагировали с помощью EtOAc (2x) и DCM (1x). Объединенные органические слои высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле (элюент: 0-60% 3:1 EtOAc-EtOH/гептан) с получением (3*S*)-*трет*-бутил-4-(6-фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)-3-метилпиперазин-1-карбоксилата. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 10,19 (br s, 1 H), 8,38 (d, *J*=5,0 Гц, 1 H), 8,26 (dd, *J*=12,5, 9,2 Гц, 1 H), 7,23-7,28 (m, 1 H), 7,18 (d, *J*=5,0 Гц, 1 H), 6,72 (d, *J*=8,0 Гц, 1 H), 6,68 (t, *J*=8,9 Гц, 1 H), 4,77-4,98 (m, 1 H), 4,24 (br t, *J*=14,2 Гц, 1 H), 3,93-4,08 (m, 1 H), 3,84 (br d, *J*=12,9 Гц, 1 H), 3,52-3,75 (m, 1 H),

3,07-3,28 (m, 1 H), 2,62-2,74 (m, 1 H), 1,86-1,93 (m, 3 H), 1,43-1,48 (m, 9 H), 1,35 (dd, *J*=10,8, 6,8 Гц, 3 H), 1,26-1,32 (m, 1 H), 1,07 (dd, *J*=6,6, 1,7 Гц, 3 H), 0,93 (dd, *J*=6,6, 2,1 Гц, 3 H). ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ: -115,65 (s, 1 F), -128,62 (s, 1 F). *масса/заряд* (ESI, +ve ион): 607,3 $(M+H)^+$.

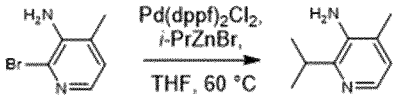
Стадия 7. 6-Фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-1-(4-метил-2-(2-пропанил)-3-пиридинил)-4-((2*S*)-2-метил-4-(2-пропеноил)-1-пиперазинил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1H)-он. Трифторуксусную кислоту (25 мл, 324 ммоль) добавляли к раствору (3*S*)-*трет*-бутил-4-(6-фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)-3-метилпиперазин-1-карбоксилата (6,3 г, 10,4 ммоль) в DCM (30 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч., а затем концентрировали. Остаток растворяли в DCM (30 мл), охлаждали до 0°C и последовательно обрабатывали с помощью DIPEA (7,3 мл, 41,7 ммоль) и раствора акрилоилхлорида (0,849 мл, 10,4 ммоль) в DCM (3 мл; добавляли по каплям с помощью шприца). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 мин., затем гасили с помощью полунасыщенного водного раствора бикарбоната натрия и экстрагировали с помощью DCM (2x). Объединенные органические слои высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Хроматографическая очистка остатка (силикагель; элюент: 0-100% EtOAc-EtOH (3:1)/гептан) с последующим хиральным разделением с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (Chiralpak IC, 30 × 250 мм, 5 мкм, 55% MeOH/CO_2, 120 мл/мин., 102 бар; собирали соединение первого элюируемого пика) обеспечивала AMG 510 (2,25 г, выход 43%). 6-Фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-1-(4-метил-2-(2-пропанил)-3-пиридинил)-4-((2*S*)-2-метил-4-(2-пропеноил)-1-пиперазинил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1H)-он. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 10,20 (s, 1 H), 8,39 (d, *J*=4,8 Гц, 1 H), 8,24-8,34 (m, 1 H), 7,23-7,32 (m, 1 H), 7,19 (d, *J*=5,0 Гц, 1 H), 6,87 (td, *J*=16,3, 11,0 Гц, 1 H), 6,74 (d, *J*=8,6 Гц, 1 H), 6,69 (t, *J*=8,6 Гц, 1 H), 6,21 (br d, *J*=16,2 Гц, 1 H), 5,74-5,80 (m, 1 H), 4,91 (br s, 1 H), 4,23-4,45 (m, 2 H), 3,97-4,21 (m, 1 H), 3,44-3,79 (m, 2 H), 3,11-3,31 (m, 1 H), 2,67-2,77 (m, 1 H), 1,91 (s, 3 H), 1,35 (d, *J*=6,8 Гц, 3 H), 1,08 (d, *J*=6,6 Гц, 3 H), 0,94 (d, *J*=6,8 Гц, 3 H). ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ ppm -115,64 (s, 1 F), -128,63 (s, 1 F). *масса/заряд* (ESI, +ve ион): 561,2 $(M+H)^+$.

AMG 510, как указано в данном документе, представляет собой M-атропоизомер 6-фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-1-(4-метил-2-(2-пропанил)-3-пиридинил)-4-((2*S*)-2-метил-4-(2-пропеноил)-1-пиперазинил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1H)-она,



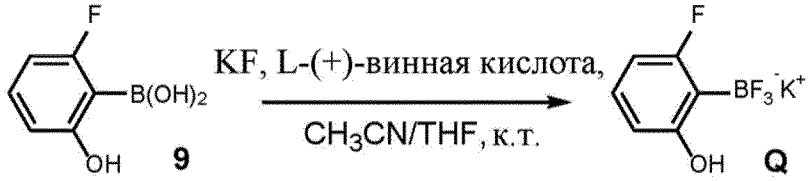
характеризующегося формулой , или его фармацевтически приемлемую соль.

Синтез промежуточных соединений



3 R

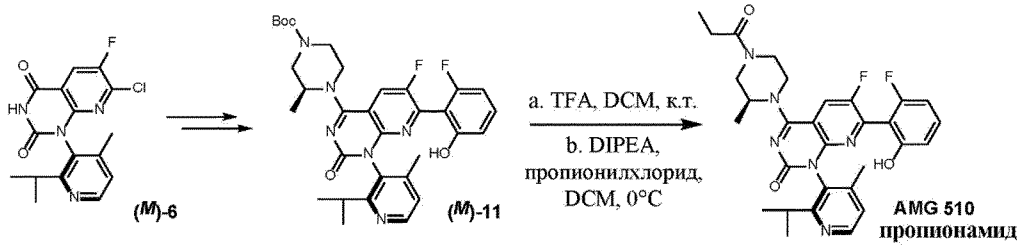
2-Изопропил-4-метилпиридин-3-амин (R). Добавляли комплекс **[1,1′-**бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия(II) с дихлорметаном (79 мг, 0,10 ммоль) во взвесь 3-амино-2-бром-4-пиколина (**3**; 360 мг, 1,9 ммоль, Combi-Blocks, San Diego, CA) в THF (4 мл) и полученную смесь продували аргоном в течение 2 мин. Добавляли 2-пропилцинк бромида (0,5 М раствор в THF, 5,40 мл, 2,7 ммоль) и полученный раствор нагревали при 60°C в течение 17 ч., затем обеспечивали охлаждение до комнатной температуры. Добавляли воду (10 мл) и 1 н. водный NaOH (20 мл) и полученную смесь экстрагировали с помощью EtOAc (2x). Объединенные органические слои высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали in vacuo. Хроматографическая очистка остатка (силикагель; элюент: 0-15% MeOH/DCM) давала **R** (284 мг, выход 98%). ^{1}H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 7,66 p.p.m. (d, J=4,6 Гц, 1H), 6,78 (d, J=4,8 Гц, 1H), 4,72 (br s, 2H), 3,14-3,25 (m, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,14 (d, J=6,8 Гц, 6H); *масса/заряд* (ESI, +ve ион): 151,1 $(M+H)^+$.



9 Q

(2-Фтор-6-гидроксифенил)калия трифторборат (Q). Раствор фторида калия (44,7 г, 770 ммоль) в воде (75 мл) добавляли к суспензии (2-фтор-6-гидроксифенил)бороновой кислоты (**9**; 30 г, 192 ммоль, Combi-Blocks, Сан-Диего, Калифорния) в ацетонитриле (750 мл). Через 2 мин. перемешивания раствор L-(+)-винной кислоты (72,2 г, 481 ммоль) в THF (375 мл) добавляли в течение 10 мин. Полученную смесь механически перемешивали в течение 1 ч. Суспендированные твердые вещества удаляли фильтрацией и промывали небольшим количеством THF. Затем объединенный фильтрат частично концентрировали in vacuo до начала осаждения твердых веществ. Фильтрат охлаждали до -20°C и перемешивали в течение 16 ч., затем медленно нагревали до температуры окружающей среды. Добавляли 2-пропанол (20 мл) и осажденные твердые вещества собирали путем фильтрации и промывали 2-пропанолом с получением 27,5 г твердого вещества. Фильтрат снова частично концентрировали (до наблюдения осаждения), охлаждали до -20°C и перемешивали в течение 20 мин. Добавляли дополнительный 2-пропанол и осажденное твердое вещество собирали путем фильтрации и промывали 2-пропанолом. Две партии твердого вещества объединяли с получением **Q** (34,6 г, выход 82%). ^{1}H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 8,07 p.p.m. (q, J=14,7 Гц, 1H), 6,93 (q, J=7,5 Гц, 1H), 6,30-6,38 (m, 2H).

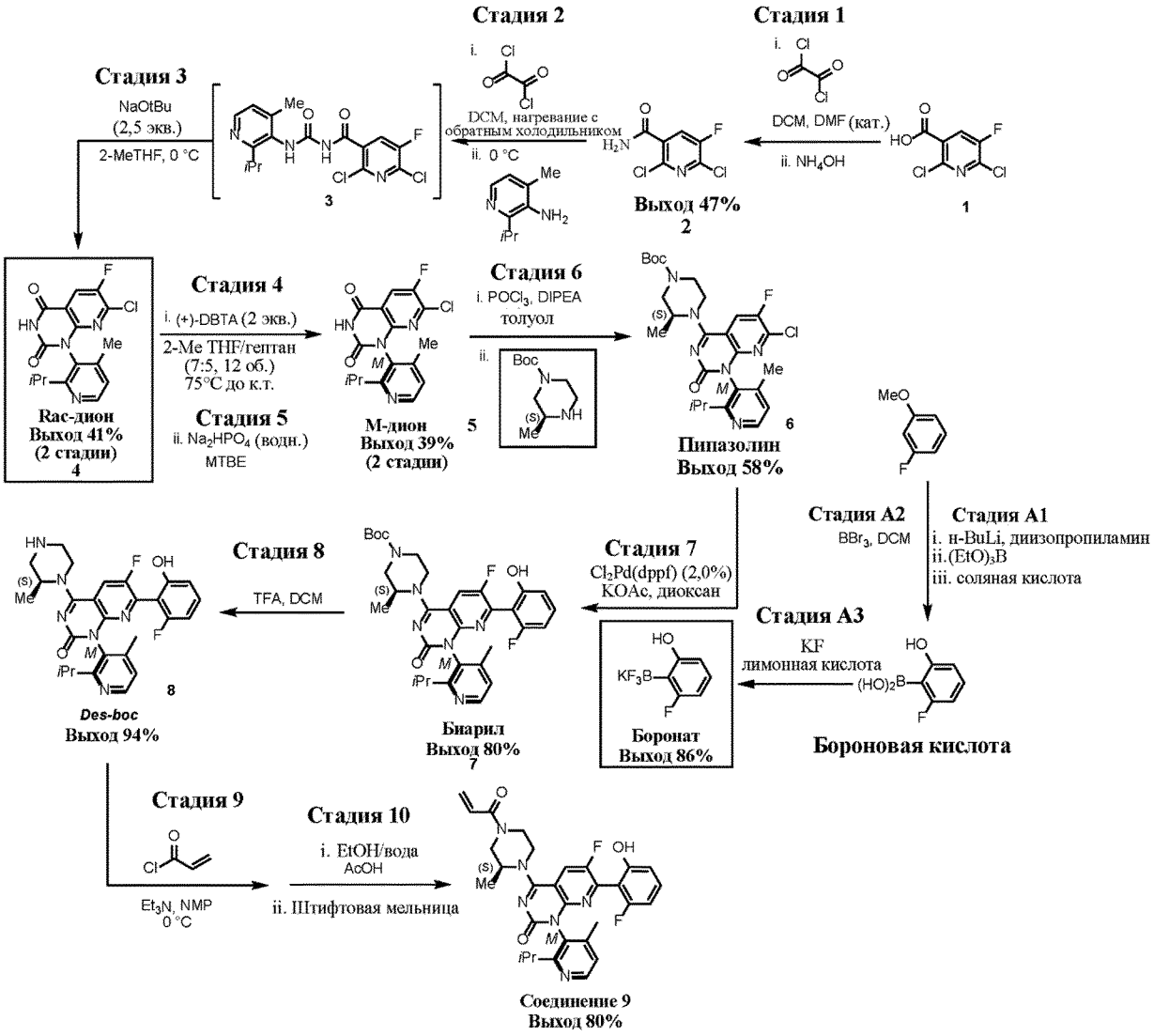
Синтез пропионамида AMG 510



(*M*)-6 и **(*M*)-11.** Рацемическое соединение **6** разделяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (Chiralpak AD, 21 × 250 мм, 5 мкм, 40% MeOH/CO_2, 80 мл/мин., 110 бар; собирали соединение второго элюируемого пика) с получением **(*M*)-6**, которое превращали в **(*M*)-11** с использованием процедур, представленных для рацемических субстратов.

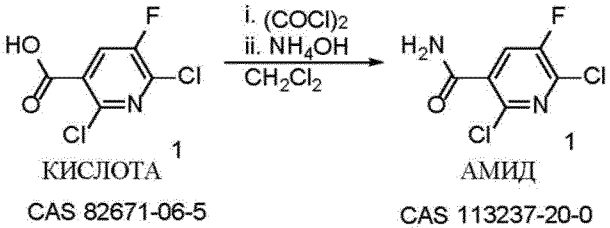
(*M*)-6-Фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-1-(4-метил-2-(2-пропанил)-3-пиридинил)-4-((2*S*)-2-метил-4-пропаноил-1-пиперазинил)пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1H)-он (пропионамид AMG 510). Трифторуксусную кислоту (4,0 мл, 51,9 ммоль) добавляли в раствор **(*M*)-11** (0,196 г, 0,323 ммоль) в DCM (5 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем смесь концентрировали in vacuo и обеспечивали поглощение остатка в DCM (10 мл), охлаждали до 0°C и последовательно обрабатывали с помощью DIPEA (0,169 мл, 0,969 ммоль) и пропионилхлорида (0,016 мл, 0,194 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 мин., затем разбавляли насыщенным водным бикарбонатом натрия и экстрагировали с помощью DCM (2x). Объединенные экстракты высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали in vacuo. Хроматографическая очистка остатка (силикагель; элюент: 0-70% EtOAc-EtOH (3:1)/гептан) обеспечивали AMG 510 пропионамид (0,180 г, выход 99%). ^{1}H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 10,20 p.p.m (s, 1H), 8,40 (d, J=5,0 Гц, 1H), 8,27 (br dd, J=15,1, 9,3 Гц, 1H), 7,27 (m, 1H), 7,21 (br d, J=4,8 Гц, 1H), 6,73 (d, J=8,3 Гц, 1H), 6,69 (t, J=8,9 Гц, 1H), 4,87 (br s, 1H), 4,31 (m, 1,5H), 4,21 (br d, J=13,5 Гц, 0,5H), 3,94 (br d, J=12,2 Гц, 0,5H), 3,82 (br d, J=13,3 Гц, 0,5H), 3,62-3,76 (m, 1H), 3,52-3,62 (m, 0,5H), 3,43-3,51 (m, 0,5H), 3,18 (br dd, J=13,3, 3,3 Гц, 0,5H), 3,06 (br t, J=10,7 Гц, 0,5H), 2,73 (br dd, J=10,5, 6,1 Гц, 1H), 2,33-2,48 (m, 2H), 1,91 (s, 3H), 1,29-1,42 (m, 3H), 0,98-1,12 (m, 6H), 0,94 (d, J=6,6 Гц, 3H); *масса/заряд* (ESI, +ve ион): 563,2 $(M+H)^+$.

В альтернативном способе синтезировали AMG 510 и соответствующие промежуточные соединения описаны в предварительной заявке на патент США № 62/768802, поданной 16 ноября 2018 года. Альтернативный способ предусматривает следующие стадии, где разделение rac-диона на стадиях 4 и 5 обеспечивает успешное разделение атропоизомеров.



Описание способа

Стадия 1

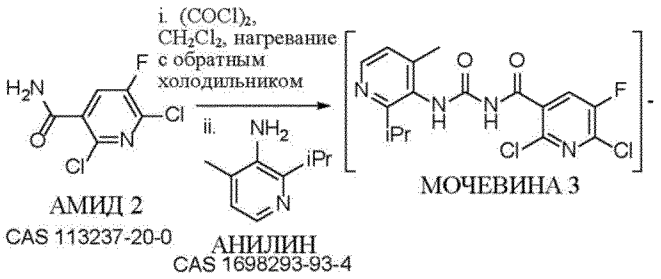


Материал	№ CAS	MW (г/моль)	Эквиваленты/объемы	Моли	Теоретическое количество
2,6-Дихлор-5-фтор-3-пиридинкарбоновая кислота	82671-06-5	209,99	1,0 экв.	119,1	25 кг
DCM	74-09-2	84,93	16,51 экв.	2354,9	200 кг

DMF	68-12-2	73,09	0,068 экв.	8,1	592 г (627 мл)
Оксалилхлорид	79-37-8	126,93	1,25 экв.	148,9	18,9 кг
Гидроксид аммония	1336-21-6	35,05	5 экв.	595,5	40,2 л
Вода	7732-18-5	18,02	н. д.	н. д.	261 л

В раствор 2,6-дихлор-5-фтор-3-пиридинкарбоновой кислоты (соединения 1) (25 кг; 119,1 моль) в дихлорметане (167 кг) и DMF (592 г) добавляли оксалилхлорид (18,9 кг; 148,9 моль) при поддержании внутренней температуры на уровне от 15 до 20°C. Добавляли дополнительное количество дихлорметана (33 кг) в качестве промывки и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали, затем гасили гидроксидом аммония (40,2 л; 595,5 моль) при поддержании внутренней температуры на уровне 0 ± 10°C. Полученную взвесь перемешивали в течение 90 мин., затем продукт собирали посредством фильтрации. Отфильтрованные твердые вещества промывали деионизированной водой (3 X 87 л) и высушивали с получением 2,6-дихлор-5-фторникотинамида (соединения 2).

Стадия 2.

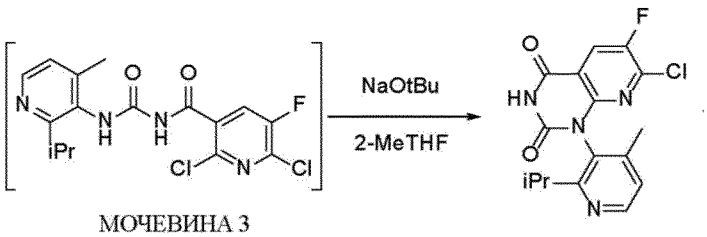


Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/объемы**	**Моли**	**Теоретическое количество**
Амид (2,6-дихлор-5-фторникотинамид)	113237-20-0	209,99	1,0 экв.	77,8	16,27 кг
Оксалилхлорид	79-37-8	126,93	1,2 экв.	93,8	11,9 кг (7,9 л)
Дихлорметан	75-09-2	84,93	н. д.	н. д.	730,7 кг (551,5 л)
DCM раствор анилина 2-изопропил-4-	1698293-93-4	150,22	1,1 экв.	85,9	12,9 кг (вес содержащегося

метилпиридин-3-амин					анилина)

В реактор A в раствор 2,6-дихлор-5-фторникотинамида (соединения 2) (16,27 кг; 77,8 моль) в дихлорметане (359,5 кг) добавляли оксалилхлорид (11,9 кг; 93,8 моль) при поддержании температуры на уровне ≤ 25°C в течение 75 мин. Затем полученный раствор нагревали до 40°C ± 3°C и выдерживали в течение 3 ч. Раствор дистиллировали с использованием вакуума с удалением дихлорметана до тех пор, пока раствор не оказывался ниже мешалки. Затем добавляли дихлорметан (300 кг) и смесь охлаждали до 0 ± 5°C. В чистый сухой реактор (реактор B) добавляли 2-изопропил-4-метилпиридин-3-амин (ANILINE) (12,9 кг; 85,9 моль), а затем дихлорметан (102,6 кг). Раствор анилина азеотропно высушивали посредством вакуумной дистилляции при поддержании внутренней температуры на уровне от 20 до 25°) с замещением дополнительным количеством дихлорметана до достижения высушивания раствора согласно анализу KF (предел ≤ 0,05%). Объем раствора доводили до объема приблизительно 23 л дихлорметаном. Затем в реактор A добавляли высушенный раствор анилина при поддержании внутренней температуры на уровне 0 ± 5°C в течение всей процедуры добавления. Затем смесь нагревали до 23°C и выдерживали в течение 1 ч., раствор окончательно фильтровали в чистый реактор с получением 2,6-дихлор-5-фтор-N-((2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)карбамоил)никотинамида (соединения 3) в виде раствора в DCM и использовали непосредственно на следующей стадии.

Стадия 3.



МОЧЕВИНА 3 rac-ДИОН 4

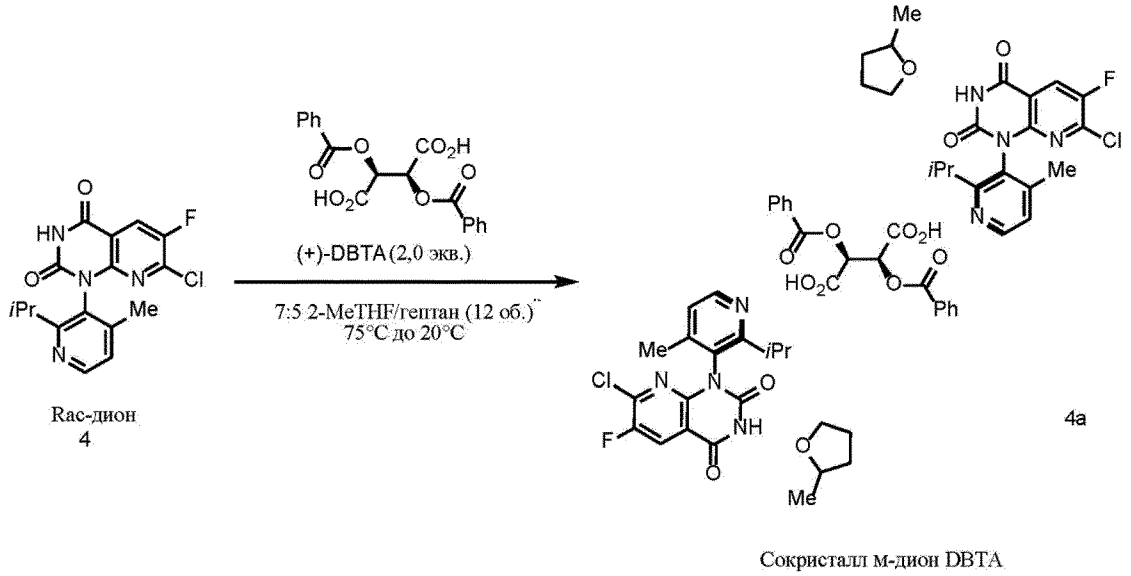
Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/объемы**	**Моли**	**Теоретическое количество**
Мочевина, раствор в DCM 2,6-дихлор-5-фтор-*N*-{[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]карбамоил}пиридин-3-карбоксамид	н. д.	385,22	1,0 экв.	38,9	208,3 кг (15 кг содержащегося веса)

2-Метилтетрагидрофуран	96-47-9	86,13	н. д.	н. д.	308 кг (358 л)
Трет-бутоксид натрия	865-48-5	96,11	2,0 экв.	97,8	9,4 кг
Хлорид аммония	12125-02-9	53,49	н. д.	430	23,0 кг
Хлористоводородная кислота	7467-01-0	36,46	н. д.	41	1,6 кг
Сульфат магния	7487-88-9	120,37	н. д.	195	23,5 кг
Хлорид натрия	7647-14-5	58,44	н. д.	282	16,5 кг
Гептан	142-82-5	100,21	н. д.	н. д.	94 л
10% лимонная кислота					75 кг

В растворе 2,6-дихлор-5-фтор-*N*-{[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]карбамоил}пиридин-3-карбоксамида в дихлорметане (UREA (соединение 3)) (15 кг содержащегося веса; 38,9 моль) растворитель заменяли на 2-MeTHF с использованием вакуумной дистилляции при поддержании внутренней температуры на уровне 20-25°C. Объем в реакторе доводили до 40 л, а затем загружали дополнительное количество 2-MeTHF (105,4 кг). Добавляли трет-бутоксид натрия (9,4 кг; 97,8 моль) при поддержании 5-10°C. Содержимое нагревали до 23°C и перемешивали в течение 3 ч. Затем содержимое охлаждали до 0-5°C и добавляли хлорид аммония (23,0 кг; 430 моль) в виде раствора в 60 л деионизированной воды. Смесь нагревали до 20°C и добавляли деионизированную воду (15 л), и дополнительно выдерживали в течение 30 мин. Перемешивание останавливали и слои разделяли. Водный слой удаляли и в органический слой добавляли деионизированную воду (81,7 л). Получали смесь конц. HCl (1,5 кг) и воды (9 л), затем медленно добавляли ее в реактор до тех пор, пока измеренное значение pH не достигало 4-5. Слои разделяли и водный слой обратно экстрагировали с использованием 2-MeTHF (42,2 кг). Два органических слоя объединяли и промывали 10% раствором лимонной кислоты (75 кг), а затем смесью воды (81,7 л) и насыщенного NaCl (19,8 кг). Затем органический слой промывали насыщенным бикарбонатом натрия (75 кг), повторяя при необходимости до достижения целевого уровня pH водного раствора, составляющего ≥ 7,0. Органический слой снова промывали солевым раствором (54,7 кг), а затем высушивали над сульфатом магния (5 кг). Смесь фильтровали для удаления сульфата магния, промывая фильтрованный слой с помощью 2-MeTHF (49,2 кг). Объединенный

фильтрат и смывы дистиллировали с использованием вакуума до объема 40 л. Концентрированный раствор нагревали до 55°C и медленно добавляли гептан (10-12 кг) до достижения точки помутнения. Раствор охлаждали до 23°C в течение 2 ч., затем добавляли гептан (27,3 кг) в течение 2 ч. Взвесь продукта выдерживали в течение 3 ч. при 20-25°C, затем фильтровали и промывали смесью 2-MeTHF (2,8 кг) и гептана (9 кг). Продукт высушивали с использованием азота и вакуума с получением твердого 7-хлор-6-фтор-1-(2-изопропил-4-метилпиридин-3-ил)пиридо[2,3-d]пиримидин-2,4(1H,3H)-диона (rac-диона (соединения 4)).

Стадия 4.

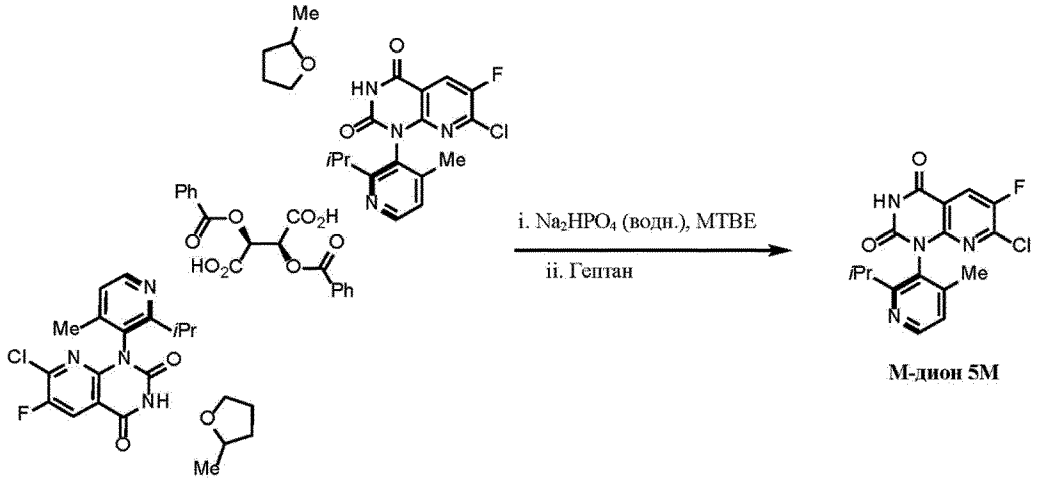


Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/объемы**	**Моли**	**Теоретическое количество**
Rac-дион	н. д.	348,76	1,0	-	-
(+)-2,3-Дибензоил-D-винная кислота	17026-42-5	358,30	2,0	-	-
2-Метилтетрагидрофуран	96-47-9	86,13	7,0	-	-
Гептан	142-82-5	100,21	2,0	-	-
Гептан	142-82-5	100,21	3,0	-	-
2-Метилтетрагидрофуран	96-47-9	86,13	4,0	-	-
Гептан	142-82-5	100,21	2,0	-	-

В сосуд с перемешиваемой суспензией соединения 4 (1,0 экв.) в 2-метилтетрагидрофуране (7,0 л/кг) добавляли (+)-2,3-дибензоил-D-винную кислоту (2,0 экв.) в атмосфере азота. 2-MeTHF является хиральным, но его применяют в качестве рацемической смеси. Различные энантиомеры 2-MeTHF случайным образом включены в сокристал. Полученную суспензию нагревали до 75°C и выдерживали при 75°C до тех

пор, пока не наблюдали полное растворение (≤ 30 мин.). Полученный раствор окончательно фильтровали при 75°C во второй сосуд. В окончательно отфильтрованный раствор загружали н-гептан (2,0 л/кг) при скорости, которая обеспечивала поддержание внутренней температуры выше 65°C. Затем раствор охлаждали до 60°C, вводили затравку из кристаллов (0,01 кг/кг) и оставляли для отстаивания в течение 30 минут. Полученную суспензию охлаждали до 20°C в течение 4 часов, а затем отбирали образцы для анализа хиральной чистоты посредством HPLC. В суспензию загружали н-гептан (3,0 л/кг), а затем выдерживали в течение 4 часов при 20°C в атмосфере азота. Суспензию фильтровали и выделенные твердые вещества промывали два раза с помощью (2:1) н-гептана:2-метилтетрагидрофурана (3,0 л/кг). Материал высушивали с помощью азота и вакуума с получением комплекса М-дион:DBTA: Me-THF (соединения 4а).

Стадия 5



М-дион 5М

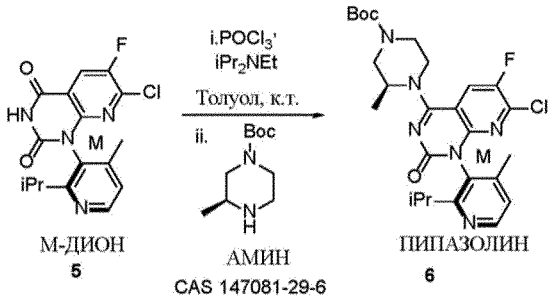
Сокристалл м-дион/DBTA/2-MeTHF 4а

Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/объемы**	**Моли**	**Теоретическое количество**
Сокриталл М-дион/DBTA/Me-THF	н. д.	1228,08	1,0	74,2	46,9 кг (25,9 кг, с учетом поправки на М-дион)
Метил-*трет*-бутиловый эфир	1634-04-4	88,15	45,0	17593	2100 л
Гидрофосфат динатрия	7558-79-4	141,96	2,0	148,4	21,1 кг
Вода, очищенная по USP					В необходимом количестве
Сульфат магния	7487-88-9	120,37	н. д.	н. д.	25 кг
Гептан	142-82-5	100,20	60,0	19322	2835 л

В сосуде A суспензию гидрофосфата динатрия (21,1 кг, 2,0 экв.) в деионизированной воде (296,8 л, 6,3 л/кг) перемешивали до тех пор, пока не наблюдали растворение (≥ 30 мин.). В сосуде B суспензию комплекса M-дион:DBTA: Me-THF (композиция 4a) [46,9 кг (25,9 кг, с учетом поправки на M-дион, 1,0 экв.)] в метил-трет-бутиловом эфире (517,8 L, 11,0 л/кг) перемешивали в течение 15-30 минут. Полученный раствор из сосуда A добавляли в сосуд B, а затем смесь перемешивали в течение более 3 часов. Перемешивание останавливали и двухфазную смесь для разделения в течение более 30 минут. Нижнюю водную фазу удаляли, а затем осуществляли обратное экстрагирование метил-трет-бутиловым эфиром (77,7 л, 1,7 л/кг). Органические фазы объединяли в сосуде B и высушивали с помощью сульфата магния (24,8 кг, 0,529 кг/кг). Полученную суспензию из сосуда B перемешивали в течение более трех часов, а затем фильтровали в сосуд C. В сосуд B загружали промывку в виде метил-трет-бутилового эфира (46,9 л, 1,0 л/кг), а затем фильтровали в сосуд C. Содержимое сосуда C охлаждали до 10°C, а затем дистиллировали под вакуумом при медленном нагревании до 35°C. Дистилляцию продолжали до сбора 320-350 кг (6,8-7,5 кг/кг) метил-трет-бутилового эфира. После охлаждения содержимого сосуда C до 20°C загружали н-гептан (278,7 л, 5,9 л/кг) в течение одного часа, а затем дистиллировали под вакуумом при медленном нагревании до 35°C. Дистилляцию продолжали до сбора 190-200 кг (4,1-4,3 кг/кг) смеси метил-трет-бутилового эфира и н-гептана. После охлаждения содержимого сосуда C до 20°C загружали н-гептан (278,7 л, 5,9 л/кг) второй раз в течение одного часа, а затем дистиллировали под вакуумом при медленном нагревании до 35°C. Дистилляцию продолжали до сбора 190-200 кг (4,1-4,3 кг/кг) смеси метил-трет-бутилового эфира и н-гептана. После охлаждения содержимого сосуда C до 20°C загружали н-гептан (195,9 л, 4,2 л/кг) загружали третий раз в течение одного часа, а затем отбирали образец для анализа состава растворителя с помощью GC анализа. Суспензию в сосуде C продолжали перемешивать в течение более одного часа. Суспензию фильтровали, а затем промывали промывкой в виде н-гептана (68,6 л, 1,5 л/кг) из сосуда C. Выделенные твердые вещества высушивали при 50°C и образец рассматривали в отношении соответствия исходного материала. Получали 7-хлор-6-фтор-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (M-дион), соединение 5M.

Вышеупомянутый способ первого поколения успешно масштабировали на 200+ кг исходного материала rac-диона (соединения 5). В этом способе затравка кристаллизации термодинамически стабильной кристаллической формой rac-диона (которая проявляет низкую растворимость) может вызывать негодность партии. На основе последующих исследований авторы настоящего изобретения обнаружили, что увеличение эквивалентов DBTA и снижение температуры затравки путем регулирования графика загрузки гептана повышает надежность способа. Улучшенный способ устойчив в отношении присутствия термодинамически стабильной кристаллической формы rac-диона и обеспечивает успешное разделение атропоизомеров. Последующие партии будут включать улучшенный способ для крупномасштабного изготовления.

Стадия 6.

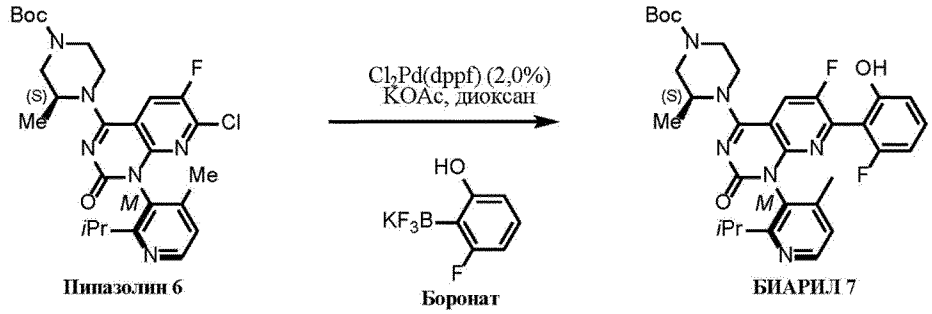


Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/ объемы**	**Моли**	**Теоретическое количество**
М-дион	н. д.	348,76	1 экв.	9,8	3,7 кг
Толуол	108-88-3	92,14	н. д.	375	34,6 кг (40 л)
Фосфорилхлорид	10025-87-3	153,33	1,2 экв.	11,7	1,8 кг (1,1 л)
N,N-Диизопропил-этиламин	7087-68-5	129,24	3,0 экв.	29,4	3,8 кг (5,1 л)
(s)-1-Boc-3-метилпиперазин	147081-29-6	200,28	1,1 экв.	10,8	2,214 кг
Бикарбонат натрия	144-55-8	84,01	н. д.	н. д.	973 г
Дихлорметан	75-09-2	84,93	н. д.	871	74 кг (55,6 л)
Хлорид натрия	7647-14-5	58,44	н. д.	103	6,0 кг
Этилацетат	141-78-6	88,11	н. д.	288	25,4 кг (28,2 л)

7-Хлор-6-фтор-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2,4(1*H*,3*H*)-дион (М-дион) (3,7 кг; 9,8 моль) объединяли в реакторе (A) с 10,5 кг толуола и перегоняли в масло для удаления воды при поддержании заданной температуры 45°C. Толуол (21 кг) добавляли к остатку и смесь перемешивали в течение 30 мин. при 40-45°C. Содержимое охлаждали до 22°C, затем добавляли фосфорилхлорид (1,8 кг; 11,7 моль). Смесь охлаждали до 0-5°C перед добавлением N, N-диизопропилэтиламина (2,5 кг; 19,34 моль) при поддержании температуры на уровне < 5°C. Раствор выдерживали в течение 3 ч. при 22°C. В отдельном реакторе (B) (s)-1-boc-3-метилпиперазин (2,21 кг; 10,8 моль) и N, N-диизопропилэтиламин (1,26 кг; 9,75 моль)) объединяли в толуоле (6 кг), а затем загружали в реактор (A) при поддержании температуры на уровне < 25°C. Реакционную смесь выдерживали в течение 15 мин. при 22°C, затем гасили бикарбонатом натрия (973 г) в воде (12,9 л) при поддержании температуры на уровне < 25°C. Смесь перемешивали в течение 30 мин., затем добавляли DCM (36,8 кг), продолжая перемешивание в течение 1 ч. Обеспечивали разделение слоев и нижний органический

слой сливали в реактор (C). Водный слой в реакторе (A) подвергали обратной экстракции с использованием DCM (18,4 кг) и объединенные органические слои промывали солевым раствором (6,0 кг NaCl; 16,5 кг деионизированной воды). Органический слой дистиллировали при атмосферном давлении, поддерживая внутреннюю температуру на уровне от 45 до 55°C. DCM в ходе дистилляции заменяли на раствор для азеотропной сушки. После дистилляции объем раствора доводили до 19 л с использованием DCM. Раствор охлаждали до 30°C и окончательно фильтровали. Фильтрат объединяли с этилацетатом (8,5 кг), а затем дистиллировали при атмосферном давлении до сбора 11-13 кг в резервуаре. В раствор вводили затравку в виде 30 г исходного продукта и выдерживали в течение 1 ч. при 25-30°C, затем дополнительно дистиллировали при атмосферном давлении при внутренней температуре 45-55°C до сбора 8,2 кг дистиллята. Взвесь охлаждали до 22°C и выдерживали на протяжении ночи, затем дополнительно охлаждали до 0-5°C. Продукт собирали путем фильтрации и промывали два раза с использованием этилацетата (по 4,2 кг каждый раз). Осадок на фильтре высушивали с помощью азота и вакуума с получением *трет*-бутил-(3*S*)-4-{7-хлор-6-фтор-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил}-3-метилпиперазин-1-карбоксилата (соединение 6, пипазолин).

Стадия 7.



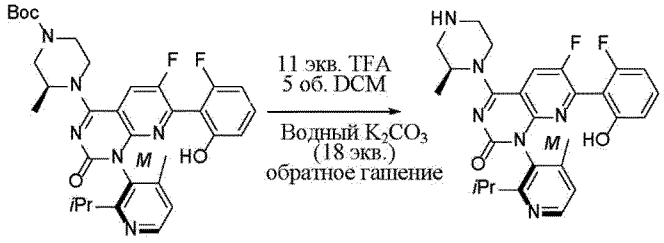
Материал	№ CAS	MW (г/моль)	Эквиваленты/ объемы	Моли	Теоретическое количество
[1,1'-Бис(дифенилфосфино) ферроцен]дихлорпалладий (II)	72287-26-4	731,714	0,020	1,01	0,74 кг
Дихлорметан	75-09-2	84,93	-	н. д.	400 кг
1,4-диоксан	123-91-1	88,1052	5,0	н. д.	168 кг
Дигидрат динатриевой соли этилендиаминтетра-уксусной кислоты	6381-92-6	336,207	1,0	45,2	15,2 кг

Гептан	142-82-5	100,21	-	-	200 кг
Азот	-	-	-	-	В необходимом количестве
Пипазолин	н. д.	531,0	1,0	45,2	24,0 кг
Ацетат калия	127-08-2	98,1417	5,0	225,99	22,2 кг
Трифтор(2-фтор-6-гидроксифенил)борат калия	н. д.	233,03	1,20	54,24	12,6 кг
2-Пропанол	67-63-0	66,10	-	н. д.	850 кг
Si-тиол	н. д.	н. д.	-	н. д.	13,2 кг
Гидроксид натрия	1310-73-2	40,00	-	-	6,5 кг
Вода, очищенная по USP	-	-	-	-	В необходимом количестве

В реактор добавляли дегазированный диоксан (74,2 кг), *трет*-бутил-(3*S*)-4-{7-хлор-6-фтор-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил}-3-метилпиперазин-1-карбоксилат (соединение 6, пипазолин) (24,0 кг, 45,2 моль), ацетат калия (22,2 кг, 45,2 моль) и (dppf)$PdCl_2$ (0,74 кг, 1,01 моль). В реакторе создавали инертную атмосферу с помощью газообразного азота. Раствор продували газообразным азотом до достижения содержания кислорода, составляющего < 500 мг/л. Реакционную смесь нагревали до 87,5°C. Раствор трифтор(2-фтор-6-гидроксифенил)бората калия (12,6 кг, 54,3 моль) в дегазированном диоксане (49,4 кг) и дегазированной воде (14,4 кг) с содержанием кислорода < 500 мг/л переносили в реакционную смесь, поддерживая внутреннюю температуру на уровне 82,5°C ± 7,5°C. Реакционную смесь доводили до 87,5°C ± 1,5°C и перемешивали в течение 75 мин. ± 15 мин. Загружали 1,0 М раствор EDTA (47,3 кг), а затем воду (40,1 кг) в реактор при поддержании внутренней температуры 85°C ± 5°C. Реакционную смесь охлаждали до 20°C ± 3°C в течение > 2 ч., а затем перемешивали в течение > 16 ч. Реакционную смесь фильтровали и неочищенные твердые вещества промывали водой (3×120 кг). Твердые вещества промывали смесью гептана (28,8 кг) и 2-пропанола (33,1 кг), а затем высушивали при < 50°C в течение > 10 ч. В чистый реактор загружали неочищенные твердые вещества и дихлорметан (240 кг). Содержимое перемешивали при 20°C ± 5°C в

течение > 30 мин. В реактор добавляли Si-тиол (144 кг) и дихлорметан (14,9 кг). Реакционную смесь перемешивали при 20°C ± 5°C в течение 18 ч. Реакционную смесь фильтровали и промывали дихлорметаном (84 кг). Раствор дистиллировали и растворитель заменяли на 2-пропанол. Реакционную смесь нагревали до 60°C ± 3°C и загружали гептан (108 кг) при поддержании температуры реакционной смеси на уровне 60°C ± 3°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 45 мин., а затем охлаждали и перемешивали при 20°C ± 5°C в течение 2,5 ч. Реакционную смесь фильтровали и промывали 50% об./об. гептан/2-пропанол (61,9 кг). Выделенные твердые вещества высушивали при < 50°C в течение > 12 ч. с получением *трет*-бутил-(3*S*)-4-{6-фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил}-3-метилпиперазин-1-карбоксилата (соединение 7, биарил).

Стадия 8.



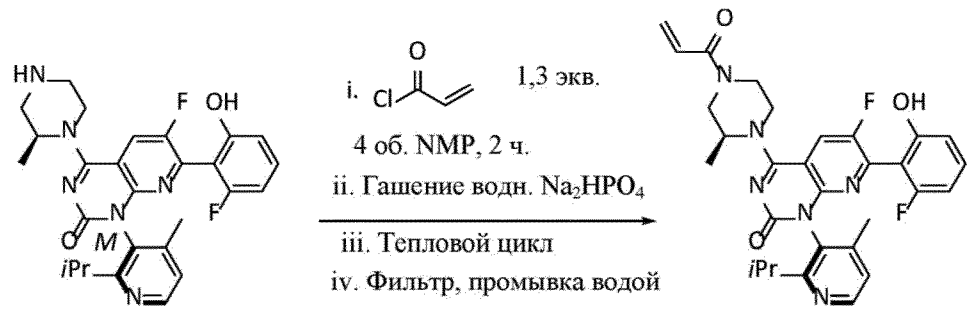
Общее примечание. Все эквиваленты и объемы указаны относительно биарила 7.

Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/ объемы**	**Моли**	**Теоретическое количество**
Биарил 7	н. д.	606,67	1,0 экв.	5,27	2,75 кг
TFA	76-05-1	114,02	11 экв.	49,7	5,67 кг
DCM	74-09-2	84,93	5 об.	н. д.	13,71 л
метанол	67-56-1	32,04	5 об.	н. д.	13,71 л
Вода	7732-18-5	18,02	20 об.	н. д.	54,8 л
Карбонат калия	584-08-7	138,20	18 экв.	94,91	11,24 кг
DCM	74-09-2	84,93	1 об.	н. д.	2,75 л
Вода	7732-18-5	18,02	10 об.	н. д.	27,5 л
Вода	7732-18-5	18,02	10 об.	н. д.	27,5 л

В реактор добавляли *трет*-бутил-(3*S*)-4-{6-фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]-2-оксо-1,2-дигидропиридо[2,3-*d*]пиримидин-4-ил}-3-метилпиперазин-1-карбоксилат (соединение 7, биарил) (2,75 кг, 5,27 моль), DCM (13,7 л) и TFA (5,67 кг, 49,7 моль). Реакционную смесь перемешивали в

течение 8-16 ч. при 20 ± 5°C. Во второй реактор добавляли карбонат калия (11,24 кг), воду (54,8 л) и метанол (13,7 л) для образования гомогенного раствора. Реакционную смесь добавляли в раствор карбоната калия в течение 2 ч. Смесь перемешивали при 20 ± 5°C в течение еще 12 ч. Полученную взвесь фильтровали и промывали водой (2×27,5 л). Влажный фильтрационный осадок высушивали в течение 24 ч. с получением 6-фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-4-[(2*S*)-2-метилпиперазин-1-ил]-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1*H*)-она (соединения 8, DESBOC).

Стадия 9.



Des-BOC 8 **Неочищенный продукт 9**

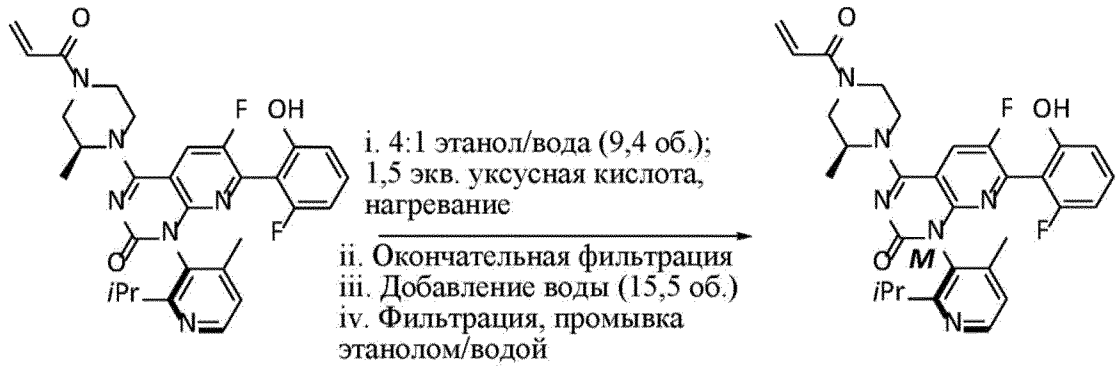
Общее примечание. Все эквиваленты и объемы указаны относительно Des-BOC.

Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/ объемы**	**ммоль**	**масса**	**объем**
Des-BOS	н. д.	506,56	1,0 экв.	308,4	156,25 г	-
Акрилоилхлорид N1	814-68-6	90,51	1,3 экв.	401,0	36,29 г	-
						-
NMP N-Метилпирролидон N2	872-50-4	99,13	4 об.	н. д.	-	625 мл
Вода	7732-18-5	18,02	20 об.	н. д.	3125g	3125 мл
Na_2HPO4 N3	7558-79-4	141,96	4 экв.	1233,6	175,12 г	-
Вода	7732-18-5	18,02	20 об.	н. д.	3125 г	3,125 мл

6-Фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-4-[(2*S*)-2-метилпиперазин-1-ил]-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1*H*)-он (соединение 8, DESBOC) (156,25 г) объединяли с N-метилпирролидоном (625 мл) и перемешивали при температуре окружающей среды. В полученный раствор добавляли акрилоилхлорид (36,29 г; 401,0 ммоль) при поддерж ании внутренней температуры на уровне < 30°C. Содержимое перемешивали в течение 2 ч. при 25°C. В отдельном реакторе получали раствор гидрофосфата натрия (175,1 г; 1234 ммоль) в деионизированной воде (3,1 л).

Затем раствор неочищенного продукта переносили в реактор, содержащий раствор гидрофосфата натрия, в течение > 2 ч. при 25°C. Взвесь нагревали до 45°C в середине добавления и после завершения добавления выдерживали в течение 2 ч. при той же температуре. Смесь охлаждали до 25°C и выдерживали в течение 4 ч. перед сбором твердых веществ путем вакуумной фильтрации. Твердые вещества дважды промывали водой (по 1,5 л каждый раз) и продукт высушивали в азоте и под вакуумом с получением продукта 6-фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]-4-[(2*S*)-2-метил-4-(проп-2-еноил)пиперазин-1-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1*H*)-она (неочищенное соединение 9).N4

Стадия 10.



Неочищенное соединение 9 **Соединение 9**

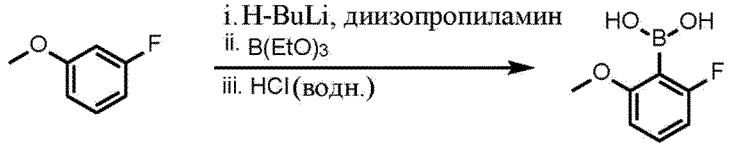
Общее примечание. Все эквиваленты и объемы указаны относительно неочищенного лекарственного вещества.

Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/ объемы**	**ммоль**	**масса**	**объем**
Неочищенное соединение 9	н. д.	560,60	1,0 экв.	253,9	142,33 г	-
Этанол (крепость 200)	64-17-5	-	7,5 об.	-	-	1067 мл
Вода по USP	-	18,02	1,9 об.	-	-	270 мл
Уксусная кислота	64-19-7	60,05	1,5 экв.	380,8	22,87 г	21,82 мл
Вода WFI	-	18,02	15,5 об.	-	-	2200 мл
Этанол (для промывки)	64-17-5	-	2,5 об.	-	-	356 мл
Вода WFI (для промывки)	-	-	5,0 об.	-	-	712 мл
Затравка соединением	-	560,60	0	-	0,3-0,7 г	-

9N5						

6-Фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]-4-[(2*S*)-2-метил-4-(проп-2-еноил)пиперазин-1-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1*H*)-он (неочищенное соединение 9) (142,33 г; 253,9 ммоль) объединяли с этанолом (996 мл) и водой (270 мл). Добавляли уксусную кислоту (21,8 мл; 380,8 ммоль) и смесь нагревали до 75°C для образования раствора, который окончательно фильтровали в чистый реактор. Раствор охлаждали до 45°C, а затем добавляли воду (1067 мл) при поддержании внутренней температуры на уровне > 40°C. В раствор вводили затравку в виде исходного соединения 9 и полученную смесь выдерживали в течение 30 мин. Затем добавляли воду (1138 мл) в течение 2 ч. Смесь охлаждали до 25°C и выдерживали в течение 8 ч., после чего собирали твердое вещество путем вакуумной фильтрации и промывали с использованием смеси этанола (355,8 мл) и воды (711,6 мл). Твердое вещество высушивали с использованием вакуума и азота с получением 6-фтор-7-(2-фтор-6-гидроксифенил)-(1*M*)-1-[4-метил-2-(пропан-2-ил)пиридин-3-ил]-4-[(2*S*)-2-метил-4-(проп-2-еноил)пиперазин-1-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-2(1*H*)-она (соединение 9).

Схема реакции стадии A1 и таблица загрузки



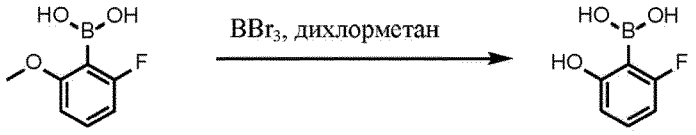
3-фторанизол (2-фтор-6-метоксифенил)бороновая кислота

Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/ объемы**	**мол.**	**Масса (г)**	**Объем (л)**
3-Фторанизол	456-49-5	126,13	1,0	1,19	150	0,136
н-Бутиллитий (2,5 М в гексане)	109-72-8	64,06	1,5	1,78	н. д.	0,712
Диизопропиламин	108-18-9	101,19	1,4	1,66	168	0,233
Триэтилборат	150-46-9	145,99	2,0	2,38	347,5	0,405
тетрагидрофуран	109-99-9	72,11	12 об.	н. д.	н. д.	1,8
Хлористоводородная кислота (2N)	7647-01-0	36,46	10 об.	н. д.	н. д.	1,5
Метил-трет-бутиловый эфир	1634-04-4	88,15	12 об.	н. д.	н. д.	1,8
Гептан	142-82-5	100,20	10,5 об.	н. д.	н. д.	1,575

В реактор A загружали THF (6 об.) и диизопропиламин (1,4 экв.). Полученный

раствор охлаждали до -70°C и медленно добавляли н-BuLi (2,5 М в гексане, 1,5 экв.). После завершения добавления медленно добавляли раствор 3-фторанизола (1,0 экв.) в THF (6 об.) и поддерживали при -70°C в течение 5 мин. Медленно добавляли $B(EtO)_3$ (2,0 экв.) и поддерживали при -70°C в течение 10 мин. Реакционную смесь гасили с помощью 2 н. HCl. Погашенную реакционную смесь экстрагировали с помощью MTBE (3×4 об.). Объединенные органические фазы концентрировали до суммарных объемов 1,5~3. Гептан добавляли по каплям (7-9 об.), смесь охлаждали до 0-10°C и перемешивали в течение 3 ч. Смесь фильтровали и промывали гептаном (1,5 об.). Твердое вещество высушивали в азоте при < 30°C с получением (2-фтор-6-метоксифенил)бороновой кислоты.

Схема реакции стадии A2 и таблица загрузки



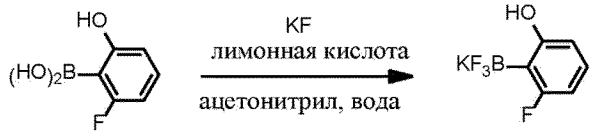
(2-фтор-6-метоксифенил)бороновая кислота (2-фтор-6-гидроксифенил)бороновая кислота

Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/ объемы**	**мол.**	**Масса (г)**	**Объем (л)**
(2-Фтор-6-метоксифенил)боронов ая кислота.	78495-63-3	169,95	1,0	0,118	20	н. д.
Трибромид бора	10294-33-4	250,52	1,5	0,177	44,2	0,017
Дихлорметан	75-09-2	84,93	4 об.	н. д.	н. д.	0,080
Вода	7732-18-5	18,02	13 об.	н. д.	н. д.	0,26
Метил-трет-бутиловый эфир	1634-04-4	88,15	13 об.	н. д.	н. д.	0,26
Гептан	142-82-5	100,20	10 об.	н. д.	н. д.	0,20

В реактор A загружали дихлорметан (4 об.) и 2-фтор-6-метокси-4-метилфенилбороновую кислоту (1 экв.). Реакционную смесь охлаждали до -30°C и по каплям добавляли 1,5 BBr_3 (1,5 экв.). По завершении добавления смесь нагревали до 25°C и перемешивали в течение 2 ч. Реакционную смесь гасили в ледяной (0-5°C) воде (10 об.). Добавляли MTBE (10 об.) и смесь нагревали до 25°C и перемешивали в течение 1-2 ч. или до растворения всех твердых веществ. Водную фазу выделяли и экстрагировали с помощью MTBE (3 об.). Объединенные органические экстракты промывали водой (3 об.), а затем концентрировали до суммарных объемов 1. В смесь добавляли гептан (10 об.) и перемешивали в течение 2 ч. Полученный продукт выделяли путем фильтрации и

высушивали при < 30°C с получением (2-фтор-6-гидроксифенил)бороновой кислоты.

Схема реакции стадии A3 и таблица загрузки



Бороновая кислота **Боронат**

Материал	**№ CAS**	**MW (г/моль)**	**Эквиваленты/ объемы**	**мол.**	**Масса (кг)**	**Объем (л)**
(2-Фтор-6-гидроксифенил) бороновая кислота	1256345-60-4	155,92	1,0	89,79	14,00	н. д.
Моногидрат лимонной кислоты	5949-29-1	210,14	1,64	147,26	30,94	н. д.
Ацетонитрил	75-05-8	41,05	21 об.	н. д.	220,1	294
Фторид калия	7789-23-3	58,10	4,00	359,16	20,87	н. д.
Вода по USP	7732-18-5	18,02	2,0 об.	н. д.	28,00	28,00
Целит	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	7,00	н. д.
2-Пропанол	67-63-0	60,10	25 об.	н. д.	275	350

Стадия A3

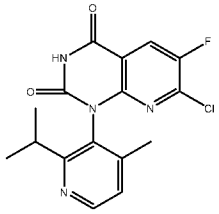
Фторид калия (21,0 кг; 20,87 моль) объединяли с водой (28 л) в реакторе (реакторе A) и содержимое перемешивали в течение 30 мин. В отдельный реактор (реактор B) загружали (2-фтор-6-гидроксифенил)бороновую кислоту (14,00 кг, 89,79 моль), а затем ацетонитрил (206,1 кг) и лимонную кислоту (30,94 кг; 147,26 моль) при 25 C. Содержимое реактора A добавляли в реактор B при 25°C и перемешивали при этой температуре в течение 10 ч. Реакционную смесь фильтровали через слой целита (7,0 кг) и промывали ацетонитрилом (42 кг). Фильтрат объединяли с изопропанолом (56 кг), а затем дистиллировали в вакууме при температуре < 35°C, заменяя дистиллированный объем в реакторе изопропанолом, и повторяли при необходимости до завершения замены растворителя с ацетонитрила на изопропанол. Взвесь охлаждали до 15°C и выдерживали в течение 1 ч., затем фильтровали и промывали с помощью 28 кг изопропанола. Остаток на фильтре высушивали с использованием вакуума и азота и упаковывали с получением соединения A3.

Разделение соединения 5 M-диона

Хроматографическое разделение промежуточного соединения M-диона

Использовали ряд хиральных хроматографических методик и способов для

выделения M-диона из соединения 4. Методики и неподвижные фазы хорошо известны в уровне техники и описаны в таблице 1.



Соединение 4

Таблица 1

Методика	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Выход^
SFC	Chiralpak® AD	40% метанол/60% CO2*	~95%
HPLC	Chiralpak® AD	90/10/0,1 этанол/метанол/ триэтиламин	~94%
HPLC	Chiralpak® IG	60/40/0,1 этанол/метанол/ триэтиламин	~92%
Псевдодвижущийся слой (SMB)	Chiralpak® IC	Ацетонитрил	~ 96%

^Выход определяют как % доступного M-диона, который был извлечен при необходимой чистоте ее > 98%.

*Такое выделение проводили несколько раз. Для каждой партии материала подвижная фаза могла быть слегка модифицирована для приспособления к вариациям в партиях. Дополнительные подвижные фазы, используемые для очистки, включали

1) 25/75 метанол/CO_2,

2) 30/70 метанол/CO_2, и

3) 50/50 метанол/CO_2.

Методики SFC, HPLC и SMB хорошо известны в уровне техники и неподвижные фазы Chiralpak® коммерчески доступны из коммерческих источников, таких как компании Fisher Scientific и Daicel Corporation.

Однако требуется разрабатывать более эффективный способ выделения M-диона (соединение 5).

Классическое разделение

Настоящее изобретение направлено на разработку эффективного способа классического разделения для рацемата M/P-диона (соединение 4).

В общей сложности проводили 100 экспериментов скрининга сокристаллов и идентифицировали три потенциальных сокристалла диона. На основании соотношения наибольших площадей M/P-диона в остаточном твердом веществе и соотношения наименьших площадей в супернатанте выбирали (+)-2,3-дибензоил-D-винную кислоту (DBTA) в качестве хирального реагента для разделения.

Согласно результатам 100 экспериментов скрининга сокристаллов и еще 20 скринингов растворителей обнаружили, что 2-MeTHF/н-гептан обеспечивает лучший

результат разделения, чем другие системы растворителей. На основании результатов растворимости сокристалла M-диона и сокристалла P-диона в различных соотношениях 2-MeTHF и н-гептана выбирали 2-MeTHF/н-гептан (1,4:1, об./об.) в качестве оптимальной композиции растворителя для разделения.

Чтобы выяснить любое возможное превращение формы в рацемат диона или M/P-диона во время способа кристаллизации с хиральным разделением, определяли растворимость сокристалла M-диона, сокристалла P-диона, смеси сокристаллов M+P-диона (1:1, мас./мас.), рацемат диона и DBTA при различных температурах в 2-MeTHF/н-гептане (1,4:1, об./об.). Для сокристаллов M-диона и сокристаллов P-диона при различных температурах в течение 7 дней не наблюдали изменения формы. Однако рацемат диона типа C получали после перемешивания сокристаллической смеси M+P-диона (1:1, мас./мас.) при различных температурах в течение 7 дней. Рацемат диона типа D (20 и 30°C) или рацемат диона типа C (40, 50, 60 и 65°C) наблюдали после перемешивания рацемата диона при соответствующих температурах в течение 7 дней. Растворимость ~ 100 мг/мл наблюдали для DBTA при всех температурах.

Для дальнейшей оптимизации способа разделения строили тройную фазовую диаграмму сокристалла M/P-диона на основе результатов равновесной растворимости, а точка эвтектики не была получена вероятно потому, что рацемат типа C мог кристаллизоваться, когда присутствовали сокристалл M-диона и сокристалл P-диона. Другую тройную фазовую диаграмму M/P-диона строили на основе результатов равновесной растворимости, а точка эвтектики не была получена вероятно потому, что рацемат диона типа C или типа D мог кристаллизоваться, когда присутствовали как M-дион, так и P-дион.

Таким образом, идентифицировали хиральный реагент (DBTA) и систему растворителей ((2-MeTHF/н-гептан (1,4:1, об./об.)) для разделения рацемата диона. Процесс мелкомасштабной кристаллизации с использованием реагентов разделения и системы растворителей может обеспечить выход M-диона 39% и чистоту ее 99%. Кроме того, во время скрининговых экспериментов наблюдали и исследовали полиморфизм рацемата диона.

Соединения по настоящему изобретению также можно применять в комбинации с фармацевтически активными средствами, которые лечат тошноту. Примеры средств, которые можно применять для лечения тошноты, включают дронабинол, гранисетрон, метоклопрамид, ондансетрон и прохлорпемазин или их фармацевтически приемлемые соли.

Соединение по настоящему изобретению также можно применять в комбинации с лучевой терапией, гормональной терапией, хирургией и иммунотерапией, при этом такие виды терапии широко известны специалистам в данной области техники.

Поскольку в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено лечение заболевания/состояний с помощью комбинации фармацевтически активных соединений, которые можно вводить раздельно, настоящее изобретение дополнительно относится к

объединению отдельных фармацевтических композиций в форме набора. Набор содержит две отдельные фармацевтические композиции: соединение по настоящему изобретению и второе фармацевтическое соединение. Набор содержит контейнер для содержания отдельных композиций, такой как разделенный на части флакон или пакет из фольги, разделенный на части. Дополнительные примеры контейнеров включают шприцы, коробки и мягкие резервуары. Как правило, набор содержит инструкции по применению отдельных компонентов. Форма набора особенно предпочтительна, когда отдельные компоненты предпочтительно вводят в разных лекарственных формах (например, перорально и парентерально), вводят с различными интервалами между введением лекарственного средства, или когда подбор дозы отдельных компонентов комбинации будет назначаться терапевтом или ветеринаром.

Примером такого набора является так называемая блистерная упаковка. Блистерные упаковки хорошо известны в упаковочной промышленности и широко используются для упаковки фармацевтических стандартных лекарственных форм (таблеток, капсул и т. п.). Блистерные упаковки в основном состоят из листа относительно жесткого материала, покрытого фольгой, предпочтительно из прозрачного пластического материала. В ходе процесса упаковки в пластиковой фольге формируют углубления. Углубления соответствуют размеру и форме таблеток или капсул, подлежащих упаковке. Далее таблетки или капсулы помещают в углубления и листом относительно жесткого материала герметизируют пластиковую фольгу со стороны, противоположной направлению формирования углублений. В результате таблетки или капсулы оказываются герметично запечатанными в углублениях между пластиковой фольгой и листом. Предпочтительно прочность листа является такой, что таблетки или капсулы могут быть извлечены из блистерной упаковки вручную при приложении давления на углубления с образованием отверстия в листе на месте углубления. Далее таблетку или капсулу извлекают через указанное отверстие.

Может требоваться обеспечение средства напоминания на наборе, например, в виде цифр рядом с таблетками или капсулами, при этом цифры будут соответствовать дням режима, в которые следует принимать таблетки или капсулы, обозначенные таким образом. Другой пример такого средства напоминания представляет собой календарь, напечатанный на карточке, например, следующим образом: "первая неделя, понедельник, вторник,

. . . и т д. . . вторая неделя, понедельник, вторник, . . . и т. д. Другие вариации средств напоминания будут очевидными. "Суточная доза" может представлять собой одну таблетку или капсулу, или несколько пилюль или капсул для приема в конкретный день. Кроме того, суточная доза соединения по настоящему изобретению может состоять из одной таблетки или капсулы, тогда как суточная доза второго соединения может состоять из нескольких таблеток или капсул, и наоборот. Это должно отображаться в средстве напоминания и способствовать правильному введению активных средств.

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения

предлагается диспенсер, сконструированный для отпуска суточных доз во время и в порядке их предусмотренного применения. Предпочтительно диспенсер оборудован средством напоминания, чтобы дополнительно облегчить соблюдение пациентом режима. Примером такого средства напоминания является механический счетчик, который показывает количество отпущенных суточных доз. Другой пример такого средства напоминания представляет собой средство напоминания с питанием от аккумулятора в виде микрочипа, соединенного с жидкокристаллическим экраном или звуковым сигналом напоминания, который, например, считывает дату отпуска предыдущей суточной дозы и/или напоминает о времени приема следующей дозы.

Соединения по настоящему изобретению и другие фармацевтически активные соединения, при необходимости, могут быть введены пациенту либо перорально, ректально, парентерально (например, внутривенно, внутримышечно или подкожно), интрацистернально, внутривагинально, внутрибрюшинно, интравезикально, местно (например, порошки, мази или капли), либо в качестве буккального или назального спрея. Предусмотрены все способы, которые применяют специалисты в данной области техники для введения фармацевтически активного средства.

Композиции, подходящие для парентеральной инъекции, могут предусматривать физиологически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии и стерильные порошки для восстановления в стерильные инъекционные растворы или дисперсии. Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или сред-носителей включают воду, этанол, полиолы (пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, глицерин и т. п.), их подходящие смеси, растительные масла (такие как оливковое масло) и инъекционные органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Такие композиции также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Загрязнение микроорганизмами может быть предупреждено добавлением различных противобактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т. п. Кроме того, может быть желательным включение средств для поддержания изотоничности, например, сахаров, хлорида натрия и т. п. Пролонгированная абсорбция инъекционных фармацевтических композиций может быть достигнута за счет использования средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активное соединение смешано по меньшей мере с одним обычным инертным вспомогательным средством (или носителем), таким как цитрат натрия или гидрофосфат кальция, или (a) наполнителями или сухими разбавителями, такими как виды крахмала, лактоза, сахароза,

маннит и кремниевая кислота; (b) связующими средствами, такими как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и акациевая камедь; (c) увлажняющими средствами, такими как глицерин; (d) разрыхляющими средствами, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые сложные силикаты и карбонат натрия; (a) средствами, замедляющими растворение, такими как парафин; (f) средствами, ускоряющими абсорбцию, такими как соединения четвертичного аммония; (g) смачивающими средствами, такими как цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (h) адсорбентами, такими как каолин и бентонит; и (i) смазывающими средствами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия или их смеси. В случае капсул и таблеток лекарственная форма может также содержать буферные средства.

