

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040549**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.21

(21) Номер заявки
202090261

(22) Дата подачи заявки
2018.07.09

(51) Int. Cl. *A61K 31/496* (2006.01)
C07D 241/02 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/530,778; 62/593,185; 62/675,581**

(32) **2017.07.10; 2017.11.30; 2018.05.23**

(33) **US**

(43) **2020.05.26**

(86) **PCT/US2018/041230**

(87) **WO 2019/014100 2019.01.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛДЖИН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
**Александр Мэттью Д., Артман
Джеральд Д. III, Брэй Гордон Л. (US),
Кармайлл Джеймс (GB), Каррансио
Сорайя, Кэтерс Брайан Э., Корреа
Мэттью Д., Хансен Джошуа, Хэвенз
Кортни Дж., Керхер Тимоти С., Лопес-
Хирона Антония, Лу Сяолин, Мань
Хон-Вах, Нэйджи Марк А., Нарла
Рама К., Пиккотти Джозеф Р., Пирс
Дэниел У., Таварес-Греко Пола Э.,
Уайтфилд Брэндон У., Вон Лилли Л.,
Цзоу Наньфэй (US)**

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

(56) MATYSKIELA MARY E ET AL.: "A Cereblon Modulator (CC-220) with Improved Degradation of Ikaros and Aiolos", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 61, no. 2, 20 April 2017 (2017-04-20), pages 535-542, XP002784904, DOI: 10.1021/ACS.JMEDCHEM.6B01921 [retrieved on 2017-04-20] page 535 - page 536

WO-A1-2014025960

US-B2-8518972

S. VINCENT RAJKUMAR ET AL.: "Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment", MAYO CLINIC PROCEEDINGS, vol. 91, no. 1, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 101-119, XP055513290, US ISSN: 0025-6196, DOI: 10.1016/j.mayocp.2015.11.007 page 4 - page 8; tables 6, 8

(57) В данном документе предложен 4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер или фармацевтически приемлемая соль и способы лечения, предупреждения или сдерживания множественной миеломы с использованием таких соединений. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные соединения, и способы применения указанных композиций.

B1**040549****040549****B1**

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/530778, поданной 10 июля 2017 г., предварительной заявки на патент США № 62/593185, поданной 30 ноября 2017 г., и предварительной заявки на патент США № 62/675581, поданной 23 мая 2018 г., содержание каждой из которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

1. Область техники

В данном документе предложены 4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер или фармацевтически приемлемая соль и способы лечения, предупреждения или сдерживания множественной миеломы с использованием таких соединений. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные соединения, и способы применения указанных композиций, в том числе комбинированные терапии.

2. Уровень техники

Множественная миелома (ММ) представляет собой рак плазматических клеток в костном мозге. Как правило, плазматические клетки вырабатывают антитела и играют ключевую роль в функционировании иммунной системы. Однако неконтролируемый рост данных клеток приводит к переломам костей и боли в костях, анемии, инфекции и другим осложнениям. Множественная миелома является второй наиболее распространенной гематологической злокачественной опухолью, хотя точные причины множественной миеломы остаются неизвестными. Множественная миелома вызывает высокие уровни белков в крови, моче и органах, включая, но не ограничиваясь ими, М-белок и другие иммуноглобулины (антитела), альбумин и бета-2-микроглобулин, за исключением некоторых пациентов (по оценкам, от 1% до 5%), чьи клетки миеломы не секретируют данные белки (т.н. несекреторная миелома). М-белок, сокращение для моноклонального белка, также известный как парапротеин, является особенно аномальным белком, продуцируемым плазматическими клетками миеломы, и может быть найден в крови или моче почти у всех пациентов с множественной миеломой, за исключением пациентов, которые имеют несекреторную миелому или чьи клетки миеломы продуцируют легкие цепи иммуноглобулинов с тяжелой цепью.

Скелетные симптомы, включая боль в костях, являются одними из наиболее клинически значимых симптомов множественной миеломы. Злокачественные плазматические клетки высвобождают факторы, стимулирующие остеокласты (включая IL-1, IL-6 и TNF), которые вызывают вымывание кальция из костей, вызывая литические поражения; еще одним симптомом является гиперкальциемия. Факторы, стимулирующие остеокласты, называемые также цитокинами, могут предотвращать апоптоз или гибель клеток миеломы. Пятьдесят процентов пациентов имеют рентгенологически выявляемые скелетные повреждения, связанные с миеломой, на момент постановки диагноза. Другие общие клинические симптомы множественной миеломы включают полинейропатию, анемию, гипервязкость, инфекции и почечную недостаточность.

Современное лечение множественной миеломы может включать одно или более из хирургии, пересадки стволовых клеток, химиотерапии, иммунотерапии и/или лучевой терапии для уничтожения клеток множественной миеломы у пациента. Все современные терапевтические подходы имеют существенные недостатки для пациента.

В последнее десятилетие новые терапевтические агенты, в частности иммуномодулирующие препараты, такие как леналидомид и помалидомид, значительно увеличили частоту ответа, пролонгированную выживаемость без прогрессирования (ВБП) и общую выживаемость (ОВ) у больных множественной миеломой. Тем не менее постоянные уровни остаточного заболевания, которые находятся ниже чувствительности морфологии костного мозга (КМ), электрофореза белков с иммунофиксацией и количественного определения легких цепей, существуют у многих пациентов с множественной миеломой, даже после того как данные пациенты достигли полной ремиссии (ПР), и в конечном счете вызывают рецидив заболевания. Минимальная остаточная болезнь (МОБ) при миеломе является независимым прогностическим фактором выживаемости без прогрессирования (ВБП) и рассматривается в качестве суррогатной конечной точки исследования для улучшения идентификации эффективных методов лечения, в частности для передовых испытаний, которые в настоящее время требуют от 5 до 10 лет наблюдения, чтобы определить различия выживаемости. Мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с множественной миеломой, таким образом, обеспечивает прогностическое значение при прогнозировании ВБП и ОВ и принятия решений по лечению. При определении минимальной остаточной болезни (МОБ) при миеломе можно использовать порог 0,01% (10^{-4}) после лечения, то есть доля 10^{-4} или менее клеток множественной миеломы от общего количества моноклеарных клеток костного мозга считается МОБ-отрицательной и доля 10^{-4} клеток или более МОБ-положительная. Порог 10^{-4} МОБ первоначально был основан на технических возможностях, но количественное определение МОБ теперь возможно при 10^{-5} с помощью проточной цитометрии и 10^{-6} с помощью секвенирования с высокой пропускной способностью. (Rawstron et al., Blood 2015; 125(12):1932-1935). Способы измерения МОБ включают секвенирование ДНК VDJ, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (в том числе аллель-специфическую ПЦР, АСО ПЦР) и многопараметрическую проточную цитометрию (МПЦ). Анализы МОБ, например, на основе измерения профиля клонотипа, также описаны в патенте США № 8628927, Faham и др., который вклю-

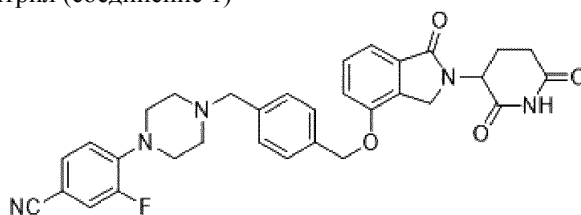
чен в данный документ посредством ссылки.

Существует значительная потребность в безопасных и эффективных соединениях и способах лечения, предупреждения и сдерживания множественной миеломы, в том числе для пациентов, у которых множественная миелома впервые диагностирована или является резистентной к стандартным способам лечения, при этом уменьшая или избегая токсичности и/или побочных эффектов, связанных с традиционной терапией.

Цитирование или определение какой-либо ссылки в разделе 2 этой заявки не должны толковаться как признание того, что эта ссылка предшествует уровню техники настоящей заявки.

3. Сущность изобретения

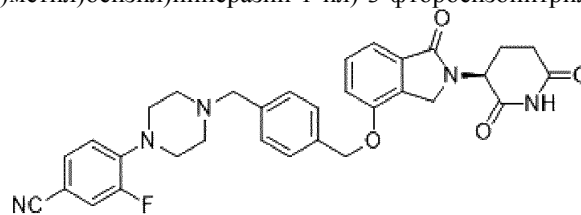
В данном документе предложены соединения, фармацевтические композиции, содержащие соединения, и способы их применения при лечении множественной миеломы. В одном варианте осуществления соединения для применения в композициях и способах, предложенных в данном документе, представляет собой 4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил (соединение 1)



1

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

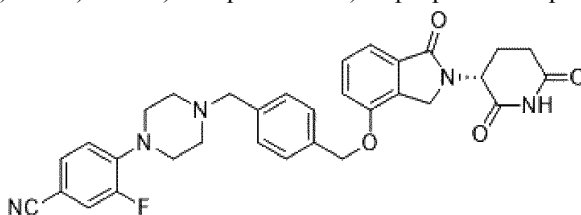
В одном варианте осуществления соединения для применения в композициях и способах, предложенных в данном документе, представляет собой (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил (соединение 2)



2

или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления соединения для применения в композициях и способах, предложенных в данном документе, представляет собой (R)-4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил (соединение 3):



3

или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

Также предложены фармацевтические композиции, составленные для введения соответствующим путем и средствами, содержащие эффективные концентрации соединений, предложенных в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли, и необязательно содержащие по меньшей мере один фармацевтический носитель.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции доставляют количества, эффективные для лечения множественной миеломы. В одном варианте осуществления фармацевтические композиции доставляют количества, эффективные для профилактики множественной миеломы. В одном варианте осуществления фармацевтические композиции доставляют количества, эффективные для облегчения множественной миеломы.

Также в данном документе предложены комбинированные терапии с применением соединений или композиций, предлагаемых в данном описании, или их энантиомеров, смесей энантиомеров, таутомеров,

изотопологов или фармацевтически приемлемых солей, в сочетании с терапией, например, другим фармацевтическим агентом с активностью против множественной миеломы или ее симптомов. Примеры терапий в пределах объема данных методов включают, но не ограничиваются ими, хирургию, химиотерапию, лучевую терапию, биологическую терапию, трансплантацию стволовых клеток, клеточную терапию и их комбинации.

Соединения или композиции, предлагаемые в данном писании, или их фармацевтически приемлемые производные могут быть введены одновременно с, до или после введения одной или нескольких вышеуказанных терапий. Также предлагаются фармацевтические композиции, содержащие соединение, предложенное в данном документе, и одну или более вышеуказанных терапий.

В одном варианте осуществления эффективное количество соединений или композиций, содержащих терапевтически эффективные концентрации соединений, вводят индивидууму, проявляющему симптомы множественной миеломы, подлежащей лечению. Данные количества являются эффективными для облегчения или устранения одного или нескольких симптомов множественной миеломы. При осуществлении способов лечения эффективные количества соединений или композиций, содержащих терапевтически эффективные концентрации соединений, вводят пациенту с множественной миеломой, нуждающемуся в этом.

Дополнительно предложен также фармацевтический комплект или набор, содержащий один или более контейнер, заполненный одним или более ингредиентами фармацевтических композиций. При необходимости может предоставляться связанное с таким контейнером(ми) уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, которое отражает одобрение для введения человеку данным агентством по производству, применению или продаже. Пакет или набор могут быть помечены информацией о способе введения, последовательности введения лекарственного средства (например, отдельно, последовательно или одновременно) или тому подобное.

Эти и другие аспекты предмета изобретения, описанного в данном описании, станут очевидными при ссылке на следующее подробное описание.

4. Подробное описание сущности изобретения

А. Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. Все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае наличия нескольких определений термина, упомянутого в данном документе, следует руководствоваться определением, представленным в данном разделе, если не указано иное.

"IC₅₀" относится к количеству, концентрации или дозе конкретного тестируемого соединения, которое достигает 50% ингибирования от максимального ответа, такого как связывание рецептора, активность рецептора, клеточный рост или пролиферация, по данным измерения с помощью любого из анализов *in vitro* или анализов на основе клеток, описанных в данном документе.

Фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваясь ими, соли аминов, таких как, но не ограничиваясь ими, N,N'-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, аммиак, диэтаноламин и другие гидроксикамины, этилендиамин, N-метилглюкамин, прокаин, N-бензилфенетиламин, 1-парахлорбензил-2-пирролидин-1'-илметилбензимидазол, диэтиламин и другие алкаламины, пиперазин и трис(гидроксиметил)аминометан; соли щелочных металлов, таких как, но не ограничиваясь ими, литий, калий и натрий; соли щелочноземельных металлов, таких как, но не ограничиваясь ими, барий, кальций и магний; соли переходных металлов, таких как, но не ограничиваясь ими, цинк; и соли других металлов, таких как, но не ограничиваясь ими, гидрофосфат натрия и динатрийфосфат; и также включают, но не ограничиваясь ими, соли минеральных кислот, такие как, но не ограничиваясь ими, гидрохлориды и сульфаты; и соли органических кислот, такие как, но не ограничиваясь ими, ацетаты, лактаты, малаты, тартраты, цитраты, аскорбаты, сукцинаты, бутираты, валераты, фумараты и органические сульфонаты.

Если конкретно не указано иное, в том случае, когда у соединения можно предположить существование альтернативных таутомерных, региоизомерных и/или стереоизомерных форм, все альтернативные изомеры охватываются в пределах объема заявленного объекта изобретения. Например, где соединение может иметь одну из двух таутомерных форм, предполагается, что в данное описание будут включены оба таутомера.

Таким образом, соединения, предлагаемые в данном описании, могут быть энантиомерно чистыми или быть стереоизомерными или диастереомерными смесями. Как используется в данном документе и если не указано иное, термин "стереоизомерно чистый" или "оптически чистый" означает композицию, которая содержит один стереоизомер соединения и практически не содержит других стереоизомеров указанного соединения. Например, стереоизомерно чистая композиция соединения, имеющего один хиральный центр, будет по существу не содержать противоположного энантиомера данного соединения. Стереоизомерно чистая композиция соединения, имеющего два хиральных центра, будет по существу не содержать других диастереомеров данного соединения. Типичное стереоизомерно чистое соединение содержит более чем около 80% по массе одного стереоизомера данного соединения и менее чем около

20% по массе других стереоизомеров данного соединения, более предпочтительно более чем около 90% по массе одного стереоизомера данного соединения и менее чем около 10% по массе других стереоизомеров данного соединения, еще более предпочтительно более чем около 95% по массе одного стереоизомера данного соединения и менее чем около 5% по массе других стереоизомеров данного соединения и наиболее предпочтительно более чем около 97% по массе одного стереоизомера данного соединения и менее чем около 3% по массе других стереоизомеров данного соединения. Как используется в данном документе, стереоизомерно чистое соединение содержит более чем около 80% по массе одного стереоизомера данного соединения, более предпочтительно более чем около 90% по массе одного стереоизомера данного соединения, еще более предпочтительно более чем около 95% по массе одного стереоизомера данного соединения и наиболее предпочтительно более чем около 97% по массе одного стереоизомера данного соединения. Как используется в данном документе и если не указано иное, термин "стереоизомерно обогащенный" означает композицию, которая содержит более чем около 60% по массе одного стереоизомера соединения, предпочтительно более чем около 70% по массе, более предпочтительно более чем около 80% по массе одного стереоизомера соединения. Как используется в данном документе и если не указано иное, термин "энантиомерно чистый" означает стереоизомерно чистую композицию соединения, имеющего один хиральный центр. Аналогичным образом термин "стереоизомерно обогащенный" означает стереоизомерно обогащенную композицию соединения, имеющего один хиральный центр. Как используется в данном документе, смеси стереоизомеров или диастереомеров означает композицию, которая содержит более одного стереоизомера соединения. Типичная смесь стереоизомеров соединения содержит около 50% по массе одного стереоизомера данного соединения и около 50% по массе других стереоизомеров данного соединения, или содержит более чем около 50% по массе одного стереоизомера данного соединения и менее чем около 50% по массе других стереоизомеров данного соединения, или содержит более чем около 45% по массе одного стереоизомера данного соединения и менее чем около 55% по массе других стереоизомеров данного соединения, или содержит более чем около 40% по массе одного стереоизомера данного соединения и менее чем около 60% по массе других стереоизомеров данного соединения, или содержит более чем около 35% по массе одного стереоизомера данного соединения и менее чем около 65% по массе других стереоизомеров данного соединения.

Следует понимать, что представленные здесь соединения могут содержать хиральные центры. Такие хиральные центры могут иметь либо (R), либо (S) конфигурацию, либо могут быть их смесью. Следует понимать, что хиральные центры соединений, представленных в настоящем документе, могут подвергаться эпимеризации *in vivo*. Таким образом, специалист в данной области техники поймет, что введение соединения в его (R) форме эквивалентно, в случае соединений, которые подвергаются эпимеризации *in vivo*, введению соединения в его (S) форме.

Оптически активные (+) и (-), (R)- и (S)-, или (D)- и (L)- изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов или разделены с использованием обычных методов, таких как хроматография с хиральной неподвижной фазой.

Как используется в данном документе, "изотополог" означает изотопно обогащенное соединение. Термин "изотопно обогащенный" относится к атому, имеющему изотопный состав, отличный от природного изотопного состава данного атома. "Изотопно обогащенный" может также относиться к соединению, содержащему по меньшей мере один атом, имеющий изотопный состав, отличный от природного изотопного состава данного атома. Термин "изотопный состав" относится к количеству каждого присутствующего изотопа для данного атома. Радиоактивно меченные и изотопно обогащенные соединения являются полезными в качестве терапевтических агентов, например терапевтических агентов для множественной миеломы, исследовательских реагентов, например реагентов анализа связывания, и диагностических агентов, например агентов визуализации *in vivo*. Все изотопные варианты соединений, описанных в данном документе, радиоактивны или нет, должны охватываться объемом данных вариантов реализации, предложенных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предложены изотопологи данных соединений, например изотопологи соединения 1, соединения 2 или соединения 3 представляют собой соединения, обогащенные дейтерием, углеродом-13 или азотом-15. В некоторых вариантах осуществления изотопологи, предложенные в данном документе, являются соединениями, обогащенными дейтерием. В некоторых вариантах осуществления изотопологи, предложенные в данном документе, являются соединениями, обогащенными дейтерием, где обогащение дейтерием происходит на хиральном центре.

В описании, приведенном в данном документе, если существует какой-либо расхождение между химическим названием и химической формулой, формула имеет приоритет.

Как используется в данном документе, термин "множественная миелома" относится к гематологическим состояниям, характеризующихся злокачественными плазматическими клетками и включает следующие расстройства: моноклональная гаммапатия неясного генеза (МГНГ); множественная миелома низкого риска, среднего риска и высокого риска; впервые диагностированная множественная миелома (в том числе впервые диагностированная множественная миелома низкого риска, среднего риска и высокого риска); множественная миелома с возможностью трансплантации и без возможности трансплантации; вялотекущая (медленно прогрессирующая) множественная миелома (в том числе вялотекущая множественная миелома).

венная миелома низкого риска, среднего риска и высокого риска); активная множественная миелома; одиночная плазмоцитома; экстрамедуллярная плазмоцитома; лейкоз плазматических клеток; множественная миелома центральной нервной системы; легкоцепочечная миелома; несекреторная миелома; миелома иммуноглобулина D; и миелома иммуноглобулина E; и множественная миелома характеризующаяся генетическими аномалиями, такими как транслокация циклина D (например, t(11;14)(q13;q32); t(6;14)(p21;q32); t(12;14)(p13;q32); или t(6;20)); транслокации MMSET (например, t(4;14)(p16;q32)); транслокации MAF (например, t(14;16)(q32;q32); t(20;22); t(16; 22)(q11;q13); или t(14;20)(q32;q11)); или другие факторы хромосом (например, делеция 17p13, или хромосомы 13; del(17/17p), негиперплоидия и gain(1q)).

Как используется в данном документе и если не указано иное, термины "лечить", "лечат" и "лечение" относятся к облегчению или уменьшению тяжести симптома, связанного с заболеванием или состоянием, подлежащим лечению, например множественной миеломой.

Термин "предупреждение" распространяется на уменьшение симптомов конкретного заболевания или нарушения, например множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления пациенты с семейным анамнезом множественной миеломы являются кандидатами для предупреждающих режимов. Как правило, термин "предупреждение" относится к введению препарата до появления симптомов, особенно пациентам с возможным появлением множественной миеломы.

Как используется в данном документе и если не указано иное, термин "сдерживание" включает предупреждение рецидива конкретного заболевания или расстройства, такого как множественная миелома, у пациента, который страдал от него, удлиняя время, когда пациент, который страдал от этого заболевания или расстройства, остается в состоянии ремиссии, уменьшая смертность пациентов и/или поддержание снижения тяжести или предотвращение симптома, связанного с заболеванием или состоянием, которое сдерживают.

Как используется в данном документе, термин "субъект" или "пациент" означает животное, как правило, млекопитающее, включая человека, такого как больной человек.

Термин "рецидивирующий" относится к ситуации, когда пациенты, у которых была ремиссия множественной миеломы после терапии, имели возвращение клеток миеломы и снижение количества здоровых клеток в костном мозге.

Термин "рефрактерный или резистентный" относится к тому обстоятельству, когда пациенты, даже после интенсивного лечения, имеют остаточные клетки миеломы и/или редуцированные здоровые клетки в своем костном мозге.

Как используется в данном документе, "индукционная терапия" относится к первому лечению данного заболевания, или первому лечению, оказанному с целью индукции полной ремиссии заболевания, такого как рак. В случае использования отдельно принято, что индукционная терапия является наилучшим имеющимся лечением. Если обнаружен остаточный рак, пациенты подвергаются лечению другой терапией, называемой реиндукционной. Если пациент находится в состоянии полной ремиссии после индукционной терапии, затем оказывается дополнительная укрепляющая и/или поддерживающая терапия, чтобы продлить ремиссию или потенциально вылечить пациента.

Как используется в данном документе, термин "укрепляющая терапия" относится к лечению заболевания после достижения первой ремиссии. Например, укрепляющей терапией рака является лечение, оказанное после того как рак исчез после начальной терапии. Укрепляющая терапия может включать лучевую терапию, трансплантацию стволовых клеток или лечение лекарствами от рака. Укрепляющую терапию также называют усиливающей терапией и постремиссионной терапией.

Как используется в данном документе, термин "поддерживающая терапия" относится к лечению заболевания после достижения ремиссии или наилучшего ответа для предотвращения или задержки рецидива. Поддерживающая терапия может включать химиотерапию, гормональную терапию или целенаправленную терапию.

Как используется в данном документе, "ремиссия" означает уменьшение или исчезновение признаков и симптомов рака, например множественной миеломы. При частичной ремиссии некоторые, но не все, признаки и симптомы рака исчезают. При полной ремиссии все признаки и симптомы рака исчезают, хотя рак все еще может находиться в организме.

Как используется в данном документе, "трансплантация" относится к терапии высоких доз со спасением стволовыми клетками. Кроветворные стволовые клетки (кровь) или стволовые клетки костного мозга используются не в качестве лечения, но чтобы спасти пациента после терапии высоких доз, например химиотерапии высоких доз и/или лучевой терапии высоких доз. Трансплантация включает "аутологичную" трансплантацию стволовых клеток (АТСК), которая относится к использованию собственных стволовых клеток пациентов, собранных и использованных в качестве клеток для замены. В некоторых вариантах осуществления трансплантация также включает тандемную трансплантацию или несколько трансплантаций.

Как используется в данном документе и если не указано иное, термины "терапевтически эффективное количество" и "эффективное количество" соединения относятся к количеству, достаточному для обеспечения терапевтического эффекта при лечении, предупреждении и/или сдерживании заболевания,

например множественной миеломы, чтобы задержать или свести к минимуму один или более симптомов, связанных с заболеванием или расстройством, подлежащим лечению. Термины "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" могут включать такое количество, которое улучшает общую терапию, снижает или исключает симптомы или причины заболевания или расстройства или усиливает терапевтическую эффективность другого терапевтического средства.

Термины "совместное введение" и "в сочетании с" включают введение одного или более терапевтических агентов (например, соединение, предложенное в данном документе и еще один агент против множественной миеломы, противораковый агент или агент поддерживающей терапии) одновременно, параллельно или последовательно без каких-либо конкретных ограничений по времени. В одном варианте осуществления указанные агенты присутствуют в клетке или в организме пациента в одно и то же время или проявляют свой биологический или терапевтический эффект в одно и то же время. В одном варианте осуществления терапевтические средства находятся в одном и том же составе или в одной и той же единичной лекарственной форме. В другом варианте реализации терапевтические средства находятся в различных композициях или различных единичных лекарственных формах.

Термин "агент поддерживающей терапии" относится к любому веществу, которое лечит, предотвращает или сдерживает неблагоприятный эффект от лечения соединением 1, соединением 2, или соединением 3, или его энантиомером, или смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом, или фармацевтически приемлемой солью.

Термин "биологическая терапия" относится к введению биологической терапии, такой как пуповинная кровь, стволовые клетки, факторы роста и подобное.

В контексте рака, такого как множественная миелома, ингибирование может быть оценено по ингибированию прогрессирования заболевания, ингибированию роста опухоли, уменьшению первичной опухоли, облегчению симптомов, связанных с опухолью, ингибированию факторов, секретируемых опухолью, задержке появления первичных или вторичных опухолей, замедлению развития первичных или вторичных опухолей, снижению возникновения первичных или вторичных опухолей, замедлению или снижению тяжести вторичных эффектов заболевания, задержанию роста опухоли и регрессии опухолей, увеличению времени до прогрессирования (ВДП), увеличению выживаемости без прогрессирования (ВБП), увеличению общей выживаемости (ОВ) среди прочего. Как используется в данном документе, ОВ означает время от начала лечения до смерти по любой причине. Как используется в данном документе, ВДП означает время от начала лечения до прогрессирования опухоли; ВДП не включает смерти. В одном варианте осуществления ВБП означает время от начала лечения до прогрессирования опухоли или смерти. В одном варианте осуществления ВБП означает время от первой дозы соединения до первого проявления прогрессирования заболевания или смерти по любой причине. В одном варианте осуществления скорости ВБП будут вычислены с использованием оценок Каплана-Мейера. Бессобытийная выживаемость (EFS) означает время от момента начала лечения до любого проявления неэффективности лечения, в том числе прогрессирования заболевания, прерывания лечения по любой причине или смерти. В одном варианте осуществления частота общего ответа (ЧОО) означает долю пациентов, которые достигают ответа на лечение. В одном варианте осуществления ЧОО означает сумму долей пациентов, которые достигают полного и частичного ответов. В одном варианте осуществления ЧОО означает долю пациентов чей лучший ответ $\geq$ частичного ответа (ЧО), в соответствии с критериями равномерного ответа IMWG. В одном варианте осуществления продолжительность ответа (ПО) представляет собой время от достижения ответа до рецидива или прогрессирования заболевания. В одном варианте осуществления ПО представляет собой время от достижения ответа $\geq$ частичного ответа (40) до рецидива или прогрессирования заболевания. В одном варианте осуществления ПО представляет собой время от первого документирования ответа до первого документирования прогрессирования заболевания или смерти. В одном варианте осуществления ПО представляет собой время от первого документирования ответа $\geq$ частичного ответа (40) до первого документирования прогрессирования заболевания или смерти. В одном варианте осуществления время до развития ответа (TTR) означает время от первой дозы соединения до первого документирования ответа. В одном варианте осуществления TTR означает время от первой дозы соединения до первого документирования ответа $\geq$ частичного ответа (40). В крайнем случае, полное ингибирование, упоминается в данном документе как предупреждение или химиопреупреждение. В данном контексте термин "предупреждение" включает либо полное предупреждение начала клинически очевидного рака или предупреждение начала доклинически очевидной стадии рака. Также предназначено для охвата данным определением предупреждение трансформации в злокачественные клетки или задержание или обращение прогрессирования предраковых клеток в злокачественные клетки. Это включает профилактическое лечение лиц с повышенным риском развития рака.

В некоторых вариантах осуществления лечение множественной миеломы может быть оценено с помощью международных критериев равномерного ответа для множественной миеломы (IURC - англ. International Uniform Response Criteria) (см Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006; (10)10:1-7), используя определение отклика и конечной точки, как показано ниже.

Подкатегория Ответа	Критерий оценки ответа ^a
сПР	ПР как определено ниже и Обычное соотношение FLC и Отсутствие клональных клеток в костном мозге ^b с помощью иммуногистохимии или иммунофлуоресценции ^c
ПР	Отрицательная иммунофиксация в сыворотке и моче и Исчезновение любых плазмочитом мягких тканей и <5% плазматических клеток в костном мозге ^b
ОХЧО	М-белок в сыворотке и моче, обнаруживаемые с помощью иммунофиксации, но не с помощью электрофореза или 90% или более снижения уровня М-белка в сыворотке и моче <100 мг в течение 24 часов
ЧО	Снижение М-белка в сыворотке $\geq 50\%$ и снижение М-белка в моче $\geq 90\%$ или до <200 мг в течение 24 часов Если М-белок в сыворотке и моче является неизмеримым, ^d а $\geq 50\%$ требуется уменьшение разницы между вовлеченными и невовлеченными уровнями FLC вместо критериев М-белка Если М-белок в сыворотке и моче является неизмеримым, и облегченный бессывороточный анализ является также неизмеримым, требуется уменьшение плазматических клеток $\geq 50\%$ вместо М-белка, при условии, базовый процент плазматических клеток костного мозга был $\geq 30\%$ В дополнение к перечисленным выше критериям, также требуется уменьшение размера плазмочитом мягких тканей $\geq 50\%$, если они присутствуют на базовой линии
СЗ (не рекомендуется для использования в качестве индикатора ответа; устойчивость болезни лучше всего описывается путем оценки времени до прогрессирования заболевания)	Не отвечающее критериям ПО, ОХЧО, ЧО или прогрессирующее заболевание

Сокращения: ПР, полная ремиссия;

FLC, свободная легкая цепь;

ЧО, частичный ответ;

СЗ, стабилизация заболевания;

сПР, строгая полная ремиссия;

ОХЧО, очень хороший частичный ответ

^a Все категории ответа требуют две последовательных оценки, сделанных в любое время до учреждения любой новой терапии; все категории также требуют доказательство отсутствия прогрессирующих или новых костных повреждений, если были проведены рентгенологические исследования. Рентгенологические исследования не требуется для удовлетворения данных требований к ответу

^b Подтверждение с повторной биопсией костного мозга не требуется

^c Наличие/отсутствие клональных клеток основывается на соотношении к/λ

Аномальное соотношение κ/λ , по данным иммуногистохимии и/или иммунофлуоресценции требует минимум 100 плазматических клеток для анализа. Аномальное соотношение, отражающее наличие аномального клона, представляет собой κ/λ , $>4:1$ или $<1:2$.

Измеримое заболевание определяется по меньшей мере одним из следующих измерений.

Плазматические клетки костного мозга $\geq 30\%$; М-белок в сыворотке ≥ 1 г/дл (≥ 10 г/л) [10 г/л]; М-белок в моче ≥ 200 мг/24 ч; анализ FLC сыворотки: вовлеченный уровень FLC ≥ 10 мг/дл (≥ 100 мг/л); при условии аномального соотношения FLC сыворотки.

Применяемый в данном документе статус по шкале ECOG относится к общесоматическому статусу по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) (Oken M, et al, Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 1982;5(6):649655), как проиллюстрировано ниже.

Балл	Описание
0	Полностью активен, способен выполнять все, как и до заболевания без ограничения
1	Ограничен в активности выполнять физически тяжелую работу, но может выполнять легкую или сидячую работу, например, легкую работу по дому, офисную работу.
2	Проходит лечение амбулаторно и способен к самообслуживанию, но не может выполнять какую-либо работу. Более 50% времени бодрствования проводит активно - в вертикальном положении.
3	Способен лишь к ограниченному самообслуживанию, проводит в кресле или постели более 50% времени бодрствования.
4	Полностью нетрудоспособный. Совершенно не способен к самообслуживанию. Полностью прикован к постели или креслу
5	Мертв

Термин "около", применяемый в данном документе, если не указано иное, относится к значению, которое не более чем на 10% выше или ниже значения, изменяемого термином. Например, термин "около 10 мг/м²" означает диапазон от 9 мг/м² до 11 мг/м².

В. Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. (А) Изменение в индукции апоптоза, измеренное по площади под кривой кратности индукции Каспазы 3 (так называемый индекс апоптоза) от времени в клетках H929-1051, устойчивых к леналидомиду. Абсцисса: $\log$ нМ (соединение), ордината: индекс апоптоза. Линии наилучшего приближения представляют собой логистическое уравнение с 3 параметрами рассчитанное в GraphPad Prism. (В) Площадь под кривой кривых концентрация-ответ для соединения 1 и соединения А в клетках H929-1051 была использована для сравнения способности соединений индуцировать апоптоз после 6-часовой экспозиции, а затем разбавления с примерно 20-кратным уменьшением концентрации соединения.

Фиг. 2. Сравнение антипролиферативной активности комбинированной обработки помалидомидом-дексаметазоном и соединением 2 (А) и комбинированной обработки соединением 2-дексаметазоном (В) в клетках MM H929-1051, устойчивых к леналидомиду. Пролиферацию оценивали с использованием анализа определения АТФ (CellTiter-Glo) после 120 ч терапии. Процент от контроля рассчитывали путем вычитания фона и нормализации к контролю ДМСО (100% от контроля). Каждая точка данных представляет собой среднее значение трех независимых экспериментов с повторением.

Фиг. 3. (А) Антипролиферативные эффекты на нестимулированных МКПК и (В) THLE-2, обработанных соединением 2 в течение 72 ч оценивали с использованием анализа определения АТФ (CellTiter-Glo). Процент от контроля рассчитывали путем вычитания фона и нормализации к контролю ДМСО (100% от контроля).

Фиг. 4. Противоопухолевая активность соединения 2 с непрерывным дозированием в модели ксенотрансплантата H929-1051, устойчивой к леналидомиду. Самкам мышей с SCID инокулировали 10×10^6 опухолевых клеток H929-1051 в правый бок. Мыши были разделены на группы лечения ($n=10$ /группу) в момент начала лечения. Тестовое лечение начинали на 14 день, когда опухоли были примерно 120 мм³.

Фиг. 5. Антипролиферативная активность соединения 2 в клеточных линиях множественной миеломы, сгруппированных по хромосомным транслокациям. График представляет собой площадь под кривой (AUC) кривых концентрация-отклик роста, при измерении числа живых клеток методом проточной цитометрии для 15 клеточных линий MM, содержащих распространенные транслокации, найденные в MM. Наблюдаемое значение AUC соответствует площади под кривой доза-ответ, в котором значения 0

соответствуют полному снижению пролиферации/жизнеспособности при всех дозах и значения 10000 соответствуют отсутствию уменьшения пролиферации/жизнеспособности. Клеточные линии группировали сначала по найденной хромосомной транслокации и затем по данным, имеет ли транслокация высокий риск или нет.

Фиг. 6. Антипролиферативная активность соединения 2 и помалидомида в клеточных линиях множественной миеломы, устойчивых к леналидомиду и помалидомиду. IC_{50} = концентрация соединения 2 и помалидомида, приводящая к 50%-ному ингибированию роста клеток по сравнению с контролем. На графике показано сравнение значений антипролиферативной IC_{50} (свечи) соединения 2 и помалидомида, определенных с использованием анализа CellTitre-Glo в исходных (DF15, NCI-H929 и OPM2), устойчивых к леналидомиду (NCI-H929-1051), или устойчивых к помалидомиду (NCI-H929-P01, OPM2-P01, OPM2-P1, OPM2-P10 и DF15R) клеточных линиях MM, представленных в табл. 11.

Фиг. 7. Стратегия гейтирования миелоидных субпопуляций.

Фиг. 8. Последние стадии дифференциации клеток-предшественников нейтрофилов *in vitro* - эффекты короткой ежедневной экспозиции соединения 2 в течение по большей мере трех дней. Клетки $CD34^+$, полученные из костного мозга здорового донора, были подвергнуты экспозиции соединения 2 при концентрациях 1, 10, и 100 нМ в каждый из 1, 2 или 3 последовательных дней. Только живые клетки были включены в анализ. Данные представляют собой среднее значение результатов для доноров 1 и 2 и представляют собой пример доли клеток стадии III и стадии IV, определенных как $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$ и $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$, соответственно после 6 ч экспозиции.

Фиг. 9. Поздняя стадия созревания клеток-предшественников нейтрофилов, следующая за 6-часовой экспозицией соединения 2 в каждый из 3 последовательных дней. Клетки $CD34^+$, полученные из костного мозга здорового донора, были подвергнуты экспозиции соединения 2 при концентрациях 1, 10, или 100 нМ в течение 6 ч в каждый из 3 последовательных дней, начиная с дня 10. Данные представляют собой среднее значение доли клеток стадии III, определенных как $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$, и доли клеток стадии IV, определенных как $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$, из доноров № 1 и № 2. Свечи погрешности представляют собой стандартное отклонение.

Фиг. 10. Поздняя стадия созревания клеток-предшественников нейтрофилов, следующая за 6-часовой экспозицией соединения 2 в каждый из 5 последовательных дней. Клетки $CD34^+$, полученные из костного мозга здорового донора, были подвергнуты экспозиции соединения 2 при концентрациях 1, 10, или 100 нМ в течение 6 ч в каждый из 5 последовательных дней, начиная с дня 10. Данные представляют собой среднее значение доли клеток стадии III, определенных как $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$, и доли клеток стадии IV, определенных как $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$, из доноров № 1 и № 2. Свечи погрешности представляют собой стандартное отклонение.

Фиг. 11. Диаграммы графика монотерапии для агента дексаметазона.

Фиг. 12. Доля зрелых нейтрофилов во время миелоидной дифференциации после одной экспозиции дексаметазоном или соединением 2 по отдельности или в комбинации при различных концентрациях. Клетки $CD34^+$, полученные из костного мозга здорового донора, были подвергнуты экспозиции соединения 2 (в течение 6 ч) и дексаметазоном (в течение 30 ч) по отдельности (верхний ряд) или в комбинации (нижний ряд) при концентрациях 1, 10, или 100 нМ в день 13. В каждом из нижних графиков концентрация соединения 2 изменялась, а концентрация дексаметазона поддерживалась постоянной при 1 нМ (левый), 10 нМ (средний), или 100 нМ (правый). Для комбинаций культуры подвергали воздействию обоих агентов одновременно в течение 6 ч. Затем клетки промывали и повторно инкубировали с дексаметазоном в течение последующих 24 ч. Затем клетки промывали и повторно инкубировали без соединения 2 или дексаметазона в течение оставшейся части исследования. Данные представляют собой долю клеток стадии IV, определенных как $CD34^+/CD33^+/CD11b^+$ из доноров 3, 4, и 5. Красная линия представляет собой 50% от уровня клеток стадии IV в контроле ДМСО.

Фиг. 13. Эффект лечения дексаметазоном отдельно или в комбинации с соединением 2, леналидомидом и помалидомидом на апоптоз в клеточной линии множественной миеломы, устойчивой к леналидомиду. Ось ординат показывает кратность изменения активности каспазы 3 по сравнению с ДМСО, а ось абсцисс представляет собой логарифм концентрации дексаметазона.

Фиг. 14. Соединение 2 непосредственно активирует мононуклеарные клетки периферической крови человека (РВМС) для лизиса эритромиелоцитических лейкозных клеток K562 в зависимости от концентрации. (Слева.) Репрезентативные графики сортировки клеток активированной флуоресценцией клеток K562 совместно культивированных с МКПК человека, которые были предварительно инкубированы с Соединением 2, леналидомидом, помалидомидом или ДМСО. (Справа.) Необработанные данные доли клеток PI-Аннексин V-K562 показывающие уменьшение жизнеспособных клеток K562 в совместной культуре, зависимое от концентрации. Данные представлены в виде среднего значения со свечами ошибок, представляющих стандартные ошибки среднего значения.

Фиг. 15. Иммунные клетки непосредственно активируются соединением 2 для лизиса чувствительных к леналидомиду и устойчивых к леналидомиду клеточных линий множественной миеломы. Мононуклеарные клетки периферической крови доноров (РВМС) (эффекторные клетки) были предварительно обработаны с указанными тестовыми изделиями или соединением 2 в течение 2 ч перед тем, как их куль-

тивировали на планшетах с покрытием анти-CD3 антител в течение 72 ч. До начала совместного культивирования с необработанными меченными CFSE клеточными линиями множественной миеломы, РВМС промывали и помещали в среду, не содержащую соединений, и затем совместно культивировали с клеточными линиями множественной миеломы (клетки-мишени) в течение 24 ч. Увеличение гибели клеток множественной миеломы, опосредованной иммунными клетками, было очевидно в МКПК, обработанных соединением 2, совместно культивированных (соотношение мишень:эффектор 1:5) с либо (А) клетками NCI-H929, либо (В) клетками H929-1051.

Фиг. 16. Активированные соединением иммунные клетки показывают увеличенную гибель опухолевых клеток, когда клетки множественной миеломы предварительно обрабатывают леналидомидом, помалидомидом или соединением 2 до совместного культивирования. Мононуклеарные клетки периферической крови были предварительно инкубированы с леналидомидом, помалидомидом или соединением 2 в течение 2 ч перед тем, как их культивировали на планшетах с покрытием анти-CD3 антител в течение 72 ч. В то же время 4 клеточные линии множественной миеломы (ММ) культивировали в среде, содержащей тестовые изделя. После 72 ч клетки совместно культивировали в течение 24 ч (соотношение мишень:эффектор [М:Э] 1:5). Увеличение гибели клеток ММ, опосредованной иммунными клетками, было очевидно в совместных культурах (графики справа в каждом ряду) по сравнению с отдельными культурами ММ (графики слева в каждом ряду) во всех типах протестированных клеток клеточных линий (А) NCI-H929, (В) H929-1051, (С) OPM2 и (D) OPM2 P10. Указанные соединения мало влияют на жизнеспособность РВМС (как показано на графиках посередине в каждом ряду).

Фиг. 17. Соединение 2 активирует экспрессию CD38 в клеточных линиях ММ. Экспрессию CD38 клеточной поверхностью оценивали в клетках ММ, предварительно обработанных соединением 2 или помалидомидом в течение 72 ч. Эффекты доза-ответ показаны для клеточных линий OPM-2 и OPM-2.P10.

Фиг. 18. Соединение 2 увеличивает АЗКЦ клеток ММ, опосредованную даратумамабом. Семь клеточных линий ММ обрабатывали сублетальными концентрациями Соединения 2 или помалидомида в течение 72 ч до совместного культивирования с клетками NK при соотношении эффектор:мишень [Э:М] 10:1 для анализа АЗКЦ. Графики иллюстрируют репрезентативные данные, полученные для 7 клеточных линий ММ. Анализы проводили дважды с клетками NK из двух разных доноров. Контроль ДМСО является базовой активностью клеток NK с необработанными опухолевыми клетками; изотип и дара является активностью клеток NK в присутствии изотипического контроля и даратумамаба, соответственно, с необработанными опухолевыми клетками; изотип+соединение и дара+соединение является активностью клеток NK в присутствии изотипического контроля и даратумамаба, соответственно с обработанными опухолевыми клетками.

Фиг. 19. Соединение 2 усиливает антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP - англ. Antibody-dependent cellular phagocytosis) клеток ММ, опосредованный даратумамабом. Анализы фагоцитоза проводили с соотношением эффектор:мишень [Э:М] 2:1. Шесть клеточных линий ММ ± с предварительной обработкой соединением 2 или помалидомидом были подвергнуты ADCP, опосредованному даратумамабом. А) Репрезентативные изображения ADCP с клеточной линией OPM2. Макрофаги показаны красным цветом, а клетки OPM2 показаны зеленым цветом. В) Количественный анализ фагоцитоза с помощью проточной цитометрии. Контроль ДМСО является базовой активностью клеток NK с необработанными опухолевыми клетками; изотип и дара является активностью клеток NK в присутствии изотипического контроля и даратумамаба соответственно с необработанными опухолевыми клетками; изотип+соединение и дара+соединение является активностью клеток NK в присутствии изотипического контроля и даратумамаба соответственно с обработанными опухолевыми клетками.

Фиг. 20. Комбинация соединения 2 с ингибитором протеасом приводит к увеличенному апоптозу в моделях клеток ММ. Клеточные линии ММ были обработаны импульсом бортезомиба или ДМСО в течение 1 ч с последующим вымыванием. Предварительно обработанные клетки инкубировали с различными концентрациями соединения 2 в течение 72 ч с последующим окрашиванием образцов раствором 7-AAD и аннексина V и анализом проточной цитометрией. А) Доля живых клеток с соединением 2 в отдельности или с предварительной обработкой бортезомибом. В) Точечные диаграммы клеток OPM2-P10 при различных условиях обработки.

Фиг. 21. Комбинация соединения 2 с бортезомибом или карфилзомибом в моделях клеток ММ. Четыре клеточные линии ММ были обработаны импульсом бортезомиба или ДМСО в течение 1 ч с последующим вымыванием. Предварительно обработанные клетки инкубировали с различными концентрациями соединения 2 в течение 72 ч с последующим окрашиванием образцов раствором 7-AAD и аннексина V и анализом проточной цитометрией. А) Антипролиферативный эффект соединения 2 в отдельности или с предварительной обработкой бортезомибом. В) Антипролиферативный эффект соединения 2 в отдельности или с предварительной обработкой карфилзомибом. DRC=кривая доза-ответ.

Фиг. 22. Показана обработка клеток ММ соединением 2 в комбинации с ингибиторами гистоновой деацетилазы, химиотерапевтическими агентами, ингибиторами Bcl-2, ингибиторами Mcl-1, ингибиторами BET или ингибиторами LSD-1. Расчеты синергии были выполнены для обработки соединением 2 в комбинации с 13 низкомолекулярными ингибиторами в панели клеточных линий ММ. Прямоугольники

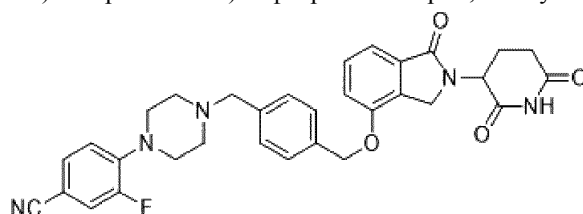
синего цвета иллюстрируют долю лунок, которые являются синергическими в сочетании с соединением 2. * представляет собой статическую значимость разности ответа поверхности от нулевой модели.

Фиг. 23. Эффект обработки соединением 2 (0,1 мг/кг, QD) и дексаметазоном (0,5 мг/кг, ежедневно (QD)) в качестве отдельных агентов, так и в комбинации в модели ксенотрансплантата H929-1051, устойчивой к леналидомиду.

Фиг. 24. Противоопухолевая активность соединения 2 отдельно и в комбинации с бортезомибом в модели ксенотрансплантата множественной миеломы/плазмцитомы NCI-H929 (H929-1051), устойчивой к леналидомиду. Дни дозирования обозначены стрелками на оси X.

С. Соединения

В данном документе предложено соединение 4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил, именуемое как "соединение 1":

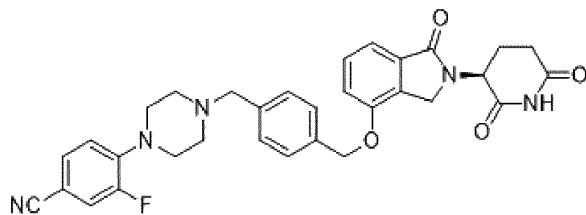


1

или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение для применения в композициях и способах, предложенных в данном документе, представляет собой соединение 1 или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

Также в данном документе предложено соединение (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил, именуемое как "соединение 2":

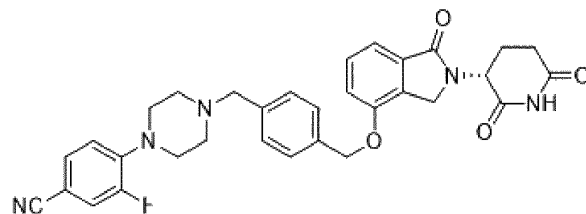


2

или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение для применения в композициях и способах, предложенных в данном документе, представляет собой соединение 2 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

Также в данном документе предложено соединение (R)-4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил, именуемое как "соединение 3":



3

или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления соединение для применения в композициях и способах, предложенных в данном документе, представляет собой соединение 3 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль.

В данном документе предложено соединение 1. В данном документе предложен таутомер соединения 1. В данном документе предложен энантиомер соединения 1. В данном документе предложена смесь энантиомеров соединения 1. В данном документе предложена фармацевтически приемлемая соль соединения 1.

В данном документе предложено соединение 2. В данном документе предложен таутомер соединения 2. В данном документе предложена фармацевтически приемлемая соль соединения 2.

В данном документе предложено соединение 3. В данном документе предложен таутомер соединения 3. В данном документе предложена фармацевтически приемлемая соль соединения 3.

Также в данном документе предложены изотопически обогащенные аналоги соединений, предложенных в данном документе. Изотопное обогащение (например, дейтерирование или обогащение дейтерием) фармацевтических препаратов для улучшения фармакокинетических свойств ("ФК"), фармакодинамических свойств ("ФД") и профилей токсичности было ранее продемонстрировано некоторыми классами лекарственных средств. См., например, Lijinsky et. al., *Food Cosmet. Toxicol.*, 20: 393 (1982); Lijinsky et. al., *J. Nat. Cancer Inst.*, 69: 1127 (1982); Mangold et. al., *Mutation Res.* 308: 33 (1994); Gordon et. al., *Drug Metab. Dispos.*, 15: 589 (1987); Zello et. al., *Metabolism*, 43: 487 (1994); Gately et. al., *J. Nucl. Med.*, 27: 388 (1986); Wade D, *Chem. Biol. Interact.* 117: 191 (1999). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, изотопное обогащение соединения может быть применено, например, для того, чтобы (1) уменьшить или устранить нежелательные метаболиты, (2) увеличить период полувыведения исходного лекарственного средства, (3) уменьшить количество доз, необходимых для достижения желаемого эффекта (4) уменьшить размер дозы, необходимой для достижения желаемого эффекта, (5) увеличить образование активных метаболитов, если они образуются и/или (6) уменьшить получение вредных метаболитов в конкретных тканях и/или создать более эффективное лекарственное средство и/или более безопасное лекарственное средство для комбинированной терапии, независимо от того, является ли комбинационная терапия запланированной или нет. Замена атома на один из его изотопов часто приводит к изменению скорости реакции химической реакции. Это явление известно как кинетический изотопный эффект ("KIE"). Например, если связь C-H разрывается на этапе, определяющем скорость химической реакции, (т.е. на этапе с наивысшей энергией переходного состояния), замещение дейтерием данного атома водорода приведет к уменьшению скорости реакции, и процесс будет замедляться. Это явление известно как дейтериевый кинетический изотопный эффект ("DKIE" - англ.: Deuterium Kinetic Isotope Effect). (См., например, Foster et al., *Adv. Drug Res.*, vol. 14, pp. 1-36 (1985); Kushner et al., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 77, pp. 79-88 (1999)). Величина DKIE может быть выражена в виде отношения между скоростями данной реакции, в которой разрывается связь C-H, и той же реакцией при условии, что водород заменен на дейтерий. DKIE может варьироваться от около 1 (без изотопного эффекта) до очень больших чисел, например, 50 или более, что означает, что реакция может быть в пятьдесят или более раз медленнее, при условии, что водород заменен на дейтерий. Не ограничиваясь определенной теорией, высокие значения DKIE могут быть частично обусловлены явлением, известным как туннелирование, что является следствием принципа неопределенности. Туннелирование приписывают малой массе атома водорода, и при этом оно происходит потому, что переходные состояния с участием протона могут иногда возникать в условиях отсутствия требуемой энергии активации. Поскольку дейтерий имеет большую массу, нежели водород, он статистически имеет гораздо меньшую вероятность подвергаться этому явлению.

Тритий ("Т") представляет собой радиоактивный изотоп водорода, применяемый в исследованиях, термоядерных реакторах, нейтронных генераторах и радиофармацевтических препаратах. Тритий представляет собой атом водорода, который имеет 2 нейтрона в ядре и имеет атомный вес, близкий к 3. Он встречается в природе в окружающей среде в очень низких концентрациях, чаще всего в виде T₂O. Тритий медленно распадается (период полувыведения=12,3 года) и испускает бета-частицу с низкой энергией, которая не может проникать через наружный слой кожи человека. Внутреннее облучение является основной опасностью, связанной с этим изотопом, однако его необходимо принимать в больших количествах, чтобы подвергнуться значительному риску для здоровья. По сравнению с дейтерием до достижения опасного уровня необходимо потреблять меньшее количество трития. Замещение водорода тритием ("Т") приводит к еще более сильной связи, чем в случае дейтерия, и дает численно большие изотопные эффекты.

Аналогичным образом замещение изотопов других элементов, включая, без ограничения, ¹³C или ¹⁴C в случае углерода, ³³S, ³⁴S или ³⁶S в случае серы, ¹⁵N в случае азота и ¹⁷O или ¹⁸O в случае кислорода, будет обеспечивать аналогичные кинетические изотопные эффекты.

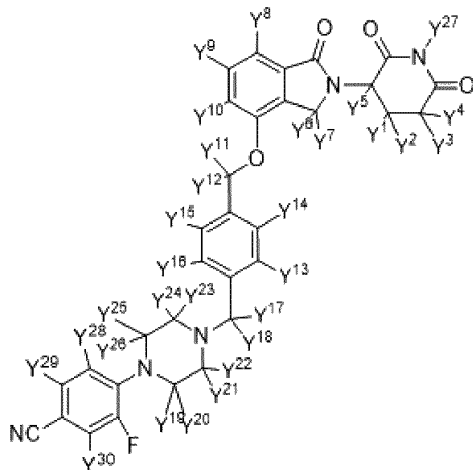
Организм животного экспрессирует разнообразие ферментов с целью устранения посторонних веществ, таких как терапевтические агенты, из его системы циркуляции. Примеры таких ферментов включают ферменты цитохрома P450 ("CYP"), эстеразы, протеазы, редуктазы, дегидрогеназы и моноаминоксидазы для взаимодействия и преобразования данных инородных веществ в более полярные промежуточные соединения или метаболиты для почечной экскреции. Некоторые из наиболее распространенных метаболических реакций фармацевтических соединений включают окисление углерод-водородной (C-H) связи в любую из углерод-кислородной (C-O) или углерод-углеродной (C-C) пи-связи. Полученные метаболиты могут быть стабильными или нестабильными в физиологических условиях, и могут иметь существенно отличающиеся фармакокинетические, фармакодинамические профили, и профили краткосрочной и долгосрочной токсичности по отношению к исходным соединениям. Для многих препаратов, такие окисления являются быстрыми. В результате эти препараты часто требуют введения нескольких или высоких суточных доз.

Изотопное обогащение в определенных положениях соединения, предложенного в данном документе, может иметь детектируемый KIE, который влияет на фармакокинетические, фармакологические

и/или токсикологические профили соединения, предложенного в данном документе, по сравнению с подобным соединением, имеющим природный изотопный состав. В одном варианте осуществления обогащение дейтерием происходит в положении расщепления С-Н связи в процессе метаболизма.

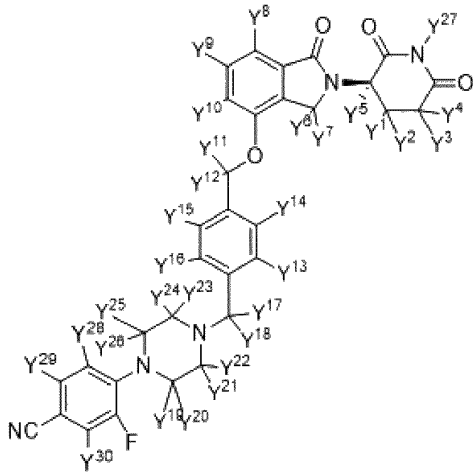
В одном варианте осуществления в данном документе предложен изотополог соединения 1 или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер или фармацевтически приемлемая соль. В одном варианте осуществления изотополог соединения 1 представляет собой соединение 1, обогащенное дейтерием, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер или фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления изотополог соединения 1 представляет собой соединение 1, обогащенное дейтерием, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер или фармацевтически приемлемую соль, где обогащение дейтерием происходит на хиральном центре. В другом варианте осуществления в данном документе предложен изотополог соединения 2 или его таутомер или фармацевтически приемлемая соль. В одном варианте осуществления изотополог соединения 2 представляет собой соединение 2, обогащенное дейтерием, или его таутомер, или фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления изотополог соединения 2 представляет собой соединение 2, обогащенное дейтерием, или его таутомер, или фармацевтически приемлемую соль, где обогащение дейтерием происходит на хиральном центре.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены изотопологи 4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила, или их энантиомеры или смеси энантиомеров, таутомеры или фармацевтически приемлемые соли, в которых один или несколько атомных позиций молекулы 4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила изотопно обогащен/обогащены, например, дейтерием. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены соединения следующей формулы:

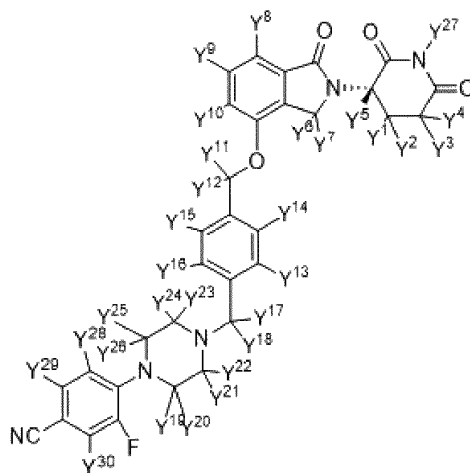


в которых один или несколько атомов Y (т.е. Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵, Y⁶, Y⁷, Y⁸, Y⁹, Y¹⁰, Y¹¹, Y¹², Y¹³, Y¹⁴, Y¹⁵, Y¹⁶, Y¹⁷, Y¹⁸, Y¹⁹, Y²⁰, Y²¹, Y²², Y²³, Y²⁴, Y²⁵, Y²⁶, Y²⁷, Y²⁸, Y²⁹, и Y³⁰) изотопно обогащен/обогащены дейтерием и любой оставшийся атом (атомы) Y является/являются необогащенным атомом (атомами) водорода.

В одном из вариантов осуществления данное соединение имеет следующую формулу:



В одном из вариантов осуществления данное соединение имеет следующую формулу:

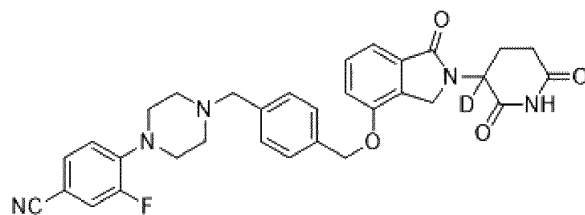


В некоторых вариантах осуществления один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать, двадцать один, двадцать два, двадцать три, двадцать четыре, двадцать пять, двадцать шесть, двадцать семь, двадцать восемь, двадцать девять или каждый из указанных атомов Y изотопно обогащен/обогащены дейтерием и любой оставшийся атом (атомы) Y является/являются необогащенным атомом (атомами) водорода. В одном варианте осуществления один из указанных атомов Y изотопно обогащен дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными атомами водорода. В одном варианте осуществления Y⁵ обогащен дейтерием.

В некоторых вариантах осуществления один или более атомов Y в глутаримидном фрагменте данных соединений (Y¹, Y², Y³, Y⁴, Y⁵ и Y²⁷) обогащены дейтерием. В некоторых вариантах осуществления один или более атомов Y в изоиндолиновом фрагменте данных соединений (Y⁶, Y⁷, Y⁸, Y⁹ и Y¹⁰) обогащены дейтерием. В некоторых вариантах осуществления один или более атомов Y в фенилалкиловом фрагменте данных соединений (Y¹¹, Y¹², Y¹³, Y¹⁴, Y¹⁵, Y¹⁶, Y¹⁷ и Y¹⁸) обогащены дейтерием. В некоторых вариантах осуществления один или более атомов Y в пиперазиновом фрагменте данных соединений (Y¹⁹, Y²⁰, Y²¹, Y²², Y²³, Y²⁴, Y²⁵ и Y²⁶) обогащены дейтерием. В некоторых вариантах осуществления один или более атомов Y в отдельном фенильном кольце данных соединений (Y²⁸, Y²⁹ и Y³⁰) обогащены дейтерием. Соединение, предложенное в данном документе, может являться любой комбинацией обогащения дейтерием, как описано в данном документе. Другими словами, любая комбинация из обогащенного дейтерием глутаримидного фрагмента, обогащенного дейтерием изоиндолинового фрагмента, обогащенного дейтерием фенилалкилового фрагмента, обогащенного дейтерием пиперазинового фрагмента и обогащенного дейтерием отдельного фенильного кольца охватывается в данном документе.

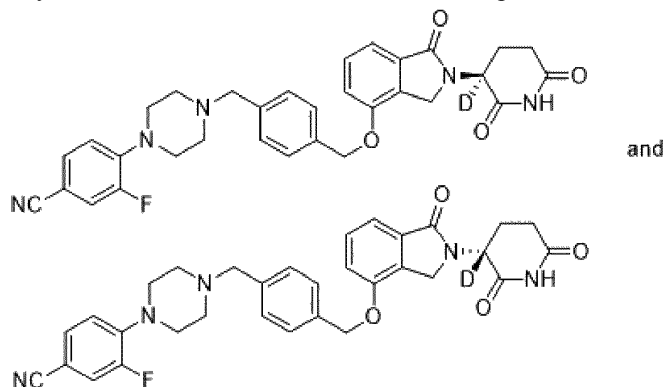
В одном варианте осуществления Y¹ и Y² обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления Y³ и Y⁴ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления Y⁵ обогащен дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления от Y¹ до Y⁵ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления от Y³ до Y⁵ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления Y⁶ и Y⁷ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления от Y⁸ до Y¹⁰ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления Y¹¹ и Y¹² обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления от Y¹³ до Y¹⁶ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления Y¹⁷ и Y¹⁸ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления от Y¹¹ до Y¹⁸ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления от Y¹⁹ до Y²⁶ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления Y²⁷ обогащен дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами. В одном варианте осуществления от Y²⁸ до Y³⁰ обогащены дейтерием и любые оставшиеся атомы Y являются необогащенными водородами.

В одном варианте осуществления изотополог соединения 1 представляет собой соединение 1-D



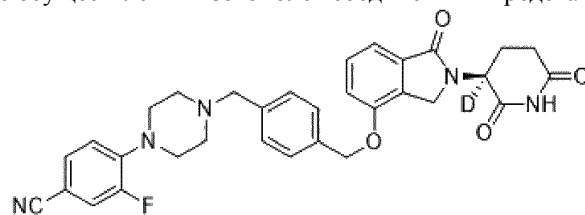
(1-D).

В другом варианте осуществления изотополог соединения 1 представляет собой смесь



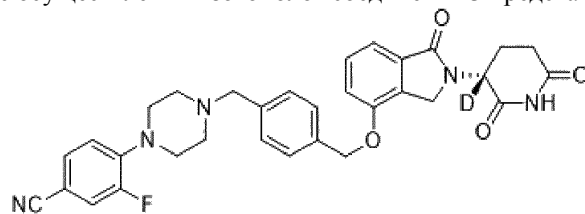
and

В еще одном варианте осуществления изотополог соединения 2 представляет собой соединение 2-D



(2-D).

В еще одном варианте осуществления изотополог соединения 3 представляет собой соединение 3-D



(3-D).

В определенных вариантах осуществления любые положения, обогащенные дейтерием, имеют содержание дейтерия по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или около 100%. В одном варианте осуществления Y^5 обогащен дейтерием и имеет содержание дейтерия по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или около 100%.

В одном варианте осуществления D (на хиральном центре) соединения 1-D имеет содержание дейтерия по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или около 100%. В одном варианте осуществления D имеет содержание дейтерия по меньшей мере 90%.

В одном варианте осуществления D (на хиральном центре) соединения 2-D имеет содержание дейтерия по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или около 100%. В одном варианте осуществления D имеет содержание дейтерия по меньшей мере 90%.

В одном варианте осуществления D (на хиральном центре) соединения 3-D имеет содержание дейтерия по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по

меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или около 100%. В одном варианте осуществления D имеет содержание дейтерия по меньшей мере 90%.

В определенных вариантах осуществления соединение, обогащенное дейтерием, предложенное в данном документе, имеет энантиомерный избыток по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. Дополнительные примеры оптической чистоты включают энантиомерный избыток по меньшей мере 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

В одном варианте осуществления соединение 2-D имеет энантиомерный избыток по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. В одном варианте осуществления соединение 2-D имеет энантиомерный избыток по меньшей мере 90%.

В одном варианте осуществления соединение 3-D имеет энантиомерный избыток по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. В одном варианте осуществления соединение 3-D имеет энантиомерный избыток по меньшей мере 90%.

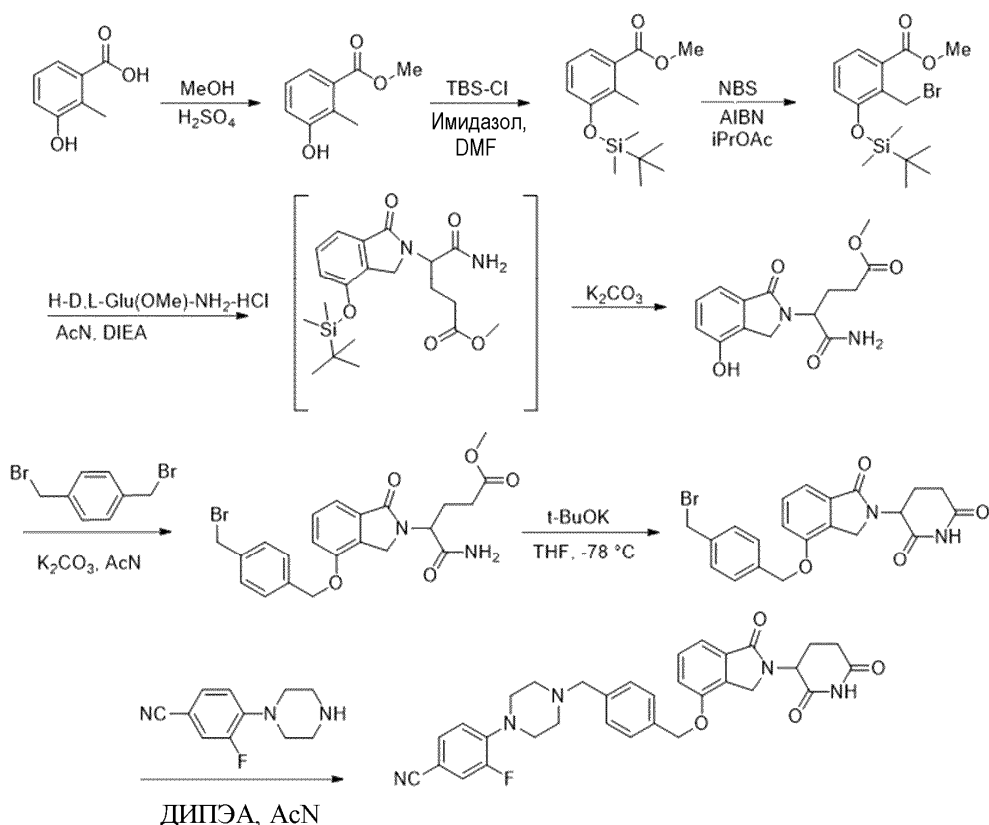
Соединения, обогащенные дейтерием, предложенные в данном документе, могут быть получены в соответствии с схемой синтеза и примерами, приведенными в данном документе, но с использованием соответствующего исходного материала (материалов), обогащенного дейтерием. Соединения, обогащенные дейтерием, предложенные в данном документе, могут быть также получены в соответствии с общей химией, известной специалистам в данной области техники, для получения обогащенных дейтерием изоиндолиновых и глутаримидных соединений, в том числе, но не ограничиваясь ими, описанных в WO 2014/039421 и WO 2014/116573, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

D. Получение соединения 1, соединения 2 и соединения 3

Соединения, предлагаемые в данном документе, могут быть получены способами, известными специалисту в данной области техники, и следующими методиками, аналогичными методикам, описанным в разделе примеры в данном документе, и их обычными модификациями. Типичная схема реакций для получения данных соединений проиллюстрирована ниже на схеме 1 для соединения 1, соединения 2 и соединения 3, и на схеме 2 для соединения 2.

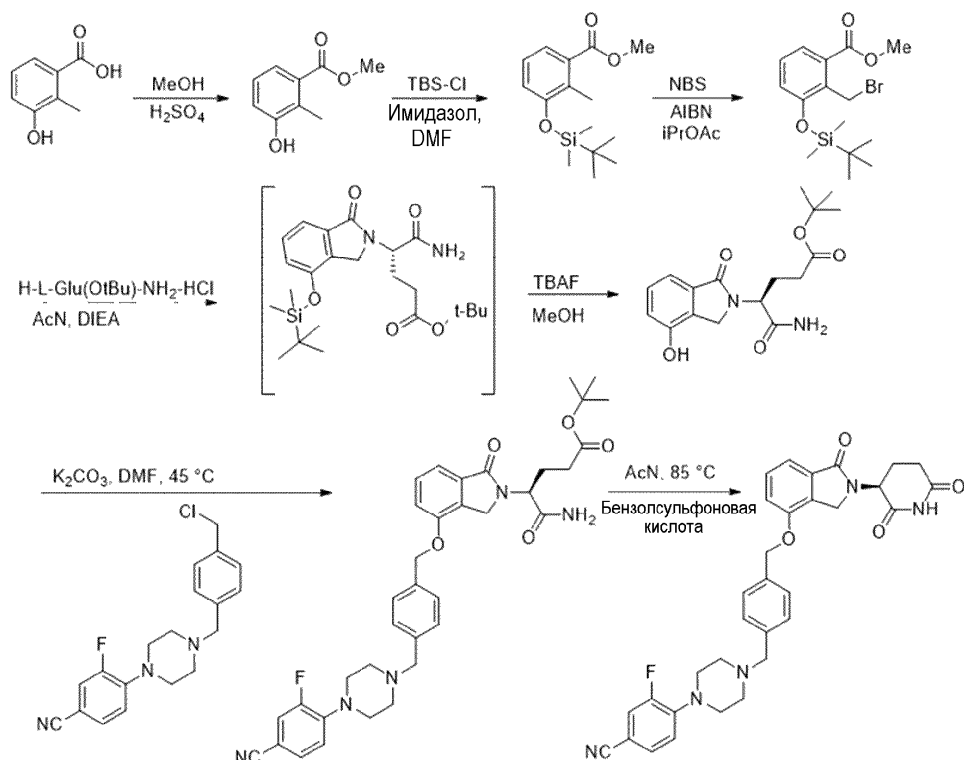
Как показано на схеме 1, после защиты 3-гидрокси-2-метилбензойной кислоты (с помощью, например, образования метилового эфира и трет-бутил(диметил)силилового эфира) следовало бромирование, например с использованием N-бромсукцинимид и азобисизобутиронитрила. Реакция с метил-4,5-диамино-5-оксопентаноатом (также известным как H-D, L-Glu(OMe)-NH₂), в присутствии основания (такого как ДИПЭА), приводила к получению производного изоиндолина, за которым следовало удаления защитной группы TBDMS с использованием основания, такого как карбонат калия. После реакции замещенного изоиндолина с 1,4-бис(бромметил)бензолом в присутствии основания (такого как карбонат калия) следовало образование глутаримида в присутствии трет-бутоксид калия. Наконец, реакция с 3-фтор-4-(пиперазин-1-ил)бензонитрилом приводила к получению целевого соединения 1. Хиральное разделение приводит к получению соединения 2 и соединения 3.

Схема 1



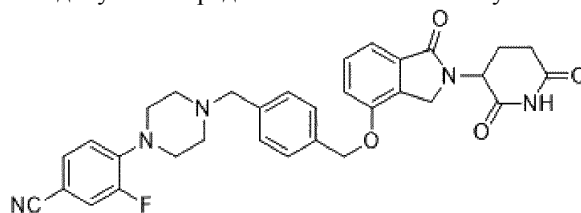
В альтернативном варианте, как проиллюстрировано на схеме 2, реакция промежуточного соединения метил-2-(бромметил)-3-[трет-бутил(диметил)силил]оксибензоата с хиральным трет-бутил (4S)-4,5-диамино-5-оксо-пентаноатом (также известным как H-L-Glu(OtBu)-NH₂; реакция с H-D-Glu(OtBu)-NH₂ приводит к получению противоположного энантиомера) в присутствии основания (такого как ДИПЭА), приводит к получению замещенного изоиндолина, за которым следовало снятие TBDMS защитной группы с использованием тетрабутиламмоний фторида. После реакции замещенного изоиндолина с 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрилом или его солью в присутствии основания (такого как карбонат калия) следовало образованием глутаримида с получением целевого соединения 2.

Схема 2



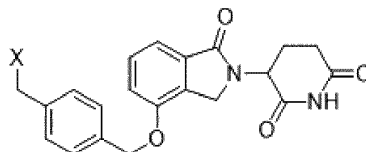
Специалисту в данной области техники будет понятно, как изменить методики, изложенные в иллюстративных схемах и примерах, чтобы получить желаемые продукты.

В одном аспекте в данном документе представлены способы получения соединения 1,



1,

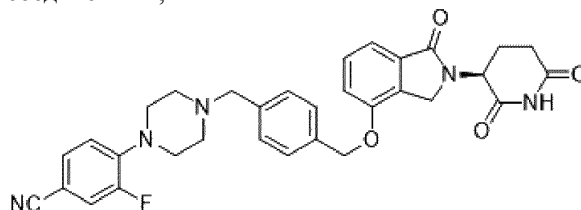
или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, или изотополога, включающие приведение в контакт соединения 1a



1a,

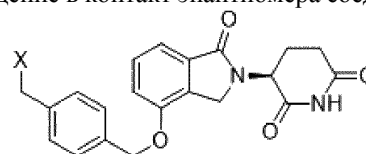
или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера или изотополога с 3-фтор-4-(пиперазин-1-ил)бензонитрилом в органическом растворителе в присутствии основания в условиях, подходящих для получения соединения 1; где X представляет собой уходящую группу.

В одном варианте осуществления данный способ представляет собой способ получения энантиомера соединения 1, например соединения 2,



2,

данный способ включает приведение в контакт энантиомера соединения 1a, например соединения 2a

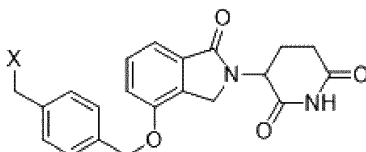


2a

с 3-фтор-4-(пиперазин-1-ил)бензонитрилом в органическом растворителе в присутствии основания в условиях, подходящих для получения соединения 2; где X представляет собой уходящую группу.

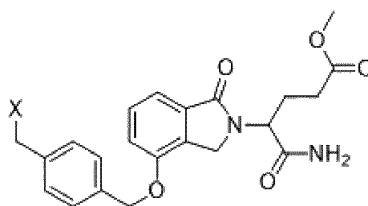
В одном варианте осуществления X представляет собой галоген, например Br или Cl. В другом варианте осуществления X представляет собой метансульфонат (также известный как -OMs). В одном варианте осуществления растворитель представляет собой ацетонитрил, ТГФ или ДМСО. В другом варианте осуществления основание представляет собой ДИПЭА или ТЭА. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят при повышенной температуре, например при от около 35°C до около 50°C.

В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают получение соединения 1a,



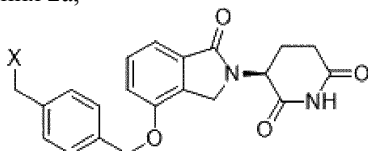
1a,

или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, или изотополога, включающие приведение в контакт соединения 1b

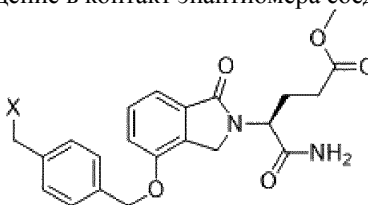
**1b,**

или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера или изотополога с трет-бутоксидом калия в органическом растворителе в условиях, подходящих для получения соединения 1a.

В одном варианте осуществления данный способ представляет собой способ получения энантиомера соединения 1a, например соединения 2a,

**2a,**

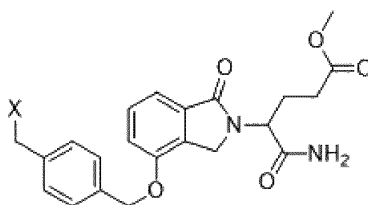
данный способ включает приведение в контакт энантиомера соединения 1b, например соединения 2b

**2b**

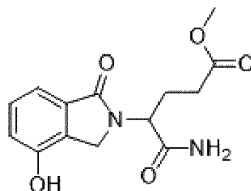
с трет-бутоксидом калия в органическом растворителе в условиях, подходящих для получения соединения 2a.

В одном варианте осуществления X представляет собой Br. В одном варианте осуществления растворитель представляет собой ТГФ. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят при пониженной температуре, например при от около -70°C до около -80°C .

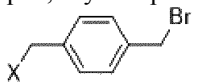
В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают получение соединения 1b,

**1b,**

или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, или изотополога, включающие приведение в контакт соединения 1c

**1c,**

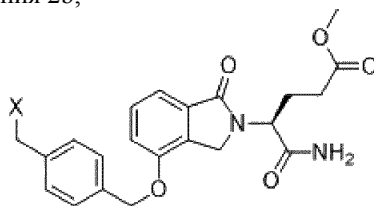
или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера или изотополога с



в органическом растворителе в присутствии основания, в условиях, подходящих для получения соединения 1b.

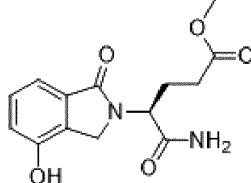
В одном варианте осуществления данный способ представляет собой способ получения энантиомера

ра соединения 1b, например соединения 2b,



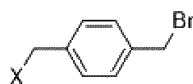
2b,

данный способ включает приведение в контакт энантиомера соединения 1c, например соединения 2c



2c

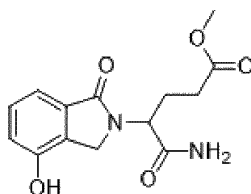
c



в органическом растворителе в присутствии основания в условиях, подходящих для получения соединения 1b.

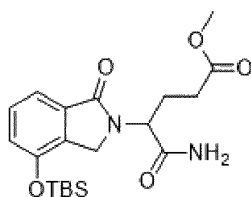
В одном варианте осуществления X представляет собой Br. В одном варианте осуществления растворитель представляет собой ацетонитрил. В некоторых вариантах осуществления основание представляет собой карбонат калия. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят при повышенной температуре, например при от около 50°C до около 70°C.

В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают получение соединения 1c,



1c,

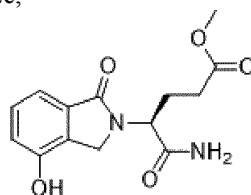
или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, или изотополога, включающие приведение в контакт соединения 1d



1d,

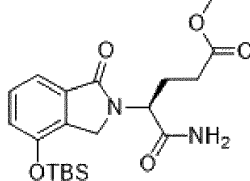
или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера или изотополога с основанием в растворителе в условиях, подходящих для получения соединения 1c.

В одном варианте осуществления данный способ представляет собой способ получения энантиомера соединения 1c, например соединения 2c,



2c,

данный способ включает приведение в контакт энантиомера соединения 1d, например соединения 2d

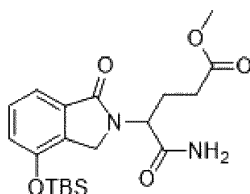


2d

с основанием в растворителе в условиях, подходящих для получения соединения 2с.

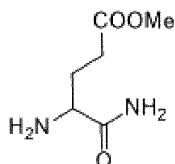
В одном варианте осуществления растворитель представляет собой воду. В некоторых вариантах осуществления основание представляет собой карбонат калия.

В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают получение соединения 1d,



1d,

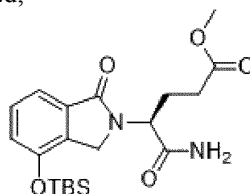
или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, или изотополога, включающие приведение в контакт соединения 1e



1e,

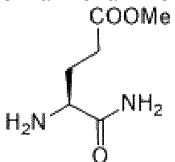
или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера или изотополога с метил 2-(бромметил)-3-[трет-бутил(диметил)силил]оксибензоатом в растворителе в присутствии основания, в условиях, подходящих для получения соединения 1d.

В одном варианте осуществления данный способ представляет собой способ получения энантиомера соединения 1d, например соединения 2d,



2d,

данный способ включает приведение в контакт энантиомера соединения 1e, например соединения 2e

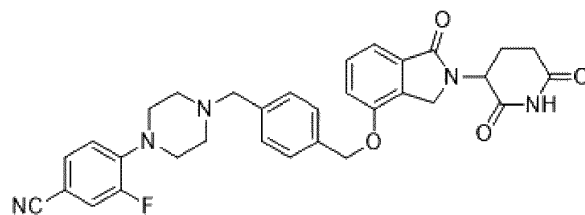


2e

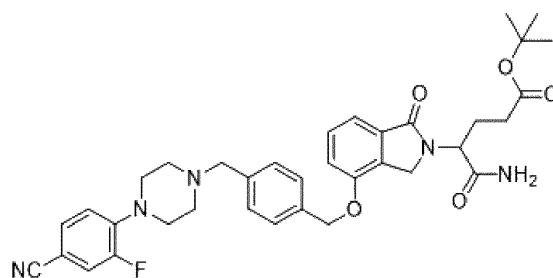
с метил 2-(бромметил)-3-[трет-бутил(диметил)силил]оксибензоатом в растворителе в присутствии основания в условиях, подходящих для получения соединения 2d.

В одном варианте осуществления растворитель представляет собой ацетонитрил. В некоторых вариантах осуществления основание представляет собой ДИПЭА. В некоторых других вариантах осуществления приведение в контакт проводят при повышенной температуре, например при от около 50°C до около 70°C.

В другом аспекте в данном документе представлены способы получения соединения 1,

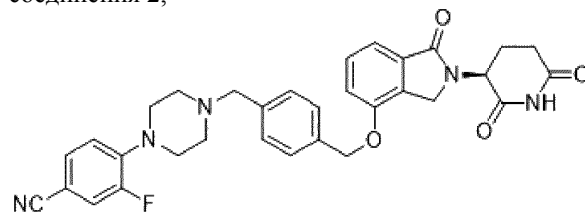
**1,**

или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, или изотополога, включающие приведение в контакт соединения 1f

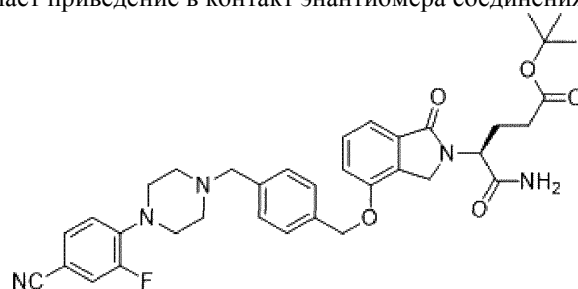
**1f,**

или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера или изотополога с кислотой в органическом растворителе в условиях, подходящих для получения соединения 1.

В одном варианте осуществления данный способ представляет собой способ получения энантиомера соединения 1, например соединения 2,

**2,**

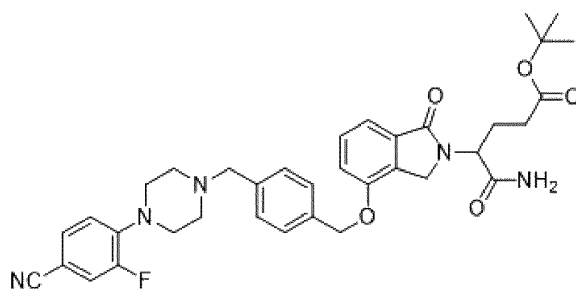
данный способ включает приведение в контакт энантиомера соединения 1f, например соединения 2f

**2f**

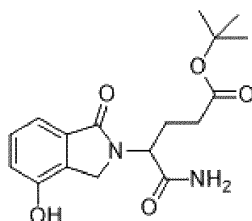
с кислотой в органическом растворителе в условиях, подходящих для получения соединения 2.

В одном варианте осуществления растворитель представляет собой ацетонитрил. В другом варианте осуществления кислота представляет собой бензолсульфоновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят при повышенной температуре, например при от около 75°C до около 95°C.

В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают получение соединения 1f,

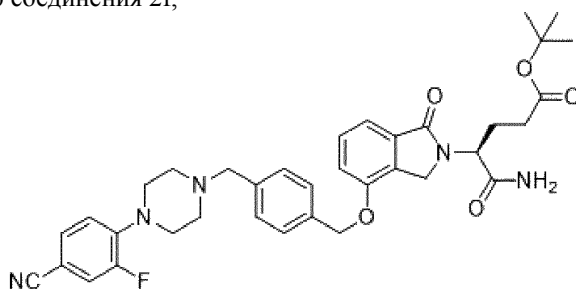
**1f,**

или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, или изотополога, включающие приведение в контакт соединения 1g

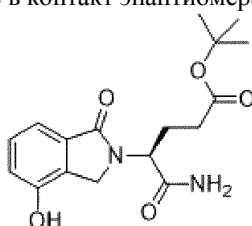
**1g,**

или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера или изотополога с 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрилом или его солью в растворителе в присутствии основания в условиях, подходящих для получения соединения 1f.

В одном варианте осуществления данный способ представляет собой способ получения энантиомера соединения 1f, например соединения 2f,

**2f,**

данный способ включает приведение в контакт энантиомера соединения 1g, например соединения 2g

**2g**

с 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрилом или его солью в растворителе в присутствии основания в условиях, подходящих для получения соединения 2f.

В одном варианте осуществления растворитель представляет собой ДМФА. В одном варианте осуществления растворитель представляет собой ДМСО. В другом варианте осуществления основание представляет собой карбонат калия. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт проводят при повышенной температуре, например при от около 35°C до около 55°C.

В некоторых вариантах осуществления способы получения соединения 1f дополнительно включают способ очистки, включающий (i) приведение в контакт соединения 1f (свободное основание) с кислотой в первом растворителе; (ii) фильтрование с получением соли кислоты соединения 1f; и (iii) промывка соли кислоты соединения 1f во втором растворителе с основанием с получением соединения 1f (свободное основание). В одном варианте осуществления кислота представляет собой винную кислоту (например, L-винную кислоту). В одном варианте осуществления первый растворитель представляет собой метанол. В одном варианте осуществления соль кислоты соединения 1f представляет собой тартрат (на-

пример, соль L-винной кислоты) соединения 1f. В одном варианте осуществления второй растворитель представляет собой 2-метилтетрагидрофуран. В одном варианте осуществления основание представляет собой карбонат калия.