Твердые композиции подобного типа также можно использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах с применением таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т. п.

Твердые лекарственные формы, такие как таблетки, драже, капсулы, пилюли и гранулы, могут быть получены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в уровне техники. Они также могут содержать средства, придающие непрозрачность, а также могут представлять собой такие композиции, которые высвобождают активное соединение или соединения в определенной части кишечного тракта замедленным способом. Примерами заливочных композиций, которые могут использоваться, являются полимерные вещества и воски. Активное соединение также может быть в микроинкапсулированной форме, при необходимости, с одним или несколькими описанными выше вспомогательными средствами.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии, сиропы и настойки. В дополнение к активным соединениям, жидкая лекарственная форма может содержать инертные разбавители, обычно применяемые в уровне техники, такие как вода или другие растворители, солюбилизирующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла, в частности, хлопковое масло, арахисовое масло, кукурузное масло, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло, глицерин, тетрагидрофурфуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирной кислоты сорбитана или смеси указанных веществ и т. п.

Помимо таких инертных разбавителей, композиция может включать адъюванты, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы. Суспензии в дополнение к активному соединению могут содержать суспендирующие средства, как например,

этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант или смеси указанных веществ и т. п.

Композиции для ректального введения предпочтительно представляют собой суппозитории, которые могут быть получены путем смешивания соединений по настоящему изобретению с подходящими нераздражающими вспомогательными веществами или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или суппозиторный воск, которые являются твердыми при обычной комнатной температуре, но жидкими при температуре тела и, таким образом, плавятся в прямой кишке или полости влагалища и высвобождают активный компонент.

Лекарственные формы для местного введения соединения по настоящему изобретению включают мази, порошки, спреи и ингаляционные формы. Активное соединение или соединения смешивают в стерильных условиях с физиологически приемлемым носителем и любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут быть необходимы. Глазные составы, глазные мази, порошки и растворы также предусмотрены в объеме настоящего изобретения.

Соединения по настоящему изобретению можно вводить пациенту с уровнями доз, находящимися в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 3000 мг в сутки. Для нормального взрослого человека с массой тела приблизительно 70 кг обычно будет достаточной доза в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 100 мг на килограмм массы тела. Конкретная доза и диапазон доз, которые можно применять, зависят от множества факторов, в том числе потребностей пациента, тяжести состояния или заболевания, подлежащего лечению, и фармакологической активности вводимого соединения. Конкретная доза соединения по настоящему изобретению представляет собой дозу, одобренную FDA, если соединение одобрено.

Соединения по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтически приемлемых солей, сложных эфиров, амидов или пролекарств. Термин "соли" относится к неорганическим и органическим солям соединений по настоящему изобретению. Соли могут быть получены in situ в ходе заключительного выделения и очистки соединения или посредством отдельного осуществления реакции очищенного соединения в форме его свободных основания или кислоты с подходящими органическими или неорганическими основанием или кислотой и выделения полученной таким образом соли. Иллюстративные соли включают соли, представляющие собой гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, нитрат, ацетат, оксалат, пальмитат, стеарат, лаурат, борат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глюкогептонат, лактобионат и лаурилсульфонат и т. п. Соли могут включать соли на основе катионов щелочных и щелочноземельных металлов, таких как натрий, литий, калий, кальций, магний и т. п., а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, в том числе без ограничения аммония, тетраметиламмония, тетраэтиламмония, метиламина, диметиламина, триметиламина, триэтиламина, этиламина

и т. п. См., например, S. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J Pharm Sci, 66: 1-19 (1977).

Примеры фармацевтически приемлемых сложных эфиров соединения по настоящему изобретению включают C_1-C_8алкиловые сложные эфиры. Приемлемые сложные эфиры также включают в себя C_5-C_7циклоалкиловые сложные эфиры, а также арилалкиловые сложные эфиры, такие как бензил. Обычно используют C_1-C_4алкиловые сложные эфиры. Сложные эфиры соединений по настоящему изобретению могут быть получены согласно способам, хорошо известным в уровне техники.

Примеры фармацевтически приемлемых амидов соединения по настоящему изобретению включают амиды, полученные из аммония, первичные C_1-C_8алкиламины и вторичные C_1-C_8диалкиламины. В случае вторичных аминов амин также может иметь форму 5- или 6-членной гетероциклоалкильной группы, содержащей по меньшей мере один атом азота. Обычно используют амиды, полученные из аммония, первичные C_1-C_3алкиламины и вторичные C_1-C_2диалкиламины. Амиды соединения по настоящему изобретению могут быть получены согласно способам, хорошо известным специалистам в уровне техники.

Термин "пролекарство" означает соединения, которые преобразуются *in vivo* с получением соединения согласно настоящему изобретению. Преобразование может происходить с помощью различных механизмов, например, посредством гидролиза в крови. Обсуждение применения пролекарств представлено в T. Higuchi and W. Stella, "Prodrugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 of the A.C.S., и в Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

Для иллюстрации, поскольку соединение согласно настоящему изобретению содержит функциональную группу карбоновой кислоты, пролекарство может содержать сложный эфир, образованный путем замены атома водорода кислотной группы группой, такой как (C_1-C_8алкил, (C_2-$C1_2$)алканоилоксиметил, 1-(алканоилокси)этил, содержащий от 4 до 9 атомов углерода, 1-метил-1-(алканоилокси)этил, содержащий от 5 до 10 атомов углерода, алкоксикарбонилоксиметил, содержащий от 3 до 6 атомов углерода, 1-(алкоксикарбонилокси)этил, содержащий от 4 до 7 атомов углерода, 1-метил-1-(алкоксикарбонилокси)этил, содержащий от 5 до 8 атомов углерода, N-(алкоксикарбонил)аминометил, содержащий от 3 до 9 атомов углерода, 1-(N-(алкоксикарбонил)аминометил, содержащий от 4 до 10 атомов углерода, 3-фталидил, 4-кротонолактонил, гамма-бутиролактон-4-ил, ди-N, N-(C_1-C_2)алкиламино(C_2-C_3)алкил (такой как β-диметиламиноэтил), карбамоил-(C_1-C_2)алкил, N, N-ди(C_1-C_2)алкилкарбамоил-(C_1-C_2)алкил и пиперидино-, пирролидино- или морфолино(C_2-$_3$)алкил.

Соединения по настоящему изобретению могут содержать асимметричные или хиральные центры и, следовательно, существовать в различных стереоизомерных формах. Предполагается, что все стереоизомерные формы соединения, а также их смеси, в том числе рацемические смеси, составляют часть настоящего изобретения. Кроме того, в настоящем изобретении предусмотрены все геометрические и позиционные изомеры. Например, если соединение содержит двойную связь, предусмотрены как цис-, так и

транс-формы (обозначенные как Z и E, соответственно), а также смеси.

Смесь стереоизомеров, такая как диастереомерные смеси, может быть разделена на ее отдельные стереохимические компоненты, исходя из их физико-химических различий, с помощью известных способов, таких как хроматография и/или фракционная кристаллизация. Энантиомеры также могут быть разделены путем превращения энантиомерной смеси в диастереомерную смесь путем осуществления реакции с соответствующим оптически активным соединением (например, спиртом), разделения диастереомеров и превращения (например, в результате гидролиза) отдельных диастереомеров в соответствующие чистые энантиомеры. Также некоторые соединения могут быть атропоизомерами (например, замещенными биарилами).

Соединения по настоящему изобретению могут находиться в несольватированной, а также сольватированной формах с фармацевтически приемлемыми растворителями, такими как вода (гидрат), этанол и т. п. В настоящем изобретении предусмотрены и охвачены как сольватированные, так и несольватированные формы.

Также возможно, что соединения по настоящему изобретению могут находиться в различных таутомерных формах. Предусмотрены все таутомеры соединения по настоящему изобретению. Например, все таутомерные формы тетразольного фрагмента включены в настоящее изобретение. Кроме того, например, все кето-енольные или имин-енаминные формы соединений включены в настоящее изобретение.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что названия и структуры соединений, содержащиеся в данном документе, могут быть основаны на конкретном таутомере соединения. Хотя могут применяться название или структура только для конкретного таутомера, подразумевается, что в настоящем изобретении охвачены все таутомеры, если не указано иное.

Также подразумевается, что в настоящем изобретении охвачены соединения, которые синтезированы *in vitro* с применением лабораторных методик, таких как широко известные специалистам в области химического синтеза; или синтезированы с применением методик *in vivo*, например, посредством метаболизма, ферментации, расщепления и т. п. Также предусматривается, что соединения по настоящему изобретению могут быть синтезированы с применением комбинации методик *in vitro* и *in vivo*.

Настоящее изобретение также включает меченные изотопами соединения, идентичные приведенным в данном документе, за исключением того факта, что один или несколько атомов заменены атомом с атомной массой или массовым числом, отличными от атомной массы или массового числа, обычно обнаруженных в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{14}C, ^{15}N, ^{16}O, ^{17}O, ^{18}O, ^{31}P, ^{32}P, ^{35}S, ^{18}F и ^{36}Cl. В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединениям, где один или несколько атомов водорода заменены атомами дейтерия (^{2}H).

Соединения по настоящему изобретению, которые содержат вышеупомянутые изотопы и/или другие изотопы других атомов, входят в объем настоящего изобретения. Некоторые меченные изотопами соединения по настоящему изобретению, например, соединения, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как ^{3}H и ^{14}C, применимы для анализов распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Содержащие тритий, т. е. ^{3}H, углерод-14, т. е. ^{14}C, изотопы особенно предпочтительны вследствие простоты их получения и обнаружения. Кроме того, замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, т. е. ^{2}H, может предоставлять некоторые терапевтические преимущества, возникающие вследствие более высокой устойчивости к инактивации в процессе метаболизма, например, повышенный период полувыведения *in vivo* или сниженные требования к дозировке, и, следовательно, могут быть более предпочтительными в некоторых обстоятельствах. Меченные изотопами соединения по настоящему изобретению в основном могут быть получены путем замены немеченного изотопами реагента легко доступным меченным изотопами реагентом.

Соединения по настоящему изобретению могут существовать в различных твердых состояниях, в том числе кристаллических состояниях и в аморфном состоянии. Различные кристаллические состояния, также называемые полиморфами, и аморфные состояния соединений по настоящему изобретению рассматриваются как часть настоящего изобретения.

При синтезе соединений по настоящему изобретению может требоваться использование некоторых уходящих групп. Термин "уходящие группы" ("LG") как правило относится к группам, которые могут быть замещены нуклеофилом. Такие уходящие группы известны в уровне техники. Примеры уходящих групп включают без ограничения галогениды (например, I, Br, F, Cl), сульфонаты (например, мезилат, тозилат), сульфиды (например, SCH_3), N-гидроксисукцинимид, N-гидроксибензотриазол и т. п. Примеры нуклеофилов включают без ограничения амины, тиолы, спирты, реактивы Гриньяра, анионные формы (например, алкоксиды, амиды, карбанионы) и т. п.

Все патенты, патентные заявки и другие документы, изложенные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Примеры, представленные ниже, иллюстрируют конкретные варианты осуществления настоящего изобретения. Такие примеры предназначены для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема формулы изобретения каким-либо образом.

ПРИМЕРЫ

AMG 510 был разработан как перорально биодоступный ковалентный ингибитор $KRAS^{G12C}$ с мощной биохимической и клеточной активностью и высокой эффективностью *in vivo*. Анализ цистеинового протеома клеток NCI-H358, обработанных AMG 510, показал, что только G12C-содержащий пептид KRAS был ковалентно модифицирован. AMG 510 ингибировал SOS-катализируемый обмен нуклеотидов рекомбинантного мутанта $KRAS^{G12C/C118A}$, но оказывал минимальное влияние на $KRAS^{C118A}$, который является диким типом в положении 12. В клеточных анализах AMG 510 ковалентно

модифицировал $KRAS^{G12C}$ и ингибировал передачу сигнала $KRAS^{G12C}$, что измеряли по фосфорилированию ERK1/2 во всех тестируемых линиях клеток, мутантных по *KRAS p.G12C*, но не ингибировал фосфорилирование ERK1/2 в линии клеток с различными другими мутациями *KRAS*. AMG 510 также селективно ухудшал жизнеспособность линий клеток, мутантных по *KRASp.G12C*, но не влиял на линии клеток с другими мутациями *KRAS*. Фармакодинамические анализы *in vivo* продемонстрировали зависимое от дозы и времени ингибирование передачи сигнала $KRAS^{G12C}$, что измеряли по фосфорилированию ERK1/2 (p-ERK) в ксенотрансплантатах опухолей поджелудочной железы человека (MIA PaCa-2 T2) и NSCLC (NCI-H358). Ковалентную модификацию $KRAS^{G12C}$ с помощью AMG 510 измеряли с помощью масс-спектрометрии и коррелировали с ингибированием p-ERK в опухолях. Исследования временной динамики на несущих опухоль мышах показали, что воздействие AMG 510 в плазме крови достигает пикового значения через 0,5 часа после введения дозы, за которым с небольшим отставанием следует ингибирование p-ERK в опухолях. AMG 510 значительно ингибировал рост ксенотрансплантатов MIA PaCa-2 T2 и NCI-H358 и приводил к регрессии опухоли при более высоких дозах. Обработка линий KRAS p.G12C ковалентными ингибиторами $KRAS^{G12C}$ усиливала экспрессию HLA. Комбинированное лечение с помощью AMG 510 с ингибиторами других путей клеточной передачи сигнала продемонстрировало синергетические эффекты в отношении жизнеспособности клеток. Комбинированное лечение с помощью AMG 510 со стандартным лечением карбоплатином продемонстрировало усиленное ингибирование роста опухоли NCI-H358 по сравнению с любым отдельным средством. Аналогичным образом, AMG 510 в комбинации с ингибитором MEK приводил к повышенной противоопухолевой эффективности по сравнению с любым отдельным средством.

Для тестирования влияния ингибирования $KRAS^{G12C}$ на иммунный надзор in vivo создавали новую линию сингенных опухолевых клеток, которая подходит для тестирования AMG 510 в комбинации с терапевтическими средствами на основе ингибиторов контрольных точек и, таким образом, охарактеризована in vitro. В заново разработанной модели рака с мутантом KRAS-G12C обработка AMG 510 значительно ингибировала рост опухоли и вызывала регрессию. Поразительно, но комбинация AMG 510 с ингибитором иммунных контрольных точек приводила к заметному повышению общей выживаемости и приводила к длительному излечению. Иммунофенотипирование мышиных опухолей *KRAS p.G12C* выявило значительное увеличение инфильтрации Т-клеток после обработки, что позволяет предположить, что AMG 510 может индуцировать микроокружение опухоли, более чувствительное к ингибированию иммунных контрольных точек.

Новая сингенная модель опухоли CT-26 *KRAS p.G12C*

Мышиные клетки CT26 (опухоль толстой кишки № 26) были получены в 1975 году путем воздействия на мышей BALB/c N-нитрозо-N-метилуретана (NMU), что привело к быстрорастущей карциноме IV стадии, которая легко имплантируется и быстро метастазирует. Карцинома толстой кишки CT26, использованная в более чем 500

опубликованных исследованиях, является одной из наиболее часто используемых линий клеток при разработке лекарственных средств. С помощью этих клеток были изучены многочисленные цитотоксические средства, а также терапевтические средства, нацеленные на определенные пути передачи сигнала. Более того, поскольку модель CT26 на мышах BALB/c обеспечивает сингенную тест-систему in vivo, ее часто используют для разработки и тестирования иммунотерапевтических концепций. *BMC Genomics. 2014 Mar 13;15:190. doi: 10.1186/1471-2164-15-190. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma.*

Сингенную модель опухоли CT-26 *KRAS p.G12C* разрабатывали для проведения комбинированных исследований с линиями клеток и иммунотерапией, как показано в таблице A и на фигурах 3, 4, 5, 6, 18, 24, 31, 34, 38 и 39. Линию сингенных опухолевых клеток CT-26 выбирали на основании того, что она имеет мутацию KRAS-G12D, присутствующую в родительской линии. Присутствие мутации KRAS-G12D предполагает, что рост и выживаемость линии клеток могут управляться конститутивной передачей сигналов KRAS (G12D) и потенциально могут быть чувствительны в отношении ингибирования KRAS. Клетки CT-26 *KRAS p.G12C* получали из линии клеток колоректальной опухоли мыши CT-26. Использовали технологию CRISPR, описанную в предшествующем уровне техники Liang et al. (Journal of Biotechnology 241 (2017) 136-146), для замены обоих аллелей *KRAS p.G12D* на *KRAS p.G12C* с использованием последовательности CTTGTGATGGTTGGAGCTGA (SEQ ID NO: 21). Клон 10 определяли как гомозиготный по аллелю *KRAS p.G12C* с помощью секвенирования следующего поколения (NGS) и идентифицировали как *CT-26 KRAS G12C-H10.* Эту новую выделенную линию сингенных опухолевых клеток CT-26 KRAS p.G12C, которая обеспечивает ингибирование передачи сигнала KRAS с помощью AMG 510, использовали для всех исследований CT-26 G12C *in* vivo (см. фигуры 3, 4, 5 и 6) и исследований in vitro (см. фигуры 18, 24, 31, 34, 38 и 39).

Настоящее изобретение охватывает новую линию выделенных клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12C}$, и способ получения линии клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12C}$, при этом способ включает

a) инкубирование линии клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12D}$, с конструкцией CRISPR, которая индуцирует замещение нуклеотида в каждом из двух аллелей KRAS, таким образом образуются два аллеля $KRAS^{G12C}$; и

b) выделение линии клеток, содержащих два аллеля $KRAS^{G12C}$.

Секвенирование следующего поколения (NGS), также известное как высокопроизводительное секвенирование, представляет собой универсальный термин, используемый для описания ряда различных современных технологий секвенирования, включающих

- секвенирование Illumina (Solexa),
- секвенирование Roche 454,
- секвенирование Ion torrent: Proton/PGM,

• секвенирование SOLiD™.

В настоящем изобретении использовали платформу Ion Torrent™ Personal Genome Machine™, коммерчески доступную от компании Thermo-Fisher Scientific. Эти новейшие технологии позволяют ученым секвенировать ДНК и РНК намного быстрее и дешевле, чем ранее использовавшееся секвенирование по Сэнгеру.

Исследования комбинации на клетках *in vitro*

Линии клеток приобретали в Американской коллекции типовых культур (ATCC), Немецкой коллекции микроорганизмов и культур клеток (DSMZ) и Японской коллекции исследовательских биоресурсов (JCRB). Каждую линию культивировали в рекомендованной для нее питательной среде.

Для двухкомпонентных комбинаций соединений клетки высевали в 96-луночные или 384-луночные

планшеты для культивирования клеток при начальной плотности, варьирующей от 500 до 2500 клеток на лунку.

Спустя от шестнадцати до 24 часов соединения добавляли в планшеты для культивирования в матричном

формате, при котором одно средство титровали по оси x, а второе средство - по оси y.

Для всех комбинаций, тестируемых на любой из представленных линий клеток, начальную высокую концентрацию и

коэффициент разбавления каждого соединения выбирали для точного определения максимума кривой,

минимума кривой и наклона диапазона доз, выбранных для формата скрининга

комбинации. Наборы для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega) использовали для определения количества жизнеспособных клеток.

Люминесценцию измеряли с помощью многоканального считывающего устройства EnVision® (Perkin Elmer) для

каждой линии клеток в нулевой момент времени (V0) до добавления соединений, а также через 72

часа после обработки соединением. Ингибирование роста (GI) рассчитывали по 200-балльной

шкале в соответствии со следующими уравнениями, где V72 представляло собой люминесценцию контроля DMSO

через 72 часа, а T72 представляло собой люминесценцию обработанного соединением образца, если T72 >

V0, то GI=100 x (1 - ((T72-V0)/(V72 - V0))); если T72 < V0, то GI=100 x (1 - ((T72-

V0)/V0)). Значения GI, составляющие 0, 100 и 200 представляют неингибированный рост клеток (т.е. кнтроль DMSO)

, стаз клеток и полное уничтожение клеток соответственно. Сигмоидальные кривые

зависимости ответа от дозы

строили с использованием 4-параметрической логистической модели. Данные анализировали в отношении

синергетических взаимодействий с использованием аналитического программного обеспечения Chalice™ (Zalicus), которое генерировало

баллы синергизма на основе модели аддитивности Loewe.

Ингибирование роста для каждой лунки матрицы рассчитывали, как описано ранее, и данные анализировали на предмет синергетических взаимодействий с использованием аналитического программного обеспечения Chalice™ (Zalicus; Кембридж, Массачусетс) которое генерировало баллы синергизма на основе модели аддитивности Loewe (Lehàr, J., et al. (2009). "Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity." *Nat Biotech* **27**(7): 659-666) и Rickles, et al (2012) "Adenosine A2A and Beta-2 Adrenergic Receptor Agonists: Novel Selective and Synergistic Multiple Myeloma Targets Discovered through Systematic Combination Screening" Mol Cancer Therapeutics 11 (7): 1432.

Модель ADD (аддитивности) Loewe (как показано на фигурах 7-37) позволяет количественно оценить эффекты комбинации. Сначала комбинации ранжировали по избытку величины аддитивности, что определяется как величина ADD = $\sum C_X, C_Y (I_{data} - I_{Loewe})$, где $I_{Loewe}(C_X, C_Y)$, что представляет собой ингибирование, которое удовлетворяет $(C_X/EC_X) + (C_Y/EC_Y) = 1$, а $EC_{X, Y}$ представляют собой эффективные концентрации при I_{Loewe} для кривых отдельного средства. Также использовали "баллы синергизма", где балл синергизма $S=\log f_X \log f_Y \sum I_{data} (I_{data}-I_{Loewe})$, суммированный для всех пар концентраций, не относящихся к отдельному средству, и где $\log f_{X, Y}$ представляет собой натуральный логарифм факторов разбавления, применяемых для каждого отдельного средства. Это позволяет эффективно вычислить объем между измеренной поверхностью и поверхностью аддитивного ответа Loewe, взвешенный по высокой степени ингибирования и откорректированное с учетом различных факторов разбавления. Неопределенность σ_S вычисляли для каждого балла синергизма на основании измеренных ошибок для значений I_{data} и распространения стандартной ошибки.

В примерах показано, что матрицы ингибирования роста (%) содержат консенсусные значения ингибирования роста, вычисленные по данным люминесценции с использованием описанных выше формул; матрицы модели ADD ингибирования роста (%) содержат предсказанные значения ингибирования роста, основанные на модели аддитивности Loewe, которые получены из смоделированных кривых ингибирования роста для отдельного средства; и матрицы избытка величины ADD ингибирования роста (%) содержат значения ингибирования роста в избытке относительно модели аддитивности. Модель аддитивности служит "нулевой гипотезой" и допускает отсутствие синергетического взаимодействия между двумя средствами. Любая активность, наблюдаемая после вычитания модели ADD из матрицы зависимости ответа ингибирования роста от дозы (= избыток ADD ингибирования роста), является показателем синергизма.

В приведенной ниже таблице А показаны специфические *in vitro* комбинации ингибитора $KRAS^{G12C}$ с одним или несколькими дополнительными фармацевтически активными средствами для конкретных типов рака. Данные, полученные и обобщенные на фигурах 7-39, показывают, что комбинации, представленные в таблице А, демонстрируют повышенную противораковую активность по сравнению с ожидаемой, когда отдельные компоненты комбинированной терапии используются по отдельности. Следует отметить, что величина наблюдаемого терапевтического синергизма может варьировать в зависимости от типа рака, подвергаемого лечению, и используемого средства.

ТАБЛИЦА А

	EGFRi			SHP2i	MEKi	PI3Ki		AKTi	Ab к EGFR
	AMG 510 Афатиниб	AMG 510 Эрлотиниб	AMG 510 Лапатиниб	AMG 510 RMC-4550	AMG 510 Траметиниб	AMG 510 AMG 511	AMG 510 Бупарлисиб	AMG 510 AZD5363	AMG 510 Цетуксимиб
NCI-H358 (легкое)	22,3	12,4	19,7	25	17	10,5	13,5	4,53	--
MIA PaCa-2 (поджелудочная железа)	4,7	2,07	--	6,36	3,06	5,53	--	2,67	--
MIA PaCa-2 3D	2,76	--	--	--	7,46	--	--	--	--
NCI-H1373 3D (легкое)	8,7*	--	--	--	11,8	--	--	--	--
CT-26 KRAS p.G12C 3D (толстая кишка мыши)	10,8*	--	--	11,7*	2,63	10,8	--	--	--

SW837 (толстая кишка)	--	--	--	--	--	--	--	--	2,96

• Нецелевые эффекты при более высоких концентрациях, возможно, способствуют повышению баллов синергизма.

Исследования комбинации на ксенотрансплантате опухоли *in vivo*

Исследования на ксенотрансплантате опухоли *in vivo* проводили в соответствии со следующими общими процедурами.

Опухолевые клетки культивировали, собирали и подкожно имплантировали в правый бок самок бестимусных голых мышей. По достижении опухолями приблизительно 200 мм^3 мышей рандомизировали на группы лечения (n=10/группа) и начинали лечение (в дни, указанные на графиках). Размеры опухолей и массы тела измеряли 2-3 раза в неделю. Объем опухоли измеряли с помощью электронных штангенциркулей, вычисляли как L x W x H и выражали в мм^3. Статистическую значимость наблюдаемых отличий между кривыми роста оценивали с помощью дисперсионного анализа результатов повторных измерений (RMANOVA) данных логарифмически трансформированного объема опухоли со скорректированными по Даннетту множественными сравнениями показателей контрольной группы с группами лечения. В случае исследований комбинации проводили RMANOVA с группой обработки комбинации, сравнивая один к одному с каждой группой обработки отдельным средством.

Матрица на мембранной подложке BD Matrigel™ представляет собой солюбилизированный препарат на мембранной подложке, экстрагированный из саркомы мыши Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния).

Все исследования проводили вслепую.

На фигурах 3, 4, 5 и 6 антитело к PD-1 мыши (клон 29F.1A12) является коммерчески доступным от компании Bio X Cell, Западный Ливан, Нью-Гэмпшир.

На фигурах 1, 2, 3, 4, 5 и 6 показаны специфические комбинации ингибитора $KRAS^{G12C}$ *in vivo* с одним или несколькими дополнительными фармацевтически активными средствами для конкретных типов рака. Данные, полученные и обобщенные на фигурах, показывают, что комбинации, представленные на фигурах, демонстрируют повышенную противораковую активность по сравнению с ожидаемой, когда отдельные компоненты комбинированной терапии используются по отдельности. Следует отметить, что величина наблюдаемого терапевтического синергизма может варьировать в зависимости от типа рака, подвергаемого лечению, и используемого средства.

На фигуре 4 комбинированная обработка с помощью AMG 510 и антитела к PD1 (клон 29F.1A12) в модели сингенной опухоли CT26-KRASG12C привело к значительному повышению выживаемости и привело к длительному излечению по сравнению с обработкой отдельным средством. Монотерапия AMG 510 или монотерапия антителом к PD1 приводила к замедлению роста опухоли по сравнению с контрольной группой.

Каждая обработка с помощью монотерапии приводила к полному ответу 1/10 объекта. Комбинированное лечение с помощью AMG 510+антитело к PD1 приводило к полному ответу 9/10 субъектов. Это считали надежным излечением, и у этих 9 мышей не осталось опухолей после прекращения обработки (день 43) вплоть до дня 57, когда исследование было завершено.

Повышенные связывание и эффективность AMG 510

Хотя ARS-1620 подтвердил подход прямого ингибирования $KRAS^{G12C}$, идентификация улучшенных ингибиторов, подходящих для клинического тестирования, оказалась сложной. Авторы настоящего изобретения считают, что серьезной проблемой является недостаточная эффективность из-за небольшого объема аллостерического кармана, занятого ARS-1620, что дает ограниченные возможности для дополнительных взаимодействий белок-лиганд. Это было проиллюстрировано рентгеновской кристаллической структурой ковалентного комплекса $KRAS^{G12C}$/ARS-1620 (фиг. 40a), в которой водородная связь между ARS-1620 и гистидином 95 (H95) заметно выделялась (пунктирная линия). Прорывом стало открытие того, что бороздка на поверхности, образованная альтернативной ориентацией H95, может быть занята замещенными ароматическими кольцами, что усиливает взаимодействие с $KRAS^{G12C}$. AMG 510 стал лучшим кандидатом в кампании по оптимизации молекул, связывающих бороздки H95, поскольку он представлял собой сочетание улучшенной эффективности и благоприятных для разработки свойств. Рентгеновская сокристаллическая структура ковалентного комплекса AMG 510-$KRAS^{G12C}$ (фиг. 40b) подчеркивает связывание AMG 510 в кармане P2 KRAS. Изопропил-метилпиридиновый заместитель занимает бороздку между Y96, H95 и Q99 и входит в непрерывную сеть из 25 ван-дер-ваальсовых контактов лиганд-белок, простирающуюся от остова спирали 2 (H95, Y96) до остова гибкой петли переключателя II (E62, E63).

Чтобы оценить влияние, которое усиленные взаимодействия оказали в отношении эффективности AMG 510, авторы настоящего изобретения использовали два анализа, в которых использовали рекомбинантный GDP-связанный $KRAS^{C118A}$ или $KRAS^{G12C/C118A}$ с дополнительной заменой цистеина на аланин в остатке 118, чтобы избежать реактивности с цистеинами, отличными от C12. В ферментативном анализе обмена нуклеотидов использовали катализируемый SOS1 обмен GDP/GTP для обеспечения связывания RAS-связывающего домена (RBD) c-RAF с обеими версиями KRAS. В 40-минутной реакции AMG 510 демонстрировал в ~10 раз большую эффективность (средняя IC_{50}=0,09 мкМ), чем ARS-1620 (фиг. 40c). AMG 510 заметно не ингибировал $KRAS^{C118A}$ (фиг. 40c), а нереакционноспособный аналог AMG 510 имел минимальную активность в этих анализах (фиг. 46a). Кинетические показатели реакции между AMG 510 и GDP-$KRAS^{G12C/C118A}$ в условиях кажущегося первого порядка измеряли с помощью масс-спектрометрии (MS). С помощью нелинейной аппроксимации данных зависимости скорости от концентрации (фиг. 40d) установили максимальную скорость реакции k_{inact}=0,85 ± 0,08 c^{-1} и концентрацию AMG 510 при полумаксимальной скорости K_I=8,6E-05 ± 1,4E-05 M с

получением соотношения k_{inact}/K_I 9,8E+03 ± 1,8E+03 $M^{-1}c^{-1}$. Кинетические показатели реакции между AMG 510 и $KRAS^{G12C/C118A}$ были значительно улучшены по сравнению с ARS-1620. По сравнению с клиническими нацеленными на цистеин ингибиторами киназы AMG 510 характеризовался значительно большей k_{inact}, что согласуется с механизмом индуцированного KRAS катализа, который был ранее описан для ARS-1620. Неспецифическая реактивность AMG 510 с 5 мМ глутатионом была относительно низкой (AMG 510 $t_{1/2=}$196 мин.) и находилась в пределах диапазона клинических ковалентных акриламидов.

Ингибирование передачи сигнала и роста опухолевых клеток

Клеточную активность AMG 510 оценивали путем измерения базального фосфорилирования ERK1/2 (p-ERK) и с помощью MS для обнаружения ковалентной конъюгации (т. е. занятости) $KRAS^{G12C}$ AMG 510. В двух линиях клеток *KRAS p.G12C* AMG 510 сильно ингибировал p-ERK (IC_{50} ~0,02 и 0,03 мкМ соответственно) до почти неопределяемых уровней после 2-часовой обработки и был в 20 раз эффективнее, чем ARS-1620 (фиг. 40e). Это ингибирование точно коррелировало с занятостью $KRAS^{G12C}$ AMG 510 с почти максимальными уровнями, достигнутыми в обоих анализах при ~ 0,2 мкМ (фиг. 40f). AMG 510 также сильно снижал жизнеспособность клеток в обеих линиях (IC_{50} ~ 0,006 мкМ и 0,009 мкМ, ~ в 40 раз сильнее, чем ARS-1620) (фиг. 40g).

Клеточные кинетические показатели AMG 510 в двух линиях клеток *KRAS p.G12C* определяли с использованием зависимости ингибирования p-ERK от времени и концентрации, что отражает занятость $KRAS^{G12C}$ AMG 510. Скорость ингибирования p-ERK увеличивалась с увеличением концентрации AMG 510, при этом насыщение происходило при концентрациях выше 3 мкМ. Аппроксимации по кривой зависимости скорости от концентрации для AMG 510 и ARS-1620 (фиг. 40h и фиг. 46b) показывают, что клеточная кинетическая эффективность ингибирования $KRAS^{G12C}$ с помощью AMG 510 была в приблизительно 23 раза выше, чем ARS-1620. Максимальная скорость ингибирования фосфорилирования ERK с помощью AMG 510 (8.9E-04 c^{-1}) в приблизительно 2 раза выше скорости лимитирующего скорость гидролиза GTP-$KRAS^{G12C}$, предложенной в недавней кинетической модели (оцениваемая скорость по ингибированию EGFR=4,2 E-04 c^{-1}; $t_{1/2}$=27,4 мин.). Чтобы обеспечить альтернативную оценку скорости гидролиза GTP с помощью $KRAS^{G12C}$, использовали ингибитор SHP2 для устранения всей восходящей передачи сигнала к KRAS. Этот эксперимент дал скорость клеточного гидролиза GTP 9,4E-04 c^{-1}, ($t_{1/2=}$12,2 мин.; фиг. 46c), что соответствует скорости, наблюдаемой для AMG 510.

Для более широкого оценивания воздействия ингибирования $KRAS^{G12C}$ на передачу сигнала две линии клеток обрабатывали несколькими дозами AMG 510 в течение 4 и 24 часов и проводили вестерн-блоттинг для оценивания множественных узлов передачи сигнала (фиг. 41a). Образование ковалентного аддукта AMG 510 с $KRAS^{G12C}$ обнаруживали по сдвигу подвижности более медленно мигрирующей полосы KRAS (верхняя стрелка). Этот вид молекулы, характеризующийся сдвигом, накапливался с

увеличением времени и дозы и соответствовал последующему ингибированию пути MAPK (т.е. p-MEK1/2 и p-ERK1/2) в обеих линиях клеток (фиг. 41a, 41b). Ингибирование KRAS с помощью AMG 510 также привело к накоплению активного EGFR (p-EGFR Y1068). Ингибирование фосфорилирования AKT (p-AKT) было очевидным в одной линии, но снижение фосфорилирования рибосомного белка S6 (p-S6) наблюдали через 24 часа в обеих линиях. Расщепление каспазы-3 также наблюдали через 24 часа, что свидетельствует об индукции апоптоза. В более продолжительном периоде времени обработка с помощью AMG 510 при 0,1 мкМ (рис. 41b) вызвала быстрые (< 2 ч.) и устойчивые (> 24 ч.) эффекты в отношении MAPK и EGFR, тогда как p-S6 и расщепление каспазой проявились через 8-16 часов после обработки в обеих линиях.

Для оценки активности и селективности AMG 510 профилировали в 22 линиях клеток, несущих либо гетерозиготные, либо гомозиготные мутации *KRAS p.G12C* или *KRAS*, отличные от *p.G12C,* а также линии *KRAS* дикого типа (WT). Двухчасовая обработка с помощью AMG 510 подавляла базисный p-ERK во всех линиях клеток *KRAS p.G12C* со значениями IC_{50}, варьирующими от 0,010 мкМ до 0,123 мкМ (фиг. 41c и дополнительная таблица 1). AMG 510 не ингибировал p-ERK ни в каких отличных от *KRAS p.G12C* линиях (IC_{50} > 10 мкМ; фиг. 41c и дополнительная таблица 1).

В анализах жизнеспособности клеток AMG 510 нарушал рост всех гомозиготных и гетерозиготных линий клеток *KRAS p.G12C*, кроме SW1573, со значениями IC_{50}, варьирующими от 0,004 мкМ до 0,032 мкМ (фиг. 41d и дополнительная таблица 1). Хотя все линии *KRAS p.G12C* демонстрировали подобное максимальное ингибирование p-ERK, максимальное влияние в отношении жизнеспособности клеток варьировало. Линии клеток с мутациями *KRAS*, отличными от *p.G12C*, или с мутациями в генах, отличных от *KRAS*, были нечувствительны в отношении AMG 510 (IC_{50} > 7,5 мкМ; фиг. 41d и дополнительная таблица 1). Подгруппу линий клеток *KRAS p.G12C* выбирали для оценки жизнеспособности в условиях низкой адгезии для индуцирования образования сфероидов. Как сообщалось для других ингибиторов $KRAS^{G12C}$, эти условия повышали чувствительность всех тестируемых линий в отношении AMG 510 и приводили к 20-кратному увеличению активности и 2,5-кратному увеличению максимального ингибирования (фиг. 41e, фиг. 46d и дополнительная таблица 1). SW1573 оставался минимально чувствительным, возможно, из-за сопутствующей драйверной мутации, *PIK3CA p.K111E.*

Для дополнительного определения селективности ковалентного взаимодействия AMG 510 с $KRAS^{G12C}$ и идентифицирования других потенциально «нецелевых» цистеин-содержащих белков в клетках осуществляли профилирование цистеинового протеома с помощью MS, как описано. После обработки клеток с помощью DMSO или 1 мкМ AMG 510 (> 30-кратная IC_{50} p-ERK) в течение 4 часов обогащали цистеиновый протеом и идентифицировали пептиды. Среди 6451 уникального содержащего цистеин пептида пептид Cys12 из $KRAS^{G12C}$ был единственным идентифицированным пептидом, который отвечал критериям ковалентного взаимодействия с мишенью (фиг. 41f).

AMG 510 ингибирует передачу сигнала KRAS in vivo

Эффект пероральной обработки AMG 510 в отношении передачи сигнала $KRAS^{G12C}$ оценивали с помощью фармакодинамических (PD) анализов, измеряющих p-ERK. В опухолях человека, несущих *KRAS p.G12C*, AMG 510 ингибировал p-ERK зависимым от дозы образом через 2 часа после обработки (фиг. 42a, b). Ингибирование p-ERK после обработки с помощью AMG 510 (100 мг/кг) варьировало от 69% (MIA PaCa-2 T2) до 83% (NCI-H358) снижения по сравнению с контролем. Подобные эффекты AMG 510 в отношении уровней p-ERK наблюдали на модели опухоли мыши (фиг. 47a) с использованием сингенной линии CT-26 *KRAS p.G12C*, которую создавали с использованием технологии CRISPR. Анализы PD с течением времени продемонстрировали пиковое воздействие AMG 510 на плазму крови и опухоль через 0,5 часа после однократной дозы (10 мг/кг), что привело к максимальному ингибированию p-ERK через 2-4 часа после обработки и к устойчивому значительному ингибированию в течение 48 часов (фиг. 42c, 42d). Это согласуется с относительно продолжительным периодом полувыведения белка $KRAS^{G12C}$ от 20 до 24 часов (фиг. 46e).

Кроме того, в параллельных экспериментах занятость $KRAS^{G12C}$ AMG 510 измеряли с помощью MS и она приближалась к 100% при максимальной дозе (100 мг/кг), что коррелирует с максимальной супрессией p-ERK (фиг. 42e и 42f). Исследования временной динамики показали, что частичную занятость AMG 510 обнаруживали через 0,5 часа, а занятость ~ 100% наблюдали через 2 часа (фиг. 42g).

Селективное в отношении мутанта ингибирование опухоли in vivo

AMG 510 оценивали в отношении его способности ингибировать рост ксенотрансплантатов опухоли человека *KRAS p.G12C* и *KRAS p.G12V* (SW480-1AC) у мышей. AMG 510 значительно ингибировал рост опухолей MIA PaCa-2 T2 и NCI-H358 при всех уровнях доз, при этом регрессию опухоли наблюдали при более высоких дозах (фиг. 43a, 43b). Напротив, обработка с помощью AMG 510 не влияла на рост опухоли *KRAS p.G12V* (фиг. 47b). Уровни AMG 510 в плазме крови были сопоставимыми во всех моделях (данные не показаны). В мышиной модели опухоли CT-26 *KRAS p.G12C*, выращенной на иммунокомпетентных мышах, AMG 510 приводил к ингибированию роста и регрессии опухоли при максимальной дозе (фиг. 43c). У двух из 10 мышей (в получающей 100 мг/кг группе) не обнаруживали опухоли, когда исследование было прекращено в день 29. AMG 510 также значительно ингибировал рост человеческих полученных от пациентов ксенотрансплантатов (PDX), мутантных по *KRAS p.G12C*, у мышей (фиг. 43d и фиг. 47c).

Доказательства клинической активности

Повышенная активность, высокая эффективность и благоприятный фармацевтический профиль AMG 510 обеспечили выбор его в качестве первого ингибитора $KRAS^{G12C}$ для участия в клинических испытаниях (Clinical trials.gov NCT03600883). Примечательно, что в первых двух когортах пациентов обработка с помощью AMG 510 привела к объективным частичным ответам (согласно RECIST 1.1) у

двух пациентов с NSCLC *KRAS p.G12C* (фиг. 43e и фиг. 47d). Оба пациента прогрессировали на нескольких предшествующих системных курсах лечения, включающих карбоплатин, пеметрексед и ниволумаб, с документированным прогрессированием заболевания. Первый пациент демонстрировал уменьшение опухоли на 34% через 6 недель лечения с помощью AMG 510. Второй респондент показал уменьшение опухоли на 67% всего через 2 недели лечения с помощью AMG 510. Эти пациенты продолжали лечение с помощью AMG 510 через 6 месяцев и 2 месяца соответственно (на момент даты подачи настоящей предварительной заявки на патент в США). Нежелательные явления не регистрировали. Эти пациенты стали первыми, кто отвечал на специфический в отношении мутанта ингибитор KRAS, что стало важной вехой для пациентов с опухолями, мутантными по *KRAS p.G12C*.

Повышенная эффективность в комбинации

Учитывая высокую распространенность *KRAS p.G12C* при аденокарциноме легкого на модели NCI-H358 исследовали комбинированное лечение с помощью AMG 510 с карбоплатином, стандартным химиотерапевтическим средством для лечения рака легкого. Лечение любым отдельным средством (AMG 510 или карбоплатином) приводило к значительному ингибированию роста опухоли (фиг. 44a). Однако комбинированное лечение при различных дозах привело к значительному повышению противоопухолевой эффективности (фиг. 44a и фиг. 47e). Насколько известно авторам настоящего изобретения это первая демонстрация повышенной эффективности от комбинации селективного в отношении мутанта ингибитора KRAS с химиотерапевтическим средством, что обеспечивает обоснование такого подхода в клинике.

Клинически подтвержденная стратегия комбинирования ингибиторов BRAF и MEK предполагает, что комбинации с AMG 510 и другими ингибиторами сигнальных путей MAPK (и AKT) могут усиливать уничтожение опухолевых клеток и преодолевать устойчивость[26]. Поэтому эксперименты с комбинацией in vitro проводили на нескольких линиях клеток *KRAS p.G12C* с матрицами AMG 510 и ингибиторами киназ HER, EGFR, SHP2, PI3K, AKT и MEK (фиг. 48). Как показывает индуцирование p-EGFR с помощью AMG 510 (фиг. 41a), комбинация AMG 510 с несколькими средствами приводила к синергетическому уничтожению опухолевых клеток в NCI-H358 (фиг. 44b и фиг. 48). Синергизм был более ограниченным в других линиях, но комбинация с MEKi была синергетической во многих условиях и усиливалась в условиях сфероидного роста (фиг. 44b). Значительно повышенная противоопухолевая активность также наблюдалась in vivo с минимально эффективной дозой AMG 510 в комбинации с MEKi по сравнению с любым одним отдельным средством (фиг. 44c). Вместе эти данные подтверждают вызывающий интерес клинический подход комбинирования AMG 510 со средствами, нацеленными на другие узлы пути MAPK, для подавления остаточной или обходной передачи сигнала, которые могут ограничивать эффективность или вызывать устойчивость.

Провоспалительное микроокружение опухоли

Блокада оси иммунных контрольных точек программируемой клеточной смерти

1/лиганда программируемой смерти 1 (PD-1/PD-L1) клинически подтверждена и одобрена для некоторых онкологических пациентов. Активность терапии AMG 510 в комбинации с антителом к PD-1 оценивали в иммунокомпетентных условиях на модели CT-26 *KRAS p.G12C*. Эта линия зависит от аллеля *KRAS p.G12C* (фиг. 49a, b) и была чувствительна в отношении AMG 510 (фиг. 43c и фиг. 47a). Как показано ранее (фиг. 43c), AMG 510 приводил к регрессии опухоли в качестве единственного средства (фиг. 45a). Однако с течением времени только 1 из 10 опухолей оставалась полностью регрессивной (фиг. 45a). Монотерапия антителом к PD-1 приводила к замедленному росту опухоли и только 1 из 10 опухолей проявляла полную регрессию. Поразительно, что комбинированное лечение привело к полному ответу у 9 из 10 пациентов (фиг. 45a). Лечение прекращали через 43 дня и за мышами продолжали наблюдение в течение еще 112 дней. У всех пациентов с полным ответом на комбинированное лечение по-прежнему не было выявляемых опухолей, что указывает на то, что комбинация AMG 510 с антителом к PD-1 приводит к длительному излечению. При использовании суррогатной конечной точки выживаемости (объем опухоли> 800 мм^3), комбинированное лечение приводило к заметному увеличению выживаемости по сравнению с видами монотерапии (фиг. 45b).

Чтобы понять эффекты лечения в отношении композиции иммунных клеток в опухолях, опухоли CT-26 *KRAS p.G12C* иммунофенотипировали после лечения. Через 4 дней лечения AMG 510 приводил к заметному увеличению инфильтрации Т-клеток, в первую очередь CD8+ Т-клеток (фиг. 45c и фиг. 50a). Повышенную инфильтрацию CD8+ Т-клеток также наблюдали в получающей комбинацию группе, в первую очередь за счет AMG 510, поскольку этого не происходило после монотерапии антителома к PD-1. В качестве дополнительного компаратора ингибитор MEK (MEKi), который блокировал передачу сигналов MAPK ниже RAS (фиг. 50b) и приводил к подобному ингибированию роста опухоли CT-26 *KRAS p.G12C*, как и AMG 510 (фиг. 50c, 50d), не влияет на количество инфильтрирующихся CD8+ Т-клеток (фиг. 45c). Обработка с помощью AMG 510 также приводила к повышенной инфильтрации макрофагов и дендритных клеток, чего не наблюдали с MEKi (фиг. 45c). Экспрессия PD-1 на CD8+ Т-клетках умеренно увеличивалась посредством как AMG 510, так и MEKi (фиг. 44a). РНК цельной опухоли очищали после обработки и оценивали профили транскрипции на панели иммунных генов. Всего через 2 дня лечения ингибирование $KRAS^{G12C}$ с помощью AMG 510 индуцировало провоспалительное микроокружение, характеризующееся повышенной передачей сигнала интерферона, процессингом антигена, цитотоксической активностью и активностью NK-клеток, а также маркерами стимуляции врожденного иммунитета, которые были значительно выше по сравнению с эффектами, индуцированными ингибированием MEK (фиг. 45d и фиг. 44e). AMG 510 также индуцировал экспрессию белков MHC-I на опухолевых клетках CT-26 *KRAS p.G12C* (фиг. 45e и фиг. 50f). Эти данные предполагают, что лечебные эффекты AMG 510 в отношении опухолевых клеток могут приводить к усилению Т-клеточного примирования и распознавания антигена. Для тестирования этого, вылеченным мышам после комбинированного лечения (фиг. 45a)

повторно вводили двусторонние опухоли CT-26 *KRAS p.G12C* и родительские CT-26 (*KRAS p.G12D*) или CT-26 *KRAS p.G12C*, а также неродственную модель опухоли молочной железы мыши 4T1. Все опухоли 4T1 (4/4) выросли, но ни одна (0/8) из опухолей CT-26 *KRAS p.G12C* не установилась (фиг. 45f). Примечательно, что все мыши, получавшие родительские опухоли CT-26, не имели опухолей через 40 дней (фиг. 45f). В отдельной контрольной группе наивных мышей выросли 15 из 15 (100% случаев) родительских опухолей CT-26 и CT-26 *KRAS p.G12C* (фиг. 50g). Спленоциты, собранные у вылеченных мышей, стимулировали либо опухолевыми клетками CT-26, CT-26 *KRAS p.G12C*, либо 4T1, и уровни секретируемого IFN-γ измеряли в качестве маркера опухолеспецифического примирования и активности Т-клеток. Клетки CT-26 *KRAS p.G12C* и родительские клетки CT-26 вызывали ~ 3-кратное увеличение IFN-γ, которое не индуцировалось клетками 4T1 (фиг. 45g).

ОБСУЖДЕНИЕ

Открытие нового взаимодействия с бороздкой H95 $KRAS^{G12C}$ позволило заметно повысить эффективность и идентифицировать AMG 510, первый в своем классе пероральный ингибитор $KRAS^{G12C}$ с доказательствами клинической активности у пациентов. AMG 510 селективно нацеливается на опухоли *KRAS p.G12C* и комбинируется с цитотоксическими и нацеливаемыми средствами для синергетического уничтожения опухолевых клеток. Гибель опухолевых клеток, индуцированная AMG 510, приводила к воспаленному микроокружению опухоли, которое в высокой степени реагировало на ингибирование иммунных контрольных точек. Комбинированное лечение с помощью антитела к PD-1 и MEKi продемонстрировало убедительную доклиническую эффективность в нескольких отчетах, и это было связано с повышенной Т-клеточной инфильтрацией. В настоящем исследовании инфильтрация иммунных клеток после селективного ингибирования $KRAS^{G12C}$ была значительно более устойчивой, чем инфильтрация, индуцированная MEKi. В отличие от описанных эффектов неселективных в отношении опухоли MEKi, которые блокируют размножение и примирование Т-клеток, селективное ингибирование $KRAS^{G12C}$ с помощью AMG 510 приводило к усиленному примированию Т-клеток. Эти данные подтверждают модель улучшенного распознавания антигена и Т-клеток памяти, в которой индуцированная AMG 510 гибель опухолевых клеток в комбинации с обработкой антителом к PD-1 приводит к адаптивному иммунному ответу, так что опухоли, не относящиеся к *p.G12C*, распознаются и уничтожаются. Существуют достаточные доказательства того, что статус внутриопухолевой мутации *KRAS* может быть гетерогенным как в пределах одной опухоли, так и между первичными и метастатическими участками. Взятые вместе, данные по настоящему изобретению позволяют предположить, что AMG 510 может быть эффективным противоопухолевым средством даже в условиях, когда экспрессия $KRAS^{G12C}$ является гетерогенной.

СПОСОБЫ

Рекомбинантные белки

Рекомбинантный His-меченный $KRAS^{G12C/C118A}$ человека (1-169), c-RAF GST

человека (1-149) и His-меченный $KRAS^{C118A}$ человека (1-169) были экспрессированы в *Escherichia coli* и очищены с использованием аффинной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. Рекомбинантный His-меченный SOS1 человека (564-1049, оптимизированный по кодонам насекомого) был экспрессирован в *Trichoплюсia ni* и очищен с использованием аффинной хроматографии; после удаления His-метки он был дополнительно очищен с помощью эксклюзионной хроматографии. Конструкцию мутанта с заменой цистеина в легкой цепи использовали для исследований сокристаллизации на основании работы Ostrem et al[15]. Рекомбинантный His-меченый $KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$ человека (1-169) был экспрессирован в *E. coli* и очищен с использованием аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии с удалением His-метки для кристаллизации.

Соединения и антитела

ARS-1620, PD-0325901, траметиниб, афатиниб, эрлотиниб, RMC-4550 и AZD5363 получали из коммерческих источников. AMG 511 синтезировали самостоятельно. Синтез AMG 510 и его нереакционноспособного пропионамида описан в данном документе. Исходные растворы AMG 510 и всех других ингибиторов, используемых для экспериментов in vitro, получали в виде 10 мМ растворов в 100% диметилсульфоксиде (DMSO). Для исследований *in vivo* AMG 510 и MEKi (PD-0325901) составляли в 2% HPMC, 1% Tween 80 и вводили через желудочный зонд ежедневно в дозе 10 мл/кг. Исходный раствор карбоплатина в дозе 10 мг/мл дополнительно разбавляли до 5 мг/мл или 3 мг/мл в 1% PBS и вводили посредством внутрибрюшинной инъекции (IP) один раз в неделю. Клон 29F.1A12 антитела крысы к PD1 мыши химеризовали с содержанием остова мышиного IgG1. Кроме того, вводили молчащую мутацию Fc-рецептора N297G в область тяжелой цепи IgG для снижения эффекторной функции. Антитело 29F.1A12 к PD-1 разбавляли в 1X PBS до концентрации 500 мкг/мл и вводили один раз каждые 3 дня, всего 3 IP инъекции. Все антитела, используемые для вестерн-блоттинга, приобретали в компании Cell Signaling, за исключением антител к RAS (Abcam), антител к фосфо-ERK1/2 (ThermoFisher Scientific) и антител к бета-актин-HRP (Sigma).

Линии клеток

Все линии клеток приобретали в Американской коллекции типовых культур (ATCC), за исключением KM12 и NCI-H3122, которые получали из Национального института рака. Линии клеток аутентифицировали с помощью профилирования с коротким тандемным повтором (STR). Для улучшения кинетических показателей роста *in vivo* получали клетки MIA PaCa-2 T2 и SW480-1AC путем пассирования клеток MIA PaCa-2 и SW480 соответственно мышам. Клетки CT-26 *KRAS p.G12C* получали из мышиной колоректальной линии CT-26 (ATCC) с использованием технологии CRISPR для замещения обоих аллелей *KRAS p.G12D* с помощью *p.G12C* (ThermoFisher Scientific). Клон H10 определяли как гомозиготный по аллелю *KRAS p.G12C*, идентифицировали как CT-26 *KRAS p.G12C*-H10 и обозначали как CT-26 *KRAS p.G12C*. Все линии клеток культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1x

пенициллин/стрептомицин/L-глутамин при 37°C, 5% CO_2 в увлажненном инкубаторе.

Рентгеновская кристаллография

Очищенный немеченный $KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$ ("KRAS") в 20 мМ HEPES, pH 7,5, 150 мМ NaCl концентрировали до 40 мг/мл и добавляли к двукратному молярному избытку твердого соединения AMG 510, растворенного в DMSO. Образец белкового комплекса помещали на орбитальный шейкер при к. т. на 16 часов, а затем подвергали центрифужной фильтрации. Сокристаллизацию проводили с использованием способа диффузии паров в сидячей капле. Смешивали образец белкового комплекса "KRAS"-AMG 510 и буфер для кристаллизации (1 мМ $MgCl_2$, 0,1 М MES, pH 6,5, 30% вес./об. полиэтиленгликоля 4000). Сплюснутые стержневидные кристаллы появлялись за одни сутки при 20°C.

Кристалл уравновешивали в буфере для кристаллизации в качестве криопротектора перед замораживанием в жидком азоте. Набор данных собирали на кремниевом пиксельном детекторе Pilatus 6M в Advanced Light Source Beamline 5.0.1 при длине волны 0,97741 Å и температуре 100 К. Данные интегрировали и масштабировали с помощью HKL2000. Кристаллы принадлежат к орторомбической пространственной группе $P2_12_12_1$ с параметрами элементарной ячейки a=40,9 Å, b=58,4 Å, c=65,9 Å, α=90°, β=90°, γ=90° (см. дополнительную таблицу 2). Структуру определяли путем молекулярного замещения с использованием MolRep со структурой Apo KRAS в качестве модели поиска. В асимметричной единице содержится одна молекула белка. Структуру уточняли с использованием Refmac5, а построение модели производили с помощью графической программы Coot. Лиганд получали с использованием PRODRG. Структуру $KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$, связанную с GDP и AMG 510, уточняли до 1,65Å, при этом значение R-фактора составляло 18,1%, и R_{free} 21,5%. Статистические характеристики по карте Рамачандрана были на 98,2% благоприятными, 1,8% допустимыми, без каких-либо отклонений. Аминокислотные остатки 105-107 были неразрешенными в кристаллической структуре. Атомные координаты и структурные факторы будут помещены в банк данных белков (ID-код PDB: еще не присвоен).

Анализ обмена связанных нуклеотидов.

Ингибирование активности катализируемого SOS1 обмена нуклеотидов $KRAS^{G12C/C118A}$ или $KRAS^{C118A}$ измеряли с использованием технологии Alpha (гомогенного анализа усиления люминесценции при сближении). 20 нМ связанного с GDP человеческого белка $KRAS^{G12C/C118A}$ или $KRAS^{C118A}$ инкубировали с двукратным серийно разбавленным AMG 510 или DMSO в течение 5 минут при комнатной температуре (к. т.) в реакционном буфере (25 мМ HEPES, pH 7,4; 10 мМ $MgCl_2$; 0,01% Triton X-100). Для всех последующих стадий к реакционному буферу добавляли DTT до конечной концентрации 1 мМ. Затем GTP и SOS-1 добавляли в реакционный буфер с DTT при конечных концентрациях 1,25 мМ или 500 нМ соответственно и инкубировали при к. т. в течение 30 минут. Наконец, добавляли c-RAF RBD (конечная концентрация 50 нМ), донорные гранулы глутатиона Alpha (PerkinElmer; конечная концентрация 20 мкг/мл) и акцепторные

гранулы хелата никеля AlphaLISA® (PerkinElmer; конечная концентрация 20 мкг/мл), все разбавленные в реакционном буфере с DTT. Реакционную смесь инкубировали при к. т. в течение 5 мин., а затем планшеты считывали на EnVision® Multilabel Reader с использованием протокола AlphaScreen. Сигнал люминесценции измеряли при 570 нм через 180 мс после возбуждения при 680 нм. Интенсивность сигнала соответствовала ассоциации c-RAF RBD с $KRAS^{G12C/C118A}$ или $KRAS^{C118A}$ связанным с GTP и была нормализована к контролю DMSO.

Анализы фосфорилирования ERK1/2

Для клеточных анализов высевали по 2,5E+04 клеток на лунку в 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 на протяжении ночи. На следующий день к клеткам добавляли 3-кратно серийно разбавленное соединение или DMSO и планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 2 часов. После обработки клетки промывали ледяным PBS и лизировали в буфере для лизиса RIPA (50 мМ трис-HCl, pH 7,5; 1% Igepal; 0,5% дезоксихолата натрия; 150 мМ NaCl; 0,1% додецилсульфата натрия), содержащем протеазу и ингибиторы фосфатазы. Уровни базисного фосфорилирования ERK1/2 измеряли в обработанных клеточных лизатах с использованием наборов Phospho-ERK1/2 Whole Cell Lysate (Meso Scale Discovery) в соответствии с протоколом изготовителя. Интенсивность сигнала соответствовала уровням фосфо-ERK1/2 и была нормализована к контролю DMSO.

Для лизатов опухолевых клеток из фармакодинамических анализов in vivo 50 мкг общего белка на образец анализировали с использованием наборов Phospho-ERK1/2 and Total ERK1/2 Whole Cell Lysate (Meso Scale Discovery) в соответствии с протоколом изготовителя. Сигнал фосфо-ERK1/2 нормализовали по сигналу общего ERK1/2 для данного образца и рассчитывали % ингибирования фосфорилирования ERK относительно обрабатываемой средой-носителем группы.

Анализы жизнеспособности клеток

Для анализа жизнеспособности адгерентных клеток высевали по 0,5-1,0E+03 клеток на лунку в 384-луночные планшеты (или по 2,5-4,0E+04 клеток на лунку в 96-луночные планшеты) и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 на протяжении ночи. На следующий день к клеткам добавляли серийно разбавленное соединение или DMSO и планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 72 часов. Жизнеспособность клеток измеряли с использованием набора Luminescent Cell Viability Assay CellTiter-Glo® (Promega) в соответствии с протоколом изготовителя. Сигнал люминесценции обработанных образцов нормализовали по контролю DMSO.

Для анализов жизнеспособности сфероидных клеток высевали по 2,5-4,0E+04 клеток на лунку в 96-луночные микропланшеты для сфероидной культуры и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 24 часов. Применяли ту же процедуру, что и описанная выше, за исключением того, что жизнеспособность измеряли с использованием набора CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega) в соответствии с протоколом изготовителя.

Исследования синергетической комбинации

Комбинированные эксперименты для оценки синергетических взаимодействий AMG 510 с другими ингибиторами in vitro проводили как описано ранее (Saiki, A. Y. *et al.* MDM2 antagonists synergize broadly and robustly with compounds targeting fundamental oncogenic signaling pathways. *Oncotarget* **5**, 2030-2043, doi:10,18632/oncotarget,1918 (2014)).

Кинетические анализы

Образование ковалентных аддуктов ингибитор-$KRAS^{G12C}$ измеряли с использованием MS как описано ранее[44]. Значения относительного % связывания для различных концентраций ингибитора при разном времени инкубации подгоняли к экспоненциальному уравнению с получением значений k_{obs} для каждой тестируемой концентрации с использованием Prism (программное обеспечение GraphPad). Затем полученные значения k_{obs} пересчитывали в зависимости от концентрации ингибитора с получением значений k_{inact} и K_i .

Для определения кинетических значений образования ковалентного аддукта ингибитор-$KRAS^{G12C}$ в клетках измеряли уровни базисного фосфорилирования ERK1/2 после обработки различными концентрациями ингибитора при разном времени инкубации точно так, как описано выше, и значения % активности использовали для кинетических расчетов.

Цистеиновый протеомный анализ

Клетки NCI-H358 немелкоклеточного рака легкого человека высевали при 2,0E+06 клеток/10 см планшет и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 на протяжении ночи. На следующий день клетки обрабатывали с помощью 1 мкМ AMG 510 или DMSO (n=5) и инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 4 часов. После обработки клетки промывали ледяным PBS, содержащим ингибиторы протеаз, а затем удаляли из планшетов. Осадки мгновенно замороженных клеток обрабатывали в IQ Proteomics, LLC с помощью масс-спектрометрии (MS) в соответствии с их протоколом, описанным Patricelli et al. Вкратце, осадок клеток лизировали и обрабатывали 100 мкМ дестиобиотинйодацетамидом для мечения оставшихся непрореагировавших цистеинов, подвергшихся воздействию растворителя. После расщепления трипсином смесь пептидов, полученную из каждого образца, метили реагентами изобарической метки TMT-10 plex (Tandem Mass Tag) (ThermoFisher Scientific). После мечения образцы смешивали перед обогащением дестиобиотинилированными пептидами с использованием стрептавидин-агарозы высокой емкости. Обогащенные пептиды анализировали с помощью нано-LC-MS с использованием трехчасового градиента и способа MS3 на основе синхронного выбора предшественников (SPS) на масс-спектрометре Orbitrap Lumos (ThermoFisher Scientific). Идентификацию дестиобиотинилированных пептидов осуществляли путем поиска в базе данных с помощью специализированного информационного конвейера, разработанного в лаборатории Gygi в Гарвардской медицинской школе, который использует SEQUEST. Все спектры сравнивали с базой данных последовательностей белков Human Uniprot (2018), к которой была добавлена последовательность мутантного белка $KRAS^{G12C}$ и общие

контаминанты. Пептиды и белки фильтровали до 1% доли ложноположительных результатов (FDR) и только те пептиды, которые соответствовали критерию минимального отношения сигнала к шуму 200 и чистоты выделения более 50%, использовали для количественного анализа. Всю обработку данных для статистического анализа проводили в Microsoft Excel с использованием нормализованных пиковых количественных показателей цистеинсодержащих пептидов. Log_2-кратные изменения рассчитывали между образцами групп, получающих контроль DMSO, и групп, обработанных с помощью AMG 510. Проводили двусторонний t-тест для каждого пептида для оценивания статистической значимости разницы между образцами групп, подвергающихся обработке, и групп с получением контроля DMSO, при условии равной дисперсии. Строили диаграмму volcano, показывающую отрицательные P-значения log_{10}, нанесенные напротив log_2-кратных изменений для каждого дестиобиотинилированного цистеинсодержащего пептида. Пептиды, которые демонстрировали снижение количественных показателей в log_2 раза больше 2 и P-значение меньше 0,0001, обозначали как ковалентные мишени для AMG 510 (n=5 биологических повторностей).

Исследования на животных

Все экспериментальные процедуры на животных проводили в соответствии с рекомендациями Комитета по уходу и использованию животных Amgen и Ассоциации по оцениванию и аккредитации стандартов ухода за лабораторными животными. Во всех исследованиях использовали самок бестимусных голых мышей или самок Balb/c возрастом от 4 до 7 недель (Charles River Laboratories). Бестимусных голых мышей содержали по пять на каждую клетку с фильтром в стерильном помещении, а мышей Balb/c содержали по пять в клетке с фильтром в нестерильном помещении в комнате с контролируемой средой (температура 23 ± 2°C, относительная влажность 50 ± 20%) при 12-часовом цикле свет/темнота. Мышей кормили коммерческим кормом для грызунов.

Анализ экспрессии гена

Общую РНК очищали с помощью наборов RNeasy Mini (QIAGEN) из опухолей CT-26 *KRAS p.G12C* с обработкой средой-носителем перорально, AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) или MEKi перорально (PD-0325901, 10 мг/кг QD) в течение двух дней (n=5/группа). Определяли количество РНК с помощью DropSense 96 (PerkinElmer Inc). 300 нг РНК анализировали на nCounter™ (NanoString Technologies) с панелью иммунного профилирования в отношении всех видов рака мыши, содержащей 750 генов-мишеней, 20 генов домашнего хозяйства, 8 внутренних отрицательных контролей и 6 внутренних положительных контролей. Необработанные данные проверяли на качество, нормализовали и анализировали с помощью программного обеспечения nSolver (NanoString Technologies). Необработанные данные преобразовывали в log_2 и выполняли статистические анализы. Баллы пути (балл интерферона, балл процессирования антигена, балл MHC, балл TLR и балл функции Т-клеток) и баллы профилирования клеток (балл NK-клеток, балл цитотоксических клеток и балл CD45) получали с помощью nSolver Advanced Analysis (NanoString Technologies).

См. дополнительную таблицу 3A, таблицу 3B, таблицу 3C, таблицу 3D и таблицу 3E для получения подробного перечня генов, включенных в каждый балл, и p-значений, используемых для расчета баллов пути и профилирования клеток.

Фармакодинамический анализ опухоли

Эффект AMG 510 в отношении фосфорилирования ERK1/2 оценивали на несущих опухоль MIA PaCa-2 T2, NCI-H358 и CT-26 *KRAS p.G12C* мышах. Опухолевые клетки MIA PaCa-2 T2 или NCI-H358 (5,0E+06 клеток) вводили посредством подкожной инъекции в бок самок бестимусных голых мышей в соотношении клеток к матригелю 2:1 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Калифорния). Мышам вводили однократную пероральную дозу либо среды-носителя, либо AMG 510 (0,3, 1, 3, 10, 30 и 100 мг/кг), когда средний размер опухоли достигал ~300-600 мм^3 (n=3/группа), и собирали через 2 часа. Однократную пероральную дозу AMG 510 (10 мг/кг) использовали для исследований временной динамики. Самкам мышей Balb/c вводили посредством подкожной инъекции клеток опухоли CT-26 *KRAS p.G12C* (3,0E+05 клеток). Мышей рандомизировали на группы (n=3/группа), когда средний объем опухоли составлял 486 мм^3, вводили однократную пероральную дозу либо среды-носителя, либо AMG 510 (3, 10, 30 или 100 мг/кг), либо MEKi (PD-0325901, 10 мг/кг) и собирали через 2 часа. Во всех исследованиях анализировали плазму крови и опухоль для определения концентраций тестируемого изделия. Образцы опухолей также собирали в указанные моменты времени, мгновенно замораживали в жидком азоте и обрабатывали для биоанализа или измельчали с использованием cryoPREP® Dry Impactor (Covaris). Измельченные образцы ресуспендировали в буфере для лизиса RIPA, содержащем ингибиторы протеазы и фосфатазы, и гомогенизировали. Затем очищенные лизаты анализировали в отношении уровней фосфорилирования ERK1/2, как описано выше, и в отношении ковалентной модификации KRAS^{G12C} с помощью MS.