В некоторых вариантах осуществления способы получения энантиомера соединения 1f, например соединения 2f, дополнительно включают способ очистки, включающий (i) приведение в контакт соединения 2f (свободное основание) с кислотой в первом растворителе; (ii) фильтрование с получением соли кислоты соединения 2f; и (iii) промывку соли кислоты соединения 2f во втором растворителе с основанием с получением соединения 2f (свободное основание). В одном варианте осуществления кислота представляет собой винную кислоту (например, L-винную кислоту). В одном варианте осуществления первый растворитель представляет собой метанол. В одном варианте осуществления соль кислоты соединения 2f представляет собой тартрат (например, соль L-винной кислоты) соединения 2f. В одном варианте осуществления второй растворитель представляет собой 2-метилтетрагидрофуран. В одном варианте осуществления основание представляет собой карбонат калия.

В некоторых вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают получение 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила или его соли, включающие приведение в контакт 4-(хлорметил)бензальдегида с 3-фтор-4-(пиперазин-1-ил)бензонитрилом в растворителе в присутствии основания или восстанавливающего агента в условиях, подходящих для получения 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила.

В одном варианте осуществления восстанавливающий агент представляет собой триацетоксиборгидрид натрия ($\text{NaBH}(\text{OAc})_4$). В одном варианте осуществления растворитель представляет собой толуол. В одном варианте осуществления данное приведение в контакт проводят в присутствии кислоты. В одном варианте осуществления кислота представляет собой уксусную кислоту.

В одном варианте осуществления 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил или его соль, полученные и используемые в способах, предложенных в данном документе, представляют собой соль HCl 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила. В одном варианте осуществления данную соль HCl получают путем приведения в контакт свободного основания 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила с соляной кислотой в изопропанол.

Е. Способы лечения и предупреждения

Неожиданно было обнаружено, что соединение 1, соединение 2 и соединение 3 являются очень активными соединениями против миеломы, которые имеют отличительные характеристики, такие как улучшенный профиль безопасности, в том числе селективную гибель клеток множественной миеломы по сравнению со здоровыми клетками, пониженную активность по отношению к рецепторам, которые не являются мишенью, а также сниженное ингибирование фермента CYP, уменьшающее потенциал побочных лекарственных взаимодействий.

В одном варианте осуществления в данном документе предложен способ лечения множественной миеломы, включающий введение пациенту соединения 1 или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления в данном документе предложено соединение 1 или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль для применения в способе лечения множественной миеломы, включающем введение указанного соединения пациенту.

В одном варианте осуществления в данном документе предложен способ лечения множественной миеломы, включающий введение пациенту соединения 2 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления в данном документе предложено соединение 2 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль для применения в способе лечения множественной миеломы, включающем введение указанного соединения пациенту.

В одном варианте осуществления в данном документе предложен способ лечения множественной миеломы, включающий введение пациенту соединения 3 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления в данном документе предложено соединение 3 или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль для применения в способе лечения множественной миеломы, включающем введение указанного соединения пациенту.

В одном варианте осуществления в данном документе предложен способ предупреждения множественной миеломы, включающий введение пациенту соединения, предложенного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления в данном документе предложено соединение, предложенное в данном документе, например соединение 1, соединение 2, или соединение 3, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог, или фармацевтически приемлемая соль для применения в способе предупреждения множественной миеломы, включающем введение указанного соединения пациенту.

В одном варианте осуществления в данном документе предложен способ сдерживания множественной миеломы, включающий введение пациенту соединения, предложенного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления в данном

документе предложено соединение, предложенное в данном документе, например, соединение 1, соединение 2 или соединение 3, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог, или фармацевтически приемлемая соль для применения в способе сдерживания множественной миеломы, включающем введение указанного соединения пациенту.

В одном варианте осуществления в данном документе также предложены способы вызывания терапевтического ответа, оцененного с помощью международных критериев равномерного ответа для множественной миеломы (IURC) (см Durie BGM, Harousseau J-L, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 2006; (10) 10:17) у пациента, включающие введение эффективного количества соединения, описанного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли пациенту, страдающему от множественной миеломы. В другом варианте осуществления в данном документе предложены способы достижения строгой полной ремиссии, полной ремиссии или очень хорошего частичного ответа, оцененного с помощью международных критериев равномерного ответа для множественной миеломы (IURC) у пациента, включающие введение эффективного количества соединения, описанного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли пациенту, страдающему от множественной миеломы. В другом варианте осуществления в данном документе предложены способы достижения увеличения общей выживаемости, выживаемости без прогрессирования, бессобытийной выживаемости, времени до прогрессирования заболевания или выживаемости без признаков заболевания у пациента, включающие введение эффективного количества соединения, описанного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли пациенту, страдающему от множественной миеломы. В другом варианте осуществления в данном документе предложены способы достижения увеличения общей выживаемости у пациента, включающие введение эффективного количества соединения, описанного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли пациенту, страдающему от множественной миеломы. В другом варианте осуществления в данном документе предложены способы достижения увеличения выживаемости без прогрессирования у пациента, включающие введение эффективного количества соединения, описанного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли пациенту, страдающему от множественной миеломы. В другом варианте осуществления в данном документе предложены способы достижения увеличения бессобытийной выживаемости у пациента, включающие введение эффективного количества соединения, описанного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли пациенту, страдающему от множественной миеломы. В другом варианте осуществления в данном документе предложены способы достижения увеличения времени до прогрессирования заболевания у пациента, включающие введение эффективного количества соединения, описанного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли пациенту, страдающему от множественной миеломы. В другом варианте осуществления в данном документе предложены способы достижения увеличения выживаемости без признаков заболевания у пациента, включающие введение эффективного количества соединения, описанного в данном документе, например соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли пациенту, страдающему от множественной миеломы.

В данном документе предложены также способы лечения пациентов, ранее проходивших лечение множественной миеломы, но не отвечающих на стандартные терапевтические средства, а также пациентов, ранее не подверженных лечению. Также включены способы лечения пациентов, прошедших хирургическую операцию, предпринятую для лечения множественной миеломы, а также пациентов, не подвергавшихся операции. В данном документе предложены также способы лечения пациентов, ранее проходивших пересадку органов, а также пациентов, ранее не подвергавшихся такому лечению.

Предлагаемые в данном описании способы включают лечение множественной миеломы, которая является рецидивирующей, рефрактерной или резистентной. Предлагаемые в данном описании способы включают предупреждение множественной миеломы, которая является рецидивирующей, рефрактерной или резистентной. Предлагаемые в данном описании способы включают сдерживание множественной миеломы, которая является рецидивирующей, рефрактерной или резистентной. В некоторых таких вариантах осуществления миелома является однократно, двукратно, трехкратно, четырехкратно или пятикратно рецидивирующей множественной миеломой. В одном варианте осуществления способы, предложенные в данном документе, уменьшают, поддерживают или устраняют минимальную остаточную болезнь (МОБ). В одном варианте осуществления способы, предложенные в данном документе, охватывают лечение, предупреждение или сдерживание различных типов множественной миеломы, таких как моноклональная гаммапатия неясного генеза (МГНГ); множественная миелома низкого риска, среднего

риска и высокого риска; впервые диагностированная множественная миелома (в том числе впервые диагностированная множественная миелома низкого риска, среднего риска и высокого риска); множественная миелома с возможностью трансплантации и без возможности трансплантации; вялотекущая (медленно прогрессирующая) множественная миелома (в том числе вялотекущая множественная миелома низкого риска, среднего риска и высокого риска); активная множественная миелома; одиночная плазмочитома; экстрамедуллярная плазмочитома; лейкоз плазматических клеток; множественная миелома центральной нервной системы; легкоцепочечная миелома; несекреторная миелома; миелома иммуноглобулина D; и миелома иммуноглобулина E, путем введения терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе. В другом варианте осуществления способы, предложенные в данном документе, охватывают лечение, предупреждение или сдерживание множественной миеломы, характеризующейся генетическими аномалиями, такими как транслокация циклина D (например, t(11;14)(q13;q32); t(6;14)(p21;q32); t(12;14)(p13;q32); или t(6;20);); транслокации MMSET (например, t(4;14)(p16;q32)); транслокации MAF (например, t(14;16)(q32;q32); t(20;22); t(16; 22)(q11;q13); или t(14;20)(q32;q11)); или другие факторы хромосом (например, делеция 17p13, или хромосомы 13; del(17/17p), негиперплоидия и gain(1q)), путем введения терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе.

В одном варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 1 или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 2 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 3 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 1 или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве индукционной терапии. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 2 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве индукционной терапии. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 3 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве индукционной терапии. В некоторых вариантах осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 1 или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве укрепляющей терапии. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 2 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве укрепляющей терапии. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 3 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве укрепляющей терапии. В некоторых вариантах осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 1 или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве поддерживающей терапии. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 2 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве поддерживающей терапии. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 3 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве поддерживающей терапии.

В одном конкретном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, множественная миелома является лейкозом плазматических клеток.

В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, множественная миелома является множественной миеломой высокого риска. В некоторых таких вариантах осуществления множественная миелома высокого риска является рецидивирующей или рефрактерной. В одном варианте осуществления множественная миелома высокого риска представляет собой множественную миелому, которая рецидивировала в течение 12 месяцев после первого курса лечения. В еще одном варианте осуществления множественная миелома высокого риска представляет собой множественную миелому, которая характеризуется генетическими аномалиями, например одно или более из del(17/17p) и t(14;16)(q32;q32). В некоторых таких вариантах осуществления множественная миелома высокого риска является рецидивирующей или рефрактерной к одному, двум или трем предшествующим терапиям.

В одном варианте осуществления множественная миелома характеризуется мутацией p53. В одном варианте осуществления мутация p53 представляет собой мутацию Q331. В одном варианте осуществления мутация p53 представляет собой мутацию R273H. В одном варианте осуществления мутация p53 представляет собой мутацию K132. В одном варианте осуществления мутация p53 представляет собой мутацию K132N. В одном варианте осуществления мутация p53 представляет собой мутацию R337.

при t(11;14).

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, множественная миелома является впервые диагностированной множественной миеломой с возможностью трансплантации. В другом варианте осуществления множественная миелома является впервые диагностированной множественной миеломой без возможности трансплантации.

В еще одних вариантах осуществления множественная миелома характеризуется ранним прогрессированием (например, менее 12 месяцев) после первоначального лечения. В еще одних вариантах осуществления множественная миелома характеризуется ранним прогрессированием (например, менее 12 месяцев) после пересадки аутологичных стволовых клеток. В другом варианте осуществления множественная миелома является рефрактерной к леналидомиду. В другом варианте осуществления множественная миелома является рефрактерной к помалидомиду. В некоторых таких вариантах осуществления спрогнозировано, что множественная миелома является рефрактерной к помалидомиду (например, молекулярной характеристикой). В другом варианте осуществления множественная миелома является рецидивирующей или рефрактерной к 3 или более лечениям и подвергалась экспозиции ингибитора протеасом (например, бортезомиба, карфилзомиба, иксазомиба, опророзомиба или маризомиба) и иммуномодулирующего соединения (например, талидомида, леналидомида, помалидомида, ибердомида или авадомида), или двойной рефрактерной к ингибитору протеасом и иммуномодулирующему соединению. В еще других вариантах осуществления множественная миелома является рецидивирующей, или рефрактерной к 3 или более лечениям, включающим, например, CD38 моноклональным антителом (CD38 mAb, например, даратумумаб или изатуксимаб), ингибитором протеасом (например, бортезомибом, карфилзомибом, иксазомибом или маризомибом) и иммуномодулирующим соединением (например, талидомидом, леналидомидом, помалидомидом, ибердомидом или авадомидом), или двойной рефрактерной к ингибитору протеасом или иммуномодулирующему соединению и CD38 mAb. В еще других вариантах осуществления множественная миелома является тройной рефрактерной, например, множественная миелома является рефрактерной к ингибитору протеасом (например, бортезомибу, карфилзомибу, иксазомибу, опророзомибу или маризомибу) и иммуномодулирующему соединению (например, талидомиду, леналидомиду, помалидомиду, ибердомиду или авадомиду) и одному другому активному агенту, как описано в данном документе.

В некоторых таких вариантах осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 1 или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве индукционной терапии. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 2 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве индукционной терапии. В другом варианте осуществления указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества соединения 3 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в качестве индукционной терапии.

В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания множественной миеломы, в том числе рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы у пациентов с нарушенной функцией почек или ее симптома, которые включают введение терапевтически эффективного количества соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли пациенту с нарушенной функцией почек, имеющему рецидивирующую/рефрактерную множественную миелому.

В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания множественной миеломы, в том числе рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломы у хилых пациентов или ее симптома, которые включают введение терапевтически эффективного количества соединения 1, соединения 2, или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога, или фармацевтически приемлемой соли хилому пациенту, имеющему множественную миелому. В некоторых таких вариантах осуществления хилый пациент характеризуется невозможностью индукционной терапии или непереносимостью лечения дексаметазоном. В некоторых таких вариантах осуществления хилый пациент находится в преклонном возрасте, например в возрасте старше 65 лет.

В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания множественной миеломы, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 1 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, где множественная миелома представляет собой рецидивирующую/рефрактерную к четвертой линии множественную миелому. В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания множественной миеломы, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 2 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, где множественная миелома представляет собой рецидивирующую/рефрактерную к четвертой линии множественную миелому. В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания

преждения и/или сдерживания множественной миеломы, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 1 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, где множественная миелома представляет собой множественную миелому высокого риска, рецидивирующую или рефрактерную к одному, двум или трем предшествующим лечениям. В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания множественной миеломы, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 2 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, где множественная миелома представляет собой множественную миелому высокого риска, рецидивирующую или рефрактерную к одному, двум или трем предшествующим лечениям. В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания множественной миеломы, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 3 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, где множественная миелома представляет собой множественную миелому высокого риска, рецидивирующую или рефрактерную к одному, двум или трем предшествующим лечениям.

В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания множественной миеломы, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 1 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, где множественная миелома представляет собой впервые диагностированную множественную миелому без возможности трансплантации. В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания множественной миеломы, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 2 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, где множественная миелома представляет собой впервые диагностированную множественную миелому без возможности трансплантации. В конкретных вариантах осуществления в данном документе предложены способы лечения, предупреждения и/или сдерживания множественной миеломы, которые включают введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения 3 или его таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, где множественная миелома представляет собой впервые диагностированную множественную миелому без возможности трансплантации.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество соединения составляет от около 0,01 до около 25 мг в сутки, от около 0,01 до около 10 мг в сутки, от около 0,01 до около 5 мг в сутки, около от 0,01 до около 2 мг в сутки, от около 0,01 до около 1 мг в сутки, от около 0,01 до около 0,5 мг в сутки, от около 0,01 до около 0,25 мг в сутки, от около 0,1 до около 25 мг в сутки, около от 0,1 до около 10 мг в сутки, от около 0,1 до около 5 мг в сутки, от около 0,1 до около 2 мг в сутки, от около 0,1 до около 1 мг в сутки, от около 0,1 до около 0,5 мг в сутки, около от 0,1 до около 0,25 мг в сутки, от около 0,5 до около 25 мг в сутки, от около 0,5 до около 10 мг в сутки, от около 0,5 до около 5 мг в сутки, от около 0,5 до около 2 мг в сутки, около от 0,5 до около 1 мг в сутки, от около 1 до около 25 мг в сутки, от около 1 до около 10 мг в сутки, от около 1 до около 5 мг в сутки, от около 1 до около 2,5 мг в сутки или от около 1 до около 2 мг в сутки. В одном варианте осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество соединения 1, соединения 2 или соединения 3 составляет от около 0,1 мг в сутки до около 0,4 мг в сутки.

В некоторых вариантах осуществления указанное терапевтически или профилактически эффективное количество составляет около 0,1, около 0,2, около 0,3, около 0,4, около 0,5, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 15, около 20 или около 25 мг в сутки. В некоторых таких вариантах осуществления указанное терапевтически или профилактически эффективное количество составляет около 0,1, около 0,2, около 0,3, около 0,4, около 0,5, около 0,6 или около 0,7 мг в сутки.

В одном варианте осуществления рекомендуемый диапазон суточной дозы соединения 1, соединения 2 или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли в случае условий, описанных в данном документе, лежат в пределах от около 0,1 мг до около 25 мг в сутки, предпочтительно в виде разовой дозы один раз в сутки или в разделенных дозах в течение дня. В других вариантах осуществления диапазоны дозировок составляют от около 0,1 до около 10 мг в сутки. Конкретные дозы в сутки включают 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 мг в сутки. Более конкретные дозы в сутки включают 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5 мг в сутки.

В конкретном варианте осуществления рекомендуемая начальная доза может составлять 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 мг в сутки. В другом варианте реализации рекомендуемая начальная доза может составлять 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5 мг в сутки. Дозу можно повышать до 1, 2, 3, 4 или 5 мг в сутки.

В конкретных вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от около 0,001 до около 5 мг/кг/сутки, от около 0,001 до около 4 мг/кг/сутки, от около 0,001 до около 3 мг/кг/сутки, от около 0,001 до около 2 мг/кг/сутки, от около 0,001 до около 1 мг/кг/сутки, 0,001 до около 0,05 мг/кг/сутки, от около 0,001 до около 0,04 мг/кг/сутки, от около 0,001 до

около 0,03 мг/кг/сутки, от около 0,001 до около 0,02 мг/кг/сутки, от около 0,001 до около 0,01 мг/кг/сутки или от около 0,001 до около 0,005 мг/кг/сутки.

Вводимая доза также может быть выражена в других единицах, отличных от мг/кг/сутки. Например, дозы для парентерального введения могут быть выражены в мг/м²/сутки. Специалист в данной области техники легко определит, как преобразовать дозы из мг/кг/сутки в мг/м²/сутки с учетом высоты или массы субъекта или их обоих (см. www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm). Например, доза 1 мг/кг/сутки для человека массой 65 кг примерно равна 38 мг/м²/сутки.

В некоторых вариантах реализации пациент, подлежащий лечению одним из способов, предложенных в данном документе, не проходил терапию против множественной миеломы до введения соединения 1, соединения 2 или соединения 3, предложенного в данном документе, или его энантиомера, смеси энантиомеров, тауомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах реализации пациент, подлежащий лечению одним из способов, предложенных в данном документе, проходил терапию против множественной миеломы до введения соединения 1, соединения 2 или соединения 3, предложенного в данном документе, или его энантиомера, смеси энантиомеров, тауомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления у пациента, подлежащего лечению одним из способов, предложенных в данном документе, развилась лекарственная устойчивость к терапии против множественной миеломы. В других таких вариантах осуществления у пациента развилась устойчивость к одному, двум или трем лечением против множественной миеломы, выбранным из группы, включающей CD38 моноклональное антитело (CD38 mAb, например, даратумумаб или изатуксимаб), ингибитор протеасом (например, бортезомиб, карфилзомиб, иксазомиб или маризомиб) и иммуномодулирующее соединение (например, талидомид, леналидомид, помалидомид, ибердомид или авадомид).

Способы, предложенные в данном документе, включают лечение пациента, независимо от возраста пациента. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой 18-летнего субъекта или старше. В других вариантах осуществления возраст субъекта составляет более 18, 25, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 или 70 лет. В других вариантах осуществления возраст субъекта составляет не менее 65 лет. В других вариантах осуществления возраст субъекта составляет не более 65 лет. В одном варианте осуществления субъект является пожилым субъектом с множественной миеломой, таким как субъект старше 65 лет. В одном варианте осуществления субъект является пожилым субъектом с множественной миеломой, таким как субъект старше 75 лет.

В зависимости от состояния заболевания, подлежащего лечению, и от состояния субъекта соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предлагаемого в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, тауомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль можно вводить пероральным, парентеральным способом (например, внутримышечным, интраперитонеальным, внутривенным, CIV, интрацистернальной инъекцией или инфузией, подкожной инъекцией или с применением имплантата), посредством ингаляции, назальным, вагинальным, ректальным, сублингвальным или местным (например, трансдермальным или локальным) способом введения. Соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предложенное в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, тауомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль могут быть составлены, отдельно или совместно, в подходящую единичную лекарственную форму с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, носителями, адъювантами и жидкими средами, подходящими для каждого способа введения.

В одном варианте осуществления соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предложенные в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, тауомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят перорально. В другом варианте осуществления соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предложенные в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, тауомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят парентерально. В еще одном варианте осуществления соединения 1, соединения 2 или соединения 3, предложенные в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, тауомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят внутривенно.

Соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предлагаемое в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, тауомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль можно доставлять в виде разовой дозы, такой как, например, однократная болюсная инъекция или пероральные таблетки или пилюли; или в течение определенного времени, например посредством непрерывной инфузии в течение определенного времени или в виде дробных болюсных доз в течение определенного времени, соединения, описанные в данном документе, при необходимости можно вводить несколько раз, например до стабилизации или регрессии заболевания у пациента или до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности у пациента. Стабильное заболевание или его отсутствие определяют способами, известными в данной области техники, такими как оценка симптомов пациента, медицинский осмотр, визуализация опухоли, снимок которой получен с помощью рентгеновского излучения, КТ, ПЭТ или МРТ, а также с помощью других общепринятых способов оценки.

Соединение 1, соединения 2 или соединения 3, предложенное в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, тауомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль может независимо вводиться один раз в сутки (QD или qd) или может быть разделено на несколько дневных доз, та-

ких как для приема два раза в сутки (BID или bid), три раза в сутки (TID или tid) и четыре раза в сутки (QID или qid). Кроме того, введение может быть непрерывным (т.е. ежедневно в течение нескольких дней или каждый день), периодическим, например в циклах (т.е. в том числе дни, недели или месяцы отдыха без лекарственного средства). Как используется в данном документе, термин "ежедневно" означает, что терапевтическое соединение, такое как соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предлагаемые в данном описании, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят один или более раз в сутки, например в течение периода времени. Термин "непрерывный" означает, что терапевтическое соединение, такое как соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предлагаемые в данном описании, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно в течение непрерывного периода по меньшей мере от 7 дней до 52 недель. Термин "периодический" или "периодически", применяемый в данном документе, означает прекращение и начало с регулярными или нерегулярными интервалами. Например, периодическое введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3, предлагаемого в данном документе, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли представляет собой введение в течение от одного до шести дней в неделю, введение в циклах (например, ежедневное введение в течение от двух до восьми последовательных недель, после чего идет период отдыха без введения в течение до одной недели) или введение через день. Как используется в данном документе, термин "циклический" означает, что терапевтическое соединение, такое как соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предлагаемые в данном описании, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят ежедневно или непрерывно, но с периодом отдыха. В некоторых подобных вариантах осуществления введение осуществляют один раз в сутки в течение от двух до шести дней, с последующим периодом отдыха без введения в течение от пяти до семи дней.

В некоторых вариантах осуществления частота введения находится в пределах от около дозы ежедневно до дозы ежемесячно. В конкретных вариантах осуществления введение осуществляют раз в сутки, два раза в сутки, три раза в сутки, четыре раза в сутки, один раз в сутки, два раза в неделю, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в четыре недели. В одном варианте осуществления соединения 1, соединения 2 или соединения 3, предложенные в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят один раз в сутки. В другом варианте осуществления соединения 1, соединения 2 или соединения 3, предложенные в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят два раза в сутки. В еще одном варианте осуществления соединения 1, соединения 2 или соединения 3, предложенные в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят три раза в сутки. В еще одном варианте осуществления соединения 1, соединения 2 или соединения 3, предложенные в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят четыре раза в сутки.

В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1, соединения 2 или соединения 3 вводят в цикле лечения, который включает период введения, составляющий не более 20 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1, соединения 2 или соединения 3 вводят в цикле лечения, который включает период введения, составляющий не более 15 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1, соединения 2 или соединения 3 вводят в цикле лечения, который включает период введения, составляющий не более 10 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1, соединения 2 или соединения 3 вводят в цикле лечения, который включает период введения, составляющий не более 7 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1, соединения 2 или соединения 3 вводят в цикле лечения, который включает период введения, составляющий не более 5 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1, соединения 2 или соединения 3 вводят в цикле лечения, который включает период введения, составляющий не более 4 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1, соединения 2 или соединения 3 вводят в цикле лечения, который включает период введения, составляющий не более 3 дней, с последующим периодом отдыха.

В одном варианте осуществления цикл лечения включает период введения, составляющий не более 14 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления цикл лечения включает период введения, составляющий не более 10 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления цикл лечения включает период введения, составляющий не более 7 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления цикл лечения включает период введения, составляющий не более 5 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления цикл лечения включает период введения, составляющий не более 4 дней, с последующим периодом отдыха. В одном варианте осуществления цикл лечения включает период введения, составляющий не более 3 дней, с

количества соединения 1, соединения 2 или соединения 3 в дни 1-14 21-дневного цикла. В другом варианте осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 в дни 1-4 и 8-11 21-дневного цикла. В одном варианте осуществления цикл лечения включает введение терапевтически эффективного количества соединения 1, соединения 2 или соединения 3 в дни 1-5 и 8-12 21-дневного цикла. В другом варианте осуществления цикл лечения включает введение терапевтически эффективного количества соединения 1, соединения 2 или соединения 3 в дни 1-5 и 11-15 21-дневного цикла. В другом варианте осуществления цикл лечения включает введение терапевтически эффективного количества соединения 1, соединения 2 или соединения 3 в дни 1-5 и 8-12 и 15-19 21-дневного цикла. В другом варианте осуществления цикл лечения включает введение терапевтически эффективного количества соединения 1, соединения 2 или соединения 3 в дни 1-4 и 8-11 и 15-18 21-дневного цикла. В другом варианте осуществления цикл лечения включает введение терапевтически эффективного количества соединения 1, соединения 2 или соединения 3 в дни 1-4 и 8-10 и 15-17 21-дневного цикла. В другом варианте осуществления цикл лечения включает введение терапевтически эффективного количества соединения 1, соединения 2 или соединения 3 в дни 1-3 и 8-11 21-дневного цикла. В другом варианте осуществления цикл лечения включает введение терапевтически эффективного количества соединения 1, соединения 2 или соединения 3 в дни 1-3 и 11-13 21-дневного цикла.

Любой цикл лечения, описанный в данном документе, может повторяться с числом циклов по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше. В некоторых случаях цикл лечения, описанный в данном документе, включает от 1 до около 24 циклов, от около 2 до около 16 циклов или от около 2 до около 4 циклов. В некоторых случаях цикл лечения, описанный в данном документе, включает от 1 до около 4 циклов. В некоторых вариантах осуществления все циклы 1-4 представляют собой 28-дневные циклы. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1, соединения 2 или соединения 3 вводят в течение 1-13 циклов из 28 дней (например, в течение около 1 года). В некоторых случаях циклическая терапия не ограничена числом циклов, и при этом терапию продолжают до прогрессирования заболевания. Циклы в некоторых случаях могут предусматривать различную продолжительность периодов введения и/или периодов отдыха, описанных в данном документе.

В одном варианте осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 при величине дозировки, составляющей около 0,1 мг/сутки, 0,2 мг/сутки, 0,3 мг/сутки, 0,4 мг/сутки, 0,5 мг/сутки, 0,6 мг/сутки, 0,7 мг/сутки, 0,8 мг/сутки, 0,9 мг/сутки, 1,0 мг/сутки, 5,0 мг/сутки или 10 мг/сутки, при введении один раз в сутки. В одном варианте осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 при величине дозировки, составляющей около 0,1 мг/сутки, 0,2 мг/сутки, 0,3 мг/сутки, 0,4 мг/сутки, 0,5 мг/сутки, 0,6 мг/сутки, 0,7 мг/сутки или 0,8 мг/сутки, при введении один раз в сутки. В некоторых таких вариантах осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 раза в сутки при величине дозировки, составляющей около 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг или 0,5 мг, в дни 1-10 28-дневного цикла. В некоторых таких вариантах осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 раза в сутки при величине дозировки, составляющей около 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг или 0,5 мг, в дни 1-10 и 15-24 28-дневного цикла. В некоторых таких вариантах осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 раза в сутки при величине дозировки, составляющей около 0,1 мг в дни 1-10 и 15-24 28-дневного цикла. В других вариантах осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 дважды в сутки при величине дозировки, составляющей около 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг или 0,5 мг, в дни 1-3 28-дневного цикла. В других вариантах осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 дважды в сутки при величине дозировки, составляющей около 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг или 0,5 мг, в дни 1-3 и 15-19 28-дневного цикла. В других вариантах осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 дважды в сутки при величине дозировки, составляющей около 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг или 0,5 мг, в дни 1-3 и 15-17 28-дневного цикла. В других вариантах осуществления цикл лечения включает введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3 дважды в сутки при величине дозировки, составляющей около 0,2 мг в дни 1-3 и 15-17 28-дневного цикла. В одном таком варианте осуществления соединение вводят в дни от 1 до 3 (утром и вечером), день 14 (только вечер), дни 15 и 16 (утром и вечером), и день 17 (только утром) 28-дневного цикла, например в цикле 1.

Ф. Комбинированная терапия со вторым активным агентом

Соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предложенные в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль также может быть объединено или использовано в сочетании с (например, до, во время или после) обычной терапией, включающей, но не ограничиваясь ими, хирургию, биологическую терапию (в том числе иммунотерапию, например, с помощью ингибиторов контрольной точки), лучевую терапию, химиотерапию, трансплантацию стволовых клеток, клеточную терапию или другую терапию не на основе препаратов используемую в настоящее время для лечения, предотвращения или сдерживания множественной миеломы. Комбинированное применение соединения, предложенного в данном документе, и обычной терапии может обеспечить уникальный режим лечения, который является неожиданно эффективным у некоторых

пациентов. Не ограничиваясь теорией, полагают, что соединение 1, соединение 2 или соединение 3 может обеспечивать аддитивный или синергетический эффект при параллельном введении с традиционной терапией.

Как описано в данном документе, предусмотрен способ уменьшения, лечения и/или предупреждения неблагоприятных или нежелательных эффектов, связанных с традиционной терапией, включая, но не ограничиваясь этим, операцию, химиотерапию, лучевую терапию, биологическую терапию и иммунотерапию. Соединение, предложенное в данном документе, например соединение 1, соединение 2, или соединение 3, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог, или фармацевтически приемлемую соль и другой активный ингредиент можно вводить пациенту до, во время или после возникновения неблагоприятного эффекта, связанного с традиционной терапией.

Соединение 1, соединение 2 или соединение 3, предложенное в данном документе, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль также может быть объединено или использовано в комбинации с другими терапевтическими агентами, пригодными для лечения и/или предупреждения множественной миеломы, описанными в данном документе.

В одном варианте осуществления в данном документе предложен способ лечения, предупреждения или сдерживания развития множественной миеломы, включающий введение пациенту соединения 1, соединения 2 или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с одним или более вторыми активными агентами и необязательно в комбинации с лучевой терапией, переливанием крови или хирургической операцией.

В данном контексте термин "в комбинации" включает применение более чем одной терапии (например, одного или более профилактических и/или терапевтических агентов). Однако применение термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства (например, профилактические и/или терапевтические средства) вводят пациенту, страдающему заболеванием или расстройством. Первая терапия (например, профилактическое или терапевтическое средство, такое как соединение, предлагаемое в данном документе, например, соединение 1, соединение 2 или соединение 3, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль) может быть введена перед (например, за 5, 15, 30, 45 мин; 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель), одновременно с или после (например, спустя 5, 15, 30, 45 мин; 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 12 недель) введения второй терапии (например, профилактического или терапевтического средства) субъекту. Тройная терапия также рассматривается в данном документе, также как и четверная терапия. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой дексаметазон.

Введение соединения 1, соединения 2 или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли, и одного или более вторых активных средств пациенту можно осуществлять одновременно или последовательно, одним или разными способами введения. Пригодность конкретного способа введения, применяемого для конкретного активного средства, зависит от самого активного средства (например, от возможности его перорального введения без разложения до попадания в кровоток).

Путь введения соединения 1, соединения 2 или соединения 3 или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтически приемлемой соли не зависит от пути введения второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления соединение 1, соединение 2 или соединение 3 или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят перорально. В другом варианте осуществления соединение 1, соединение 2 или соединение 3 вводят внутривенно. Так, в соответствии с указанными вариантами осуществления, соединение 1, соединение 2 или соединение 3, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят перорально или внутривенно, а вторую терапию можно вводить перорально, парентерально, интраперитонеально, внутривенно, внутриартериально, трансдермально, сублингвально, внутримышечно, ректально, трансбуккально, интраназально, липосомально, посредством ингаляции, вагинально, интраокулярно, посредством местной доставки через катетер или стент, подкожно, интраадипозально, интраартикулярно, интратекально или в лекарственной форме с медленным высвобождением. В одном варианте осуществления соединение 1, соединение 2 или соединение 3 или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль и второй терапевтический агент вводят одним и тем же путем введения, перорально или внутривенно. В другом варианте осуществления соединение 1, соединение 2 или соединение 3 или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят одним путем введения, например внутривенно, а второй терапевтический агент (агент против множественной миеломы) вводят другим путем введения, например перорально.

В одном из вариантов осуществления второй активный агент вводят внутривенно или подкожно и один или два раза в сутки в количестве от около 1 до около 1000 мг, от около 5 до около 500 мг, от около 10 до около 350 мг или от около 50 до около 200 мг. Конкретное количество второго активного агента зависит от конкретного используемого агента, типа множественной миеломы, подлежащей лечению или сдерживанию развития, тяжести и стадии заболевания, а также от количества соединения 1, соединения 2 или соединения 3, или его энантиомера, смеси энантиомеров, таутомера, изотополога или фармацевтиче-

ски приемлемой соли, предложенных в данном документе, и любых необязательных дополнительных активных агентов, параллельно вводимых пациенту.

В способах и композициях, представленных в данном документе, могут использоваться один или более из вторых активных ингредиентов или агентов вместе с соединением 1, соединением 2 или соединением 3. Вторые активные средства могут представлять собой высокомолекулярные соединения (например, белки), малые молекулы (например, синтетические неорганические, металлоорганические или органические молекулы) или клеточные терапии (например, клетки CAR).

Примеры вторых активных агентов, которые могут быть использованы в способах и композициях, описанных в данном документе, включают один или более из списка, включающего мелфалан, винкристин, циклофосамид, этопозид, доксорубин, бендамустин, обинутузумаб, ингибитор протеасом (например, бортезомиб, карфилзомиб, иксазомиб, опророзомиб или маризомиб), ингибитор гистондеацетилазы (например, панобиностат, ACY241), ингибитор BET (например, GSK525762A, OTX015, BMS-986158, TEN-010, CPI-0610, INCB54329, BAY1238097, FT-1101, ABBV-075, BI 894999, GS-5829, GSK1210151A (I-BET-151), CPI-203, RVX208, XD46, MS436, PFI-1, RVX2135, ZEN3365, XD14, ARV-771, MZ1, PLX5117, 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он, EP11313 и EP11336), ингибитор BCL2 (например, венетоклакс или навитоклакс), ингибитор MCL-1 (например, AZD5991, AMG176, MIK665, S64315 или S63845), ингибитор LSD-1 (например, ORY-1001, ORY-2001, INCB-59872, IMG-7289, TAK418, GSK-2879552, 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фтор-бензонитрил или его соль), кортикостероид (например, преднизон), дексаметазон; антитело (например, антитело CS1, такое как элутузумаб; антитело CD38, такое как даратумумаб или изатуксимаб; или антитело BCMA или конъюгат антитела, такой как GSK2857916 или BI 836909), ингибитор контрольной точки (как описано в данном документе) или клетки CAR (как описано в данном документе).

В одном варианте осуществления второй активный агент, применяемый вместе с соединением 1, соединением 2 или соединением 3 или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью в способах и композициях, описанных в данном документе, представляет собой дексаметазон.

В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 4 мг в дни 1 и 8 21-дневного цикла. В некоторых других вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 4 мг в дни 1, 4, 8 и 11 21-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 4 мг в дни 1, 8 и 15 28-дневного цикла. В некоторых других вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 4 мг в дни 1, 4, 8, 11, 15 и 18 28-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 4 мг в дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного цикла. В одном таком варианте осуществления дексаметазон вводят при дозировке 4 мг в дни 1, 10, 15 и 22 цикла 1. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 4 мг в дни 1, 3, 15 и 17 28-дневного цикла. В одном таком варианте осуществления дексаметазон вводят при дозировке 4 мг в дни 1, 3, 14 и 17 цикла 1.

В некоторых других вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 8 мг в дни 1 и 8 21-дневного цикла. В некоторых других вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 8 мг в дни 1, 4, 8 и 11 21-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 8 мг в дни 1, 8 и 15 28-дневного цикла. В некоторых других вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 8 мг в дни 1, 4, 8, 11, 15 и 18 28-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 8 мг в дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного цикла. В одном таком варианте осуществления дексаметазон вводят при дозировке 8 мг в дни 1, 10, 15 и 22 цикла 1. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 8 мг в дни 1, 3, 15 и 17 28-дневного цикла. В одном таком варианте осуществления дексаметазон вводят при дозировке 8 мг в дни 1, 3, 14 и 17 цикла 1.

В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 10 мг в дни 1 и 8 21-дневного цикла. В некоторых других вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 10 мг в дни 1, 4, 8 и 11 21-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 10 мг в дни 1, 8 и 15 28-дневного цикла. В некоторых других вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 10 мг в дни 1, 4, 8, 11, 15 и 18 28-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 10 мг в дни 1, 8, 15 и 22 28-дневного цикла. В одном таком варианте осуществления дексаметазон вводят при дозировке 10 мг в дни 1, 10, 15 и 22 цикла 1. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 10 мг в дни 1, 3, 15 и 17 28-дневного цикла. В одном таком варианте осуществления дексаметазон вводят при дозировке 10 мг в дни 1, 3, 14 и 17 цикла 1.

В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 20 мг в дни 1 и 8 21-дневного цикла. В некоторых других вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 20 мг в дни 1, 4, 8 и 11 21-дневного цикла. В некоторых вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 20 мг в дни 1, 8 и 15 28-дневного цикла. В некоторых других вариантах осуществления дексаметазон вводят при дозировке 20 мг в дни 1, 4, 8, 11, 15 и 18 28-дневного цикла. В некоторых вариантах

В другом варианте осуществления второй активный агент, применяемый вместе с соединением 1, соединением 2 или соединением 3 или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью в способах и композициях, описанных в данном документе, представляет собой AMG176. В некоторых таких вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают введение дексаметазона.

В другом варианте осуществления второй активный агент, применяемый вместе с соединением 1, соединением 2 или соединением 3 или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью в способах и композициях, описанных в данном документе, представляет собой MIK665. В некоторых таких вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают введение дексаметазона.

В другом варианте осуществления второй активный агент, применяемый вместе с соединением 1, соединением 2 или соединением 3 или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью в способах и композициях, описанных в данном документе, представляет собой GSK525762A. В некоторых таких вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают введение дексаметазона.

В другом варианте осуществления второй активный агент, применяемый вместе с соединением 1, соединением 2 или соединением 3 или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью в способах и композициях, описанных в данном документе, представляет собой OTX015. В некоторых таких вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают введение дексаметазона.

В другом варианте осуществления второй активный агент, применяемый вместе с соединением 1, соединением 2 или соединением 3 или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью в способах и композициях, описанных в данном документе, представляет собой 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он. В некоторых таких вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают введение дексаметазона.

В другом варианте осуществления второй активный агент, применяемый вместе с соединением 1, соединением 2 или соединением 3 или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью в способах и композициях, описанных в данном документе, представляет собой 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фторбензонитрил или его соль (например безилат). В некоторых таких вариантах осуществления указанные способы дополнительно включают введение дексаметазона.

В некоторых вариантах осуществления соединение 1, соединение 2, или соединение 3, или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемую соль вводят в комбинации с ингибиторами контрольной точки. В одном варианте осуществления применяют один ингибитор контрольных точек в комбинации с соединением 1, или его таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью по отношению к способам, представленным в данном документе. В другом варианте осуществления применяют два ингибитора контрольных точек в комбинации с соединением 1, или его таутомером, изотопологом или фармацевтически приемлемой солью по отношению к способам, представленным в данном документе. В еще одном варианте осуществления применяют три или больше ингибиторов контрольных точек в комбинации с соединением 1, соединением 2, или соединением 3, или его энантиомером, смесью энантиомеров, таутомером, изотопологом, или фармацевтически приемлемой солью по отношению к способам, представленным в данном документе.

Применяемый в данном документе термин "ингибитор контрольных точек иммунного ответа" или "ингибитор контрольных точек" относится к молекулам, которые полностью или частично снижают, ингибируют, создают препятствия или модулируют один или более белков контрольных точек. Не ограничиваясь определенной теорией, белки контрольных точек регулируют активацию или функцию Т-клеток. Известны многочисленные белки контрольных точек, такие как CTLA-4 и его лиганды CD80 и CD86 и PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2 (Pardoll, Nature Reviews Cancer, 2012, 12, 252-264). Эти белки проявляют ответственность за костимулирующие или ингибирующие взаимодействия Т-клеточных ответов. Белки иммунных контрольных точек ответственны за регулирование и поддержание аутоотолерантности, а также продолжительности и амплитуды физиологических иммунных реакций. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела или получены из антител.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор CTLA-4. В одном варианте осуществления ингибитор CTLA-4 представляет собой антитело к CTLA-4. Примеры антител к CTLA-4 включают без ограничения таковые, описанные в патенте США №№: 5811097; 5811097; 5855887; 6051227; 6207157; 6682736; 6984720 и 7605238, все из которых включены в данный документ во всей своей полноте. В одном варианте осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой тремелимуаб (также известный как тицилимуаб или CP-675206). В другом варианте осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой ипилимуаб (также известный как MDX-010 или MDX-101). Ипилимуаб является полностью человеческим моноклональным IgG-антителом, которое связывается с CTLA-4. Ипилимуаб представлен на рынке под торговым наименованием Yervoy™.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор PD-1/PD-L1. Примеры ингибиторов PD-1/PD-L1 включают без ограничения таковые, которые описаны в патентах США №№ 7488802; 7943743; 8008449; 8168757; 8217149 и публикациях патентной заявки по РСТ №№ WO 2003042402, WO 2008156712, WO 2010089411, WO 2010036959, WO 2011066342, WO 2011159877, WO 2011082400 и WO 2011161699, все из которых включены в данный документ во всей своей полноте.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело к PD-1. В одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой BGB-A317, ниволумаб (также известный как ONO-4538, BMS-936558 или MDX1106) или пембролизумаб (также известный как MK-3475, SCH 900475 или ламбролизумаб). В одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой ниволумаб. Ниволумаб представляет собой моноклональное антитело IgG4 к PD-1 человека, и при этом он представлен на рынке под торговым наименованием Opdivo™. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4 и представлен на рынке под торговым наименованием Keytruda™. В еще одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой CT-011, гуманизированное антитело. CT-011 при введении самого по себе не продемонстрировал ответ при лечении острого миелоидного лейкоза (AML) при рецидиве. В еще одном варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой AMP-224, слитый белок. В другом варианте осуществления антитело к PD-1 представляет собой BGB-A317. BGB-A317 представляет собой моноклональное антитело, в котором специально разработана способность связываться с Fc гамма-рецептором I, и которое имеет уникальную сигнатуру связывания с PD-1 с высокой аффинностью и превосходной специфичностью к мишени.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L1. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой антитело к PD-L1. В одном варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (дурвалумаб). В другом варианте осуществления антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559 (также известный как MDX-1105-01). В еще одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой атезолизумаб (также известный как MPDL3280A и Tecentriq®).

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L2. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L2 представляет собой антитело к PD-L2. В одном варианте осуществления антитело к PD-L2 представляет собой rHlgM12B7A.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3). В одном варианте осуществления ингибитор LAG-3 представляет собой IMP321, растворимый слитый белок Ig (Brignone et al., J. Immunol., 2007, 179, 4202-4211). В другом варианте осуществления ингибитор LAG-3 представляет собой BMS-986016.

В одном варианте осуществления ингибиторы контрольных точек представляют собой ингибитор B7. В одном варианте осуществления ингибитор B7 представляет собой ингибитор B7-H3 или ингибитор B7-H4. В одном варианте осуществления ингибитор B7-H3 представляет собой MGA271, антитело к B7-H3 (Loo et al., Clin. Cancer Res., 2012, 3834).

В одном варианте осуществления ингибиторы контрольных точек представляют собой ингибитор TIM3 (домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен муцина 3) (Fourcade et al., J. Exp. Med., 2010, 207, 2175-86; Sakuishi et al., J. Exp. Med., 2010, 207, 2187-94).

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой агонист OX40 (CD134). В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой антитело к OX40. В одном варианте осуществления антитело к OX40 представляет собой анти-OX-40. В другом варианте осуществления антитело к OX40 представляет собой MEDI6469.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой агонист GITR. В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой антитело к GITR. В одном варианте осуществления антитело к GITR представляет собой TRX518.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой агонист CD137. В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой антитело к CD137. В одном варианте осуществления антитело к CD137 представляет собой урелумаб. В другом варианте осуществления антитело к CD137 представляет собой PF-05082566.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой агонист CD40. В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой антитело к CD40. В одном варианте осуществления антитело к CD40 представляет собой CF-870893.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой рекомбинантный человеческий интерлейкин-15 (rhIL-15).

В одном варианте осуществления ингибитор контрольных точек представляет собой ингибитор IDO. В одном варианте осуществления ингибитор IDO представляет собой INCB024360. В другом варианте осуществления ингибитор IDO представляет собой индоксимод.

В некоторых вариантах осуществления виды комбинированной терапии, представленные в данном документе, включают два или более ингибиторов контрольных точек, описанных в данном документе (в том числе ингибиторов контрольных точек одного и того же или отличного класса). Более того, виды комбинированной терапии, описанные в данном документе, могут применяться в комбинации с одним или более вторыми активными средствами, описанными в данном документе, если это необходимо для лечения заболеваний, описанных в данном документе, и предусмотрено в области техники.

В некоторых вариантах осуществления соединение 1, соединение 2 или соединение 3 может применяться в комбинации с одной или более иммунными клетками, экспрессирующими один или более рецепторов химерных антигенов (CAR) на их поверхности (например, модифицированный иммунный элемент). Как правило, CAR содержат внеклеточный домен из первого белка, например антигенсвязывающего белка), трансмембранного домена и внутриклеточного сигнального домена. В некоторых вариантах осуществления, как только внеклеточный домен связывается с белком-мишенью, таким как ассоциированный с опухолью антиген (TAA) или опухолеспецифический антиген (TSA), сигнал генерируется посредством внутриклеточного сигнального домена, который активирует иммунную клетку, например для нацеливания и уничтожения клетки, экспрессирующей целевой белок

Внеклеточные домены.

Внеклеточные домены CAR связываются с представляющим интерес антигеном. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR включает рецептор или часть рецептора, который связывается с указанным антигеном. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит, или представляет собой, антитело или его антигенсвязывающую часть. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит, или представляет собой, одноцепочечный домен Fv (scFv). Одноцепочечный домен Fv может содержать, например, V_L, связанный с V_H посредством гибкого линкера, где V_L и V_H являются антителами, которые связывают указанный антиген.

В некоторых вариантах осуществления указанный антиген, распознаваемый внеклеточным доменом полипептида, описанного в данном документе, представляет собой опухолеассоциированный антиген (TAA) или опухолеспецифический антиген (TSA). В различных конкретных вариантах осуществления, ассоциированный с опухолью антиген или опухолеспецифический антиген представляет собой, без ограничения, Her2, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), альфа-фетопротейн (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), раковый антиген-125 (CA-125), CA19-9, кальретицин, MUC-1, антиген созревания В-клеток (BCMA), эпителиальный мембранный белок (EMA), эпителиальный опухолевый антиген (ETA), тирозиназа, меланома-24-ассоциированный антиген (MAGE), CD19, CD22, CD27, CD30, CD34, CD45, CD70, CD99, CD117, EGFRvIII (вариант III эпидермального фактора роста), мезотелин, PAP (простатическая кислая фосфатаза), простейин, TARP (белок Т-клеточного рецептора альтернативной рамки считывания гамма), Trp-p8, STEAPI (шеститрансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 1), хромогранин, цитокератин, десмин, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), белок жидкости при острой кистозной болезни (GCDFP-15), антиген FIMB-45, белок мелан-А (антиген меланомы, распознаваемый Т-лимфоцитами, MART-1), мио-D1, мышечно-специфичный актин (MSA), нейрофиламент, нейрон-специфическая енолаза (NSE), плацентарная щелочная фосфатаза, синантофиз, тиреоглобулин, фактор транскрипции щитовидной железы-1, димерная форма изофермента типа M2 пируват-киназы (опухоль M2-PK), аномальный gas-белок или аномальный белок p53. В некоторых других вариантах осуществления TAA или TSA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляют собой интегрин $\alpha v \beta 3$ (CD61), галактин или Ral-B.

В некоторых вариантах осуществления TAA или TSA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляют собой раково-тестикулярный антиген (CT), например, BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ES0-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXBI, SPA17, SSX, SYCP1 или TPTE.

В некоторых других вариантах осуществления TAA или TSA, распознаваемые внеклеточным доменом CAR, представляют собой углевод или ганглиозид, например, fuc-GM1, GM2 (онкофетальный антиген-имунногенный-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2), GM3, GD3, и тому подобное.

В некоторых других вариантах осуществления TAA или TSA, распознаваемый как внеклеточный домен CAR, представляет собой альфа-актинин-4, Bage-1, BCR-ABL, слитый белок Bcr-Ab1, бета-катенин, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29YBCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, слитый белок dek-can, EBNA, EF2, антигены вируса Эпштейна-Барра, слитый белок ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2 и 3, neo-PAP, миозин класса I, OS-9, слитый белок pml-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, тризофосфатизомераза, Gage 3,4,5,6,7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, gp100 (Pmel17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15(58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, HRas, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, антигены E6 и E7 вируса папилломы человека (HPV), TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-катенин, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, CT7, теломераза, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68KP1, C0-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-

175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB\70K, NY-C0-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90, TAAL6, TAG72, TLP или TPS.

В различных конкретных вариантах осуществления ассоциированный с опухолью антиген или опухолеспецифический антиген представляет собой опухолевые антигены, связанные с ОМЛ, как описано в S. Anguille et al, *Leukemia* (2012), 26, 2186-2196.

Другие связанные с опухолью и опухолеспецифические антигены известны в данной области техники.

Из уровня техники известны рецепторы, антитела и scFv, которые связываются с TSA и TAA, пригодными для конструирования рецепторов химерных антигенов, а также нуклеотидные последовательности, которые кодируют их.

В некоторых конкретных вариантах осуществления антиген, распознаваемый внеклеточным доменом химерного антигенного рецептора, представляет собой антиген, который обычно не считается TSA или TAA, но который тем не менее ассоциируется с опухолевыми клетками или повреждением, вызванным опухолью. В некоторых вариантах осуществления, например, антиген представляет собой, например, фактор роста, цитокин или интерлейкин, например, фактор роста, цитокин, или интерлейкин, связанный с ангиогенезом или васкулогенезом. Такие факторы роста, цитокины или интерлейкины могут включать, например, фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF) или интерлейкин-8 (IL-8). Опухоли могут также создавать гипоксическую среду локальной по отношению к данной опухоли. Таким образом, в других конкретных вариантах осуществления антиген представляет собой фактор, связанный с гипоксией, например, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α или HIF-3 β . Опухоли могут также вызывать локализованное повреждение нормальной ткани, вызывая высвобождение молекул, известных как молекулы патоген-ассоциированного молекулярного паттерна (DAMP; также известные как алармины). Таким образом, в некоторых других конкретных вариантах осуществления антиген представляет собой DAMP, например, белки теплового шока, бокс 1 связанных с хроматином белков с высокой подвижностью (HMGB 1), S100A8 (MRP8, калгранулин А), S100A9 (MRP14, калгранулин В), сывороточный амилоид А (SAA) или может быть дезоксирибонуклеиновой кислотой, аденозинтрифосфатом, мочевой кислотой или сульфатом гепарина.

Трансмембранный домен.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR соединяется с трансмембранным доменом полипептида с помощью линкерной, спейсерной или петлевой полипептидной последовательности, например, последовательности из CD28 или последовательности из CTLA4. Трансмембранный домен может быть получен или быть производным из трансмембранного домена любого трансмембранного белка и может включать весь такой трансмембранный домен или его часть. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен может быть получен или быть производным из, например, CD8, CD16, рецептора цитокинов и рецептора интерлейкина или рецептора фактора роста или тому подобного.

Внутриклеточные сигнальные домены.

В конкретных вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR представляет собой или содержит внутриклеточный домен или мотив белка, который экспрессируется на поверхности Т-клеток и инициирует активацию и/или пролиферацию указанных Т-клеток. Такой домен или мотив способен передавать первичный антигенсвязывающий сигнал, который необходим для активации Т-лимфоцитов в ответ на связывание антигена с внеклеточной частью CAR. Обычно этот домен или мотив содержит или представляет собой ITAM (мотив активации на основе тирозина иммунорецептора). Полипептиды, содержащие ITAM, подходящие для CAR, включают, например, цепь дзета CD3 (CD3 ζ или ее содержащие ITAM части. В конкретном варианте осуществления внутриклеточный домен является внутриклеточным сигнальным доменом CD3 ζ . В других конкретных вариантах осуществления внутриклеточный домен представляет собой цепь рецептора лимфоцитов, комплексный белок TCR/CD3, субъединицу рецептора γ или субъединицу рецептора IL-2. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит один или более костимулирующих доменов или мотивов, например, как часть внутриклеточного домена полипептида. Один или более костимулирующих доменов или мотивов могут представлять собой или могут содержать одну или более из костимулирующей последовательности полипептида CD27, костимулирующей последовательности полипептида CD28, костимулирующей последовательности полипептида OX40 (CD134), костимулирующей последовательности полипептида 4-1BB (CD137) или костимулирующей индуцибельной полипептидной последовательности Т-клеток (ICOS) или другого костимулирующего домена или мотива или любой их комбинации.

CAR могут также содержать мотив выживания Т-клеток. Мотив выживаемости Т-клеток может быть любой полипептидной последовательностью или мотивом, который облегчает выживаемость Т-лимфоцитов после стимуляции антигеном. В некоторых вариантах осуществления мотив выживания Т-клеток представляет собой или получен из CD3, CD28, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-7 (IL-7R), внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-12, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-15, внутриклеточного сигнального домена рецептора IL-21 или внутриклеточного сигнального домена рецептора трансформирующего фактора роста β (TGF β).

Модифицированными иммунными клетками, экспрессирующими CAR, могут быть, например, Т-лимфоциты (Т-клетки, например, CD4+ Т-клетки или CD8+ Т-клетки), цитотоксические лимфоциты (CTL) или естественные клетки-киллеры (NK). Т-лимфоциты, применяемые в композициях и способах, представленных в данном документе, могут быть нативными Т-лимфоцитами или МНС-ограниченными Т-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты представляют собой инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL). В некоторых вариантах осуществления Т-лимфоциты были выделены из биопсии опухоли или были размножены из Т-лимфоцитов, выделенных из биопсии опухоли. В некоторых других вариантах осуществления Т-клетки были выделены из или размножены из Т-лимфоцитов, выделенных из периферической крови, пуповинной крови или лимфы. Иммунные клетки, подлежащие применению для генерации модифицированных иммунных клеток, экспрессирующих CAR, могут быть выделены с применением общепринятых, обычных способов, например, сбора крови с последующим аферезом и, необязательно, антителопосредованного выделения или сортировки клеток.

Модифицированные иммунные клетки предпочтительно являются аутологичными индивидууму, которому необходимо вводить модифицированные иммунные клетки. В некоторых других вариантах осуществления модифицированные иммунные клетки предпочтительно являются аллогенными индивидууму, которому необходимо вводить модифицированные иммунные клетки. Когда аллогенные Т-лимфоциты или NK-клетки применяют для получения модифицированных Т-лимфоцитов, предпочтительно выбирают Т-лимфоциты или NK-клетки, что уменьшает вероятность появления реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD) у индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления вирус-специфические Т-лимфоциты выбраны для получения модифицированных Т-лимфоцитов; ожидается, что такие лимфоциты будут иметь значительно уменьшенную нативную способность связываться с и, таким образом, активироваться любыми антигенами-реципиентами. В некоторых вариантах осуществления отторжение, опосредованное реципиентом, аллогенных Т-лимфоцитов может быть уменьшено путем совместного введения хозяину одного или более иммуносупрессивных агентов, например циклоспорина, такролимуса, сиролимуса, циклофосамида или тому подобного.

Т-лимфоциты, например немодифицированные Т-лимфоциты или Т-лимфоциты, экспрессирующие CD3 и CD28, или содержащие полипептид, содержащий сигнальный домен CD3 ζ и костимулирующий домен CD28, могут быть размножены с применением антител к CD3 и CD28, например антител, прикрепленных к гранулам; см., например, патенты США №№ 5948893; 6534055; 6352694; 6692964; 6887466; 6905681.

Модифицированные иммунные клетки, например модифицированные Т-лимфоциты, могут необязательно содержать "ген самоубийства" или "предохранительный выключатель", что позволяет вызвать гибель по существу всех модифицированных клеток иммунной системы, когда это необходимо. Например, модифицированные Т-лимфоциты в некоторых вариантах осуществления могут содержать ген HSV-тимидинкиназы (HSV-ТК), который вызывает гибель модифицированных Т-лимфоцитов при контакте с ганцикловиром. В другом варианте осуществления модифицированные Т-лимфоциты содержат индуцибельную каспазу, например, индуцибельную каспазу 9 (icaspase9), например, слитый белок между каспазой 9 и человеческим FK506-связывающим белком, что позволяет димеризоваться с применением специфической фармацевтической малой молекулы. См Straathof et al., Blood 105(11):4247-4254 (2005).

В определенных вариантах осуществления соединения 1, соединение 2 или соединение 3, предложенное в данном документе, вводят пациентам с различными типами или стадиями множественной миеломы в комбинации с Т-клетками, модифицированными химерным рецептором антигена (CAR). В некоторых вариантах осуществления Т-клетками CAR в комбинации с мишенью антигеном созревания В-клеток (BCMA), а в более конкретных вариантах осуществления Т-клетками CAR bb2121 или bb21217. В некоторых вариантах осуществления CAR-модифицированная Т-клетка представляет собой JCARN125.

G. Фармацевтические композиции

Фармацевтические композиции, предлагаемые в данном документе, содержат терапевтически эффективное количество одного или нескольких соединений, предлагаемых в данном документе, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Указанные соединения могут быть составлены в подходящие лекарственные формы, такие как растворы, суспензии, таблетки, диспергируемые таблетки, пилюли, капсулы, порошки, препараты с замедленным высвобождением или эликсиры, для перорального введения, или в стерильных растворах, или суспензиях для офтальмологического или парентерального введения, а также трансдермальный пластырь и ингаляторы в виде сухого порошка. Как правило, соединения, описанные выше, составлены в фармацевтические композиции с использованием методов и методик, хорошо известных в данной области техники (см, например, Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 7-е изд. 1999).

В данных композициях эффективные концентрации одного или более соединений или их фармацевтически приемлемых солей смешивают с подходящим фармацевтическим носителем или наполнителем. В конкретных вариантах осуществления концентрации соединений в композициях являются эффективными для доставки количества, которое при введении лечит, предотвращает или облегчает один или несколько симптомов и/или прогрессирование множественной миеломы.

Как правило, композиции составлены для однократного введения дозы. Для приготовления компо-

зиции массовую навеску соединения растворяют, суспендируют, диспергируют или иным образом смешивают в выбранном наполнителе с такой эффективной концентрацией, что патологическое состояние облегчается или улучшается. Фармацевтические носители или наполнители, подходящие для введения соединений, представленных в данном документе, включают любые такие носители, известные специалистам в данной области техники, подходящие для конкретного способа введения.

Кроме того, соединения могут быть составлены в виде единственного фармацевтически активного ингредиента в композиции или могут быть объединены с другими активными ингредиентами. Липосомальные суспензии, в том числе липосомы, нацеленные на ткани, такие как липосомы, нацеленные на опухоль, также могут быть пригодны в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники. Например, липосомные лекарственные формы могут быть получены, как известно в данной области техники. Вкратце, липосомы, такие как многослойные везикулы (MLV), могут быть образованы путем высушивания яичного фосфатидилхолина и фосфатидилсерина головного мозга (молярное соотношение 7:3) на внутренней стороне колбы. Добавляют раствор соединения, предложенного в данном документе в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ФСБ), лишенном двухвалентных катионов, и колбу перемешивают до тех пор, пока липидная пленка не диспергируется. Полученные везикулы промывают для удаления неинкапсулированного соединения, осаждают центрифугированием и затем ресуспендируют в ФСБ.

Активное соединение включено в фармацевтически приемлемый наполнитель в количестве, достаточном для оказания терапевтически полезного эффекта в отсутствие нежелательных побочных эффектов для пациента, подвергающегося лечению. Терапевтически эффективная концентрация может быть определена эмпирически путем исследования соединений в *in vitro* и *in vivo* системах, описанных в данном документе, и затем экстраполирована на основании этого для дозировки для людей.

Концентрация активного соединения в фармацевтической композиции будет зависеть от скоростей абсорбции, распределения в тканях, инактивации, метаболизма и экскреции активного соединения, физико-химических характеристик данного соединения, графика дозирования и количества вводимого вещества, а также других факторов, известных специалистам в данной области техники. Например, количество, которое доставляется, является достаточным для ослабления одного или более симптомов рака, включающего солидные опухоли и опухоли крови.

Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, внутрикожного, подкожного или местного применения, могут включать любой из следующих компонентов: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучее масло, полиэтиленгликоль, глицерин, пропиленгликоль, диметилацетамид или другой синтетический растворитель; противомикробные средства, такие как бензиловый спирт и метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); буферы, такие как ацетаты, цитраты и фосфаты; и средства для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральные препараты могут быть заключены в ампулы, шприц-ручки, одноразовые шприцы, или одноразовые или многоразовые флаконы из стекла, пластика или другого подходящего материала.

В случаях когда соединения проявляют недостаточную растворимость, могут быть использованы способы для солюбилизующих соединений. Такие способы известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими: применение соразтворителей, таких как диметилсульфоксид (ДМСО), применение поверхностно-активных веществ, таких как TWEEN®, или растворение в водном растворе гидрокарбоната натрия.

При смешивании или добавлении соединения(й) полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию или тому подобное. Лекарственная форма полученной смеси зависит от ряда факторов, включая предполагаемый способ введения и растворимость соединения в выбранном носителе или наполнителе. Эффективная концентрация достаточна для уменьшения симптомов заболевания, нарушения или патологии, и может быть определена эмпирически.

Фармацевтические композиции предназначены для введения людям и животным в виде лекарственных форм единичных доз, таких как таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, стерильные парентеральные растворы или суспензии, и растворы или суспензии для полости рта, а также эмульсии масло-вода, содержащих подходящие количества соединений или их фармацевтически приемлемых солей. Фармацевтически терапевтически активные соединения и их соли составляют и вводят в виде единичных лекарственных форм или лекарственных форм многократных доз. Единичные лекарственные формы, применяемые в данном документе, относятся к физически дискретным единицам, подходящим для людей и животных, и упаковываются индивидуально, как известно в данной области техники. Каждая единичная доза содержит predetermined количество терапевтически активного соединения, достаточного для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем, наполнителем или разбавителем. Примеры единичных лекарственных форм включают ампулы и шприцы и индивидуально упакованные таблетки или капсулы. Единичные лекарственные формы можно вводить в виде частей или их кратных величин. Лекарственная форма многократной дозы представляет собой множество идентичных единичных лекарственных форм, упакованных в один кон-

тейнер, которые должны вводиться отдельными единичными лекарственными формами. Примеры лекарственных форм с множеством доз включают флаконы, бутылки таблеток или капсул или бутылки пинт или галлонов. Следовательно, лекарственная форма многократной дозы представляет собой множество единичных доз, которые не разделены в упаковке.

Можно изготовить лекарственные формы или композиции, содержащие активный ингредиент в диапазоне от 0,005 до 100%, где остальную часть составляет нетоксичный носитель. Для перорального введения фармацевтически приемлемую нетоксичную композицию получают путем внесения любого из обычно применяемых наполнителей, таких как, например, фармацевтические классы маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, талька, производных целлюлозы, натрий-кросс-кармеллозы, глюкозы, сахара-за, карбоната магния или сахарин натрия. Такие композиции включают растворы, суспензии, таблетки, капсулы, порошки и составы с замедленным высвобождением, такие как, но не ограничиваясь ими, имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки, и биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как коллаген, этилен винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, полиортоэфир, полимолочная кислота и другие. Способы получения таких композиций очевидны специалистам в данной области техники.

Активные соединения или фармацевтически приемлемые соли могут быть получены с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, такими как лекарственные формы для высвобождения со временем или препараты с покрытием.

Композиции могут содержать другие активные соединения для получения желаемых комбинаций свойств. Соединения, предлагаемые в данном описании, или их фармацевтически приемлемые соли, как описано в данном документе, также могут быть преимущественно введены в терапевтических или профилактических целях вместе с другим фармакологическим средством, которое известно в общем уровне техники как полезное для лечения одного или более заболеваний или медицинских состояний, упомянутых выше в данном документе, таких как болезни, связанные с окислительным стрессом. Следует понимать, что такая комбинированная терапия представляет собой дополнительный аспект композиций и способов лечения, представленных в данном документе.

Н. Оценка активности и свойств данных соединений

Стандартные физиологические, фармакологические и биохимические процедуры доступны для исследования соединений для идентификации тех, которые обладают желаемыми свойствами, в том числе активностью против пролиферации множественной миеломы и адекватным профилем безопасности.

Такие анализы включают, например, биохимические анализы, такие как анализы связывания, анализы радиоактивных включений, а также различные анализы на основе клеток.

Производные изоиндолинона и их терапевтическое применение были описаны, например, в патенте США № 8518972. Неожиданно соединение 1, соединение 2 и соединение 3 демонстрируют неожиданные и полезные свойства, как показано в разделе примеры. Данные полезные свойства включают значительно увеличенную активность против множественной миеломы, повышение уровней апоптоза и более сильный и эффективный ответ в комбинации с дексаметазоном, и удивительно улучшенный профиль безопасности, как показано по снижению функциональной активности на адренергических $\alpha 1$ и дофаминовых D2 рецепторах (in vitro, а также in vivo), улучшение селективности гибели клеток (как показано по снижению гибели клеток не миеломы) и уменьшение ингибирования CYP3A4.

Понятно, что вышеприведенное подробное описание и сопроводительные примеры являются всего лишь иллюстративными, и их не следует воспринимать как ограничение объема объекта изобретения. Различные изменения и модификации описанных вариантов осуществления будут очевидны специалистам в данной области техники. Такие изменения и модификации, включая, без ограничения, относящиеся к химическим структурам, заместителям, производным, промежуточным соединениям, синтезу, составу и/или способам применения, приведенным в данном документе, можно осуществлять, не отступая от его сущности и объема. Патенты США и публикации, упоминаемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки.

6. Примеры

Некоторые варианты осуществления данного изобретения проиллюстрированы следующими неограничивающими примерами.

Сокращения:

AcN/ACN - ацетонитрил;

AIBN - азобисизобутиронитрил;

Woc - трет-бутоксикарбонил;

Woc₂O - ди-трет-бутилдикарбонат;

tBuOK - трет-бутоксид калия;

ДИПЭА - диизопропилэтиламин;

ДМФА - N,N'-диметилформамид;

ДМСО - диметилсульфоксид;

EtOAc - этилацетат;

ИПС - изопропанол или 2-пропанол;

MeOH - метанол;

MM - множественная миелома;

NBS - N-бромсукцинимид;

ЯМР - ядерный магнитный резонанс;

МКПК - моноклеарные клетки периферической крови человека;

i-PrOAc - изопропилацетат;

TBDMS - трет-бутилдиметилсилил;

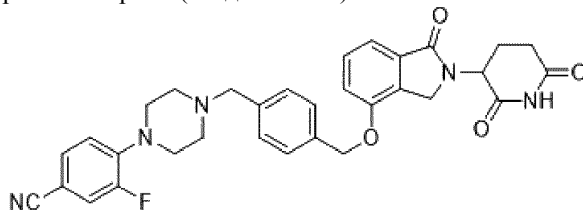
TBDMSCl - трет-бутилдиметилсилилхлорид;

ТГФ - тетрагидрофуран;

ТСХ - тонкослойная хроматография;

TMSCl - триметилсилилхлорид.

Пример 1. Синтез 4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила (соединение 1).



2-Амино-5-метокси-5-оксопентановая кислота.

К суспензии 2-аминоглутаровой кислоты (250 г, 1,70 моль) в сухом метаноле (2,5 л) в атмосфере азота добавляли триметилсилилхлорид (277 г, 2,55 моль) в течение 30 мин. Полученный прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре (20°C) в течение 30 мин. ¹H ЯМР показал, что исходный материал был израсходован полностью. Реакционную смесь использовали на следующей стадии без дополнительной отмывки. ¹H ЯМР: 400 МГц CD₃OD δ: 4,17-4,15 (м, 1H), 3,71 (с, 3H), 2,70-2,60 (м, 2H), 2,33-2,25 (м, 2H).

2-((трет-Бутоксикарбонил)амино)-5-метокси-5-оксопентановая кислота.

К полученному раствору добавляли триэтиламин (275 г, 2,72 моль) и ди-трет-бутилдикарбонат (447,35 г, 2,05 моль). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 ч. Раствор упаривали досуха, затем добавляли воду (2,5 л) для растворения остатка. Полученный водный раствор промывали этилацетатом (200 мл), затем подкисляли до pH=3 с помощью HCl (1 Н) и экстрагировали этилацетатом (1 л×3). Органические слои промывали солевым раствором (800 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и упаривали с получением 2-(трет-бутоксикарбониламино)-5-метокси-5-оксопентановой кислоты (250 г, выход 56%, две стадии) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР: 400 МГц CD₃OD δ: 4,18-4,11 (м, 1H), 3,69 (с, 3H), 2,48-2,43 (м, 2H), 2,21-2,15 (м, 1H), 1,95-1,91 (м, 1H), 1,46 (с, 9H).

Метил 5-амино-4-(трет-бутоксикарбониламино)-5-оксо-пентаноат.

К раствору 2-(трет-бутоксикарбониламино)-5-метокси-5-оксопентановой кислоты (200 г, 765 ммоль) в 1,4-диоксане (1,5 л) добавляли ди-трет-бутил дикарбонат (267 г, 1,22 ммоль) и пиридин (121 г, 1,53 моль). После того, как реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин, к смеси добавляли карбонат аммония (182 г, 2,30 моль) и перемешивали в течение еще 16 ч при 25°C. Органический растворитель удаляли на ротаторном испарителе, остаток подкисляли HCl (6 М) до pH=3, а затем экстрагировали этилацетатом (800 мл×3). Объединенную органическую фазу промывали солевым раствором (800 мл), сушили над сульфатом натрия и фильтровали. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении с получением метил 5-амино-4-(трет-бутоксикарбониламино)-5-оксопентаноата (180 г, выход 90%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР: 400 МГц CDCl₃ δ: 6,51 (с, 1H), 5,94 (с, 1H), 5,43 (с, 1H), 4,21 (с, 1H), 3,63 (с, 3H), 2,59-2,40 (м, 2H), 2,15-2,11 (м, 1H), 1,94-1,90 (м, 1H), 1,42 (с, 9H).

Метил 4,5-диамино-5-оксо-пентаноат гидрохлорид.

Смесь метил 5-амино-4-(трет-бутоксикарбониламино)-5-оксопентаноата (180 г, 692 ммоль) и HCl/этилацетат (300 мл, 4 М) перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Осажденное твердое вещество собирали вакуумной фильтрацией и промывали этилацетатом (500 мл) с получением метил 4,5-диамино-5-оксопентаноат гидрохлорида (130 г, выход 95%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР: 400 МГц CD₃OD δ: 4,00-3,96 (м, 1H), 3,70 (с, 3H), 2,59-2,52 (м, 2H), 2,22,13 (м, 2H).

Метил 3-гидрокси-2-метил-бензоат.

Четыре загрузки (200 г каждая) проводили параллельно. К раствору 3-гидрокси-2-метилбензойной кислоты (200 г, 1,31 моль) в метаноле (4,0 л) добавляли концентрированную серную кислоту (47,7 г, 486 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 17 ч и затем упаривали до 800 мл. Полученную смесь охлаждали до 20°C и медленно выливали в воду (400 мл) в течение 30 мин. Добавляли воду (1200 мл) при 20°C в течение 3 ч и полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. Осажденное твердое вещество собирали путем вакуумной фильтрации (объединенные четыре загрузки) и промывали три раза водой/метанолом (1000 мл, 9:1) или до тех пор, пока фильтрат не имел pH>3. Твер-

дое вещество сушили под вакуумом при 45°C с получением метил 3-гидрокси-2-метилбензоата (700 г, выход 80,4%) в виде серого твердого вещества. ¹H ЯМР: 400 МГц ДМСО-d₆ δ: 9,70 (с, 1H), 7,18 (т, J=6,8 Гц, 1H), 7,09 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,00 (т, J=6,8 Гц, 1H), 3,81 (с, 3H), 2,29 (с, 3H).

Метил 3-[трет-бутил(диметил)силил]окси-2-метил-бензоат.

Две загрузки (240 г каждая) проводили параллельно. К раствору метил 3-гидрокси-2-метилбензоата (240 г, 1,44 моль) в ДМФА (1,40 л) добавляли имидазол (246 г, 3,61 моль) и трет-бутилдиметилсилилхлорид (238 г, 1,58 моль) при 5°C. После добавления, смесь нагревали до 20°C и перемешивали в течение 6 ч. Добавляли изопропилацетат (1700 мл), а затем медленно добавляли воду (2000 мл) в то время как температуру поддерживали ниже 30°C. Полученную смесь перемешивали и органическую фазу отделяли. Объединенную органическую фазу (объединенные две загрузки) промывали водой (1700 мл×3) и упаривали до ~1500 мл (KF<0,05%). Продукт хранили в виде раствора в изопропилацетате, который использовали для следующей стадии без дополнительной очистки.

Метил 2-(бромметил)-3-[трет-бутил(диметил)силил]окси-бензоат.

Две загрузки (~375 г каждая) проводили параллельно. К раствору метил 3-[трет-бутил(диметил)силил]окси-2-метилбензоата (~375 г, 1,34 моль) в изопропилацетате добавляли N-бромсукцинимид (274 г, 1,54 моль) и азобисизобутиронитрил (4,40 г, 26,8 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 70°C в течение по меньшей мере 1 ч и перемешивали при 70°C в течение 4 ч. Реакционную смесь охлаждали до 20°C и выдерживали при 20°C в течение по меньшей мере 1 ч. Две загрузки твердого вещества (сукцинимид) удаляли фильтрованием и промывали изопропилацетатом (700 мл). Фильтрат промывали насыщенным раствором сульфита натрия (700 г) в воде (6000 мл), затем водой (1500 мл). Органический слой перегоняли под вакуумом при 45°C досуха с получением метил 2-(бромметил)-3-[трет-бутил(диметил)силил]оксибензоата (920 г, выход 95,5%) в виде темно-оранжевого масла. ¹H ЯМР: 400 МГц ДМСО-d₆ δ: 7,45 (д, J=6,8 Гц, 1H), 7,36 (т, J=8,0 Гц, 1H), 7,13 (т, J=7,2 Гц, 1H), 4,95 (с, 2H), 1,02 (с, 9H), 0,29 (с, 6H).

Метил 5-амино-4-[4-[трет-бутил(диметил)силил]окси-1-оксо-изоиндолин-2-ил]-5-оксо-пентаноат.

К перемешиваемому раствору метил 4,5-диамино-5-оксопентаноат гидрохлорида (74,5 г, 379 ммоль) в ацетонитриле (2,50 л) добавляли метил 2-(бромметил)-3-[трет-бутил(диметил)силил]оксибензоат (125 г, 348 ммоль). К суспензии добавляли диизопропилэтиламин (89,9 г, 696 ммоль) через капельную воронку в течение 10 мин и затем смесь перемешивали при 60°C в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (1,0 л), последовательно промывали HCl (1 л, 1,0 л), гидрокарбонатом натрия (нас, 1,0 л) и соевым раствором (1,0 л). Органический слой упаривали с получением неочищенного метил 5-амино-4-[4-[трет-бутил(диметил)силил]окси-1-оксоизоиндолин-2-ил]-5-оксопентаноата (108 г, неочищенный продукт) в виде бледно-желтого твердого вещества. ЖХ-МС: m/z 407,3 [M+1]⁺.

Метил 5-амино-4-(4-гидрокси-1-оксо-изоиндолин-2-ил)-5-оксо-пентаноат.

К перемешиваемому холодному раствору метил 5-амино-4-[4-[трет-бутил(диметил)силил]окси-1-оксоизоиндолин-2-ил]-5-оксопентаноата (108 г, 266 ммоль) в N, N-диметилформамиде (350 мл) порциями добавляли карбонат калия (14,7 г, 106 ммоль) в воде (40 мл) в течение 5 мин. Полученную реакционную смесь перемешивали при 15°C в течение 15 ч. Реакционную смесь охлаждали на ледяной бане и медленно добавляли HCl (12 М, 15 мл) при 0-5°C. К смеси добавляли ацетонитрил (200 мл), и образовывался осадок. Суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин и фильтровали. Осадок на фильтре промывали этилацетатом (200 мл×5) с получением продукта (55 г). Фильтрат упаривали под высоким вакуумом с получением неочищенного продукта (100 г), который растворяли в дихлорметане (1,0 л) и оставляли стоять при 15°C в течение 16 ч. Образовывалось белое твердое вещество, которое фильтровали с получением 5 г продукта. Твердые вещества объединяли с получением метил 5-амино-4-(4-гидрокси-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата (60 г, выход 77%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР: 400 МГц ДМСО-d₆ δ: 7,58 (с, 1H), 7,31 (т, J=8,0 Гц, 1H), 7,197,14 (м, 2H), 7,01 (д, J=7,6 Гц, 1H), 4,75-4,71 (м, 1H), 4,50 (д, J=17,6 Гц, 1H), 4,32 (д, J=17,6 Гц, 1H), 3,51 (с, 3H), 2,29-2,18 (м, 3H), 2,09-1,99 (м, 1H).

Метил 5-амино-4-[4-[[4-(бромметил)фенил]метокси]-1-оксо-изоиндолин-2-ил]-5-оксо-пентаноат.

Две реакции (25 г, 85,5 ммоль) проводили параллельно. Смесь 1,4-бис(бромметил)бензола (67,7 г, 257 ммоль), карбоната калия (11,8 г, 85,5 ммоль) и метил 5-амино-4-(4-гидрокси-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата (25 г, 85,5 ммоль) в ацетонитриле (1 л) перемешивали при 60°C в течение 16 ч. Две загрузки объединяли и смесь охлаждали до 15°C и фильтровали. Фильтрат упаривали и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (элюирование 50% петролейного эфира в этилацетате до 100% этилацетата) с получением метил 5-амино-4-[4-[[4-(бромметил)фенил]метокси]-1-оксоизоиндолин-2-ил]-5-оксопентаноата (52 г, выход 63%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР: 400 МГц ДМСО-d₆ δ: 7,59 (с, 1H), 7,50-7,44 (м, 5H), 7,32-7,28 (м, 2H), 7,19 (с, 1H), 5,26 (с, 2H), 4,79-4,71 (м, 3H), 4,55 (д, J=17,6 Гц, 1H), 4,43 (д, J=17,6 Гц, 1H), 3,52 (с, 3H), 2,30-2,19 (м, 3H), 2,10-2,08 (м, 1H).

3-[4-[[4-(Бромметил)фенил]метокси]-1-оксо-изоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-дион.

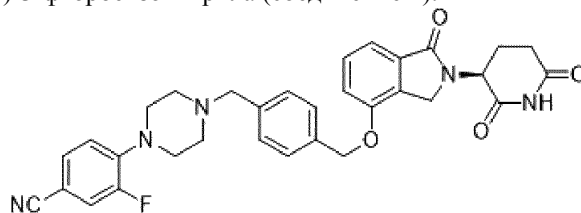
Две реакции (28,5 г, 60,0 ммоль) проводили параллельно, метил 5-амино-4-[4-[[4-(бромметил)фенил]метокси]-1-оксоизоиндолин-2-ил]-5-оксопентаноат (28,5 г, 60,0 ммоль) растворяли в

тетрагидрофуране (720 мл) и раствор охлаждали баней с сухим льдом/ацетоном до -70°C . При перемешивании к данному прозрачному раствору добавляли трет-бутоксид калия (7,4 г, 66,0 ммоль) одной порцией. Реакционная смесь приобрела бледно-желтый цвет и перемешивание продолжали в течение еще 2 ч при -70°C . Охлажденный раствор HCl (1 Н, 260 мл) быстро добавляли в реакционную смесь, поддерживая температуру на уровне -70°C . Смесь сразу же стала молочно-белой и баню сухого льда/ацетона удаляли. Смесь упаривали для удаления большей части тетрагидрофурана. После упаривания реакционной смеси осаждалось белое твердое вещество. Белую суспензию разбавляли водой (500 мл) и затем фильтровали. Осадок на фильтре промывали водой (500 мл) и сушили в вакуумной печи при 40°C в течение 12 ч, затем промывали этилацетатом (500 мл). Загрузки объединяли с получением 3[4[[4(бромметил)фенил]метокси]-1-оксоизоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (49,85 г, 93%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР: 400 МГц ДМСО- d_6 δ : 10,95 (с, 1H), 7,51-7,41 (м, 5H), 7,35-7,28 (м, 2H), 5,23 (с, 2H), 5,12-5,07 (м, 1H), 4,70 (с, 2H), 4,41 (д, $J=17,6$ Гц, 1H), 4,25 (д, $J=17,6$ Гц, 1H), 2,90-2,84 (м, 1H), 2,58-2,53 (м, 1H), 2,44-2,41 (м, 1H), 1,98-1,95 (м, 1H).

4-(4-(4-(((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил.

3-(4-((4-(Бромметил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-дион (5,0 г, 11,28 ммоль) добавляли в колбу с 3-фтор-4-(пиперазин-1-ил)бензонитрилом (2,315 г, 11,28 ммоль), диизопропилэтиламин (5,91 мл, 33,8 ммоль) и ацетонитрилом (100 мл). Реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 18 ч. Летучие органические вещества удаляли при пониженном давлении и очищали стандартными методами с получением 4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила. ^1H ЯМР (400 МГц ДМСО- d_6) δ 10,97 (с, 1H), 7,68 (дд, $J=1,96$, 13,45 Гц, 1H), 7,56 (дд, $J=1,77$, 8,38 Гц, 1H), 7,43-7,52 (м, 3H), 7,30-7,38 (м, 4H), 7,11 (т, $J=8,80$ Гц, 1H), 5,24 (с, 2H), 5,11 (дд, $J=5,14$, 13,33 Гц, 1H), 4,37-4,46 (м, 1H), 4,22-4,30 (м, 1H), 3,54 (с, 2H), 3,12-3,23 (м, 4H), 2,84-2,98 (м, 1H), 2,52-2,62 (м, 5H), 2,36-2,48 (м, 1H), 1,92-2,04 (м, 1H). МС (ESI) m/z 568,2 $[\text{M}+1]^+$. Анал. Рассч. для $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{FN}_5\text{O}_4$: C, 67,71; H, 5,33; N, 12,34. Эксп: C, 67,50; H, 5,44; N 12,34.

Пример 2. Синтез (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила (соединение 2).



трет-Бутил-(4S)-5-амино-4-(бензилоксикарбониламино)-5-оксо-пентаноат.

К раствору (2S)-2-(бензилоксикарбониламино)-5-трет-бутоксид-5-оксопентановой кислоты (150 г, 445 ммоль) в 1,4-диоксане (1,50 л) добавляли ди-трет-бутил дикарбонат (155 г, 711 ммоль), пиридин (70,3 г, 889 ммоль) и аммоний гидрокарбонат (105 г, 1,33 моль). Реакционную смесь перемешивали при 18°C в течение 16 ч и затем упаривали. Остаток растворяли в этилацетате (5,0 л) и воде (5,0 л), органический слой отделяли и промывали HCl (3,0 мл, 1Н), насыщенным раствором гидрокарбоната натрия (3,0 л), соевым раствором (3,0 л), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали с получением неочищенного трет-бутил (4S)-5-амино-4-(бензилоксикарбониламино)-5-оксопентаноата (450 г, неочищенный) в виде белого твердого вещества, которое использовали в следующей стадии без дополнительной очистки. ^1H ЯМР 400 МГц ДМСО- d_6 δ : 7,35-7,30 (м, 5H), 7,02 (с, 1H), 5,01 (д, $J=3,2$ Гц, 1H), 3,93-3,90 (м, 1H), 2,20 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 1,88-1,84 (м, 1H), 1,72-1,69 (м, 1H), 1,35 (с, 9H).

трет-Бутил-(4S)-4,5-диамино-5-оксо-пентаноат.

К раствору трет-бутил (4S)-5-амино-4-(бензилоксикарбониламино)-5-оксопентаноата (112 г, 333 моль) в метаноле (1,0 л) добавляли 10% палладий на угле (15 г) в атмосфере азота. Суспензию дегазировали под вакуумом и продували водородом несколько раз. Смесь перемешивали под атмосферой водорода (40 фунт/кв. дюйм, 2,75 бар) при 30°C в течение 16 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат упаривали с получением неочищенного трет-бутил-(4S)-4,5-диамино-5-оксопентаноата в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР 400 МГц ДМСО- d_6 δ : 7,30 (с, 1H), 6,95 (с, 1H), 3,10-3,07 (м, 1H), 2,27-2,23 (м, 2H), 1,69-1,78 (м, 1H), 1,59-1,55 (м, 1H), 1,38 (с, 9H).

Метил-3-гидрокси-2-метил-бензоат.

Четыре загрузки (200 г каждая) проводили параллельно. К раствору 3-гидрокси-2-метилбензойной кислоты (200 г, 1,31 моль) в метаноле (4,0 л) добавляли концентрированную серную кислоту (47,7 г, 486 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 17 ч. Реакционную смесь упаривали до 800 мл. Полученную смесь охлаждали до 20°C и медленно выливали в воду (400 мл) в течение 30 мин. Добавляли воду (1200 мл) при 20°C в течение 3 ч и полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. Осажденное твердое вещество собирали путем вакуумной фильтрации (объединенные четыре загрузки) и

промывали три раза водой/метанолом (1000 мл, 9:1), или до тех пор, пока фильтрат не имел $\text{pH} > 3$. Твердое вещество сушили под вакуумом при 45°C с получением метил-3-гидрокси-2-метилбензоата (700 г, выход 80,4%) в виде серого твердого вещества. ^1H ЯМР: 400 МГц DMSO-d_6 δ : 9,70 (с, 1H), 7,18 (т, $J=6,8$ Гц, 1H), 7,09 (т, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,00 (т, $J=6,8$ Гц, 1H), 3,81 (с, 3H), 2,29 (с, 3H).