Ксенотрансплантат и сингенные исследования

Клетки MIA PaCa-2 T2, NCI-H358 или SW480-1AC (5,0E+06 клеток с матригелем в соотношении 2:1) вводили посредством подкожной инъекции в бок самок бестимусных голых мышей (n=10/группа). Лечение начинали, когда опухоли были установлены и составляли приблизительно 170 мм^3 для исследований MIA PaCa-2 T2 и NCI-H358 или приблизительно 200 мм^3 для модели SW480-1AC. В исследованиях зависимости ответа от дозы мыши получали либо среду-носитель перорально (QD), либо AMG 510 перорально (3, 10, 30 и 100 мг/кг QD). В исследовании комбинации NCI-H358 с AMG 510 и карбоплатином мышей рандомизировали на 8 групп (n=10/группа) и вводили одно из среды-носителя перорально (QD) + PBS внутрибрюшинно (1x/неделя); AMG 510 перорально (10 или 30 мг/кг QD) + PBS внутрибрюшинно (1x/неделя); среды-носителя перорально (QD) + карбоплатин (50 или 100 мг/кг) внутрибрюшинно (1x/неделя); AMG 510 перорально (10 или 30 мг/кг QD) + карбоплатин (50 или 100 мг/кг) внутрибрюшинно (1x/неделя). Для исследования комбинации с AMG 510 и MEKi мышей рандомизировали на 4 группы n=10/группа и вводили одно из среды-носителя перорально (QD); AMG 510

перорально (10 мг/кг QD); MEKi перорально (1 мг/кг QD); AMG 510 перорально (10 мг/кг QD) + MEKi перорально (1 мг/кг QD). Для сингенных исследований клетки CT-26 *KRAS p.G12C* (3,0E+05 клеток) вводили посредством подкожной инъекции в бок самкам мышей Balb/c. Лечение начинали, когда опухоли устанавливались и составляли приблизительно 170 мм^3 для исследований зависимости ответа от дозы и приблизительно 130 мм^3 для исследования комбинации, *n*=10/группа; за исключением исследования зависимости ответа от дозы MEKi, где *n*=8/группа. В исследованиях зависимости ответа от дозы мыши получали либо среду-носитель перорально (QD), AMG 510 перорально (3, 10, 30 и 100 мг/кг QD), либо MEKi (PD-0325901) перорально (1, 3 или 10 мг/кг QD). В исследовании комбинации мышей рандомизировали на 4 групп *n*=10/группа и вводили одно из среды-носителя перорально (QD) + PBS внутрибрюшинно (Q3Dx3); AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) + PBS внутрибрюшинно (Q3Dx3); среды-носителя перорально (QD) + антитело к PD-1 (29F,1A12; 100 мкг/доза, Q3Dx3) внутрибрюшинно; AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) + антитело к PD-1 (29F,1A12; 100 мкг/доза, Q3Dx3) внутрибрюшинно с 15 дня до 43 дня. Исследования комбинированного лечения проводили в слепом режиме. Размеры опухоли оценивали два раза в неделю с помощью электронного цифрового штангенциркуля Pro-Max (Japan Micrometer Mfg. Co. LTD), объем опухоли вычисляли с использованием формулы: длина x ширина x высота, и выражали в мм^3. На моделях PDX *KRAS p.G12C* легкого мышам подкожно имплантировали фрагменты опухоли размером ~70 мг. Мышей рандомизировали, когда объемы опухоли составляли приблизительно 160-200 мм^3, и вводили либо среду-носитель перорально (QD), либо AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) через день после рандомизации. Размеры опухоли снимали два раза в неделю с использованием формулы: ширина^2 x длина x 0,52 и выражали в мм^3. Данные выражены как среднее значение ± SEM.

Выявление конъюгата AMG 510-KRAS^{G12C}

Антитело к RAS человека (антитело к RAS) приобретали у компании Abcam и биотинилировали с помощью EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (ThermoFisher Scientific) с использованием протокола, описанного изготовителем. Остаточный биотин удаляли, полученное антитело к RAS с биотином загружали в гранулы Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (ThermoFisher Scientific) в соотношении 1:1 на один час при к. т. со встряхиванием. Лизаты из обработанных in vitro клеток или обработанных in vivo клеток опухоли, описанных ранее, инкубировали с гранулами биотинилированного антитела к RAS в течение 3 часов при к. т. со встряхиванием. Гранулы промывали с помощью PBST (3x) с использованием магнита, затем с помощью PBS (1x), а потом с помощью воды (1x). Образцы элюировали из гранул с использованием 2% водной муравьиной кислоты/10% водного ацетонитрила, а затем инкубировали при к. т. со встряхиванием в течение 10 минут. Супернатант переносили в 96-луночный планшет и высушивали. Образцы ресуспендировали в буфере для денатурации (10 мМ TCEP, 8 М мочевина) и инкубировали при 65°C со встряхиванием в течение 15 минут. Добавляли йодацетамид (40 мМ) и инкубировали при 37°C в течение 30 минут, защищая от света. Добавляли 50 мМ

NH_4HCO_3 и трипсин (0,01 мкг/мкл) и образцы расщепляли в течение ночи при 37°C в течение ~16-20 часов, затем окончательно гасили муравьиной кислотой с получением конечной концентрации 1% (об.:об.). Затем образцы анализировали с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) с применением мониторинга множественных реакций (MRM) в режиме положительной ионизации с использованием 6500 QTRAP (AB SCIEX), соединенного с Acquity UPLC (Waters). Образцы вводили в колонку Acquity UPLC BEH C8 1,7*мк*м, 2,1×100 мм (Waters). Подвижные фазы состояли из подвижной фазы A (вода+0,1% муравьиная кислота) и подвижной фазы B (ацетонитрил+0,1% муравьиная кислота). Градиент LC представлял собой 5-50% B за 5 минут, 50-95% B за 0,5 минуты и 95% B за 1 минуту. Осуществляли мониторинг следующих пептидов $KRAS^{G12C}$ LVVVGAC(CAM)GVGK (529,8 □ 846,3) и модифицированного AMG 510 $KRAS^{G12C}$ AMG 510-LVVVGAC(CAM)GVGK (521,4 □ 675,2). Занятость вычисляли как процент модифицированного AMG 510 пептида $KRAS^{G12C}$, нормализованного по сумме немодифицированного и модифицированного пептида $KRAS^{G12C}$.

Проточная цитометрия

Для анализа in vitro эффекта AMG 510 в отношении экспрессии антигена MHC класса I высевали клетки CT-26 *KRAS p.G12C* (5,0E+04 клеток/лунка) в 96-луночный планшет и обрабатывали трехкратным серийным разведением AMG 510 в отсутствие или в присутствии IFNγ при конечной концентрации 25 или 250 пг/мл. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO_2 в течение 24 часов. Клетки без помощи фермента отсоединяли от лунок, промывали буфером для окрашивания (PBS/0,5% BSA), а затем инкубировали с PE-конъюгированными антителами $H\text{-}2D^d$, $H\text{-}2K^d$ или $H\text{-}2L^d$ (BioLegend) в течение 30 минут на льду. После промывки клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания, содержащем SYTOX Blue Dead Cell Stain (Life Technologies), а затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Сбор данных и анализ осуществляли на проточном цитометре BD LSRFortessa с использованием программного обеспечения BD FACSDiva.

Для исследований in vivo клетки CT-26 *KRAS p.G12C* имплантировали самкам мышей Balb/c возрастом приблизительно 6 недель. В день 22 после имплантации мышей рандомизировали в получающую четырехдневное введение дозы когорту, состоящую из 5 групп по *n*=8/группа, получавших одно из среды-носителя перорально (QD) + PBS внутрибрюшинно (Q3Dx2); AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) + PBS внутрибрюшинно (Q3Dx2); среды-носителя перорально (QD) + антитело к PD-1 (29F,1A12; 100 мкг/доза, Q3Dx2) внутрибрюшинно; AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) + антитело к PD-1 (29F,1A12; 100 мкг/доза, Q3Dx2) внутрибрюшинно или MEKi перорально (10 мг/кг, QD) + PBS внутрибрюшинно (Q3Dx2) в течение 4 дней. После четырех дней введения дозы опухоли собирали и отделяли от окружающей фасции, взвешивали, механически измельчали помещали в Liberase TL (0,2 мг/мл, Roche) и ДНКазу I (20 мкг/мл, Ambion). Затем находящиеся в растворе опухоли механически гомогенизировали с использованием

мягкого диссоциатора MACS (Miltenyi Biotech) и инкубировали при 37°C в течение 15 минут на встряхивателе пробирок MACSmix (Miltenyi Biotech). Затем клетки обрабатывали с помощью 0,02% EDTA (Sigma) и термоинактивированным FBS (ThermoFisher Scientific) и пропускали через фильтр с размером пор 70 мкм для удаления комков. Затем клетки центрифугировали, супернатант удаляли, а клеточный осадок затем ресуспендировали в LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain (ThermoFisher Scientific) в течение 30 минут. Затем проводили окрашивание клеточной поверхности указанными антителами (дополнительная таблица 4) перед фиксацией и пермеабилизацией клеток (Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, eBiosciences) для внутриклеточного окрашивания. Добавляли CountBright™ Absolute Counting Beads (ThermoFisher Scientific) в каждую лунку для образцов, чтобы обеспечить подсчет клеток перед анализом на проточном цитометре LSR II (BD Biosciences). Все анализы проводили с помощью программного обеспечения FlowJo v10 (FlowJo). Абсолютное количество клеток определяли путем нормализации количества клеток к зарегистрированным гранулам, деленного на объем проанализированной аликвоты опухоли и массу опухоли.

Иммуноферментные спот-анализы (ELISpot)

Антигенспецифический Т-клеточный ответ оценивали с использованием анализа ELISpot IFN-γ (Cellular Technology Ltd.). Спленоциты собирали (n=4-5/группа) и использовали в анализе ELISpot цельных клеток. Вкратце, 2,5E+05 спленоцитов смешивали с 2,5E+04 опухолевыми клетками CT-26, CT-26 *KRAS p.G12C* или 4T1 и инкубировали при 37°C в течение 20 часов. Использовали анализатор CTLS6 Fluorospot (Cellular Technology Ltd.) для подсчета пятен.

Статистический анализ

Фармакодинамические эксперименты анализировали с помощью однофакторного ANOVA с последующим апостериорным критерием Даннета. Для исследований эффективности проводили дисперсионный анализ повторных измерений (RMANOVA) с последующим апостериорным критерием Даннетта с использованием GraphPad Prism 7.04. Регрессионный анализ проводили с помощью парного t-критерия. Статистический анализ выживаемости определяли с помощью оценки Каплана-Мейера с логарифмическим рангом Мантела-Кокса для сравнения кривых с использованием GraphPad Prism 7.04. Данные проточной цитометрии анализировали с помощью двухфакторного ANOVA для множественных сравнений с последующим апостериорным тестом Тьюки. Данные NanoString анализировали с помощью однофакторного ANOVA для множественных сравнений с последующим апостериорным тестом Тьюки. Сравнение данных ELISpot проводили с помощью непарного t-критерия с использованием GraphPad Prism.

Биоаналитические способы LC-MS/MS для AMG 510

Гомогенаты опухолевой ткани получали путем добавления воды к ткани (4:1 мл:г) с использованием гранул из карбида вольфрама в TissueLyzer (Qiagen). К 20 мкл образца (гомогената плазмы крови или опухолевой ткани) добавляли 100 мкл ацетонитрила, содержащего IS (200 нг/мл толбутамида), образец перемешивали на вортексе в течение 10

мин., центрифугировали при 3500 g в течение 10 мин. и собирали 90 мкл супернатанта. К собранному супернатанту добавляли 100 мкл воды (содержащей 0,1% муравьиной кислоты) и 5 мкл полученного раствора вводили в систему LC-MS/MS. Хроматографического разделения достигали с использованием Phenomenex Kinetex C18 50×2,1 мм, 2,7 мкм, поддерживаемого при 50°C, с использованием 0,1% муравьиной кислоты в H_2O (подвижная фаза A) и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (подвижная фаза B). Градиент хроматографии был следующим: изократический от 0 мин. до 0,1 мин. с 10% подвижной фазы B, линейное увеличение от 0,1 до 0,85 мин. до 95% подвижной фазы B, изократическая задержка от 0,85 до 1,10 мин. с 95% подвижной фазы B, линейное уменьшение от 1,10 до 1,11 мин. до 10% подвижной фазы B, изократическая задержка от 1,11 до 1,40 мин. с 10% подвижной фазы B. Для анализа обычно использовали масс-спектрометр API 4000 и запускали в режиме определения положительных ионов ESI после MS/MS перехода 561,179 > 134,100 (AMG 510) и 271,100 > 134,100 (толбутамид). Площади пиков интегрировали с помощью Analyst® (Sciex). После интегрирования площадей пиков данные экспортировали в Watson LIMS™ (ThermoFisher Scientific) и концентрации определяли с помощью взвешенной ($1/x^2$) линейной регрессии соотношений площадей пиков (площадь пика AMG 510/площадь пика IS) по сравнению с номинальными концентрациями калибровочных стандартов плазмы крови. Диапазон калибровки для AMG 510 в плазме крови составлял от 1,0 до 10000 нг/мл (LLOQ 1,0 нг/мл). Диапазон калибровки для AMG 510 в гомогенате опухолевой ткани составлял от 5,0 до 50000 нг/мл (LLOQ 5,0 нг/мл).

Мечение стабильного изотопа аминокислотами в культуре клеток (SILAC)

Легкую среду (LM) получали путем добавления следующих компонентов до конечного объема 1 л: 100 мл диализированного FBS, 10,4 г порошкообразной среды RPMI-1640, 2 г бикарбоната натрия, 200 мг L-аргинина, 48 мг L-лизина, 100 мг L-лейцина и 1x Pen-Strep, которые фильтровали с помощью системы фильтра с размером пор 0,22 мкм. Тяжелую среду (HM) получалитак же, как LM, но 100 мг [$^{13}C_6$]-L-лейцина (Cambridge Isotope Laboratories) заменяли необогащенным изотопом L-лейцином. Клетки MIA PaCa-2 и NCI-H358 высевали (3E+05 клеток) в колбы T75 с LM, LM меняли ежедневно. Через 48 часов клетки промывали с помощью 1x PBS и среду заменяли на HM, HM меняли ежедневно в течение 4 дней. В день 6 клетки промывали с помощью 1x PBS и среду заменяли на LM, LM меняли ежедневно. Начиная со дня 6 образцы MIA PaCa-2 собирали через 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 48 и 72 часа. Начиная со дня 6 образцы NCI-H358 собирали через 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 и 96 часов. Отдельные колбы T75, полученные в трех повторностях, собирали в каждый момент времени и обрабатывали для получения лизатов.

Сбор образца SILAC и получение белка лизата

Колбы T75 промывали с помощью 1x PBS, обрабатывали трипсином и инкубировали в течение 2 мин. с последующим добавлением ледяного PBS, содержащего 10% диализированного FBS. Клетки хорошо перемешивали и собирали с последующим

подсчетом клеток с использованием Vi-CELL XR. Оставшиеся клетки центрифугировали и промывали ледяным PBS (без Mg^{+2}, без Ca^{+2}). Клетки снова центрифугировали, PBS удаляли и клетки лизировали в небольшом объеме ледяного RIPA, содержащего ингибиторы фосфатазы (PhosSTOP, Roche) и протеазы (полностью без EDTA, Roche). Полученные лизаты перемешивали на вортексе, помещали на лед на 10 минут, центрифугировали для удаления нерастворимого дебриса, а затем хранили при -80°C до дальнейшей обработки.

Определение целевого периода полувыведения $KRAS^{G12C}$ с помощью SILAC

Антитело к RAS человека (антитело к RAS) приобретали у компании Abcam и биотинилировали с помощью EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (ThermoFisher Scientific) с использованием протокола, описанного изготовителем. Остаточный биотин удаляли, полученное антитело к RAS с биотином загружали в гранулы Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (ThermoFisher Scientific) в течение 1,5 ч. при к. т. со встряхиванием. Клеточный лизат (описанный выше) инкубировали с гранулами биотинилированного антитела к RAS в течение 2 часов при к. т. со встряхиванием. Гранулы промывали с помощью PBST (3x) с использованием магнита, затем с помощью PBS (1x). Образцы элюировали из гранул с использованием 3% водной муравьиной кислоты/30% водного ACN с последующей инкубацией при к. т. со встряхиванием в течение 10 мин. Супернатанты переносили в 96-луночный планшет и высушивали. Образцы ресуспендировали в буфере для денатурации (10 мМ TCEP, 8 М мочевина) и инкубировали при 37ºC в течение 1 ч. с использованием водяной бани. Добавляли йодацетамид (40 мМ) и инкубировали при 25ºC в течение 1 ч., защищая от света. Добавляли 50 мМ NH_4HCO_3 и трипсин (0,1 мкг/мкл) и образцы расщепляли при 37ºC в течение 24 часов, затем окончательно гасили муравьиной кислотой с получением конечной концентрации 1% (об.:об.). Образцы концентрировали до приблизительно 80 мкл перед анализом с помощью масс-спектрометрии. Образцы анализировали с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) с применением мониторинга множественных реакций (MRM) в режиме положительной ионизации с использованием 6500 QTRAP (AB SCIEX), соединенного с Acquity UPLC (Waters). Образцы вводили в колонку Acquity UPLC BEH C8 1,7*мк*м, 2,1×100 мм (Waters). Подвижные фазы состояли из подвижной фазы A (вода+0,1% муравьиная кислота) и подвижной фазы B (ацетонитрил+0,1% муравьиная кислота). Градиент LC представлял собой 5-50% B за 5 минут, 50-95% B за 0,5 минуты и 95% B за 1 минуту. Следующие пептиды для $KRAS^{G12C}$ (LVVVGAC(CAM)GVGK (529,8 □ 846,3) и 13C-LVVVGAC(CAM)GVGK (532,8 → 846,3)) и RAS WT (LVVVGAGGVGK (478,3 □ 743,2) и 13C-LVVVGAGGVGK (481,3 → 743,2)) использовали для мониторинга перехода от мечения тяжелыми изотопами к мечению легкими изотопами. Относительный изотопный состав (RIA) определяли с использованием следующей формулы:

$$\mathrm{RIA} = \frac{\mathrm{A_{heavy}}}{\mathrm{A_{light} + A_{heavy}}}$$

Определение с помощью SILAC периода полувыведения $KRAS^{G12C}$

Чтобы учесть влияние роста клеток на определение периода полувыведения белка, количество клеток и данные RIA, связанные с каждым моментом времени, одновременно подгоняли к серии уравнений для определения периода полувыведения $KRAS^{G12C}$ в клетках MIA PaCa-2 и NCI-H358. Использовали следующие уравнения:

Уравнение первого порядка для пептида тяжелой цепи:

$$\frac{\mathrm{d\,Hv}}{\mathrm{dt}} = -\mathrm{k_{dec}\,Hv}$$

Уравнение первого порядка для пептида легкой цепи:

$$\frac{\mathrm{d\,lt}}{\mathrm{dt}} = \mathrm{k_{dec}\,(Hv_0 + lt_0) - k_{dec}\,lt} + \frac{\mathrm{клетка_{new}}}{\mathrm{клетка_{(0)}}}\mathrm{(Hv_0 + lt_0)\,k_{dec} - k_{dec}}\,\frac{\mathrm{клетка_{new}}}{\mathrm{клетка_{(0)}}}\,\mathrm{lt}$$

Уравнение первого порядка для роста клеток:

$$\frac{\mathrm{d\,клетка_{new}}}{\mathrm{dt}} = -\mathrm{k_{dil}\,(клетка_{(0)} + клетка_{new})}$$

Дополнительные уравнения:

$$\mathrm{k_{syn} = k_{dec}(Hv_0 + lt_0)}$$

$$\text{Период полувыведения} = \frac{0{,}693}{\mathrm{k_{dec}}}$$

Время 0 определяется как время, когда HM изменяли на LM, Hv представляет собой концентрацию пептида тяжелой цепи, lt представляет собой концентрацию пептида легкой цепи, $клетка_{new}$ представляет собой число новых клеток, k_{dec} представляет собой константу скорости первого порядка для разложения, k_{syn} представляет собой константу скорости нулевого порядка для синтеза, k_{dil} представляет собой константу скорости первого порядка для роста клеток, $клетка_{(0)}$ представляет собой число клеток в момент времени 0, $Hv_{(0)}$ представляет собой концентрацию пептида тяжелой цепи в момент времени 0, $lt_{(0)}$ представляет собой концентрацию пептида легкой цепи в момент времени 0. Использовали ступенчатый подход для моделирования, при этом на первой стадии k_{dil} оценивали по числу клеток, а на второй стадии k_{dec} оценивали с использованием приведенных выше уравнений.

k_{dil} оценивали путем количественного определения числа клеток после замены на LM и применения следующего уравнения: $A = A_0 e^{-k_{dil}\,t}$, где A и A_0 представляют собой число клеток в момент времени t и 0 соответственно.

Дополнительная таблица 1. Данные клеточного анализа

Мутация	**Линия клеток**	**Ткань происхождения**	**IC_{50} базисного p-ERK1/2 (мкМ)**	**Жизнеспособность клеток IC_{50} (мкМ)**	**Жизнеспособность сфероидных клеток IC_{50} (мкМ)**
KRAS p.G12C гомозиготная	MIA PaCa-2	Поджелудочная железа	0,036 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,001 ± 0,001
	NCI-H1373	Легкое	0,010 ± 0,0001	0,020 ± 0,006	0,005 ± 0,002
	NCI-H2030	Легкое	0,040 ± 0,020	0,006 ± 0,003	ND
	NCI-H2122	Легкое	0,123 ± 0,006	0,032 ± 0,005	0,009 ± 0,002
	SW1463	Толстый кишечник	0,033 ± 0,004	0,015 ± 0,007	ND
	SW1573	Легкое	0,027 ± 0,001	> 7,5	> 10
	UM-UC-3	Мочевой пузырь	0,029 ± 0,016	0,005 ± 0,001	ND
KRAS p.G12C гетерозиготная	Calu-1	Легкое	0,013 ± 0,004	0,004 ± 0,001	ND
	NCI-H1792	Легкое	0,045 ± 0,023	0,011 ± 0,008	ND
	NCI-H23	Легкое	0,090 ± 0,017	0,006 ± 0,001	ND
	NCI-H358	Легкое	0,035 ± 0,003	0,004 ± 0,001	0,003 ± 0,002
	SW837	Толстый кишечник	0,018 ± 0,002	0,009 ± 0,006	ND
KRAS p.G12D гомозиготная	AsPC-1	Поджелудочная железа	> 10	> 7,5	ND
KRAS	A-427	Легкое	> 10	> 7,5	ND

p.G12D гетерозиготная	LS 174T	Толстый кишечник	> 10	> 7,5	ND
KRAS p.G12V гомозиготная	SW480	Толстый кишечник	> 10	> 7,5	ND
KRAS p.G12S гомозиготная	A549	Легкое	> 10	> 7,5	ND
KRAS p.G13C гетерозиготная	NCI-H1355	Легкое	> 10	> 7,5	ND
KRAS WT *EGFR p.E746_A750del*	HCC-827	Легкое	> 10	> 7,5	ND
KRAS WT Слияние *EML4-ALK*	NCI-H1322	Легкое	> 10	> 7,5	ND
KRAS WT Слияние *TPM3-NTRK*	KM12	Толстый кишечник	> 10	> 7,5	ND
KRAS WT *BRAF p.V600E*	COLO-205	Толстый кишечник	> 10	> 7,5	ND

Пояснения мутаций получали из Каталога соматических мутаций при раке (COSMIC)[1] или Misale et al. 2019[2]. Средние значения IC_{50} для анализов базисного фосфорилирования ERK1/2 и жизнеспособности клеток получали по меньшей мере в n=2 экспериментах. ND=не определено.

Дополнительная таблица 2. Сбор данных и уточнение статистических

характеристик (молекулярного замещения)

	$KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$ AMG 510	
Сбор данных		
Пространственная группа	P 21 21 21	
Клеточные размеры□□		
a, *b*, *c* (Å)	40,87, 58,42, 65,89	
□□□□α□□β□□γ□ (°)	90, 90, 90	
Разрешение (Å)	30,0-1,65 (1,71-1,65)	
R_{sym}	0,162 (0,521)	
$I/\sigma I$	6,9 (2,5)	
Завершенность (%)	97,0 (96,3)	
Избыточность	4,4 (4,2)	
Уточнение		
Разрешение (Å)	30,00-1,65	
Число отражений	18077	
R_{work}/R_{free}	0,1809/0,2152	
Число атомов	1613	
Белок	1336	
Лиганд/ион	70	
Вода	207	
B-факторы	24,8	
Белок	24,3	
Лиганд/ион	24,1	
Вода	34,1	
Среднеквадратичные отклонения		
Длины связей (Å)	0,005	
Углы связей (°)	1,08	

Для этой структуры собирали один набор данных по кристаллу.

*Значения в скобках относятся к оболочке с самым высоким разрешением.

Дополнительная таблица 3. Анализ для оценки пути генной экспрессии

Дополнительная таблица 3A

Гены, участвующие в вычислении оценки функции T-	**P-значение**	**Гены, участвующие в вычислении оценки функции T-**	**P-значение**

клеток пути		клеток пути	
STAT1	1,72E-09	LCP1	1,20E-04
H2-T23	2,70E-09	IKZF2	1,46E-04
ADA	5,22E-09	SOCS1	1,63E-04
EGR1	7,09E-09	TCF7	2,02E-04
TGFB3	1,22E-08	CEBPB	2,26E-04
TLR6	1,24E-08	IL1R1	5,42E-04
ITGA1	1,40E-08	JAK3	6,60E-04
THY1	1,65E-08	PVRL2	6,90E-04
NFATC2	2,31E-08	CD1D1	8,57E-04
H2-AB1	3,62E-08	CD274	8,63E-04
H2-AA	4,93E-08	ICOS	9,52E-04
CTSH	5,80E-08	TNFSF13B	9,63E-04
CD48	6,78E-08	IL4RA	1,02E-03
ITGAL	6,82E-08	STAT4	1,07E-03
CD74	7,35E-08	FAS	1,09E-03
ITGAM	8,78E-08	LGALS3	1,18E-03
IL2RG	8,97E-08	IL13RA1	1,28E-03
H2-DMA	1,33E-07	IFNG	1,29E-03
CD83	1,41E-07	FASL	1,39E-03
TNFRSF14	1,48E-07	IRF4	1,47E-03
MAF	1,60E-07	TRAF6	1,63E-03
CD247	1,66E-07	CD2	1,65E-03
PTPRC	1,70E-07	TIGIT	1,65E-03
TAP1	2,32E-07	TLR4	1,69E-03
CD3G	2,80E-07	CD47	2,26E-03
MILL2	3,39E-07	VEGFA	2,31E-03
CD27	3,64E-07	PDCD1LG2	2,47E-03
LCK	4,04E-07	BCL6	2,48E-03
CD3E	4,62E-07	IL12RB1	3,49E-03
SPP1	5,19E-07	RORA	3,60E-03
IKZF1	5,24E-07	NFKB1	3,96E-03

CCR2	7,34E-07	CXCL12	4,63E-03
ZAP70	7,73E-07	RIPK2	4,83E-03
NFATC1	8,07E-07	GFI1	4,88E-03
LAG3	8,54E-07	IL15	5,01E-03
IRF1	8,95E-07	IL12B	5,09E-03
SYK	9,31E-07	IL2RA	5,56E-03
IRF8	1,17E-06	CD276	6,24E-03
PSMB10	1,17E-06	BTLA	6,27E-03
XCL1	1,36E-06	FOXP3	6,70E-03
PVR	1,54E-06	ANXA1	7,25E-03
CXCR3	1,54E-06	SOCS3	7,29E-03
CD3D	1,56E-06	CD40	7,52E-03
IL18R1	1,93E-06	CD80	1,21E-02
EOMES	1,95E-06	MAPK1	1,22E-02
PSEN2	2,40E-06	MAP3K7	1,43E-02
CCL5	3,67E-06	TRP53	1,46E-02
IFNAR1	3,85E-06	TRAF2	1,59E-02
JAK1	4,90E-06	IL12RB2	1,78E-02
CXCR4	4,94E-06	NOS2	1,79E-02
CARD11	6,83E-06	TGFB1	2,02E-02
ICAM1	6,84E-06	JAK2	2,46E-02
FCGR4	6,94E-06	SPN	2,48E-02
IL1B	7,10E-06	YY1	2,53E-02
CCL2	7,33E-06	STAT6	2,90E-02
CMA1	7,69E-06	CCL3	2,97E-02
H2-K1	9,48E-06	MAPK8	3,73E-02
VCAM1	1,03E-05	IL7R	5,28E-02
IL6ST	1,16E-05	TNFSF11	5,45E-02
BCL2	1,21E-05	CCND3	6,50E-02
ICOSL	1,35E-05	TNF	1,23E-01
TYK2	1,57E-05	CSF2	1,54E-01
ITGB2	1,62E-05	RELB	1,55E-01
CD86	1,68E-05	CCL11	1,73E-01

IL18RAP	1,72E-05	SELL	1,91E-01
CCR5	1,74E-05	ITGAX	2,11E-01
ITK	1,84E-05	CCR7	2,17E-01
ITCH	1,94E-05	TNFRSF4	2,31E-01
IL18	2,01E-05	RPS6	2,43E-01
CD8A	2,41E-05	HAVCR2	3,03E-01
REL	2,69E-05	TNFSF18	3,43E-01
CD8B1	3,06E-05	FLT3	3,64E-01
CD5	3,39E-05	GZMB	3,89E-01
H2-D1	3,80E-05	FUT7	4,36E-01
STAT5B	3,93E-05	IDO1	4,69E-01
PDCD1	5,10E-05	CASP3	4,78E-01
CCL7	5,31E-05	CCR6	5,02E-01
CREBBP	5,39E-05	TMED1	5,07E-01
H2-M3	5,67E-05	BCL10	5,21E-01
CD4	5,83E-05	CXCL13	6,89E-01
TBX21	7,14E-05	CD28	7,48E-01
PSEN1	7,20E-05	TNFSF14	7,51E-01
GATA3	7,48E-05	CTLA4	7,97E-01
POU2F2	7,52E-05	CD40LG	8,17E-01
TXK	8,94E-05	IL7	8,86E-01
DPP4	9,70E-05	RORC	1,00E+00

Дополнительная таблица 3B

Гены, участвующие в вычислении оценки пути интерферона	**P-значение**	**Гены, участвующие в вычислении оценки пути интерферона**	**P-значение**
GBP5	7,49E-09	DDX58	1,73E-05
IFIT3	2,66E-08	IFIT2	5,17E-05
H2-AB1	3,62E-08	TBK1	5,83E-05
H2-AA	4,93E-08	IFI35	7,52E-05
IFI44L	8,05E-08	SH2D1B1	4,08E-04
IFNAR2	1,13E-07	IFITM2	5,30E-04

IRGM2	1,18E-07	IFI27	6,90E-04
CIITA	1,68E-07	ULBP1	9,81E-04
CD3E	4,62E-07	TMEM173	1,10E-03
IFNGR1	5,77E-07	H60A	2,91E-03
IFIH1	7,59E-07	IFIT1	3,52E-03
IRF8	1,17E-06	IL12RB2	1,78E-02
IRF7	1,19E-06	NOS2	1,79E-02
NLRC5	1,46E-06	RUNX3	9,02E-02
EOMES	1,95E-06	CCR7	2,17E-01
IFNAR1	3,85E-06	FADD	2,37E-01
CXCL16	6,82E-06	IFITM1	6,10E-01
IFI44	8,06E-06	MAVS	8,59E-01

Дополнительная таблица 3C

Гены, участвующие в вычислении оценки пути MHC	**P-значение**
H2-T23	2,70E-09
KLRK1	3,47E-08
H2-AB1	3,62E-08
H2-EB1	4,45E-08
H2-AA	4,93E-08
CTSH	5,80E-08
CD74	7,35E-08
MR1	9,98E-08
H2-DMA	1,33E-07
CIITA	1,68E-07
TAP1	2,32E-07
FCER1G	2,41E-07
LAG3	8,54E-07
CD160	1,02E-06
FCGR3	1,13E-06
NLRC5	1,46E-06
FCGR1	1,50E-06
TAPBP	1,53E-06

H2-K1	9,48E-06
H2-D1	3,80E-05
TAP2	4,89E-05
PML	5,37E-05
H2-M3	5,67E-05
FCGR2B	6,05E-05
H2-DMB1	1,80E-04
CD1D1	8,57E-04
H2-DMB2	1,17E-02
H2-Q2	4,41E-02
H2-OB	1,92E-01
CD40LG	8,17E-01

Дополнительная таблица 3D

Гены, участвующие в вычислении оценки пути процессирования антигена	**P-значение**
H2-T23	2,70E-09
H2-AB1	3,62E-08
H2-EB1	4,45E-08
H2-AA	4,93E-08
H2-EA-P	4,94E-08
NOD1	4,97E-08
CD74	7,35E-08
MR1	9,98E-08
H2-DMA	1,33E-07
PSMB8	2,03E-07
TAP1	2,32E-07
FCER1G	2,41E-07
FCGR3	1,13E-06
FCGR1	1,50E-06
TAPBP	1,53E-06
PSMB9	2,02E-06
SLC11A1	2,53E-06
ICAM1	6,84E-06

H2-K1	9,48E-06
H2-D1	3,80E-05
TAP2	4,89E-05
H2-M3	5,67E-05
FCGR2B	6,05E-05
H2-DMB1	1,80E-04
CD1D1	8,57E-04
H2-DMB2	1,17E-02
H2-Q2	4,41E-02
RELB	1,55E-01
H2-OB	1,92E-01
CCR7	2,17E-01
NOD2	2,69E-01

Дополнительная таблица 3E

Гены, участвующие в вычислении оценки пути TLR	**P-значение**
TLR6	1,24E-08
TICAM2	1,88E-08
TLR7	4,46E-08
TLR8	9,04E-08
TLR9	1,23E-07
TLR1	2,11E-07
TLR2	3,63E-06
CD86	1,68E-05
TLR3	2,63E-05
TBK1	5,83E-05
IRAK2	1,44E-04
PRKCE	3,72E-04
TICAM1	8,09E-04
IRF4	1,47E-03
TRAF6	1,63E-03
TLR4	1,69E-03
TLR5	1,90E-03

MYD88	4,49E-03
GFI1	4,88E-03
MAP3K7	1,43E-02
IRF3	3,71E-02
MAPKAPK2	1,16E-01
IRAK1	1,39E-01
NFKBIA	1,62E-01
TRAF3	6,07E-01
TIRAP	9,18E-01

Дополнительная таблица 4. Антитела для проточной цитометрии

Антитело	**Клон**	**№ по каталогу**	**Поставщик**
Антитело BUV737 крысы к CD4 мыши	RM4-5	564933	BD Biosciences
Антитело BV421 крысы к CD8a мыши	53-6,7	563898	BD Biosciences
Антитело BV510 крысы к CD11b	M1/70	562950	BD Biosciences
Антитело BUV737 крысы к CD11b	M1/70	564443	BD Biosciences
Антитело BV421 хомяка к CD11c мыши	HL3	562782	BD Biosciences
Антитело BB700 крысы к CD19 мыши	1D3	566411	BD Biosciences
Антитело FITC крысы к CD24 мыши	M1/69	11-0242-81	ThermoFisher Scientific
Антитело BV650 крысы к CD25 мыши	PC61	564021	BD Biosciences
Антитело BV786 мыши к CD45.2 мыши	104	563686	BD Biosciences
Антитело APC/Cy7 крысы к CD90.2 мыши	30-H12	105328	BioLegend
Антитело APC хомяка к CD103 мыши	2E7	17-1031-80	ThermoFisher Scientific

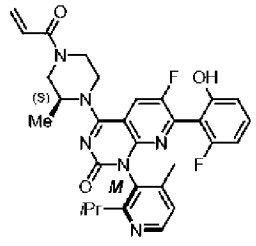
Антитело PE крысы к CD274 мыши	MIH5	558091	BD Biosciences
Антитело PE хомяка к CD279 (PD-1) мыши	J43	12-9985-82	ThermoFisher Scientific
Антитело FITC крысы к CD335 (NKp46) мыши	29A1,4	560756	BD Biosciences
Антитело BV650 крысы к F4/80 мыши	BM8	123149	BioLegend
Антитело APC крысы к FOXP3 мыши	FJK-16s	17-5773	ThermoFisher Scientific
Антитело BV711 крысы к Ly-6C мыши	HK1,4	128037	BioLegend
Антитело APC-H7 крысы к Ly-6G мыши	1A8	565369	BD Biosciences
Антитело BV510 крысы к I-A/I-E (MHCII) мыши	M5/114,15,2	107635	BioLegend
Антитело BV711 хомяка к TCR β-цепи мыши	H57-597	563135	BD Biosciences

Настоящее изобретение описано с использованием предпочтительных вариантов осуществления. Однако следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено раскрытыми вариантами осуществления. Понятно, что, учитывая описание вариантов осуществления настоящего изобретения, приведенных в данном документе, специалист в данной области может выполнить различные модификации. Такие модификации охватываются формулой изобретения, приведенной ниже.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, при этом способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества ингибитора $KRAS^{G12C}$ и по меньшей мере одного дополнительного фармацевтически активного средства.

2. Способ по п. 1, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

3. Способ по п. 1, где рак характеризуется мутацией KRAS p.G12C.

4. Способ по п. 1, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легкого, аппендикса, эндометрия или тонкого кишечника.

5. Способ по п. 4, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

6. Способ по п. 4, где рак представляет собой колоректальный рак.

7. Способ по п. 4, где рак представляет собой рак легкого.

8. Способ по п. 7, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

9. Способ по п. 4, где рак представляет собой рак аппендикса.

10. Способ по п. 4, где рак представляет собой рак эндометрия.

11. Способ по п. 4, где рак представляет собой рак тонкого кишечника.

12. Способ по п. 1, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин, ингибитор на основе антитела к PD-1, ингибитор MEK, ингибитор EGFR, ингибитор TOR, ингибитор SHP2, ингибитор PI3K или ингибитор AKT.

13. Способ по п. 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин.

14. Способ по п. 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор на основе антитела к PD-1.

15. Способ по п. 14, где ингибитор на основе антитела к PD-1 выбран из AMG 404, пембролизумаба и ниволумаба.

16. Способ по п. 15, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой пембролизумаб.

17. Способ по п. 15, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой AMG 404.

18. Способ по п. 15, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой ниволумаб.

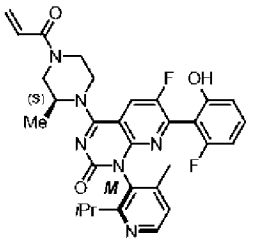
19. Способ по п. 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор MEK.

20. Способ по п. 19, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб, пимасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 или AZD8330.

21. Способ по п. 20, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

22. Способ по п. 12, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор SHP2.

23. Способ по п. 22, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4550.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая  или его фармацевтически приемлемую соль, по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

25. Композиция по п. 24, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин, ингибитор на основе антитела к PD-1, ингибитор MEK, ингибитор EGFR, ингибитор SHP2, ингибитор PI3K или ингибитор AKT.

26. Композиция по п. 25, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин.

27. Композиция по п. 25, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор на основе антитела к PD-1.

28. Композиция по п. 27, где ингибитор на основе антитела к PD-1 выбран из AMG 404, пембролизумаба и ниволумаба.

29. Композиция по п. 28, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой пембролизумаб.

30. Композиция по п. 28, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой AMG 404.

31. Композиция по п. 28, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой ниволумаб.

32. Композиция по п. 24, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор MEK.

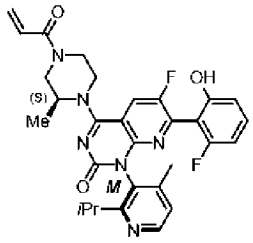
33. Композиция по п. 32, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб, пимасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 или AZD8330.

34. Композиция по п. 33, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

35. Композиция по п. 24, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор SHP2.

36. Композиция по п. 35, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4550.

37. Набор, содержащий ингибитор $KRAS^{G12C}$ или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство.

38. Набор по п. 37, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой  или его фармацевтически приемлемую соль.

39. Набор по п. 37, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин, ингибитор на основе антитела к PD-1, ингибитор MEK, ингибитор EGFR, ингибитор TOR, ингибитор SHP2, ингибитор PI3K или ингибитор AKT.

40. Набор по п. 39, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин.

41. Набор по п. 39, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор на основе антитела к PD-1.

42. Набор по п. 39, где ингибитор на основе антитела к PD-1 выбран из AMG 404, пембролизумаба и ниволумаба.

43. Набор по п. 39, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой пембролизумаб.

44. Набор по п. 39, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой AMG 404.

45. Набор по п. 39, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой ниволумаб.

46. Набор по п. 39, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор MEK.

47. Набор по п. 46, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб, пимасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 или AZD8330.

48. Набор по п. 47, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

49. Набор по п. 39, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор SHP2.

50. Набор по п. 49, где ингибитор SHP2 представляет собой RMC 4550.

51. Набор по п. 37, где набор предназначен для лечения рака.

52. Набор по п. 51, где рак характеризуется мутацией KRAS p.G12C.

53. Набор по п. 52, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легкого, аппендикса, эндометрия или тонкого кишечника.

54. Набор по п. 53, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

55. Набор по п. 53, где рак представляет собой колоректальный рак.

56. Набор по п. 53, где рак представляет собой рак легкого.

57. Набор по п. 56, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

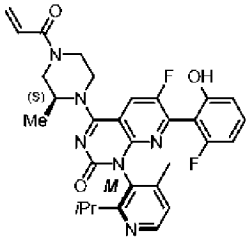
58. Набор по п. 53, где рак представляет собой рак аппендикса.

59. Набор по п. 53, где рак представляет собой рак эндометрия.

60. Набор по п. 53, где рак представляет собой рак тонкого кишечника.

61. Применение ингибитора $KRAS^{G12C}$ в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным химиотерапевтическим средством для изготовления лекарственного препарата для контроля или лечения рака у субъекта.

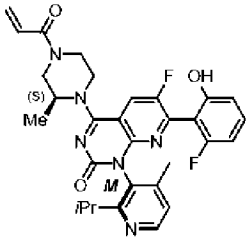
62. Применение по п. 61, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

63. Соединение, которое представляет собой ингибитор $KRAS^{G12C}$, для применения в лечении рака с по меньшей мере одним дополнительным фармацевтически активным средством.

64. Соединение по п. 63, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

65. Соединение по п. 63, где рак характеризуется мутацией KRAS p.G12C.

66. Соединение по п. 63, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак легкого, аппендикса, эндометрия или тонкого кишечника.

67. Соединение по п. 66, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

68. Соединение по п. 66, где рак представляет собой колоректальный рак.

69. Соединение по п. 66, где рак представляет собой рак легкого.

70. Соединение по п. 69, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

71. Соединение по п. 69, где рак представляет собой рак аппендикса.

72. Соединение по п. 69, где рак представляет собой рак эндометрия.

73. Соединение по п. 69, где рак представляет собой рак тонкого кишечника.

74. Соединение по п. 63, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин, ингибитор на основе антитела к PD-1, ингибитор MEK, ингибитор EGFR, ингибитор TOR, ингибитор SHP2, ингибитор PI3K или ингибитор AKT.

75. Соединение по п. 74, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой карбоплатин.

76. Соединение по п. 74, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор на основе антитела к PD-1.

77. Соединение по п. 76, где ингибитор на основе антитела к PD-1 выбран из AMG 404, пембролизумаба и ниволумаба.

78. Соединение по п. 77, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой пембролизумаб.

79. Соединение по п. 77, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой AMG 404.

80. Соединение по п. 77, где ингибитор на основе антитела к PD-1 представляет собой ниволумаб.

81. Соединение по п. 74, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор MEK.

82. Соединение по п. 81, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб, пимасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 или AZD8330.

83. Соединение по п. 82, где ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

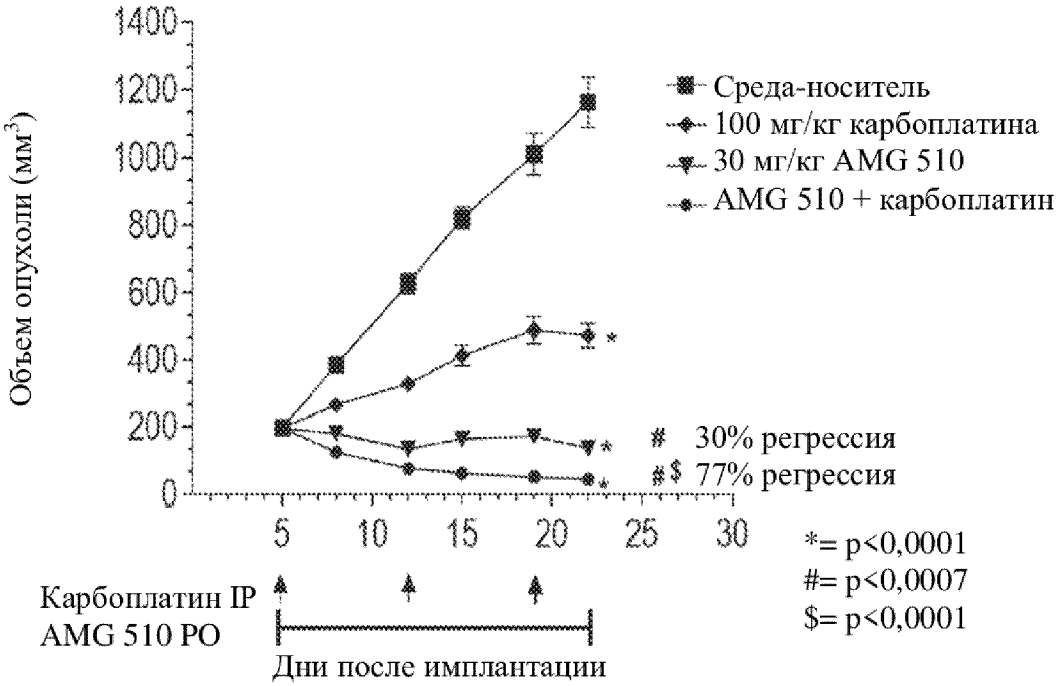
84. Соединение по п. 74, где по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство представляет собой ингибитор SHP2.

85. Способ по п. 1, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ и по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство вводят одновременно.

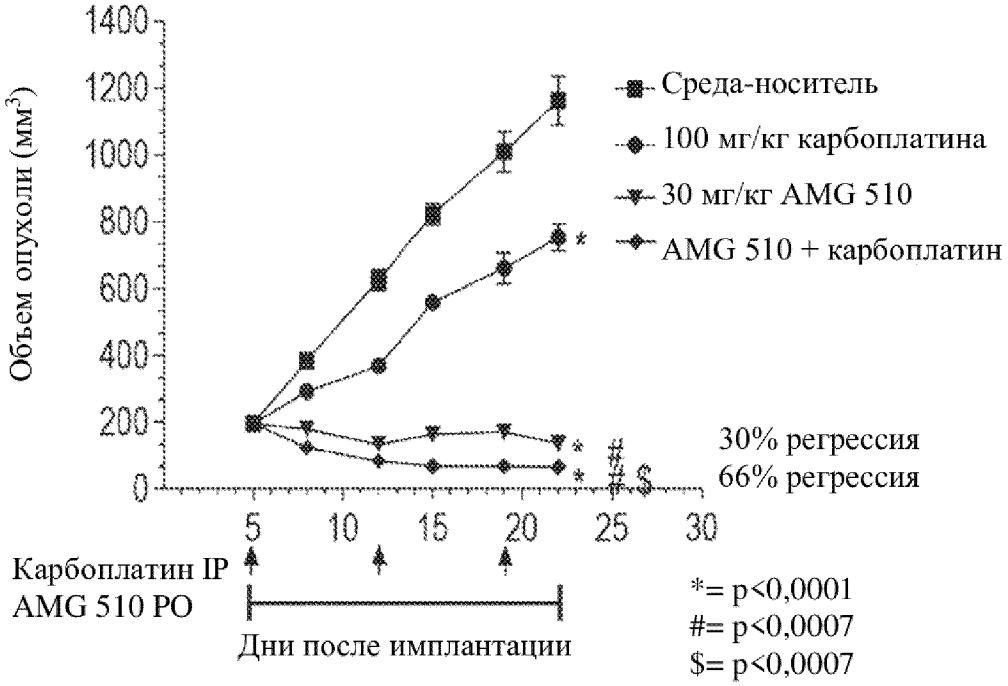
86. Способ по п. 1, где ингибитор $KRAS^{G12C}$ и по меньшей мере одно дополнительное фармацевтически активное средство вводят отдельно.

По доверенности

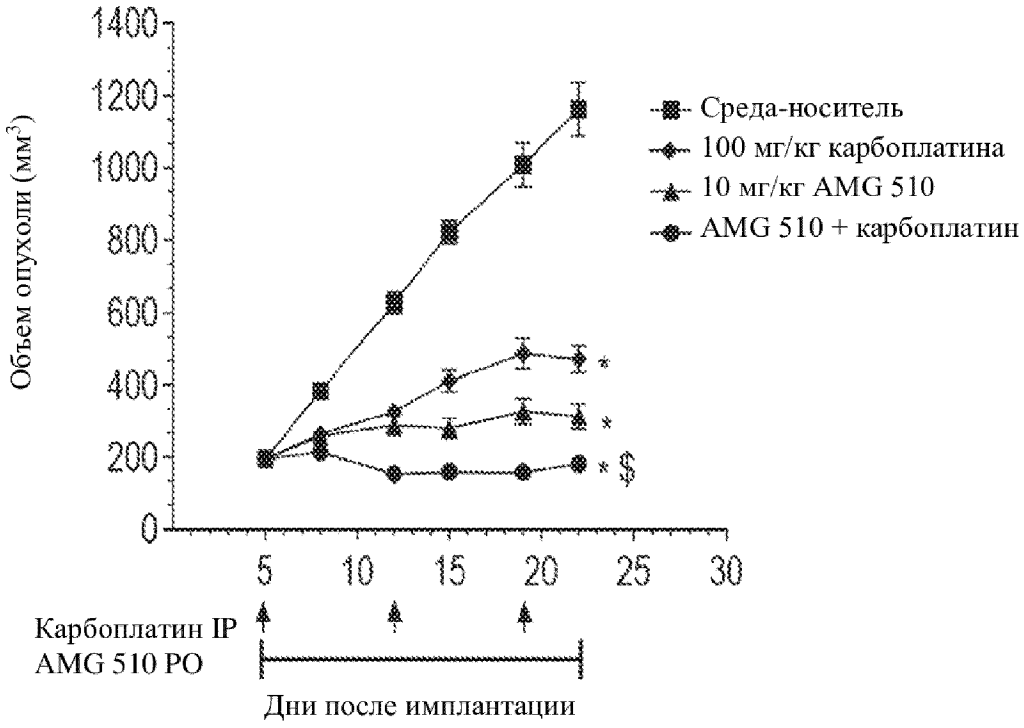
ФИГ. 1А


Объем опухоли (мм3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
Среда-носитель
100 мг/кг карбоплатина
30 мг/кг AMG 510
AMG 510 + карбоплатин
30% регрессия
#$ 77% регрессия
*= p<0,0001
#= p<0,0007
$= p<0,0001
Карбоплатин IP
AMG 510 PO
Дни после имплантации

ФИГ. 1В


Объем опухоли (мм3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
Среда-носитель
100 мг/кг карбоплатина
30 мг/кг AMG 510
AMG 510 + карбоплатин
30% регрессия
66% регрессия
*= p<0,0001
#= p<0,0007
$= p<0,0007
Карбоплатин IP
AMG 510 PO
Дни после имплантации

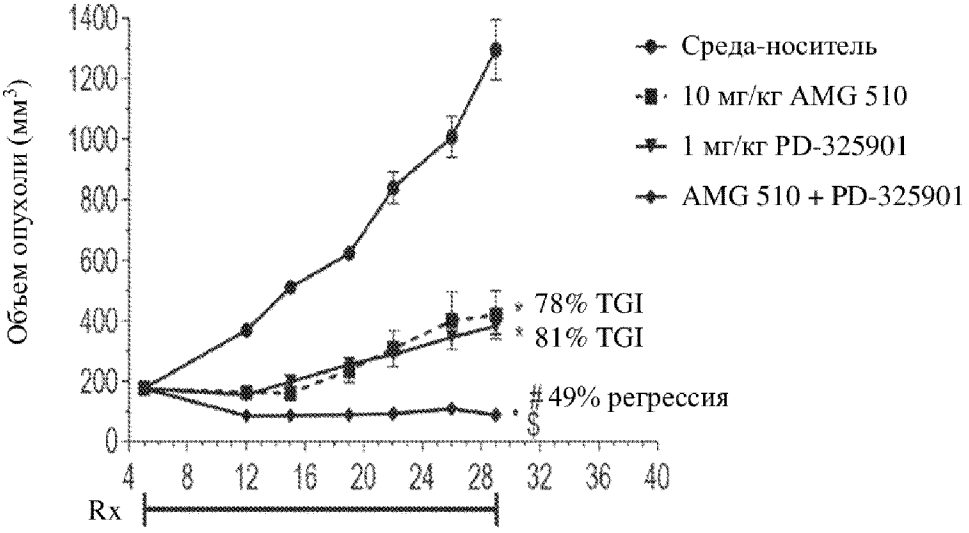
ФИГ. 1С



$ = p<0,002 для комбинации по сравнению с группой введения 10 мг/кг AMG 510 или 100 мг/кг карбоплатина

*= p<0,0001 по LME с последующим апостериорным анализом Даннетта по сравнению со средой-носителем

ФИГ. 2А



Введение доз AMG 510 и PD-325901 PO, QD

TGI: ингибирование роста опухоли

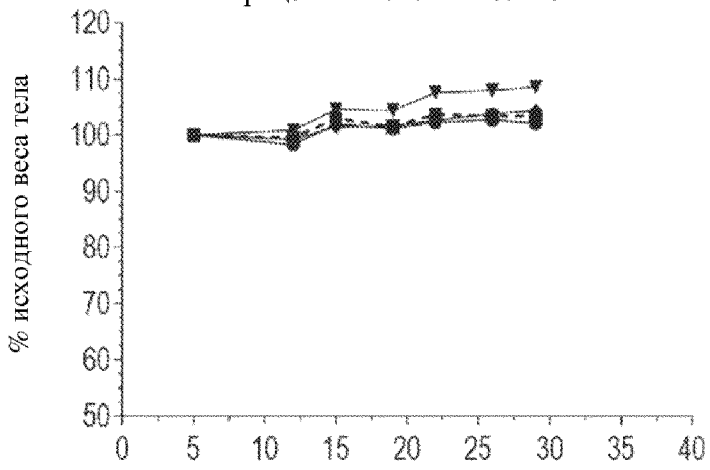
* p<0,0001 по апостериорному анализу Даннетта по сравнению со средой-носителем

# p<0,0001 для регрессии, определяемой с помощью парного t-критерия

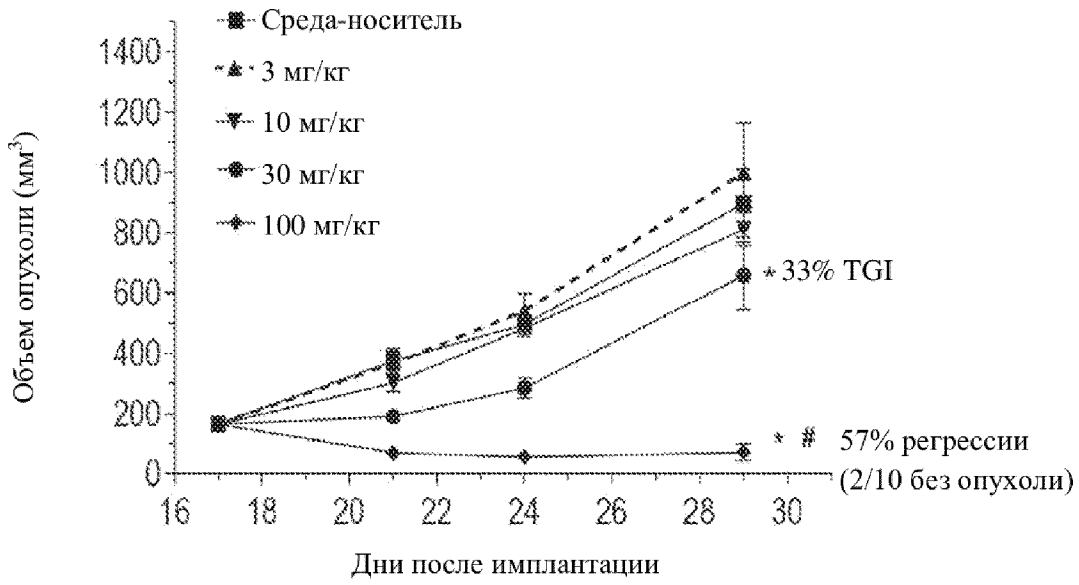
$ p<0,0005 для комбинации по сравнению с любым отдельным средством

ФИГ. 2В

Процент изменения веса тела



ФИГ. 3



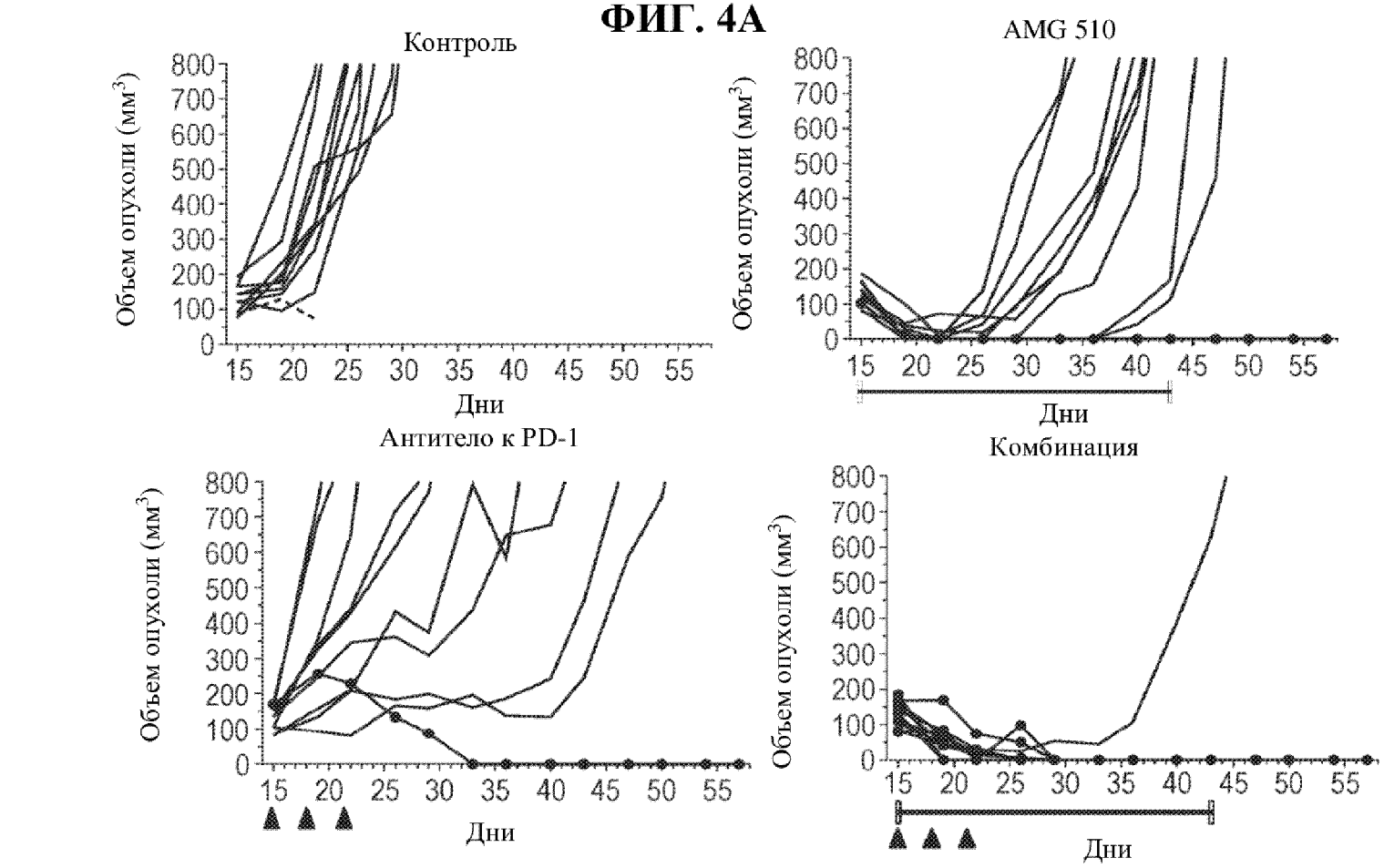
*= p<0,02 по апостериорному анализу Даннетта по сравнению со средой-носителем

#= p<0,03 для регрессии опухоли, определяемой с помощью парного t-критерия.