Метил-3-[трет-бутил(диметил)силил]окси-2-метил-бензоат.

Две загрузки (240 г каждая) проводили параллельно. К раствору метил-3-гидрокси-2-метилбензоата (240 г, 1,44 моль) в N,N-диметилформамиде (1,40 л) добавляли имидазол (246 г, 3,61 моль) и трет-бутилдиметилсилилхлорид (238 г, 1,58 моль) при 5°C . После добавления, смесь нагревали до 20°C и перемешивали в течение 6 ч. Добавляли изопропилацетат (1700 мл), а затем медленно добавляли воду (2000 мл) в то время как температуру поддерживали ниже 30°C . Полученную смесь перемешивали и органическую фазу отделяли. Объединенные органические фазы (объединенные две загрузки) промывали водой (1700 мл $\times$ 3) и упаривали до ~ 1500 мл ($\text{KF} < 0,05\%$). Продукт хранили в виде раствора в изопропилацетате, который использовали для следующей стадии без дополнительной очистки.

Метил-2-(бромметил)-3-[трет-бутил(диметил)силил]окси-бензоат.

Две загрузки (~ 375 г каждая) проводили параллельно. К раствору метил-3-[трет-бутил(диметил)силил]окси-2-метилбензоата (~ 375 г, 1,34 моль) в изопропилацетате добавляли N-бромсукцинимид (274 г, 1,54 моль) и азобисобутиронитрил (4,40 г, 26,8 ммоль). Реакционную смесь нагревали до 70°C в течение по меньшей мере 1 ч и перемешивали при 70°C в течение 4 ч. Реакционную смесь охлаждали до 20°C и выдерживали при 20°C в течение по меньшей мере 1 ч. Две загрузки твердого вещества (сукцинимид) удаляли фильтрованием и промывали изопропилацетатом (700 мл). Фильтрат промывали насыщенным раствором сульфата натрия (700 г) в воде (6000 мл), затем водой (1500 мл). Органический слой перегоняли под вакуумом при 45°C досуха с получением метил 2-(бромметил)-3-[трет-бутил(диметил)силил]оксибензоата (920 г, выход 95,5%) в виде темно-оранжевого масла. ^1H ЯМР: 400 МГц DMSO-d_6 δ : 7,45 (д, $J=6,8$ Гц, 1H), 7,36 (т, $J=8,0$ Гц, 1H), 7,13 (т, $J=7,2$ Гц, 1H), 4,95 (с, 2H), 1,02 (с, 9H), 0,29 (с, 6H).

трет-Бутил-(4S)-5-амино-4-[4-[трет-бутил(диметил)силил]окси-1-оксо-изоиндолин-2-ил]-5-оксо-пентаноат.

К раствору трет-бутил-(4S)-4,5-диамино-5-оксопентаноата (130 г, 643 ммоль) в ацетонитриле (4,0 л) добавляли метил 2-(бромметил)-3-[трет-бутил(диметил)силил]оксибензоат (210 г, 584 ммоль) и диизопропилэтиламин (113 г, 877 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 16 ч. Реакционную смесь упаривали для удаления большей части ацетонитрила, остаток растворяли в метил-трет-бутиловом эфире (2,0 л) и воде (1,5 л), органический слой промывали насыщенным раствором дигидрофосфата калия (1,0 л $\times$ 2), солевым раствором (1,0 л), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали с получением неочищенного трет-бутил-(4S)-5-амино-4-[4-[трет-бутил(диметил)силил]окси-1-оксоизоиндолин-2-ил]-5-оксопентаноата (524 г), который использовали в следующей стадии без дополнительной очистки.

трет-Бутил-(4S)-5-амино-4-(4-гидрокси-1-оксо-изоиндолин-2-ил)-5-оксо-пентаноат. К раствору трет-бутил (4S)-5-амино-4-[4-[трет-бутил(диметил)силил]окси-1-оксоизоиндолин-2-ил]-5-оксопентаноата (275 г, 613 ммоль) в метаноле (2,0 л) добавляли тетрабутиламмоний фторид тригидрат (38,7 г, 123 ммоль). Смесь перемешивали при 18°C в течение 16 ч. Реакционную смесь упаривали для удаления большей части метанола, остаток растворяли в дихлорметане/воде (3 л/ 2 л), органический слой отделяли и промывали солевым раствором (1,0 л), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и упаривали с получением неочищенного продукта, который очищали на колонке с силикагелем с получением продукта (260 г). Продукт добавляли в ацетонитрил (750 мл) и смесь перемешивали при 60°C в течение 2 ч, охлаждали до 18°C и перемешивали в течение еще 2 ч. Твердое вещество фильтровали и осадок сушили с получением трет-бутил (4S)-5-амино-4-(4-гидрокси-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата (248 г, выход 60,5%) в виде серого твердого вещества. ^1H ЯМР 400 МГц DMSO-d_6 δ : 10,00 (с, 1H), 7,54 (с, 1H), 7,29 (т, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,14 (д, $J=4,8$ Гц, 2H), 4,72-4,68 (м, 1H), 4,49-4,28 (м, 2H), 2,17-1,97 (м, 4H), 1,31 (с, 9H).

4-(4-(Хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил.

1,4бис(Хлорметил)бензол (51,2 г, 292 ммоль) помещали в колбу с ацетонитрилом (195 мл) и N,N-диметилформамидом (195 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды до полного растворения твердых веществ. Затем добавляли диизопропиламин (51,1 мл, 292 ммоль) вместе с 3-фтор-4-(пиперазин-1-ил)бензонитрилом (20 г, 97 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 1 ч. Ацетонитрил удаляли при пониженном давлении. Оставшуюся смесь отмывали с помощью этилацетата (1,0 л), воды (700 мл) и солевого раствора (300 мл). Органический слой отделяли и водный слой дважды экстрагировали этилацетатом. Летучие органические вещества удаляли при пониженном давлении. Твердое вещество растворяли в минимальном количестве дихлорметана и очищали на колонке с силикагелем (0-100% этилацетата в гексане в течение 3 л). Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и летучие органические вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток растворяли в минимальном количестве дихлорметана и очищали второй раз на колонке с силикагелем (изократический 10% этилацетат в гексане в течение 800 мл, затем 20-80% этилацетата в гексане в течение 4 л).

Фракции, содержащие желаемый продукт, объединяли и летучие органические вещества удаляли при пониженном давлении с получением 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила (22,7 г, 66,0 ммоль, выход 67,7%) в виде сероватого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц CDCl_3) δ м.д. 7,33-7,39 (м, 5H) 7,29 (д, $J=1,96$ Гц, 1H) 7,25 (д, $J=1,96$ Гц, 1H) 6,91 (т, $J=8,56$ Гц, 1H) 4,60 (с, 2H) 3,58 (с, 2H) 3,19-3,27 (м, 4H) 2,58-2,66 (м, 4H). МС (ESI) m/z 344,2 $[\text{M}+1]^+$.

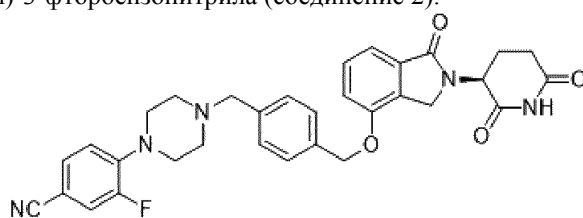
(S)-трет-Бутил-5-амино-4-(4-((4-(4-циано-2-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноат.

(S)-трет-Бутил-5-амино-4-(4-гидрокси-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноат (22,05 г, 65,9 ммоль) добавляли в колбу с 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрилом (22,67 г, 65,9 ммоль), карбонатом калия (18,23 г, 132 ммоль) и N, N-диметилформамидом (330 мл). Реакционную смесь нагревали при 45°C в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (50 мл) фильтровали. Фильтрат отмывали с помощью этилацетата (900 мл), воды (600 мл) и солевого раствора (200 мл). Органический слой отделяли и промывали водой (600 мл). Органический слой высушивали над сульфатом натрия и летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Остаток обрабатывали 20% этилацетатом в гексане и летучие вещества удаляли при пониженном давлении с получением (S)-трет-бутил-5-амино-4-(4-((4-(4-циано-2-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата (44,02 г, 68,6 ммоль, выход 104%) в виде сероватого твердого вещества. Выход был чуть больше количественного, так как оставалось некоторое количество ДМФА. ^1H ЯМР (400 МГц CDCl_3) δ м.д. 7,43-7,49 (м, 2H) 7,40 (с, 4H) 7,36 (дд, $J=8,38$, 1,28 Гц, 1H) 7,29 (д, $J=1,96$ Гц, 1H) 7,26 (д, $J=1,83$ Гц, 1H) 7,11 (дд, $J=7,64$, 1,16 Гц, 1H) 6,92 (т, $J=8,50$ Гц, 1H) 6,23 (уш с, 1H) 5,24-5,32 (м, 1H) 5,15 (с, 2H) 4,86-4,94 (м, 1H) 4,38-4,55 (м, 2H) 3,61 (с, 2H) 3,18-3,32 (м, 4H) 2,58-2,70 (м, 4H) 2,09-2,47 (м, 4H) 1,43 (с, 8H). МС (ESI) m/z 642,4 $[\text{M}+1]^+$.

(S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил.

(S)-трет-Бутил-5-амино-4-(4-((4-(4-циано-2-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноат (12,1 г, 18,86 ммоль) добавляли во флакон с ацетонитрилом (189 мл) и бензолсульфоновой кислотой (3,96 г, 24,51 ммоль). Реакционную смесь помещали под вакуум и продували азотом. Данную процедуру повторяли еще раз и полученную смесь затем нагревали до 85°C в течение ночи в атмосфере азота. Теплую реакционную смесь выливали непосредственно в 2 делительных воронки, содержащих дихлорметан (1000 мл) и этилацетат (300 мл). К данной смеси добавляли насыщенный раствор гидрокарбоната натрия (900 мл), воду (100 мл) и солевой раствор (450 мл). Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном (800 мл) и этилацетатом (200 мл). Объединенные органические слои сушили над безводным сульфатом магния и упаривали. Очищали с помощью стандартных методов с получением указанного соединения. ^1H ЯМР (400 МГц DMCO-d_6) δ м.д. 10,96 (с, 1H) 7,68 (дд, $J=13,45$, 1,83 Гц, 1H) 7,56 (дд, $J=8,44$, 1,83 Гц, 1H) 7,43-7,52 (м, 3H) 7,29-7,39 (м, 4H) 7,11 (т, $J=8,80$ Гц, 1H) 5,24 (с, 2H) 5,11 (дд, $J=13,20$, 5,14 Гц, 1H) 4,22-4,46 (м, 2H) 3,54 (с, 2H) 3,12-3,22 (м, 4H) 2,85-2,97 (м, 1H) 2,53-2,62 (м, 2H) 2,38-2,48 (м, 2H) 1,93-2,03 (м, 1H). МС (ESI) m/z 568,2 $[\text{M}+1]^+$.

Пример 3. Синтез (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила (соединение 2).



4-(4-(4-(Хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил гидрохлорид.

К раствору 3-фтор-4-(пиперазин-1-ил)бензонитрила (100 г) в толуоле (1400 мл) добавляли уксусную кислоту (28 мл) при 25°C и реакционную смесь выдерживали в течение 30 мин. 4-(Хлорметил)бензальдегид (79 г) добавляли при 25°C и смесь выдерживали в течение 2 ч. Добавляли триацетоксиборгидрид натрия (52 г каждый раз) при 25°C каждые 30 мин три раза. Смесь перемешивали при 25°C в течение около 10 ч. Добавляли воду (600 мл) в течение 1 ч, поддерживая температуру смеси ниже 30°C. Большую часть нижнего слоя отделяли. Смесь фильтровали и нижний слой отделяли. Органический слой промывали водой (200 мл). К органическому слою добавляли ИПС (75 мл), 5-6 Н HCl в ИПС (8 мл), а затем суспензию хлопьев 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил гидрохлорида (2 г) в толуоле (20 мл). К смеси добавляли 5-6 Н HCl в ИПС (115 мл) при 25°C в течение 2 ч. Смесь выдерживали в течение около 10 ч, затем фильтровали с получением неочищенного твердого вещества. Твердое вещество промывали толуолом (400 мл) и сушили в вакуумной печи с получением 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил гидрохлорида (152 г, выход 82%) в виде бледно-желтого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц DMCO-d_6) δ м.д. 11,82 (с, 1H), 7,50-7,79 (м, 6H), 7,18-7,24 (м, 1H),

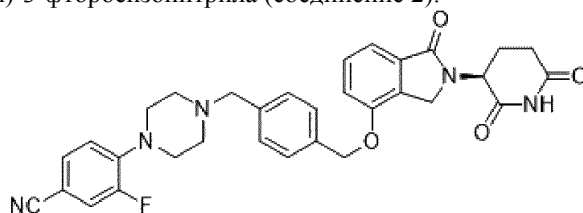
4,80 (с, 2H), 4,38-4,39 (м, 2H), 3,44-3,70 (м, 2H), 3,14-3,44 (м, 6H).

трет-Бутил (S)-5-амино-4-(4-(((4-(4-циано-2-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноат тартрат.

К смеси 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил гидрохлорида (100 г) и трет-бутил (S)-5-амино-4-(4-гидрокси-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата (97 г) в ДМФА (600 мл) добавляли карбонат калия (K_2CO_3) (75 г) при 35°C и реакцию смесь выдерживали в течение 24 ч. В смесь добавляли триэтиламин (11 мл) и смесь перемешивали при 45°C в течение около 2 ч. В смесь добавляли EtOAc (1 л) и водный раствор карбоната калия (5%, 500 мл). Органический слой промывали водным раствором хлорида натрия (5%, 500 мл). В смесь добавляли Ecosorb C948 E-pak (30 г) и смесь выдерживали в течение 2 ч. Смесь фильтровали. К данному раствору добавляли раствор L-винной кислоты (47 г) в метаноле (850 мл) при 45°C и смесь выдерживали в течение 2 ч. Смесь охлаждали до 25°C. Твердые вещества фильтровали с получением тартрата трет-бутил-(S)-5-амино-4-(4-(((4-(4-циано-2-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата. (145 г, выход 70%). 1H ЯМР (300 МГц ДМСО- d_6) δ м.д. 1,31 (с, 9H), 1,87-2,27 (м, 4H), 2,55 (уш с, 4H), 3,18 (уш с, 4H), 4,29 (с, 2H), 4,36-4,62 (м, 2H), 4,71 (дд, $J=4,2$, 10,0 Гц, 1H), 5,22 (с, 2H), 7,10 (т, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,18 (с, 1H), 7,29 (д, $J=7,7$ Гц, 2H), 7,33-7,40 (м, 2H), 7,40-7,51 (м, 3H), 7,51-7,63 (м, 2H).

(S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил. Раствор тартрата (S)-5-амино-4-(4-(((4-(4-циано-2-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата (100 г) в 2-метилтетрагидрофуране (1 л) промывали водным раствором карбоната калия (10%, 85 мл). Нижний слой отделяли. Растворитель 2-метилтетрагидрофуран был заменен на ацетонитрил, с получением раствора. К данному раствору добавляли бензолсульфовую кислоту (60 г) в ацетонитриле (200 мл) при 70°C в течение 2 ч. Очищали с помощью стандартных методов с получением указанного соединения. 1H ЯМР (400 МГц ДМСО- d_6) δ м.д. 10,96 (с, 1H) 7,68 (дд, $J=13,45$, 1,83 Гц, 1H) 7,56 (дд, $J=8,44$, 1,83 Гц, 1H) 7,43-7,52 (м, 3H) 7,29-7,39 (м, 4H) 7,11 (т, $J=8,80$ Гц, 1H) 5,24 (с, 2H) 5,11 (дд, $J=13,20$, 5,14 Гц, 1H) 4,22-4,46 (м, 2H) 3,54 (с, 2H) 3,12-3,22 (м, 4H) 2,85-2,97 (м, 1H) 2,53-2,62 (м, 2H) 2,38-2,48 (м, 2H) 1,93-2,03 (м, 1H). МС (ESI) m/z 568,2 $[M+1]^+$.

Пример 4. Синтез (S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрила (соединение 2).



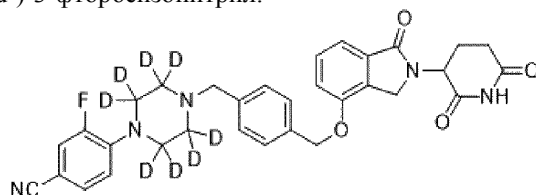
4-(4-(4-(Хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил гидрохлорид. К раствору 3-фтор-4-(пиперазин-1-ил)бензонитрила (100 г) в толуоле (1400 мл) добавляли уксусную кислоту (28 мл) при 25°C и смесь выдерживали в течение 30 мин. 4-(Хлорметил)бензальдегид (79 г) добавляли при 25°C и смесь выдерживали в течение 2 ч. Добавляли триацетоксиборгидрид натрия (52 г каждый раз) при 25°C каждые 30 мин три раза. Смесь перемешивали при 25°C в течение около 10 ч. Добавляли воду (600 мл) в течение 1 ч, поддерживая температуру смеси ниже 30°C. Большую часть нижнего слоя отделяли. Смесь фильтровали и нижний слой отделяли. Органический слой промывали водой (200 мл). К органическому слою добавляли ИПС (75 мл), 5-6 Н HCl в ИПС (8 мл), а затем суспензию хлопьев 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил гидрохлорида (2 г) в толуоле (20 мл). К смеси добавляли 5-6 Н HCl в ИПС (115 мл) при 25°C в течение 2 ч. Смесь выдерживали в течение около 10 ч, затем фильтровали с получением неочищенного твердого вещества. Твердое вещество промывали толуолом (400 мл) и сушили в вакуумной печи с получением 4-(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил гидрохлорида (152 г, выход 82%) в виде белого вещества. 1H ЯМР (300 МГц ДМСО- d_6) δ м.д. 11,82 (с, 1H), 7,50-7,79 (м, 6H), 7,18-7,24 (м, 1H), 4,80 (с, 2H), 4,384,39 (м, 2H), 3,44-3,70 (м, 2H), 3,14-3,44 (м, 6H).

трет-Бутил-(S)-5-амино-4-(4-(((4-(4-циано-2-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноат. К смеси 4(4-(4-(хлорметил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил гидрохлорида (100 г) и трет-бутил-(S)-5-амино-4-(4-гидрокси-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата (88 г) в диметилсульфоксиде (ДМСО) (700 мл) добавляли карбонат калия (K_2CO_3) (73 г) при 35°C и смесь выдерживали в течение 24 ч. В смесь добавляли EtOAc (1,2 л) и воду (1,1 л). Органический слой промывали водным раствором хлорида натрия (5%, 1 л). В смесь добавляли н-гептан (200 мл). Смесь промывали водным раствором уксусной кислоты (3%, 1 л), водой (1 л), водным раствором K_2CO_3 (20%, 10 л) и водой (10 л). Растворитель отгоняли до около 1,2 л. Смесь перекристаллизовали из н-гептана с получением трет-бутил-(S)-5-амино-4-(4-(((4-(4-циано-2-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата (143 г, выход 85%). 1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ м.д. 7,43-7,49 (м, 2H) 7,40 (с, 4H) 7,36 (дд, $J=8,38$, 1,28 Гц, 1H) 7,29 (д, $J=1,96$ Гц, 1H) 7,26 (д,

$J=1,83$ Гц, 1H) 7,11 (дд, $J=7,64$, 1,16 Гц, 1H) 6,92 (т, $J=8,50$ Гц, 1H) 6,23 (уш с, 1H) 5,24-5,32 (м, 1H) 5,15 (с, 2H) 4,86-4,94 (м, 1H) 4,38-4,55 (м, 2H) 3,61 (с, 2H) 3,18-3,32 (м, 4H) 2,58-2,70 (м, 4H) 2,09-2,47 (м, 4H) 1,43 (с, 8H).

(S)-4-(4-(4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-3-фторбензонитрил. Раствор трет-бутил (S)-5-амино-4-(4-(((4-(4-циано-2-фторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)-5-оксопентаноата (100 г) в ацетонитриле (1 л) выдерживали при 70°C. К данному раствору добавляли бензолсульфовую кислоту (74 г) в ацетонитриле (200 мл) при 70°C в течение 2 ч. Очищали с помощью стандартных методов с получением указанного соединения. ^1H ЯМР (400 МГц, DMCO-d_6) δ м.д. 10,96 (с, 1H) 7,68 (дд, $J=13,45$, 1,83 Гц, 1H) 7,56 (дд, $J=8,44$, 1,83 Гц, 1H) 7,43-7,52 (м, 3 H) 7,29-7,39 (м, 4H) 7,11 (т, $J=8,80$ Гц, 1H) 5,24 (с, 2H) 5,11 (дд, $J=13,20$, 5,14 Гц, 1H) 4,22-4,46 (м, 2H) 3,54 (с, 2H) 3,12-3,22 (м, 4H) 2,85-2,97 (м, 1H) 2,53-2,62 (м, 2H) 2,38-2,48 (м, 2H) 1,93-2,03 (м, 1H). МС (ESI) m/z 568,2 $[\text{M}+1]^+$.

Пример 5. 4-(4-(4-(((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-2,2,3,3,5,5,6,6- d^8)-3-фторбензонитрил.



3-Фтор-4-(пиперазин-1-ил-2,2,3,3,5,5,6,6- d^8)бензонитрил.

Раствор 3,4-дифторбензонитрила (278 мг, 2,00 ммоль) и пиперазина-2,2,3,3,5,5,6,6- d^8 (942 мг, 10,0 ммоль) в сухом ДМФА (6 мл) перемешивали при 110°C в течение 16 ч. Смесь охлаждали до температуры окружающей среды и медленно добавляли в H_2O (60 мл) при перемешивании. Смесь экстрагировали EtOAc (3х) и органические слои объединяли, промывали насыщенным раствором NaCl (3х), сушили над MgSO_4 , фильтровали и упаривали. Остаточный бесцветный сироп сушили под вакуумом с получением неочищенного продукта в виде белого твердого вещества (599 мг). Твердое вещество растворяли в EtOAc и раствор промывали H_2O (3 раза), насыщенным водным раствором NaCl (3 раза) и сушили над MgSO_4 . Высушенный раствор фильтровали, упаривали, и остаток сушили под вакуумом с получением указанного соединения (447 мг, 105%) в виде белого твердого вещества. ЖХ-МС (ESI) m/z 214,2 $[\text{M}+H]^+$.

4-(4-(4-(((2-(2,6-Диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-4-ил)окси)метил)бензил)пиперазин-1-ил)-2,2,3,3,5,5,6,6- d^8)-3-фторбензонитрил.

К раствору 3-[4-[[4-(бромметил)фенил]метокси]-1-оксоизоиндолин-2-ил]пиперидин-2,6-диона (736 мг, 1,66 ммоль) и 3-фтор-4-(пиперазин-1-ил-2,2,3,3,5,5,6,6- d^8)бензонитрила (425 мг, 1,99 ммоль) в сухом ДМФА (5,0 мл) добавляли ДИПЭА (0,870 мл, 4,99 ммоль) и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 4 ч. Смесь фильтровали (0,45 мкм нейлоновая мембрана), и раствор очищали с помощью стандартных методов с получением указанного продукта (532 мг, 56%). ЖХ-МС (ESI) m/z 576,4 $[\text{M}+H]^+$.

Пример 6. Антипролиферативные и проапоптотические эффекты на множественную миелому.

Материалы клеточной культуры.

Клеточные линии множественной миеломы человека были приобретены у поставщиков и культивированы при 37°C 5% CO_2 в культуральной среде, как указано в табл. 1. Клеточные линии, устойчивые к леналидомиду и помалидомиду были получены способами, как правило, описанными ранее (Lopez-Girona et al Leukemia 2012; 26(11):2335). Все клеточные линии поддерживали в log-фазе и контролировали плотность клеток и жизнеспособность с помощью вытеснения трипанового синего с применением анализатора жизнеспособности клеток Vicell XR (Beckman Coulter, Брея, Калифорния).

Таблица 1. Тестируемые клеточные линии множественной миеломы

Клеточная линия ММ	Поставщик/Источник	Номер по Каталогу	Условия культивирова ния клеток
NCI-H929	ATCC (Манассас, Виргиния)	CRL-9068	RPMI-1640, 10% ФБС

NCI-H929-1051	разработанная самостоятельно, сделанная устойчивой к леналидомиду	НД	RPMI-1640, 10% ФБС
OPM2	DSMZ (Брауншвейг, Германия)	ACC-50	RPMI-1640, 10% ФБС
OPM2-P10	разработанная самостоятельно, сделанная устойчивой к 10 мкМ помалидомида	НД	RPMI-1640, 10% ФБС

Получение растворов тестового изделия.

Соединения высевали в черные 384-луночные планшеты (Corning Inc.) до конечного объема ДМСО 0,1%, при условии, что максимальный объем составлял 50 мкл. 10-точечный дозозависимый ответ, начиная с 10 мкМ с разбавлением 1:3, наносили в двух повторностях путем акустического дозирования с применением платформы EDC ATS-100.В альтернативном варианте были использованы 10-точечный дозозависимый ответ, начиная с 10 мкМ с разбавлением 1:10, или начиная с 100 нМ с разбавлением 1:3.

Анализ пролиферации клеток.

Влияние соединений на пролиферацию/жизнеспособность гематологических клеточных линий (табл. 1) оценивали через 120 ч инкубации с применением CTG (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Гематологические клеточные линии были распределены на планшетах с соединением с помощью дозатора реагентов Multidrop Combi (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс) при концентрации $0,1 \times 10^6$ клеток/мл в общем объеме 50 мкл. В 120 ч 25 мкл CTG на лунку дозировали с помощью дозатора реагентов Combi Multidrop и измеряли высвобождение аденозинтрифосфата (АТФ) жизнеспособными клетками в относительных люминесцентных единицах спустя 30 мин с применением платформы Envision.

Анализ апоптоза клеток.

Способность соединений к индуцированию апоптоза оценивали в отобранных клеточных линиях ММ в указанные моменты времени и при указанных концентрациях соединения. В качестве маркера апоптоза, измеряли уровень активности каспазы 3 в клетках ММ с использованием визуализации живых клеток. Для визуализации суспензии клеток, 96-луночные планшеты покрывали фибронектином, чтобы клетки прилипали и лежали плоско на нижней части планшета. Клетки добавляли в 96-луночные планшеты с использованием Дозатора Реагентов Multidrop Combi (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс) в ночь перед добавлением соединения. Соединения были нанесены сверху клеток в соответствующую лунку 96-луночных планшетов с использованием Цифрового Дозатора Hewlett-Packard D300 (Tecan, Меннедорф, Швейцария). Клеточные линии ММ обрабатывали соединением и через 6 часов среда была изменена для воспроизведения метаболизма соединения *in vivo*, что приводило к примерно 20-кратному снижению концентрации соединения. Клетки выращивали в присутствии ферментного субстрата Nuc-View 488 Каспазы 3 (Biotium) и инкубировали в системе для анализа IncuCyte ZOOM Live-Cell (Essen Bioscience, Анн-Арбор, Мичиган), которую размещали в стандартном инкубаторе. Расщепление ферментного субстрата каспазы 3 и слияние клеток в каждой лунке было обнаружено с помощью визуализации при 10х в Системе IncuCyte ZOOM каждые 4-6 ч в течение 5 дней. Каждую лунку/условие проводили повторно на том же планшете, и каждое условие было средним из 4 10х изображений, полученных в каждый момент времени.

Результаты.

Демонстрация антипролиферативной активности соединения 1 и соединения 2 в клеточных линиях ММ. Клеточные линии ММ, выбранные для данного исследования были линиями, чувствительными и устойчивыми к леналидомиду и/или помалидомиду (табл. 1), двум агентам, используемым в клинике для лечения пациентов с миеломой. Пролиферацию оценивали с применением анализа CellTiter-Glo®. Результаты для культур, инкубируемых с данными соединениями, нормализовали к результатам для контрольных культур для каждой клеточной линии. IC₅₀ для ингибирования клеточного роста соединениями определяли для каждой клеточной линии с применением программного обеспечения ActivityBase. Соединение 1 и соединение 2 активно ингибировало пролиферацию клеток в четырех клеточных линиях, как определено путем количественной оценки уровней АТФ, представленных в средах через 120 ч. Значения антипролиферативной IC₅₀ для соединения 1 и соединения 2 находились в диапазоне от 0,07 нМ до 19 нМ (табл. 2). Соединение 1 и соединение 2 показали очень сильную антипролиферативную активность для множественной миеломы даже на клеточных линиях, которые были устойчивыми к леналидомиду и/или помалидомиду.

Таблица 2. Ингибирование клеточного роста соединением 1 и соединением 2 в клеточной линии MM в суспензионной культуре

Соед. №	NCI-H929 120 h IC ₅₀	NCI-H929.1051 120 h IC ₅₀	OPM-2 120 h IC ₅₀	OPM-2.P10 120 h IC ₅₀
1	<0,5 нМ	2,5 нМ	<0,5 нМ	19 нМ
2	0,07 нМ	1,0 нМ	0,07 нМ	4,3 нМ

Апоптоз, индуцированный соединением 1, в клеточных линиях множественной миеломы.

Исследовали эффекты соединений в отношении апоптоза в клеточных линиях MM. Для того чтобы определить способность соединений индуцировать апоптоз и кинетически охарактеризовать начало данного процесса, индукцию каспазы 3 измеряли относительно времени в клетках H9291051, устойчивых к леналидомиду (фиг. 1). Клетки H929-1051 инкубировали с соединениями в концентрациях 1 нМ, 10 нМ, 100 нМ и 1000 нМ и оценивали апоптоз относительно времени. Результаты показали, что для клеток H929-1051 все концентрации соединения 1 индуцировали апоптоз, начиная с около 48 ч и достигали почти максимальной индукции на ~72 ч инкубации. Далее рассчитывали площадь под кривой (AUC) для каждой концентрации и использовали для построения кривых концентрация-ответ для каждого соединения. Это дало количественные данные о способности соединения 1 индуцировать апоптоз в H929-1051. Неожиданно, индукция апоптоза соединением 1 была значительно выше, чем индукция апоптоза, наблюдаемая для соединения, описанного ранее 3-(4-((4-((2,4-дифторфенил)пиперазин-1-ил)метил)бензил)окси)-1-оксоизоиндолин-2-ил)пиперидин-2,6-диона (пример 5.285 в патенте США № 8518972) (соединение А). Как показано на фиг. 1В, индукция апоптоза (по данным измерения общей AUC) соединением 1 была увеличена почти на 30% (126%) по сравнению с индукцией апоптоза соединением А.

Комбинация с дексаметазоном.

Активность помалидомида с соединением 2 в отдельности или в комбинации с дексаметазоном оценивали в панели клеточных линий MM. Фиг. 2 представляет собой репрезентативный набор кривых доза-ответ в клеточной линии H929-1051, устойчивой к леналидомиду, демонстрирующий, что соединение 2 в качестве отдельного агента в 10 раз более активно, чем комбинация помалидомида-дексаметазона, и почти столь же эффективно (фиг. 2, панель А). Неожиданно, когда соединение 2 скомбинировано с дексаметазоном, оно не только создает более сильный ответ, но также показывает намного более высокую эффективность (фиг. 2, панель В); достигается почти полная гибель клеток. В табл. 3 приведена активность (IC₅₀) отдельного агента и исследований комбинации с дексаметазоном, выполненных в клеточной линии H929-1051. Перечислены IC₅₀ отдельного агента помалидомида, соединения 2 и комбинации 1, 0,1 или 0,01 мкМ дексаметазона (Декс) в клетках, устойчивых к леналидомиду (H929-1051). Каждая IC₅₀ представляет собой среднее из по меньшей мере 3 независимых экспериментов. Пролиферацию наблюдали на день 5 с помощью Cell Titer-Glo. Таким образом, соединение 2 в комбинации с дексаметазоном было значительно более активно, чем помалидомид в сочетании с дексаметазоном, и данная повышенная активность была достигнута при концентрациях дексаметазона, в 10-100 раз более низких. Вместе эти данные указывают на потенциал повышенной безопасности комбинированного лечения соединением 2 и дексаметазоном, позволяя использование более низких доз дексаметазона при сохранении эффективности и синергии.

Таблица 3. Сравнение антипролиферативных значений IC₅₀ соединения 2 и помалидомида в виде отдельных агентов или в комбинации с дексаметазоном в клеточной линии H929-1051, устойчивой к леналидомиду

	IC ₅₀ Одиночного агента мкМ	1 μМ Комб Декс IC ₅₀	0,1 μМ Комб Декс IC ₅₀	0,01 μМ Комб Декс IC ₅₀
Помалидомид	>10 мкМ	0,01884 мкМ	0,11824 мкМ	3,837 мкМ
Соединение 2	0,00098 мкМ	0,000018 мкМ	0,0000429 мкМ	0,00041 мкМ

Оценка безопасности in vitro оцениванием антипролиферативной селективности относительно здоровых клеток.

С целью продемонстрировать, что соединение 2 как правило не является цитотоксическим, проводили обратный скрининг в отношении иммортализованной (но не онкогенной) клеточной линии THLE-2, полученной из гепатоцитов человека (Pfeifer et al, Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90(11):5123-7) и в отношении первичных, здоровых РВМС человека (фиг. 3). Соединение 2 имело малое антипролиферативное действие на клетки THLE-2 (IC₅₀>10 мкМ) или на нестимулированные первичные РВМС человека

($IC_{50} > 10$ мкМ) по сравнению с линиями клеток ММ, показанных выше.

Противоопухолевая активность соединения 2 в модели ксенотранспланта множественной миеломы, устойчивой к леналидомиду. Цель данного исследования заключалась в проверке противоопухолевой активности отдельного агента соединения 2 в модели ксенотранспланта H929-1051 с дозировкой один раз в сутки (QD) при 1, 3, 10 и 30 мг/кг. Наблюдалась значительная ($p < 0,0001$) противоопухолевая активность на всех уровнях дозировки с уменьшением объема опухоли на 75, 86, 84 и 85% при 1, 3, 10 и 30 мг/кг соответственно (фиг. 4).

Вывод: взятые вместе, эти данные показывают, что соединение 1 и соединение 2 показывают очень сильную активность против множественной миеломы и неожиданно показывают значительно повышенный уровень апоптоза по сравнению с ранее описанными соединениями соединением А и помалидомидом. Дополнительно соединение 2 в комбинации с дексаметазоном не только создает более сильный ответ, но эффективность также значительно улучшается. Кроме того, была показана селективная гибель клеток множественной миеломы по сравнению со здоровыми клетками.

Пример 7. Эффекты соединения 1/соединения 2 на рецепторы, которые не являются мишенью, и последствия.

Адренергические $\alpha 1$ и дофаминовые D2 рецепторы.

Способы.

Связывание и функциональные анализы для адренергических $\alpha 1$ и дофаминовых D2 рецепторов были выполнены Eurofins Cerep в соответствии с их способами.

Адренорецептор $\alpha 1$. Связывание при 10 μ М.

В анализе связывания оценивали аффинность тестируемого изделия для неселективных адренергических $\alpha 1$ рецепторов в коре головного мозга крыс. Мембранные гомогенаты коры головного мозга инкубировали в двух экземплярах в течение 60 мин при комнатной температуре с 0,25 нМ [3 H]празозина в отсутствие или в присутствии тестируемых изделий при 10 μ М. После периода инкубации образцы фильтровали через фильтры из стекловолокна, фильтры сушили и затем подсчитывали радиоактивность с использованием сцинтилляционного счетчика. Результаты выражали в виде среднего процента ингибирования связывания радиолигандного контроля.

IC_{50} связывания.

Для определения IC_{50} связывания для неселективного адренергического $\alpha 1$ рецептора различные концентрации тестируемого изделия инкубировали в двух экземплярах с 0,25 нМ [3 H]празозина. Соединение А тестировали при 0,01-30 μ М. Соединение В, S-энантиомер соединения А, тестировали при 0,0003-10 μ М. Соединение 1 и соединение 2, S-энантиомер соединения 1, анализировали при 0,03-100 μ М. Радиоактивность измеряли так, как описано выше. IC_{50} определяли как концентрацию, вызывающую полумаксимум ингибирования контроля селективного связывания.

Антагонистическая активность.

Антагонистические эффекты тестируемых соединений на адренергических рецепторах α_{1A} и α_{1B} измеряли с использованием клеток яичников китайского хомячка (CHO), трансфицированных рецептором человека. Антагонистическую активность определяли путем измерения эффекта соединения на мобилизацию кальция, индуцированную агонистом (адреналином), в анализе рецептора α_{1A} или уровней цАМФ в анализе рецептора α_{1B} . В данных экспериментах клетки CHO инкубировали в двух экземплярах при комнатной температуре с тестируемым изделием и адреналином при 3 нМ в анализах рецептора α_{1A} или 3000 нМ в анализе рецептора α_{1B} . Соединение А тестировали в анализе рецептора α_{1A} при 0,01-30 μ М. Соединение В тестировали в анализах рецепторов α_{1A} и α_{1B} при 0,0003-30 μ М. Соединение 1 и соединение 2 анализировали при от 0,03 до 30 μ М в анализе рецептора α_{1A} и от 0,03 до 100 μ М в анализе рецептора α_{1B} . В анализе рецептора α_{1A} измеряли цитозольные уровни кальция флуорометрическим методом с использованием флуоресцентного зонда Fluo4 Direct. Уровни внутриклеточного цАМФ в анализе адренергических рецепторов α_{1B} измеряли с помощью гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF). IC_{50} антагонизма определяли как концентрацию, вызывающую полумаксимум ингибирования контроля агонистического ответа.

Дофаминовый D2 рецептор. Связывание при 10 μ М.

В анализе связывания оценивали аффинность тестируемых изделий для дофаминового D2 рецептора в трансфицированных эмбриональных клетках почек человека (НЕК)-293. Для определения связывания в анализе рецептора D_{2S}, тестируемое изделие инкубировали с 0,3 нМ [3 H]метилспирона или 1 нМ [3 H]7-гидрокси-2-N,N-дипропиламинотетралина (7-OH-DPAT). [3 H]Метилспирон при 0,3 нМ также использовали в качестве контроля лиганда в анализе связывания D_{2L}. Клеточные мембранные гомогенаты коры головного мозга инкубировали в двух экземплярах в течение 60 мин при комнатной температуре с лигандом в отсутствие или в присутствии тестируемых изделий при 10 μ М. После периода инкубации образцы фильтровали через фильтры из стекловолокна, фильтры сушили и затем подсчитывали радиоактивность с использованием сцинтилляционного счетчика. Результаты выражали в виде среднего процента ингибирования связывания радиолигандного контроля.

IC_{50} связывания.

Для определения IC_{50} связывания в анализах рецепторов D2, НЕК-293 тестировали, как описано выше, но с различными концентрациями тестируемого изделия. Соединение А тестировали при 0,01-30 μM в радиолигандном анализе связывания D_{2S} . Соединение В тестировали при 0,0003-10 μM в обоих анализах связывания D_{2S} и D_{2L} соединение 1 анализировали при 0,03-100 μM в обоих анализах D_{2S} и D_{2L} в то время, как соединение 2 тестировали при 0,03-100 μM в анализе D_{2S} и 0,01-100 μM в анализах D_{2L} . IC_{50} определяли как концентрацию, вызывающую полумаксимум ингибирования контроля селективного связывания.

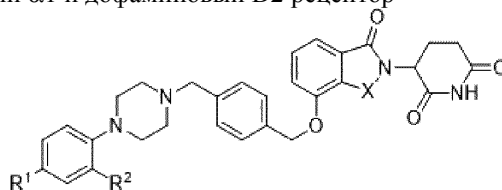
Агонистическая активность.

Агонизм тестируемых соединений на дофаминовый D_{2S} рецептор оценивали с использованием клеток НЕК-293 человека трансфицированных рецептором. Агонистическую активность определяли путем измерения эффекта соединения на модуляцию импеданса. В данных экспериментах клетки НЕК-293 инкубировали в двух экземплярах при 28°C с тестируемым изделием. Соединение А тестировали при 0,01-30 μM . Соединение В тестировали при 0,0003-10 μM , в то время как соединение 1 и соединение 2 анализировали при 0,01-10 μM . Дофамин (3 μM) использовали в качестве агониста контроля. Измерения импеданса наблюдали в течение 10 мин после добавления лиганда с использованием клеточной диэлектрической спектроскопии. EC_{50} определяли как концентрацию, вызывающую полумаксимум ответа по сравнению с контролем (дофамином) агонистического ответа.

Результаты.

Связывание при 10 мкМ на адренергических $\alpha 1$ и допаминовых D2 рецепторах оценивали для соединения 1, соединения 2, соединения А, соединения В и ряда соединений, приведенных в патенте США № 8518972 (табл. 4). В то время как ранее описанные соединения полностью ингибируют связывание лиганда на обоих рецепторах, неожиданно соединение 1 и соединение 2 показали значительно сниженную способность ингибировать связывание лиганда, показывая только 67/62% (адренергический $\alpha 1$ рецептор) и 55/52% (дофаминовый D_{2S}) ингибирования связывания лиганда соответственно. Поэтому был дополнительно проанализирован дифференцированный эффект соединения 1 и соединения 2 по сравнению с соединением А и соединением В на адренергический $\alpha 1$ и дофаминовый D2 рецепторы.

Таблица 4. Эффекты соединения А, соединения В, соединения 1 и соединения 2 и ранее описанных соединений на адренергический $\alpha 1$ и дофаминовый D2 рецептор



Соед. №	R ¹	R ²	X	Стерео	Адренергический α_1	Дофаминовый D _{2S}
					% Инг. (@10 мкМ)	% Инг. (@10 мкМ)
1	CN	F	CH ₂	рац	67	55
2	CN	F	CH ₂	S	62	52
A	F	F	CH ₂	рац	102	99
B	F	F	CH ₂	S	98	99
Пример. 5,229	H	H	CH ₂	рац	98,3	98,7
Пример. 5,273	F	H	CH ₂	рац	100,3	94,7
Пример. 5,289	F	H	CO	рац	97,9	92,4

Детальные эффекты соединения А, соединения В, соединения 1 и соединения 2 на α_1 адренорецептор приведены в табл. 5. Соединение А ингибирует связывание лиганда с адренорецептором α_1 на 102%. IC₅₀ связывания для соединения А с рецептором была 0,064 μ М. Соединение А оказалось сильным антагонистом адренорецептора α_{1A} , с IC₅₀ 0,014 μ М. Кроме того, соединение В ингибировало связывание лиганда с адренорецептором α_1 на 98-100% при 10 μ М и имело IC₅₀ связывания 0,024 μ М. Сильный антагонизм адренорецептора α_1 наблюдали для соединения В, со значениями IC₅₀ 0,0064 и 0,078 μ М на рецепторах α_{1A} и α_{1B} соответственно. Неожиданно, в отличие от этого, было показано, что соединение 1 и соединение 2 оба имеют слабую активность на адренорецепторе α_1 . Значения IC₅₀ антагонизма рецептора соединением 1 были 0,98 μ М и 6,9 μ М для α_{1A} и α_{1B} рецепторов соответственно. Сопоставимые результаты наблюдались для соединения 2.

Таблица 5. Эффекты соединения А, соединения В, соединения 1 и соединения 2 на α_1 адренорецептор

Соединение	α_1 (неселективное) % Ингибирования (10 μ М)	α_1 (неселективное) IC ₅₀ связывания	IC ₅₀ антагонизма (μ М)	
			α_{1A}	α_{1B}
		(μ М)		
Соединение А	102	0,064	0,014	НО
Соединение В	98, 100 ^a	0,024	0,0064	0,078
Соединение 1	67	3,9	0,98	6,9
Соединение 2	62	1,3 (оценочно)	0,58	2,4
^a Независимые эксперименты. НО, Не определено				

Дофаминовый D₂ рецептор.