Дозы AMG 510 вводили PO, QD

TGI: ингибирование роста опухоли

ФИГ. 4А



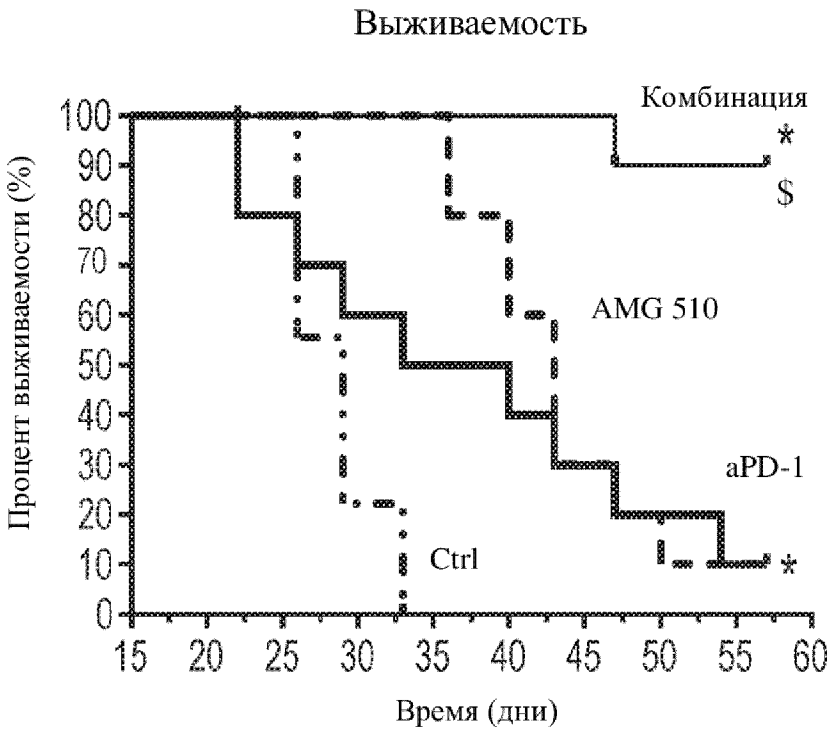
Дозировка:

▲ Антитело к PD-1
(клон 29F.1A12)
100 мкг IP, Q3Dx3

— AMG 510
100 мг/кг PO, QD

Модель колоректального рака CT-26 G12C

ФИГ. 4B



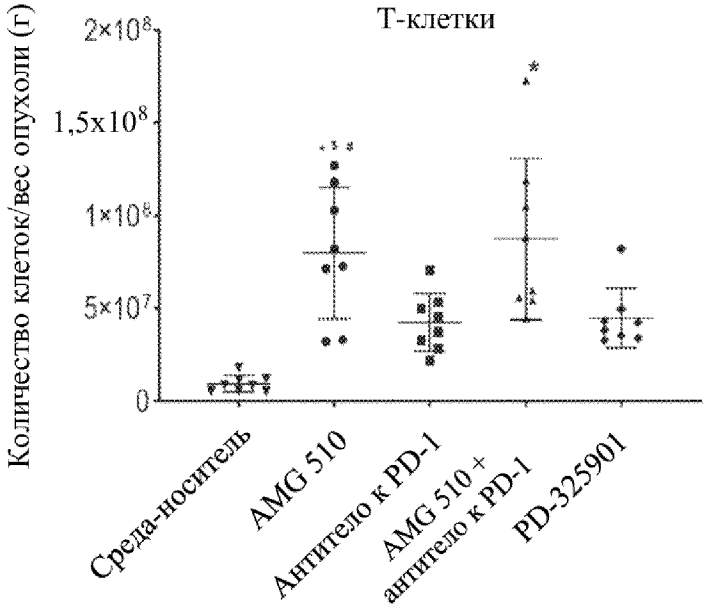
*= p<0,001 для сравнения с контролем

$ = p<0,005 для комбинации по сравнению с AMG 510 или антителом к PD-1

Выживаемость представляет собой суррогатную конечную точку, определяемую как время до достижения размера опухоли, составляющего > 800 мм^3

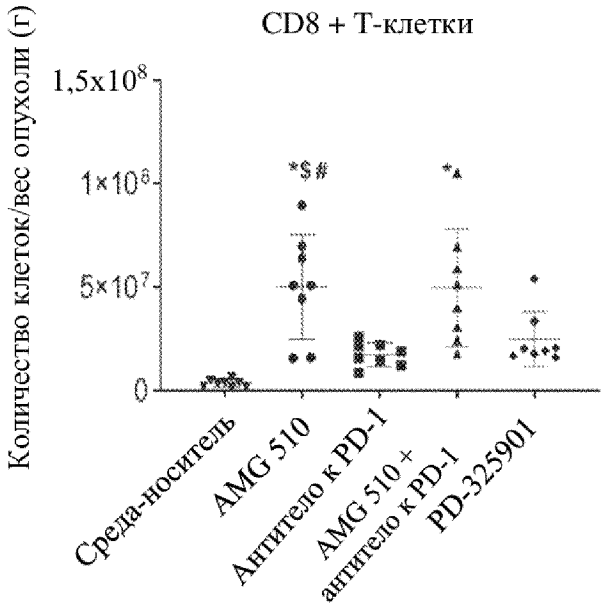
ФИГ. 5A

Обработка с помощью AMG 510 приводит к усилению инфильтрации CD8+ и CD4+ Т-клеток в опухолях CT-26 G12C-H10 (абсолютные числа)



*p=<0,05 для сравнения с группой обработки средой-носителем по двухфакторному ANOVA с последующим апостериорным анализом Тьюки
$ p=<0,05 для AMG 510 по сравнению с антителом к PD-1 по парному t-критерию
# p=<0,05 для AMG 510 по сравнению с PD-325901 по парному t-критерию

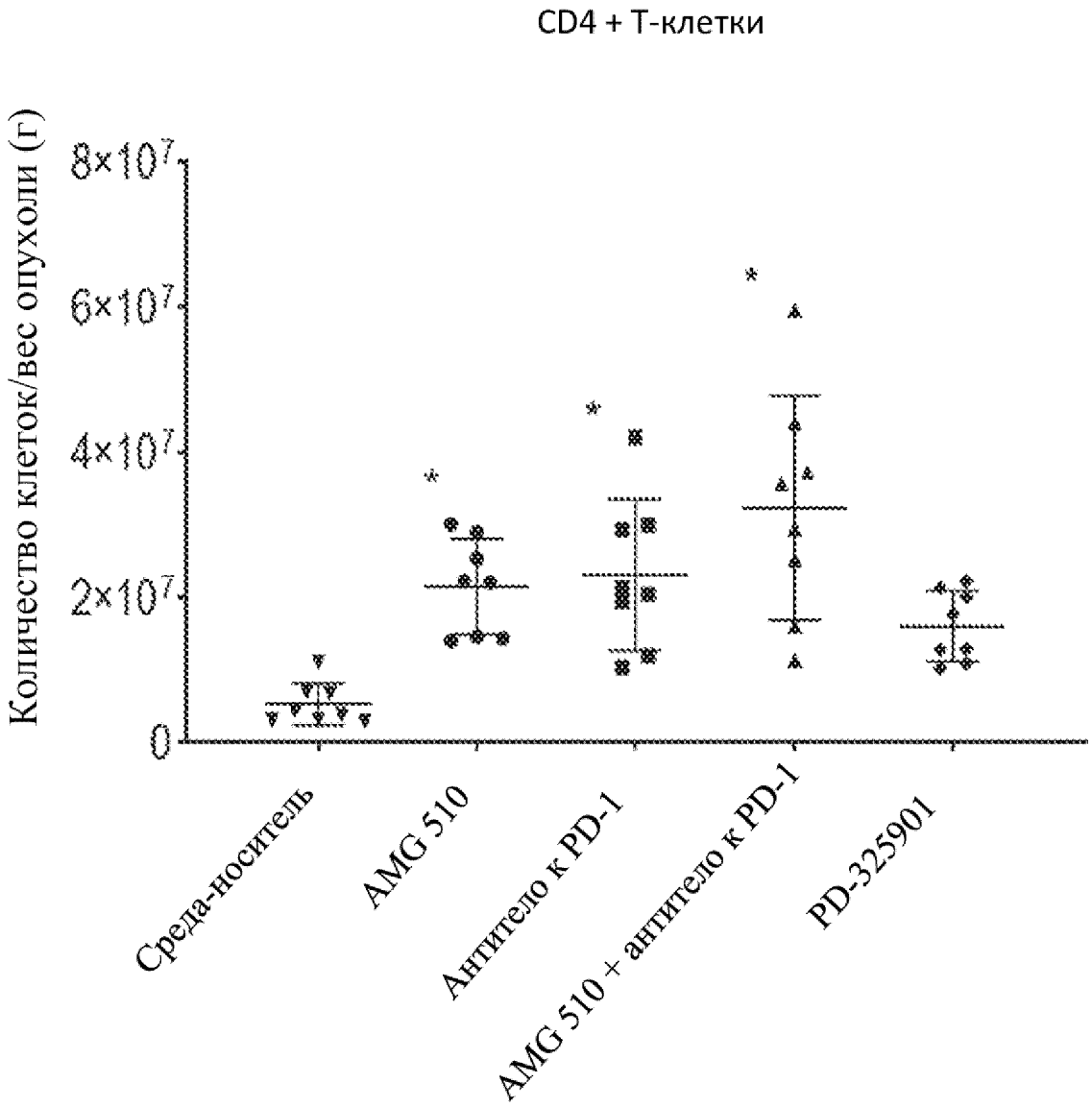
ФИГ. 5B



*= p=<0,0005 для сравнения с контролем средой-носителем по двухфакторному ANOVA с последующим апостериорным анализом Тьюки
$ p <0,05 для AMG 510 по сравнению с антителом к PD-1
# p <0,05 для AMG 510 по сравнению с PD-325901

ФИГ. 5С

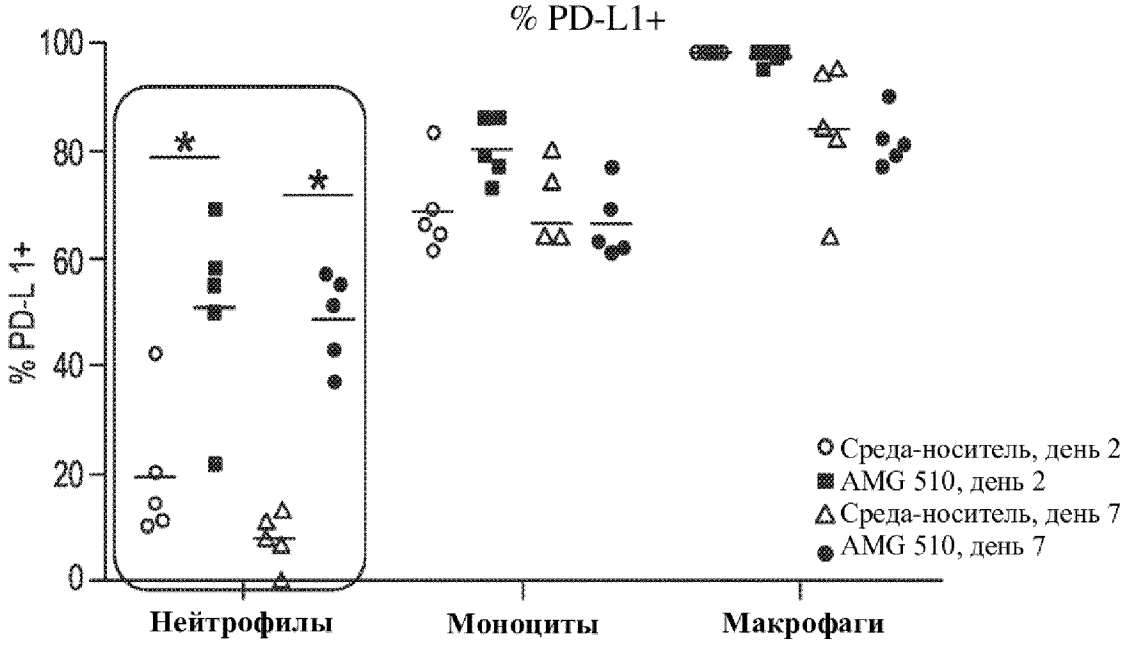
Обработка с помощью AMG 510 приводит к усилению инфильтрации CD8+ и CD4+ Т-клеток в опухолях CT-26 G12C-H10
(абсолютные числа)



*= p<0,05 для сравнения с группой среды-носителя по двухфакторному ANOVA с последующим апостериорным анализом Тьюки

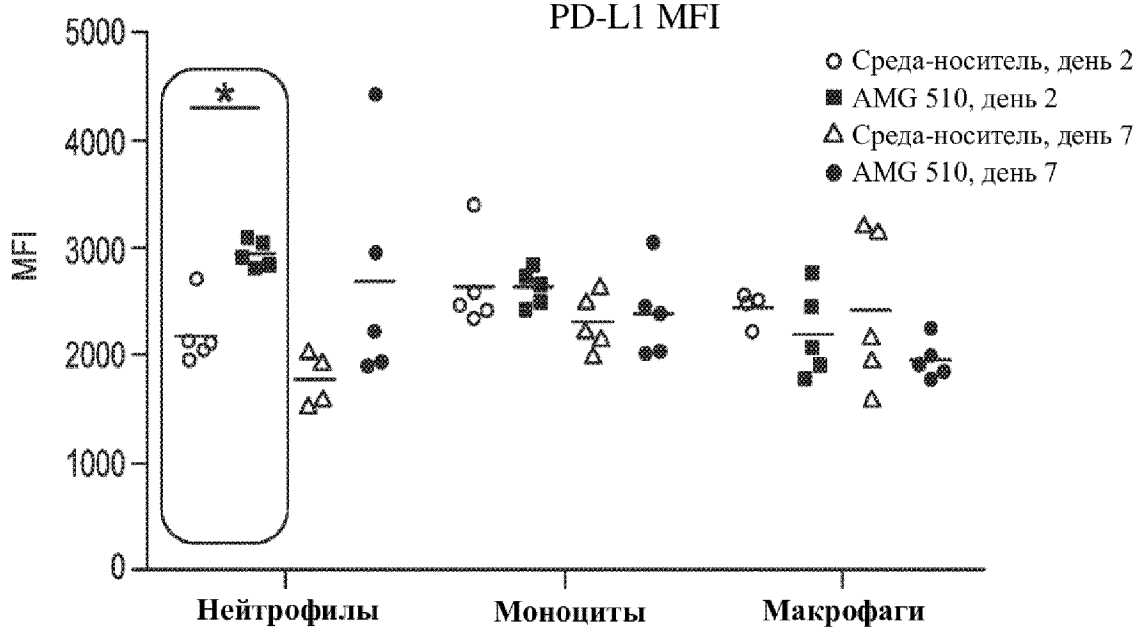
ФИГ. 6А

Инфильтрация иммунных клеток в опухоль CT26-G12C-H10



ФИГ. 6В

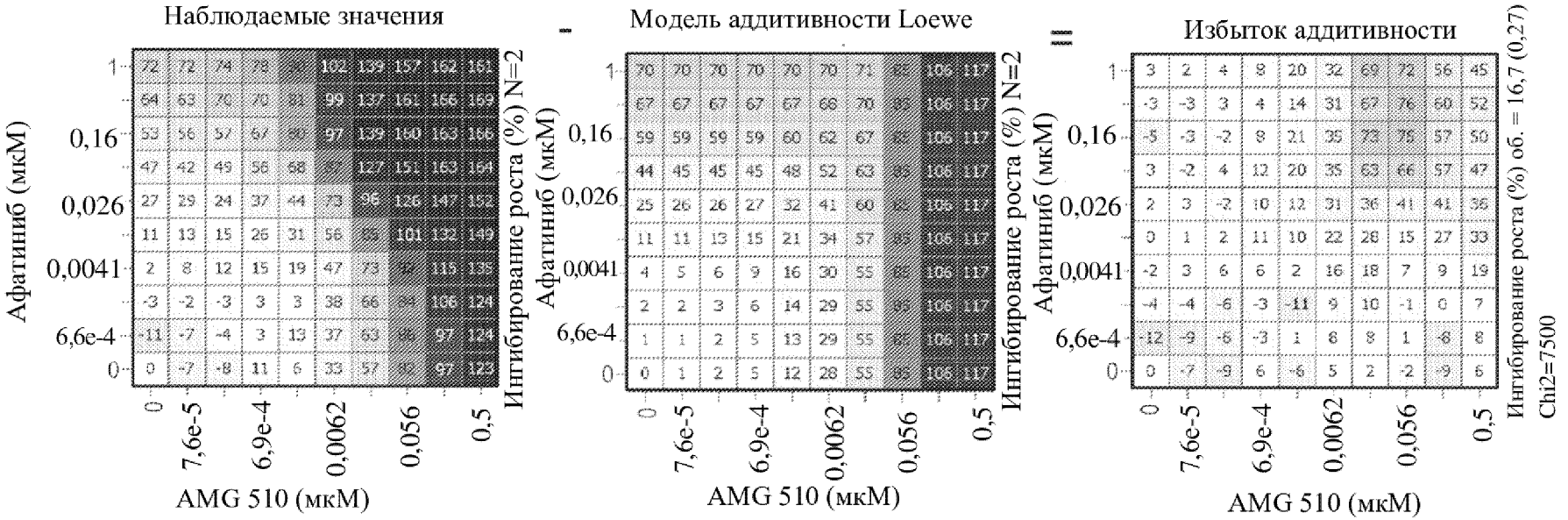
Инфильтрация иммунных клеток опухоли CT26-G12C-H10



AMG 510 (30 мг/кг) или контроль средой-носителем вводили в течение 2 или 7 дней и опухоли собирали для иммунофенотипирования

*p<0,01 по парному t-критерию

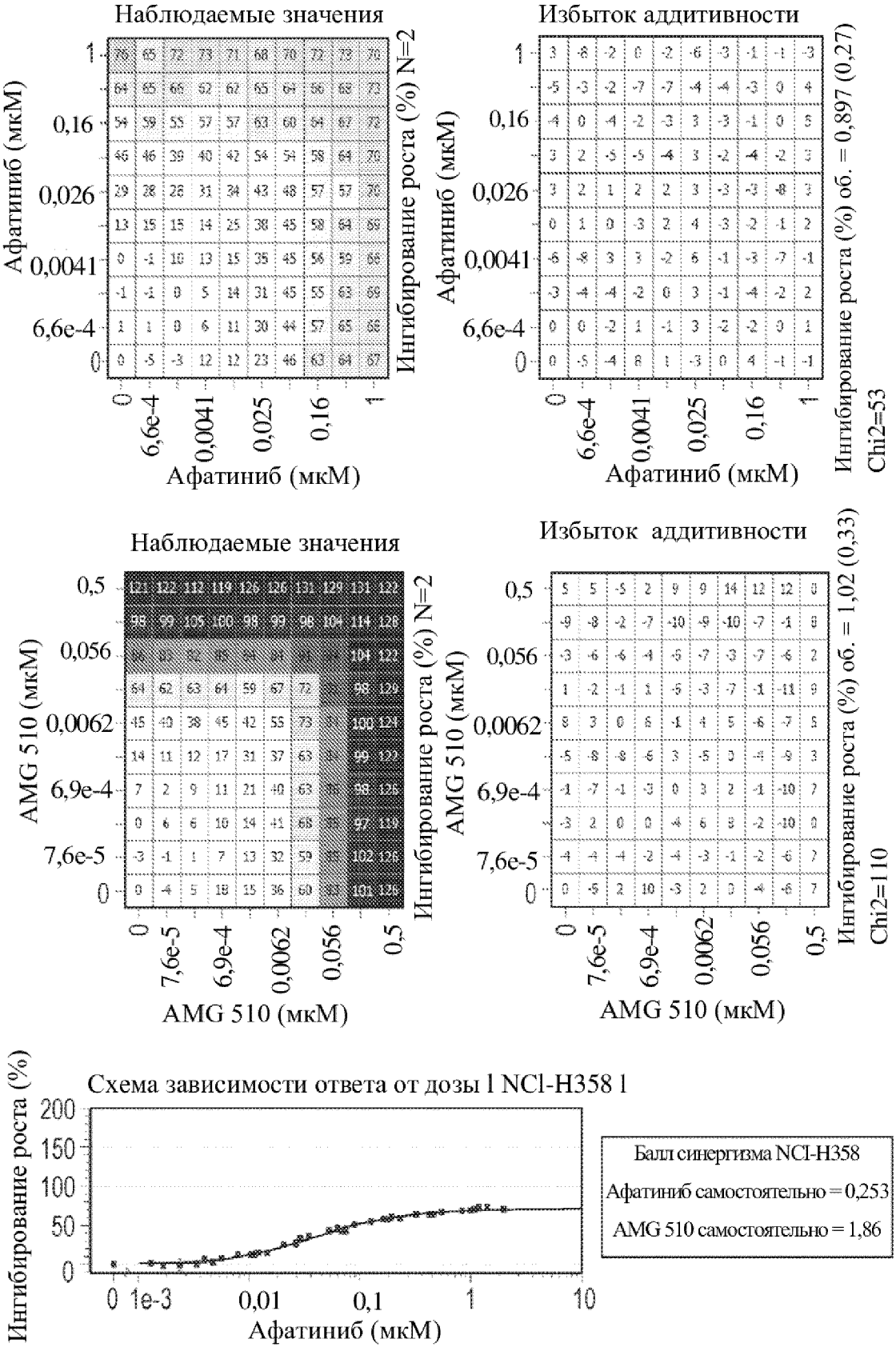
ФИГ. 7



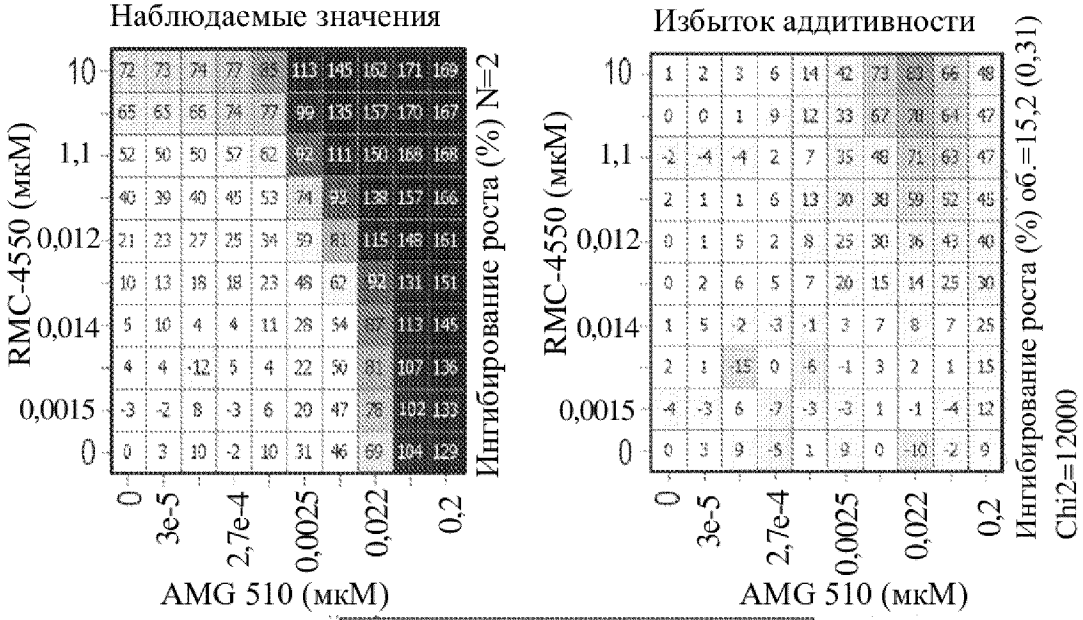
Значение избытка аддитивности = Σ (наблюдаемое значение – аддитивность Loewe)

- Определение синергетических взаимодействий при высоких уровнях активности
- Удаление отрицательных значений при отсутствии эффекта
- Нормализация коэффициентов разбавления в эксперименте

ФИГ. 8

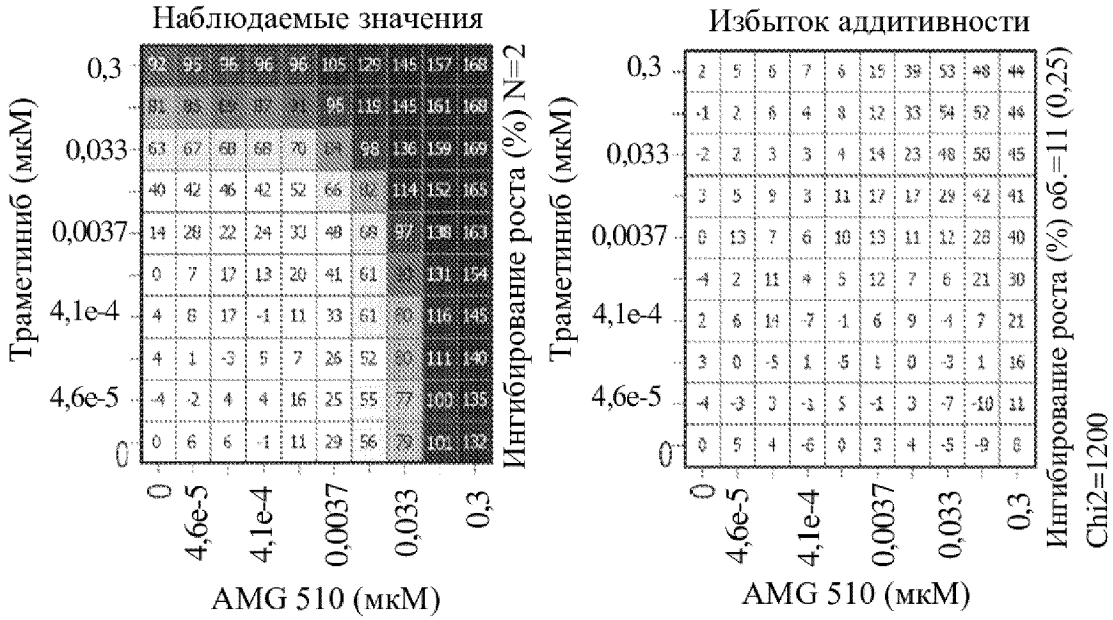

Наблюдаемые значения
Избыток аддитивности
Афатиниб (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Ингибирование роста (%) об. = 0,897 (0,27)
Chi2=53
AMG 510 (мкМ)
Наблюдаемые значения
Избыток аддитивности
Ингибирование роста (%) об. = 1,02 (0,33)
Chi2=110
Схема зависимости ответа от дозы l NCl-H358 l
Ингибирование роста (%)
Балл синергизма NCI-H358
Афатиниб самостоятельно = 0,253
AMG 510 самостоятельно = 1,86

ФИГ. 9А



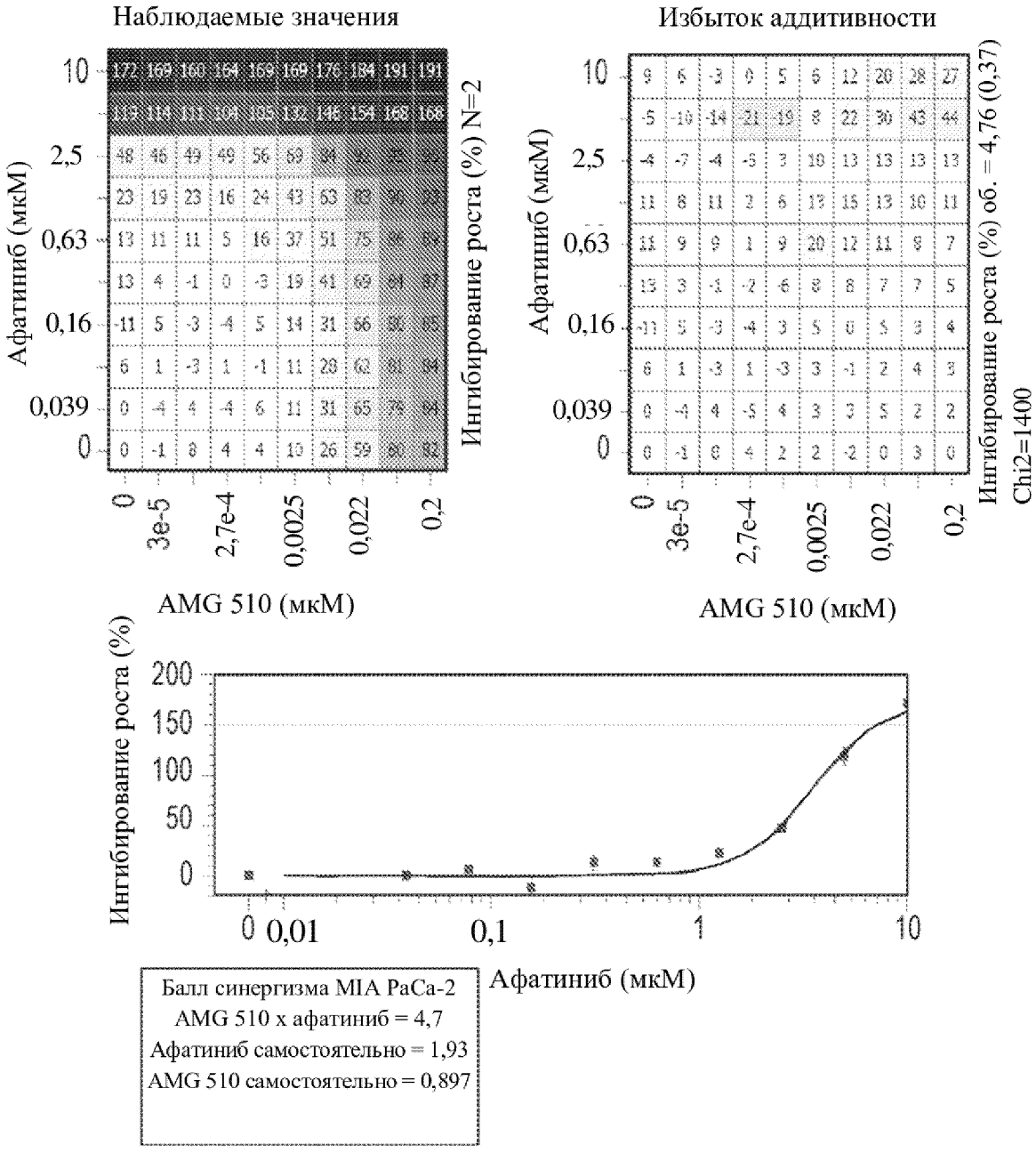
Балл синергизма NCI-H358
AMG 510 x RMC-4550 = 25
RMC-4550 самостоятельно = 0,458
AMG 510 самостоятельно = 3,36

ФИГ. 9В

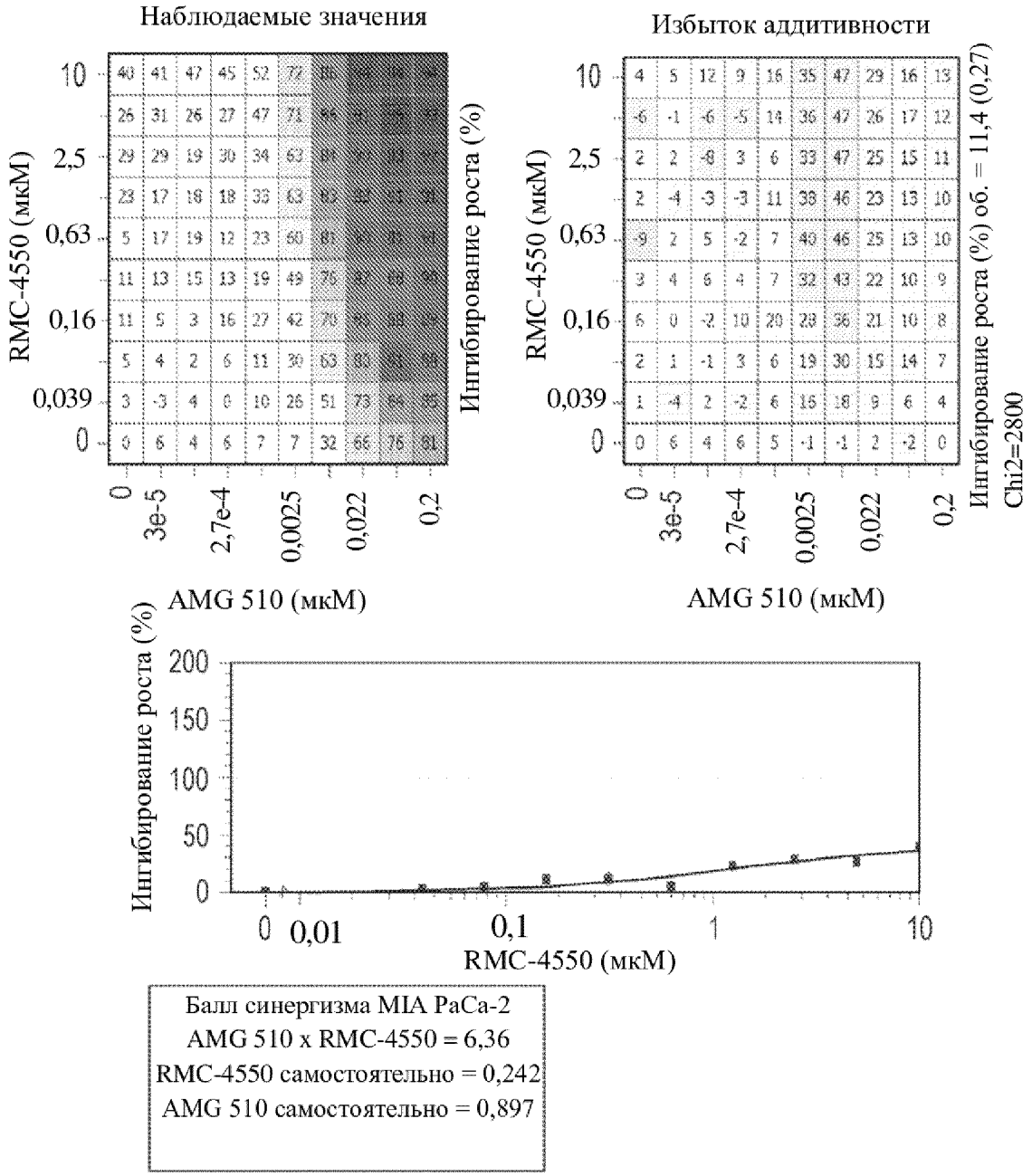


Балл синергизма NCI-H358
AMG 510 x траметиниб = 17
Траметиниб самостоятельно = 1,21
AMG 510 самостоятельно = 2,06

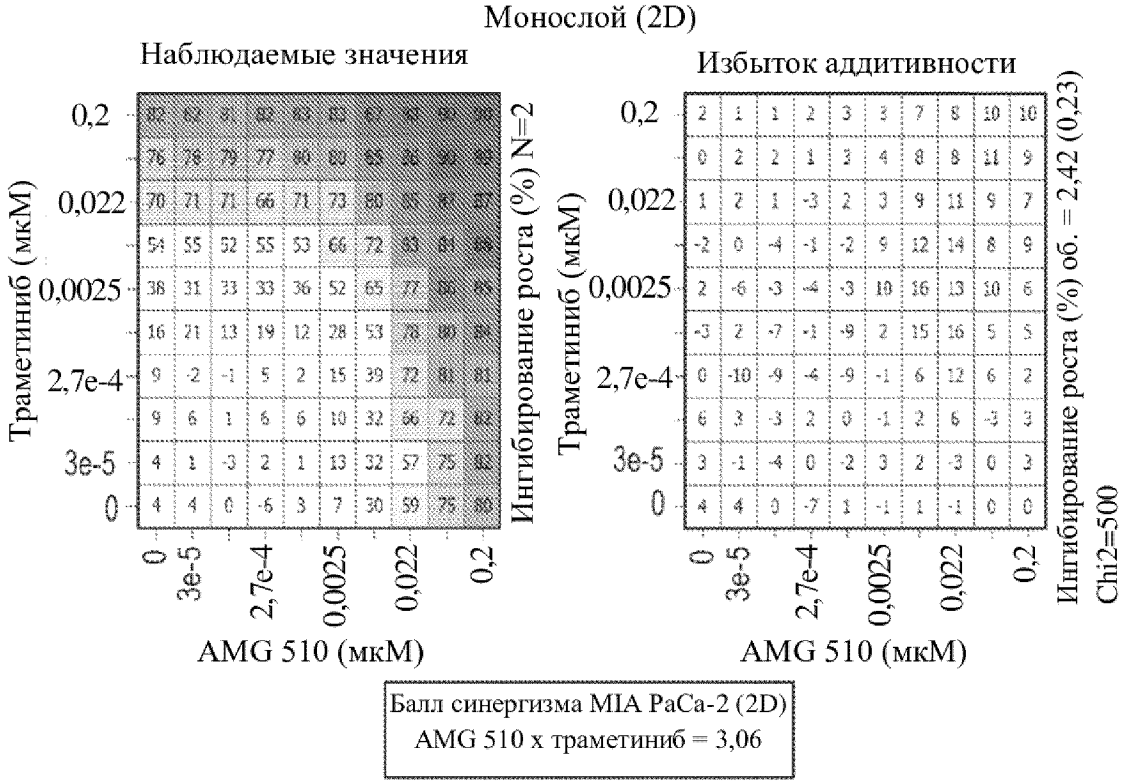
ФИГ. 10А


Наблюдаемые значения
Избыток аддитивности
Афатиниб (мкМ)
10
2,5
0,63
0,16
0,039
0
0
3e-5
2,7e-4
0,0025
0,022
0,2
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Ингибирование роста (%) об. = 4,76 (0,37)
Chi2=1400
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 0,01
0,1
1
10
Афатиниб (мкМ)
Балл синергизма MIA PaCa-2
AMG 510 x афатиниб = 4,7
Афатиниб самостоятельно = 1,93
AMG 510 самостоятельно = 0,897

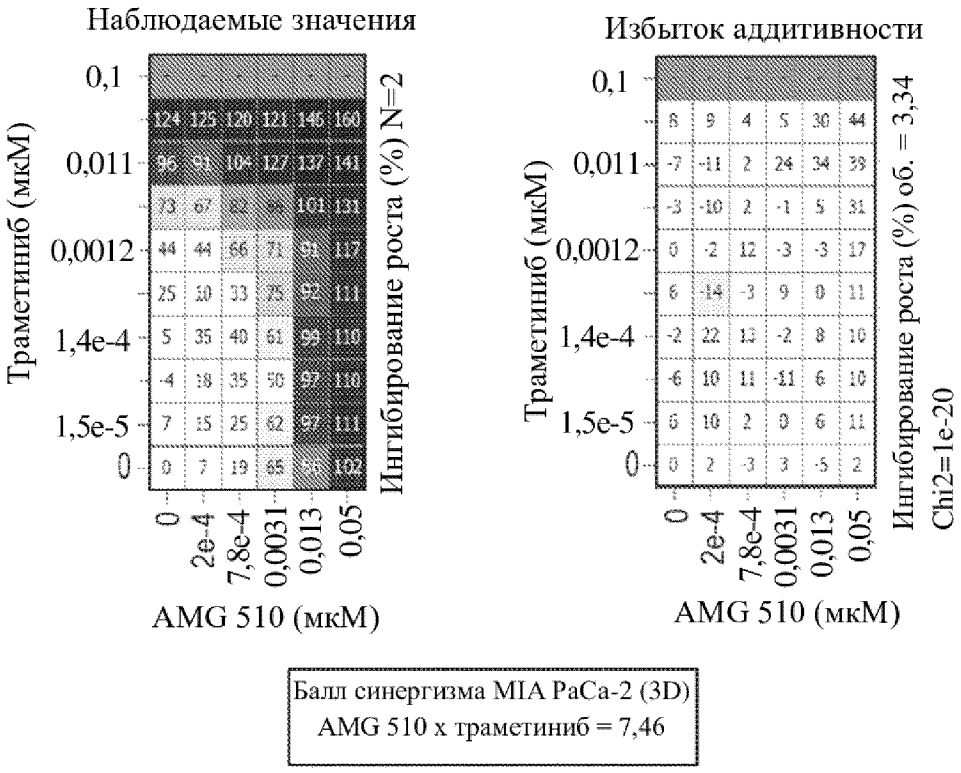
ФИГ. 10B


Наблюдаемые значения
RMC-4550 (мкМ)
10
2,5
0,63
0,16
0,039
0
0
3e-5
2,7e-4
0,0025
0,022
0,2
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%)
Избыток аддитивности
RMC-4550 (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) об. = 11,4 (0,27)
Chi2=2800
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 0,01 0,1 1 10
RMC-4550 (мкМ)
Балл синергизма MIA PaCa-2
AMG 510 x RMC-4550 = 6,36
RMC-4550 самостоятельно = 0,242
AMG 510 самостоятельно = 0,897

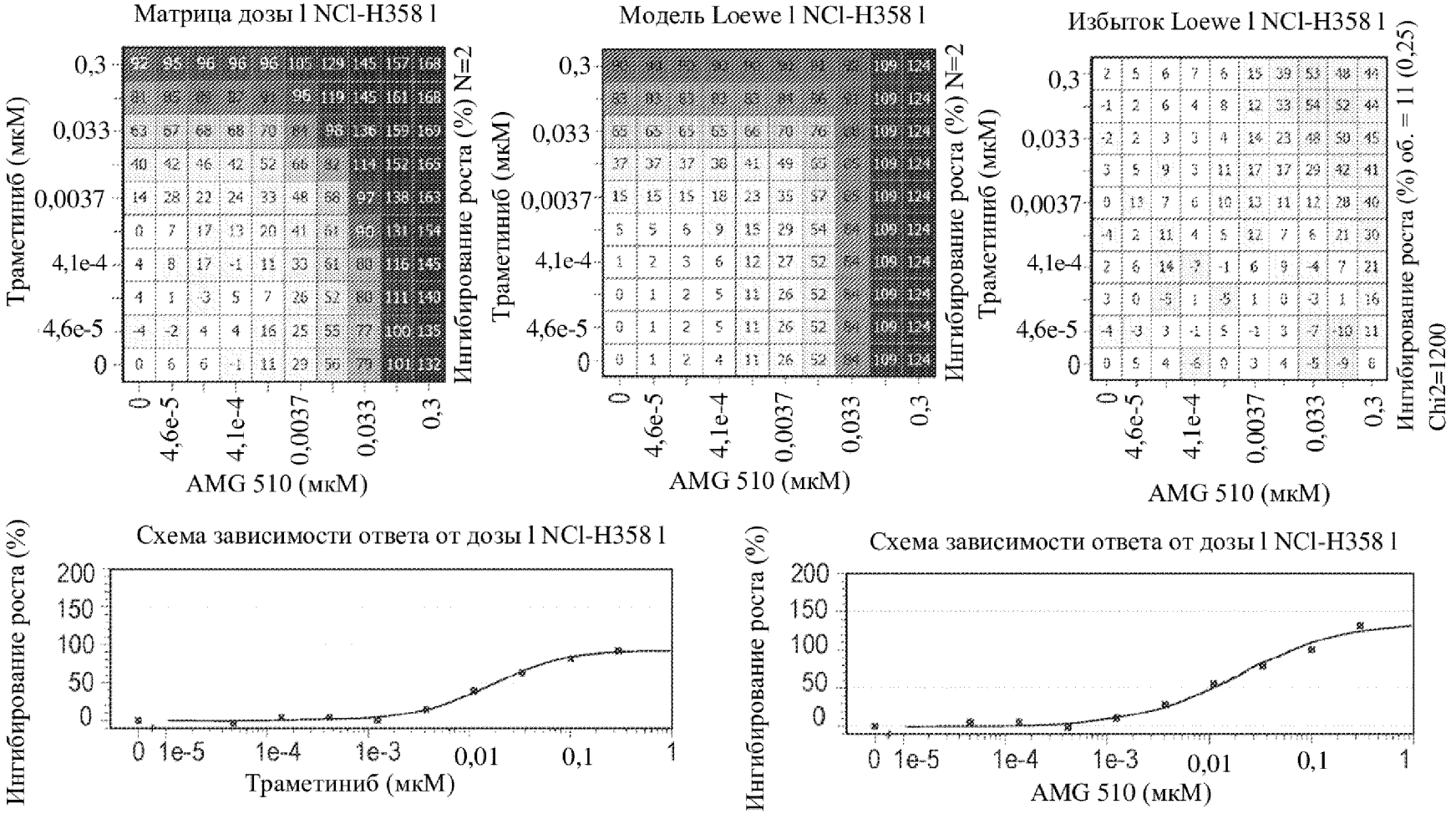
ФИГ. 11A



ФИГ. 11B

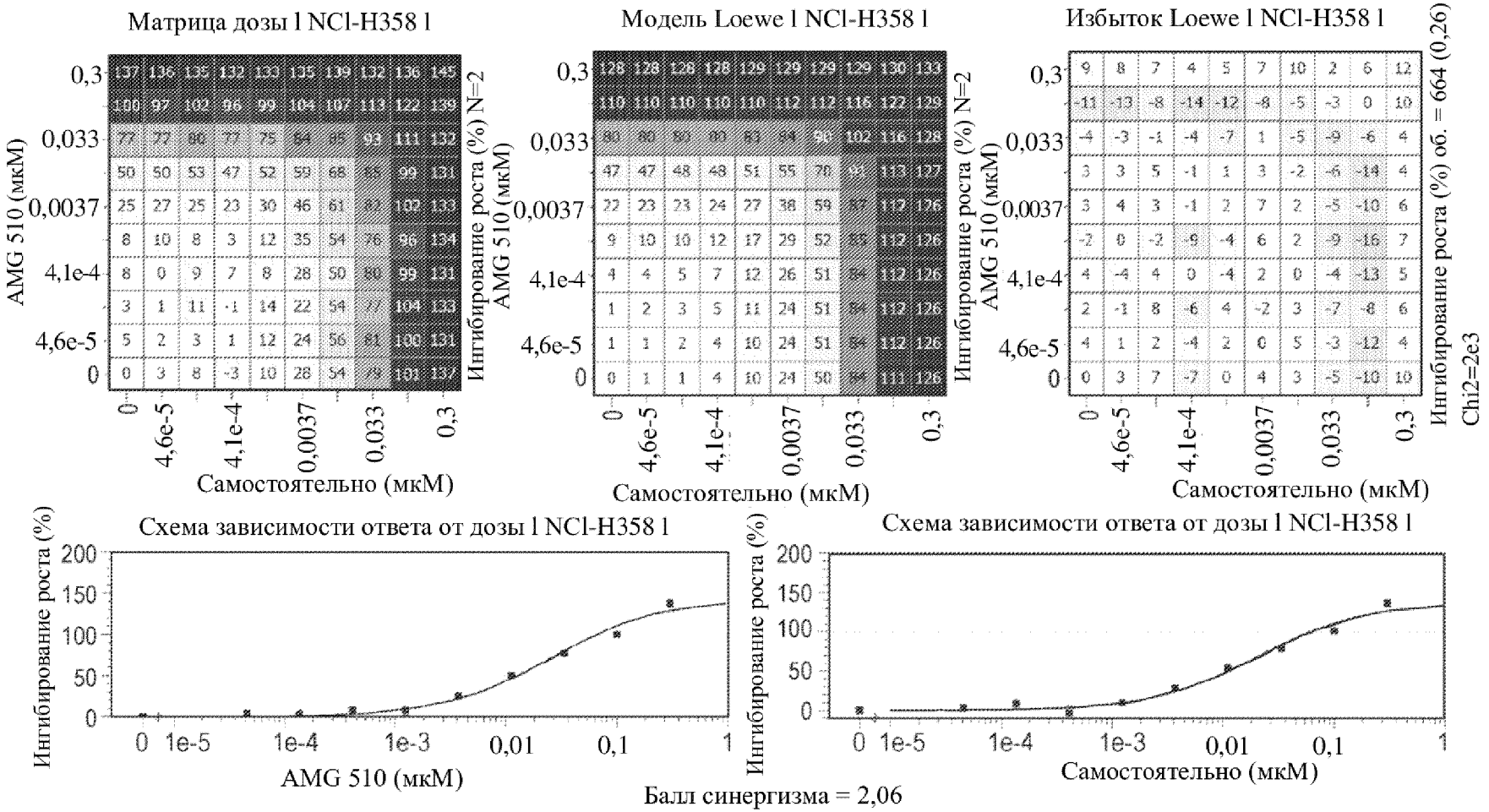


ФИГ. 12

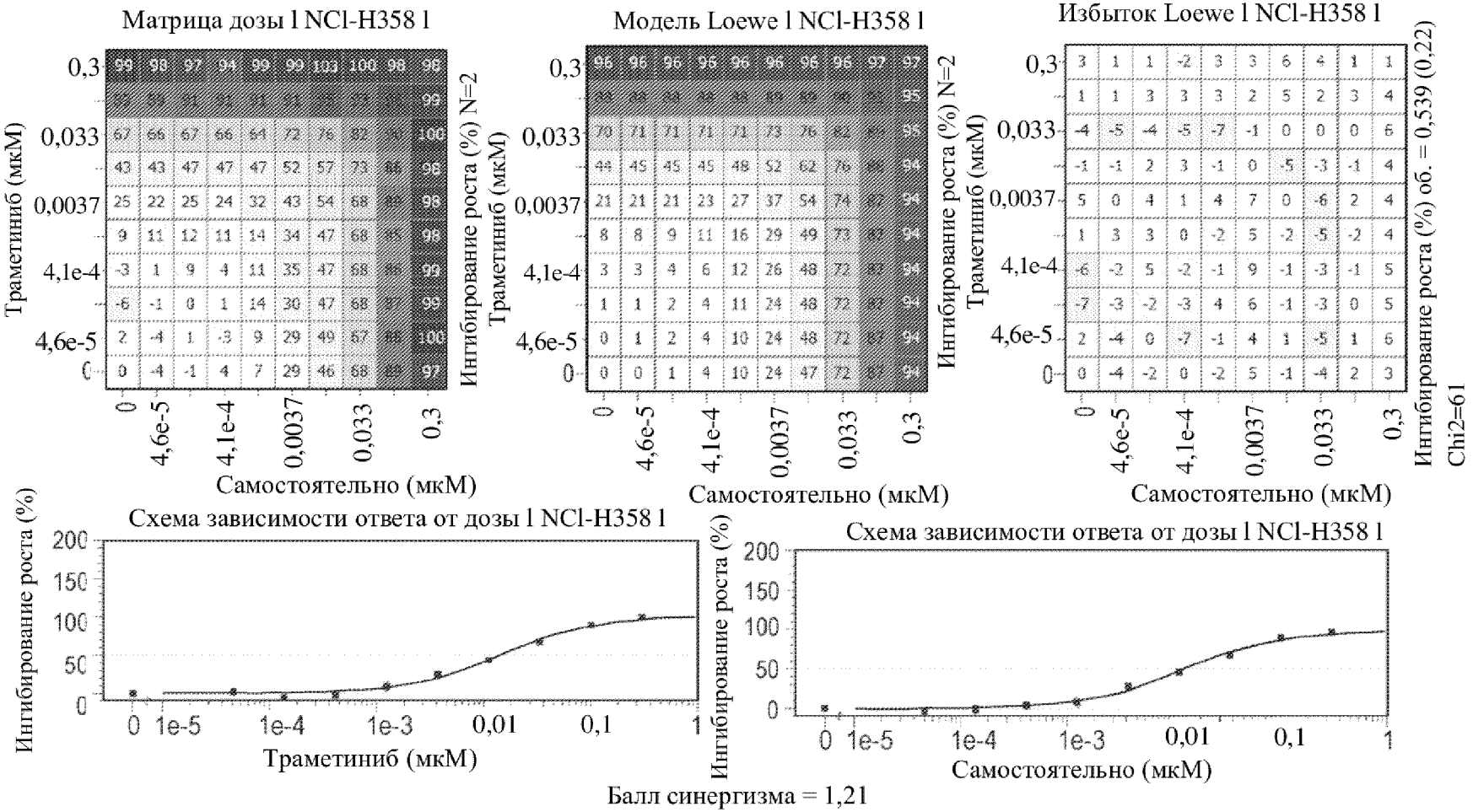


Балл синергизма = 17

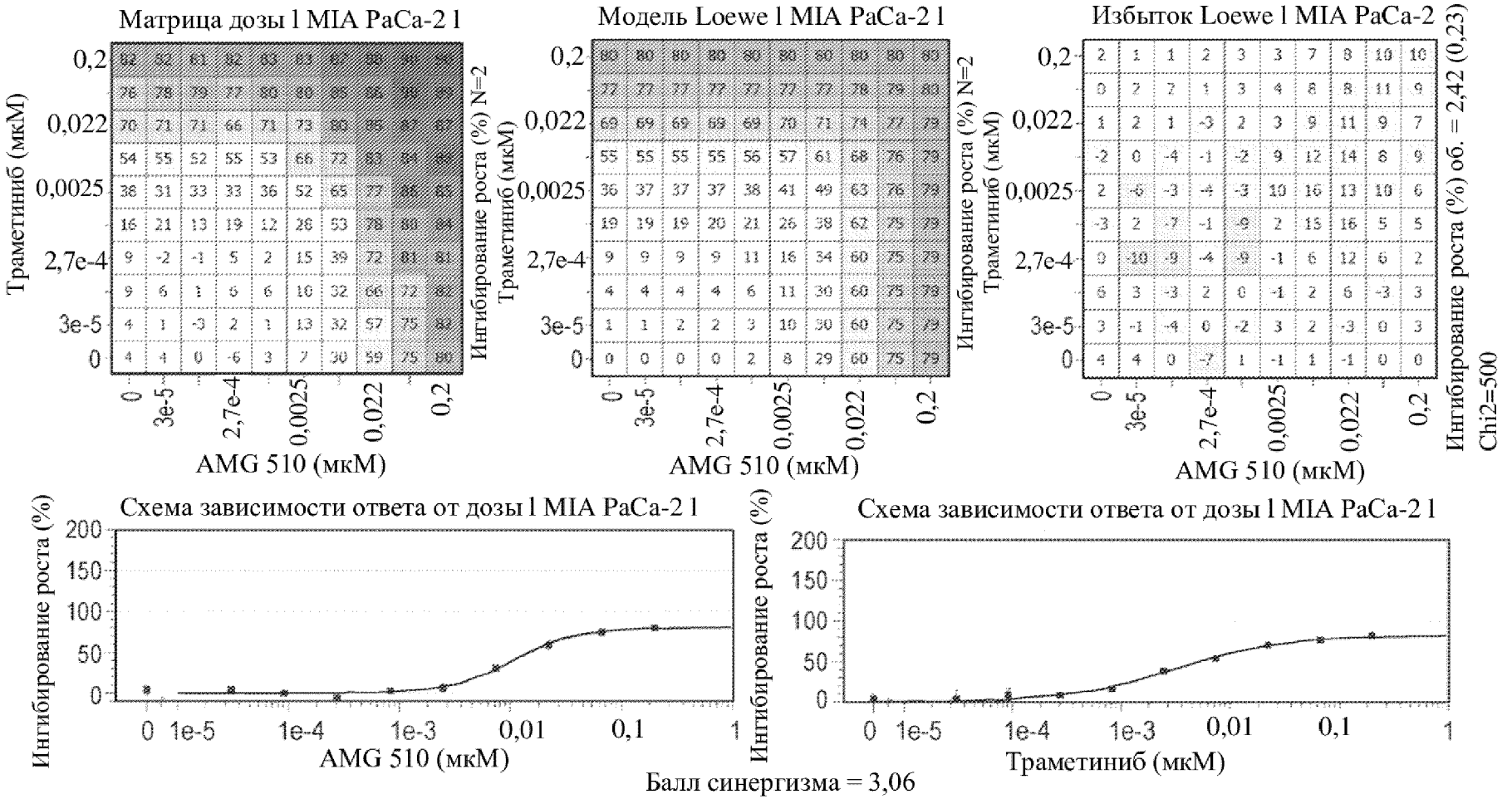
ФИГ. 13


Матрица дозы 1 NCl-H358 1
AMG 510 (мкМ)
0,3
0,033
0,0037
4,1e-4
4,6e-5
0
Самостоятельно (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Модель Loewe 1 NCl-H358 1
Избыток Loewe 1 NCl-H358 1
Ингибирование роста (%) об. = 664 (0,26)
Chi2=2e3
Схема зависимости ответа от дозы 1 NCl-H358 1
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 1e-5 1e-4 1e-3 0,01 0,1 1
AMG 510 (мкМ)
Самостоятельно (мкМ)
Балл синергизма = 2,06

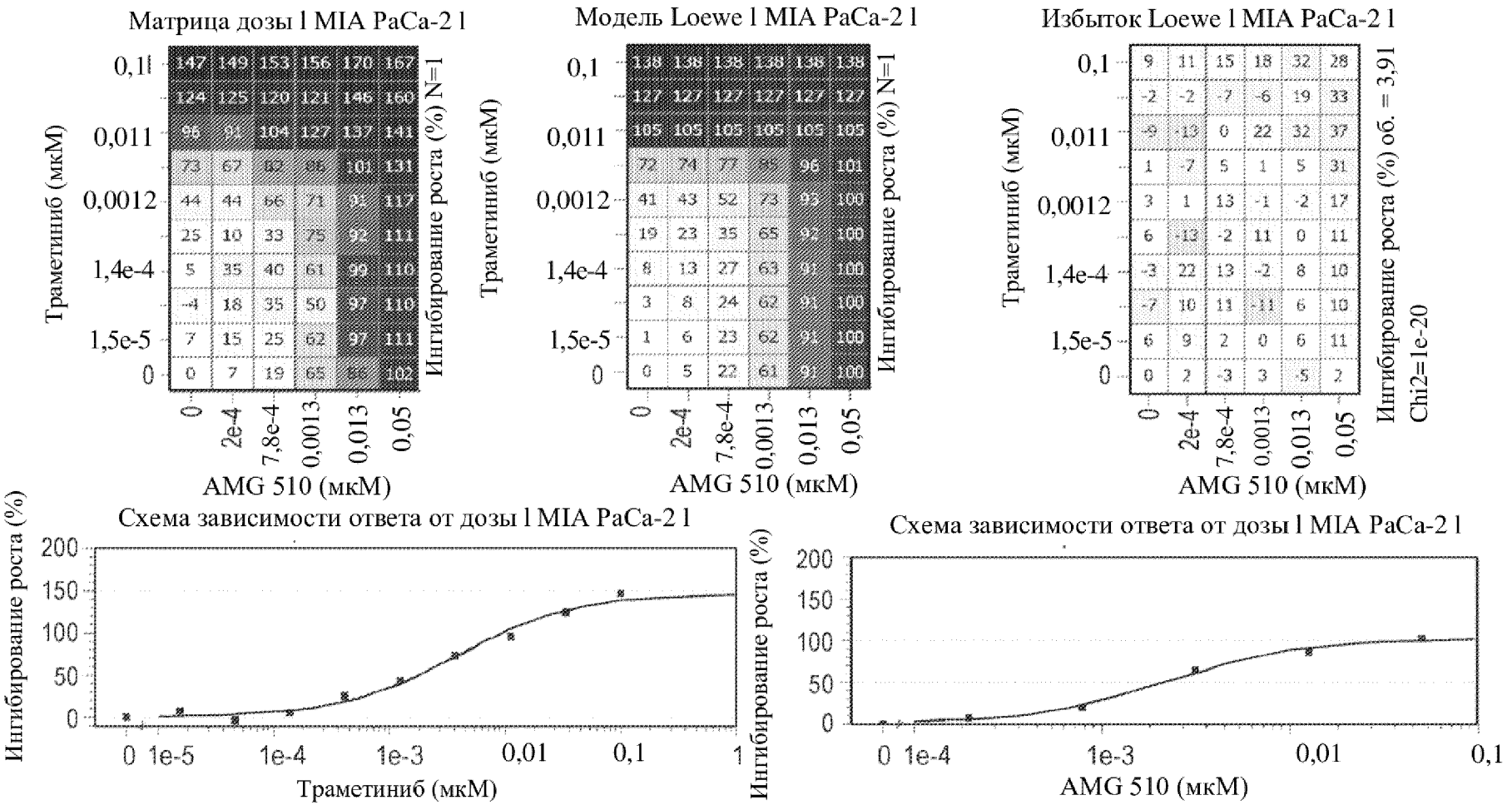
ФИГ. 14


Матрица дозы l NCl-H358 l
Траметиниб (мкМ)
0,3
0,033
0,0037
4,1e-4
4,6e-5
0
Самостоятельно (мкМ)
Модель Loewe l NCl-H358 l
Ингибирование роста (%) N=2
Траметиниб (мкМ)
Самостоятельно (мкМ)
Избыток Loewe l NCl-H358 l
Ингибирование роста (%) об. = 0,539 (0,22)
Chi2=61
Траметиниб (мкМ)
Самостоятельно (мкМ)
Схема зависимости ответа от дозы l NCl-H358 l
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 1e-5 1e-4 1e-3 0,01 0,1 1
Траметиниб (мкМ)
Схема зависимости ответа от дозы l NCl-H358 l
Ингибирование роста (%)
Самостоятельно (мкМ)
Балл синергизма = 1,21

ФИГ. 15

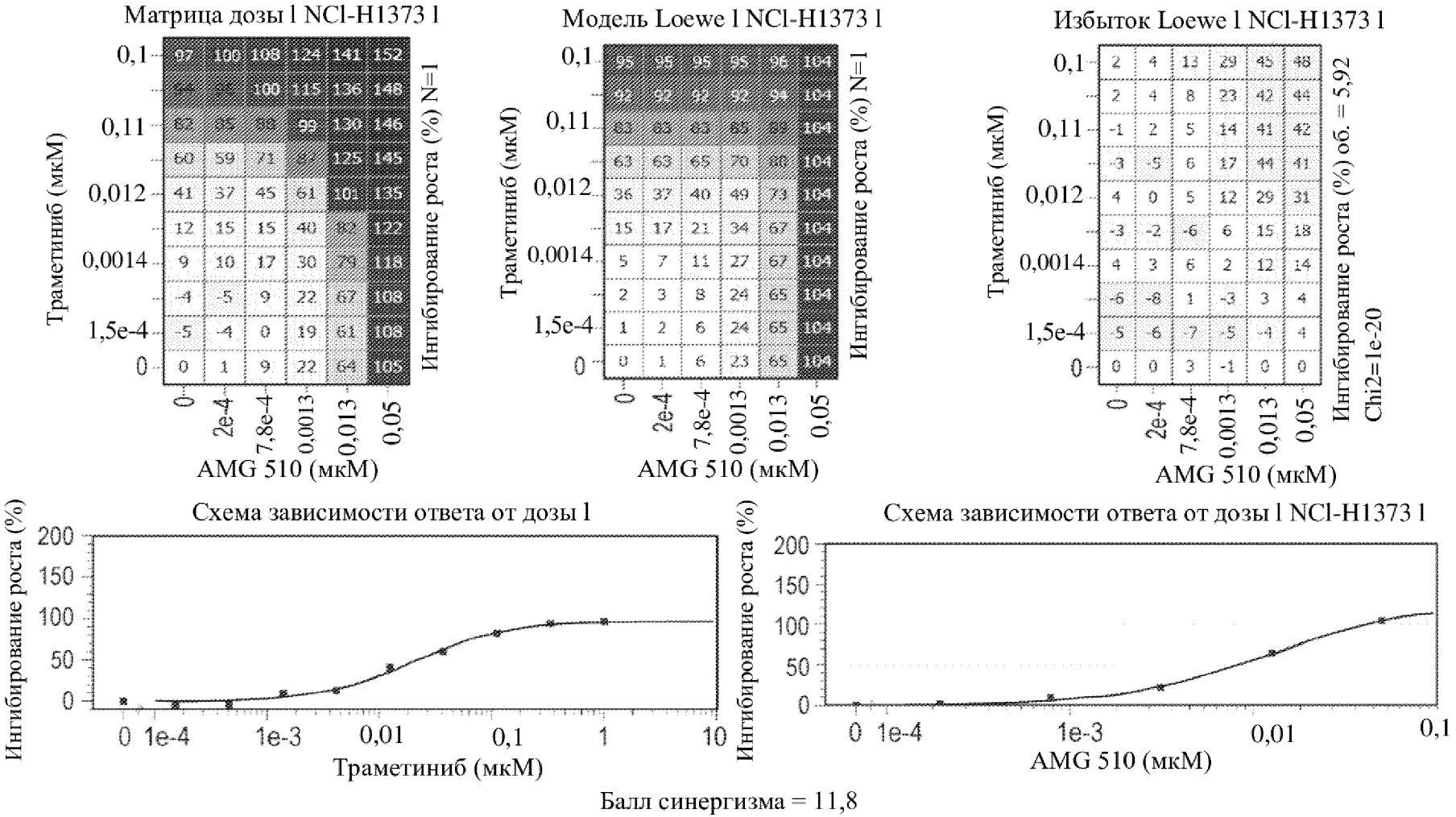

Матрица дозы l MIA PaCa-2 l
Траметиниб (мкМ)
0,2
0,022
0,0025
2,7e-4
3e-5
0
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Модель Loewe l MIA PaCa-2 l
Траметиниб (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Избыток Loewe l MIA PaCa-2
Траметиниб (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) об. = 2,42 (0,23)
Chi2=500
Схема зависимости ответа от дозы l MIA PaCa-2 l
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 1e-5 1e-4 1e-3 0,01 0,1 1
AMG 510 (мкМ)
Схема зависимости ответа от дозы l MIA PaCa-2 l
Ингибирование роста (%)
Траметиниб (мкМ)
Балл синергизма = 3,06

ФИГ. 16



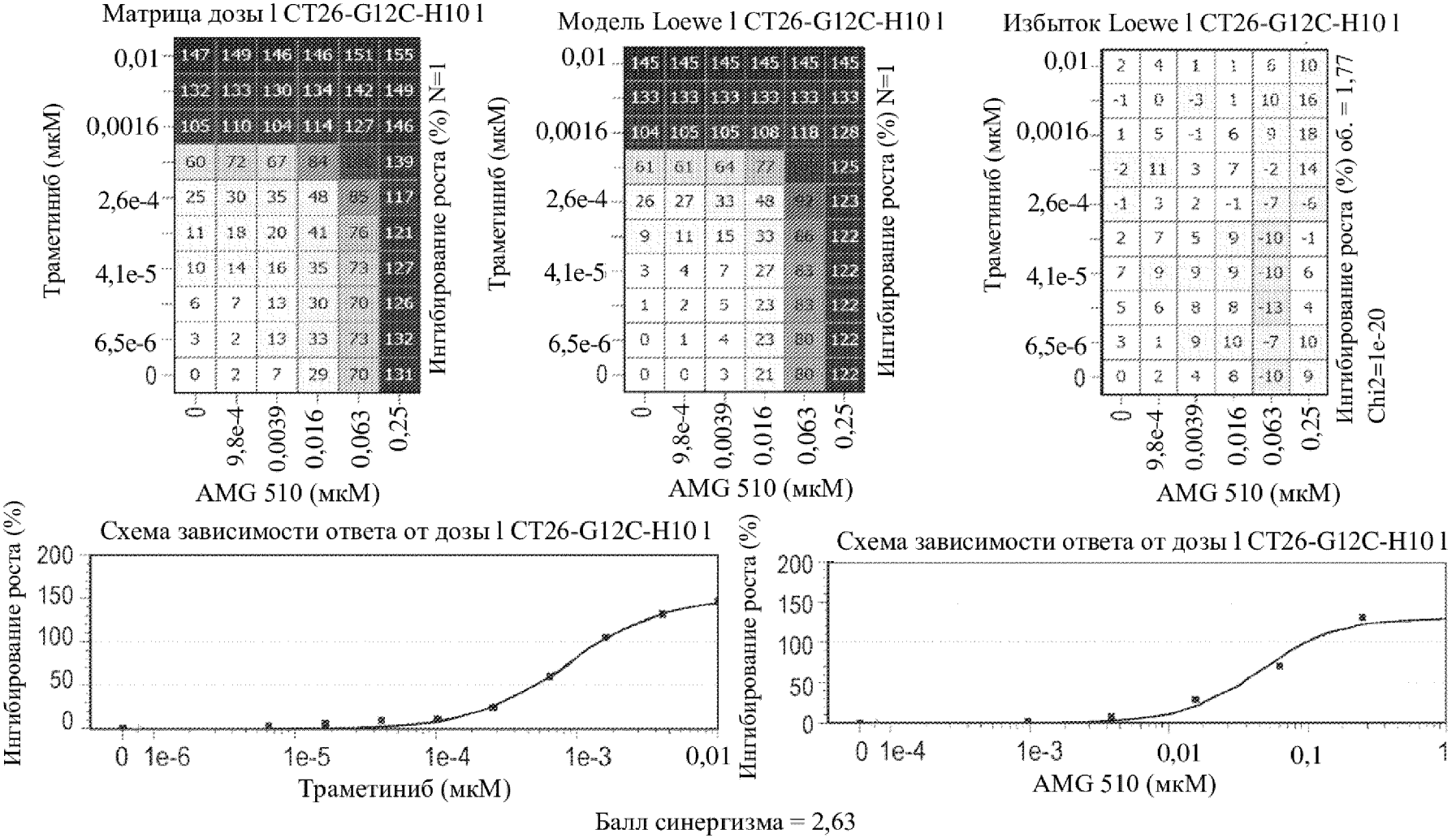
Балл синергизма = 8,31

ФИГ. 17

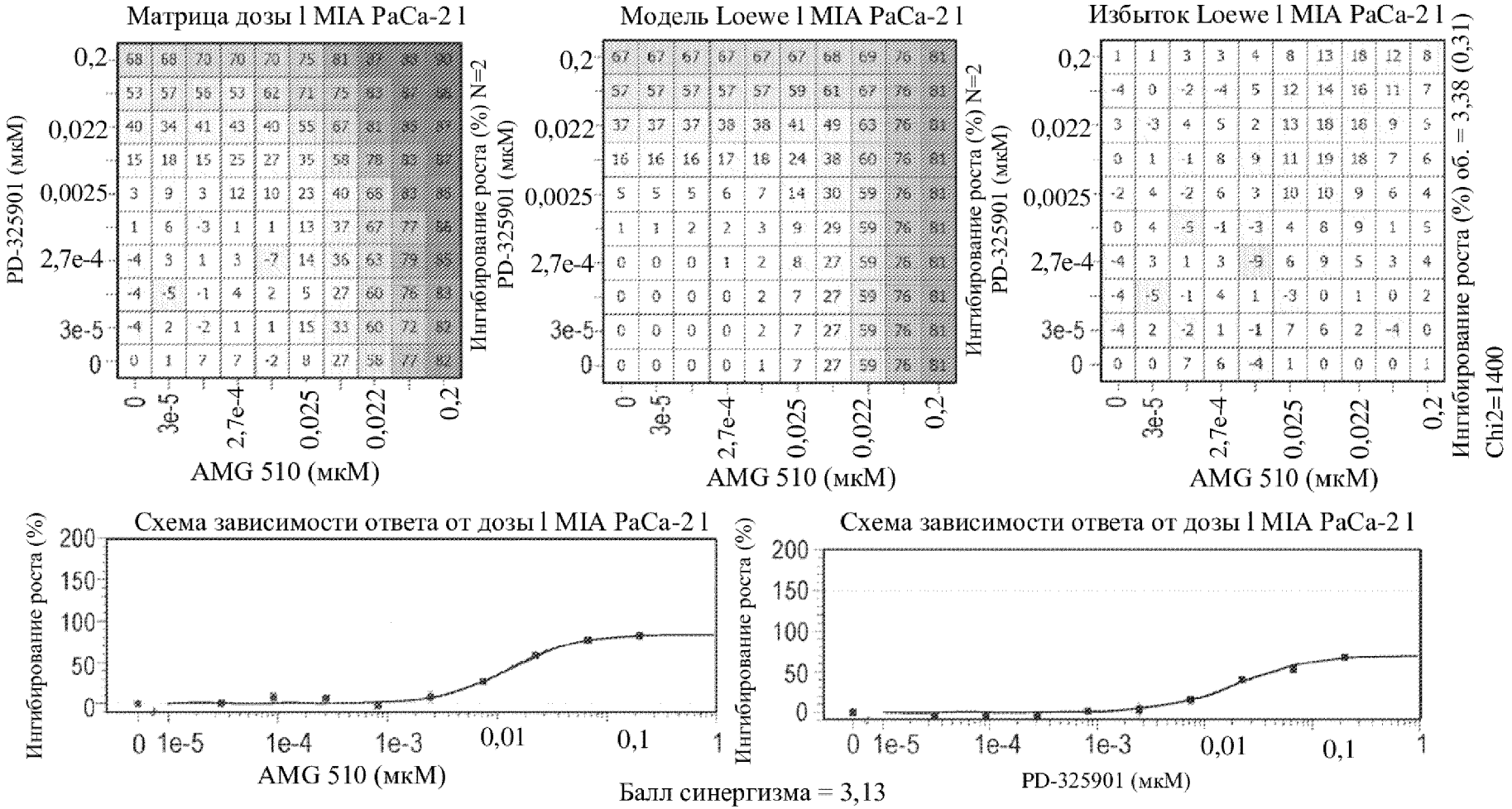


Балл синергизма = 11,8

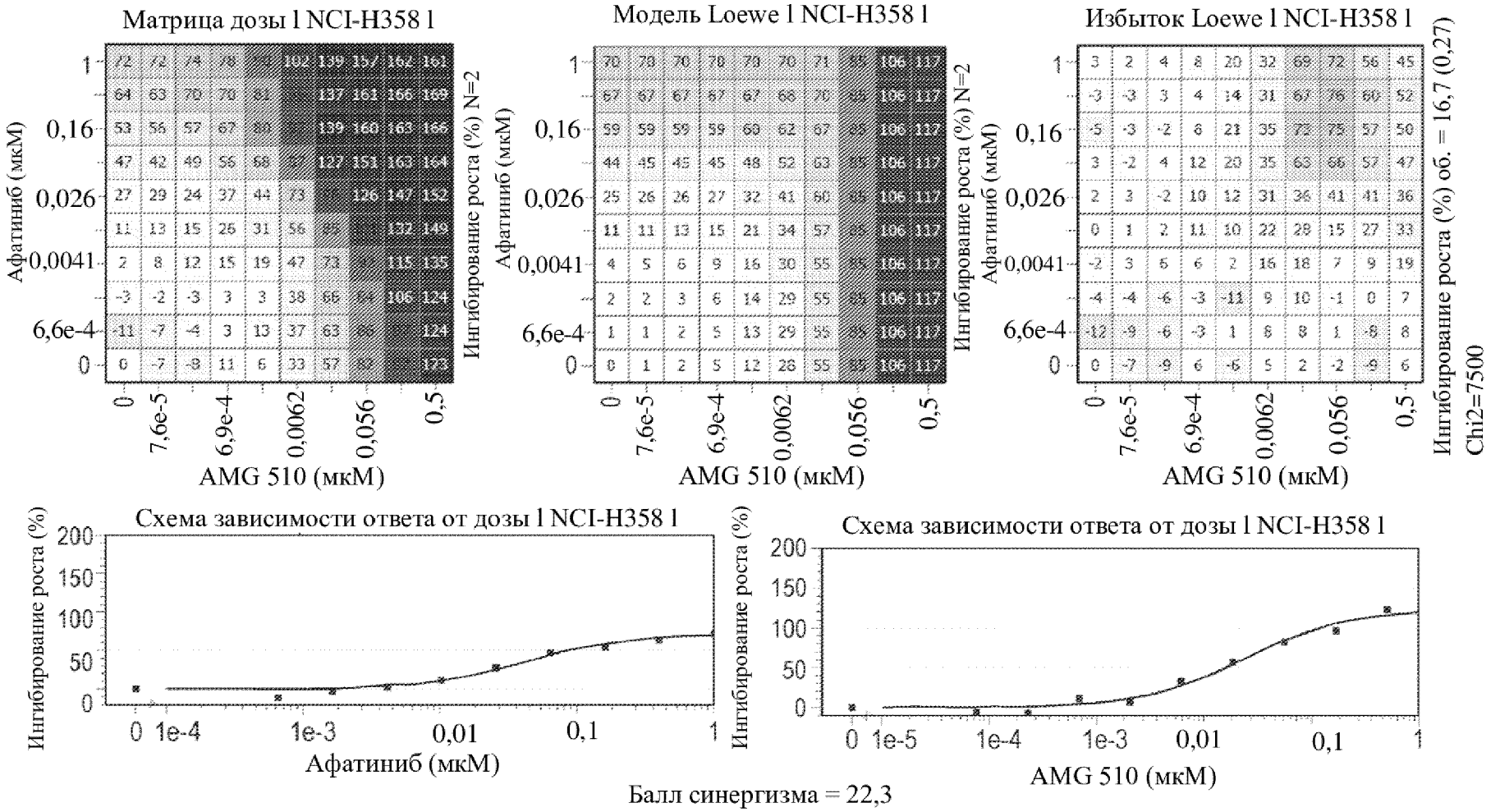
ФИГ. 18


Матрица дозы l CT26-G12C-H10 l
Траметиниб (мкМ)
0,01
0,0016
2,6e-4
4,1e-5
6,5e-6
0
147 149 146 146 151 155
132 133 130 134 142 149
105 110 104 114 127 146
60 72 67 84 139
25 30 35 48 117
11 18 20 41 121
10 14 16 35 127
6 7 13 30 126
3 2 13 33 132
0 2 7 29 131
0 9,8e-4 0,0039 0,016 0,063 0,25
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=1
Модель Loewe l CT26-G12C-H10 l
Траметиниб (мкМ)
0,01
0,0016
2,6e-4
4,1e-5
6,5e-6
0
145 145 145 145 145 145
133 133 133 133 133 133
104 105 105 108 118 128
61 61 64 77 125
26 27 33 48 123
9 11 15 33 122
3 4 7 27 122
1 2 5 23 122
0 1 4 23 122
0 0 3 21 122
0 9,8e-4 0,0039 0,016 0,063 0,25
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=1
Избыток Loewe l CT26-G12C-H10 l
Траметиниб (мкМ)
0,01
0,0016
2,6e-4
4,1e-5
6,5e-6
0
2 4 1 1 6 10
-1 0 -3 1 10 16
1 5 -1 6 9 18
-2 11 3 7 -2 14
-1 3 2 -1 -7 -6
2 7 5 9 -10 -1
7 9 9 9 -10 6
5 6 8 8 -13 4
3 1 9 10 -7 10
0 2 4 8 -10 9
0 9,8e-4 0,0039 0,016 0,063 0,25
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) об. = 1,77
Chi2=1e-20
Схема зависимости ответа от дозы l CT26-G12C-H10 l
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 1e-6 1e-5 1e-4 1e-3 0,01
Траметиниб (мкМ)
Схема зависимости ответа от дозы l CT26-G12C-H10 l
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 1e-4 1e-3 0,01 0,1 1
AMG 510 (мкМ)
Балл синергизма = 2,63