Эффекты соединения А, соединения В, соединения 1 и соединения 2 на дофаминовый D₂ рецептор приведены в табл. 6. Соединение А ингибирует связывание лиганда с дофаминовым D_{2S} рецептором на 99%. IC₅₀ связывания для соединения А с D_{2S} рецептором была 0,15 μ М. Соединение А оказалось частичным агонистом дофаминового D_{2S} рецептора, с EC₅₀ 0,016 μ М. Кроме того, соединение В ингибировало D_{2S} рецептор на 99% при 10 μ М и имело IC₅₀ связывания 0,084 и 0,016-0,047 μ М на D_{2L} и D_{2S} рецепторах. Неожиданно, но в противоположность этому, было показано, что соединение 1 и соединение 2

обладают слабой активностью на дофаминовом D2 рецепторе с ингибированием при $10 \mu\text{M} \leq 55\%$ и значением IC_{50} связывания $\geq 2 \mu\text{M}$. Функциональный агонизм (EC_{50}) соединения В на дофаминовом D_{2S} рецепторе в трех независимых исследованиях был >10 , 2,7 и 1,9 μM . Хотя степень агонизма соединения В на D_{2S} рецептор была меньшей, чем наблюдаемая для соединения А, наблюдалась тенденция к большему агонизму соединения В по сравнению с соединением 1 и соединением 2. Взяты вместе, данные % ингибирования связывания при $10 \mu\text{M}$, IC_{50} связывания и IC_{50} агонизма продемонстрировали более сильную активность соединения А и соединения В на дофаминовый D2 рецептор по сравнению с соединением 1 и соединением 2. Данное наблюдение согласуется с данными о агонизма дофаминового D2 рецептора (т.е. снижение моторики желудка/опорожнения) у крыс соединением А, но не соединением 1 (как описано ниже).

Таблица 6. Эффекты соединения А, соединения В, соединения 1 и соединения 2 на дофаминовый D2 рецептор

Соединение	% Ингибирован ия (10 μM)		IC_{50} связывания (μM)		Агонизм D _{2S} EC_{50} (μM)
	D _{2L}	D _{2S}	D _{2L}	D _{2S}	
Соединение А	НО	99	НО	0,15	0,016
Соединение В	103	99, 99 ^a	0,084	0,016, 0,021, 0.047 ^a	>10 , 2,7, 1.9 ^a
Соединение 1	55	55	2,3	7,4	Отрицательны
					й
Соединение 2	НО	52	3 (оценочно)	2 (оценочно)	>10

^a Независимые эксперименты; НО, Не определено

7-дневные пробные исследования токсикологии на самцах крыс.

Способы.

Самцам крыс CD-IGS ($n=5$ /группа для токсикологической оценки; $n=4$ /группа для токсикокинетической оценки) вводили один раз в сутки перорально через зонд (10 мл/кг) наполнитель (0,5% ГПМЦ/0,25% Tween-80 в 50 мМ цитрата, pH 2,6-2,8) или тестируемое изделие (соединение А или соединение 1) при 100, 300 или 1000 мг/кг/сутки в течение 7 последовательных дней. Образцы крови для анализа токсикокинетики собирали на день 1 и 7. У всех крыс наблюдались клинические признаки токсичности при предварительной дозе, через около 1 ч после введения дозы в дни 1-7 и до аутопсии на день 8. Вес тела регистрировали при рандомизации, до дозирования в дни 1-7 и до аутопсии. Образцы для анализов гематологии и химии сыворотки собирали на день 8, через около 24 ч после последней дозы. Крыс умерщвляли на день 8 для аутопсии. Анатомическая оценка патологии состояла из общего наблюдения, массы органов и гистопатологического изучения отдельных тканей.

Результаты.

После ежедневного перорального введения соединения А в течение 7 последовательных дней, системная экспозиция (AUC_{0-1}) увеличивалась в зависимости от дозы от 100 до 1000 мг/кг. Экспозиция в день 7 была примерно в 3-7 раз больше, чем в день 1. AUC в день 7 были 441, 1230 и 1760 мкМч при 100, 300 и 1000 мг/кг соответственно. Клинические признаки токсичности (выгибание спины, пилоэрекция и снижение активности) и снижение массы тела наблюдались при ≥ 300 мг/кг. Не было замечено увеличения массы тела при 100 мг/кг. Аномальное содержание желудка (сухое, материалы пищи) в общем наблюдалось при ≥ 100 мг/кг без микроскопических коррелятов. Данное открытие предполагает уменьшенную моторику желудка/опорожнение и согласуется с агонистической активностью на дофаминовом D₂ рецепторе. Микроскопические находки, связанные с тестируемым изделием ограничивались минимальным мультифокальным некрозом миокарда и смешанной клеточной инфильтрацией в сердцах крыс при всех уровнях дозирования. Хотя точную причину данного поражения сердца еще предстоит определить, вывод согласуется с агонизмом дофаминового D₂ рецептора и/или антагонизмом адренергического $\alpha 1$ рецептора. Изменения данных рецепторов могут привести к вазодилатации, что приводит к снижению кровотока, гипотензии и рефлекторной тахикардии. Расположение поражений сердца (апекс, эндокардная поверхность желудочков) также согласуется с механизмом ишемии. Для соединения 1, экспозиция (AUC_{0-1}) также увеличивалась в зависимости от дозы от 100 до 1000 мг/кг и экспозиция в день 7 была примерно в 2-6 раз больше, чем в день 1. В день 7 AUC при 100, 300 и 1000 мг/кг были 143, 514 и 1220 мкМч соответ-

венно. Не было никаких клинических наблюдений, связанных с тестируемым изделием. Минимальные уменьшения прироста массы тела наблюдались при ≥ 300 мг/кг. Неожиданно, но в отличие от соединения А, не было обнаружено никакого влияния на желудок или сердце у крыс, которым вводили соединение 1, что согласуется с уменьшенной активностью на адренергических α_1 и дофаминовых D_2 рецепторах, наблюдаемой Eurofins Cerep, описанной выше.

Оценка соединения 2 и соединения В *in vitro* в качестве ингибитора ферментов цитохрома р450 человека. Целью было оценить потенциал соединения В и соединения 2 в качестве прямого или зависимого от времени ингибитора активности цитохрома р450 (СУР) в объединенных микросомах печени человека. В данном исследовании изучали ингибирование девяти ферментов цитохрома р450 человека, а именно СУР1А2, СУР2А6, СУР2В6, СУР2С8, СУР2С9, СУР2С19, СУР2Д6, СУР2Е1 и СУР3А4/5 (с использованием двух субстратов).

Способы.

Для исследования потенциала данных соединений действовать в качестве прямого ингибитора ферментов СУР, объединенные микросомы печени человека инкубировали с субстратами зондами в концентрациях, примерно равных их явной K_m , в отсутствие или в присутствии соединения В (от 0,03 до 30 мкМ) или соединения 2 (от 0,03 до 30 мкМ) и НАДФН (1 мМ). Кроме того, данные соединения оценивали по их способности выступать в качестве зависящих от времени ингибиторов при тех же концентрациях, указанных выше. При оценке ингибирования, зависящего от времени, данные соединения предварительно инкубировали с микросомами печени человека и НАДФН (1 мМ) в течение 30 мин перед добавлением субстрата зонда. В дополнении к соответствующему контролю носителя, известные прямые ингибиторы и зависящие от времени ингибиторы изоформ СУР были включены в качестве положительного контроля. После инкубации концентрации метаболитов субстрата зонда были количественно определены с использованием установленных ЖХ/МС/МС методов. Была выражена степень ингибирования как процент активности контроля.

Результаты.

Соединение В.

В экспериментальных условиях, используемых для рассмотрения прямого ингибирования, соединение В (вплоть до 30 мкМ) показало крайне малый ($\leq 30\%$) эффект ингибирования СУР1А2, СУР2А6, СУР2С8, СУР2Д6, СУР2Е1 и СУР3А4/5 (мидазолам). При 30 мкМ соединение В ингибировало активность СУР2В6, СУР2С9 и СУР2С19 на 59, 38 и 45% соответственно. Соединение В ингибировало СУР3А4/5 (тестостерон) со значением IC_{50} 2,92 мкМ. В условиях, используемых для тестирования ингибирования, зависящего от времени, соединение В (вплоть до 30 мкМ) показало крайне мало зависимого от времени ингибирования СУР1А2, СУР2А6, СУР2В6, СУР2С8, СУР2С9, СУР2С19, СУР2Д6 и СУР2Е1 после 30 мин преинкубирования с или без НАДФН. Соединение В ингибировало СУР3А4/5 зависимо от времени. Сдвинутое значение IC_{50} (с НАДФН) было 2,23 и 1,93 мкМ для мидазолама и тестостерона в качестве субстратов соответственно.

Соединение 2.

В экспериментальных условиях, используемых для рассмотрения прямого ингибирования, соединение 2 (вплоть до 30 мкМ) показало крайне малый ($\leq 30\%$) эффект ингибирования СУР1А2, СУР2А6, СУР2В6, СУР2С8, СУР2С9, СУР2Д6, СУР2Е1 и СУР3А4/5 (мидазолам). При 30 мкМ соединение 2 ингибировало активность СУР2С19 и СУР3А4/5 (тестостерон) на 41 и 46% соответственно. В условиях, используемых для тестирования ингибирования, зависящего от времени, соединение 2 (вплоть до 30 мкМ) показало крайне мало зависимого от времени ингибирования СУР1А2, СУР2А6, СУР2В6, СУР2С8, СУР2С9, СУР2С19, СУР2Д6, СУР2Е1 и СУР3А4/5 (мидазолам) после 30 мин преинкубирования с или без НАДФН. Соединение 2 (при 30 мкМ) ингибировало активность СУР3А4/5 (тестостерон) на 59% (с НАДФН) и 23% (без НАДФН), что указывает, что соединение 2 было слабым, зависящим от времени ингибитором СУР3А4/5.

Вывод.

В итоге соединение В (вплоть до 30 мкМ) показало крайне малый ($\leq 30\%$) эффект прямого ингибирования СУР1А2, СУР2А6, СУР2С8, СУР2Д6, СУР2Е1 и СУР3А4/5 (мидазолам). Соединение В ингибировало СУР3А4/5 (тестостерон) со значением IC_{50} 2,92 мкМ. При 30 мкМ соединение В ингибировало активность СУР2В6, СУР2С9 и СУР2С19 на 59, 38 и 45% соответственно. Соединение В (вплоть до 30 мкМ) не является зависимым от времени ингибитором СУР1А2, СУР2А6, СУР2В6, СУР2С8, СУР2С9, СУР2С19, СУР2Д6 и СУР2Е1, но является зависимым от времени ингибитором СУР3А4/5.

Неожиданно, но в отличие от этого соединение 2 (до 30 мкМ) имело крайне малый ($\leq 30\%$) эффект ингибирования на любом из испытанных ферментов СУР, и при 30 мкМ соединение 2 ингибировало активность СУР2С19 и СУР3А4/5 (тестостерон) только на 41 и 46% (т.е. $IC_{50} > 30$ мкМ) соответственно. Соединение 2 (до 30 мкМ) также является лишь слабым, зависящим от времени ингибитором СУР3А4/5. Сниженная ингибиторная активность в отношении СУР2С19 и СУР3А4/5 приводит к уменьшенному эффекту на метаболизм, в том числе других лекарственных средств, и соответственно сниженного потенциала неблагоприятных лекарственных взаимодействий.

Резюме.

Комбинация сильной активности против множественной миеломы, при этом не затрагивая здоровые клетки, значительно повышенных уровней апоптоза и более сильного и эффективного ответа в комбинации с дексаметазоном показывает, что соединение 1 и соединение 2 будут полезны при лечении множественной миеломы. Кроме того, неожиданное открытие улучшенных профилей не мишеней и CYP *in vitro* и *in vivo* в сочетании с потенциалом использования более низких доз дексаметазона показывает, что соединение 1 и соединение 2 должно иметь улучшенные профили безопасности по отношению к ранее описанным соединениям.

Пример 8. Апоптоз, индуцированный соединением 2, в клеточных линиях множественной миеломы, характеризующейся онкогенными драйверами, хромосомными транслокациями и мутациями p53.

Способы.

Эффект соединений на пролиферацию и индукцию апоптоза репрезентативных клеточных линий ММ, обладающих обычными онкогенными мутациями и хромосомными транслокациями, включающими те, которые считаются транслокациями или мутациями высокого риска, обнаруженными у пациентов с ММ, оценивали с использованием анализа проточной цитометрией 96-луночного планшета после 120 ч инкубации с данными соединениями. Двадцать клеточных линий ММ (табл. 7 и 8), в том числе клеточные линии лейкоза плазматических клеток (PCL) L363, JIN-3, ARH-77, и SKMM-2, обрабатывали в двух экземплярах с увеличением концентрации соединения 2 или помалидомида в пределах от 0,015 до 100 нМ. Используя исходные 5 мМ растворы, соединения были предварительно нанесены в соответствующие лунки 96-луночных планшетов с использованием цифрового дозатора Hewlett-Packard D300. Клетки добавляли в 96-луночные планшеты с использованием дозатора реагентов Multidrop Combi. Через 5 дней обработки использовали анализ проточной цитометрией для определения количества клеток, которые были живы, мертвы или апоптотическими. Через 5 дней обработки клетки инкубировали с аннексином V для окрашивания экспонированного фосфатидилсерина, маркером поверхности апоптотических клеток и витальным красителем 7-AAD, который отторгается из клеток с интактными клеточными мембранами, и анализировали с помощью проточной цитометрии (Attune®, Thermo Fisher). Затем проводили анализ для определения числа живых клеток (двойного отрицательного окрашивания клеток аннексином V и 7-AAD) и была рассчитана доля апоптотических клеток (аннексин V-положительные клетки) для каждого условия по отношению к контролю обработки ДМСО. Все описанные значения были нормализованы к клеткам, обработанным только ДМСО. Все кривые пролиферации и индукции апоптоза были обработаны и построены как процент от контроля с использованием XLFit (IDBS, Аламида, Калифорния) и GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software, Ла-Холья, Калифорния). Количество живых клеток для каждой концентрации нормализовали к контролю ДМСО (рассматривается как 100%) в Microsoft Excel для генерирования кривых пролиферации. Значения IC₅₀ (концентрация, при которой соединение обеспечивает 50% ингибирования) затем рассчитывали путем выполнения анализа переменного наклона графика log(ингибитор) от нормализованного ответа, и значения площади под кривой (AUC) рассчитывали путем выполнения анализа площади под кривой на GraphPad Prism 7,03. Аналогично, для анализа апоптоза, процент апоптоза, вызванного препаратом, рассчитывали для всех доз путем сложения значений обоих "раннего" (аннексин V положительный и 7-AAD отрицательный) и "позднего" (аннексин V и 7-AAD положительный) апоптоза и вычитания значений фона (клетки, обработанные контролем носителя ДМСО). Величины AUC для кривых апоптоза были вычислены путем выполнения анализа площади под кривой на GraphPad Prism 7.03. Площадь под кривой доза-ответ (AUC) рассчитывали, поскольку она численно выражает активность и эффективность лекарственных средств выражением апоптоза одним параметром. Значения IC₅₀ для соединения 2 и помалидомида в анализах проточной цитометрии представлены в табл. 9. В табл. 10 показана площадь под кривыми доза-ответ (AUC) сравнивающая активность соединения 2 и помалидомида анализа проточной цитометрии в панели клеточных линий ММ.

Таблица 7. Клеточные линии множественной миеломы

Клеточная линия ММ	Поставщик/Источник	Номер по Каталогу	Условия культивирования клеток
ANBL-6	Jelinek, Ahmann et al. Cancer Res (1993) 53(21): 5320-5327	НД	RPMI-1640, 10% ФБС, IL-6
ARH-77	ATCC (Манассас, Виргиния)	CRL-1621	RPMI-1640, 10% ФБС
CAG	Borset, et al. Blood (2000) 96(7): 2528-2536	НД	RPMI-1640, 10% ФБС
DF15	Shaughnessy, et al. US20070027175	НД	RPMI-1640, 10% ФБС
EJM	DSMZ (Брауншвейг, Германия)	ACC-560	RPMI-1640, 10% ФБС
NCI-H929	ATCC (Манассас, Виргиния)	CRL-9068	RPMI-1640, 10% ФБС
H929-1051	Разработанная самостоятельно, сделанная устойчивой к 10 мкМ леналидомида		RPMI-1640, 10% ФБС
IM-9	ATCC (Манассас, Виргиния)	CCL-159	RPMI-1640, 10% ФБС, IL-6
JJN-3	DSMZ (Брауншвейг, Германия)	ACC-541	RPMI-1640, 10% ФБС
KMS-11	Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Осака, Япония)	JRCB-1179	RPMI-1640, 10% ФБС
KMS-12-PE	DSMZ (Брауншвейг, Германия)	ACC-606	RPMI-1640, 10% ФБС
KMS-34	Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank (Осака, Япония)	JRCB-1195	RPMI-1640, 10% ФБС
L363	DSMZ (Брауншвейг, Германия)	ACC-49	RPMI-1640, 10% ФБС
LP-1	DSMZ (Брауншвейг, Германия)	ACC-41	RPMI-1640, 10% ФБС
MM.1S	ATCC (Манассас, Виргиния)	CRL-2174	RPMI-1640, 10% ФБС
OPM2	DSMZ (Брауншвейг, Германия)	ACC-50	RPMI-1640, 10% ФБС
OPM2-P10	Разработанная самостоятельно, сделанная устойчивой к 10 мкМ помалидомида		RPMI-1640, 10% ФБС
RPMI-8226	ATCC (Манассас, Виргиния)	CCL-155	RPMI-1640, 10% ФБС
SKMM-2	DSMZ (Брауншвейг, Германия)	ACC-430	RPMI-1640, 10% ФБС
U266	ATCC (Манассас, Виргиния)	TIB-196	RPMI-1640, 10% ФБС

ATCC=American Type Tissue Collection; DSMZ=German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; ФБС=фетальная бычья сыворотка; IL-6=интерлейкин 6; JCRB=Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank; ММ=множественная миелома; НД=нет данных

Таблица 8. Онкогенные драйверы, хромосомные транслокации и мутации p53, найденные в панели клеточных линий множественной миеломы

Клеточная линия	статус p53	Онкогенные Драйверы	Транслокации
MM			
ANBL-6	мут (Q331) ^a	C-MAF	t(14;16)
ARH-77	мут (R273H)	-	-
CAG	ДТ ГД	C-MAF	t(14;16)
DF15	ДТ	-	-
EJM	мут (K132N)	MAFB	t(14;20)
NCI-H929	ДТ	FGFR3 и MMset	t(4;14)
H929-1051	ДТ	FGFR3 и MMset	t(4;14)
IM-9	ДТ	-	-
JJN-3	ДТ	C-MAF	t(14;16)
KMS-11	ДТ ГД	FGFR3/MMSET, C-MAF	t(4;14),t(14;16)
KMS-12-PE	ДТ ГД/мут (R337L) ^b	Циклин D1	t(11;14)
KMS-34	мут (W146 ^a)	FGFR3 и MMset	t(4;14)
L363	мут (S261T)	MAFB	t(6;20), t(20;22)
LP-1	мут (E286K)	FGFR3 и MMset	t(4;14)
MM.1S	ДТ	C-MAF	t(14;16)
OPM2	мут (R175H)	FGFR3 и MMset	t(4;14)
OPM2-P10	мут (R175H)	FGFR3 и MMset	t(4;14)
RPMI-8226	мут (E258K)	C-MAF	t(14;16), t(16;22)
SKMM-2	ДТ	MAFB, Циклин D1	t(14;20), t(11;14)
U266	мут (A161T)	Циклин D	t(11;14)

ГД=гомозиготная делеция; мут=мутация; ДТ=дикий тип; - = не присутствует. ^a=нонсенс мутация, ^b=противоречивые сообщения в литературе p53 ДТ с только 1 копией или мутацией

Источники: Bergsagel, et al. *Oncogene* (2001);20:5611-5622; Berglind, et al. *Cancer Biology Therapeutics* (2008);5:699-708; Keats, J. *Common Genetics of Myeloma Cell Lines* [Интернет]. Jonathan Keats Laboratory. Translational Genomics Research Institute (TGen) -Integrated Cancer Genomics Division. 2012 - [процитировано 05 Янв 2017].

Результаты.

Антипролиферативную активность соединения 2 оценивали в панели репрезентативных клеточных линий ММ, обладающих обычными онкогенными мутациями и хромосомными транслокациями (табл. 8), включающими те, которые считаются транслокациями или мутациями высокого риска, обнаруженными у пациентов с ММ (Johnson, et al. *Int J Hematol.* (2011);94:321-333; Zhou, et al. *Leukemia* (2009);23:1941-1956; Terpos, et al. *Leuk Lymphoma* (2006);47:803-814; Tonon, *Hematol Oncol Clin North Am.* (2007);21:9851006). Кривые зависимости ответа от концентрации были получены с использованием проточной цитометрии для измерения числа живых клеток, чтобы продемонстрировать антипролиферативную активность соединения 2 по сравнению с помалидомидом. Значения IC₅₀ для соединения 2 и помалидомида представлены в табл. 9.

Таблица 9. Антипролиферативная активность соединения 2 в клеточных линиях множественной миеломы

Клеточная Линия	Антипролиферативная Активность (Проточная цитометрия)	
	IC ₅₀ (нМ)	
	Соединение 2	Помалидомид
MM1-S	0,04	33,74
DF15	0,05	40,98
OPM2	0,05	69,68
ANBL-6	0,06	60,61
NCI-H929	0,05	63,10
KMS-12-PE	0,09	83,79
LP-1	0,14	175,77
JJN-3	0,10	365,84
CAG	0,12	1084,88
U266	0,19	380,67
EJM	0,43	2843,08
NCI-H929-1051	0,45	1949,67
KMS34	0,45	> 10000
KMS-11	1,41	5290,11
RPMI-8226	0,75	> 10000
OPM2-P10	1,81	> 10000
SK-MM-2	0,82	> 10000
L363	0,16	> 10000
ARH-77	>10000	> 10000
IM-9	5569,43	> 10000

Эффект индукции апоптоза соединением 2 оценивали с помощью проточной цитометрии после 120 ч обработки и по сравнению с обработкой помалидомидом. Процент от контроля рассчитывали путем нормализации к контролю ДМСО (100% от контроля) для генерации кривых доза-ответ и для расчета площади под данными кривыми (AUC). Наблюдаемое значение AUC соответствует площади под кривой доза-ответ, в котором значения 10000 соответствуют полной индукции апоптоза при всех дозах и значения 0 соответствуют отсутствию индукции апоптоза. Каждая точка данных представляет собой 2 независимых эксперимента по меньшей мере с двумя образцами в каждом эксперименте. (табл. 10).

Таблица 10. Апоптоз, индуцированный соединением 2, в клеточных линиях множественной миеломы

Клеточные Линии	AUC	
	Соединение 2	Помалидомид
CAG	5804	1561
DF15	6002	3707
NCI-H929	6089	2115
SKMM-2	3204	1033
OPM2	5620	3298
MM1.S	5701	3525
RPMI-8226	3245	1369
ANBL-6	4751	2580
H929-1051	3968	423
EJM	2591	900
KMS-12-PE	2017	1069
KMS-11	1270	234,4
JJN-3 (DSMZ)	1125	199,1
KMS-34	1614	429,7
IM-9	323,9	25,4
U266	927,8	373
OPM2-P10	1768	108,7
ARH-77	709	28,16
LP-1	630,7	174
L363	347	293

Вывод.

Соединение 2 было в целом активно в большинстве клеточных линий ММ, и отличалось от помалидомида, показывая сильную активность в клеточных линиях, которые имеют промежуточную чувствительность к помалидомиду и в клеточных линиях, которые являются устойчивыми к помалидомиду. Соединение 2 было в целом активно среди данного диапазона клеточных линий ММ с отличающимися статусом p53, онкогенными драйверами или хромосомными транслокациями. Например, клетки OPM2, LP-1, EJM, U266 и RPMI-8226 имеют мутацию p53 и были чувствительны к соединению 2. К тому же, клеточные линии NCI-H929, KMS-11, KMS 34, OPM2 и LP-1 все содержат хромосомную транслокацию t(4;14) "высокого риска" ММ и были чувствительны к соединению 2. Клетки SK-MM-2 и EJM содержат другую хромосомную транслокацию t(14;20) "высокого риска" ММ и были также чувствительны к соединению 2 (фиг. 5). Способность соединения 2 индуцировать апоптоз после коротких определенных экспозиций может позволить борьбу с болезнью, которая достигается с использованием интенсивных, эпизодических графиков лечения. Такие графики могут также улучшить терапевтический индекс путем уменьшения потенциала соединения 2 индуцировать цитопении, которые наблюдаются при более непрерывном дозировании текущих соединений против ММ.

Пример 9. Активность соединения 2 в клеточных линиях множественной миеломы, которые имеют приобретенную устойчивость к леналидомиду или помалидомиду.

Активность соединения 2 тестировали в клетках, которые имеют приобретенную устойчивость к леналидомиду или помалидомиду из-за продолжительного воздействия какого-либо соединения и в процессе приобрели сниженные уровни цереблona (табл. 11). Клетки обрабатывали в течение 5 дней и затем оценивали с использованием анализа определения АТФ (CellTiter-Glo). Процент от контроля рассчитывали путем вычитания фона и нормализации к контролю ДМСО (100% от контроля). Относительную долю цереблona в клеточных линиях с приобретенной устойчивостью к леналидомиду или помалидомиду определяли с помощью Вестерн-блоттинга и отображали относительно количества в родительских клеточных линиях, обозначенного как 100%.

Результаты.

На фиг. 6 показаны IC₅₀ кривых зависимости ответа от концентрации, сравнивающие активность соединения 2 и помалидомида, для измерения пролиферации в родительских линиях (DF15, NCI-H929 и OPM2), клеточной линии, устойчивой к леналидомиду (NCI-H929-1051) или пяти клеточных линиях,

устойчивых к помалидомиду (NCI-H929-P01, OPM2-P01, OPM2-P1, OPM2-P10 и DF15R).

Таблица 11. Соединение и концентрация соединения, используемые для вырабатывания устойчивости к препаратам у клеточных линий множественной миеломы и обретения изменений в экспрессии белка цереблону

Клеточная Линия	Устойчивость	Цереблон (%) (Нормализовано к Исходной Линии)
DF15	Н/Д	100
DF15R	100 мкМ Пом	14*
NCI-H929	Н/Д	100
NCI-H929-1051	10 мкМ Лен	50
NCI-H929-P01	100 нМ помалидомида	35
OPM2	Н/Д	100
OPM2-P01	100 нМ помалидомида	61
OPM2-P1	1 мкМ Пом	33
OPM2-P10	10 мкМ Пом	31

Н/Д=нет данных; Пом=помалидомид; *уровень фона, а не фактический цереблон, который отсутствует в данной клеточной линии

Вывод.

Наиболее поразительным эффектом соединения 2 была широкая и сильная антипролиферативная активность в клеточных линиях ММ, но не в неонкогенных клетках. Соединение 2 имеет сильную антипролиферативную активность в клеточных линиях ММ, содержащих транслокации высокого риска, такие как t(4; 14), t(14;16) и другие. По сравнению с леналидомидом и помалидомидом, соединение 2 является значительно более сильным, убивая большинство клеточных линий ММ. Более того, соединение 2 индуцировало апоптоз по данным измерения индукции активности каспазы 3 в клеточных линиях ММ, которые имеют приобретенную устойчивость к леналидомиду и помалидомиду.

Пример 10. Эффект соединения 2 Ex Vivo на созревание миелоидных клеток-предшественников зрелых нейтрофилов.

Способы.

Культуры ex vivo клеток CD34⁺ костного мозга (КМ) из здоровых доноров (ЗД) были использованы для исследования нейтрофил-специфического созревания ex vivo. Дифференциацию in vitro клеток-предшественников нейтрофилов индуцировали путем добавления к культуральной среде фактора стволовых клеток (SCF), лиганда fms-подобной тирозинкиназы 3 (Flt-3-L) и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF). Дифференциацию клеток оценивали с помощью проточной цитометрии как процент клеток в 5 субпопуляциях: гемопоэтические стволовые клетки (ГСК, CD34⁺/CD33⁻/CD11b⁻) и стадия I (CD34⁺/CD33⁺/CD11b⁻), стадия II (CD34⁺/CD33⁺/CD11b⁻), стадия III (CD34⁺/CD33⁺/CD11b⁺) и стадия IV (CD34⁺/CD33⁺/CD11b⁺) (от незрелых до зрелых), как показано на фиг. 7. Анализировали эффекты соединения 2 на созревание клеток-предшественников нейтрофилов и оценивали различные графики дозирования, чтобы получить представление о зависимости данных событий от графика.

Результаты.

Короткие ежедневные экспозиции соединения 2.

Эффекты различных периодов экспозиции (2, 4, и 6 ч) при 1, 10 и 100 нМ соединения 2 в течение вплоть до 3 последовательных дней на созревание клеток-предшественников нейтрофилов оценивали в заранее заданных точках времени с использованием проточной цитометрии. Результаты показали, что поздняя стадия созревания клеток-предшественников нейтрофилов была блокирована соединением 2, со значительно сниженным числом зрелых клеток при более высоких концентрациях после одного или более дней экспозиции. Задержание созревания, по-видимому, происходит в первую очередь на развитии клеток-предшественников нейтрофилов стадии III, о чем свидетельствует накопление клеток с иммунофенотипом клеточной поверхности стадии III и сокращение популяции клеток с иммунофенотипом клеточной поверхности стадии IV (зрелых нейтрофилов). Как показано на фиг. 8 в примере 6-часовой инкубации, данный эффект на созревание зависел от концентрации и увеличивался с количеством дней экспозиции, но не изменялся с продолжительностью (2, 4, или 6 ч) отдельных экспозиций. Важно отметить, что жизнеспособность клеток-предшественников нейтрофилов и зрелых нейтрофилов, экспонированных соединением 2, не была затронута, о чем свидетельствует отсутствие какого-либо обнаруживаемого увеличения доли клеток, позитивных на аннексин V или 7-аминоактиномицин D, которые накапливаются в мертвых клетках.

Восстановление зрелых нейтрофилов после экспозиции соединения 2 было также оценено в системе. Восстановление уровней зрелых нейтрофилов по меньшей мере на 50% необработанного контрольного уровня в аналитической системе, используемой в данном исследовании, коррелирует с отсутствием индукции или восстановления от клинически значимой нейтропении. Действительно, после одной недели без соединения 2 доля клеток стадии IV восстановилась по меньшей мере на 50% по сравнению с ее максимальным снижением (фиг. 8, нижние панели), с тенденцией к более быстрому и полному восстановлению при более низких концентрациях.

Вывод: данные результаты указывают, что возможно успешное управление нейтропенией у пациентов с ММ, которых лечат соединением 2 с использованием подходящих графиков дозирования.

Более длинные ежедневные экспозиции соединения 2.

Для дополнительной характеристики потенциального воздействия различных графиков на задерживание созревания клеток-предшественников нейтрофилов и последующее восстановление, оценивали изменения в относительных пропорциях каждой из вышеупомянутых стадий созревания миелоидных клеток-предшественников зрелых нейтрофилов с помощью проточной цитометрии через 3 или 5 последовательных дней экспозиции 1, 10 или 100 нМ соединения 2 в течение 6 или 24 ч каждый день. Клетки CD34⁺ костного мозга, полученные от здоровых доноров, были подвергнуты экспозиции соединения 2 в каждый из 3 или 5 последовательных дней, начиная с дня 10 в течение 6 ч (доноры № 1 и 2) или в течение 24 ч (доноры № 3 и 4) каждый день. После завершения конечной экспозиции клетки промывали и затем реинкубировали в отсутствие соединения 2 до дня 22. Обе 6- и 24-часовая экспозиции соединения 2 в течение 3 или 5 последовательных дней привели к накоплению популяции нейтрофилов стадии III с соответствующим уменьшением в популяции стадии IV в соответствии с блокированием созревания от стадии III до стадии IV. Как показано на фиг. 9 и 10, в примерах 6-часовой экспозиции в течение 3 и 5 дней соответственно, темп восстановления после задерживания созревания зависел от концентрации и зависел от количества ежедневных экспозиций, будучи более длительным при более высоких концентрациях соединения 2, и также при 5 днях по сравнению с 3 днями экспозиции, но изменение продолжительности (6 против 24 ч) ежедневных экспозиций оказало незначительное влияние на явный темп восстановления.

После экспозиции соединения 2 в течение 3 последовательных дней наблюдалось 50% или более восстановления нормального созревания после перерыва введения препаратов от 8 до 10 дней во всех тестируемых условиях (фиг. 10, правая панель). В отличие от этого, после экспозиции соединения 2 в течение 5 последовательных дней наблюдалось 50% или более восстановления нормального созревания после перерыва введения препаратов от 8 до 10 дней для концентраций только 1 и 10 нМ. При самой высокой концентрации соединения 2 (100 нМ) может потребоваться более длительный период перерыва введения препаратов для восстановления созревания клеток-предшественников нейтрофилов. Тем не менее, несмотря на данное неполное восстановление созревания не наблюдалось никакой потери жизнеспособности при любом из тестируемых условий, в том числе непрерывной экспозиции (24 ч) до 5 дней. Данное наблюдение контрастирует с индукцией апоптоза в клетках миеломы, которая была оптимизирована непрерывной экспозицией соединения 2 в течение более 6 ч.

В течение от 6 до 8 дней после последней экспозиции в 5-дневном графике наблюдали начальные этапы восстановления стадии IV (зрелые нейтрофилы) после экспозиции соединения 2 при концентрации только 10 нМ, тогда как никакого восстановления не наблюдалось в течение данного промежутка времени в культурах, подвергнутых воздействию 100 нМ соединения 2 в течение 5 дней. Эти данные свидетельствуют о том, что экспозиция при более высоких концентрациях соединения 2 по сравнению с увеличением числа последовательных дней предвещает более длительное задерживание созревания клеток-предшественников нейтрофилов (и нейтропению) и что темп восстановления не зависит от длительности (6 против 24 ч) ежедневных экспозиций.

Вывод: взятые вместе, эти данные свидетельствуют о том, что более интенсивное дозирование соединения 2 (несколько доз в день), по сравнению с дозированием раз в день, может не оказать негативное воздействие на индукцию и восстановление после нейтропении у пациентов.

Пример 11. Эффект дексаметазона на созревание клеток-предшественников нейтрофилов *in vitro* в качестве отдельного агента и в комбинации с соединением 2.

Способы.

Для того чтобы понять эффекты дексаметазона на нейтропению, использовали культуры *in vitro* клеток CD34⁺ КМ из здоровых доноров для оценки событий нейтропении, опосредованных дексаметазоном как в качестве отдельного агента, так и в комбинации с соединением 2. Для определения эффектов монотерапии дексаметазона в данной модели экспозицию дексаметазона 1, 10 или 100 нМ поддерживали в течение 30 ч, сравнивая 7 различных графиков дозирования (фиг. 11). Для исследований комбинации совместную экспозицию соединения 2 (1, 10 или 100 нМ) и дексаметазона поддерживали в течение 6 и 30 ч соответственно, начиная с дня 13 культивирования.

Результаты.

Результаты показали, что созревание клеток-предшественников нейтрофилов не зависело от воздействия отдельного агента дексаметазона при любом тестируемом графике, тогда как созревание кле-

ток-предшественников нейтрофилов поздней стадии было блокировано соединением 2 (фиг. 12), с уменьшенным количеством зрелых клеток при всех тестируемых концентрациях после одной экспозиции. Также наблюдалось задержание созревания, когда соединение 2 комбинировали с дексаметазоном. Данное задержание созревания зависело от концентрации соединения 2, но не изменялось при изменении концентрации дексаметазона. На жизнеспособность незрелых и зрелых нейтрофилов не влиял дексаметазон или соединение 2 по отдельности или в комбинации. После вымывания препаратов наблюдалось полное восстановление нормального созревания во всех тестируемых условиях после одной недели перерыва введения препаратов.

Вывод: эти данные указывают на то, что на нейтропению, вызванную соединением 2, можно влиять путем изменения графика дозирования, но прогнозируется, что она не будет ни облегчаться, ни усугубляться сопутствующим лечением дексаметазоном.

Пример 12. Эффект соединения 2 отдельно и в комбинации с дексаметазоном на множественную миелому, устойчивую к леналидомиду.

Способы.

Дексаметазон оценивали по его способности индуцировать апоптоз в качестве отдельного агента, либо в комбинации с соединением 2, помалидомидом или леналидомидом. Индукцию апоптоза измеряли с использованием Caspase-Glo в клетках множественной миеломы, устойчивых к леналидомиду (H929-1051). Дексаметазон распределяли при 20 концентрациях, используя акустический дозатор. Тестируемые изделия добавляли в качестве отдельных концентраций на лунки с дексаметазоном цифровым дозатором Hewlett-Packard D300. Конечные концентрации соединений для анализа были: дексаметазон (от 0,8 мкМ до 0,00002 мкМ), леналидомид (1 мкМ), помалидомид (0,1 мкМ) и соединение 2 (0,001, 0,01, или 0,1 мкМ). Клетки распределяли в планшеты для анализа дозатором Multidrop, и были сделаны дублирующие планшеты для анализа. Считывание апоптоза проводили на 72 ч после обработки соединением с использованием анализов Caspase-Glo 3/7 и CellTiter-Glo. Люминесценцию Caspase-Glo 3/7 нормализовали к люминесценции CellTiter-Glo для учета различий в количестве клеток. Изменение сворачивания в тестируемом образце рассчитывали следующим образом: нормализованное значение каспазы обработанного образца/среднее значение нормализованного значения контроля ДМСО.

Результаты.

Активность апоптоза дексаметазона отдельно или в комбинации с леналидомидом, помалидомидом или соединением 2 измеряли с помощью индукции каспазы 3. Соединение 2 синергировало с дексаметазоном в снижении жизнеспособности клеток и усиливало апоптотическую способность дексаметазона в зависимости от концентрации. Начало активности дексаметазона смещалось на 1 log в присутствии соединения 2.

Вывод: соединение 2 усиливает апоптотическую активность дексаметазона, показывая потенциал снижения дозы дексаметазона при использовании в комбинации с соединением 2 в клинике.

Как показано на фиг. 13, наблюдается существенный двунаправленный синергизм после обработки соединением 2 в комбинации с дексаметазоном. Всего 10 нМ дексаметазона повышает способность инициации гибели клеток соединением 2 и концентрации соединения 2, от низких до субнанолярных, усиливают апоптотические эффекты дексаметазона.

Пример 13. Соединение 2 повышает противоопухолевую активность иммунных клеток из здоровых доноров-людей.

Эксперименты кокультивирования мононуклеарных клеток периферической крови и клеток K562.

Способы.

Получение мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК): PBMC, выделенные из здоровых доноров, культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% ФБС при плотности 1×10^6 клеток/мл.

Клеточная культура: клетки K562 поддерживали в log-фазе и контролировали плотность клеток и жизнеспособность с помощью вытеснения трипанового синего с применением анализатора жизнеспособности клеток Vi-CELL® XR (Beckman Coulter, Брея, Калифорния).

Аналитические методики: свежевыделенные PBMC человека культивировали с рекомбинантным IL-2 при концентрации 20 ед/мл в течение 72 ч. Мононуклеарные клетки периферической крови затем центрифугировали и вновь суспендировали в свежей полной среде RPMI до 2×10^6 клеток/мл. Затем клетки обрабатывали ДМСО или соединением в указанных концентрациях и инкубировали в течение дополнительных 72 ч. PBMC дважды промывали в свежей полной среде.

RPMI до совместного культивирования.

Клетки K562 повторно суспендировали до плотности клеток 1×10^6 клеток/мл и окрашивали 1 мкМ CellTrace CFSE в соответствии с инструкциями производителя. Меченые K562 клетки затем высевали в 96-луночных планшетах с круглым дном при 1×10^5 клеток/лунку. Мононуклеарные клетки периферической крови затем переносили в тот же самый 96-луночный планшет при соотношении 1:15 в трех экземплярах и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Специфический лизис клеток мишеней клетками МКПК измеряли с использованием аннексин V-флуоресцеин изотиоцианата (FITC) и пропидия иодида (PI) в соответствии с инструкциями производителя, и образцы подвергали сканированию FACS Array. Немец-

ные клетки K562, CellTrace CFSE-меченые клетки K562 и аннексин V-FITC-меченные и PI-меченые не-обработанные клетки K562 были включены в каждом анализе в качестве контроля.

Анализы совместного культивирования.

Мононуклеарных клеток периферической крови человека, обработанных соединением и необработанных клеточных линий миеломы.

Способы.

Клеточная культура.

Все клеточные линии миеломы поддерживали в log-фазе и контролировали плотность клеток и жизнеспособность с помощью вытеснения трипанового синего с применением анализатора жизнеспособности клеток Vi-CELL XR.

Аналитическая методика.

Обработки МКГЖ: 96-луночные планшеты были предварительно покрыты анти-CD3 антителом (ОКТ3, 3 мкг/мл) и инкубированы при 4°C в течение ночи перед началом эксперимента. Замороженные РВМС доноров оттаивали при 37°C в течение 2 мин в среде RPMI с добавлением 10% ФБС, затем количество клеток и жизнеспособность были измерены на Vi-CELL® (Beckman Coulter). Мононуклеарные клетки периферической крови промывали и разводили до 1×10^6 клеток/мл и распределяли в планшетах, обработанных соединением в общем объеме 200 мкл. Клетки инкубировали в присутствии соединений в течение 2 ч перед переносом на планшеты, покрытые анти- CD3 антителами, и инкубировали в течение еще 72 ч при 37°C. После 72 ч МКГЖ центрифугировали и клетки дважды промывали средой RPMI+10% ФБС. Необработанные клеточные линии MM (H929 и H929-1051) метили CellTrace CFSE в соответствии с инструкциями производителя и повторно суспендировали при общей концентрации $0,1 \times 10^6$ клеток/мл в 96-луночном планшете с круглым дном в общем объеме 100 мкл. Мононуклеарные клетки периферической крови подсчитывали и добавляли к клеткам MM в соотношении мишень:эффектор (М:Э) 1:5. Через 24 ч совместного культивирования специфический лизис клеток мишеней с помощью МКПК измеряли с использованием аннексии V-AF647 и 7-AAP в соответствии с инструкциями производителя и образцы анализировали на цитометре Attune NXT (Thermo Fisher).

Аналитическая методика.

Обработки МКПК и клеток MM: 96-луночные планшеты были предварительно покрыты анти- CD3 антителом (ОКТ3, 3 мкг/мл) и инкубированы при 4°C в течение ночи перед началом эксперимента.

Замороженные клетки РВМС доноров оттаивали при 37°C в течение 2 мин в среде RPMI с добавлением 10% ФБС, затем количество клеток и жизнеспособность были измерены на анализаторе Vi-CELL. Мононуклеарные клетки периферической крови промывали и разводили до 1×10^6 клеток/мл и распределяли в планшетах, обработанных соединением в общем объеме 200 мкл. Клетки инкубировали в присутствии соединений в течение 2 ч перед переносом на планшеты, покрытые анти- CD3 антителами, и инкубировали в течение еще 72 ч. В то же время, клеточные линии MM (NCI-H929, H929-1051, OPM2, OPM2-P10) разводили до конечной концентрации $0,1 \times 10^6$ клеток/мл и метили CellTrace CFSE в соответствии с инструкциями производителя. Клеточные линии множественной миеломы затем распределяли в планшетах, обработанных соединением при общем объеме 200 мкл и инкубировали в течение 72 ч. Через 72 ч РВМС и клетки MM подсчитывали и переносили в 96-луночный планшет с круглым дном при конечном соотношении М:Э 1:5. Через 24 ч совместного культивирования специфический лизис клеток мишеней с помощью клеток МКПК измеряли с использованием аннексин V-AF647 и 7-AAP в соответствии с инструкциями производителя и образцы анализировали на цитометре Attune NXT.

Результаты.

Данная модель совместного культивирования была использована для определения прямых эффектов соединения 2 на противоопухолевую активность МКПК, взятых их здоровых доноров. Обработка соединением 2 IL-2-активированных РВМС индуцировала убийство необработанных клеток K562, зависящее от концентрации (фиг. 14, правая панель). МКПК, обработанные соединением 2 ($IC_{50}=5,9$ пМ) были в ~600 раз более сильными, чем МКПК, обработанные помалидомидом (Пом; $IC_{50}=0,004$ мкМ) и в ~2600 раз более сильными, чем обработанные леналидомидом (Лен; $IC_{50}=0,02$ мкМ) в достижении 50% прямой гибели клеток K562. Хотя соединение 2 было более сильным, чем леналидомид и помалидомид, величина ответа была сходной среди данных соединений (фиг. 14, правая панель).

Эффекты соединения 2 на активность МКПК, инкубированных с соединением 2, против клеток MM были дополнительно проанализированы в клеточных линиях, отображающих фенотип устойчивости для того, чтобы сравнить с ответом в чувствительных клетках. В другой модели совместного культивирования клетки РВМС доноров были предварительно обработаны с соединением 2, леналидомидом или помалидомидом в течение 2 ч перед тем, как их культивировали на планшетах с покрытием анти-CD3 антител в течение 72 ч. РВМС, активированные анти-CD3 антителами, обработанные соединением 2, продемонстрировали увеличение лизиса опухолевых клеток, зависящее от концентрации, необработанной чувствительной к леналидомиду (NCI-H929; $IC_{50}=0,005$ мкМ) и устойчивой к леналидомиду (H929-1051; $IC_{50}=0,0002$ мкМ) клеточных линий MM в похожей степени (фиг. 15). Соединение 2 было более сильным, чем леналидомид и помалидомид в отношении снижения доли жизнеспособных клеток MM. По-

добный уровень убийства опухолевых клеток с помощью МКПК наблюдали в отношении совместно культивированных опухолевых клеток, чувствительных к леналидомиду и устойчивых к леналидомиду, показывая, что РВМС были активированы для инициации гибели опухолевых клеток независимо от их фенотипа устойчивости.

Поскольку предварительная инкубация иммунных клеток с соединением 2 усиливала нацеливание и лизис клеток ММ, также исследовали эффект предварительной инкубации клеток ММ с соединением 2 на их восприимчивость к иммуно-опосредованной гибели (фиг. 16, табл. 12). Четыре клеточные линии ММ и МКПК, активированные анти-CD3 антителом отдельно предварительно инкубировали с соединением 2, леналидомидом или помалидомидом в течение 72 ч. Когда РВМС, активированные анти-CD3 антителом, и линии ММ, обе были предварительно обработаны соединением 2, леналидомидом или помалидомидом, а затем совместно культивированы, эффекты на лизис клеток ММ, индуцированный РВМС, были усилены в плане активности и величины ответа гибели клеток. По данным сравнения значений IC_{50} отдельных культур клеток ММ в сравнении с совместными культурами иммунных и опухолевых клеток соединение 2 усиливает убийство клеток NCI-H929 в ~7000 раз, и оно усиливает убийство увеличивает гибель клеток H929-1051 в ~6000 раз. В отношении клеточной линии OPM2-P10 устойчивой к помалидомиду, обработка соединением 2 клеток ММ усиливала иммуно-опосредованная гибель в ~3000 раз (табл. 12).

Таблица 12. Иммуно-опосредованная гибель клеток в клеточных линиях множественной миеломы в отдельных культурах по сравнению с совместными культурами

Клеточная Линия Множественной Миеломы	Условия культивирова ния клеток	Иммуно-опосредованная гибель клеток IC_{50} (мкМ)		
		Леналидомид	Помалидомид	Соединение 2
NCI-H929	Монотерапия	> 10	> 10	0,5810
	Совместная культура	0,3173	0,0444	8.702e-005
H929-1051	Монотерапия	> 10	> 10	0,5753
	Совместная культура	0,8782	0,0713	0,0001
OPM2	Монотерапия	> 10	0,6273	0,0003
	Совместная культура	1,722	0,1685	9.361e-005
OPM2-P10	Монотерапия	> 10	> 10	> 10
	Совместная культура	8,094	1,181	0,0031
RPMI-8226	Монотерапия	> 10	> 10	0,0134
Клеточная Линия Множественной Миеломы	Условия культивирова ния клеток	Иммуно-опосредованная гибель клеток IC_{50} (мкМ)		
		Леналидомид	Помалидомид	Соединение 2
	Совместная культура	0,1245	0,0676	8.387e-005

IC_{50} =концентрация, приводящая к гибели 50% клеток

Вывод.

РВМС, обработанные соединением 2, индуцируют лизис опухоли необработанных клеточных линий K562 и ММ в похожей степени, по сравнению с леналидомидом и помалидомидом, хотя и с гораздо большей активностью. Кроме того, гибель опухолевых клеток была значительно повышена, если обе РВМС и клеточные линии ММ были предварительно обработаны соединением 2, что свидетельствует о том, что в дополнение к своим сильным самостоятельным клеточным эффектам, соединение 2 может также повысить иммуногенность клеточных линий ММ. Комбинация сильных самостоятельных клеточных и иммуногенных эффектов на клетки ММ в дополнение к его иммуномодулирующим свойствам делает соединение 2 потенциальным кандидатом для клиники.

Пример 14. Эффект соединения 2 в комбинации с даратумабom на множественную миелому даратумаб, анти-CD38 антитело, одобренное для лечения множественной миеломы, оказывает свою активность против миеломы посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ). Эффект соединения 2 или помалидомида в комбинации с даратумабom определяли в клеточных линиях ММ.

Анализ АЗКЦ.

Эффект соединения 2 или помалидомида на АЗКЦ, опосредованную даратумумабом определяли *in vitro* проточной цитометрией в панели клеточных линий ММ. Клетки НК культивировали в течение ночи в культуральной среде для НК, содержащей 10 ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2, до начала анализа. Клетки НК промывали и снова ресуспендировали в культуральной среде для клеток НК при $3,75 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки ММ предварительно обрабатывали сублетальными концентрациями соединения 2 или помалидомида в течение 72 ч до использования в анализе АЗКЦ. Клетки ММ промывали и метили красителем отслеживания пролиферации и клеток Tag-It Violet™ в соответствии с инструкциями производителя, а затем ресуспендировали в культуральной среде для НК при концентрации $0,75 \times 10^6$ клеток/мл. Анализ АЗКЦ проводили в трех экземплярах с соотношением эффектора к опухоли 10:1 в 96-луночном планшете. Клетки ММ (10 мкл) смешивали с 10 мкл 2х концентрации даратумумаба в лунках перед добавлением 20 мкл клеток НК. Совместные культуры инкубировали при 37°C в течение 3 ч с последующим добавлением 50 мкл раствора 7-AAD при комнатной температуре в течение 15 мин. Анализ проводили на проточном цитометре BD Celesta.

Анализ ADCP.

Эффект соединения 2 или помалидомида на ADCP, опосредованный даратумумабом определяли в панели клеточных линий ММ. Моноциты высевали в 96-луночном планшете при 40000 клеток на лунку в 100 мкл объема полной среды AIM-V, содержащей 50 нг/мл M-CSF. Клеткам давали осесть на планшет в течение 15 мин при комнатной температуре перед помещением в инкубатор с 37°C, 5% CO₂ в течение 9 дней, чтобы позволить дифференциацию в макрофаги. Культуральную среду пополняли свежей культуральной средой каждые 3-4 дня. В утро анализа ADCP макрофаги голодали в течение 2-4 ч при температуре 37°C, 5% CO₂ перед совместным культивированием с клетками ММ. Клетки ММ предварительно обрабатывали сублетальными концентрациями соединения 2 или помалидомида в течение 72 ч. В день анализа клетки ММ промывали ФСБ и метили CFSE в течение 15 мин. Реакцию останавливали равным объемом 20% ФБС. Клетки промывали ФСБ дважды и ресуспендировали в среде AIM-V при $1,6 \times 10^6$ клеток/мл. Затем 50 мкл клеток ММ смешивали с 50 мкл 2 мкг/мл даратумумаба в течение 10 мин при комнатной температуре перед добавлением голодавших макрофагов. Каждое условие анализировали в трех экземплярах. Конечный объем анализа составлял 200 мкл, содержащих 10% сыворотки человека с соотношением эффектора к мишени 2:1. Планшет центрифугировали при 500 об/мин в течение 1 мин с последующей инкубацией при 37°C, 5% CO₂ в течение 3 ч. В конце инкубации планшет промывали 100 мкл ФСБ, и оставшиеся клетки окрашивали анти-CD14 и анти-CD138 антителами, чтобы идентифицировать макрофаги и клетки ММ соответственно. Планшет промывали и лунки заполняли 100 мкл ФСБ. Макрофаги отделяли от дна лунки добавлением 50 мкл 0,25% трипсина. Образцы нейтрализовали добавлением 50 мкл полной среды AIM-V. Образцы анализировали на проточном цитометре. Долю фагоцитоза определяли как количество CFSE/CD14 двойных положительных клеток, деленное на общее количество клеток CD14+, умноженное в 100 раз.

Результаты.

Обработка клеток ММ соединением 2 и помалидомидом приводила к увеличению экспрессии CD38, зависящему от дозы (фиг. 17). Степень экспрессии CD38 была выше с соединением 2 и происходила при более низких концентрациях по сравнению с помалидомидом. Клетки ММ ± предварительной обработкой соединением 2 или помалидомидом были оценены в анализах АЗКЦ с даратумумабом. Клетки ММ, обработанные соединением 2, продемонстрировали более высокую степень лизиса опухоли с даратумумабом по сравнению с необработанными клетками (фиг. 18). Клетки, обработанные соединением 2, были также более чувствительны к АЗКЦ, опосредованной даратумумабом, по сравнению с клетками, обработанными помалидомидом. Также была протестирована способность соединения 2 и помалидомида модулировать ADCP, опосредованный даратумумабом. Клетки ММ, обработанные соединением 2, были более чувствительны к ADCP, опосредованному даратумумабом, по сравнению с клетками, необработанными и обработанными помалидомидом (фиг. 19). Только одна протестированная линия клеток ARH-77 не показала усиленного ADCP с соединением 2 или помалидомидом, но продемонстрировала усиленную АЗКЦ с соединением 2.

Вывод.

Соединение 2 активирует экспрессию CD38 в клетках ММ, что приводит к увеличению АЗКЦ и ADCP, опосредованных даратумумабом, по сравнению с помалидомидом или необработанными клетками. Эти данные показывают, что комбинация даратумумаба с соединением 2 может быть более эффективной в лечении ММ по сравнению с комбинацией с помалидомидом или даратумумабом отдельно.

Пример 15. Эффект соединения 2 в комбинации с ингибиторами протеасом на множественную миелому.

За 24 ч до обработки ингибитором протеасом и тестируемым соединением соответствующее количество клеток разделяли до концентрации $0,2 \times 10^6$ клеток/мл в свежей среде для обеспечения экспоненциального роста. В день обработки соединения растворяли в ДМСО. Ингибиторы протеасом бортезомиб или карфилзомиб разводили и добавляли к предварительно нагретой культуральной среде при конечных

рабочих концентрациях 150 нМ или 300 нМ для бортезомиба и 300 нМ или 550 нМ для карфилзомиба. Концентрации ингибиторов протеасом определяли на основании клинических концентраций Стах, а также предшествующих исследований в каждой клеточной линии, что определяло продолжительность и концентрацию ингибитора протеасом, необходимого для конкретной величины ингибирования активности протеасомы $\beta 5$. Клетки подсчитывали и соответствующее количество помещали в среду, содержащую ингибитор протеасом, и тщательно перемешивали. После инкубации в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂ клетки промывали два раза 40 мл полной среды для удаления ингибитора протеасом. Аликвоты каждой обработки протеасом анализировали, чтобы подтвердить степень ингибирования субъединиц $\beta 5$, $\beta 2$ и $\beta 1$. Клетки ресуспендировали при $0,1 \times 10^6$ клеток/мл и высевали по 100 мкл/лунку в свежую посуду для культивирования, содержащую аликвоты либо соединения 2, либо помалидомида, в трех экземплярах. Высеванные клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ в течение оставшейся части эксперимента, вплоть до 72 ч. Каждые 24 ч контролировали ингибирование протеасом клеточным анализом Proteasome-Glo. Пролиферацию и апоптоз измеряли через 72 ч с помощью проточной цитометрии. Клетки окрашивали APC аннексин V и 7-AAD для вычисления количества жизнеспособных клеток, оставшихся в культуре.

Результаты.

Анализ клеток *in vitro* проводили для того, чтобы имитировать клиническую фармакокинетику (ФК) и фармакодинамику (ФД) экспозиции ингибиторов протеасом бортезомиба и карфилзомиба. Данная модель воплощает короткие экспозиции ингибитора протеасом с последующим тщательным вымыванием соединения для дозирования клеток клинически значимыми концентрациями ингибитора протеасом, при этом достигая быстрого клиренса, наблюдаемого *in vivo*. Кроме того, сопоставимый уровень ингибирования протеасомы $\beta 5$ может быть достигнут во всех клеточных линиях.

Данную модель использовали, чтобы оценить сочетание эффектов соединения 2 в комбинации с любым из бортезомиба или карфилзомиба в панели клеточных линий множественной миеломы и лейкоза плазматических клеток (линий OPM2.P10, RPMI.8226, устойчивых к помалидомиду и линий лейкоза плазматических клеток L363 и JIN -3).

Бортезомиб и соединение 2 демонстрировали комбинированный эффект в обеих тестируемых линиях MM, OPM2.P10 и RPMI.8226, а также в одной из линий клеток лейкоза плазматических клеток, JIN-3. Комбинированные эффекты в клеточной линии L363 не могли быть оценены, так как бортезомиб не имел активности отдельного агента на жизнеспособность клеток в условиях данного анализа *in vitro* (фиг. 20 и фиг. 21A).

Хотя обработка карфилзомибом различалась между экспериментами в доле гибели клеток, которая достигалась в течение 1 ч обработки, были продемонстрированы комбинированные эффекты с соединением 2 во всех 4 клеточных линиях (фиг. 21B).

Вывод.

Неожиданно, но соединение 2 сохраняет свою способность к инициации гибели клеток при клинически значимых уровнях ингибирования протеасом. Комбинация соединения 2 с бортезомибом или карфилзомибом продемонстрировала увеличение апоптоза и антипролиферативной активности в клетках MM.

Пример 16. Эффект соединения 2 в комбинации с ингибиторами гистоновой деацетилазы, химиотерапевтическими агентами, ингибиторами Bcl-2, ингибиторами Mcl-1, ингибиторами BET или ингибиторами LSD-1.

Эффект комбинированного лечения соединением 2 с низкомолекулярными ингибиторами различными механизмами определяли в панели клеточных линий MM. Тринадцать низкомолекулярных ингибиторов были выбраны для исследований комбинаций с соединением 2 в зависимости от их доклинической и/или активности против MM. Клеточные линии H929-1051, KMS11, KMS-12PE, L363, OPM-P10 и RPMI8226 были выбраны для данного исследования для представления различных генетических кластерных групп среди клеточных линий MM. Концентрации соединений для комбинированной терапии были выбраны в диапазоне от на 1 log выше до на 2 log ниже IC₅₀ отдельного агента. Агенты комбинированной терапии дозировали в 6 точечной кривой доза-ответ (DRC) при разбавлении 1:3, соединение 2 дозировали в 10 точечной DRC, также при разбавлении 1:3. Комбинированные эксперименты проводились дважды, каждый раз с воспроизводимыми данными на отдельных планшетах. Соединения были предварительно нанесены в соответствующие лунки 384-луночных планшетов с использованием акустического дозатора. Все клеточные линии MM культивировали в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ с использованием указанных культуральных сред для клеток, содержащих 1x пенициллина-стрептомицина. Клетки добавляли в 384-луночные планшеты, содержащие соединение, с использованием дозатора реагентов Multidrop Combi и инкубировали в течение 3 дней при 37°C с 5% CO₂. Через 3 дня клетки анализировали на уровень содержания АТФ с помощью Cell Titer-Glo, измеренного на детекторе люминесценции (Perkin-Elmer Envision).

Для обнаружения синергии в данных кривых доза-ответ использовали метод наивысшего отдельного агента (HSA). Для комбинаций проанализировали поверхности графиков ответа. Статистическая база (Van Der Borgh, K., et al., BIGL: Biochemically Intuitive Generalized Loewe null model for prediction of the expected combined effect compatible with partial agonism and antagonism; Scientific Reports, 7(1), 17935-1-

17935-9 (2017)) была включена в анализ в дополнение к нулевой модели HSA с двумя статистическими тестами: 1) полная поверхность ответа отличается от нулевой модели, 2) отдельная лунка отличается от нулевой модели.

Результаты.

Эффект лечения соединением 2 в комбинации с низкомолекулярными ингибиторами определяли в панели клеточных линий множественной миеломы. Соединение 2 подвергали скринингу в комбинации с 14 соединениями и синергия была рассчитана на всех скважинах для 6 клеточных линий. Дексаметазон и этопозид показали значительную синергию в комбинации с соединением 2 в пяти из шести тестируемых клеточных линий (фиг. 22). Комбинация соединения 2 с ингибиторами BET (4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-оном (соединение D), би-рабресибом и GSK525762A) также продемонстрировала синергическую активность в клетках ММ, с различной степенью синергии между тремя ингибиторами. Комбинация соединения 2 с AMG176 (ингибитором MCL-1) показала синергическую активность в трех клеточных линиях (KMS11, KMS12-PE, L363) в то время как комбинация соединения 2 с ACY241 и панобиностагом (ингибиторами гистондеацетилазы) была синергической в L363/OPM2-P10 и L363/H929-1051 соответственно. Соединение 2 в комбинации с 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фторбензонитрилом (соединение E) было синергическим в клетках L363 и KMS12-PE. MIK665, ингибитор MCL-1, был единственным соединением, которое не показало значительную синергию в 6 протестированных клеточных линиях ММ.

Выводы.

Обработка соединением 2 в комбинации с 12 из 14 низкомолекулярными соединениями продемонстрировала синергическую активность в по крайней мере одной или более тестируемых клеточных линиях ММ. Комбинация с шестью из соединений показала синергию по меньшей мере в 3 тестируемых клеточных линиях ММ (фиг. 22). Эти данные показывают, что комбинированное лечение соединением 2 с протестированными низкомолекулярными ингибиторами представляет собой потенциальную парадигму лечения ММ, в том числе некоторого с синергической активностью.

Пример 17. Противоопухолевая активность *in vivo* соединения 2 отдельно и в комбинации с дексаметазоном.

Способы.

Проводили исследование ксенотрансплантата с самками мышей SCID, имеющими опухоли множественной миеломы/плазмоцитомы устойчивые к леналидомиду, NCI-H929 (H929-1051). Самкам мыши SCID инокулировали подкожно клетки H929-1051 в область бока над правой задней ногой. После инокуляции животных, опухоль оставляли расти до объема около 100 мм³ до рандомизации. На 13 день после инокуляции опухолевых клеток мышей, несущих опухоли H929-1051 в диапазоне от 79 до 157 мм³, объединяли вместе и рандомизировали в различных группах лечения. Соединение 2 составляли в 2% ГПМЦ в воде (в виде суспензии). Дексаметазон составляли в 0,5% КМЦ/0,25% Tween 80 в деионизированной воде. Соединение 2 (0,1 мг/кг) и дексаметазон (0,5 мг/кг) вводили перорально один раз в сутки в течение всего исследования, начиная с 13 дня после инокуляции опухолевых клеток. В группе комбинации животные получали соединение 2 (0,1 мг/кг/сутки) и дексаметазон (0,5 мг/кг/сутки) одновременно в течение всего исследования, начиная с 13 дня после инокуляции опухолевых клеток. Опухоли измеряли два раза в неделю, используя штангенциркуль и объемы опухоли рассчитывали по формуле $W^2 \times L/2$. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного или 2-факторного дисперсионного анализа (ANOVA). Расчеты синергии проводили с использованием метода частичных множителей.

Результаты.

Лечение с помощью отдельного агента соединения 2 значительно ($p < 0,01$) ингибировало (-34%) рост опухоли H929-1051 множественной миеломы. Лечение дексаметазоном в качестве отдельного агента незначительно ингибировало рост опухоли ксенотрансплантата H929-1051 (-20%). Лечение соединением 2 при вводимой дозе 0,1 мг/кг в комбинации с дексаметазоном при дозе 0,5 мг/кг давало значительное ($p < 0,0001$) уменьшение объема опухоли по сравнению с контролем носителя, показывая уменьшение объема опухоли на 84%. В 2-факторном ANOVA с посттестом Бонферрони данная противоопухолевая активность комбинации была значительно лучше, чем у соединения 2 отдельно (84% против 34% TVR; $p < 0,0001$) или дексаметазон отдельно (84% против 20% TVR; $p < 0,0001$). Используя метод частичных множителей, определяли, что противоопухолевая активность комбинации соединения 2 при дозе 0,1 мг/кг и дексаметазона при дозе 0,5 мг/кг является синергической в уменьшении объема опухоли. (фиг. 23)

Вывод.

Соединение 2 в комбинации с дексаметазоном показывало синергию в уменьшении объема опухоли в модели опухоли множественной миеломы/плазмоцитомы NCI-H929, показывая, что комбинированное лечение соединением 2 и дексаметазоном показало синергическую противоопухолевую активность в модели ММ, устойчивой к леналидомиду. Соединение 2 усиливает апоптотическую активность дексаметазона, показывая потенциал снижения дозы дексаметазона при использовании в комбинации с соединением 2 в клинике.

Пример 18. Противоопухолевая активность *in vivo* соединения 2 отдельно и в комбинации с борте-

зомибом.

Способы.

Проводили исследование ксенотрансплантата с самками мышей SCID, имеющими опухоли множественной миеломы/плазмоцитомы устойчивые к леналидомиду, NCI-H929 (H929-1051). Самкам мыши SCID инокулировали подкожно клетки H929-1051 в область бока над правой задней ногой. После инокуляции животных опухоль оставляли расти до объема около 500 мм³ до рандомизации. На 31 день после инокуляции опухолевых клеток мышей, несущих опухоли H929-1051 в диапазоне от 366 до 535 мм³, объединяли вместе и рандомизировали в различных группах лечения. Соединение 2 составляли в 2% ГПМЦ в воде (в виде суспензии). Бортезомиб составляли в 1% ДМСО в физиологическом растворе (в виде раствора). Соединение 2 (1 мг/кг) вводили перорально один раз в сутки в течение 3 последовательных дней, начиная с 31 дня после инокуляции опухолевых клеток. Бортезомиб (1 мг/кг) вводили в виде однократной дозы внутривенно в день 31 после инокуляции опухолевых клеток. В группе комбинации животные получали соединение 2 (1 мг/кг/сутки) перорально в дни 31-33, и бортезомиб вводили внутривенно в виде однократной дозы в 31 день. На день 31 вводили бортезомиб за 1 час до первой дозы соединения 2. Опухоли измеряли два раза в неделю, используя штангенциркуль, и объемы опухоли рассчитывали по формуле $W^2 \times L/2$. Животных умерщвляли, когда объем опухоли достигал predetermined конечной точки приблизительно 2000 мм³. Статистический анализ проводили вплоть до дня 50 с использованием однофакторного или 2-факторного дисперсионного анализа (ANOVA). Расчеты синергии проводили с использованием метода частичных множителей.

Результаты.

Лечение с помощью отдельного агента соединения 2 при введении один раз в сутки в течение 3 последовательных дней (QD×3) в дни 31-33 после инокуляции опухолевых клеток значительно ($p < 0,0001$) ингибировало (-44%) рост опухоли H929-1051 множественной миеломы в день 50. С течением времени опухоли животных, обработанные соединением 2 (1 мг/кг), росли и достигали приблизительно 2000 мм³ к дню 58. Лечение бортезомибом в качестве отдельного агента при введении в виде однократной дозы в день 31 значительно ($p < 0,0001$) ингибировало (-60%) рост опухоли ксенотрансплантата H929-1051 в день 50. С течением времени опухоли животных, обработанные бортезомибом (1 мг/кг), росли и достигали приблизительно 2000 мм³ к дню 66. Лечение соединением 2 при вводимой дозе 1 мг/кг (QD×3) при введении в комбинации с бортезомибом при дозе 1 мг/кг (однократная доза) давало значительное ($p < 0,0001$) уменьшение объема опухоли по сравнению с контролем носителя, показывая уменьшение объема опухоли на 98% к дню 50. В 2-факторном ANOVA с пост-тестом Бонферрони, данная противоопухолевая активность комбинации была значительно лучше, чем у соединения 2 отдельно (98% против 44% TVR; $p < 0,0001$) или бортезомиб отдельно (98% против 60% TVR; $p < 0,0001$). Используя метод частичных множителей, определяли, что противоопухолевая активность комбинации соединения 2 при дозе 1 мг/кг и дексаметазона при дозе 1 мг/кг является синергической в уменьшении объема опухоли. Неожиданно, но к дню 53 после инокуляции опухолевых клеток 7 из 9 животных, которых лечили комбинацией соединения 2 и бортезомиба, стали свободными от опухоли и оставались свободными от опухоли. (фиг. 24)

Вывод: соединение 2 в комбинации с бортезомибом показывало синергию в уменьшении объема опухоли в модели опухоли плазмоцитомы NCI-H929, устойчивой к леналидомиду, и неожиданно привело к животным, свободным от опухоли.

Пример 19. Фаза 1 клинического исследования - рецидивирующая и рефрактерная множественная миелома.

Фаза 1 многоцентрового открытого исследования проводится с целью оценки безопасности, фармакокинетики и предварительной эффективности соединения 2 в комбинации с дексаметазоном у субъектов с рецидивирующей и рефрактерной множественной миеломой (PPMM).

Цели.

Основная цель данного исследования заключается в оценке фармакокинетики (ФК), безопасности/переносимости и определении максимально переносимой дозы (MTD)/рекомендуемой дозы этапа 2 (RP2D) соединения 2 в комбинации с дексаметазоном в соответствии с минимум двумя графиками дозирования соединения 2. Вторая цель заключается в оценке предварительной эффективности соединения 2 в комбинации с дексаметазоном.

План клинического исследования.

Это открытое, многоцентровое, международное, исследование фазы 1 с целью оценки безопасности, ФК/ФД и предварительной эффективности соединения 2 в комбинации с дексаметазоном у субъектов с PPMM. Все подходящие субъекты должны провалить, иметь непереносимость или иначе не являться кандидатами доступных известных методов лечения, чтобы подтвердить клиническое преимущество в PPMM.

Исследование проводится в два этапа. На этапе 1 оценивают ФК/ФД и безопасность эскалации доз соединения 2 с одновременной стандартной дозой дексаметазона и определяют MTD/RP2D для комбинации при введении в соответствии с минимум двумя различными графиками дозирования. Этап 2 состоит из несравнительной расширенной когорты (коhort) соединения 2 при RP2D плюс дексаметазон для

обоих графиков дозирования. В дополнение к оценке безопасности, ФК и ФД, все субъекты проходят ежемесячную оценку ответа в соответствии с критериями равномерного ответа Международной рабочей группы по миеломе (IMWG) (Rajkumar et al., Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. Blood, 2011, 117(18):4691-5; Kumar et al., International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma, Lancet Oncology, 2016, 17:e328-46) и могут продолжать исследование лечения до прогрессирования заболевания, непереносимой токсичности или принятия решения врачом или субъектом о прекращении исследования лечения.

Исследование проводится в соответствии с Международной конференцией по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для человека (ICH)/надлежащей клинической практикой (GCP) и применимыми нормативными требованиями.

Этап 1 (повышение дозы). Когорты субъектов с РРММ получают возрастающие дозы соединения 2 плюс фиксированную дозу дексаметазона (40 мг/доза; 20 мг/доза у пациентов ≥ 75 лет) для оценки его безопасности, MTD/РP2D и профилей ФК/ФД. На этапе 1 оценивают минимум два различных графика дозирования, первый, 28-дневный цикл, состоящий из 10 последовательных дней дозирования один раз в сутки (QD) с последующими 4 днями без лечения $\times 2$ каждый (упоминается как 20/28 график). Вторым графиком состоит из дозирования два раза в сутки (BID) в течение 3 последовательных дней с последующими 11 днями без исследуемого лечения $\times 2$ каждый (упоминается как 6/28 график). Начальные когорты дозирования получают 0,1 мг/сутки соединения 2 QD в 20/28 графике и 0,2 мг BID в 6/28 графике. Распределение субъектов назначается квотой Спонсора при наличии слотов субъектов для одного или обоих графиков. Переключение между графиками дозирования не допускается. Дополнительные графики дозирования (например, 5 дней дозирования соединения 2 с последующими 9 днями без лечения $\times 2$ или 7 дней дозирования с последующими 7 днями без лечения $\times 2$ на цикл из 28 дней) могут быть изучены в соответствии с условиями поправок протокола в ожидании результатов первоначальной безопасности и результатов ФК/ФД в соответствии с 20/28 и 6/28 графиками.

Для всех графиков дозирования цикл 1, дни 1-28 представляет собой период оценки токсичности, ограничивающей дозу (DLT), для целей определения MTD. Субъекты являются поддающимися оценке DLT, если они получают предписанную дозу соединения 2 по меньшей мере 16 из 20 дней дозирования в 20/28 графике и по меньшей мере 5 из 6 дней дозирования (10 доз) в 6/28 графике в цикле 1 или испытывают DLT. Субъекты, не поддающиеся оценке DLT, заменяются.

В каждом графике когорты трех или более субъектов получают соединение 2 в дозах, увеличивающихся с шагом 100% в последующих когортах до появления двух неблагоприятных событий 2 класса, возникающих при лечении, которые не могут быть четко и неопровержимо отнесены к посторонним причинам. После этого шаг увеличения дозы не должен превышать 50%, пока не наступит появление первой DLT. Используются Байесовские методологии увеличения дозы с помощью логистической регрессии после появления первой DLT в любом графике дозирования, с назначенной дозой соединения 2, количеством доз в сутки (QD против BID) и количеством последовательных дней дозирования для каждого графика (3 против 10) в качестве ковариант. Целевая скорость токсичности для комбинации соединения 2 плюс дексаметазона составляет 20% для всех графиков.

В течение периода оценки DLT не допускается увеличение дозы среди субъектов; однако в цикле 2 и далее для субъектов без проявления признаков прогрессирования заболевания, которые переносят свою назначенную дозу соединения 2, возможно (по усмотрению исследователя и с консультацией медицинского наблюдателя исследования) увеличение до наивысшего уровня дозы, который адекватно переносился по меньшей мере одной когортой субъектов в пределах назначенного графика дозирования.

Этап 2 (расширение когорты). После завершения этапа 1 проводят исследование несравнительного расширения соединения 2 плюс дексаметазона в 20 субъектах на график дозирования для дальнейшей оценки его безопасности, ФД и эффективности при RP2D и графике.

После определения RP2D для соединения 2 плюс дексаметазона также может быть начата параллельно оценка безопасности/переносимости, ФК и предварительной эффективности соединения 2/дексаметазона в комбинации с другими агентами против миеломы, представляющими интерес, например анти-CD38 антитело в одной или нескольких когортах субъектов с различным анамнезом лечения и/или прогностических особенностей, как часть данного протокола.

Популяция для исследования. Субъекты ≥ 18 лет с ММ, которые являются рефрактерными к их последней линии лечения, провалили или имеют непереносимость или иначе не являются кандидатами доступных известных методов лечения, чтобы подтвердить клиническое преимущество для пациентов с рецидивирующим и рефрактерным заболеванием, имеют статус общего состояния Восточной объединенной онкологической группы (ECOG PS) 0-2, измеримое заболевание, и адекватный костный мозг, почечную и сердечную функцию, могут записаться. Субъекты с анамнезом аллогенной трансплантации, не- или олигосекреторной ММ, лейкоза плазматических клеток или первичной рефрактерной ММ (т.е. в анамнезе нет хотя бы незначительного ответа на предшествующую схему лечения) исключаются.

Критерии включения.

Субъекты должны удовлетворять следующим критериям для зачисления в исследование.

1. Возраст субъекта ≥ 18 лет на момент подписания информированного согласия (ICF).
2. Субъект должен понимать и добровольно подписать ICF до проведения любых оценок/процедур, связанных с исследованием.

3. Субъект готов и способен придерживаться режима посещения при исследовании и других требований по протоколу.

4. Показатель общего состояния в соответствии с Восточной кооперативной онкологической группой (ECOG) 0, 1 или 2.

5. Субъекты должны иметь документированный диагноз ММ и измеримое заболевание при регистрации. Измеримое заболевание определяется как

количество М-белка $\geq 0,5$ г/дл по данным измерения sPEP или ≥ 200 мг/24 ч накопление в моче по данным uPEP, или

уровни FLC в сыворотке > 100 мг/л, вовлеченными легкие цепи и аномальное соотношение кап-па/лямбда (κ/λ) у субъектов без обнаруживаемого М-белка в сыворотке или моче, или

для субъектов с миеломой иммуноглобулина класса А (IgA), чье заболевание может быть надежно измерено только путем количественного измерения иммуноглобулинов, уровень IgA в сыворотке $\geq 0,50$ г/дл.

6. Все субъекты должны

иметь документированное прогрессирование заболевания через или в течение 60 дней с момента последней дозы последнего лечения миеломы и

провалить лечение, иметь непереносимость или иначе не являться кандидатом доступных известных методов лечения, чтобы подтвердить клиническое преимущество для пациентов с RPM. Примечание: предшествующие линии лечения должны включать (как минимум) ингибитор протеасом и агент, модулирующий цереброн, вводимые отдельно (в любом порядке) или вместе.

7. Субъекты должны иметь следующие лабораторные показатели:

абсолютное число нейтрофилов (ANC) $\geq 1.25 \times 10^9$ клеток/л без поддержки фактора роста в течение ≥ 7 дней (≥ 14 дней для пэгфилграстима);

гемоглобин (Hgb) ≥ 8 г/дл;

тромбоциты (plt) $\geq 75 \times 10^9$ клеток/л без переливания крови в течение ≥ 7 дней ($\geq 50 \times 10^9$ клеток/л для субъектов с $> 50\%$ плазматических клеток в костном мозге);

корригированный кальций в сыворотке $\leq 13,5$ мг/дл ($\leq 3,4$ ммоль/л);

24-ч клиренс креатинина (CrCl) ≥ 45 мл/мин;

AST/SGOT и ALT/SGPT $\leq 3,0 \times$ верхняя граница нормального диапазона (ULN);

сывороточный билирубин $\leq 1,5 \times$ ULN;

мочевая кислота $\leq 7,5$ мг/дл (446 мкмоль/л);

PT/INR $< 1,5 \times$ ULN и частичное тромбопластиновое время (PTT) $< 1,5 \times$ ULN (для субъектов, не получающих терапевтической антикоагуляции).

Примечание: субъекты, получающие лечение тромбоэмболического события, которое произошло $>$ за 3 месяца до регистрации, являются подходящими до тех пор, пока они находятся на стабильном режиме антикоагуляции варфарином, низкомолекулярным гепарином или на другом утвержденном терапевтическом режиме антикоагуляции.

8. Женщины детородного потенциала (FCBP) должны

иметь два отрицательных теста на беременность, проверяемых исследователем до начала исследования лечения;

должны согласиться на постоянный тест на беременность в ходе исследования и после прекращения соединения 2.

Это выполняется, даже если субъект практикует истинное воздержание* от гетеросексуального контакта.

Либо совершают истинное воздержание* от гетеросексуального контакта (что должно быть проверено на ежемесячной основе и документировано) или согласны использовать и быть в состоянии следовать двум надежным формам контрацепции без перерывов, за 28 дней до начала соединения 2, во время исследования лечения (в том числе во время перерывов дозирования) и в течение 28 дней после прекращения исследования лечения.

Примечание: женщина детородного потенциала (FCBP) является женщиной, которая 1) достигла менструации в какой-то момент, 2) не претерпела гистерэктомию или двустороннюю овариэктомию или 3) не была естественно постменопаузальной (аменорея после терапии рака не исключает детородный потенциал) в течение по крайней мере 24 месяцев подряд (т.е. имела менструацию в любое время в предшествующие 24 месяцев подряд).

9. Субъекты-мужчины должны

практиковать истинное воздержание* (что должно быть проверено на ежемесячной основе) или согласиться на использование презерватива во время полового контакта с беременной женщиной или жен-

щиной детородного потенциала, участвуя в исследовании (даже во время перерывов дозировки) и по крайней мере в течение 3 месяцев после прекращения соединения 2, даже если он подвергся успешной вазэктомии.

*Полное воздержание является приемлемым при условии, что это соответствует предпочитаемому и обычному образу жизни субъекта. Периодическое воздержание (например, календарная овуляция, симптотермальный метод, методы после овуляции) и прерванный половой акт (отмена) не приемлемы как способы контрацепции.

10. Мужчины должны согласиться воздержаться от донорства спермы при приеме соединения 2 и в течение 90 дней после его прекращения.

11. Все субъекты должны согласиться воздержаться от донорства крови при приеме соединения 2 и в течение 28 дней после его прекращения.

Критерии исключения.

Наличие любого из следующего исключает регистрацию субъекта.

1. У субъекта имеется значимое медицинское состояние, лабораторная аномалия или психиатрическое заболевание, которые могут препятствовать субъекту в участии в исследовании.

2. У субъекта имеется любое состояние, в том числе наличие лабораторных аномалий, которое подвергает субъекта неприемлемому риску, если он/она должны были участвовать в исследовании.

3. Субъект страдает от любого состояния, при котором нарушается возможность интерпретировать данные исследования.

4. Субъект страдает от не- или олигосекреторной множественной миеломы.

5. Субъект страдает от лейкоза плазматических клеток или активного лептоменингеального миеломатоза.

6. Субъект страдает от системного амилоидоза легкой цепи или полинейропатии, синдрома органо-мегалии, эндокринопатии, моноклональной гаммапатии и поражений кожи (POEMS).

7. Субъект страдает от миеломы иммуноглобулина класса М (IgM).

8. В анамнезе субъекта есть аллогенная трансплантация костного мозга.

9. Субъект проходит диализ.

10. Субъекты с периферической нейропатией ≥ 2 -й степени.

11. Субъекты с заболеванием желудочно-кишечного тракта, которое может значительно изменить поглощение соединения 2.

12. Субъект имеет ослабленную сердечную функцию или клинически значимое сердечное заболевание, в том числе любое из следующих:

LVEF < 45%, как определено с помощью ЭХО или сканированного изображения MUGA при скрининге;

полная левая ножка пучка Гиса, двухпучковая блокада или другой клинически значимый аномальный показатель электрокардиограммы (ЭКГ) на скрининге;

удлинении интервала QT на скрининге ЭКГ, определенное путем многократной демонстрации интервала QTc > 480 мс с использованием коррекции формулы коррекции QT Фредерика; анамнез или текущие факторы риска пируэтной желудочковой тахикардии (например, сердечная недостаточность, гипокалиемия или семейная история синдрома удлиненного QT); и одновременное введение препаратов, которые продлевают интервал QT/QTc;

застойная сердечная недостаточность (класс III-IV, по функциональной классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации);

инфаркт миокарда $\leq$ за 6 месяцев до начала введения соединения 2;

нестабильная или плохо контролируемая стенокардия, включающая стенокардию Принцметала.

13. Одновременное введение сильных модуляторов CYP3A.

14. Субъект получал предшествующее системное лечение миеломы (одобренное или исследовательское) за ≤ 5 периодов полувыведения или 4 недели перед началом введения соединения 2, независимо от того, какой из них короче.

15. Субъект подвергался радикальной хирургии $\leq$ за 2 недели перед началом введения соединения 2.

Примечание: субъекты должны оправиться от любых клинически значимых последствий недавней хирургической операции.

16. Субъект является беременной или кормящей женщиной или намеревается стать беременной во время участия в исследовании.

17. У субъекта имеется известная инфекция вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

18. Субъект имеет известную активную или хроническую инфекцию вируса гепатита В или С (ВГВ/ВГС).

19. Субъект имеет анамнез одновременной вторичной формы рака, требующей активного длительного системного лечения.

20. Субъект имеет анамнез предшествующего злокачественного новообразования, отличного от ММ, если субъект не был свободен от болезни в течение ≥ 3 лет, за исключением следующих неинвазив-

ных злокачественных новообразований, подвергавшихся терапии с целью излечения:

- базальный или плоскоклеточный рак кожи;
- преинвазивный рак шейки матки или груди;
- рак мочевого пузыря 1 стадии;

непредвиденные гистологические результаты локализованного рака простаты, такого как опухоль стадии 1a или 1b (T1a или T1b), по классификации системы классификации злокачественных опухолей (ТНМ) злокачественных опухолей или рака простаты, который был обработан с целью излечения.

21. В анамнезе субъекта есть анафилаксия к талидомиду, леналидомиду, помалидомиду или дексаметазону.

22. У субъекта имеется или подозревается гиперчувствительность к вспомогательным веществам, содержащимся в составе соединения 2 или дексаметазона.

23. Субъект претерпел одно из следующего в течение 14 дней до начала соединения 2:

- плазмаферез;

- лучевая терапия кроме местной терапии для облегчения симптомов, костных повреждений, связанных с ММ.

24. Субъект получал иммунодепрессивное лечение в течение 14 дней до первой дозы соединения 2. Следующее является исключениями из данных критериев:

- интраназальные, ингаляционные, топические или местные инъекции кортикостероидов (например, внутрисуставная инъекция);

- системное лечение кортикостероидами в дозах, не превышающих 10 мг/день преднизолона или эквивалент;

- стероиды как премедикация для реакций гиперчувствительности (например, премедикация сканирования компьютерной томографии (КТ)).

25. Субъект не может или не хочет пройти протокол профилактики венозной тромбоэмболии (ВТЭ).

Продолжительность исследования: средняя продолжительность участия в исследовании для субъекта, как ожидается, составит около 6 месяцев. Ожидается, что полная регистрация займет примерно 21 месяц до завершения (18 месяцев на этап 1 и 3 месяца на этап 2). Ожидается, что завершение активного лечения и последующее наблюдение после лечения займет дополнительно от 6 до 12 месяцев. Ожидается, что все исследование будет длиться примерно 33 месяца.

Окончание испытания определяется как дата последнего визита последнего субъекта с целью завершения наблюдения после лечения или дата получения последнего результата наблюдения от последнего субъекта, который требуется для первичного, вторичного и/или исследовательского анализа, как указано в протоколе, в зависимости от того, что наступит позднее.