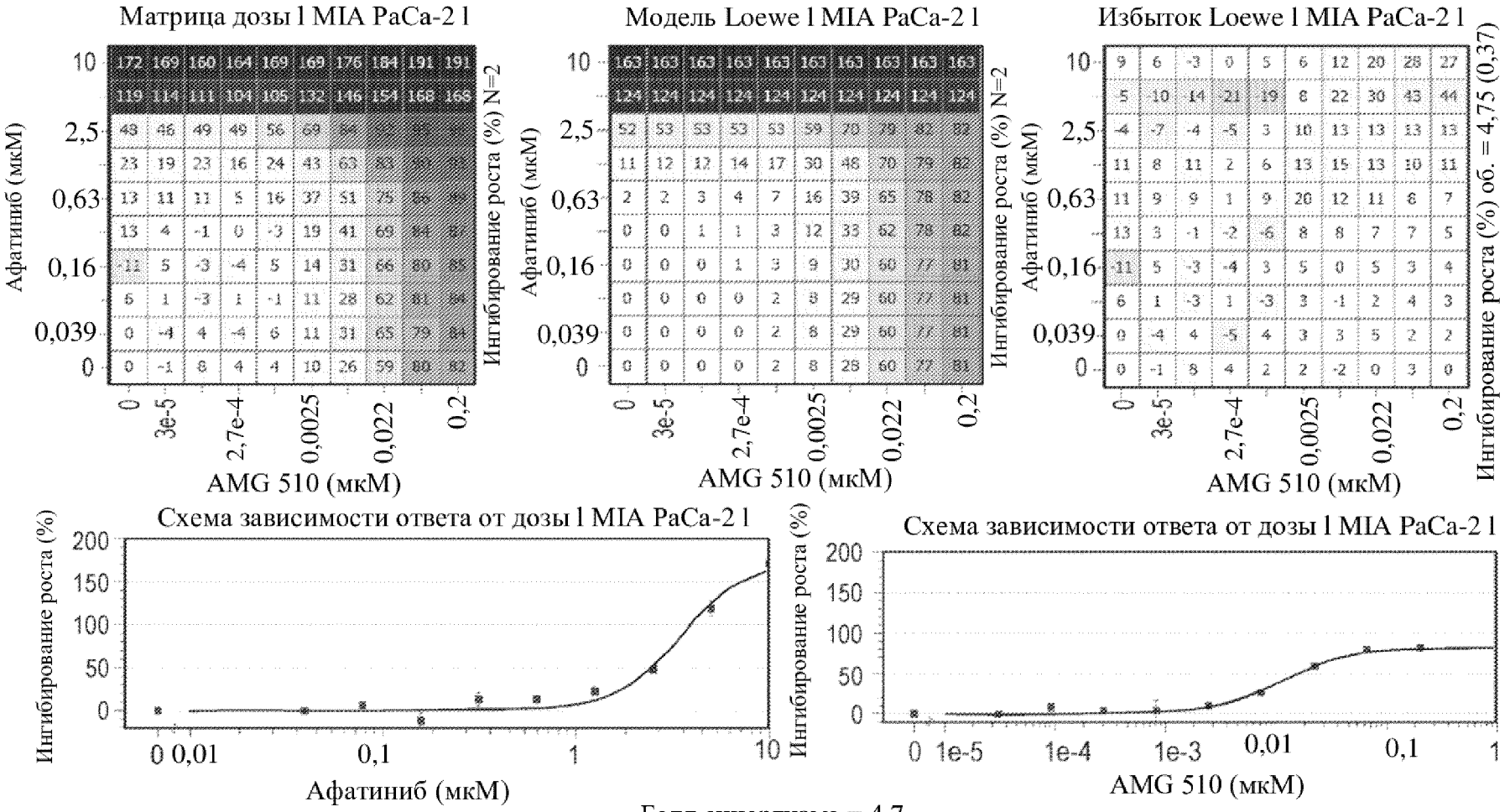
ФИГ. 19


Матрица дозы 1 MIA PaCa-2 1
PD-325901 (мкМ)
0,2
0,022
0,0025
2,7e-4
3e-5
0
AMG 510 (мкМ)
0
3e-5
2,7e-4
0,025
0,022
0,2
Ингибирование роста (%) N=2
Модель Loewe 1 MIA PaCa-2 1
Избыток Loewe 1 MIA PaCa-2 1
Ингибирование роста (%) об. = 3,38 (0,31)
Chi2=1400
Схема зависимости ответа от дозы 1 MIA PaCa-2 1
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 1e-5 1e-4 1e-3 0,01 0,1 1
AMG 510 (мкМ)
PD-325901 (мкМ)
Балл синергизма = 3,13

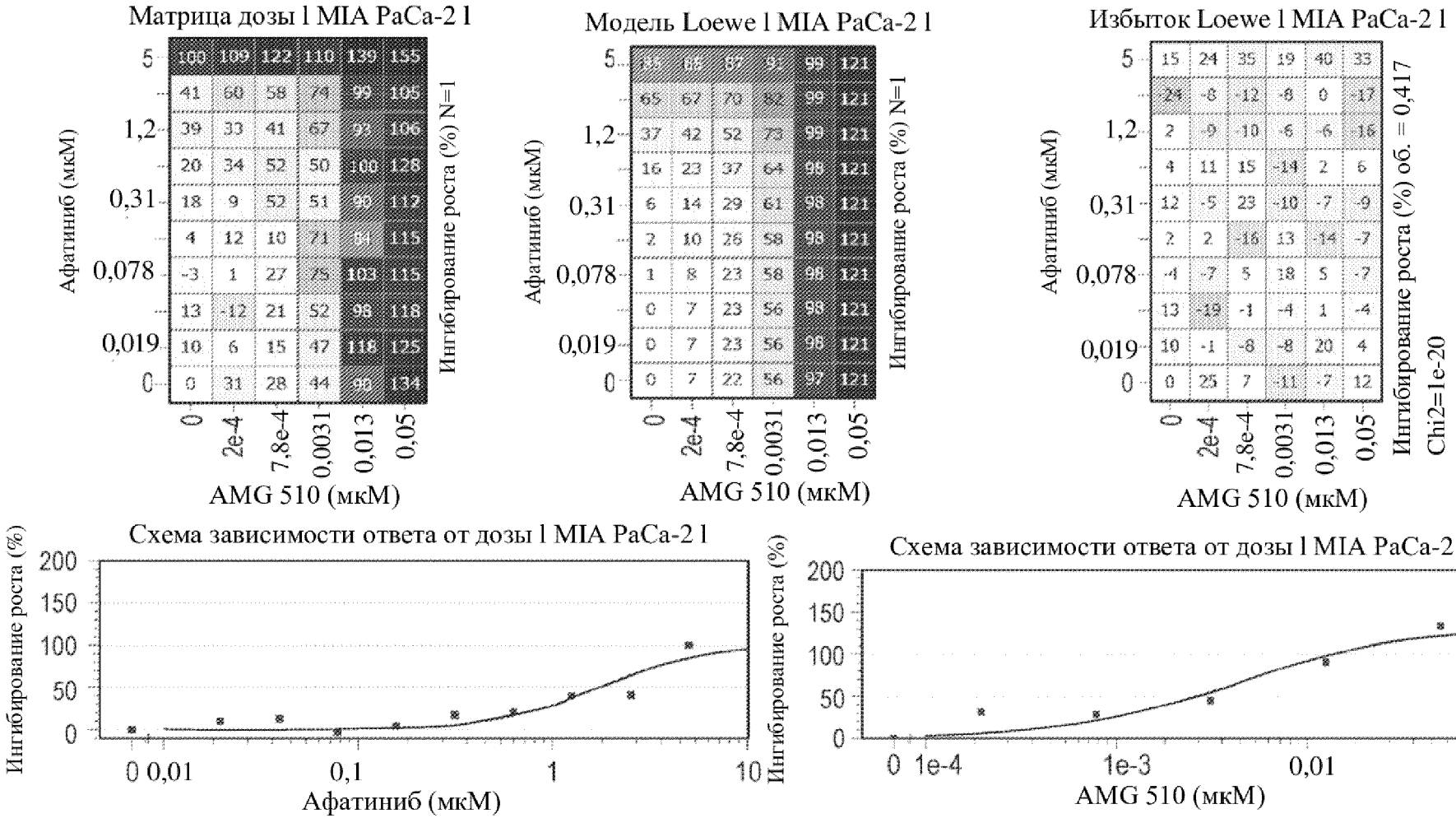
ФИГ. 20


Матрица дозы l NCI-H358 l
Модель Loewe l NCI-H358 l
Избыток Loewe l NCI-H358 l
Афатиниб (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Ингибирование роста (%) об. = 16,7 (0,27)
Chi2=7500
Схема зависимости ответа от дозы l NCI-H358 l
Ингибирование роста (%)
Афатиниб (мкМ)
Балл синергизма = 22,3

ФИГ. 21

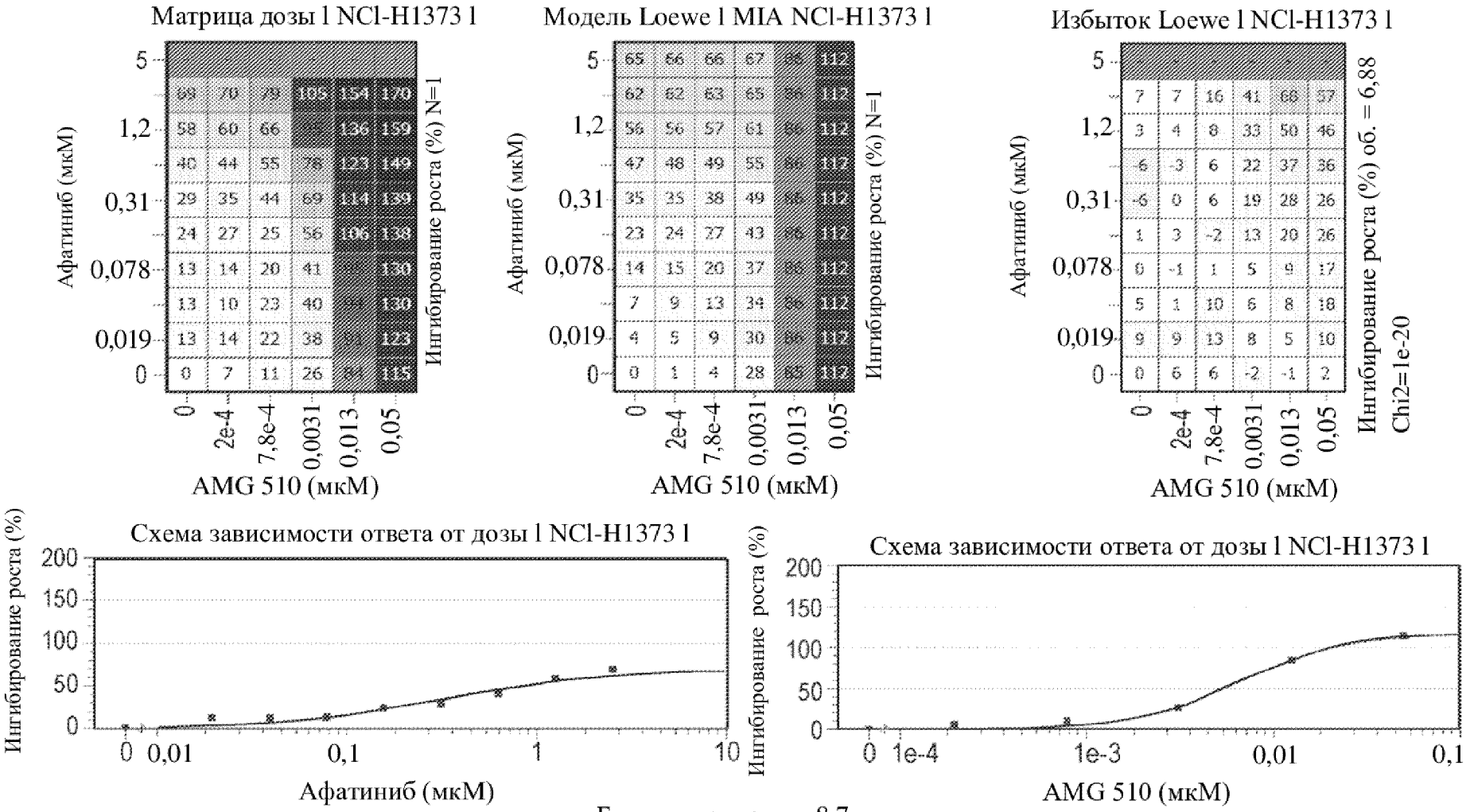

Матрица дозы 1 MIA PaCa-2 1
Модель Loewe 1 MIA PaCa-2 1
Избыток Loewe 1 MIA PaCa-2 1
Афатиниб (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) об. = 4,75 (0,37)
Chi2=1400
Схема зависимости ответа от дозы 1 MIA PaCa-2 1
Ингибирование роста (%)
Афатиниб (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Балл синергизма = 4,7

ФИГ. 22

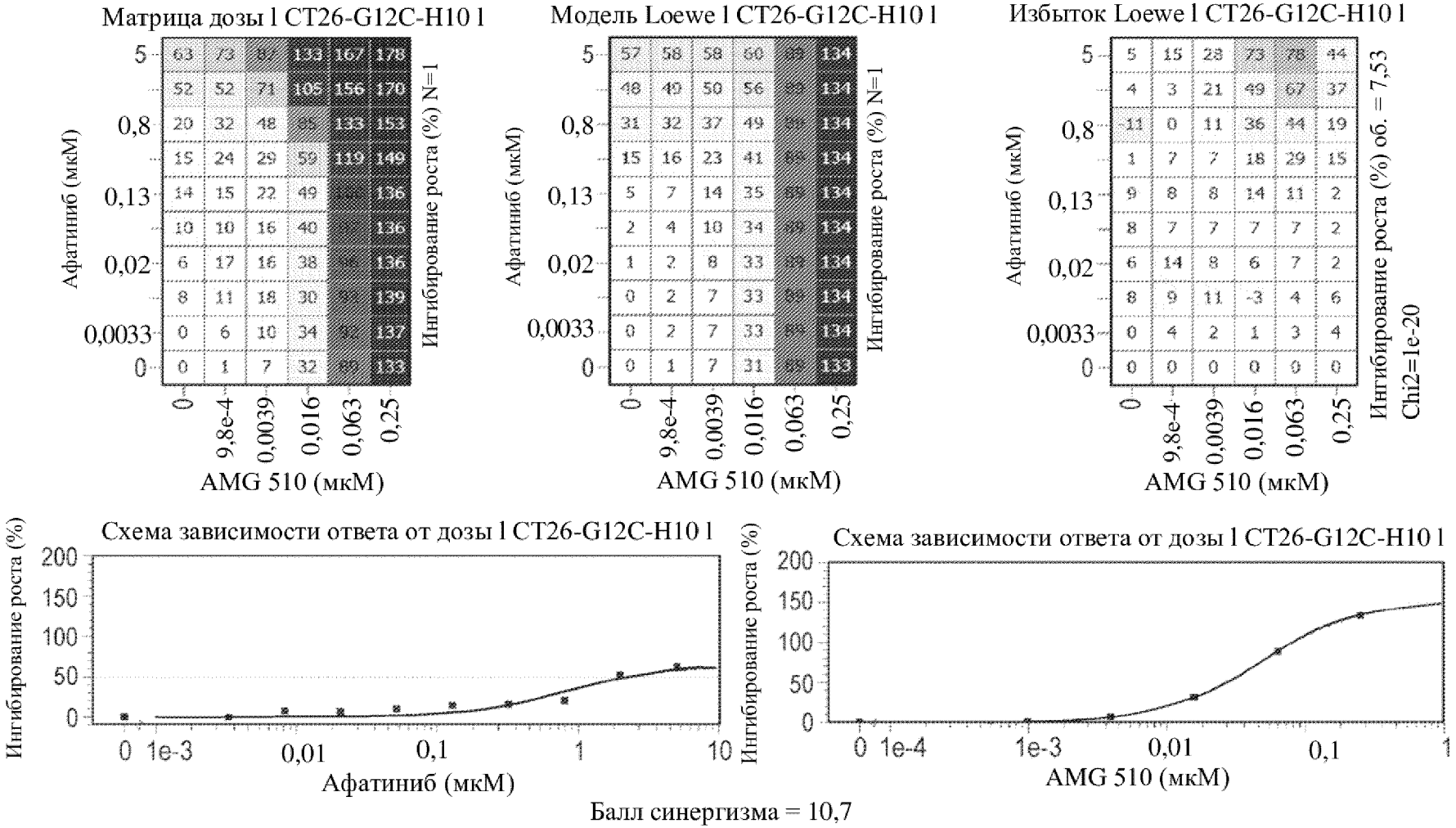


Балл синергизма = 2,76

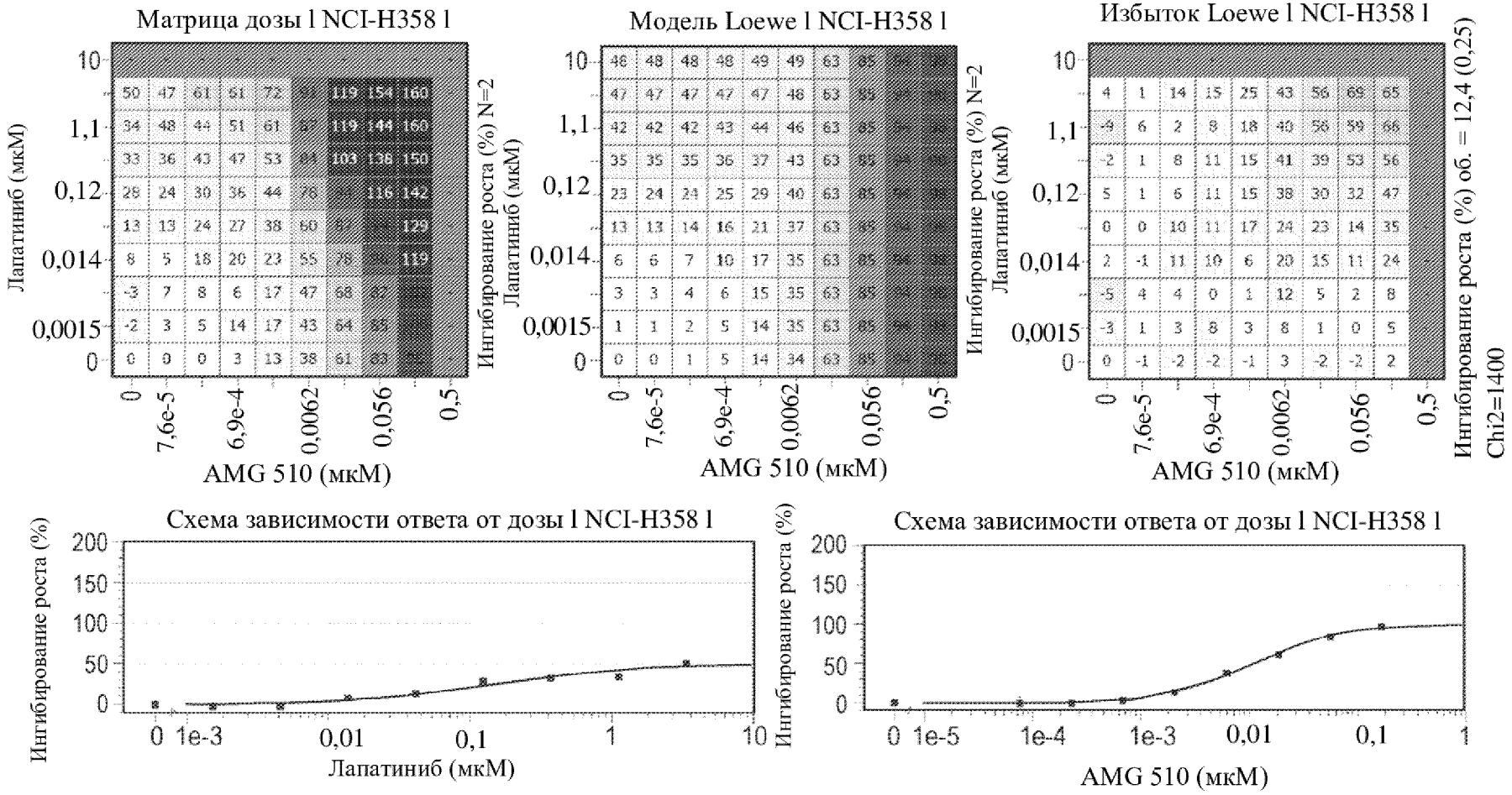
ФИГ. 23


Матрица дозы l NCl-H1373 l
Афатиниб (мкМ)
5
1,2
0,31
0,078
0,019
0
69 70 79 105 154 170
58 60 66 136 159
40 44 55 78 123 149
29 35 44 69 114 139
24 27 25 56 106 138
13 14 20 41 130
13 10 23 40 130
13 14 22 38 123
0 7 11 26 115
0 2e-4 7,8e-4 0,0031 0,013 0,05
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=1
Модель Loewe l MIA NCl-H1373 l
Афатиниб (мкМ)
5
1,2
0,31
0,078
0,019
0
65 66 66 67 112
62 62 63 65 112
56 56 57 61 112
47 48 49 55 117
35 35 38 49 112
23 24 27 43 112
14 15 20 37 112
7 9 13 34 112
4 5 9 30 117
0 1 4 28 112
0 2e-4 7,8e-4 0,0031 0,013 0,05
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=1
Избыток Loewe l NCl-H1373 l
Афатиниб (мкМ)
5
1,2
0,31
0,078
0,019
0
7 7 16 41 68 57
3 4 8 33 50 46
-6 -3 6 22 37 36
-6 0 6 19 28 26
1 3 -2 13 20 26
0 -1 1 5 9 17
5 1 10 6 8 18
9 9 13 8 5 10
0 6 6 -2 -1 2
0 2e-4 7,8e-4 0,0031 0,013 0,05
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) об. = 6,88
Chi2=1e-20
Схема зависимости ответа от дозы l NCl-H1373 l
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 0,01 0,1 1 10
Афатиниб (мкМ)
Схема зависимости ответа от дозы l NCl-H1373 l
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 1e-4 1e-3 0,01 0,1
AMG 510 (мкМ)
Балл синергизма = 8,7

ФИГ. 24

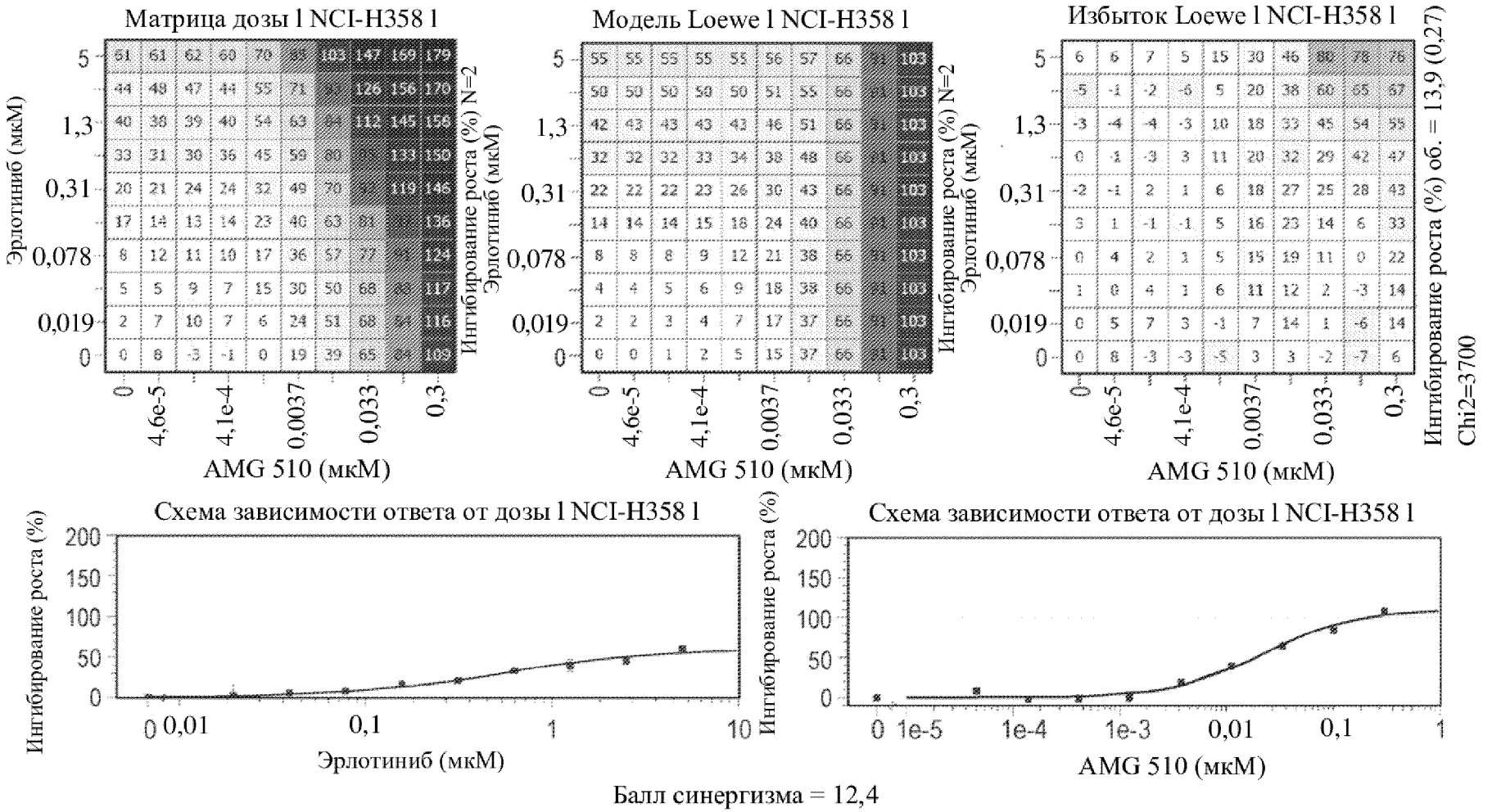

Матрица дозы l CT26-G12C-H10 l
Модель Loewe l CT26-G12C-H10 l
Избыток Loewe l CT26-G12C-H10 l
Афатиниб (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=1
Ингибирование роста (%) об. = 7,53
Chi2=1e-20
Схема зависимости ответа от дозы l CT26-G12C-H10 l
Ингибирование роста (%)
Афатиниб (мкМ)
Балл синергизма = 10,7

ФИГ. 25

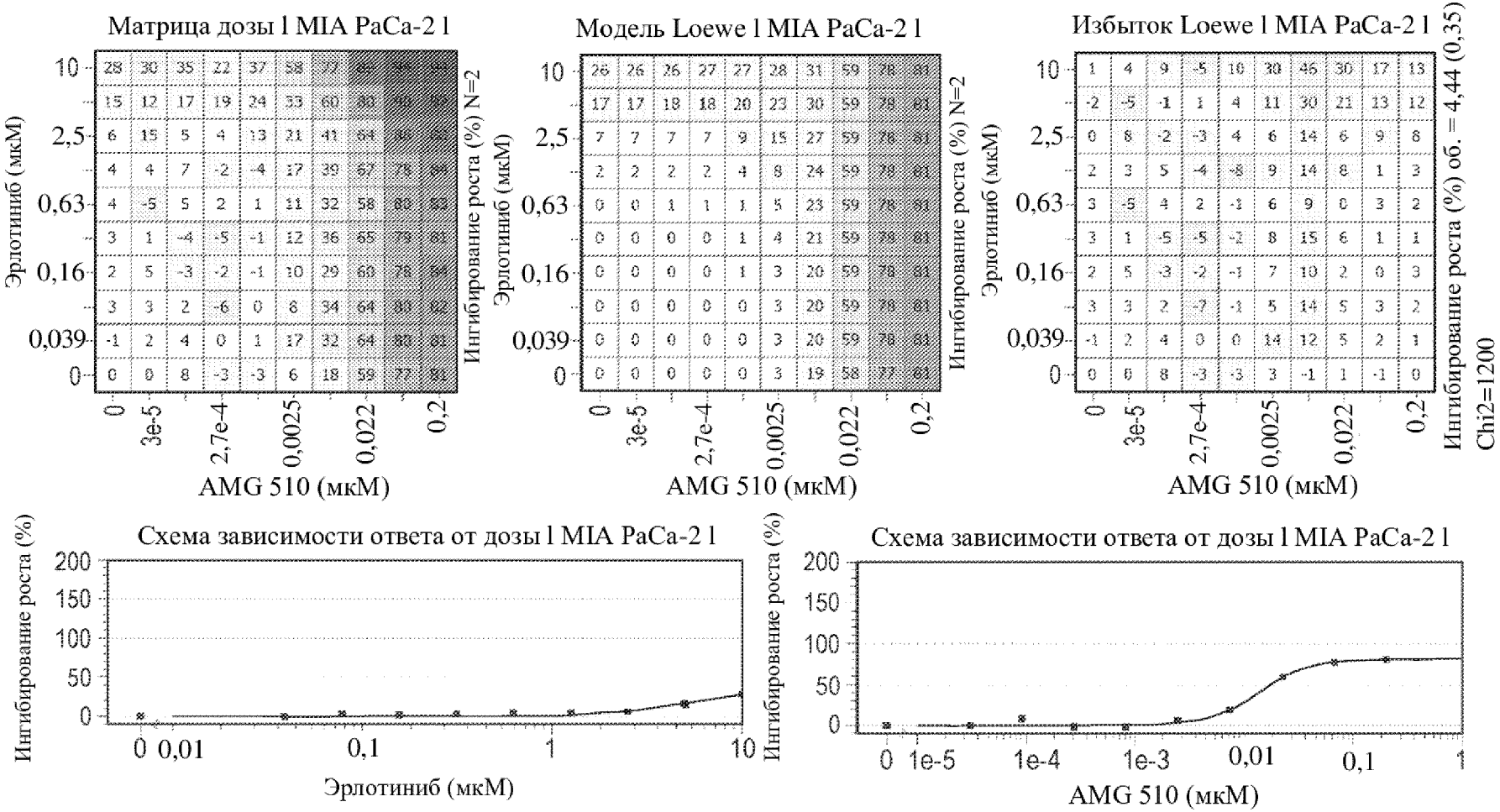


Балл синергизма = 19,7

ФИГ. 26

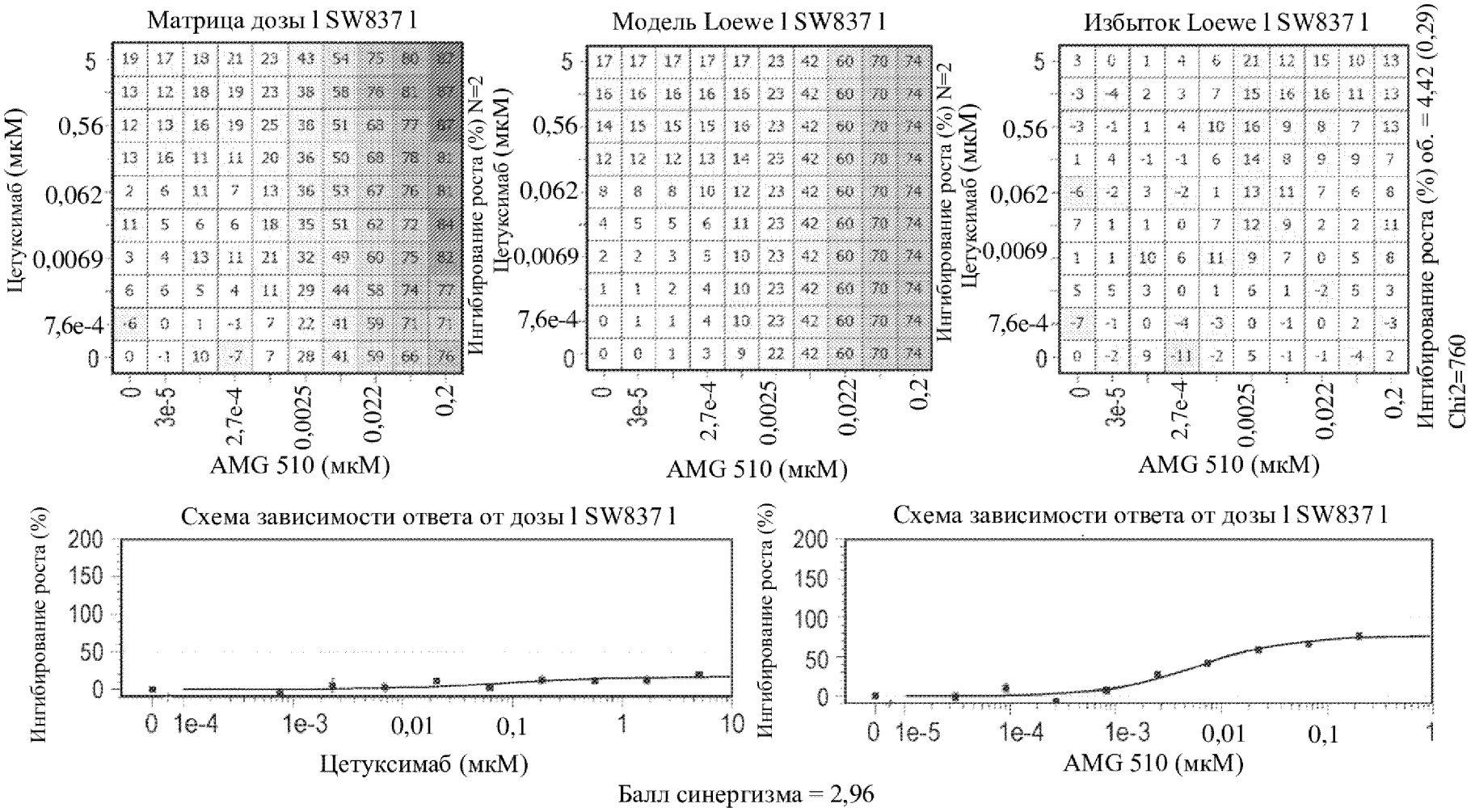

Матрица дозы l NCI-H358 l
Эрлотиниб (мкМ)
5
1,3
0,31
0,078
0,019
0
Ингибирование роста (%) N=2
0
4,6e-5
4,1e-4
0,0037
0,033
0,3
AMG 510 (мкМ)
Модель Loewe l NCI-H358 l
Эрлотиниб (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
AMG 510 (мкМ)
Избыток Loewe l NCI-H358 l
Эрлотиниб (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) об. = 13,9 (0,27)
Chi2=3700
Схема зависимости ответа от дозы l NCI-H358 l
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0 0,01
0,1
1
10
Эрлотиниб (мкМ)
Схема зависимости ответа от дозы l NCI-H358 l
Ингибирование роста (%)
0 1e-5
1e-4
1e-3
0,01
0,1
1
AMG 510 (мкМ)
Балл синергизма = 12,4

ФИГ. 27



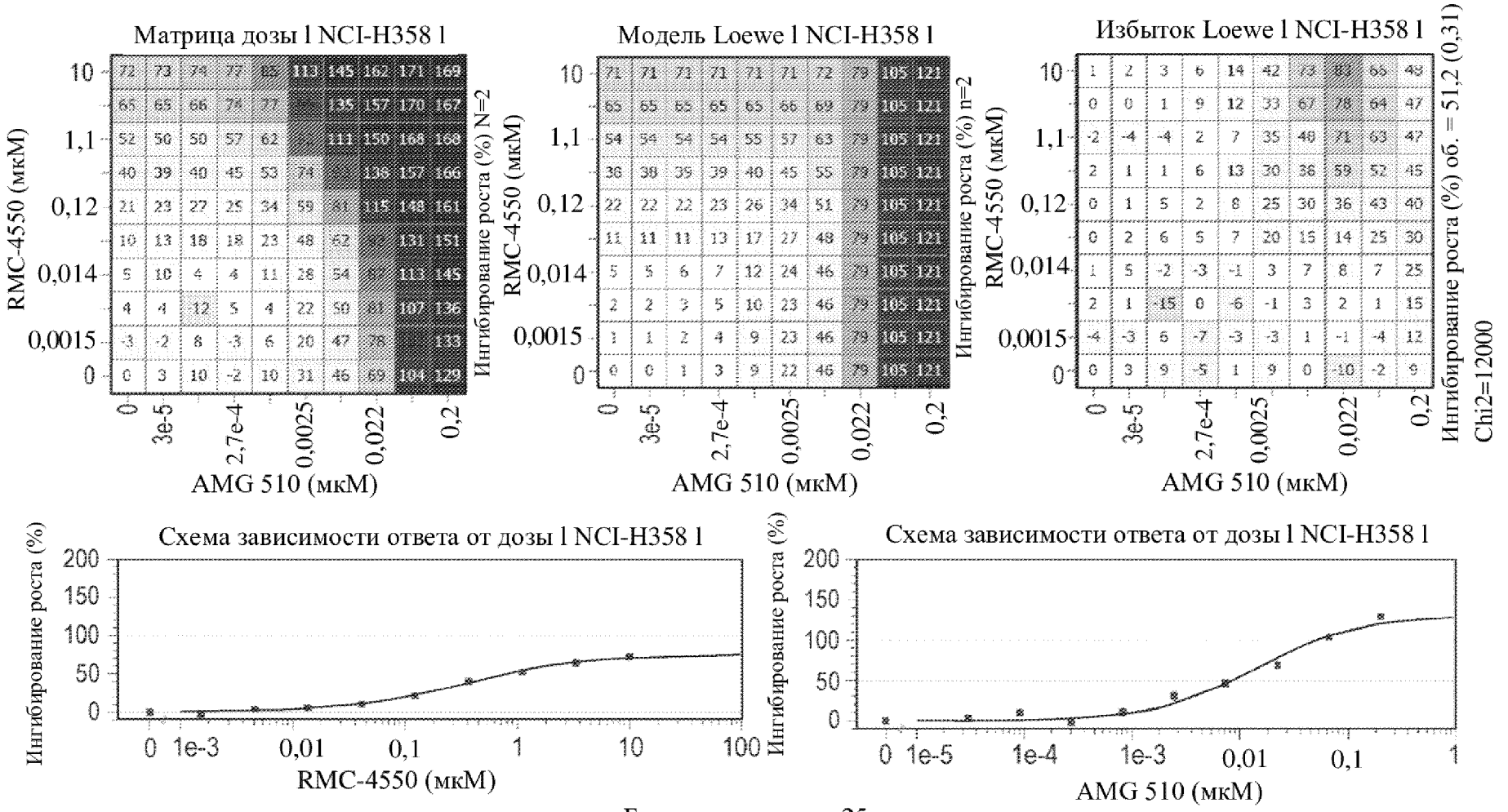
Балл синергизма = 2,07

ФИГ. 28



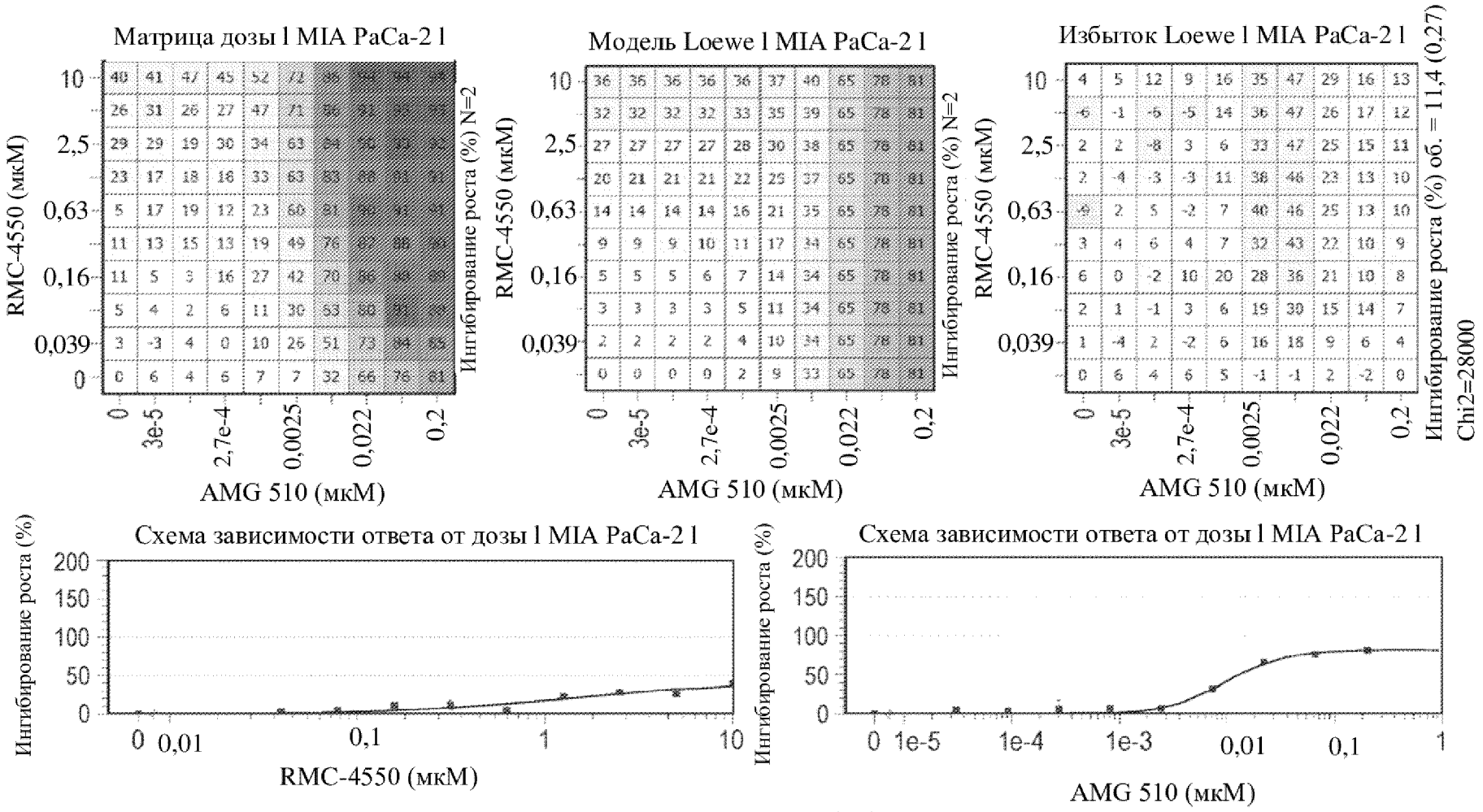
Балл синергизма = 2,96

ФИГ. 29



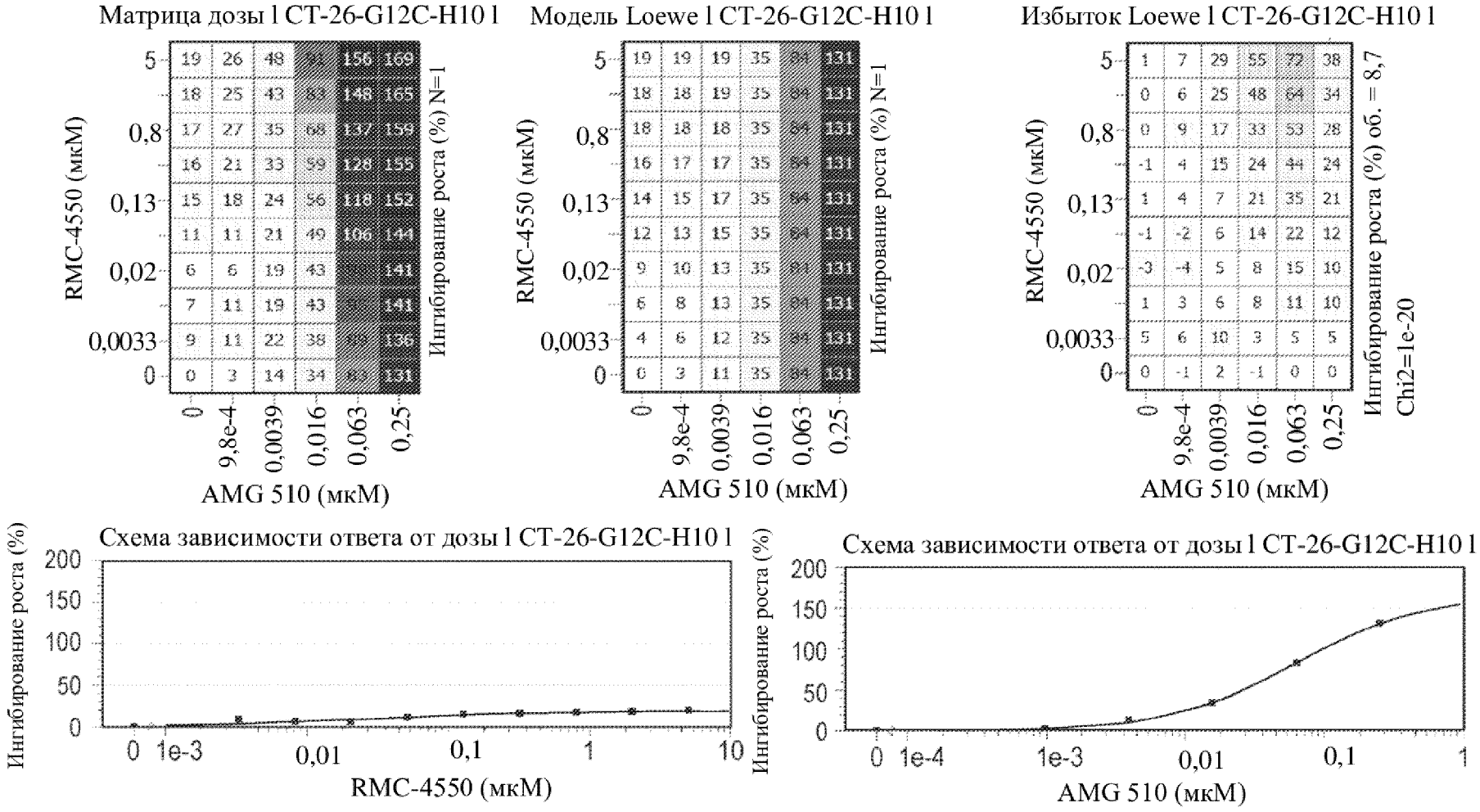
Балл синергизма = 25

ФИГ. 30



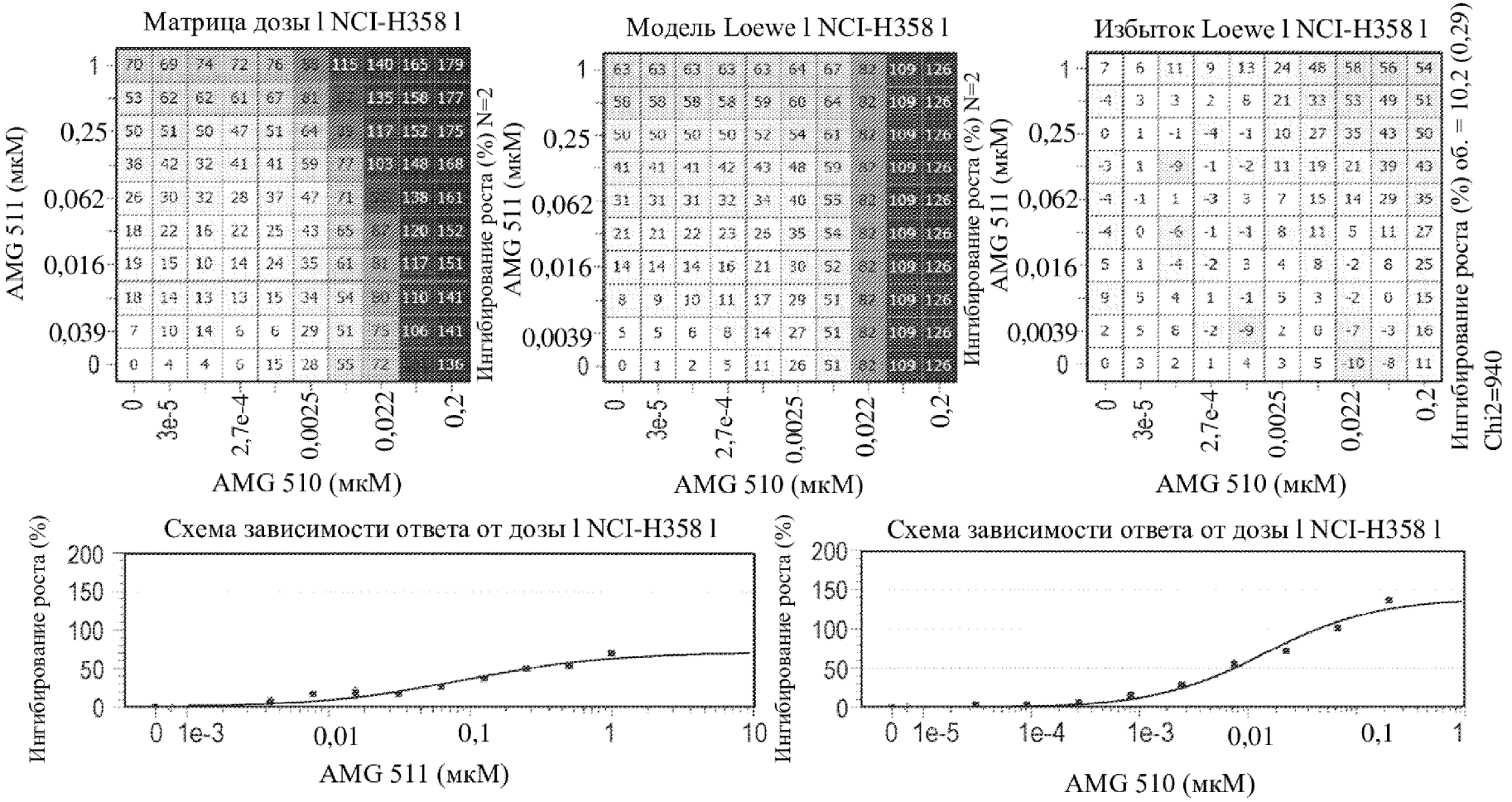
Балл синергизма = 6,36

ФИГ. 31



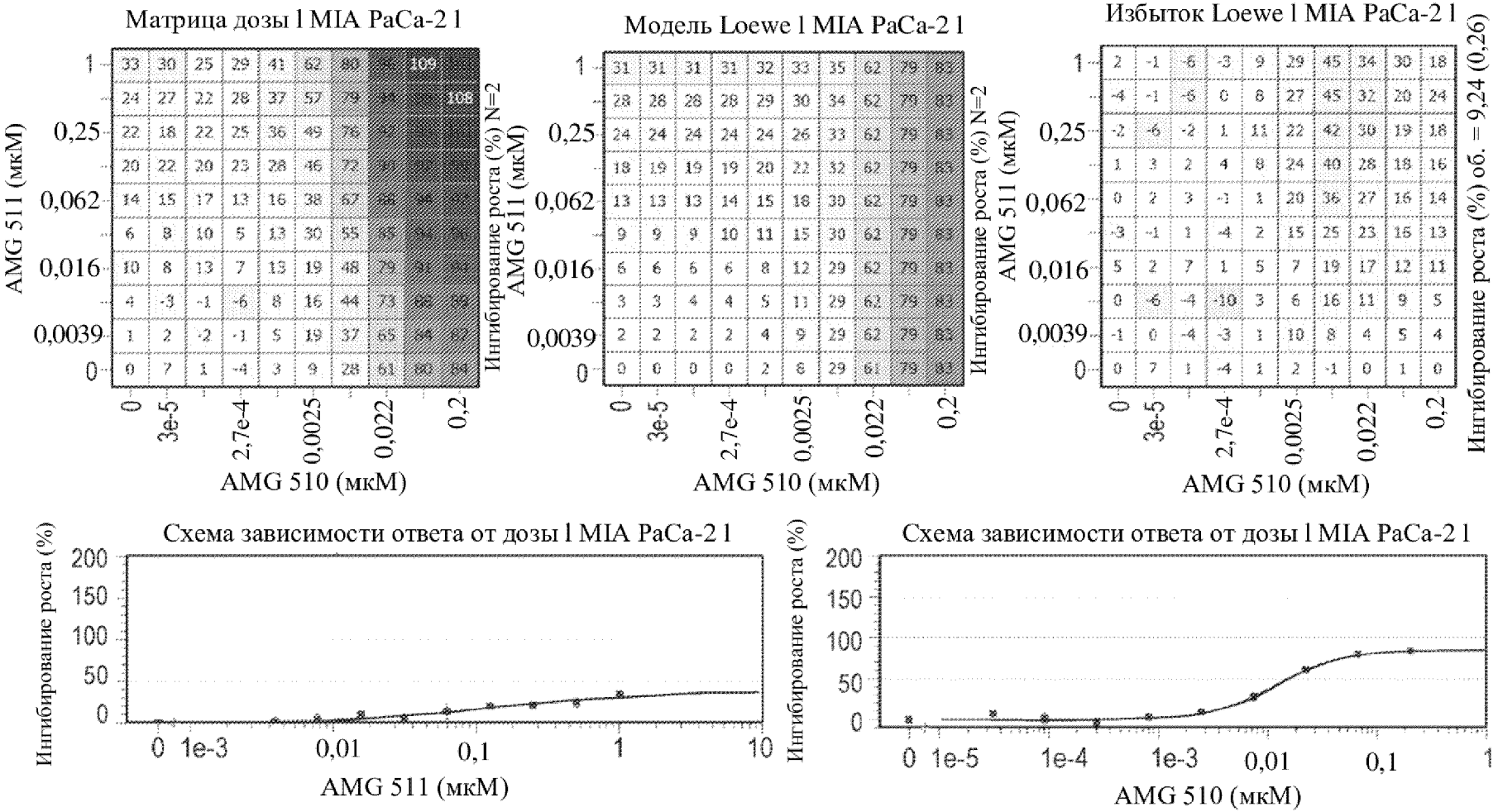
Балл синергизма = 11,7

ФИГ. 32

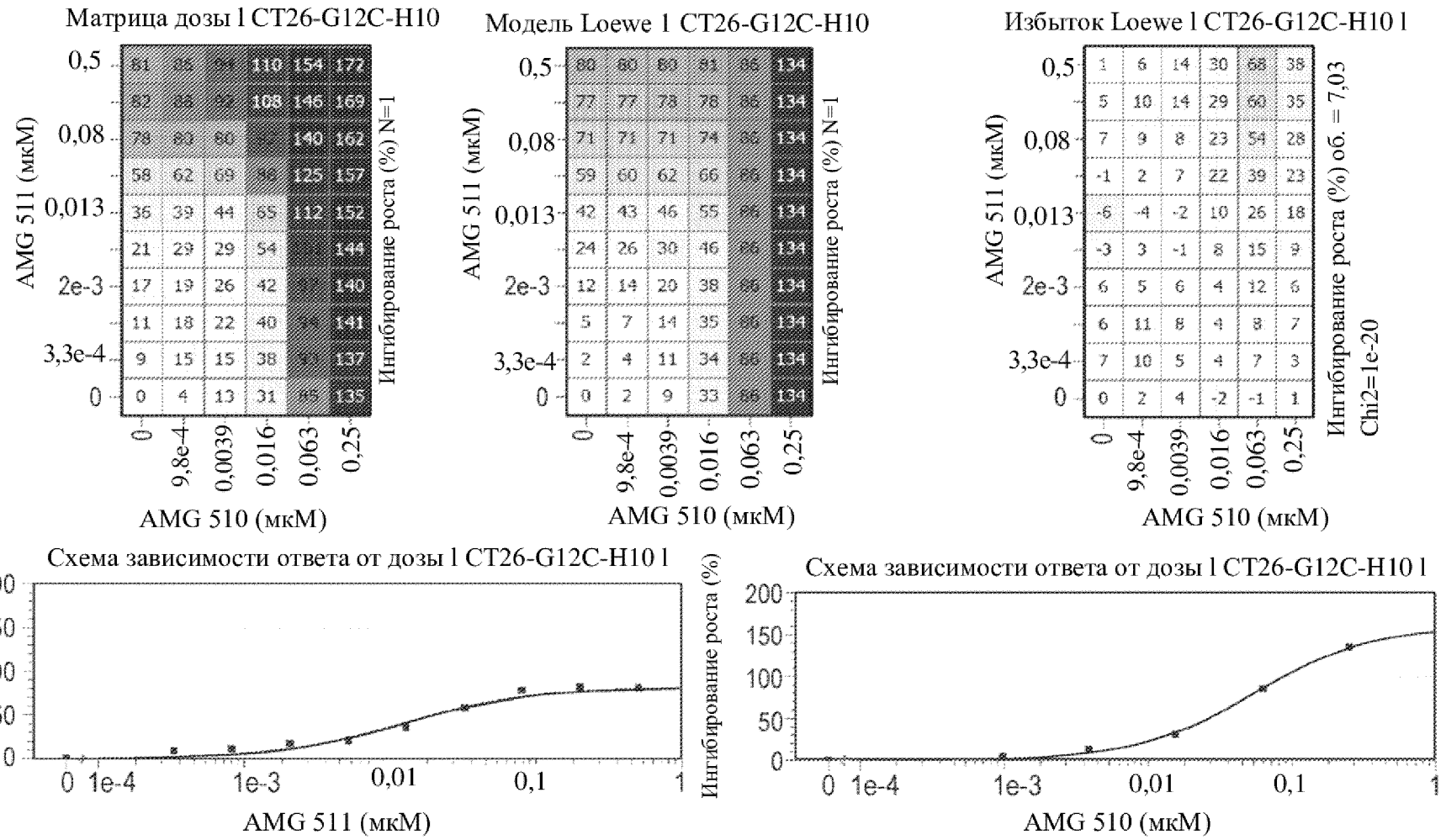


Балл синергизма = 10,5

ФИГ. 33

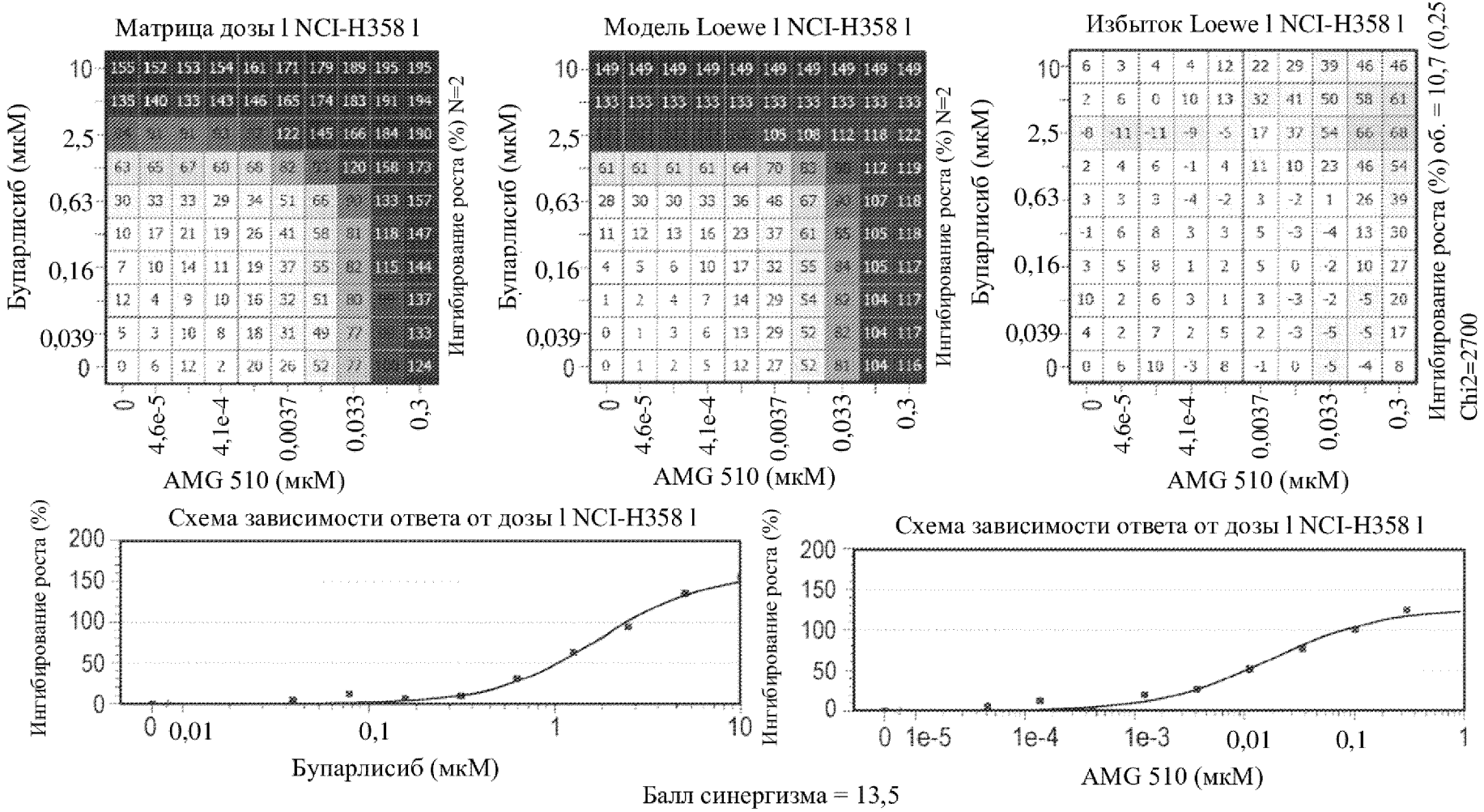

Матрица дозы l MIA PaCa-2 l
Модель Loewe l MIA PaCa-2 l
Избыток Loewe l MIA PaCa-2 l
AMG 511 (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Ингибирование роста (%) об. = 9,24 (0,26)
Chi2=2800
Схема зависимости ответа от дозы l MIA PaCa-2 l
Ингибирование роста (%)
AMG 511 (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Балл синергизма = 5,53

ФИГ. 34

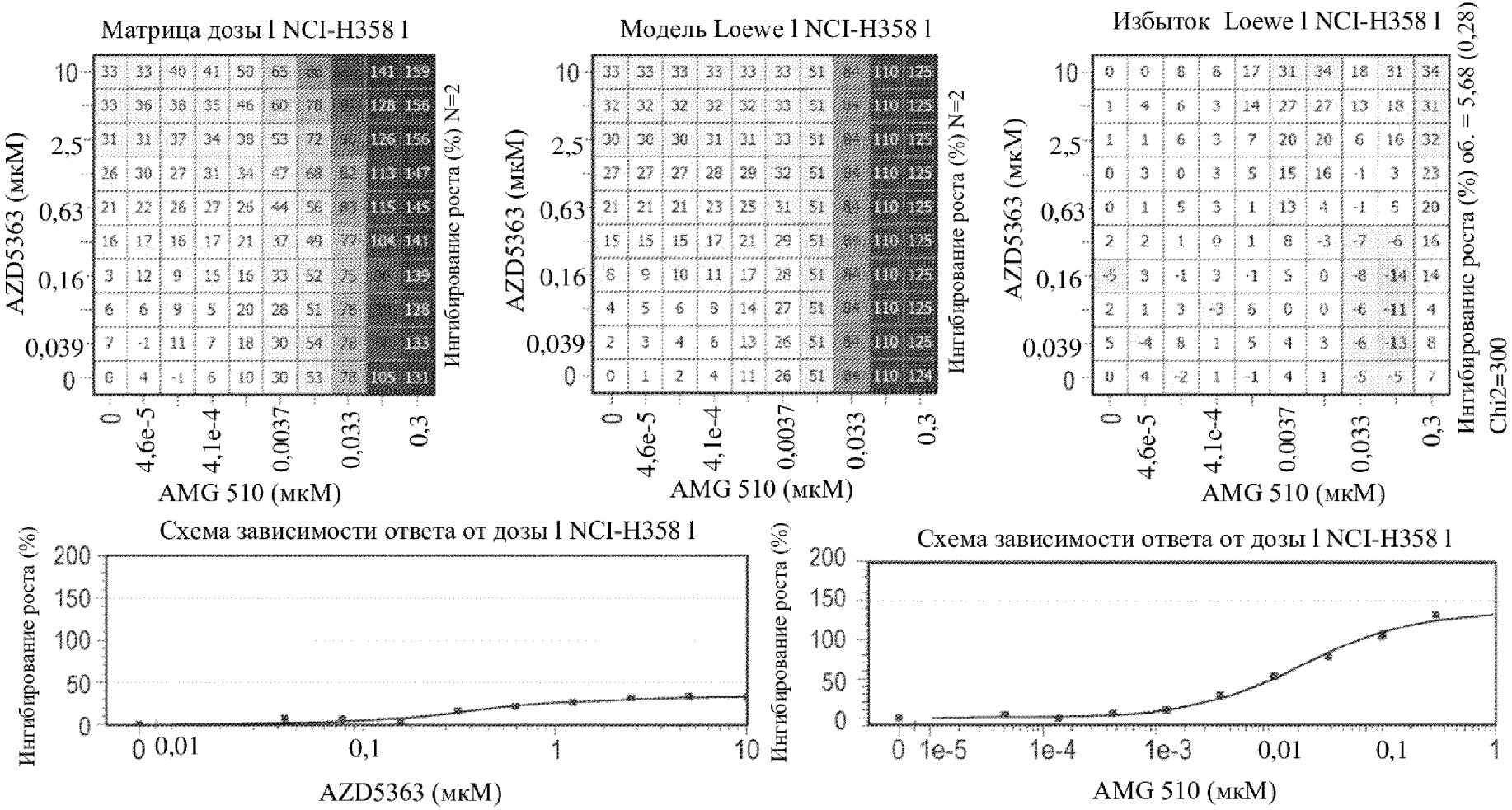


Балл синергизма = 10,8

ФИГ. 35

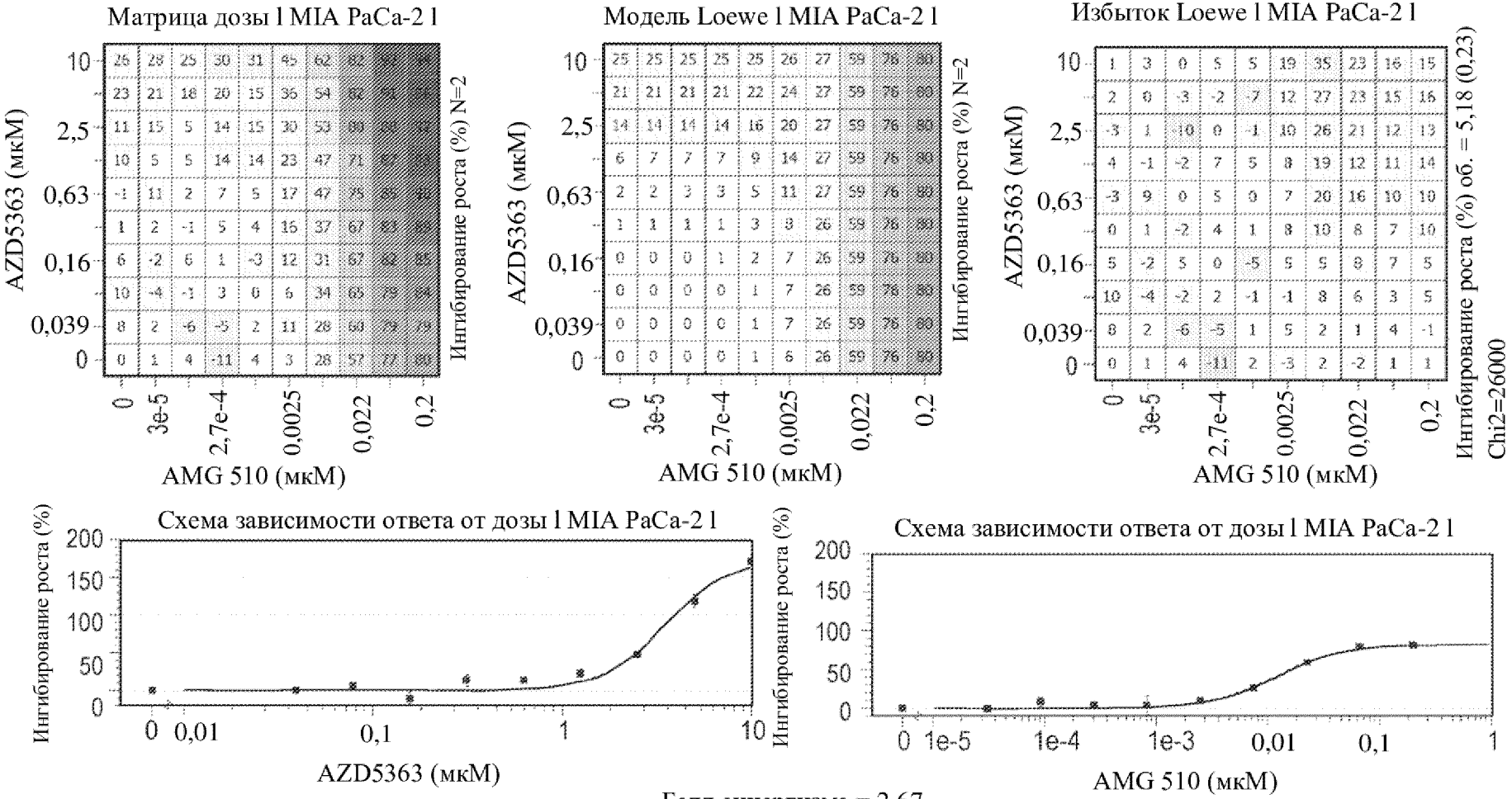

Матрица дозы l NCI-H358 l
Бупарлисиб (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Модель Loewe l NCI-H358 l
Избыток Loewe l NCI-H358 l
Ингибирование роста (%) об. = 10,7 (0,25)
Chi2=2700
Схема зависимости ответа от дозы l NCI-H358 l
Ингибирование роста (%)
Бупарлисиб (мкМ)
Балл синергизма = 13,5

ФИГ. 36

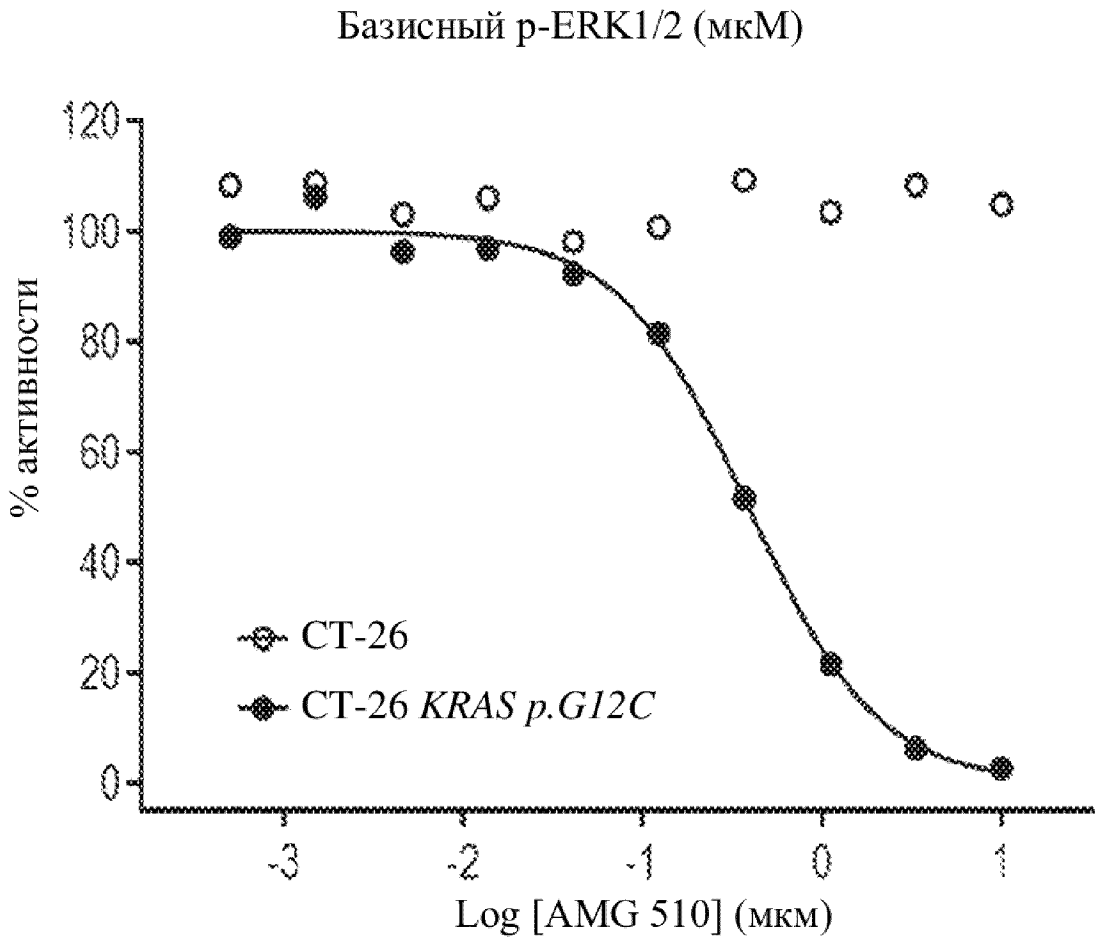


Балл синергизма = 4,53

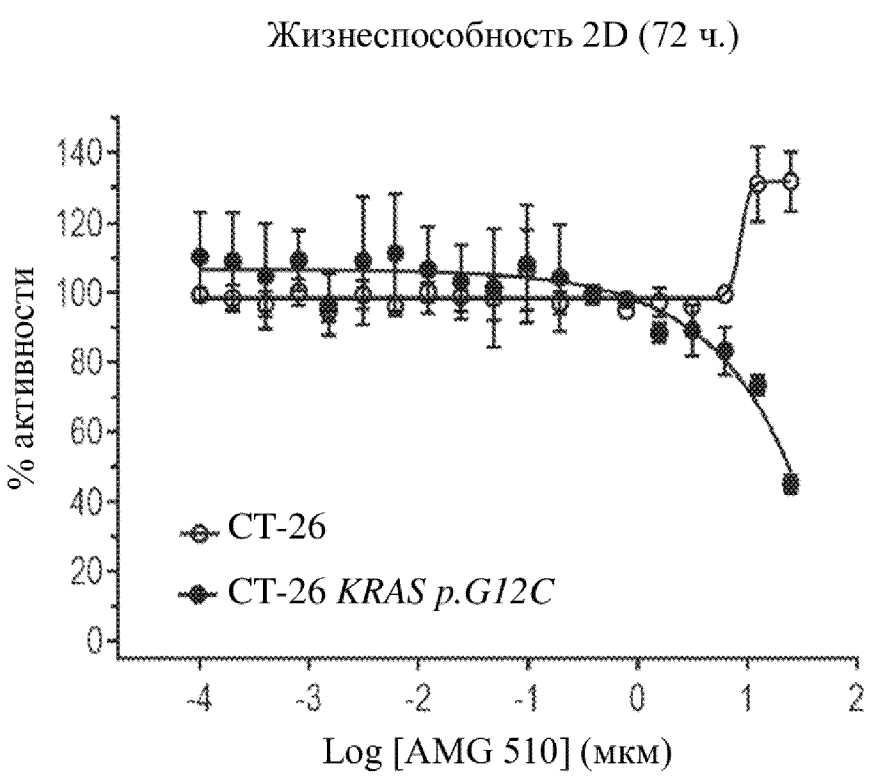
ФИГ. 37


Матрица дозы l MIA PaCa-2 l
AZD5363 (мкМ)
10
2,5
0,63
0,16
0,039
0
0
3e-5
2,7e-4
0,0025
0,022
0,2
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Модель Loewe l MIA PaCa-2 l
AZD5363 (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) N=2
Избыток Loewe l MIA PaCa-2 l
AZD5363 (мкМ)
AMG 510 (мкМ)
Ингибирование роста (%) об. = 5,18 (0,23)
Chi2=26000
Схема зависимости ответа от дозы l MIA PaCa-2 l
Ингибирование роста (%)
200
150
100
50
0
0
0,01
0,1
1
10
AZD5363 (мкМ)
Схема зависимости ответа от дозы l MIA PaCa-2 l
Ингибирование роста (%)
0
1e-5
1e-4
1e-3
0,01
0,1
1
AMG 510 (мкМ)
Балл синергизма = 2,67

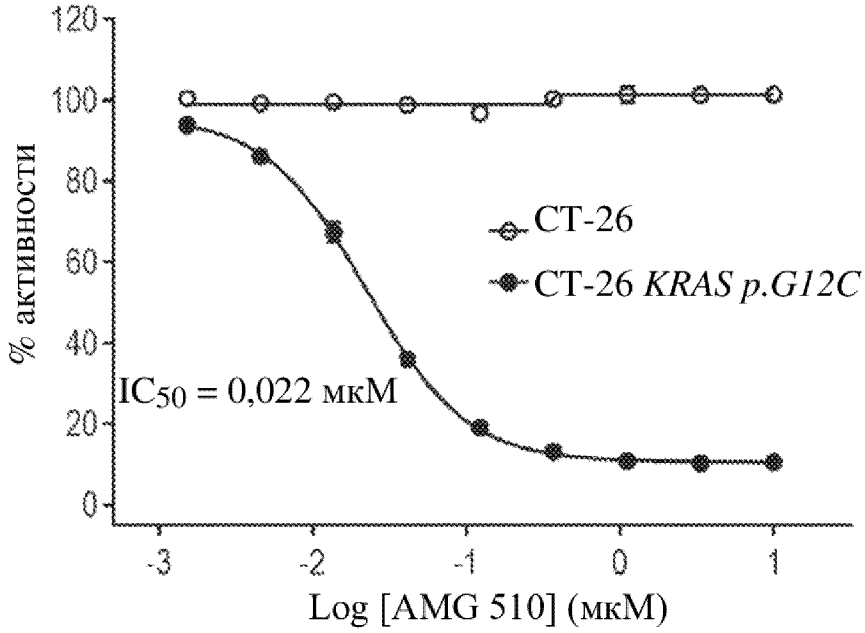
ФИГ. 38


Базисный p-ERK1/2 (мкМ)
% активности
120
100
80
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
Log [AMG 510] (мкм)
CT-26
CT-26 KRAS p.G12C

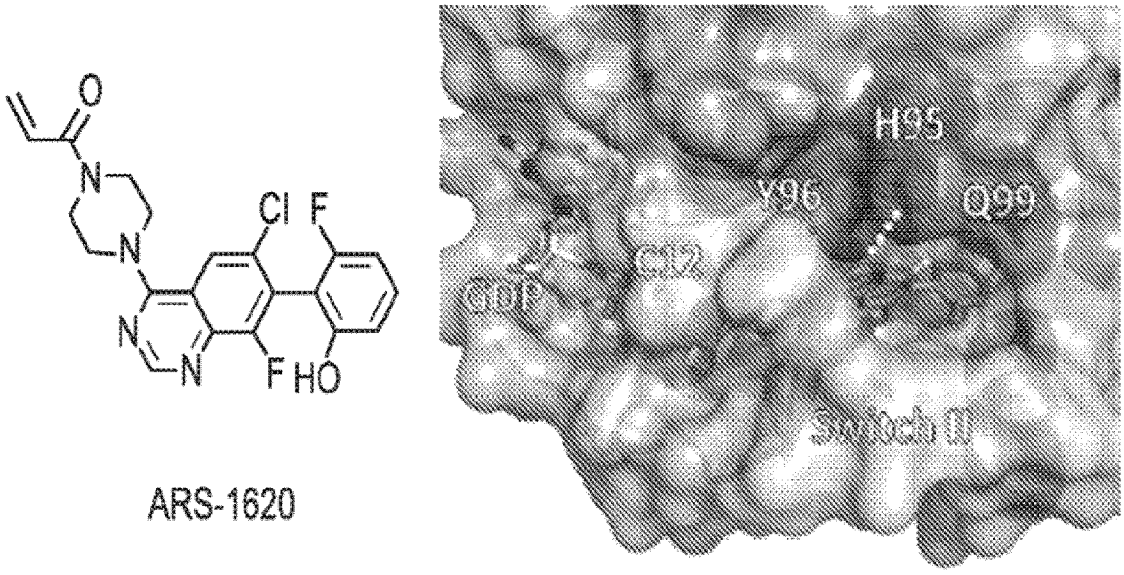
ФИГ. 39A



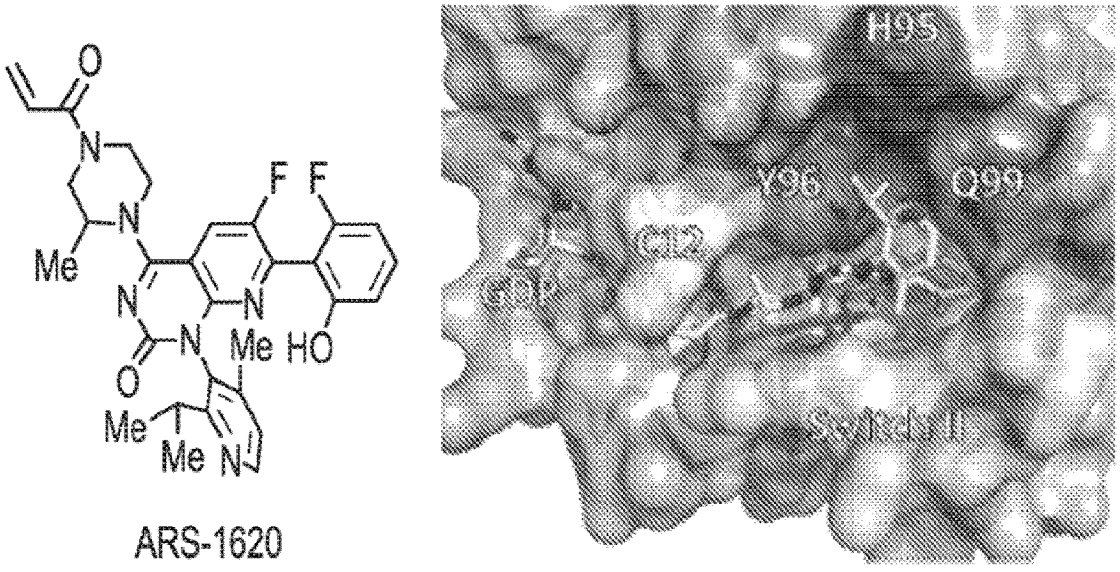
ФИГ. 39B



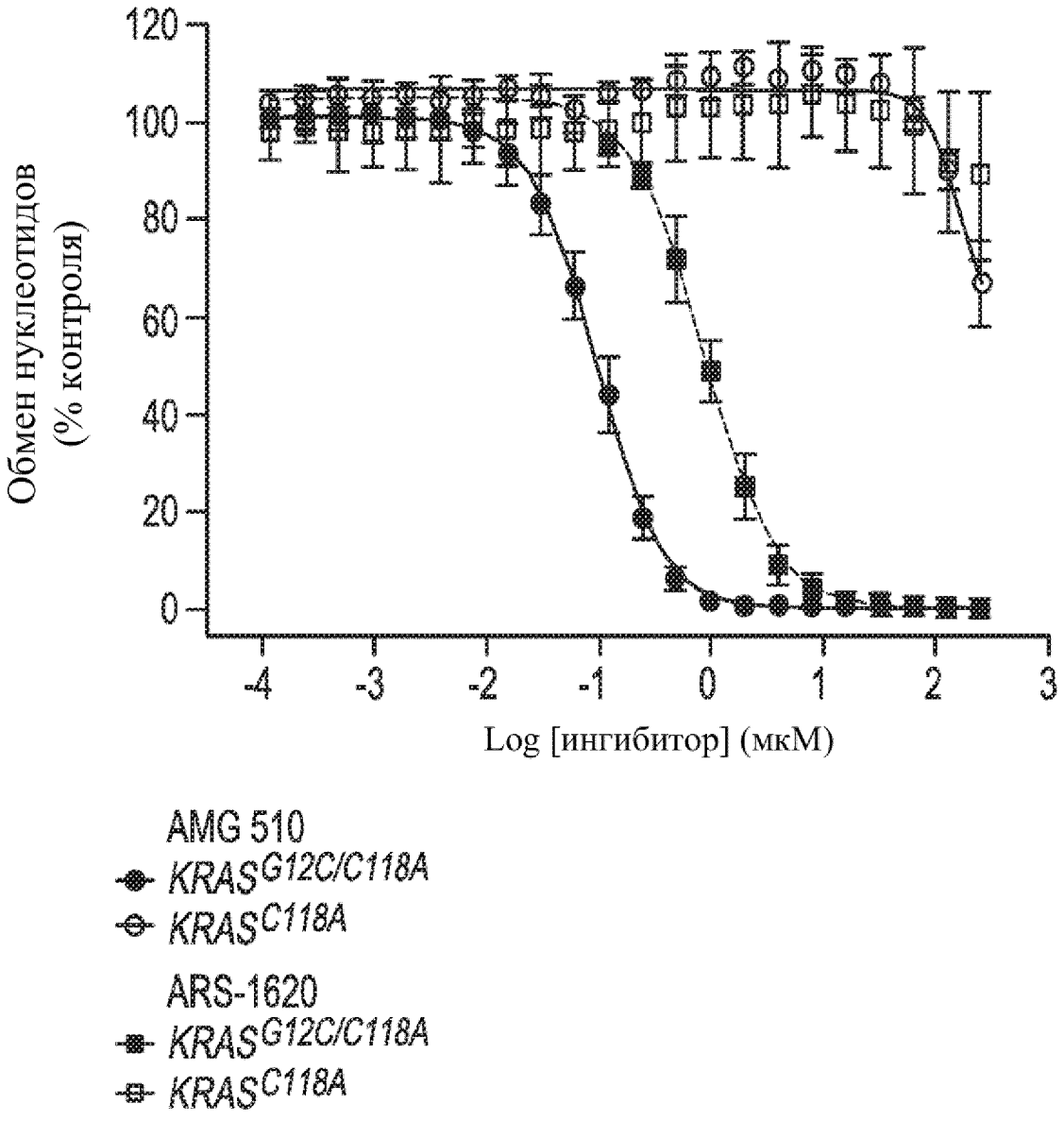
ФИГ. 40A



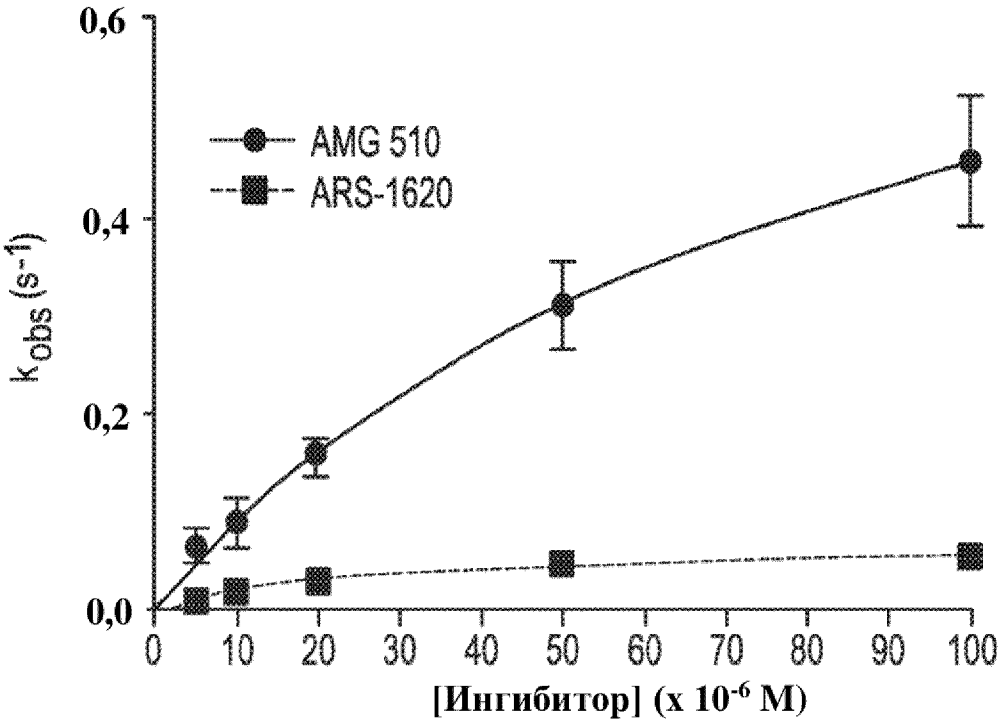
ФИГ. 40B



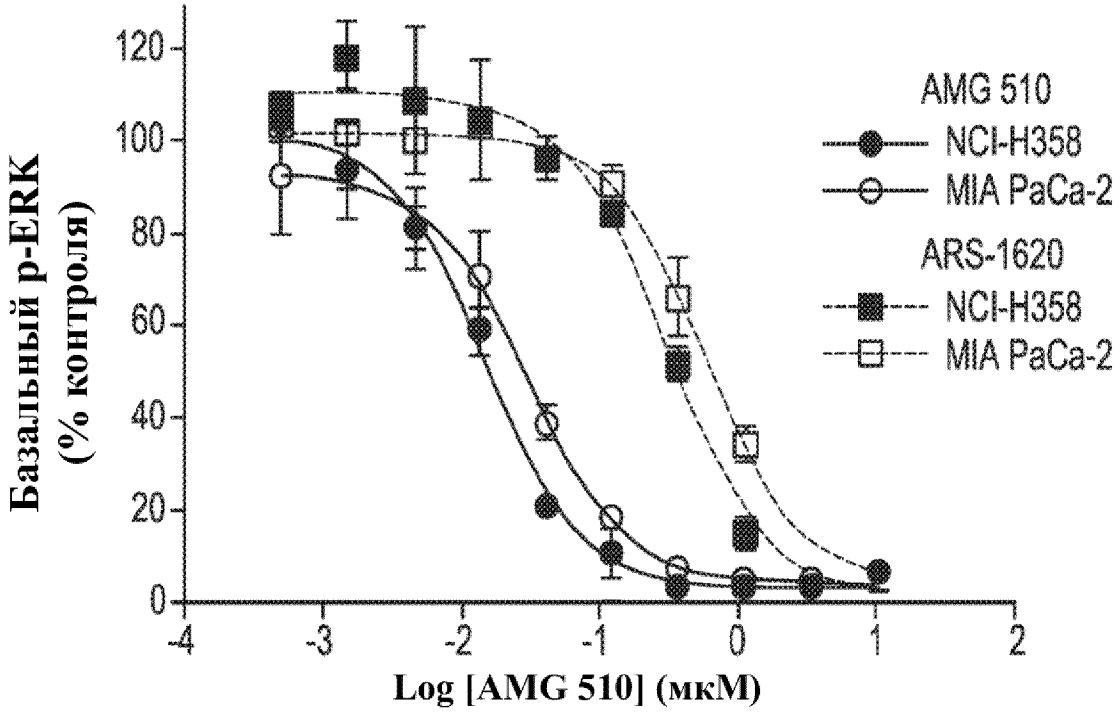
ФИГ. 40С


Обмен нуклеотидов
(% контроля)
120
100
80
60
40
20
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
Log [ингибитор] (мкМ)
AMG 510
KRASG12C/C118A
KRASC118A
ARS-1620
KRASG12C/C118A
KRASC118A

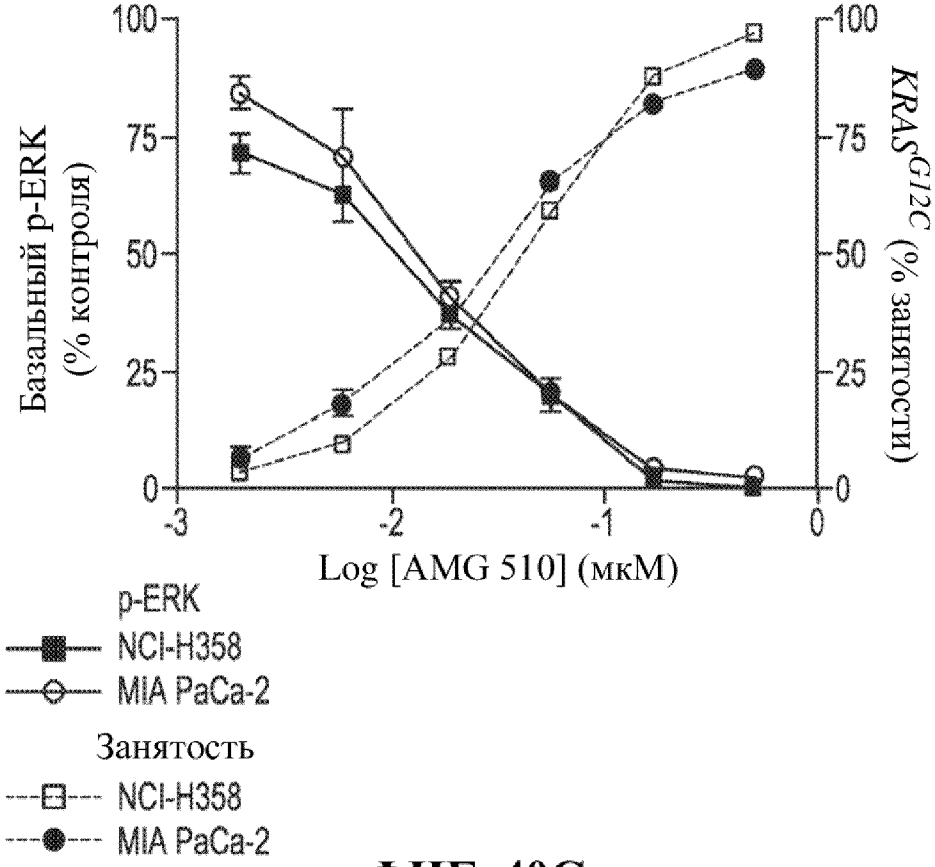
ФИГ. 40D



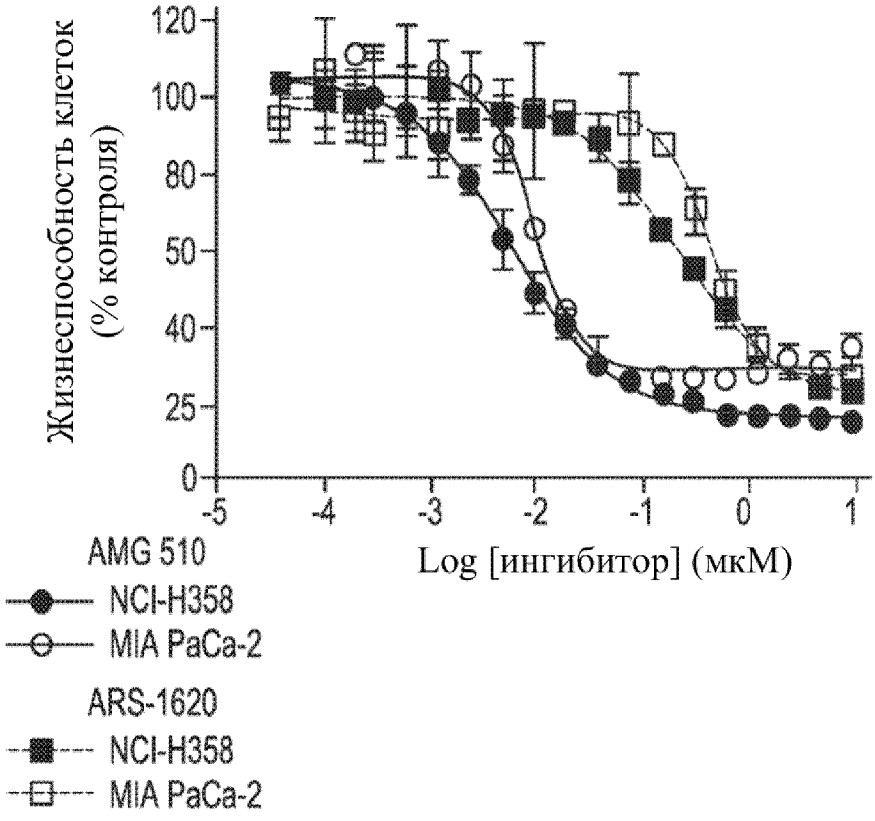
ФИГ. 40E



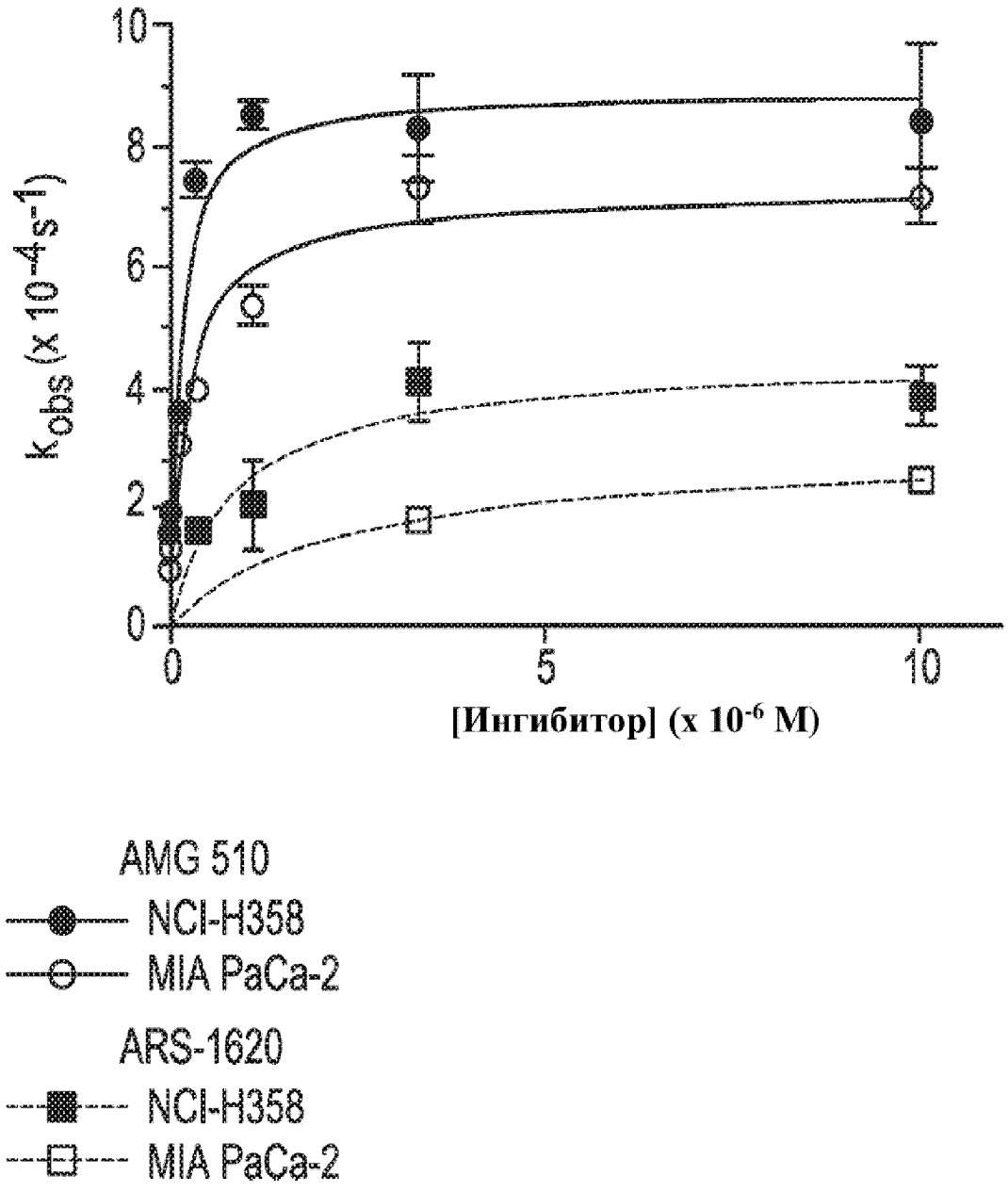
ФИГ. 40F



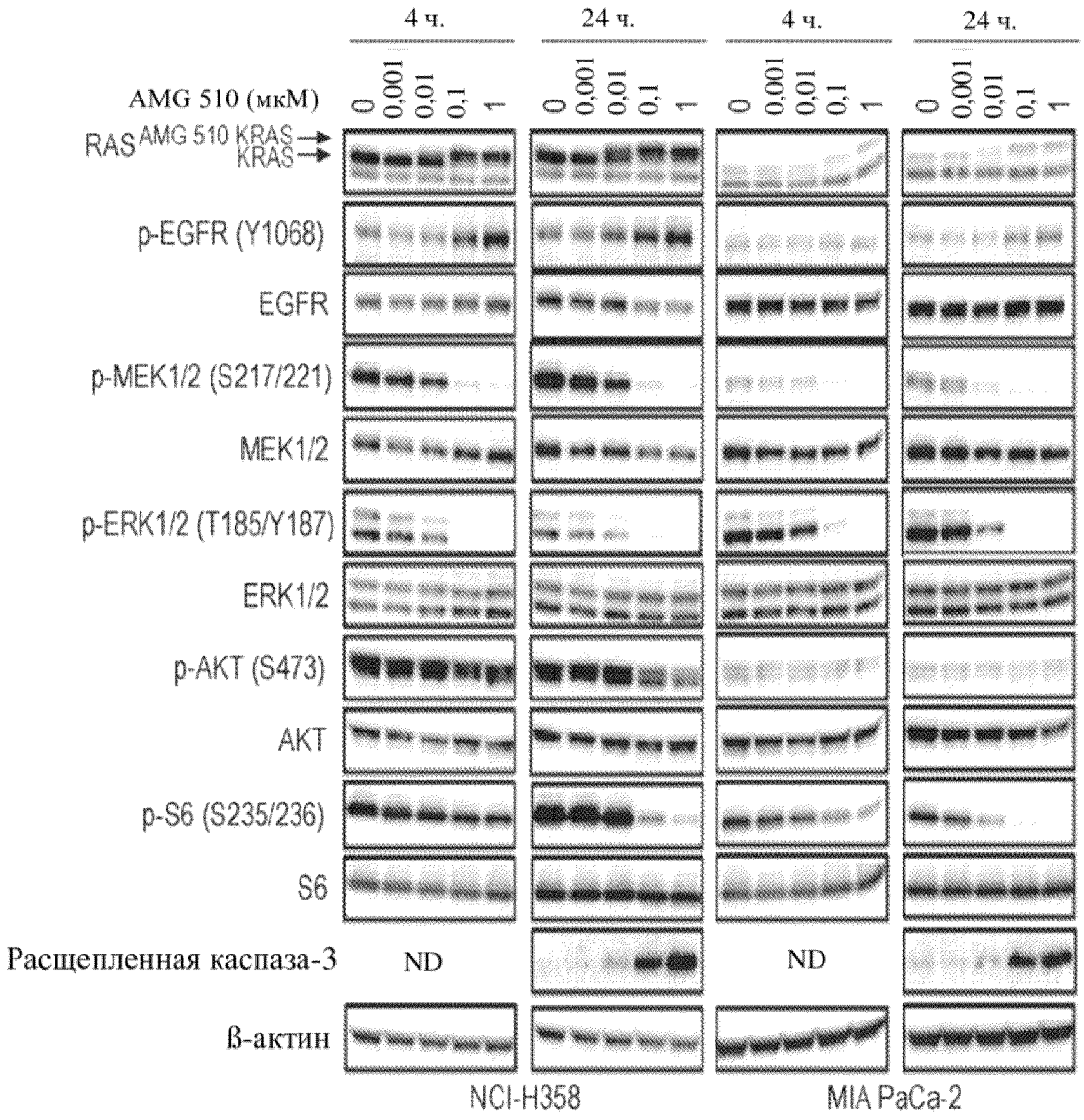
ФИГ. 40G



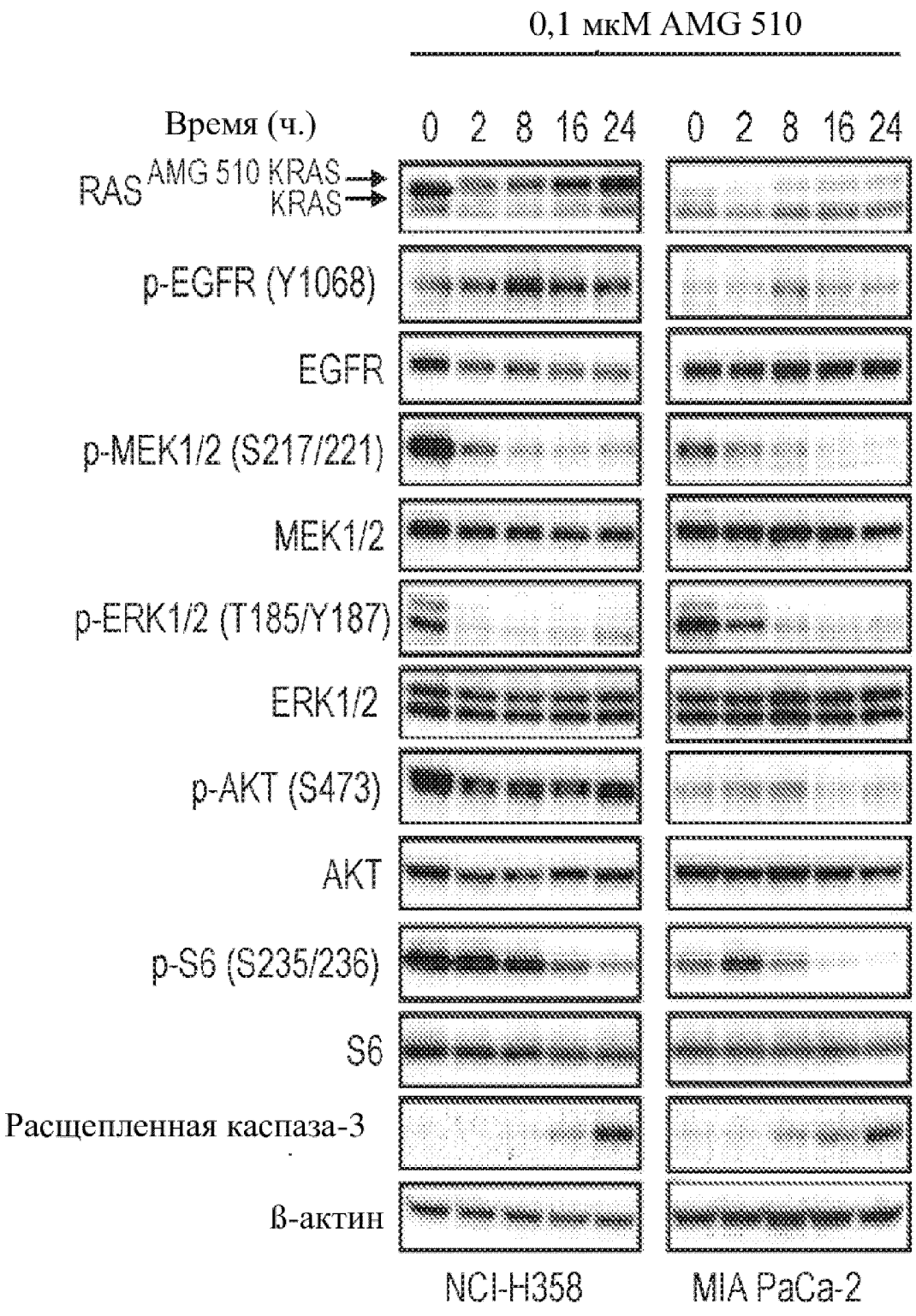
ФИГ. 40H


10
8
6
4
2
0
k_{obs} (x $10^{-4}s^{-1}$)
0
5
10
[Ингибитор] (x 10^{-6} M)
AMG 510
NCI-H358
MIA PaCa-2
ARS-1620
NCI-H358
MIA PaCa-2

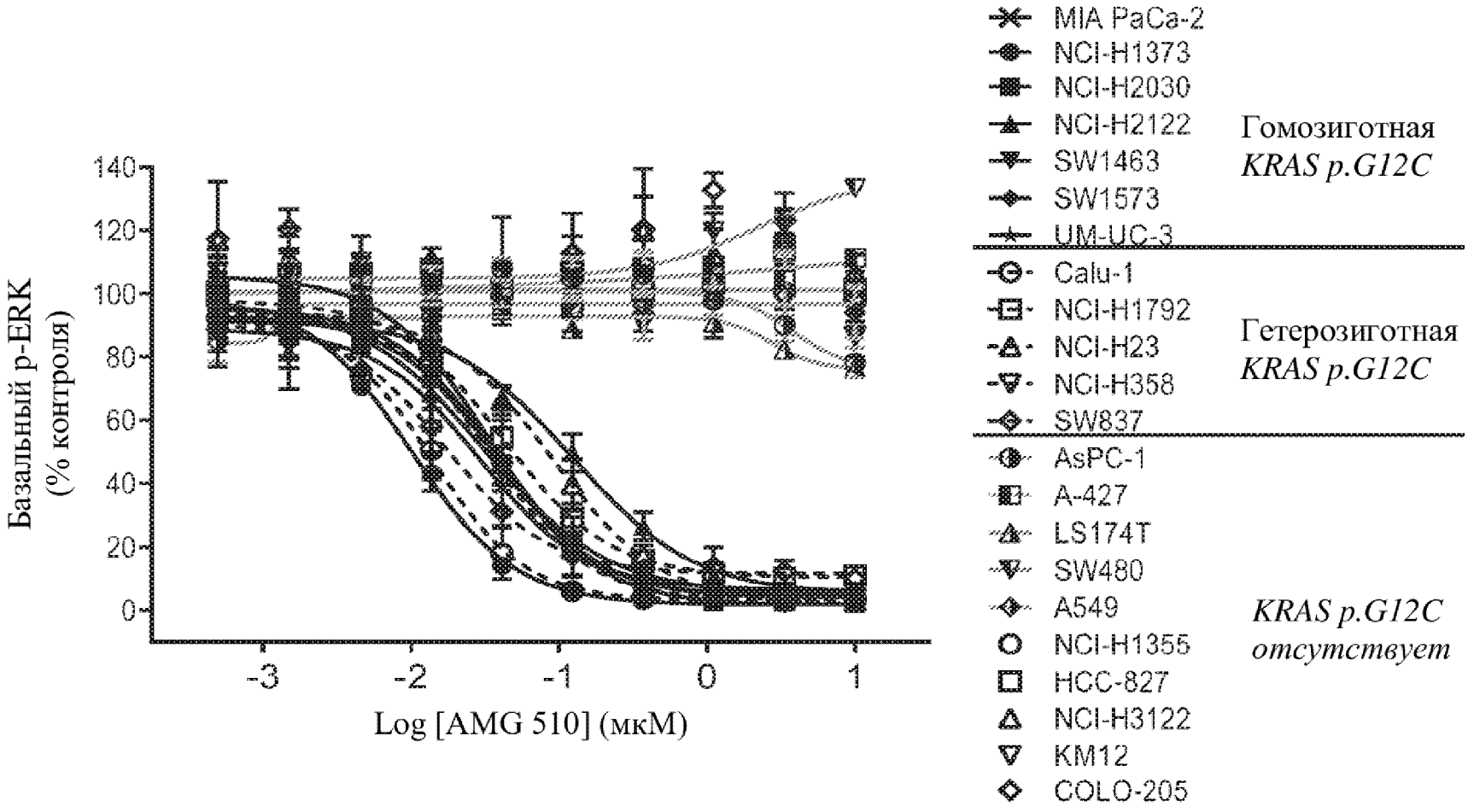
ФИГ. 41А


4 ч.
24 ч.
4 ч.
24 ч.
AMG 510 (мкМ)
0
0,001
0,01
0,1
1
RAS
AMG 510 KRAS
KRAS
p-EGFR (Y1068)
EGFR
p-MEK1/2 (S217/221)
MEK1/2
p-ERK1/2 (T185/Y187)
ERK1/2
p-AKT (S473)
AKT
p-S6 (S235/236)
S6
Расщепленная каспаза-3
ND
ND
ß-актин
NCI-H358
MIA PaCa-2

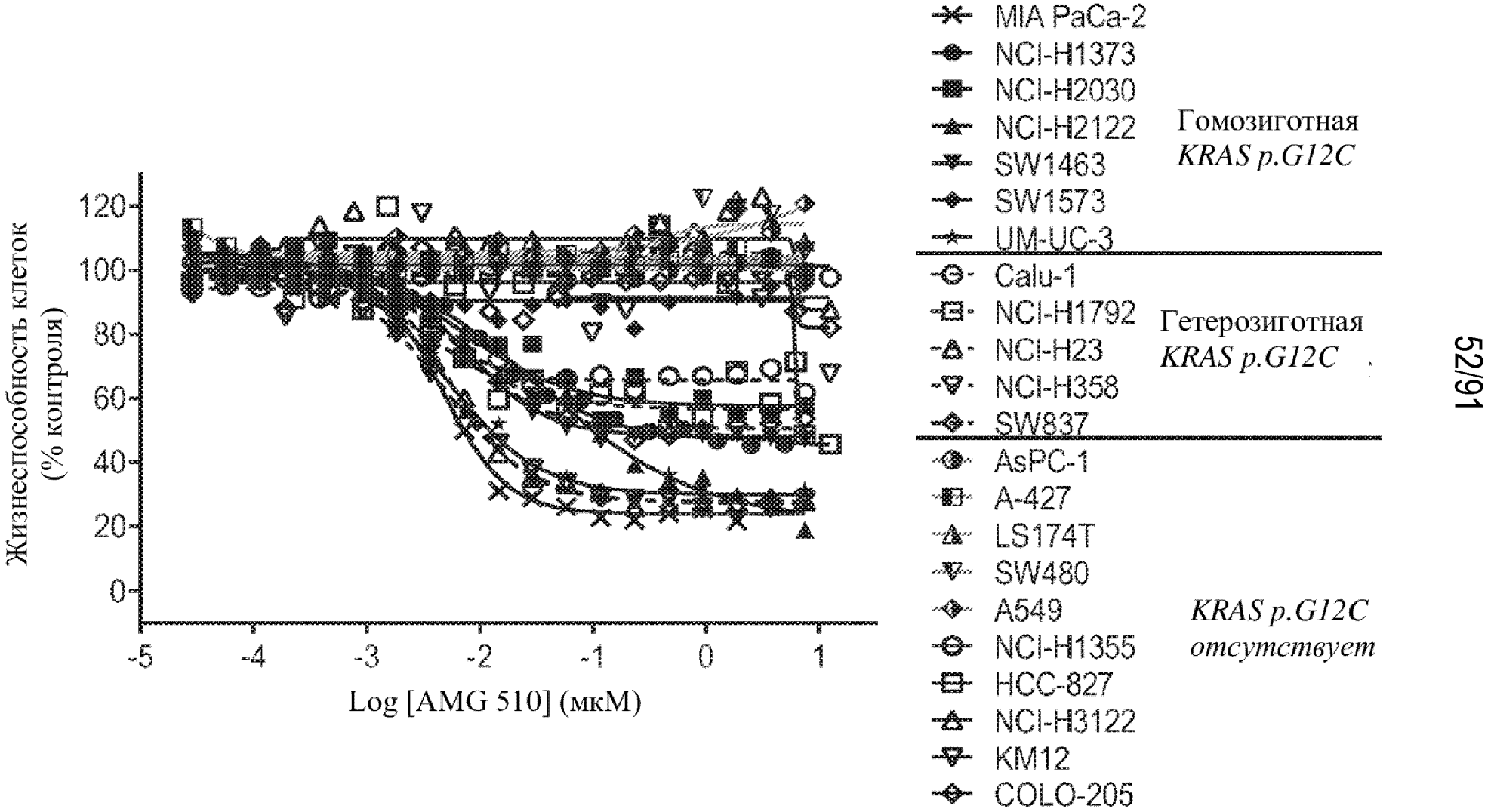
ФИГ. 41B


0,1 мкМ AMG 510
Время (ч.)
0 2 8 16 24
0 2 8 16 24
RAS
AMG 510
KRAS
KRAS
p-EGFR (Y1068)
EGFR
p-MEK1/2 (S217/221)
MEK1/2
p-ERK1/2 (T185/Y187)
ERK1/2
p-AKT (S473)
AKT
p-S6 (S235/236)
S6
Расщепленная каспаза-3
ß-актин
NCI-H358
MIA PaCa-2

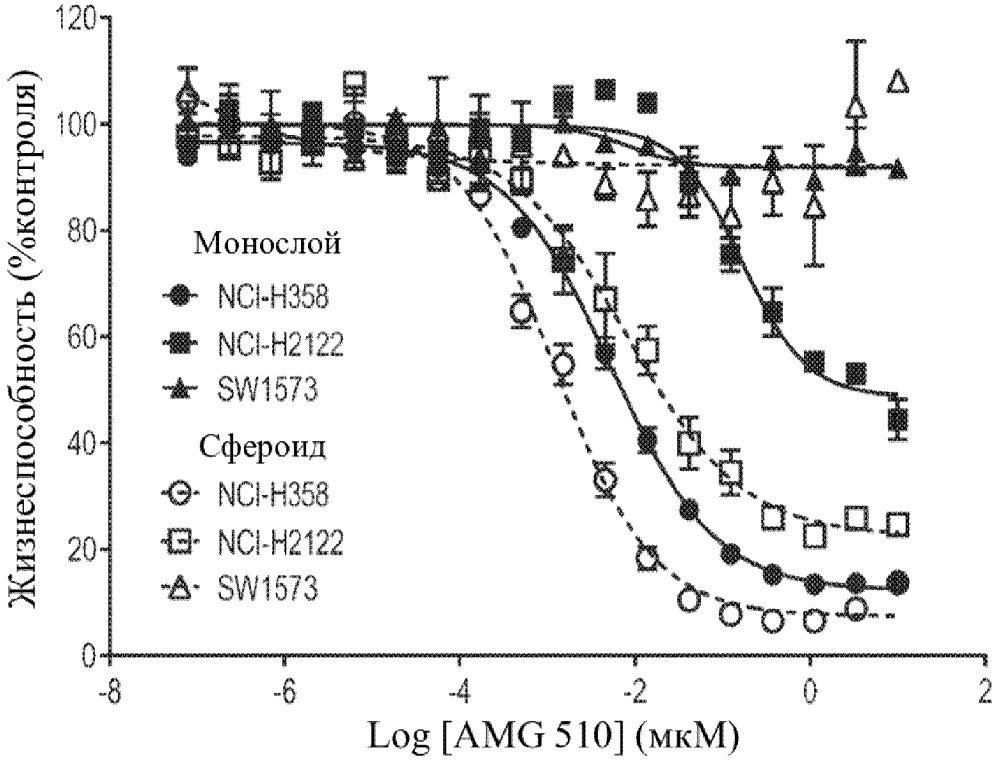
ФИГ. 41C


Базальный p-ERK
(% контроля)
140
120
100
80
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
Log [AMG 510] (мкМ)
MIA PaCa-2
NCI-H1373
NCI-H2030
NCI-H2122
SW1463
SW1573
UM-UC-3
Гомозиготная
KRAS p.G12C
Calu-1
NCI-H1792
NCI-H23
NCI-H358
SW837
Гетерозиготная
KRAS p.G12C
AsPC-1
A-427
LS174T
SW480
A549
NCI-H1355
HCC-827
NCI-H3122
KM12
COLO-205
KRAS p.G12C
отсутствует

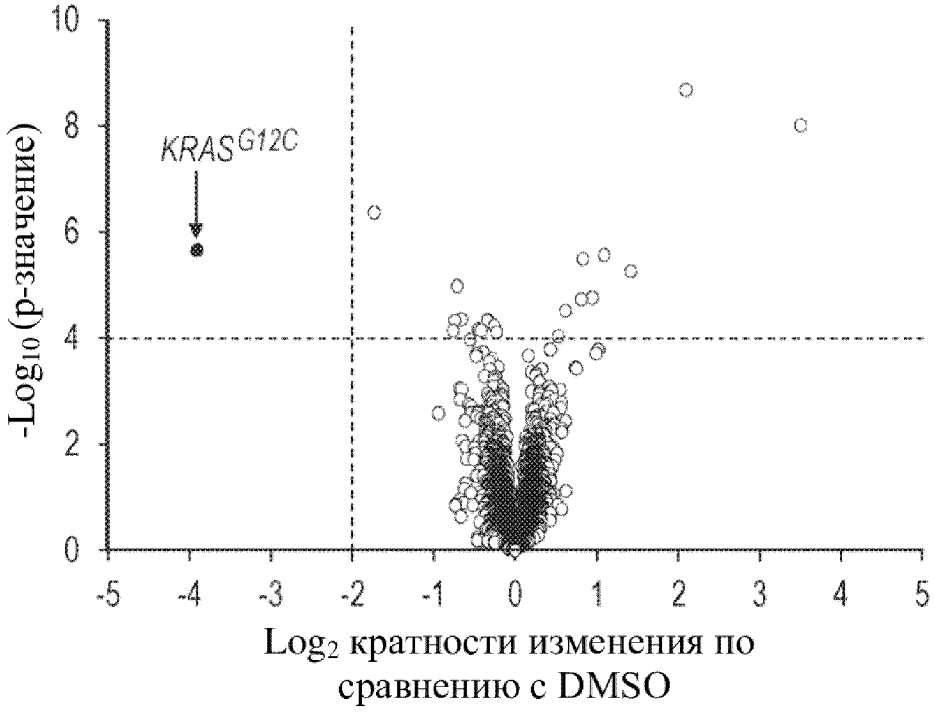
ФИГ. 41D


Жизнеспособность клеток (% контроля)
120
100
80
60
40
20
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
Log [AMG 510] (мкМ)
MIA PaCa-2
NCI-H1373
NCI-H2030
NCI-H2122
SW1463
SW1573
UM-UC-3
Гомозиготная KRAS p.G12C
Calu-1
NCI-H1792
NCI-H23
NCI-H358
SW837
Гетерозиготная KRAS p.G12C
AsPC-1
A-427
LS174T
SW480
A549
NCI-H1355
HCC-827
NCI-H3122
KM12
COLO-205
KRAS p.G12C отсутствует

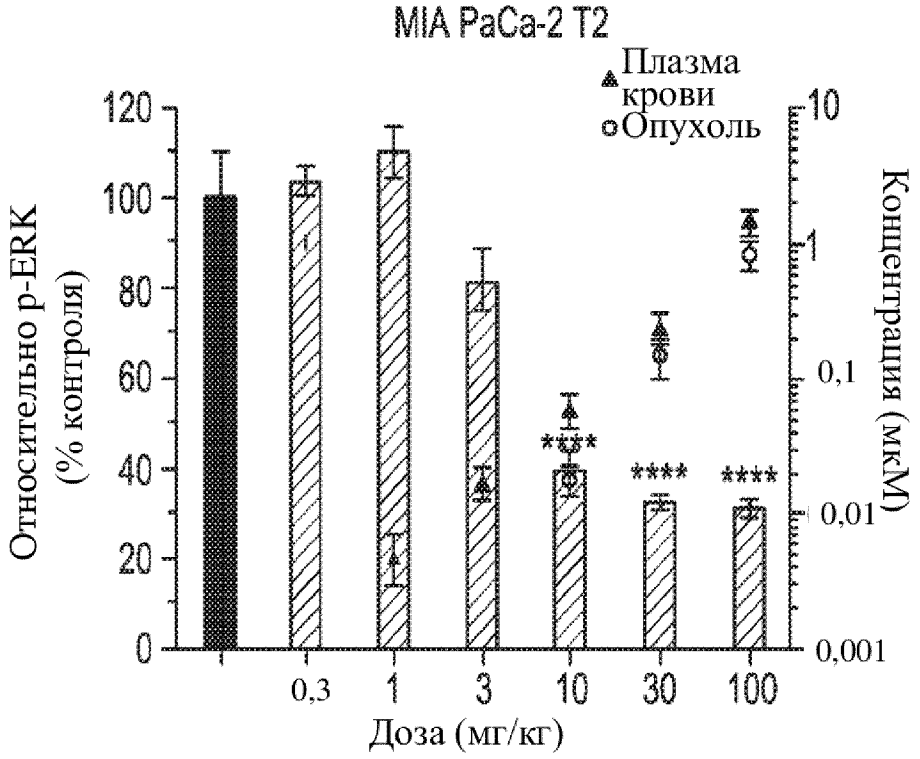
ФИГ. 41E



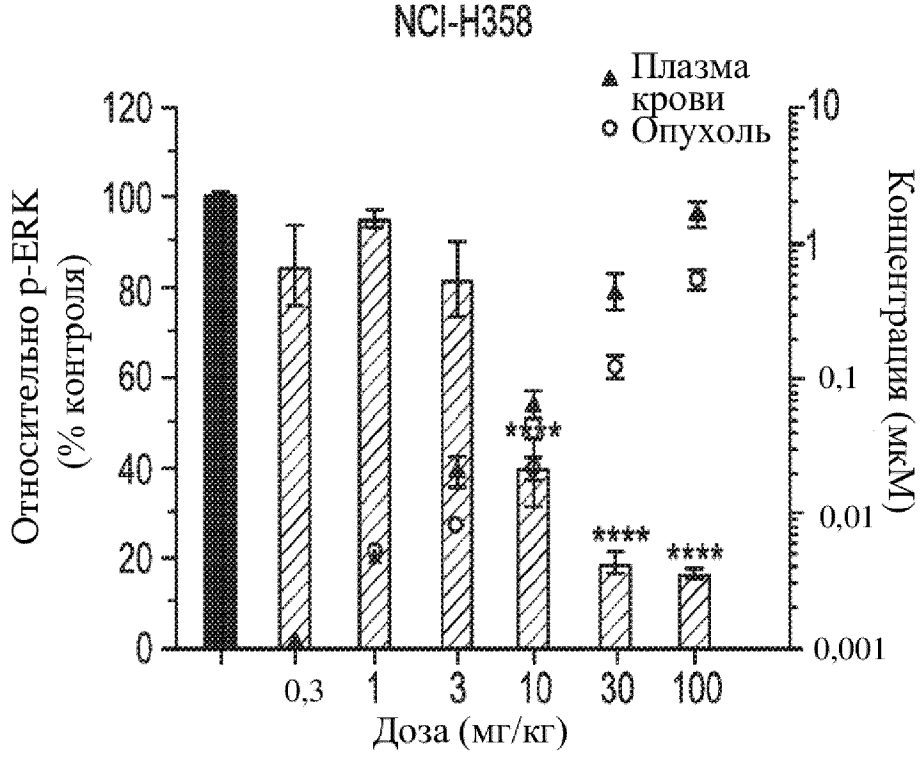
ФИГ. 41E



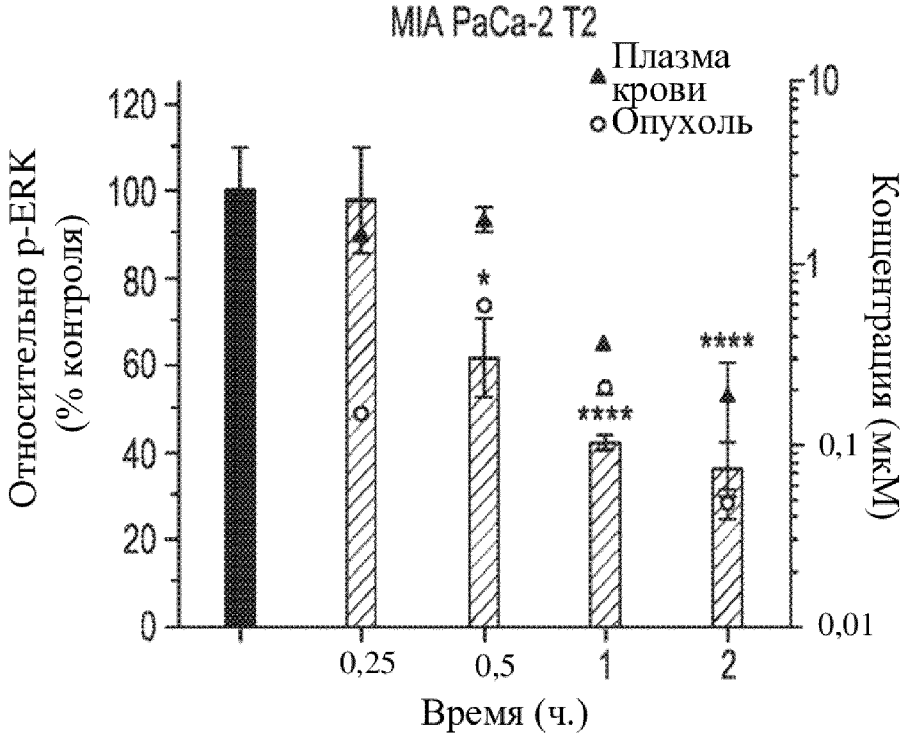
ФИГ. 42A



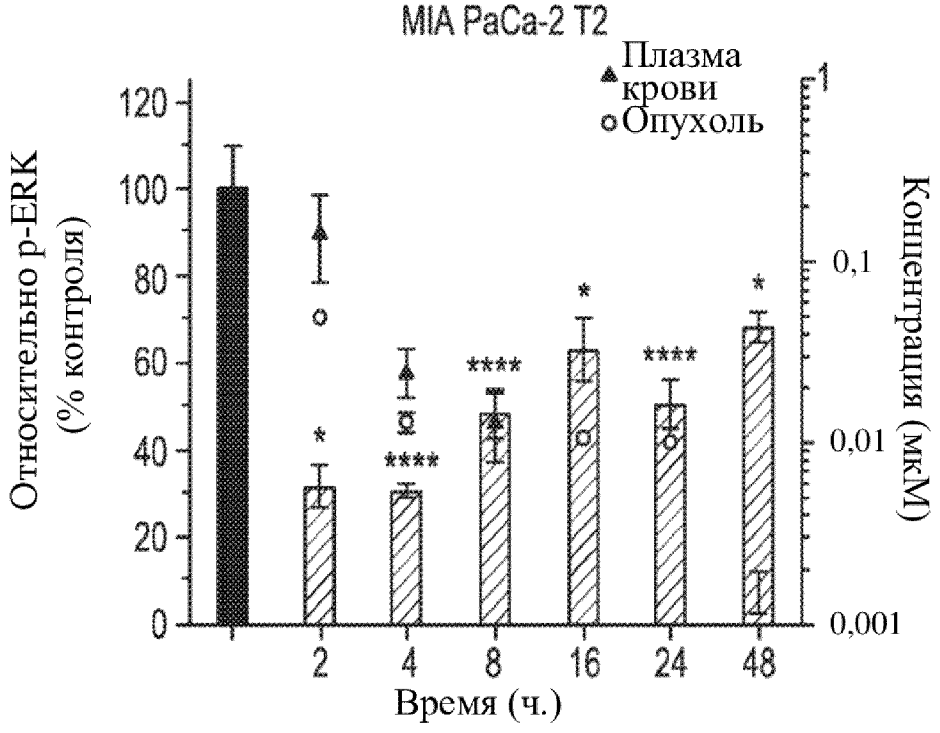
ФИГ. 42B



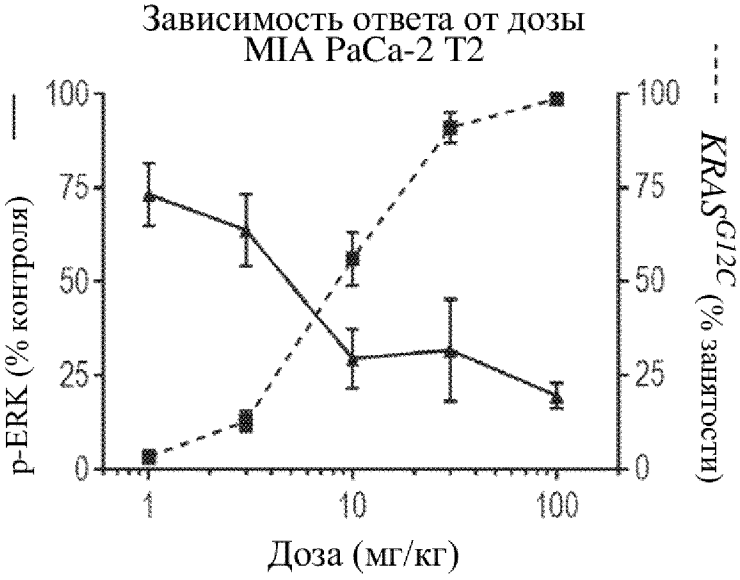
ФИГ. 42C



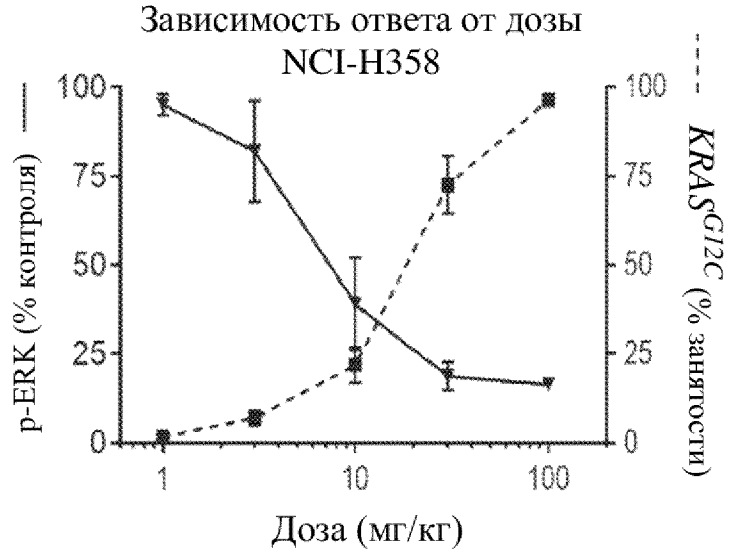
ФИГ. 42D



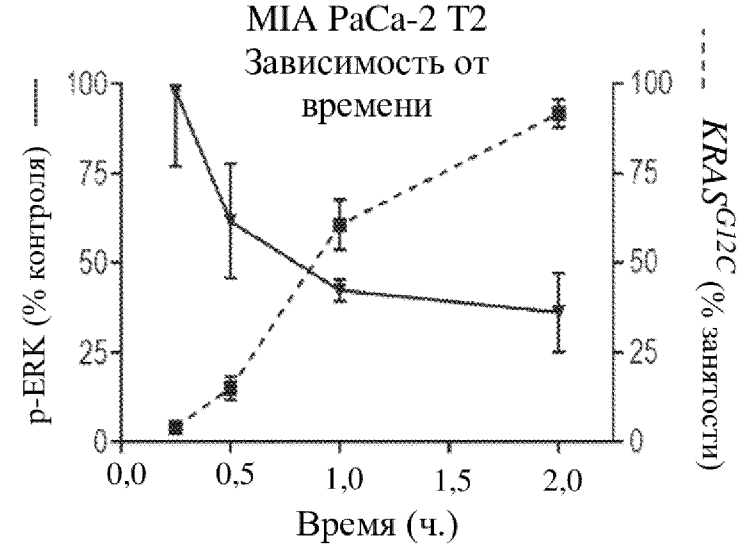
ФИГ. 42E



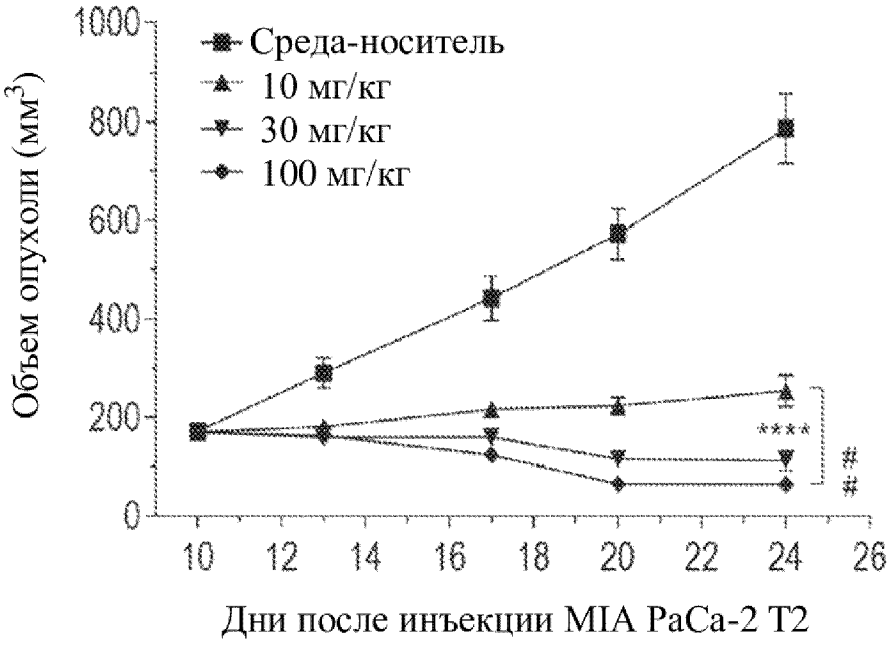
ФИГ. 42F



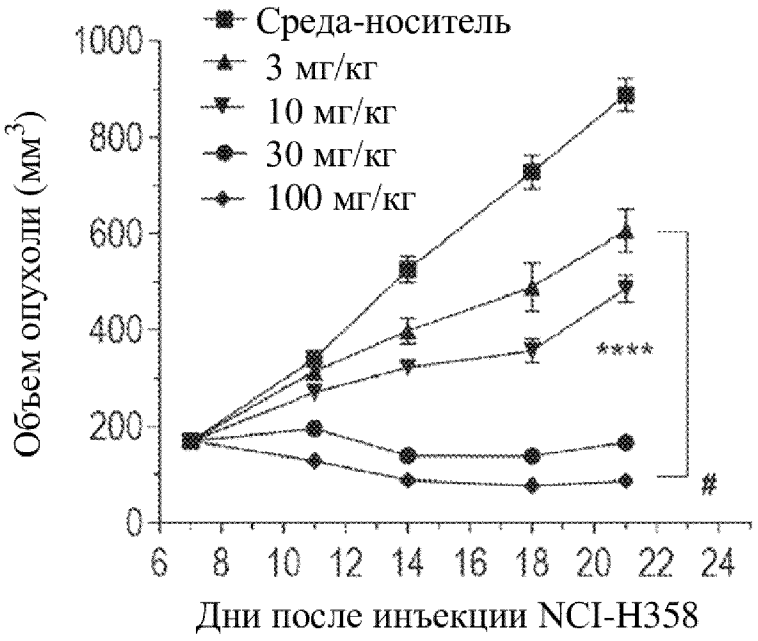
ФИГ. 42G



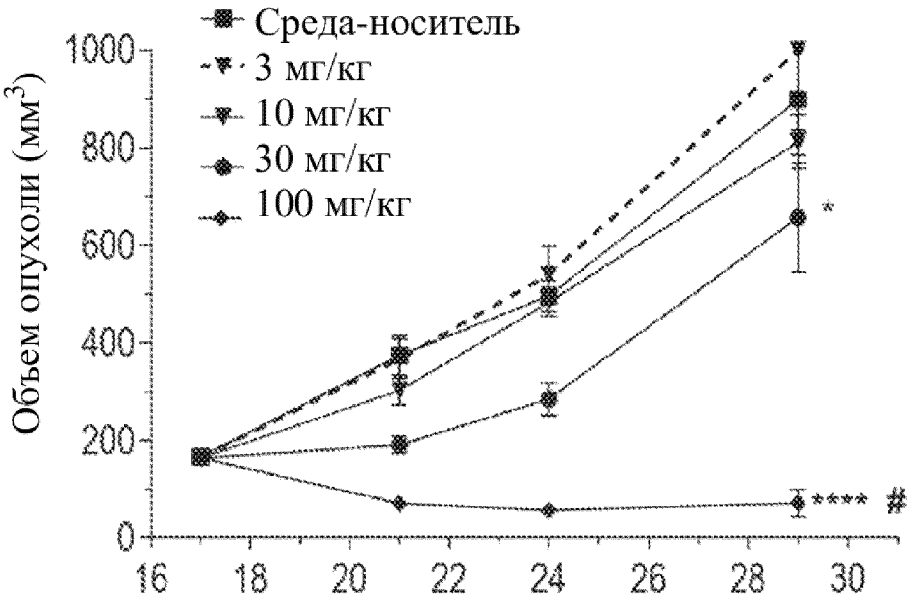
ФИГ. 43A



ФИГ. 43B

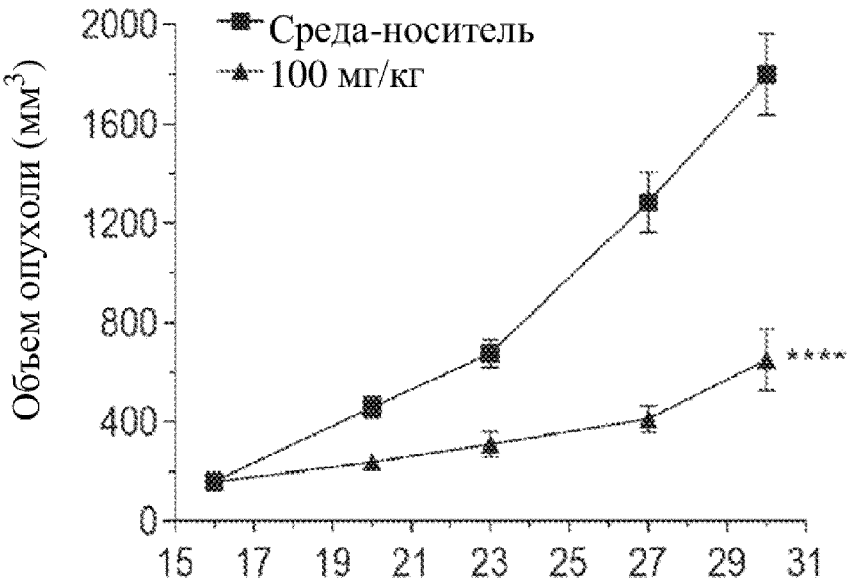


ФИГ. 43C



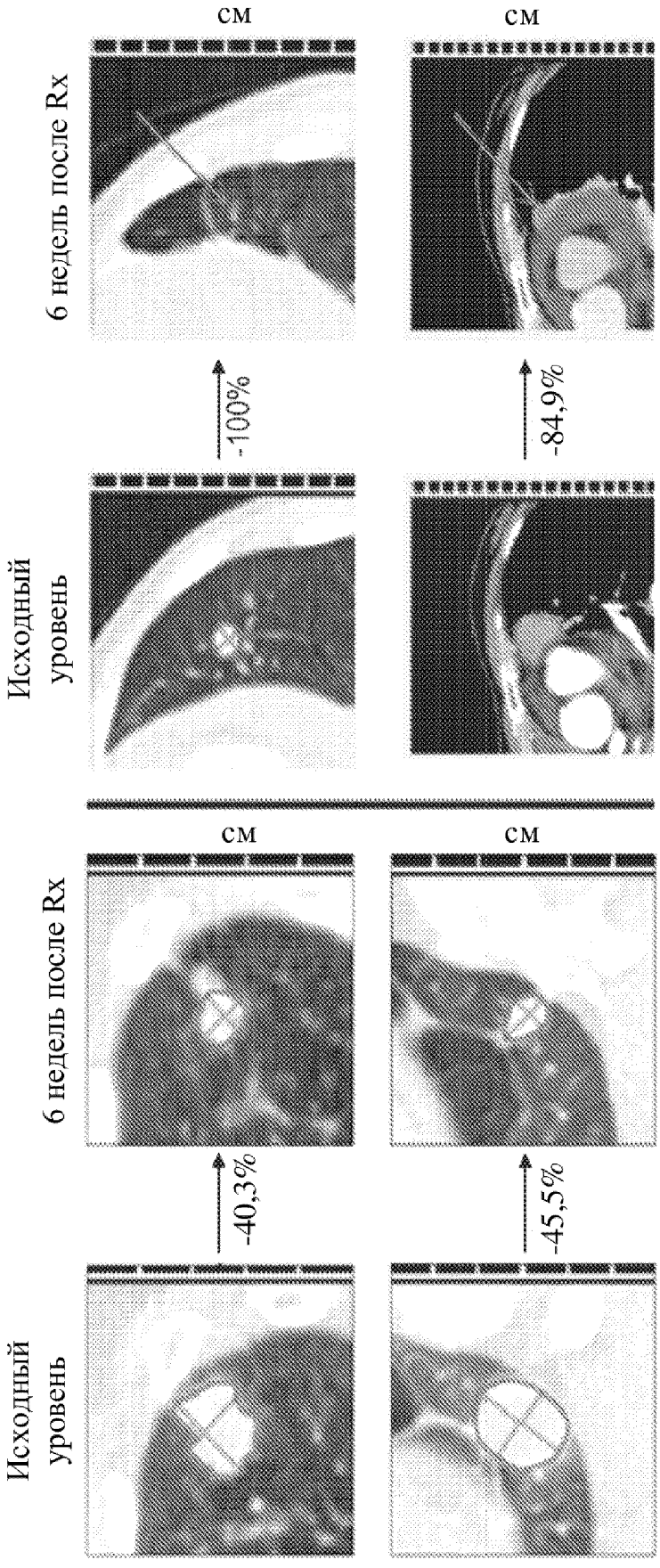
Дни после инъекции CT-26 *KRAS p.G12C*

ФИГ. 43D

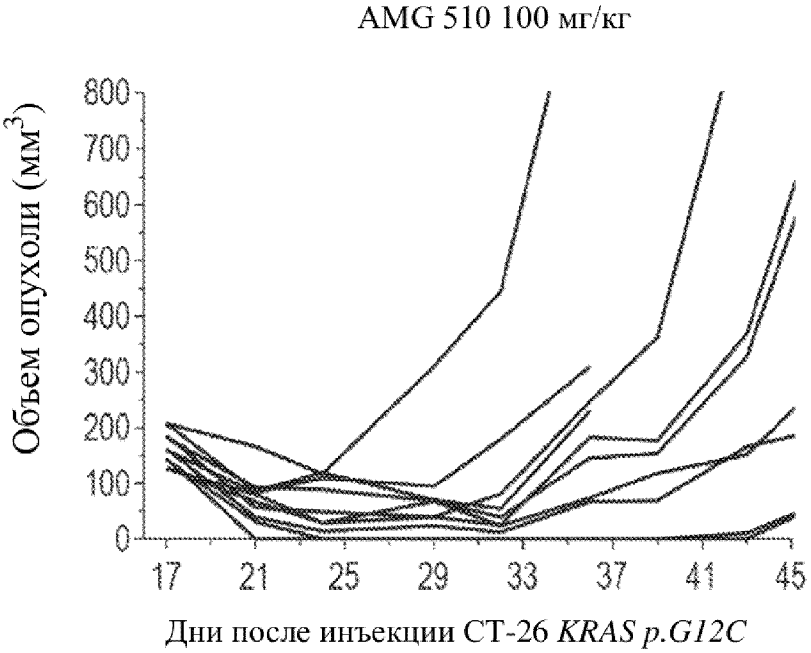


Дни после инъекции NSCLC PDX

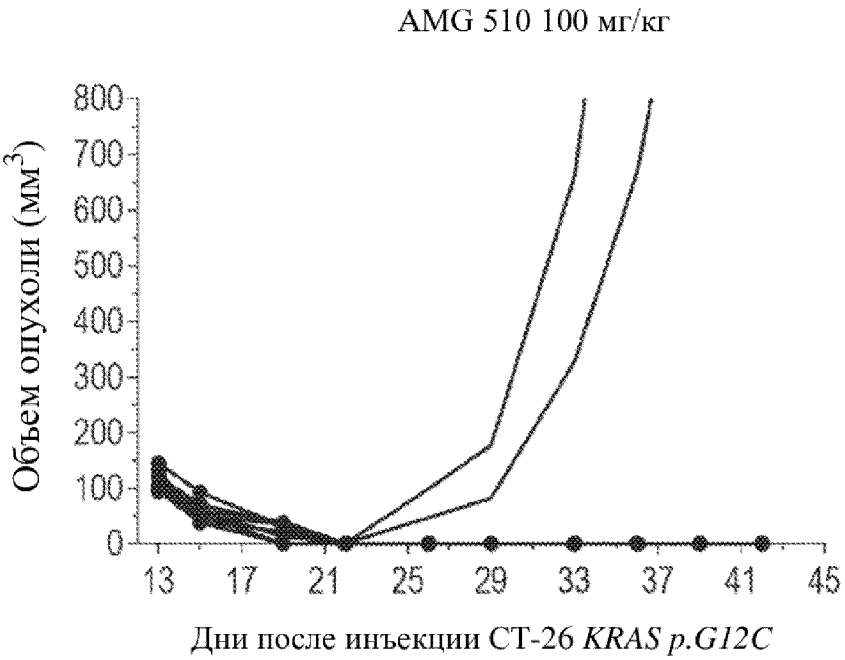
ФИГ. 43E


см
см
6 недель после Rx
-100%
-84,9%
Исходный уровень
см
см
6 недель после Rx
-40,3%
-45,5%
Исходный уровень

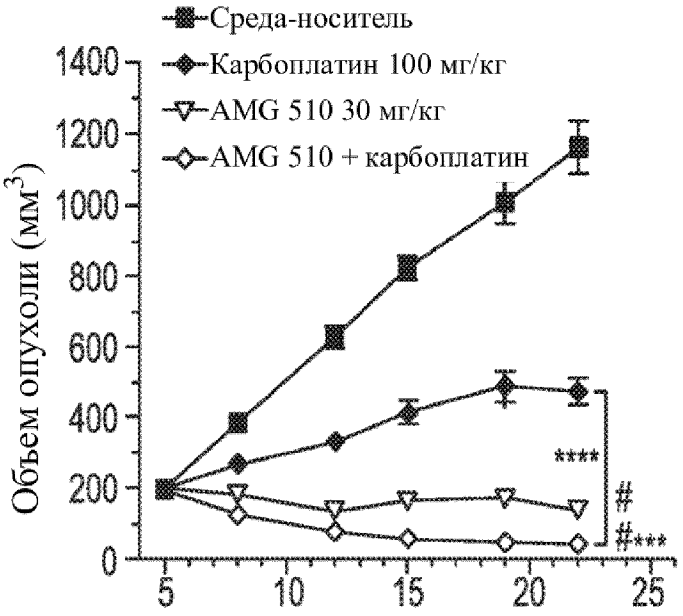
ФИГ. 43F



ФИГ. 43G

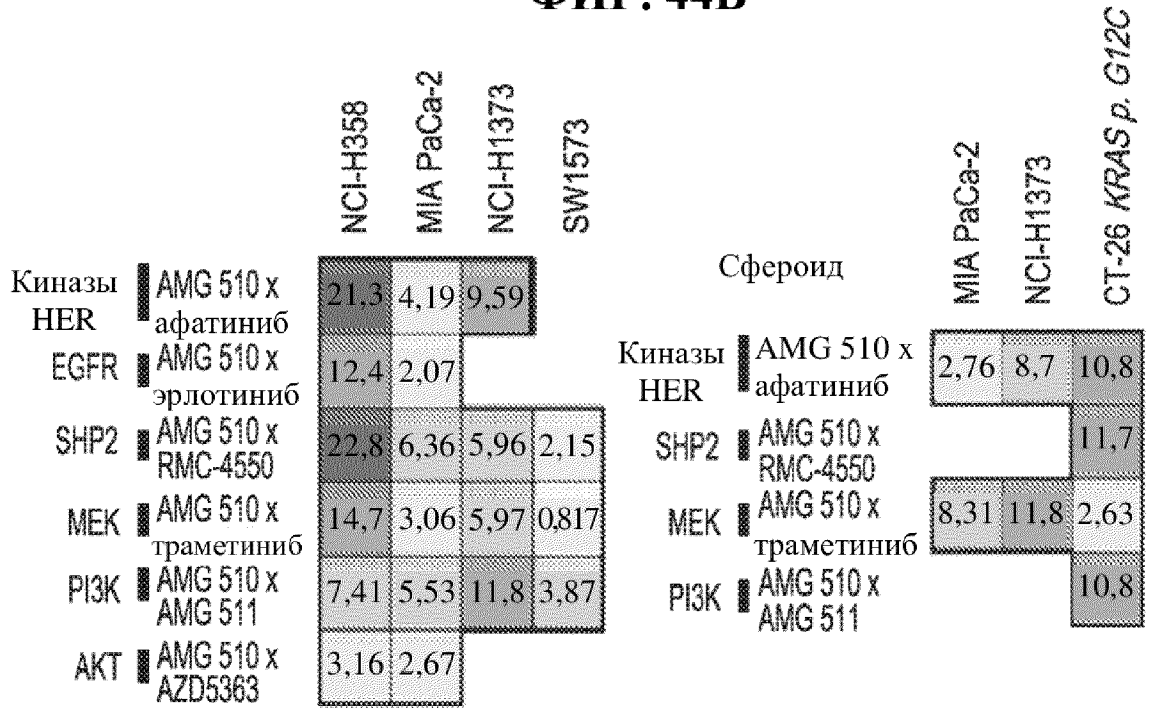


ФИГ. 44А

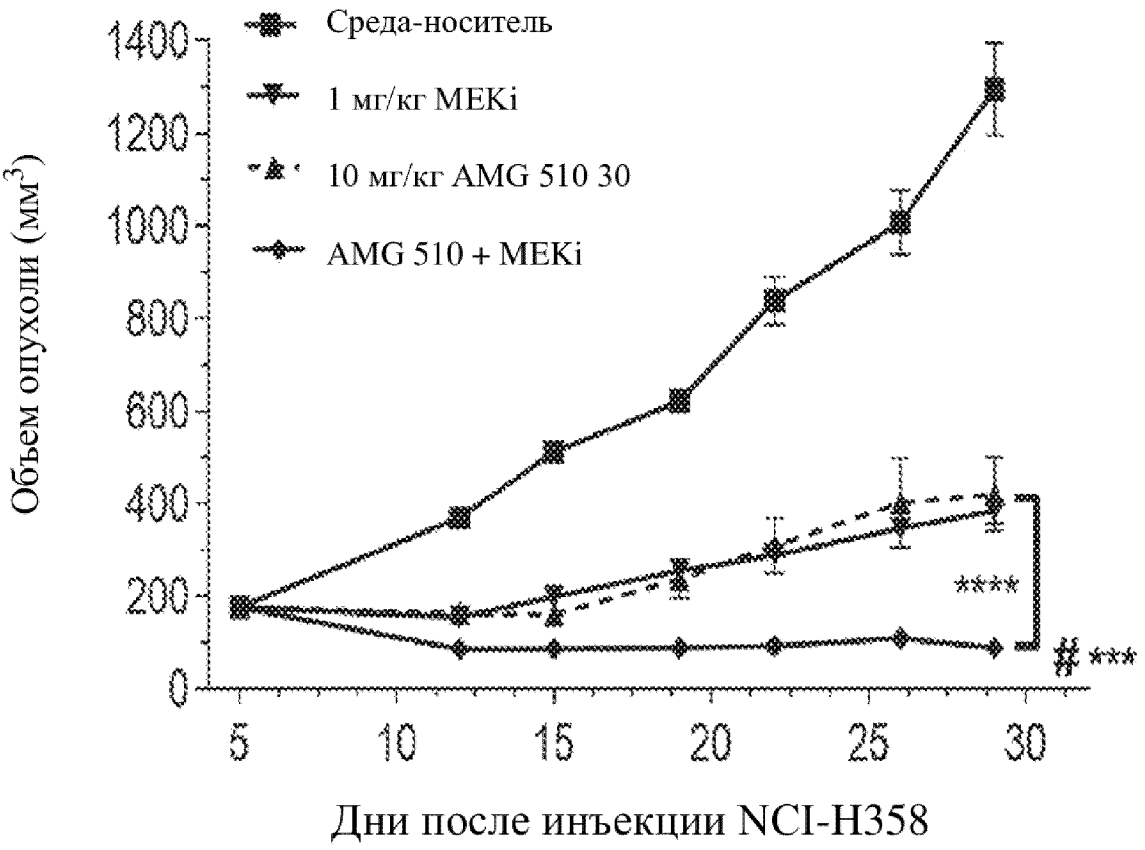


Дни после инъекции NCI-H358

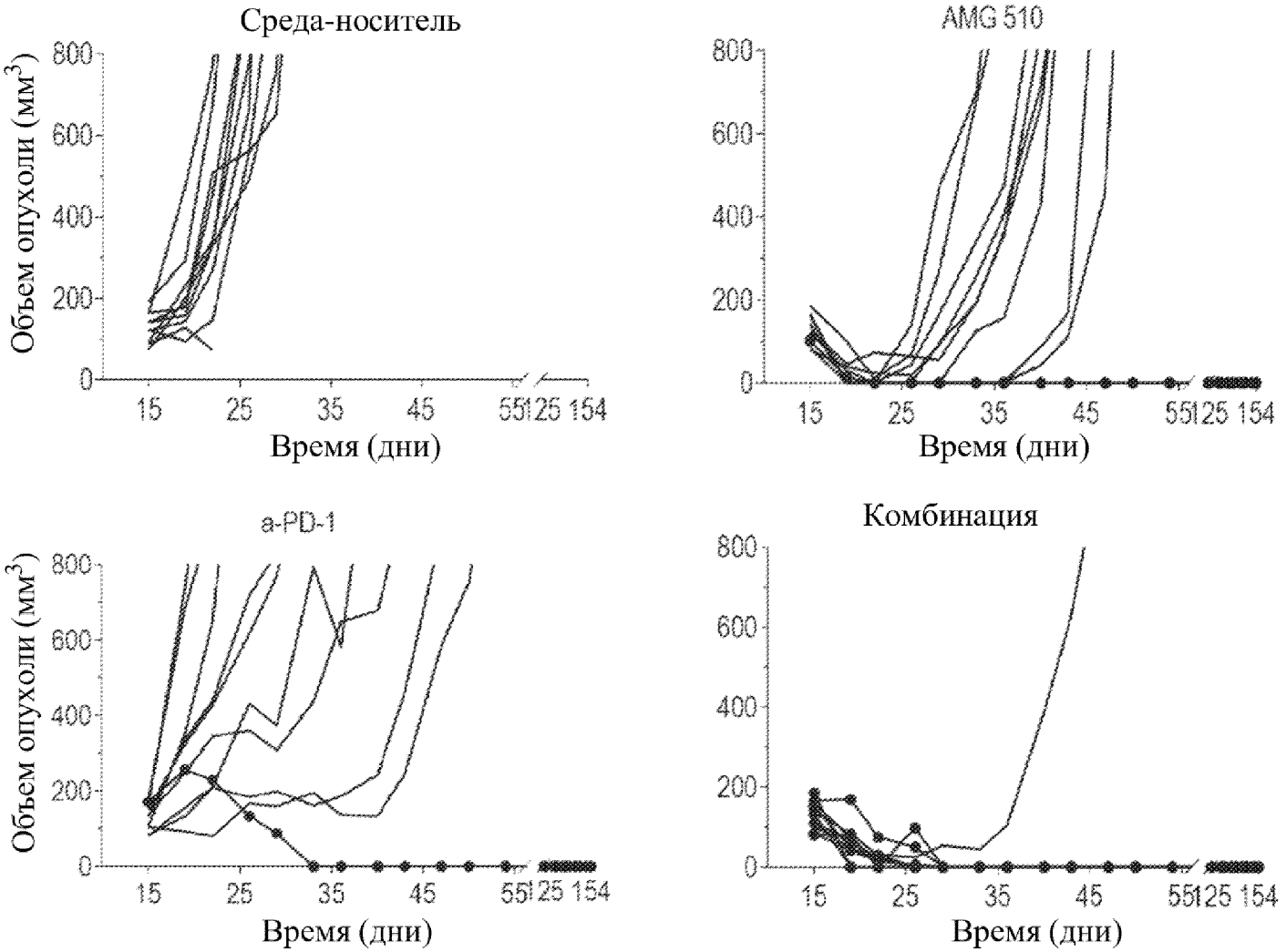
ФИГ. 44В



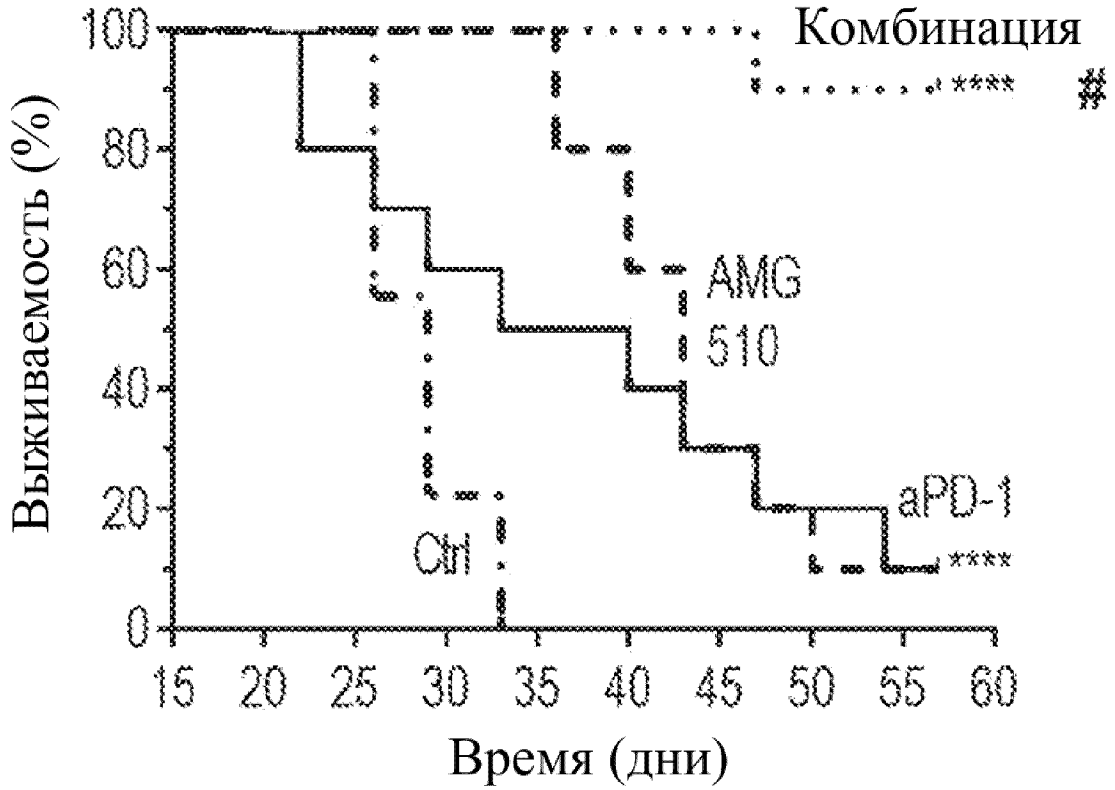
ФИГ. 44С


Среда-носитель
1 мг/кг MEKi
10 мг/кг AMG 510 30
AMG 510 + MEKi
Объем опухоли (мм3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
****
***
Дни после инъекции NCI-H358

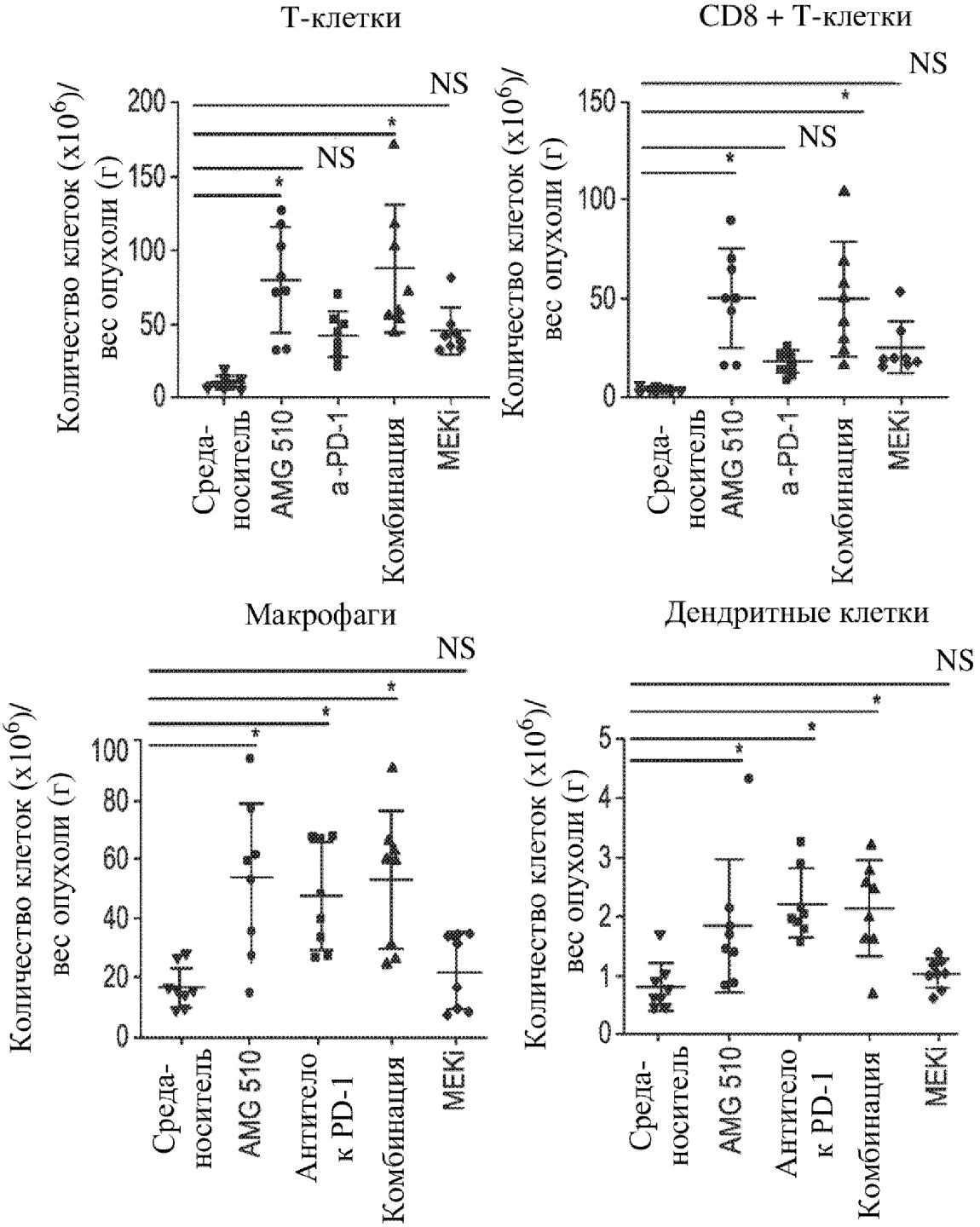
ФИГ. 45А


Среда-носитель
AMG 510
a-PD-1
Комбинация
Объем опухоли (мм3)
800
600
400
200
0
15
25
35
45
55
125
154
Время (дни)

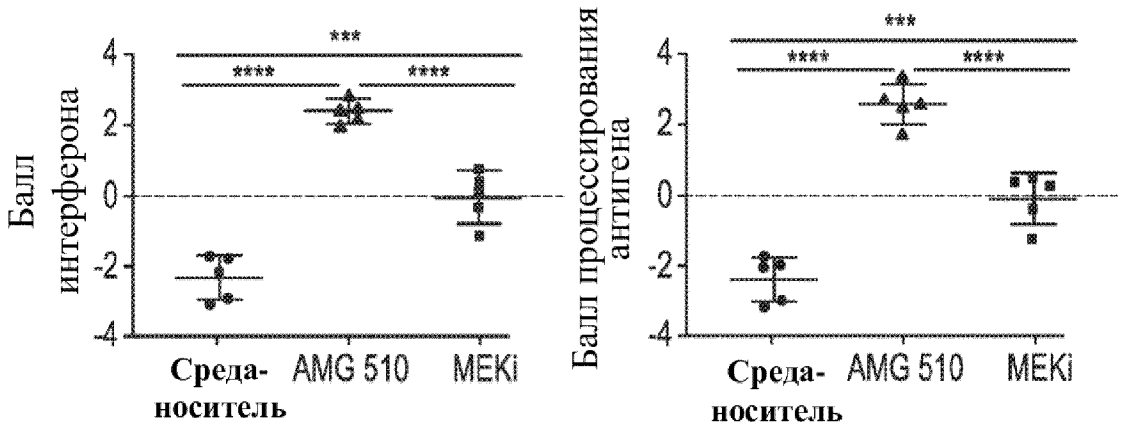
ФИГ. 45B


Комбинация
****
AMG
510
aPD-1
****
Chl
100
80
60
40
20
0
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Выживаемость (%)
Время (дни)

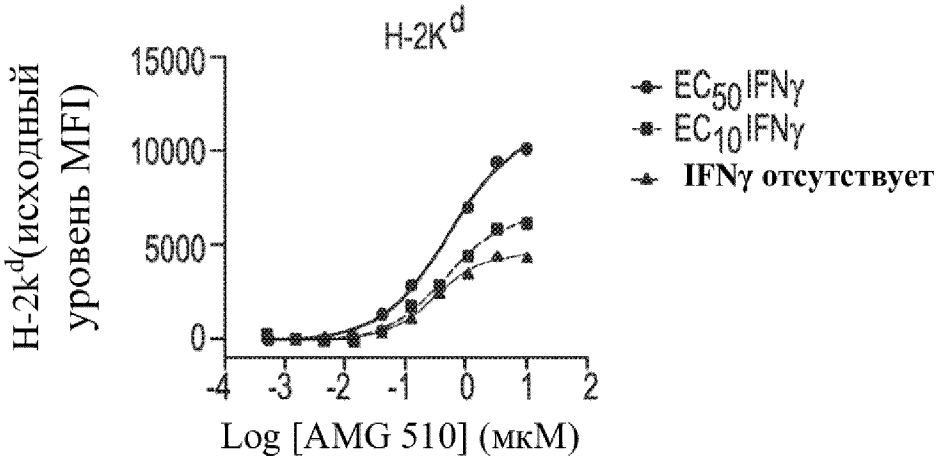
ФИГ. 45С


Т-клетки
Количество клеток (x10^6)/ вес опухоли (г)
200
150
100
50
0
NS
NS
*
*
Среда-носитель
AMG 510
a-PD-1
Комбинация
MEKi
CD8 + Т-клетки
Количество клеток (x10^6)/ вес опухоли (г)
150
100
50
0
NS
NS
*
*
Среда-носитель
AMG 510
a-PD-1
Комбинация
MEKi
Макрофаги
Количество клеток (x10^6)/ вес опухоли (г)
100
80
60
40
20
0
NS
*
*
*
Среда-носитель
AMG 510
Антитело к PD-1
Комбинация
MEKi
Дендритные клетки
Количество клеток (x10^6)/ вес опухоли (г)
5
4
3
2
1
0
NS
*
*
*
Среда-носитель
AMG 510
Антитело к PD-1
Комбинация
MEKi

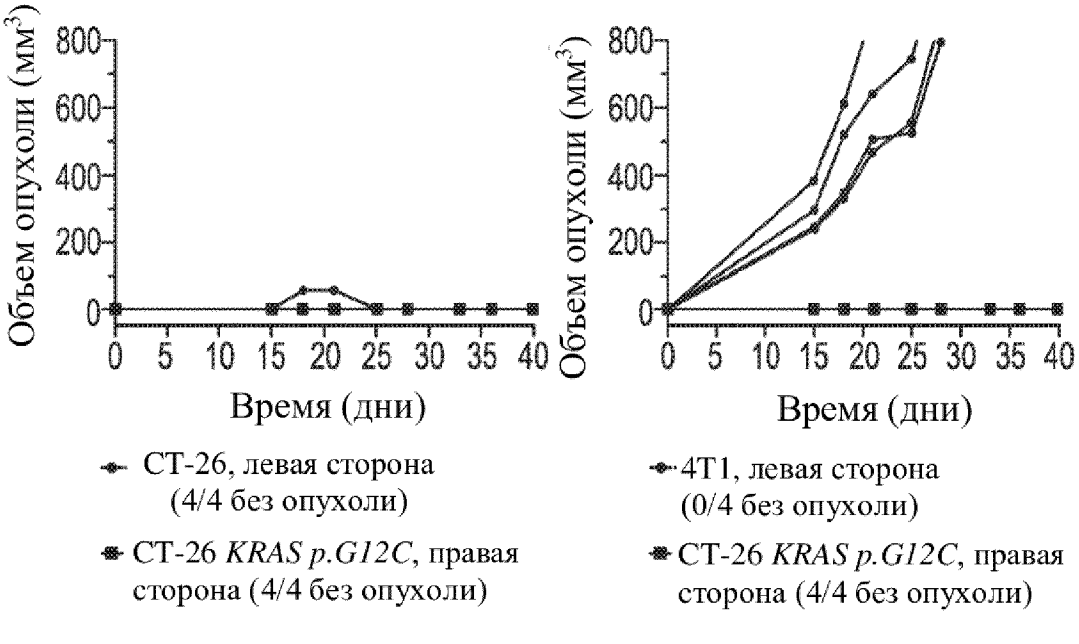
ФИГ. 45D



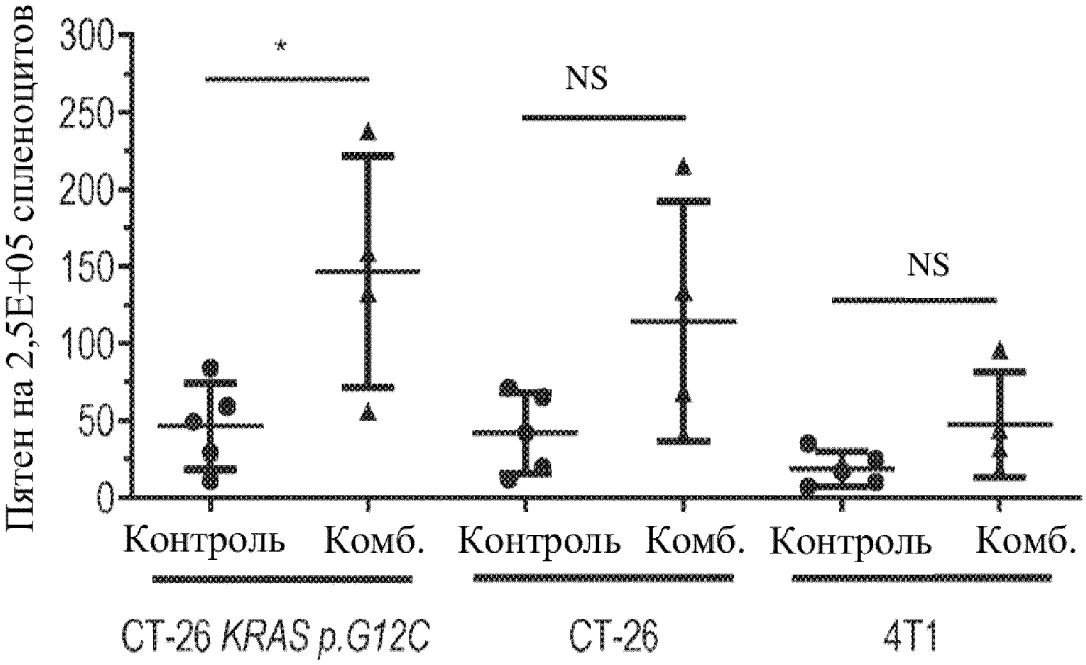
ФИГ. 45E



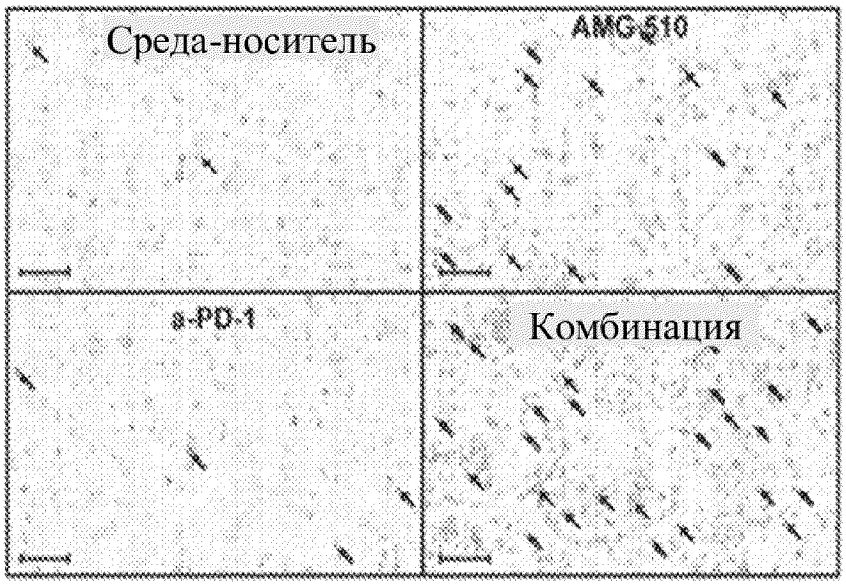
ФИГ. 45F



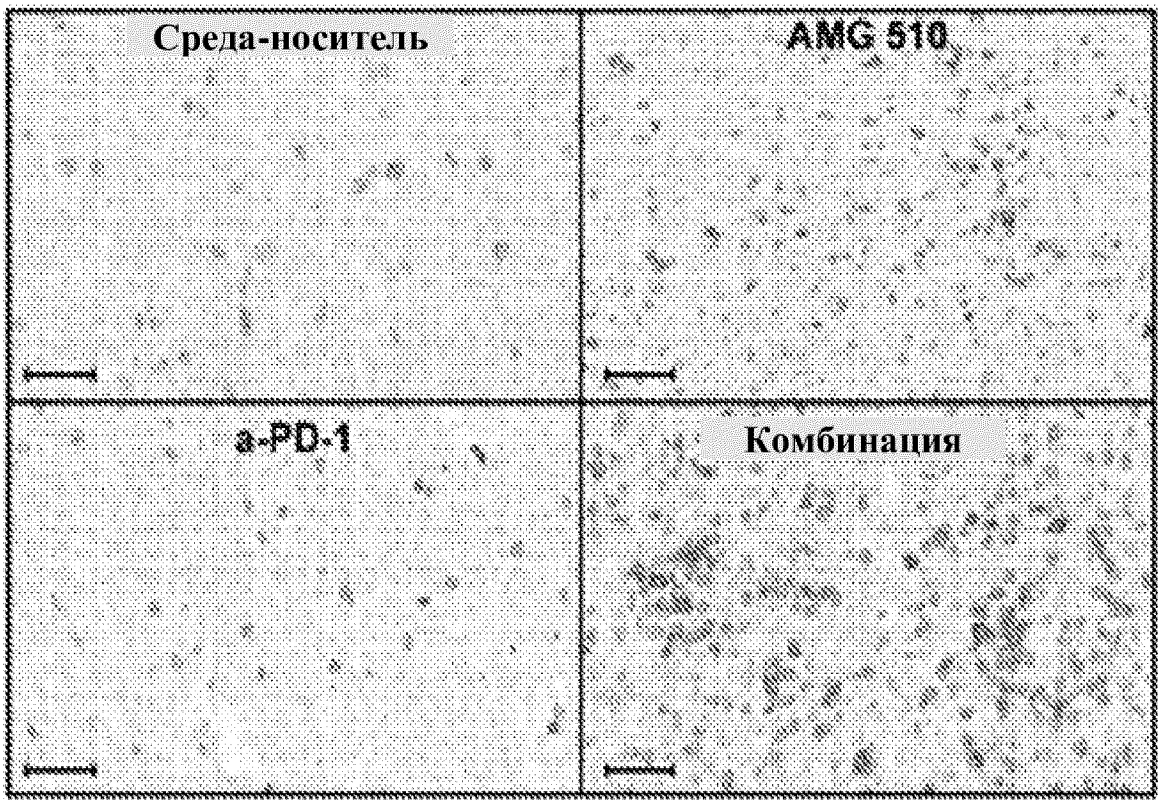
ФИГ. 45G



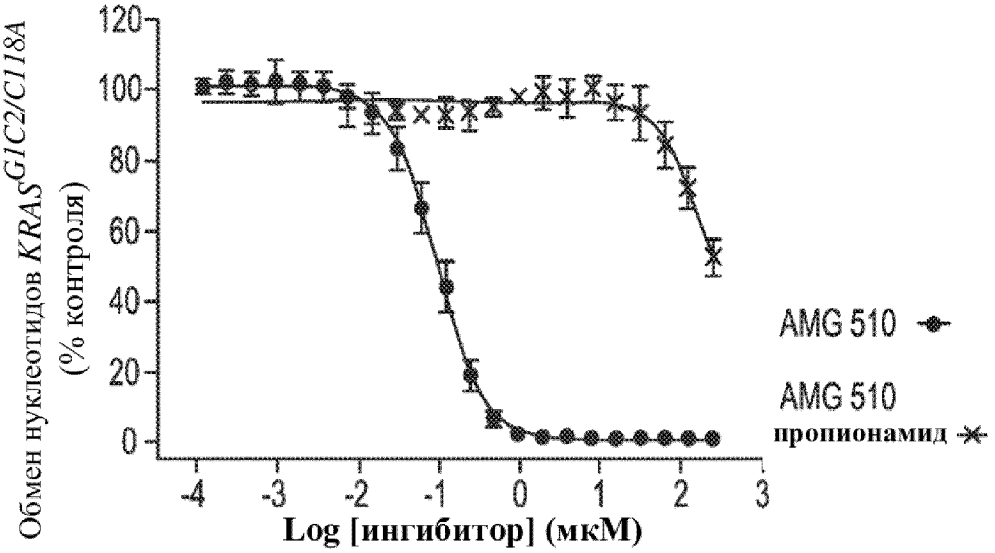
ФИГ. 45H



ФИГ. 45I



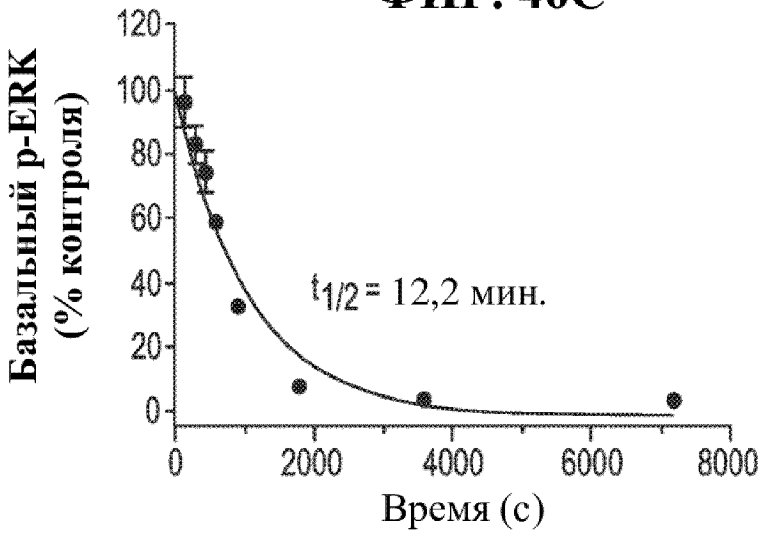
ФИГ. 46A



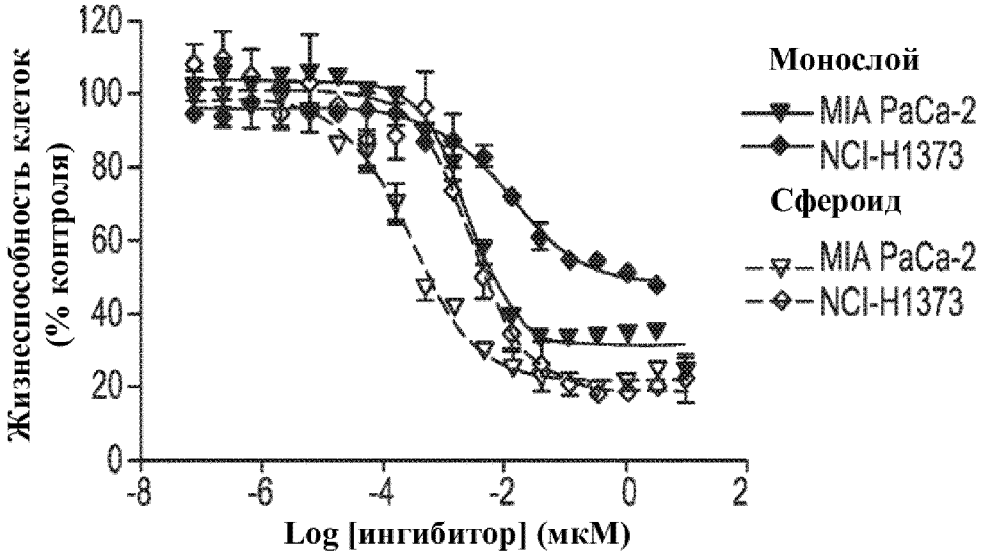
ФИГ. 46B

		Max k_{inact} или k_{obs} (s^{-1})	K_I или $[I]_{50}$ (M)	Max k_{inact} /или k_I Max k_{obs} /$[I]_{50}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
Масс-спектрометрия	AMG 510	**8,5E-01 ± 7,8E-02**	**8,6E-05 ± 1,4E-05**	**9,8E+03 ± 1,8E+03**
	ARS-1620	**7,3E-01 ± 3,0E-03**	**3,1E-05 ± 3,1E-06**	**2,4E+03**
MIA PaCa-2	AMG 510	**7,3E-04 ± 3,6E-05**	**2,5E-07 ± 6,2E-09**	**3,0E+03 ± 7,1E+01**
	ARS-1620	**3,1E-04 ± 2,2E-05**	**2,4E-06 ± 6,6E-07**	**1,3E+02 ± 2,7E+01**
NCI-H358	AMG 510	**8,9E-04 ± 7,4E-05**	**1,3E-07 ± 1,5E-08**	**7,1E+03 ± 1,4E+03**
	ARS-1620	**4,6E-04 ± 3,7E-05**	**1,1E-06 ± 4,9E-07**	**4,8E+02 ± 2,5E+02**

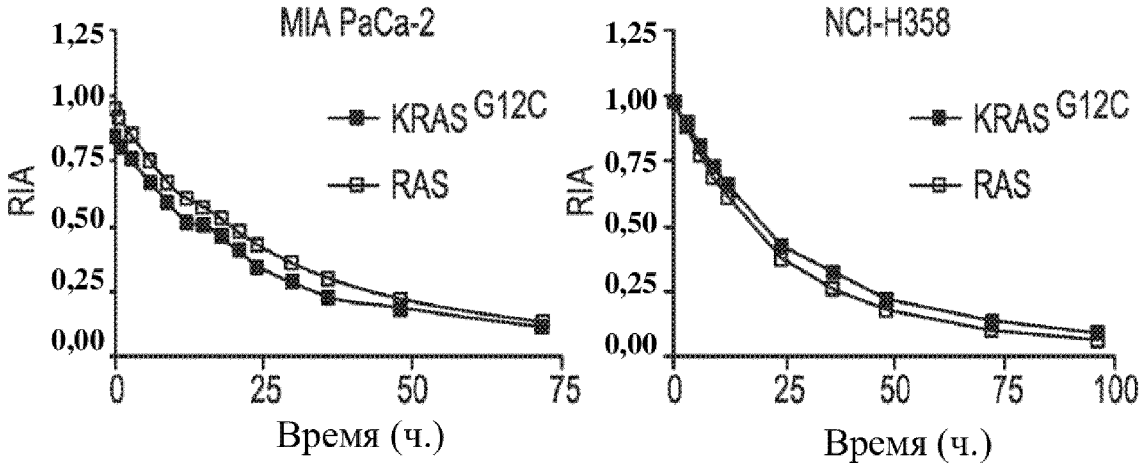
ФИГ. 46C



ФИГ. 46D

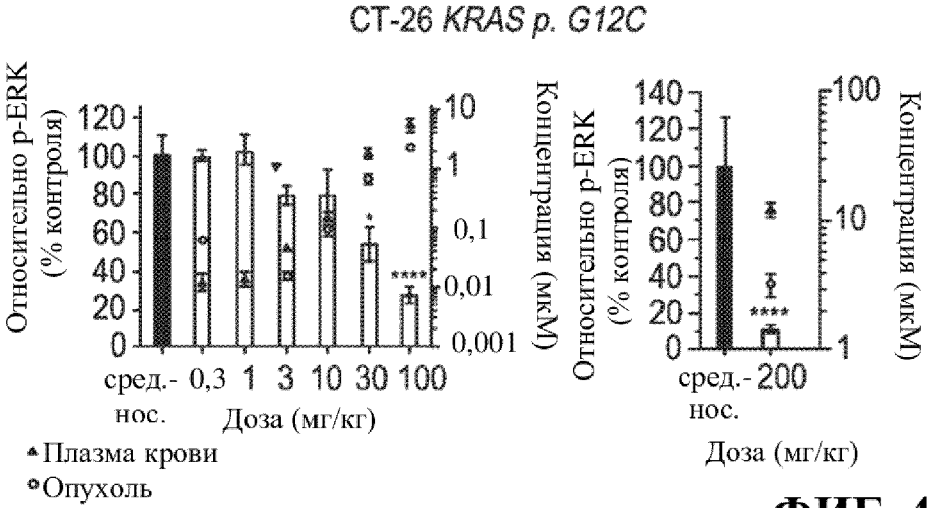


ФИГ. 46E

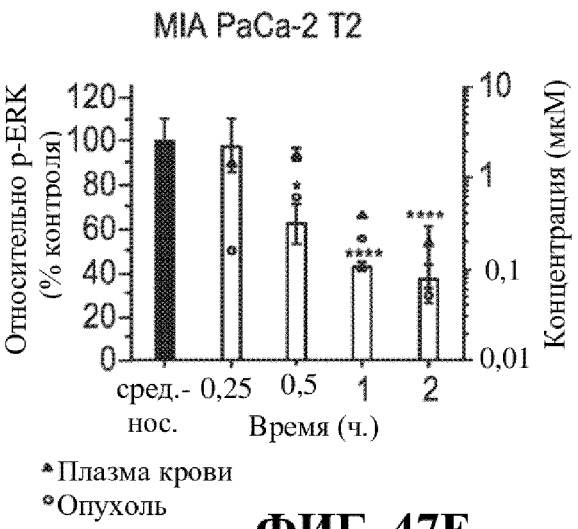


			Без поправки k_{dil}		С поправкой k_{dil}		
Клетка	**Продолжительность анализа (ч.)**	**Время удвоения клеток (ч.)**	k_{dec} **($ч.^{-1}$)**	**Период полужизни $KRAS^{G12C}$ (ч.)**	k_{dl} **($ч.^{-1}$)**	k_{dec} **($ч.^{-1}$)**	**Период полужизни $KRAS^{G12C}$ (ч.)**
MIA PaCa-2	72	24	**0,042**	17	**0,006**	**0,035**	20
NCI-H358	96	36	**0,037**	19	**0,010**	**0,029**	24

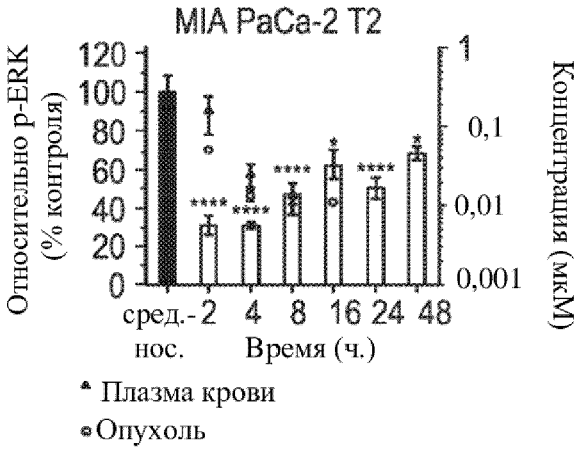
ФИГ. 47A



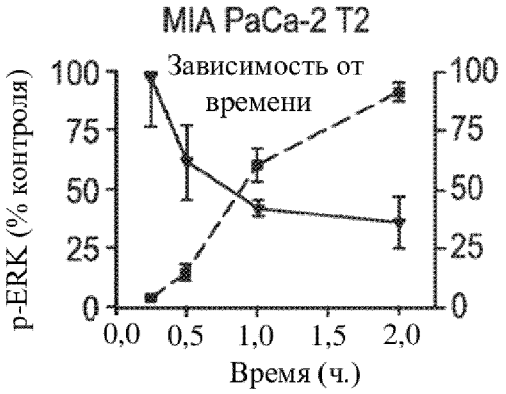
ФИГ. 47B



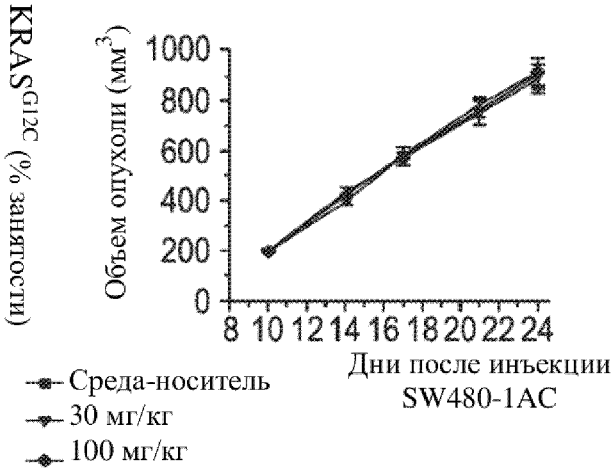
ФИГ. 47C



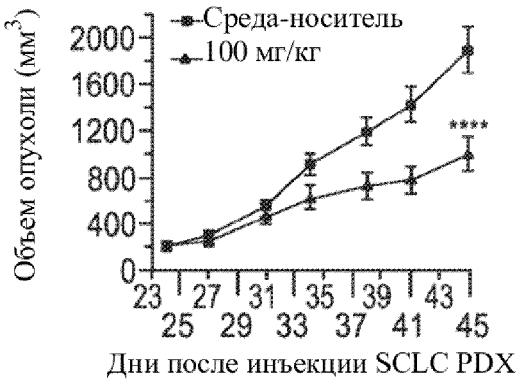
ФИГ. 47D



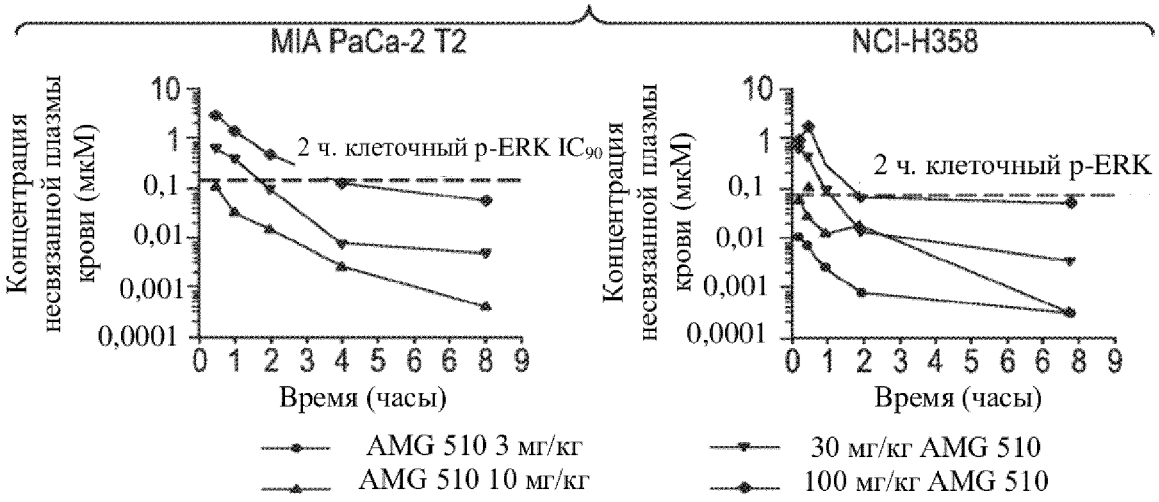
ФИГ. 47E



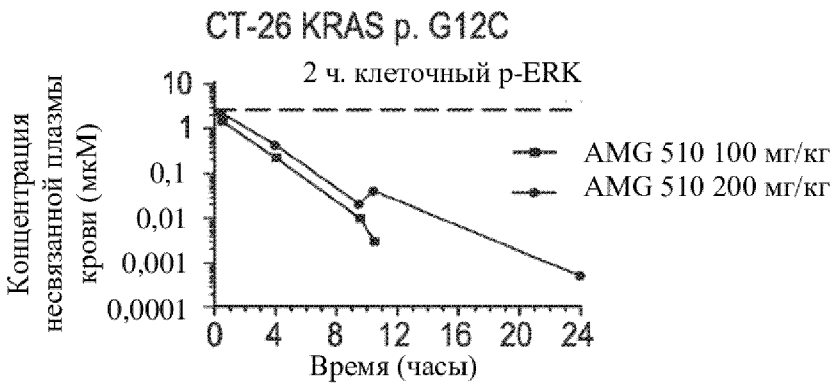
ФИГ. 47F



ФИГ. 47G



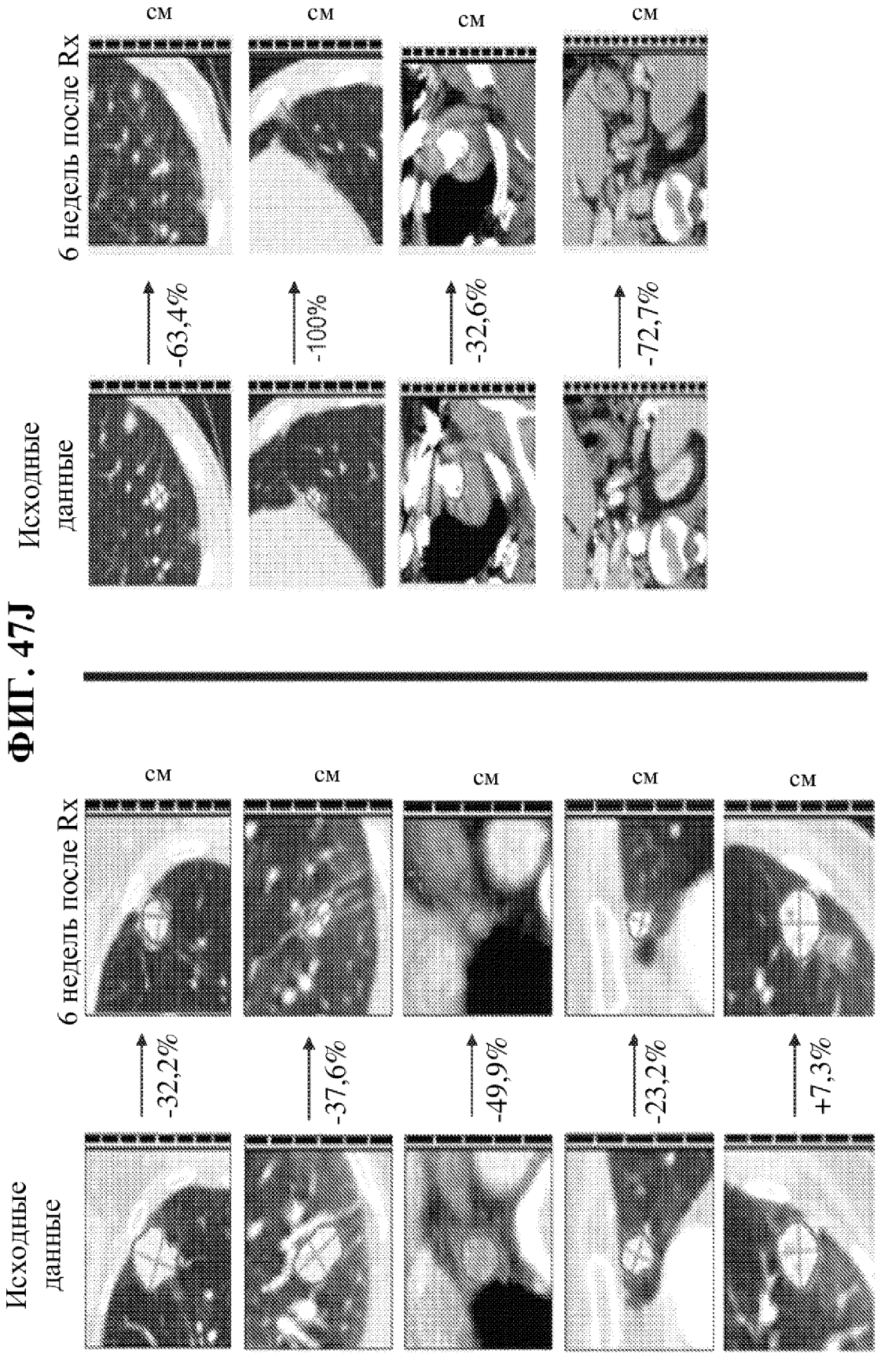
ФИГ. 47H



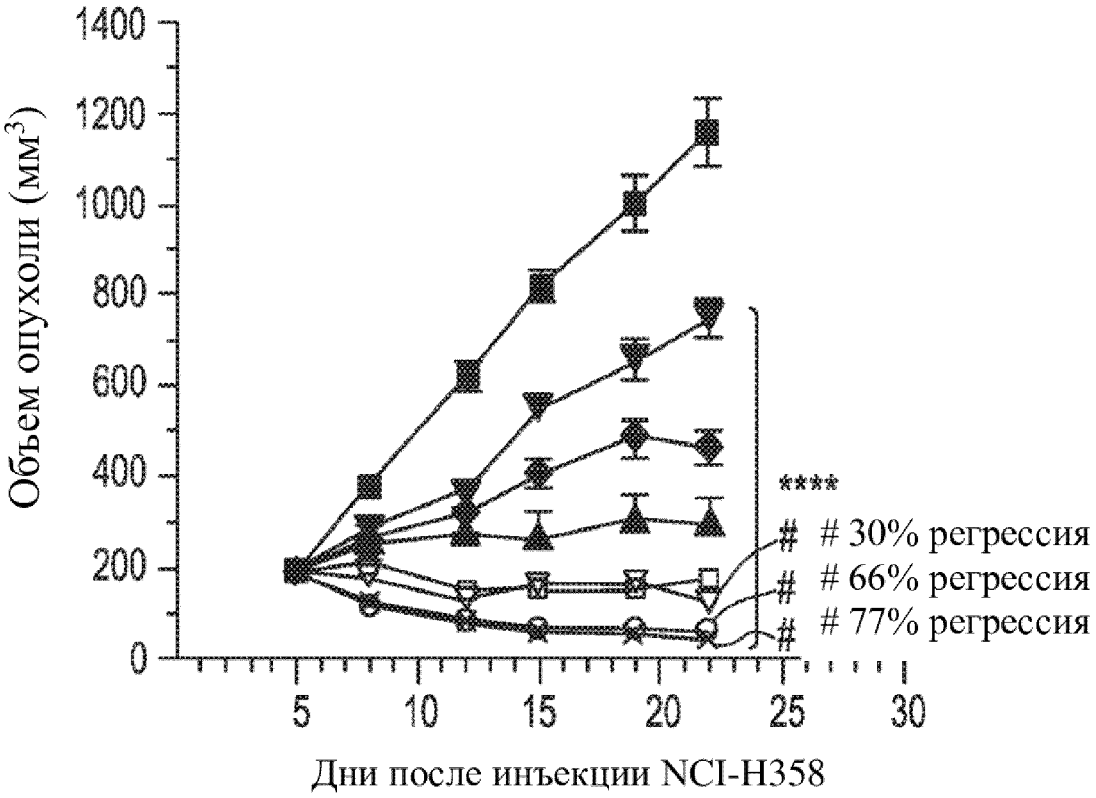
ФИГ. 47I



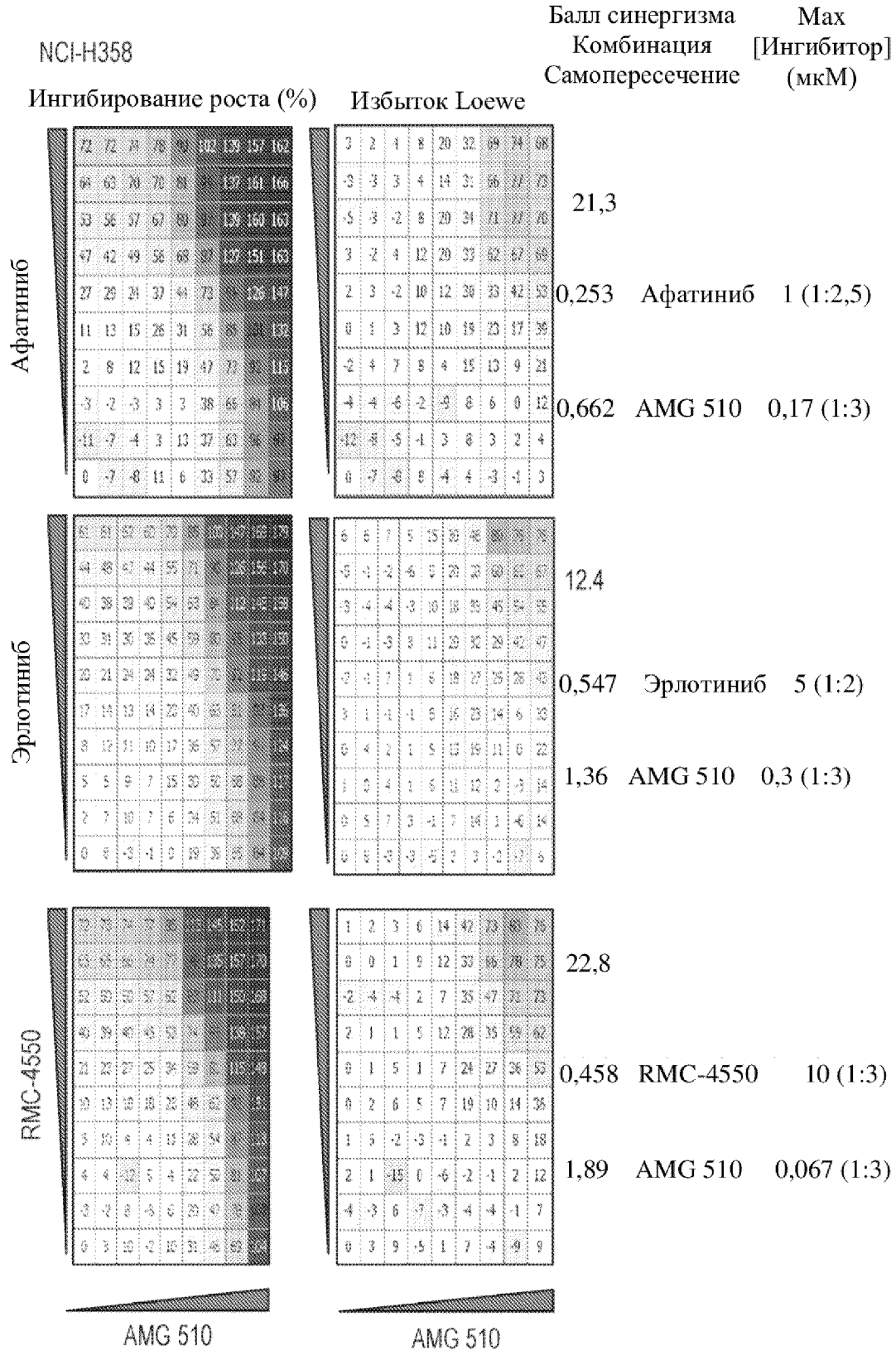
ФИГ. 47J


Исходные данные
6 недель после Rx
-32,2%
-37,6%
-49,9%
-23,2%
+7,3%
-63,4%
-100%
-32,6%
-72,7%
см

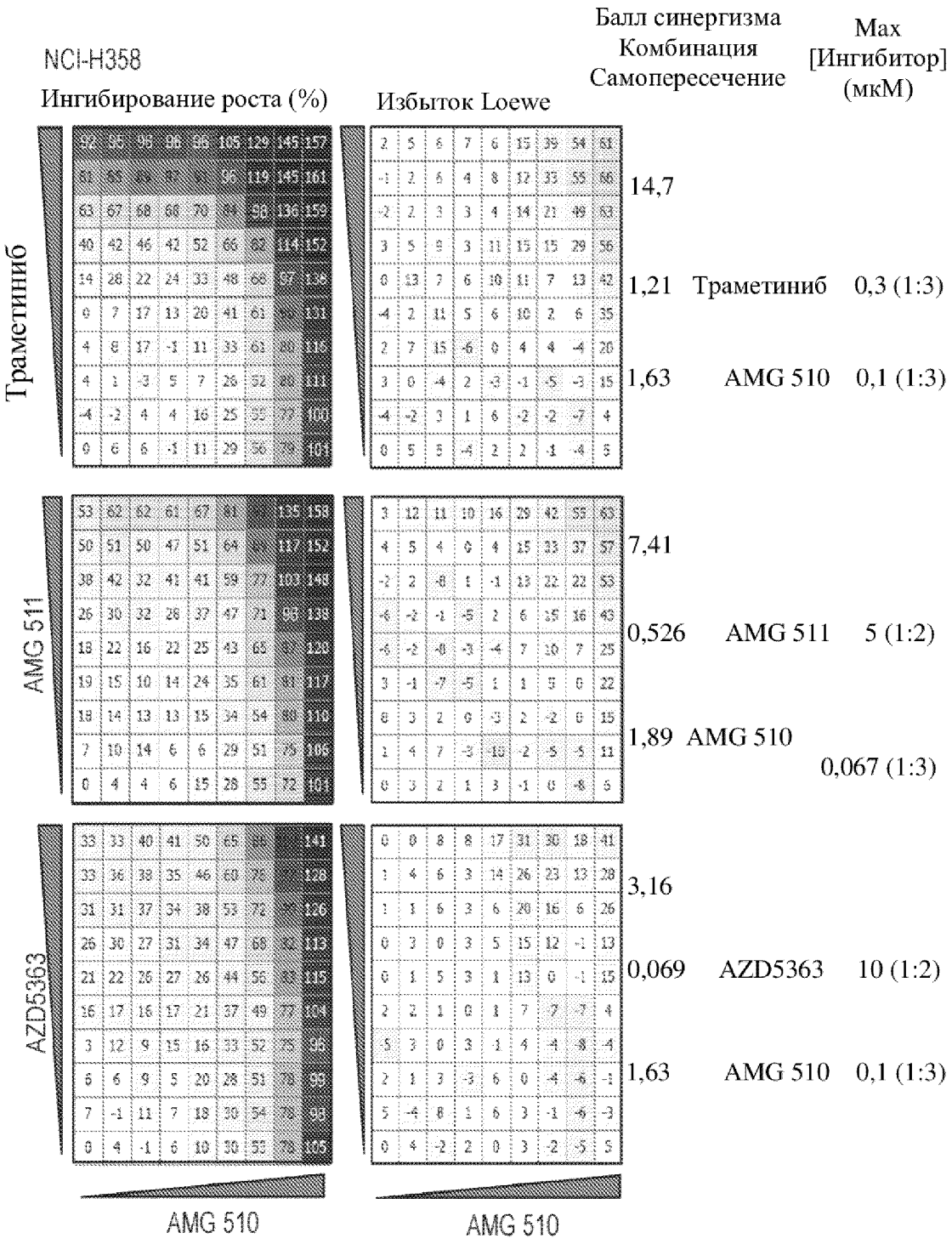
ФИГ. 47K


Объем опухоли (мм3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
5
10
15
20
25
30
Дни после инъекции NCI-H358
****
30% регрессия
66% регрессия
77% регрессия
Среда-носитель
10 мг/кг AMG 510
30 мг/кг AMG 510
50 мг/кг карбоплатина
100 мг/кг карбоплатина
10 мг/кг AMG 510 +100 мг/кг карбоплатина
30 мг/кг AMG 510 +100 мг/кг карбоплатина
30 мг/кг AMG 510 + 50 мг/кг карбоплатина

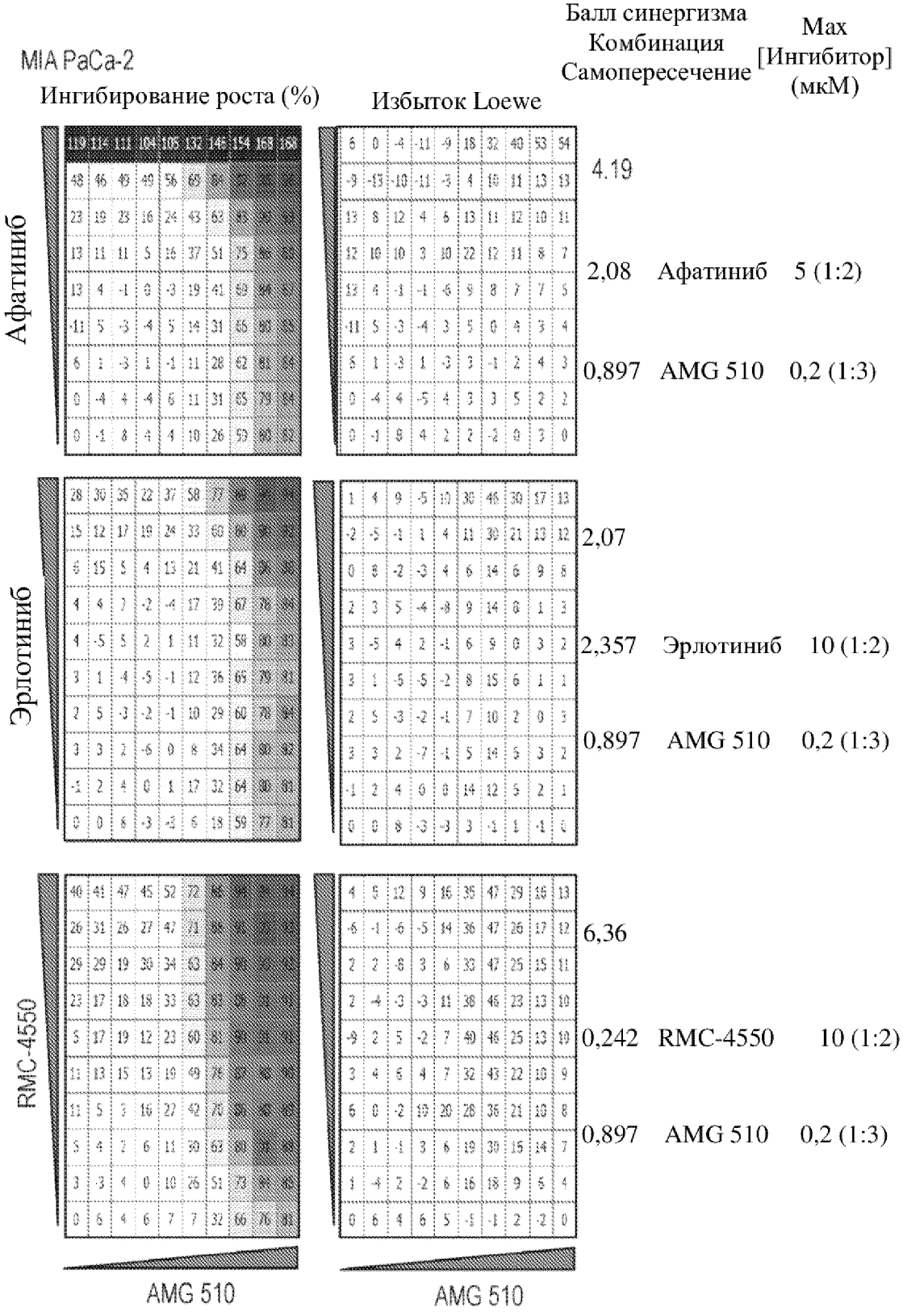
ФИГ. 48А


NCI-H358
Ингибирование роста (%)
Избыток Loewe
Балл синергизма
Комбинация
Самопересечение
Max
[Ингибитор]
(мкМ)
Афатиниб
Эрлотиниб
RMC-4550
AMG 510
AMG 510
21,3
0,253 Афатиниб 1 (1:2,5)
0,662 AMG 510 0,17 (1:3)
12,4
0,547 Эрлотиниб 5 (1:2)
1,36 AMG 510 0,3 (1:3)
22,8
0,458 RMC-4550 10 (1:3)
1,89 AMG 510 0,067 (1:3)

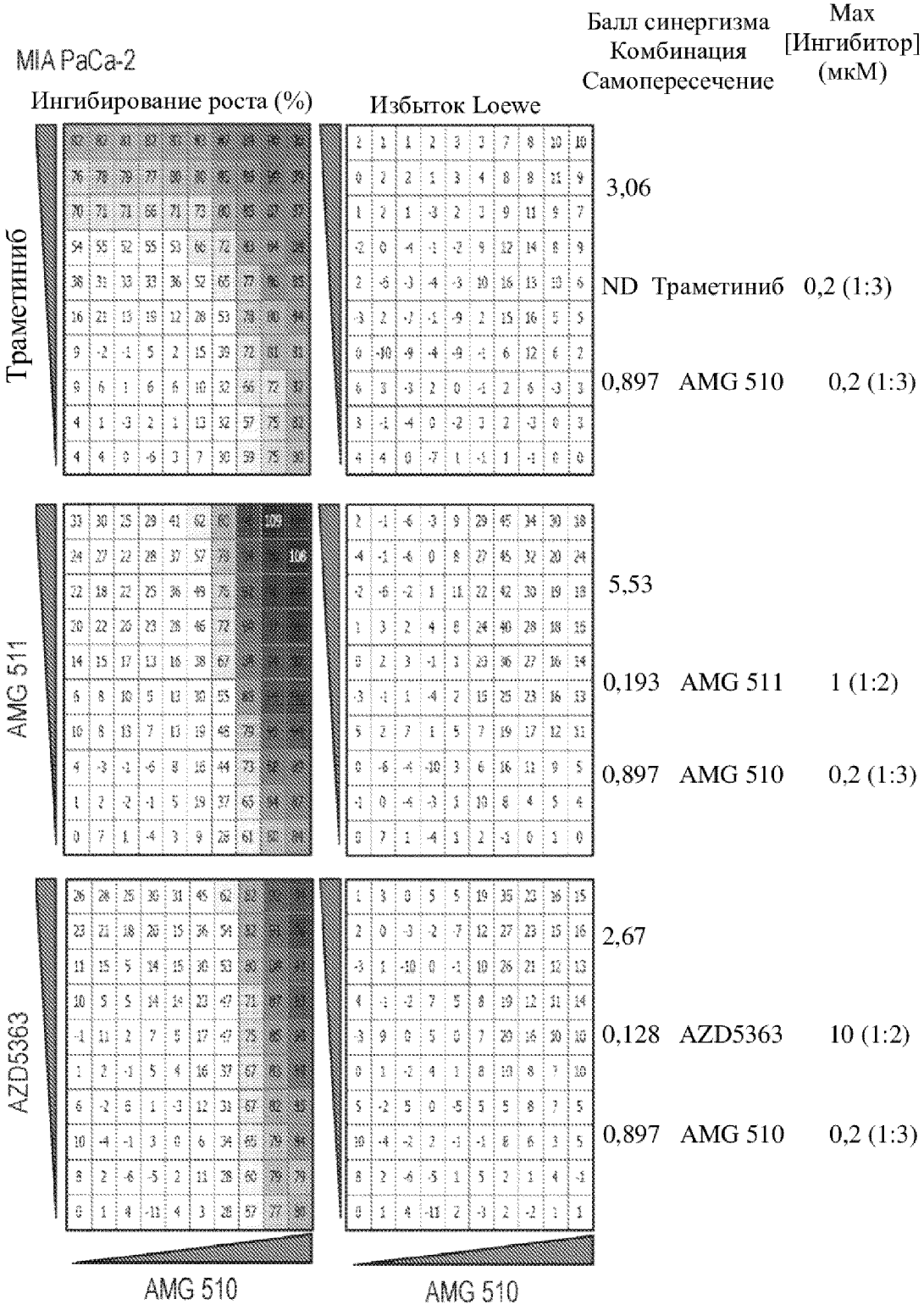
ФИГ. 48B


NCI-H358
Ингибирование роста (%)
Избыток Loewe
Балл синергизма
Комбинация
Самопересечение
Max
[Ингибитор]
(мкМ)
Траметиниб
AMG 511
AZD5363
AMG 510
AMG 510
14,7
1,21 Траметиниб 0,3 (1:3)
1,63 AMG 510 0,1 (1:3)
7,41
0,526 AMG 511 5 (1:2)
1,89 AMG 510 0,067 (1:3)
3,16
0,069 AZD5363 10 (1:2)
1,63 AMG 510 0,1 (1:3)

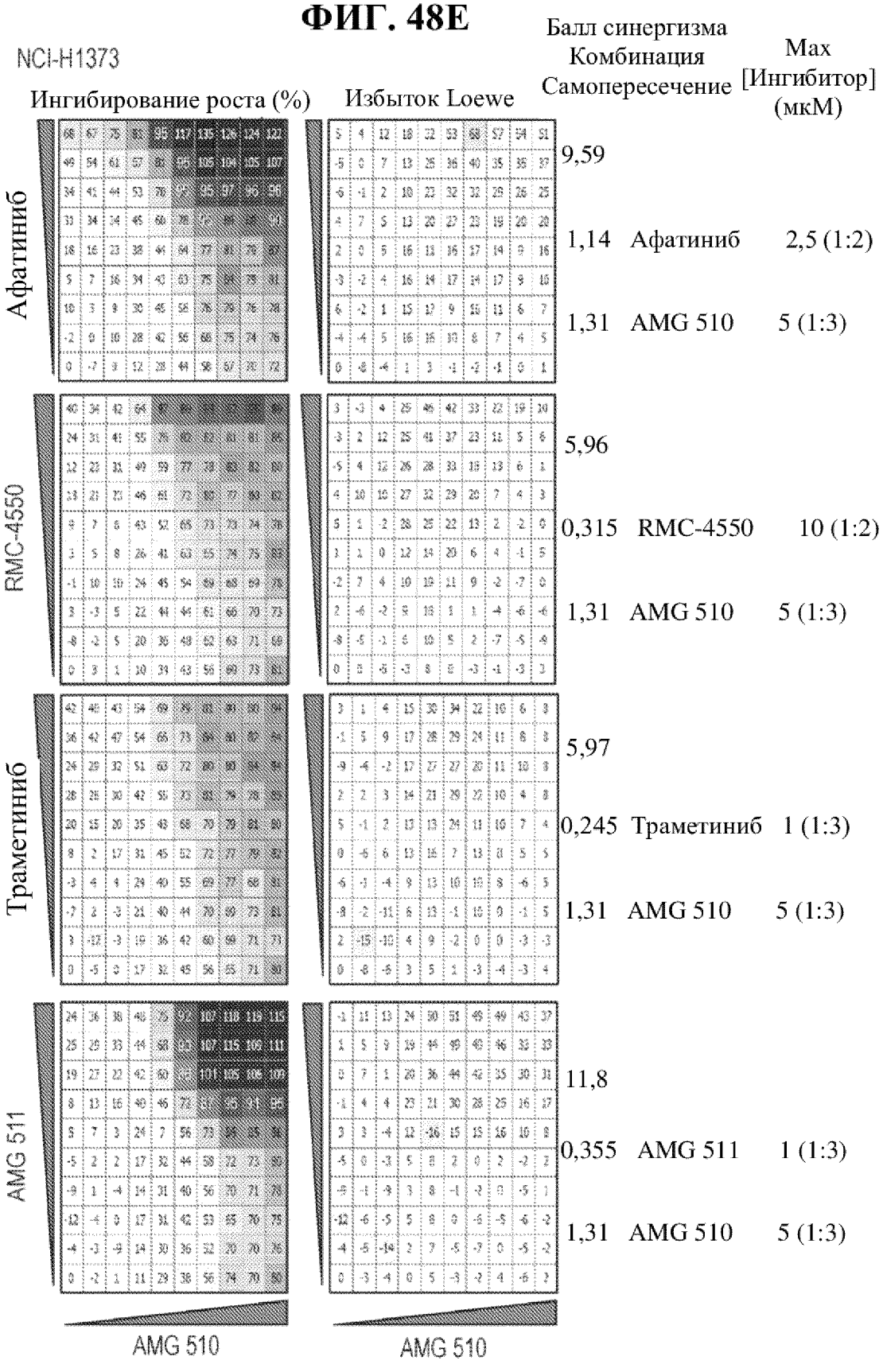
ФИГ. 48C


MIA PaCa-2
Ингибирование роста (%)
Избыток Loewe
Балл синергизма
Комбинация
Самопересечение
Max
[Ингибитор]
(мкМ)
Афатиниб
4.19
2,08
Афатиниб
5 (1:2)
0,897
AMG 510
0,2 (1:3)
Эрлотиниб
2,07
2,357
Эрлотиниб
10 (1:2)
0,897
AMG 510
0,2 (1:3)
RMC-4550
6,36
0,242
RMC-4550
10 (1:2)
0,897
AMG 510
0,2 (1:3)
AMG 510
AMG 510

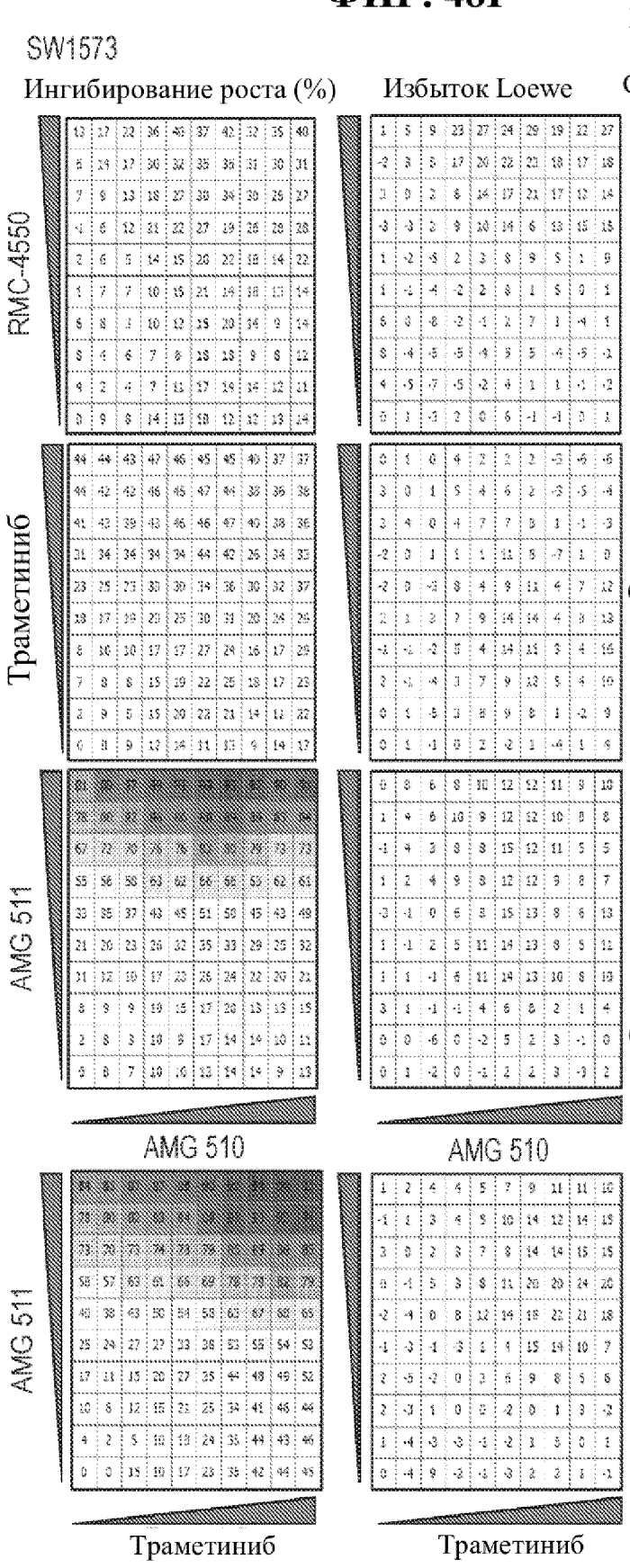
ФИГ. 48D


MIA PaCa-2
Ингибирование роста (%)
Избыток Loewe
Балл синергизма
Комбинация
Самопересечение
Max
[Ингибитор]
(мкМ)
Траметиниб
AMG 511
AZD5363
AMG 510
AMG 510
3,06
ND Траметиниб 0,2 (1:3)
0,897 AMG 510 0,2 (1:3)
5,53
0,193 AMG 511 1 (1:2)
0,897 AMG 510 0,2 (1:3)
2,67
0,128 AZD5363 10 (1:2)
0,897 AMG 510 0,2 (1:3)

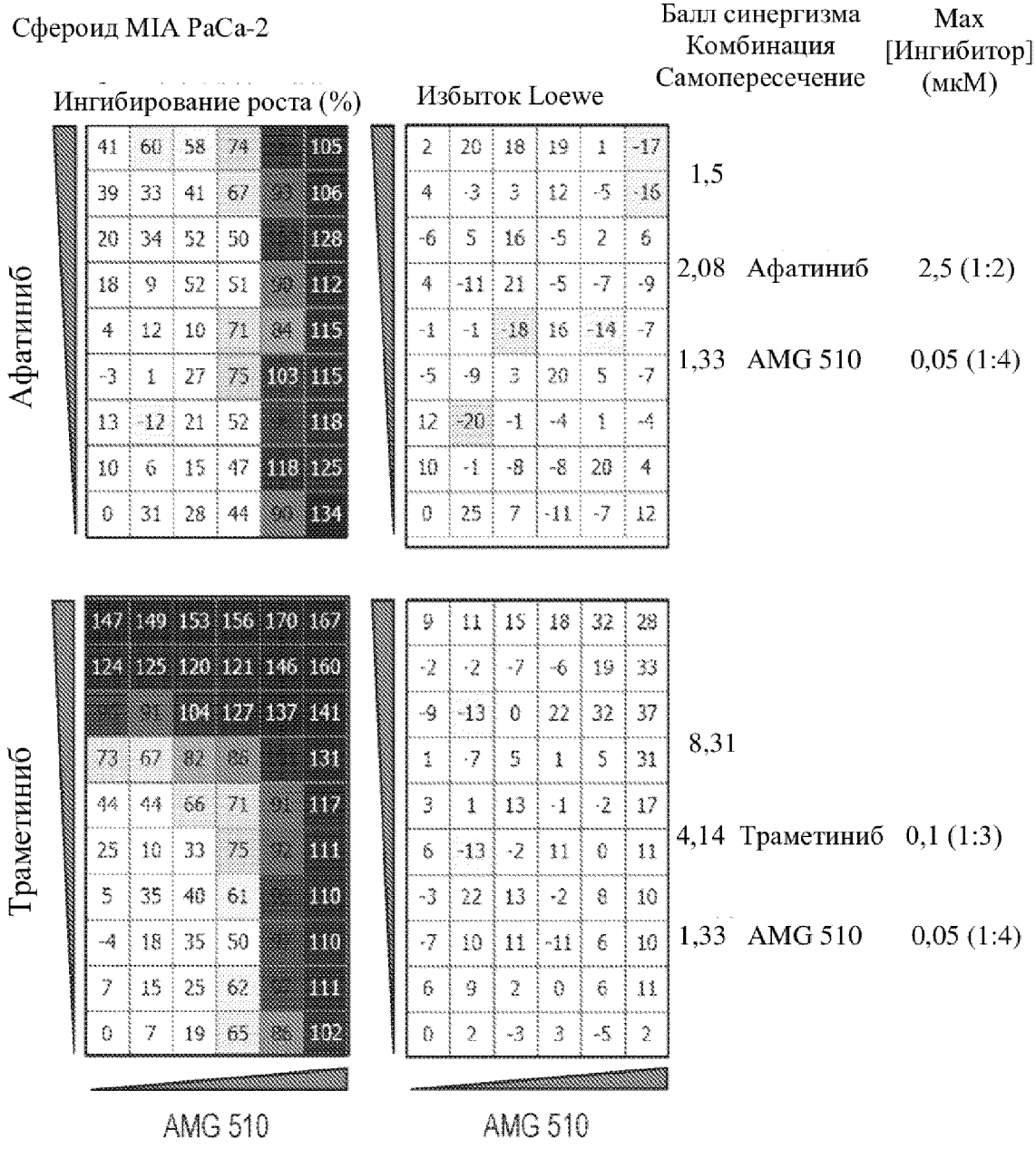
ФИГ. 48E


NCI-H1373
Ингибирование роста (%)
Избыток Loewe
Балл синергизма
Комбинация
Самопересечение
Max [Ингибитор] (мкМ)
Афатиниб
9,59
1,14 Афатиниб 2,5 (1:2)
1,31 AMG 510 5 (1:3)
RMC-4550
5,96
0,315 RMC-4550 10 (1:2)
1,31 AMG 510 5 (1:3)
Траметиниб
5,97
0,245 Траметиниб 1 (1:3)
1,31 AMG 510 5 (1:3)
AMG 511
11,8
0,355 AMG 511 1 (1:3)
1,31 AMG 510 5 (1:3)
AMG 510
AMG 510

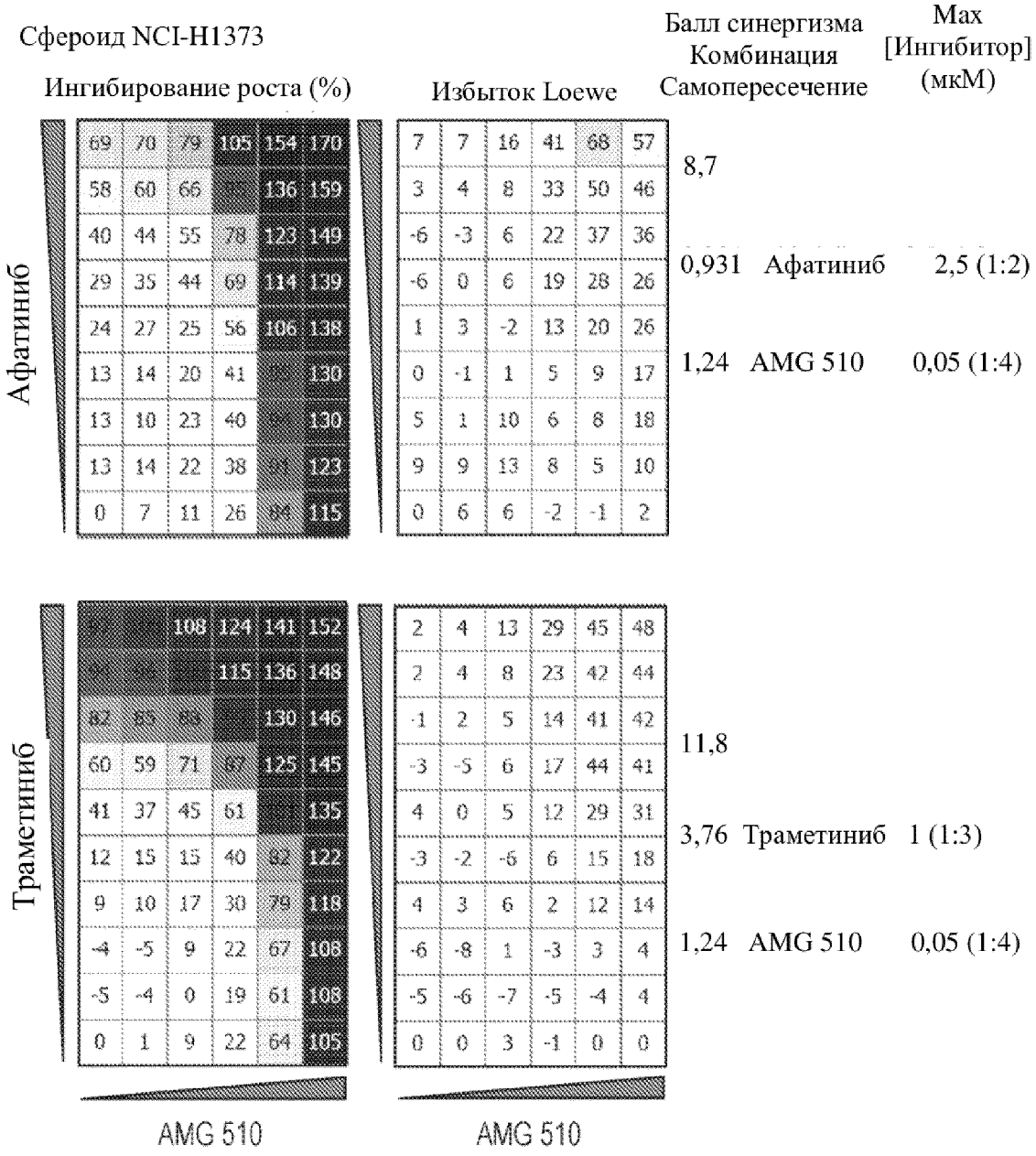
ФИГ. 48F


SW1573
Ингибирование роста (%)
Избыток Loewe
Балл синергизма
Комбинация
Самопересечение
Max
[Ингибитор]
(мкМ)
RMC-4550
Траметиниб
AMG 511
AMG 510
AMG 510
AMG 511
Траметиниб
Траметиниб
2,15
0,107 RMC-4550 10 (1:3)
0,140 AMG 510 10 (1:3)
0,817
0,141 Траметиниб 0,5 (1:2)
0,140 AMG 510 10 (1:3)
3,87
0,782 AMG 511 3 (1:3)
0,140 AMG 510 10 (1:3)
3,02
0,782 AMG 511 3 (1:3)
0,141 Траметиниб 0,5 (1:2)

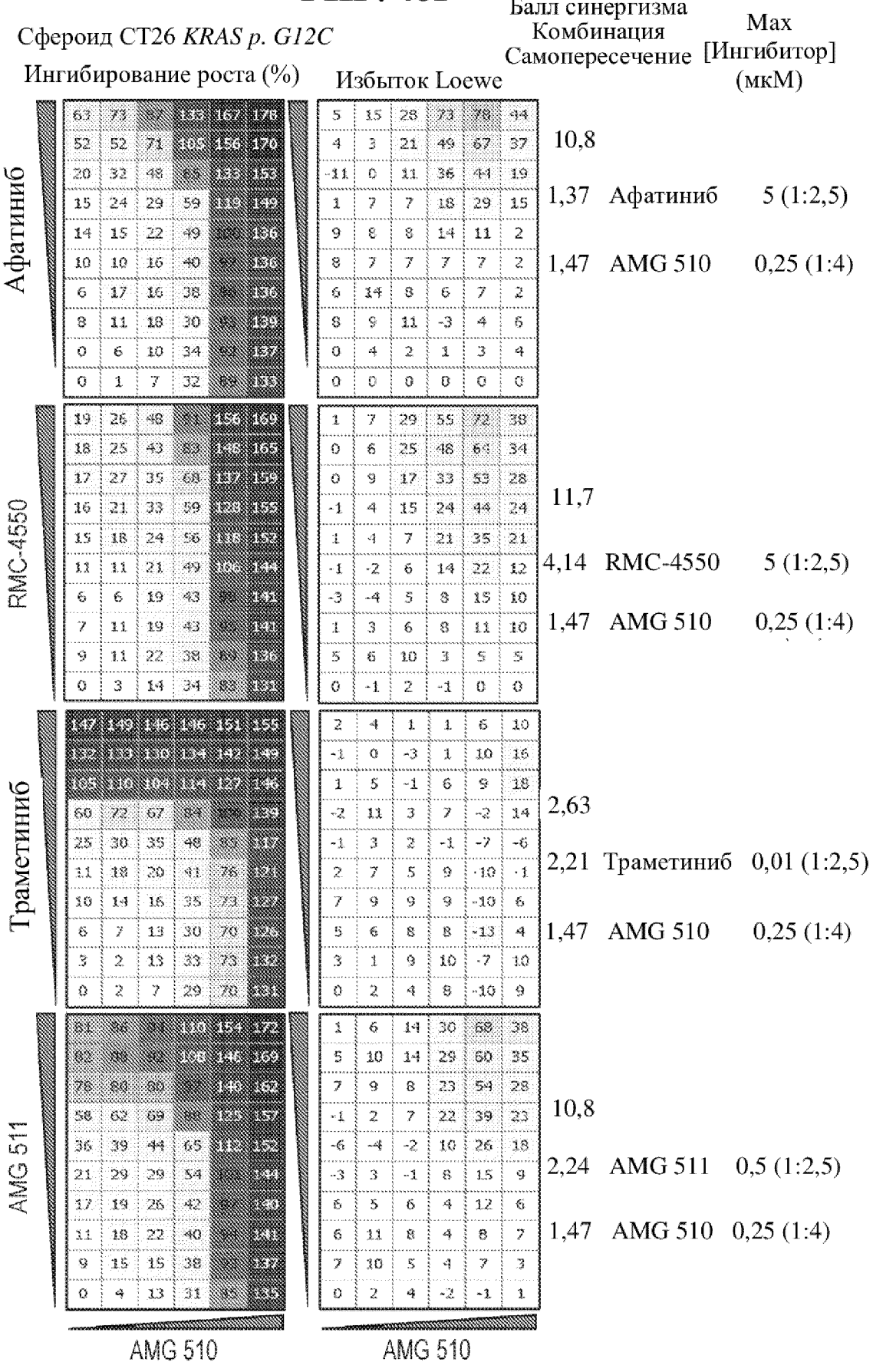
ФИГ. 48G


Сфероид MIA PaCa-2
Ингибирование роста (%)
Избыток Loewe
Балл синергизма
Комбинация
Самопересечение
Max
[Ингибитор]
(мкМ)
Афатиниб
Траметиниб
AMG 510
AMG 510
1,5
2,08 Афатиниб 2,5 (1:2)
1,33 AMG 510 0,05 (1:4)
8,31
4,14 Траметиниб 0,1 (1:3)
1,33 AMG 510 0,05 (1:4)

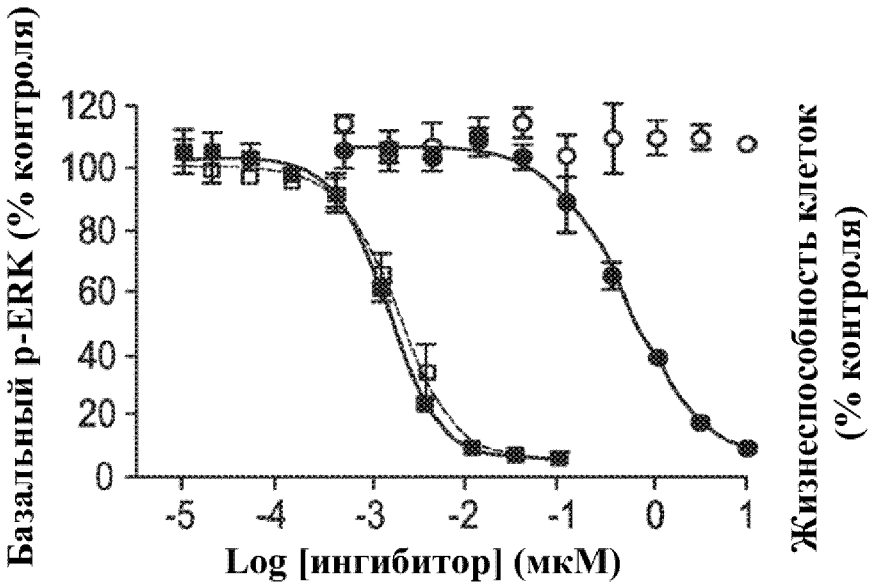
ФИГ. 48H


Сфероид NCI-H1373
Ингибирование роста (%)
Избыток Loewe
Балл синергизма
Комбинация
Самопересечение
Max
[Ингибитор]
(мкМ)
Афатиниб
69 70 79 105 154 170
58 60 66 [illegible] 136 159
40 44 55 78 123 149
29 35 44 69 114 139
24 27 25 56 106 138
13 14 20 41 [illegible] 130
13 10 23 40 [illegible] 130
13 14 22 38 [illegible] 123
0 7 11 26 [illegible] 115
7 7 16 41 68 57
3 4 8 33 50 46
-6 -3 6 22 37 36
-6 0 6 19 28 26
1 3 -2 13 20 26
0 -1 1 5 9 17
5 1 10 6 8 18
9 9 13 8 5 10
0 6 6 -2 -1 2
8,7
0,931 Афатиниб 2,5 (1:2)
1,24 AMG 510 0,05 (1:4)
Траметиниб
[illegible] [illegible] 108 124 141 152
[illegible] [illegible] [illegible] 115 136 148
82 85 [illegible] [illegible] 130 146
60 59 71 87 125 145
41 37 45 61 [illegible] 135
12 15 15 40 82 122
9 10 17 30 79 118
-4 -5 9 22 67 108
-5 -4 0 19 61 108
0 1 9 22 64 105
2 4 13 29 45 48
2 4 8 23 42 44
-1 2 5 14 41 42
-3 -5 6 17 44 41
4 0 5 12 29 31
-3 -2 -6 6 15 18
4 3 6 2 12 14
-6 -8 1 -3 3 4
-5 -6 -7 -5 -4 4
0 0 3 -1 0 0
11,8
3,76 Траметиниб 1 (1:3)
1,24 AMG 510 0,05 (1:4)
AMG 510
AMG 510

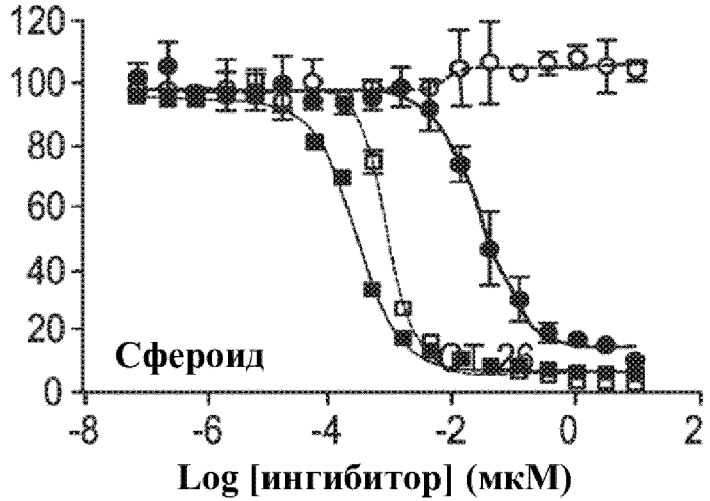
ФИГ. 48I


Сфероид CT26 *KRAS p. G12C*
Ингибирование роста (%)
Избыток Loewe
Балл синергизма
Комбинация
Самопересечение
Max
[Ингибитор]
(мкМ)
Афатиниб
RMC-4550
Траметиниб
AMG 511
AMG 510
AMG 510
10,8
1,37 Афатиниб 5 (1:2,5)
1,47 AMG 510 0,25 (1:4)
11,7
4,14 RMC-4550 5 (1:2,5)
1,47 AMG 510 0,25 (1:4)
2,63
2,21 Траметиниб 0,01 (1:2,5)
1,47 AMG 510 0,25 (1:4)
10,8
2,24 AMG 511 0,5 (1:2,5)
1,47 AMG 510 0,25 (1:4)

ФИГ. 49А



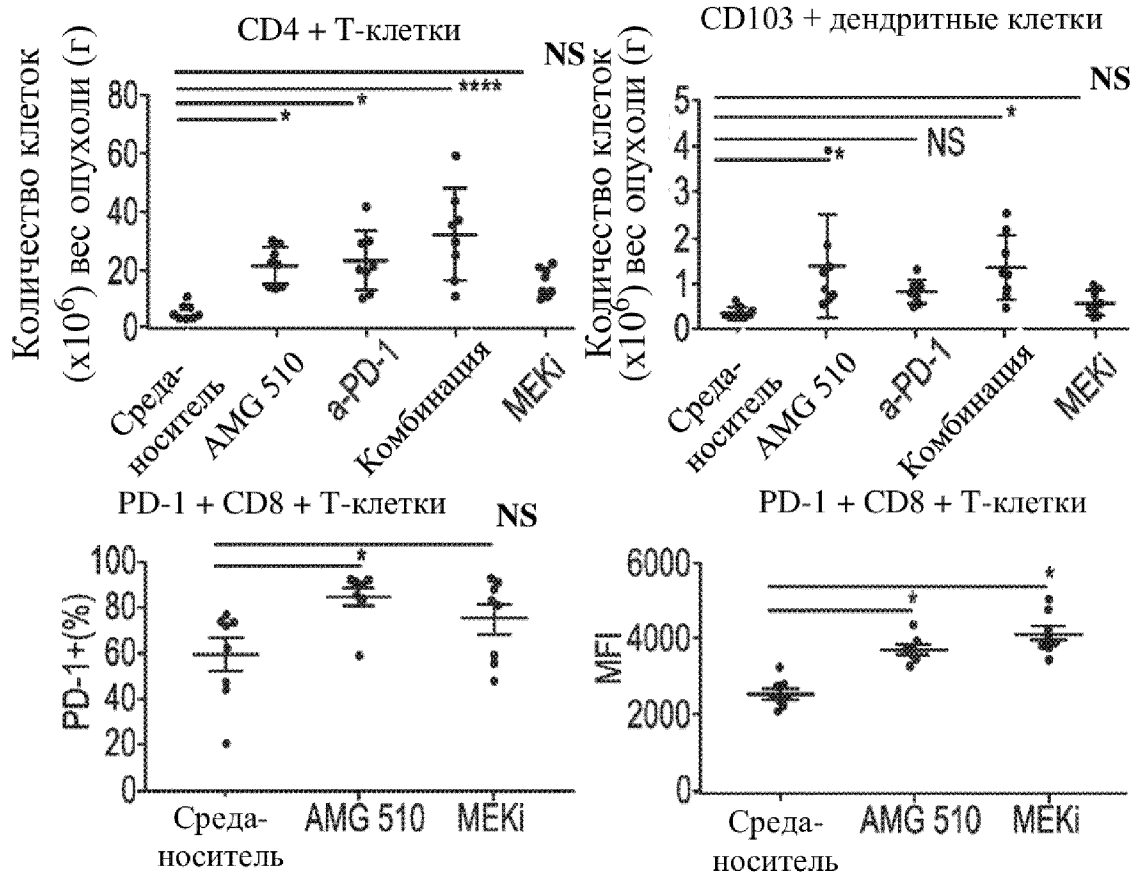
ФИГ. 49В



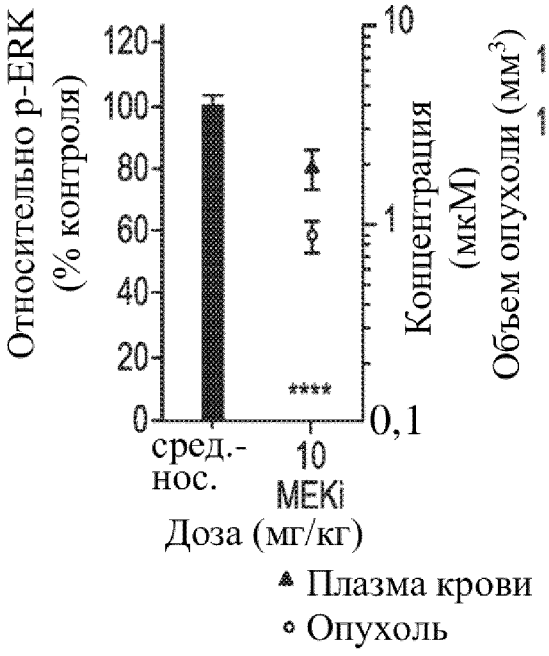
AMG 510
CT-26 *KRAS p.G12C*
CT-26

Траметиниб
CT-26 *KRAS p.G12C*
CT-26

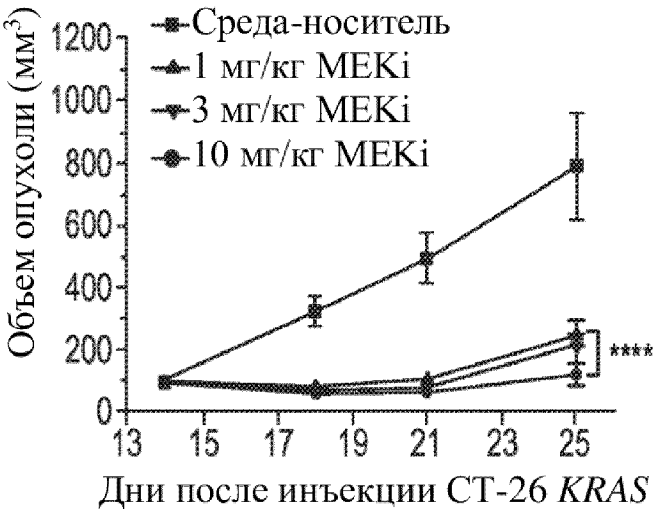
ФИГ. 50A



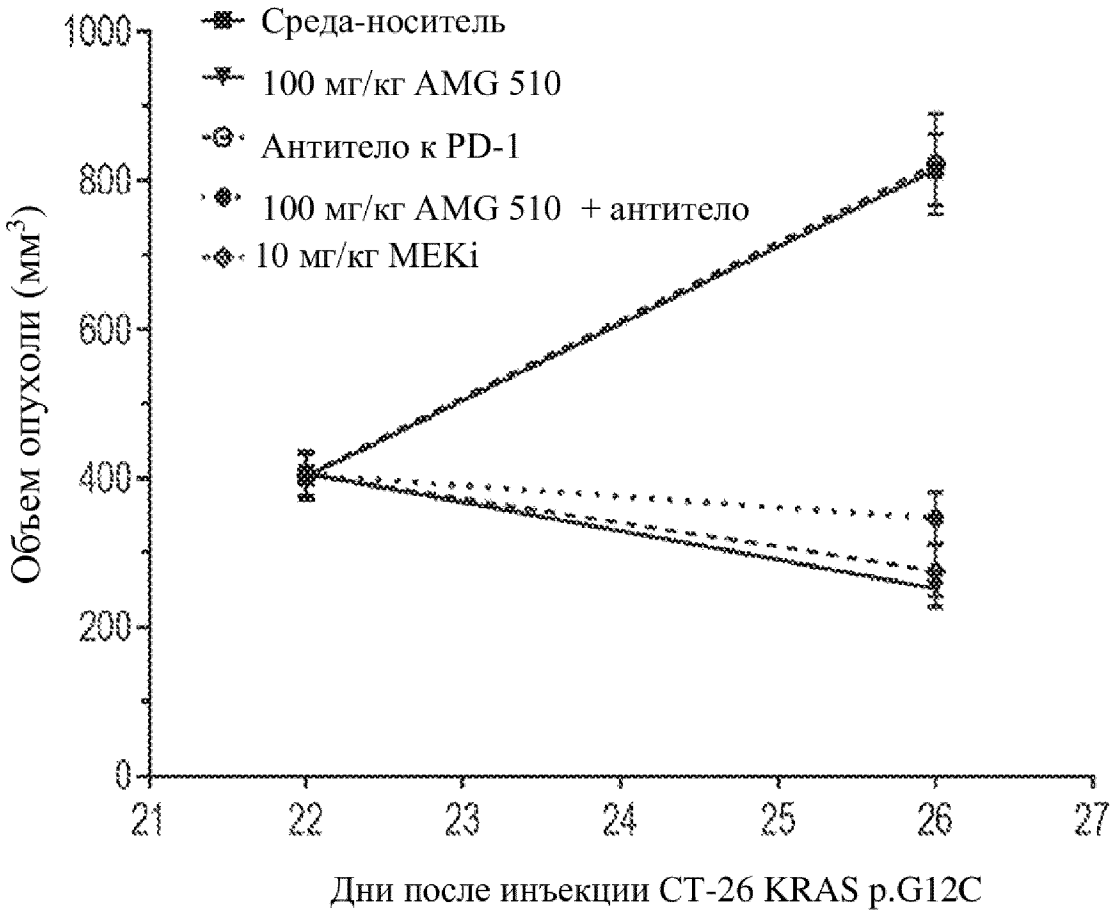
ФИГ. 50B



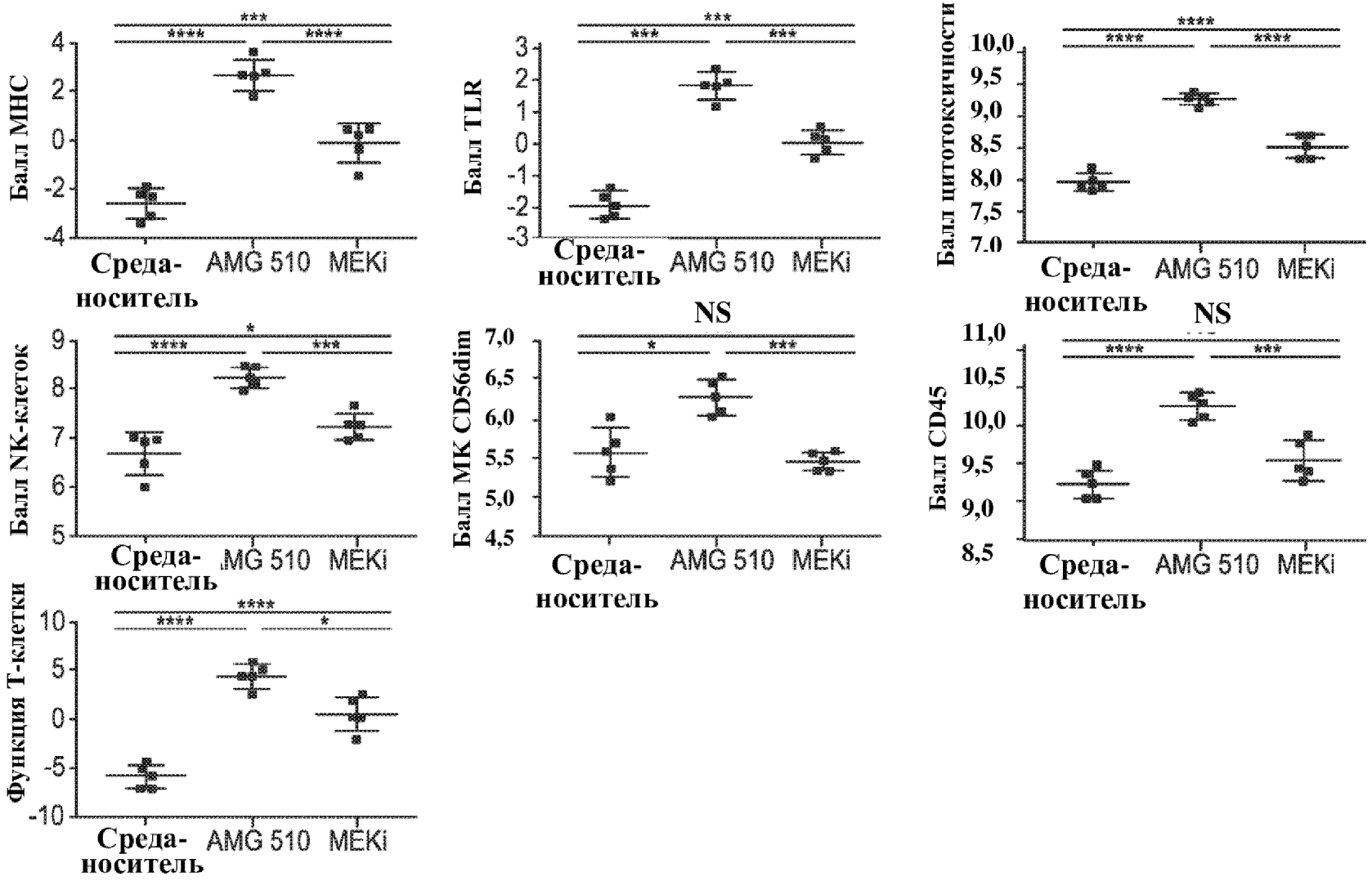
ФИГ. 50C



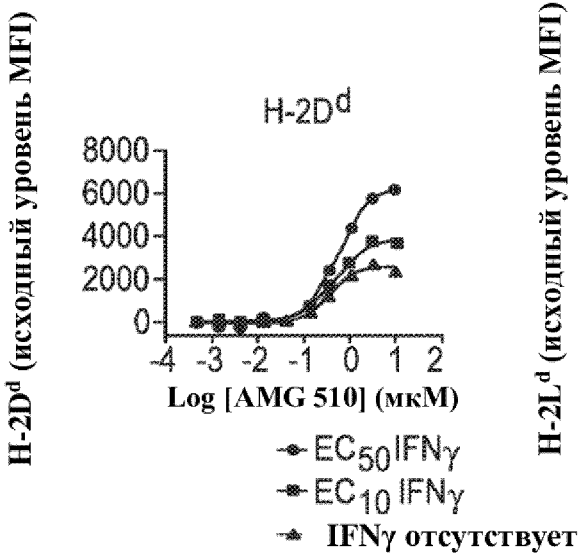
ФИГ. 50D

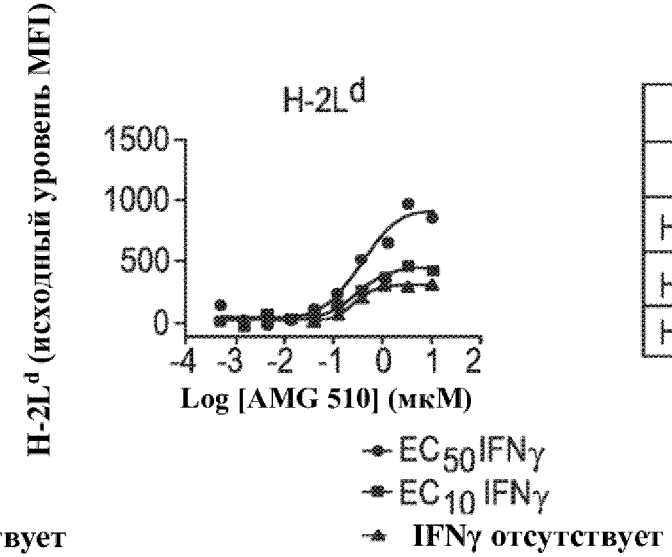

Среда-носитель
100 мг/кг AMG 510
Антитело к PD-1
100 мг/кг AMG 510 + антитело
10 мг/кг MEKi
Объем опухоли (мм3)
1000
800
600
400
200
0
21
22
23
24
25
26
27
Дни после инъекции CT-26 KRAS p.G12C

ФИГ. 50E


Балл MHC
Среда-носитель
AMG 510
MEKi
Балл TLR
Балл цитотоксичности
Балл NK-клеток
Балл MK CD56dim
NS
Балл CD45
Функция Т-клетки

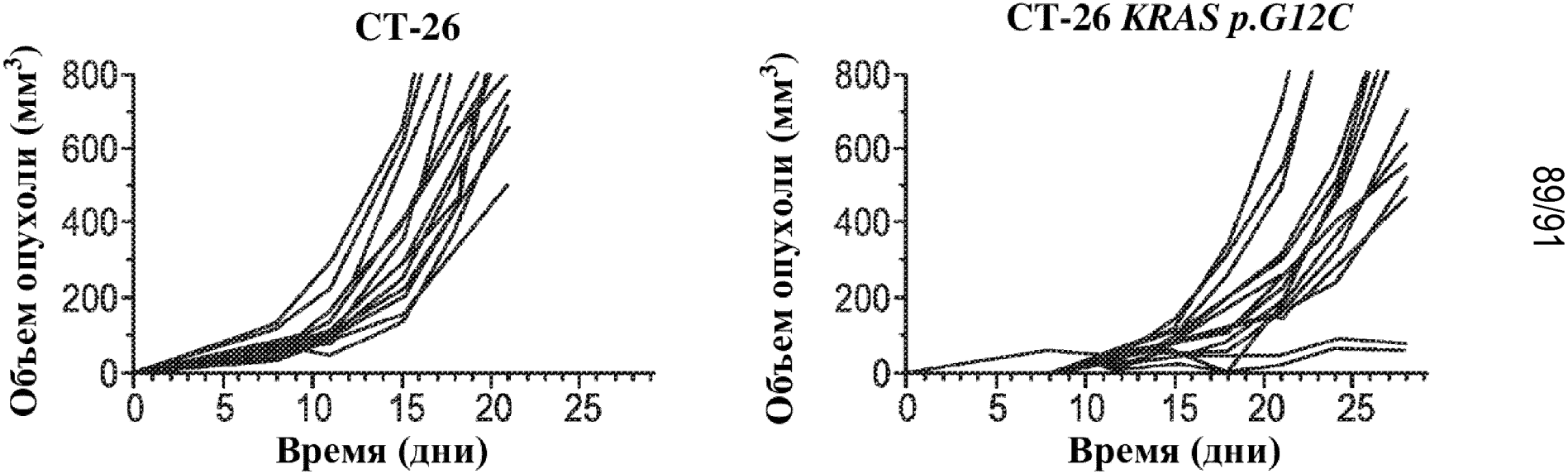
ФИГ. 50F



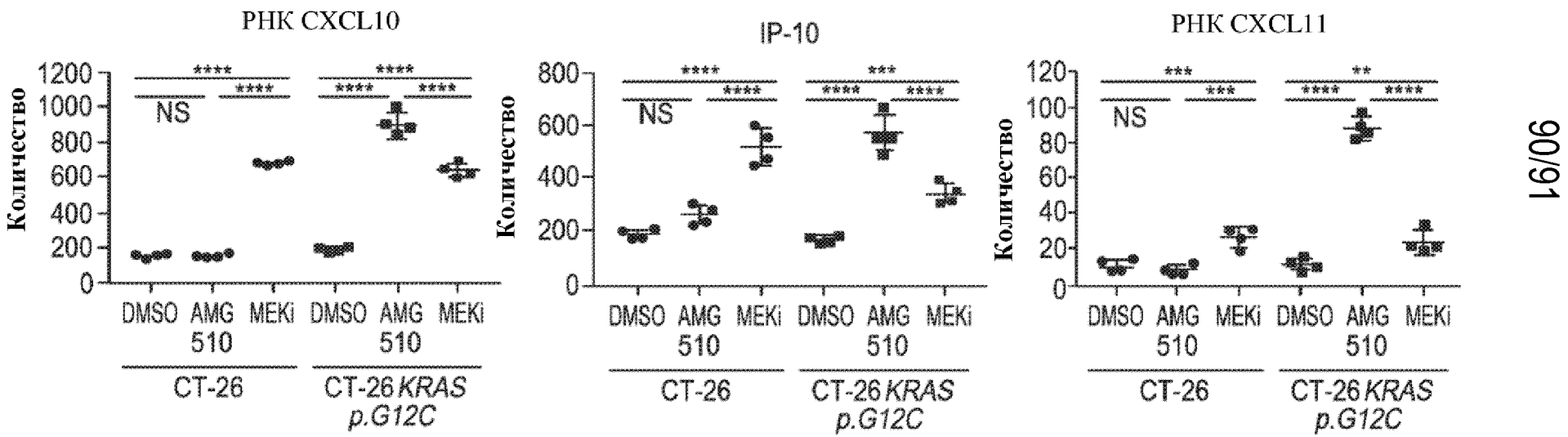


	AMC 510 EC$_{50}$ (мкМ)		
	Не IFNγ	EC$_{10}$ IFNγ	EC$_{50}$ IFNγ
H-2D^d	**0,356**	**0,484**	**0,577**
H-2K^d	**0,315**	**0,441**	**0,534**
H-2L^d	**0,288**	**0,301**	**0,356**

ФИГ. 50G

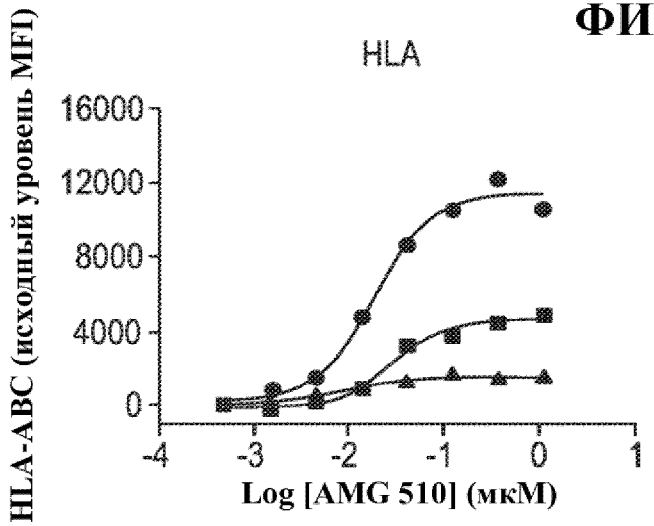

CT-26
Объем опухоли (мм3)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
Время (дни)
CT-26 KRAS p.G12C
Объем опухоли (мм3)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
Время (дни)

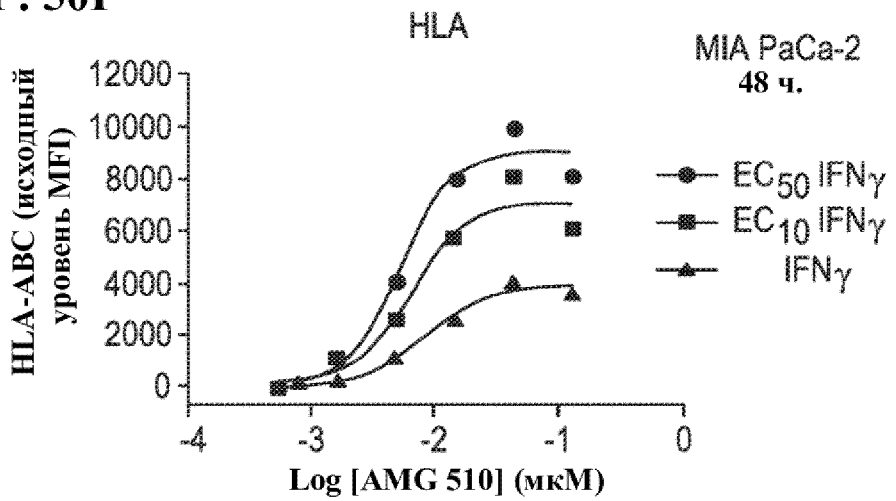
ФИГ. 50H


РНК CXCL10
Количество
1200
1000
800
600
400
200
0
****
****
****
****
****
NS
DMSO
AMG 510
MEKi
DMSO
AMG 510
MEKi
CT-26
CT-26 KRAS p.G12C
IP-10
Количество
800
600
400
200
0
****
****
***
****
****
NS
DMSO
AMG 510
MEKi
DMSO
AMG 510
MEKi
CT-26
CT-26 KRAS p.G12C
РНК CXCL11
Количество
120
100
80
60
40
20
0
***
***
**
****
****
NS
DMSO
AMG 510
MEKi
DMSO
AMG 510
MEKi
CT-26
CT-26 KRAS p.G12C

ФИГ. 50I

SW-1573
48 ч.





CT-26
KRAS p.G12C
24 ч.