Исследуемое лечение: соединение 2 вводят перорально либо один раз в день для субъектов, зарегистрированных на график 20/28, либо два раза в день для субъектов, зарегистрированных на график 6/28. Для субъектов, зарегистрированных на график дозирования 20/28, соединение 2 вводят утром по крайней мере с 240 мл воды после ночного голодания продолжительностью не менее 6 ч. Субъекты должны воздерживаться от еды или приема других лекарств в течение по крайней мере 2 ч после каждой утренней дозы. Субъекты, зарегистрированные на график 6/28 следуют вышеупомянутым инструкциям, как указано для графика 20/28 для первой дозы каждого дня дозирования. Вторую дозу вводят через 12±2 ч после утренней дозы, по крайней мере через 4 ч после и за 2 ч до приема пищи. В качестве примера, субъекты, зарегистрированные на график дозирования 6/28, возможно, могут получить начальную дозу соединения 2 в 7:00, а затем завтрак в 9:00, обед в полдень, вторую дозу соединения 2 не ранее 17:00, и ужин на 2 часа позже (т.е., не ранее 19:00). Обратите внимание, что только в цикле 1 соединение 2 вводят в дни от 1 до 3 (утром и вечером), день 14 (только вечер), дни 15 и 16 (утром и вечером) и день 17 (только утром).

Для обоих графиков дозирования дексаметазон вводят с соединением 2 натошак или по крайней мере через 2 ч после соединения 2 с пищей (за исключением дней оценки ФК, когда оба должны быть введены в то же время). Дексаметазон, вводимый в дни 1, 8 (день 10 только в цикле 1), 15 и 22 или дни 1, 3, 15 (день 14 только в цикле 1) и 17 каждого цикла в графиках дозирования 20/28 или 6/28, соответственно, может быть введен натошак одновременно с соединением 2. В альтернативном варианте (у субъектов с анамнезом раздражения желудка, индуцированного дексаметазоном) оно может быть введено с пищей по меньшей мере через 2 ч после соединения 2, за исключением дней оценки ФК, когда оба должны быть введены одновременно всем субъектам. Для всех субъектов, каждая доза дексаметазона составляет 40 мг для субъектов <75 лет и 20 мг для субъектов ≥75 лет.

Обзор ключевых показателей оценки эффективности.

Первичная переменная эффективности представляет собой лучшую частоту общего ответа (ЧОО) определяемую как доля субъектов, чей лучший ответ ≥ЧО, в соответствии с критериями равномерного ответа IMWG (Rajkumar et al Blood 2011; 117(18):4691-5). Субъекты проходят оценку ответа ежемесячно. Ответ миеломы определяется исследователем исследовательского центра на основании лабораторных исследований (электрофорез белков сыворотки (sPEP), электрофорез белков в моче (uPEP), электрофорез с иммунофиксацией (IFE), уровни свободных легких цепей (sFLC) сыворотки, количественный анализ

иммуноглобулина А (IgA), анализ костного мозга для количественной оценки плазматических клеток, в зависимости от обстоятельств), проведенных в центральной справочной лаборатории и/или локально, (т.е. скорректированный кальций сыворотки, позитронно-эмиссионной томографии/компьютерного сканирования (ПЭТ/КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ) для оценки плазмоцитомы и/или КТ или обследования скелета для оценки поражения костей). Дополнительные переменные эффективности включают время до ответа (время от 1-й дозы соединения 2 до первой документации ответа $\geq$ ЧО), продолжительность ответа (время от первой документации ответа ($\geq$ ЧО) до первой документации прогрессирования заболевания или смерти) и выживаемость без прогрессирования (время от 1-й дозы соединения 2 до первого появления прогрессирования заболевания или смерти от любой причины).

Все субъекты безопасности с действительной базовой линией и по меньшей мере одной оценки ответа после базовой линии включены в анализ эффективности. Если лечение прекращается по различным причинам, за исключением прогрессирования заболевания, пациентов просят продолжить оценки ответа в соответствии с установленным графиком оценки до прогрессирования, отзыва согласия, смерти или начала новой системной терапии против миеломы, в зависимости от того, что происходит ранее.

Обзор ключевых показателей оценки безопасности.

Переменные безопасности для данного исследования включают неблагоприятные события, возникающие при лечении (TEAE), и изменения от базовой линии в физических результатах/жизненно важных признаках, выбранных лабораторных анализах и 12-канальных электрокардиограммах (ЭКГ). Дополнительные показатели безопасности включают степень экспозиции исследуемого препарата (обоих соединений 2 и дексаметазона), оценки применения сопутствующих лекарственных препаратов, а также тест на беременность для женщин детородного потенциала (ЖДП).

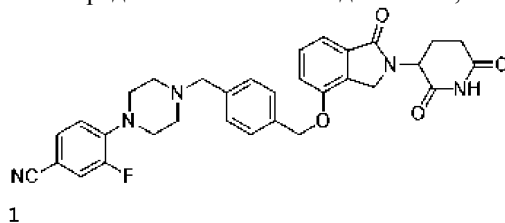
Обзор фармакокинетических оценок.

Профили ФК (начальной дозы и устойчивого состояния) оценивали для соединения 2, его R-энантиомера (соединение 3) и дексаметазона. Анализы экспозиция-ответ могут быть проведены по мере необходимости для помощи в идентификации RP2D соединения 2.

Варианты осуществления, описанные выше предназначены только в качестве примеров, и специалистам в данной области будет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных соединений, материалов и методик. Предполагается, что такие эквиваленты включены в объем данного изобретения и охватываются прилагаемой формулой изобретения.

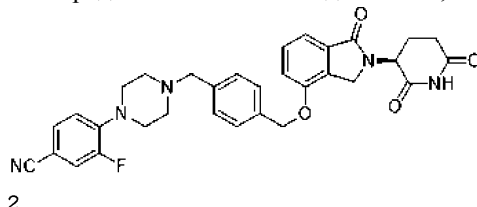
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, где соединение представляет собой соединение 1, имеющее формулу



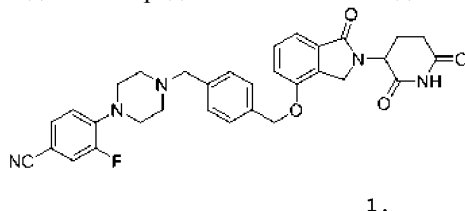
или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение, где соединение представляет собой соединение 2, имеющее формулу



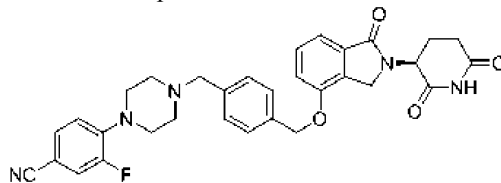
или его таутомер, изотополог или фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по п.1, где соединение представляет собой соединение 1, имеющее формулу



4. Соединение по п.1, где соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль соединения 1.

5. Соединение по п.2, где соединение представляет собой соединение 2, имеющее формулу



2.

6. Соединение по п.2, где соединение представляет собой фармацевтически приемлемую соль соединения 2.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

8. Способ лечения множественной миеломы, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-6 пациенту, нуждающемуся в этом.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что множественная миелома является рецидивирующей, рефрактерной или резистентной.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что множественная миелома является рефрактерной или резистентной к леналидомиду.

11. Способ по п.9, отличающийся тем, что множественная миелома является рефрактерной или резистентной к помалидомиду.

12. Способ по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что множественная миелома является рефрактерной или резистентной к одной, двум или трем терапиям против множественной миеломы.

13. Способ по п.8, отличающийся тем, что множественная миелома характеризуется мутацией p53, гомозиготной делецией p53, активацией одного или нескольких онкогенных драйверов или одной или несколькими хромосомными транслокациями.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что мутация p53 представляет собой мутацию а Q331, R273H, K132N, R337L, W146, S261T, E286K, R175H, E258K или A161T; один или несколько онкогенных драйверов выбраны из группы, состоящей из C-MAF, MAFB, FGFR3, MMset, Циклина D1 и Циклина D; и хромосомная транслокация представляет собой t(14;16), t(14;20), t(4;14), t(11;14), t(6;20), t(20;22) или t(16; 22).

15. Способ по п.8, отличающийся тем, что множественная миелома является впервые диагностированной множественной миеломой.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что множественная миелома является впервые диагностированной множественной миеломой с возможностью трансплантации.

17. Способ по любому из пп.8-16, отличающийся тем, что соединение вводят в качестве индукционной терапии.

18. Способ по любому из пп.8-16, отличающийся тем, что соединение вводят в качестве укрепляющей терапии.

19. Способ по любому из пп.8-16, отличающийся тем, что соединение вводят в качестве поддерживающей терапии.

20. Способ по любому из пп.8-19, отличающийся тем, что соединение вводят в количестве от около 0,1 мг до около 2 мг в сутки.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что соединение вводят в количестве около 1 мг в сутки.

22. Способ по любому из пп.8-21, отличающийся тем, что соединение вводят в дни 1-10 и дни 15-24 28-дневного цикла.

23. Способ по любому из пп.8-21, отличающийся тем, что соединение вводят в дни 1-3 и дни 15-18 28-дневного цикла.

24. Способ по любому из пп.8-21, отличающийся тем, что соединение вводят в дни 1-7 и дни 15-21 28-дневного цикла.

25. Способ по любому из пп.8-21, отличающийся тем, что соединение вводят в дни 1-14 21-дневного цикла.

26. Способ по любому из пп.8-21, отличающийся тем, что соединение вводят в дни 1-21 28-дневного цикла.

27. Способ по любому из пп.8-26, дополнительно включающий введение второго активного агента, где второй активный агент представляет собой дексаметазон, даратумумаб, ингибитор протеасом, ингибиторы гистондеацетилазы, химиотерапевтический агент, ингибитор Bcl-2, ингибитор Mcl-1, ингибитор BET, или ингибитор LSD-1, или их комбинацию.

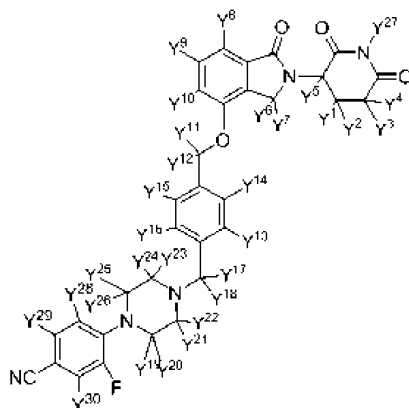
28. Способ по п.27, отличающийся тем, что второй активный агент представляет собой ACY241, AMG176, бирабрезиб, 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он, 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фторбензонитрил, циклофосфамид, дексаметазон, доксорубин, этопозид, GSK525762A, MIK665,

панобиностат, венетоклакс или винкристин.

29. Способ по п.27, отличающийся тем, что второй активный агент представляет собой дексаметазон.
30. Способ по п.27, отличающийся тем, что второй активный агент представляет собой бортезомиб.
31. Способ по п.27, отличающийся тем, что второй активный агент представляет собой карфилзомиб.
32. Способ по п.27, отличающийся тем, что второй активный агент представляет собой даратумамаб.
33. Способ по п.27, отличающийся тем, что второй активный агент представляет собой комбинацию дексаметазона и бортезомиба.
34. Способ по п.27, отличающийся тем, что второй активный агент представляет собой комбинацию дексаметазона и даратумамаба.
35. Способ по п.27, отличающийся тем, что второй активный агент представляет собой комбинацию дексаметазона и карфилзомиба.
36. Применение соединения по любому из пп.1-6 для лечения множественной миеломы.
37. Применение по п.36, где множественная миелома является рецидивирующей, рефрактерной или резистентной.
38. Применение по п.37, где множественная миелома является рефрактерной или резистентной к леналидомиду.
39. Применение по п.37, где множественная миелома является рефрактерной или резистентной к помалидомиду.
40. Применение по любому из пп.37-39, где множественная миелома является рефрактерной или резистентной к одной, двум или трем терапиям против множественной миеломы.
41. Применение по п.36, где множественная миелома характеризуется мутацией p53, гомозиготной делецией p53, активацией одного или нескольких онкогенных драйверов или одной или несколькими хромосомными транслокациями.
42. Применение по п.41, где мутация p53 представляет собой мутацию а Q331, R273H, K132N, R337L, W146, S261T, E286K, R175H, E258K или A161T; один или несколько онкогенных драйверов выбраны из группы, состоящей из C-MAF, MAFB, FGFR3, MMset, Циклина D1 и Циклина D; и хромосомная транслокация представляет собой t(14;16), t(14;20), t(4;14), t(11;14), t(6;20), t(20;22) или t(16; 22).
43. Применение по п.36, где множественная миелома является впервые диагностированной множественной миеломой.
44. Применение по п.43, где множественная миелома является впервые диагностированной множественной миеломой с возможностью трансплантации.
45. Применение по любому из пп.36-44, где соединение вводят в качестве индукционной терапии.
46. Применение по любому из пп.36-44, где соединение вводят в качестве укрепляющей терапии.
47. Применение по любому из пп.36-44, где соединение вводят в качестве поддерживающей терапии.
48. Применение по любому из пп.36-47, где соединение вводят в количестве от около 0,1 мг до около 2 мг в сутки.
49. Применение по п.48, где соединение вводят в количестве около 1 мг в сутки.
50. Применение по любому из пп.36-49, где соединение вводят в дни 1-10 и дни 15-24 28-дневного цикла.
51. Применение по любому из пп.36-49, где соединение вводят в дни 1-3 и дни 15-18 28-дневного цикла.
52. Применение по любому из пп.36-49, где соединение вводят в дни 1-7 и дни 15-21 28-дневного цикла.
53. Применение по любому из пп.36-49, где соединение вводят в дни 1-14 21-дневного цикла.
54. Применение по любому из пп.36-49, где соединение вводят в дни 1-21 28-дневного цикла.
55. Применение по любому из пп.36-54, где соединение вводят в комбинации со вторым активным агентом, где второй активный агент представляет собой дексаметазон, даратумамаб, ингибитор протеасом, ингибиторы гистондеацетилазы, химиотерапевтический агент, ингибитор Bcl-2, ингибитор Mcl-1, ингибитор BET, или ингибитор LSD-1, или их комбинацию.
56. Применение по п.55, где второй активный агент представляет собой ACY241, AMG176, бирабресиб, 4-[2-(циклопропилметокси)-5-(метансульфонил)фенил]-2-метилизохинолин-1(2H)-он, 4-[2-(4-аминопиперидин-1-ил)-5-(3-фтор-4-метоксифенил)-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-4-ил]-2-фторбензонитрил, циклофосфамид, дексаметазон, доксорубин, этопозид, GSK525762A, MIK665, панобиностат, венетоклакс или винкристин.
57. Применение по п.55, где второй активный агент представляет собой дексаметазон.
58. Применение по п.55, где второй активный агент представляет собой бортезомиб.
59. Применение по п.55, где второй активный агент представляет собой карфилзомиб.
60. Применение по п.55, где второй активный агент представляет собой даратумамаб.
61. Применение по п.55, где второй активный агент представляет собой комбинацию дексаметазона и бортезомиба.
62. Применение по п.55, где второй активный агент представляет собой комбинацию дексаметазона и даратумамаба.

63. Применение по п.55, где второй активный агент представляет собой комбинацию дексаметазона и карфилзомиба.

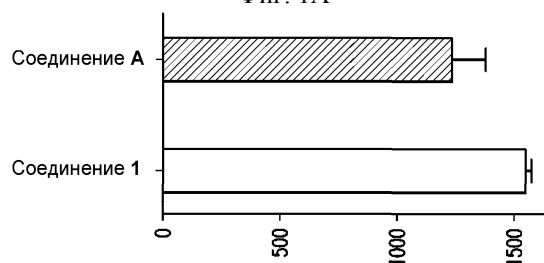
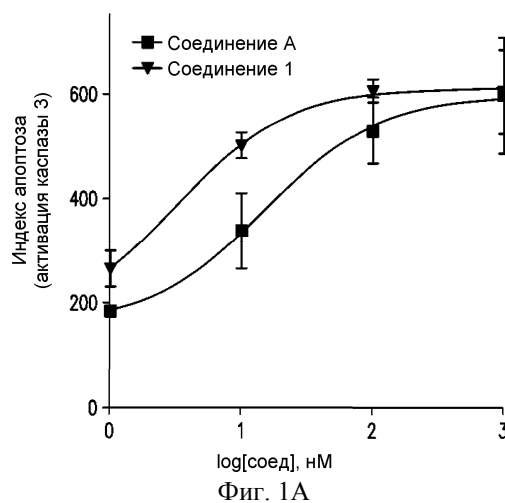
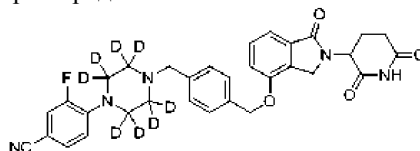
64. Соединение формулы



где один или несколько атомов Y являются атомом или атомами водорода, изотопно обогащенными дейтерием, и любой оставшийся атом или атомы Y являются необогащенными атомами или атомом водорода;

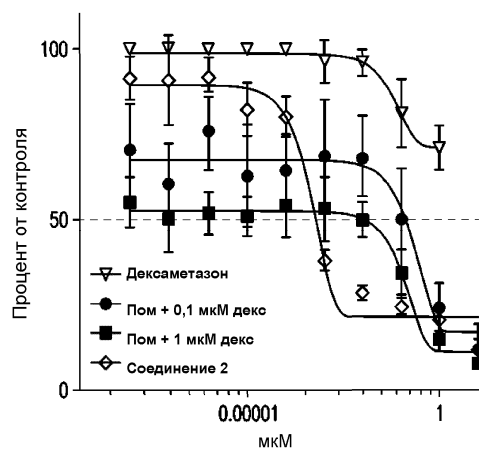
или его энантиомер, смесь энантиомеров, таутомер или фармацевтически приемлемая соль.

65. Соединение по п.64, которое представляет собой

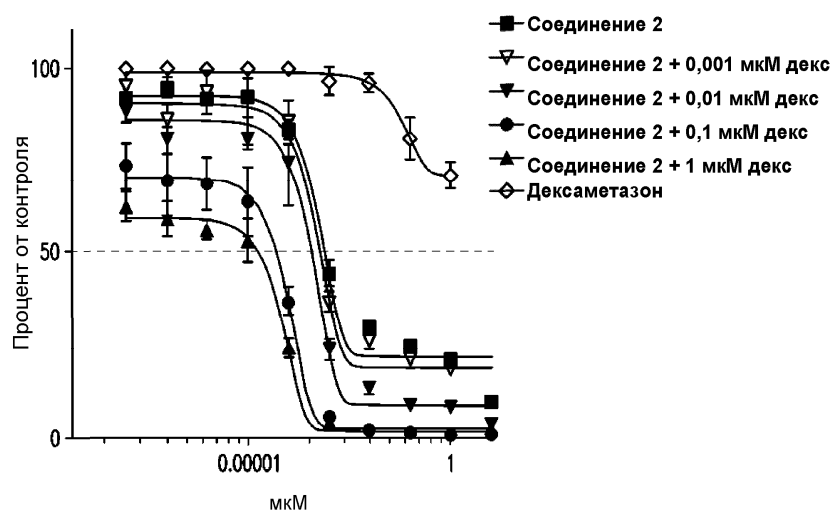


Соед. №	Всего AU
Соед. А	1232
Соед. 1	1547,5

Фиг. 1В

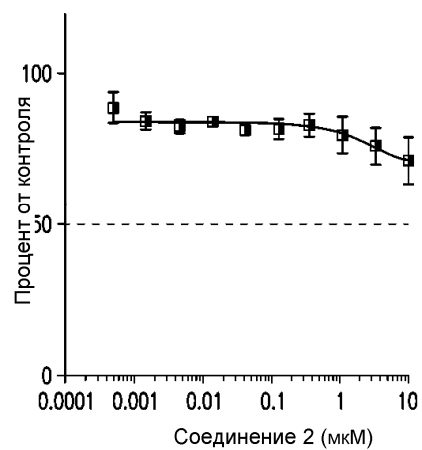


Фиг. 2А

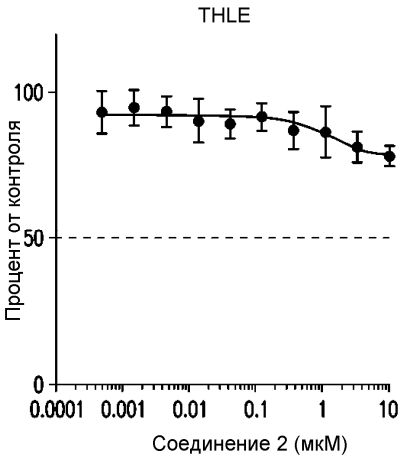


Фиг. 2В

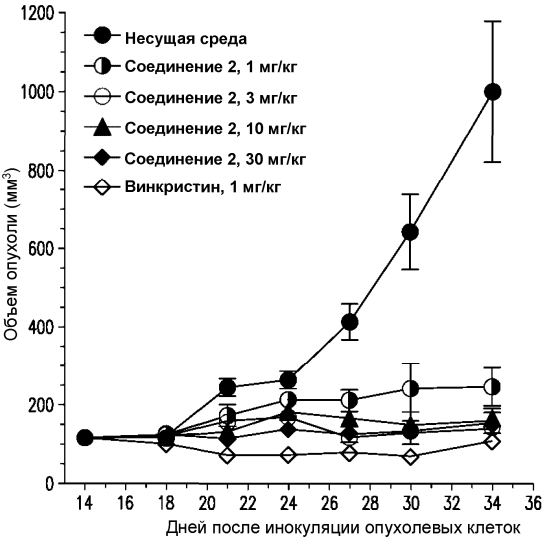
Нестимулированные РВМС



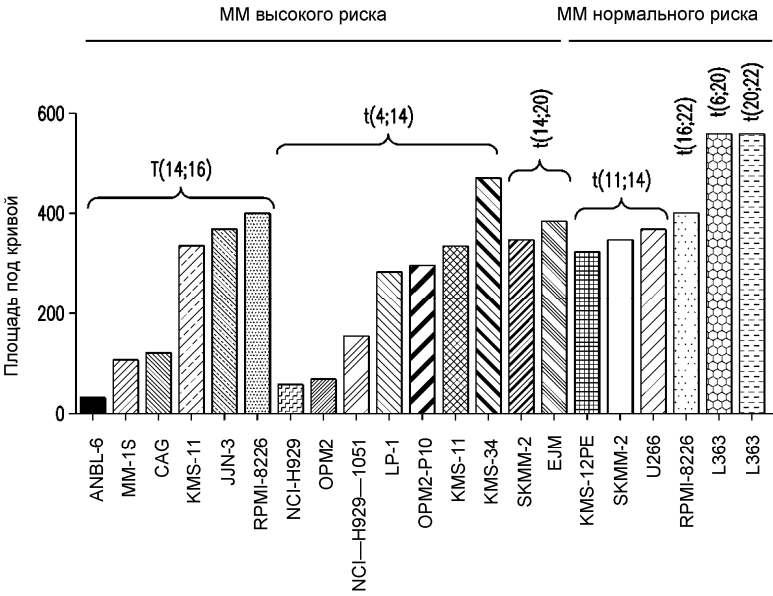
Фиг. 3А



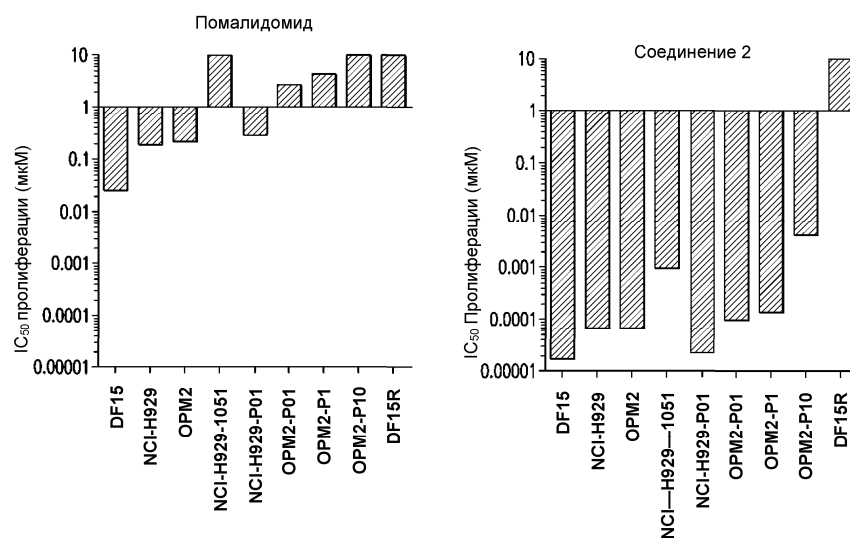
Фиг. 3В



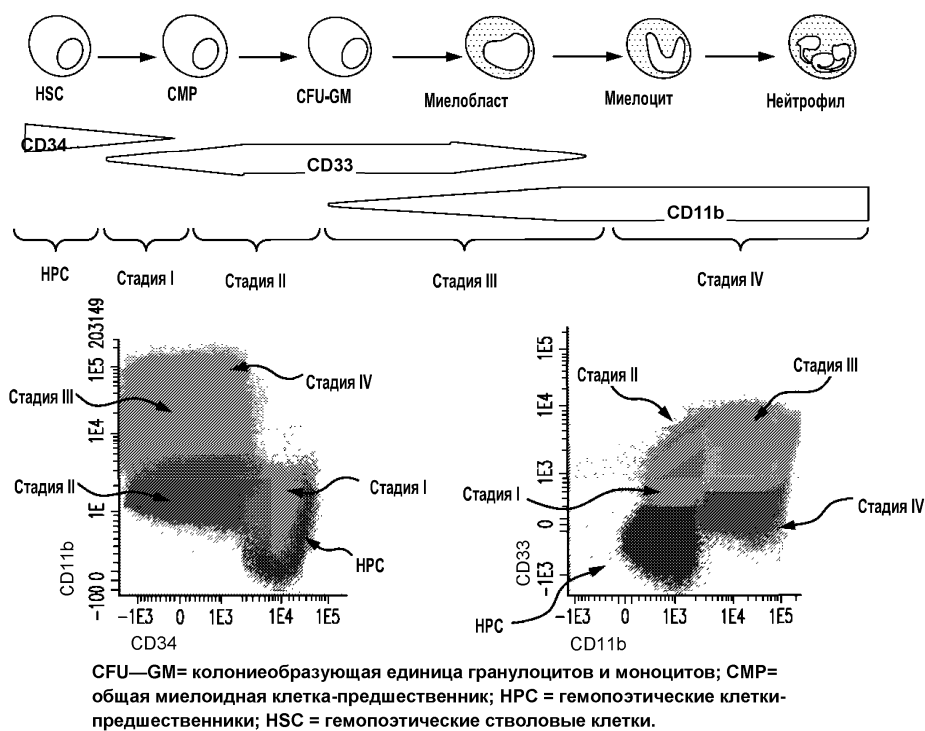
Фиг. 4



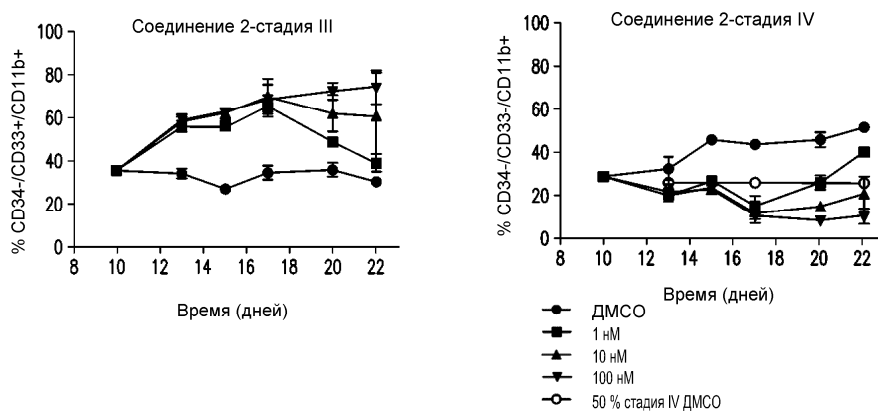
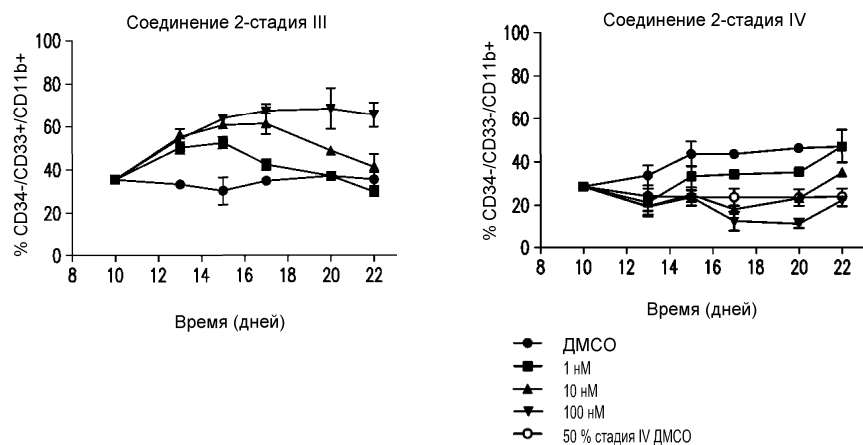
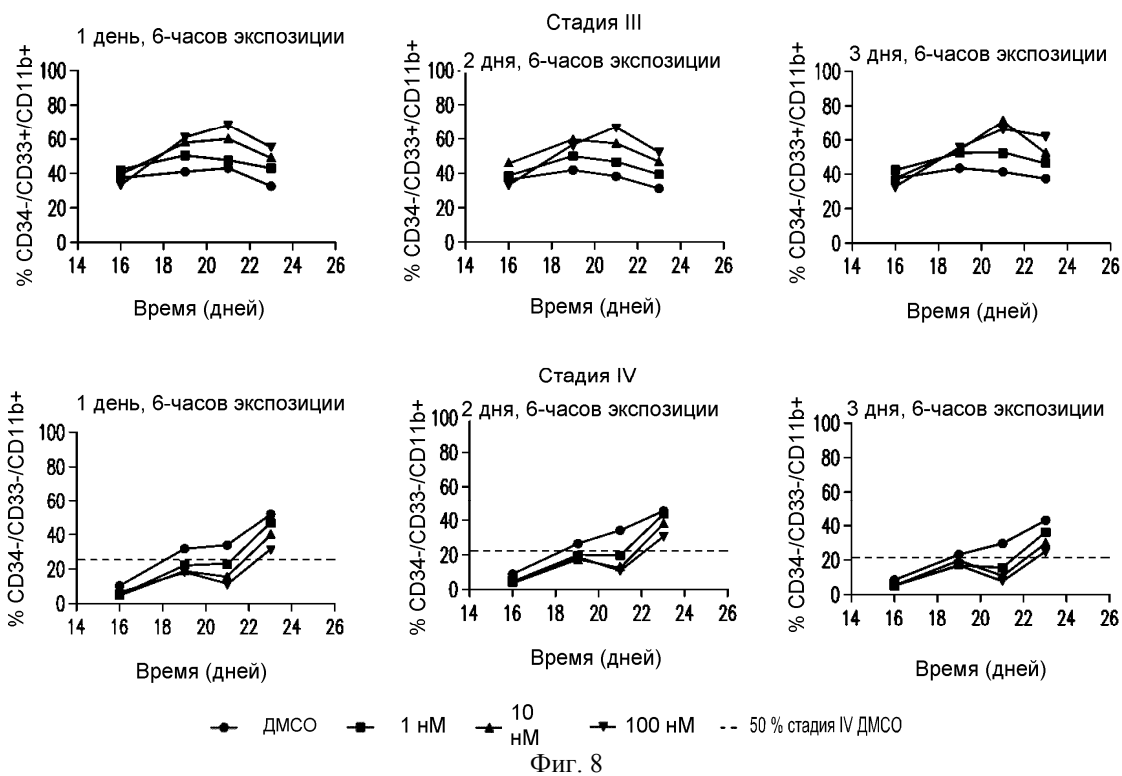
Фиг. 5



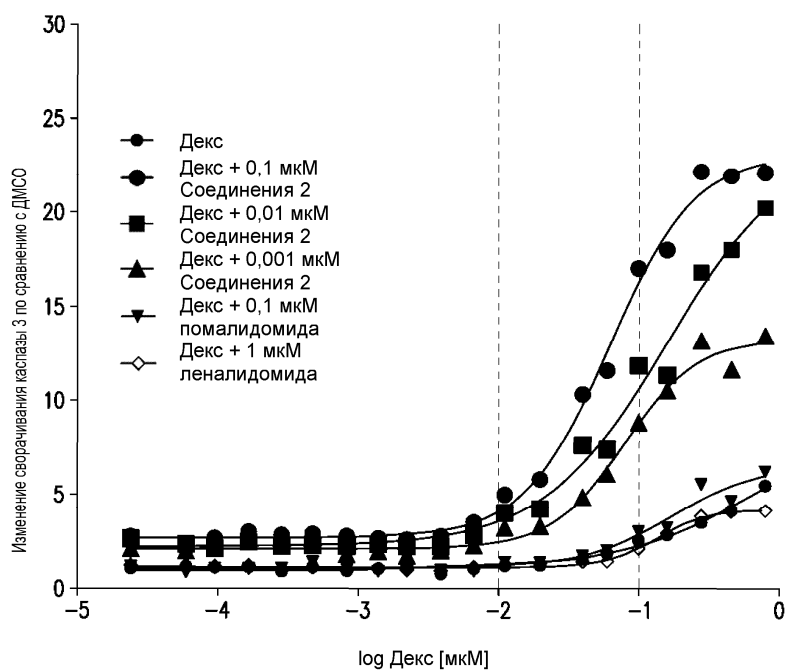
Фиг. 6



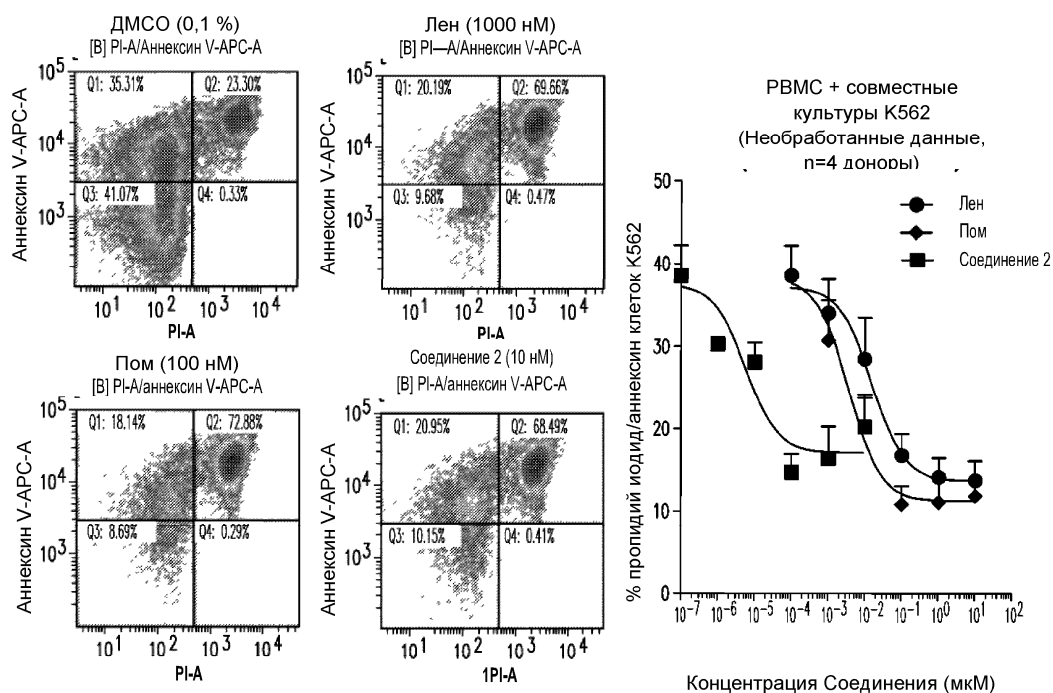
Фиг. 7





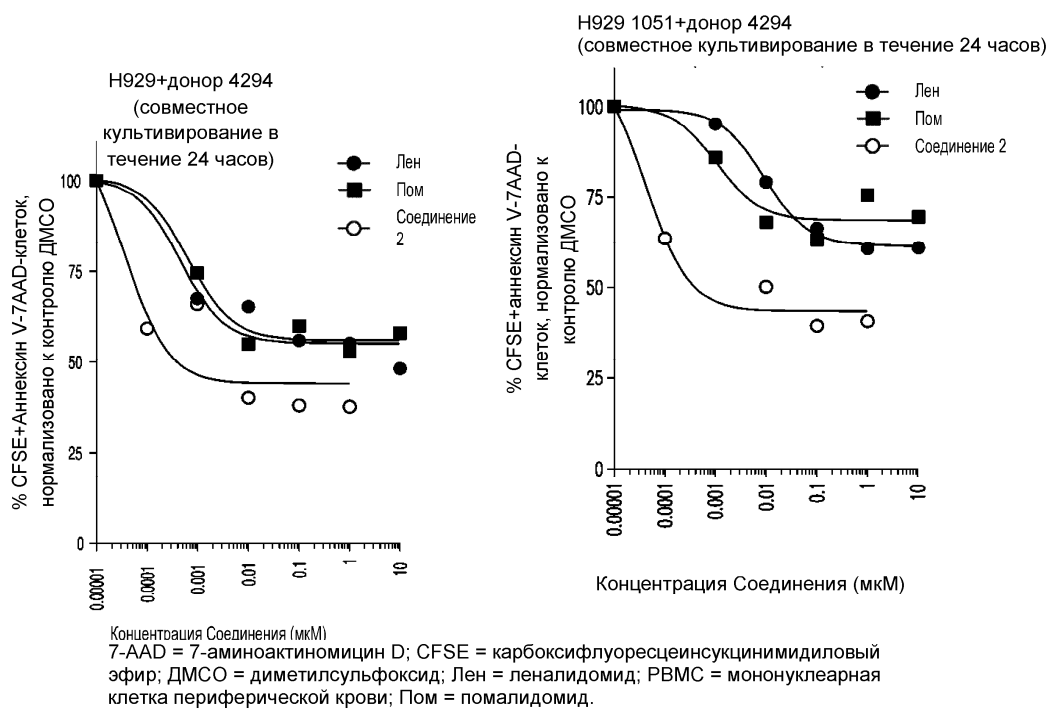


Фиг. 13

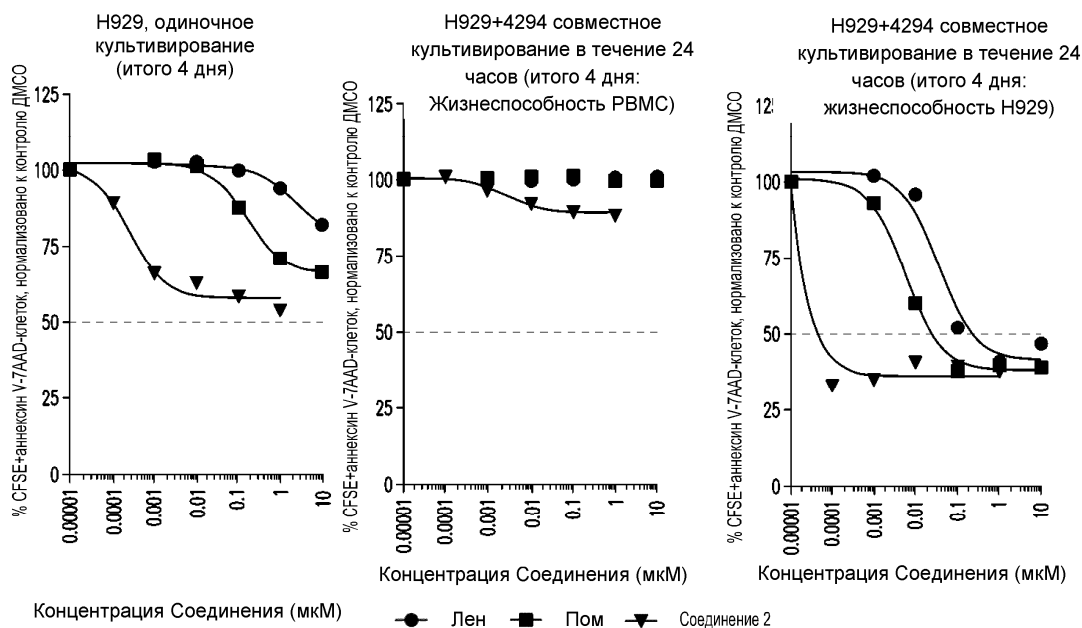


APC = аллофикоцианин; CM = Цереброн-модулирующий; ДМСО = диметилсульфоксид; IL-2 = интерлейкин-2;
 LEN = леналидомид; RBMC = мононуклеарная клетка периферической крови; PI = пропидий иодид; Пом = помалидомид; Q = квадрант; М:Э = соотношение Мишень:Эффектор; U = единицы.

Фиг. 14

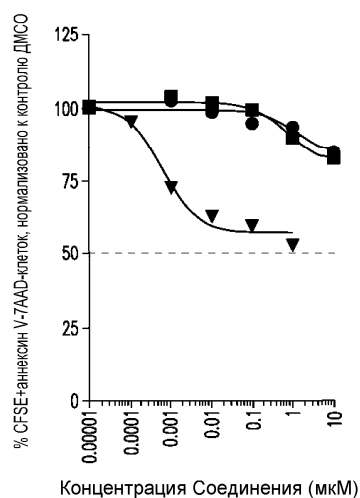


Фиг. 15

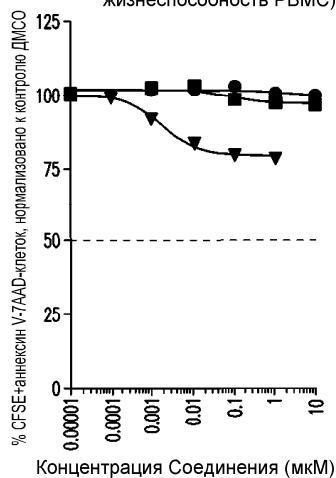


Фиг. 16А

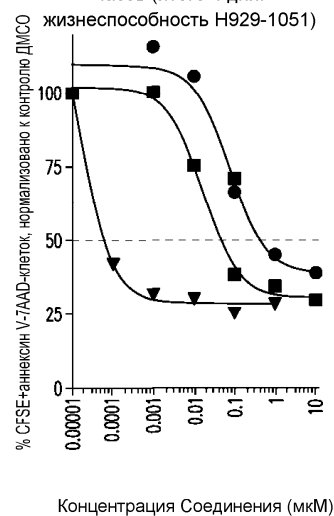
H929-1051, Одиночное совместное культивирование
(итого 4 дня)



H929-1051+4294 совместное
культивирование в течение 24
часов (итого 4 дня:
жизнеспособность RBMC)

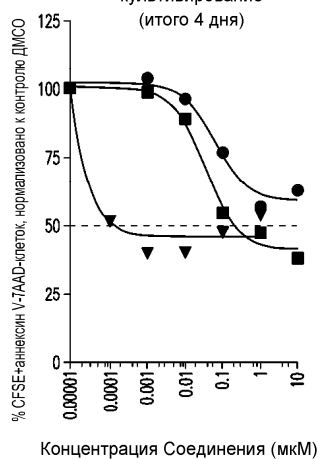


H929-1051+4294 совместное
культивирование в течение 24
часов (итого 4 дня:
жизнеспособность H929-1051)

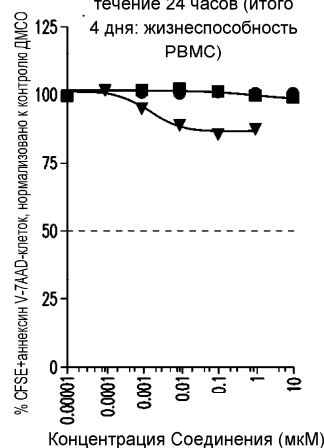


● Лен ■ Пом ▼ Соединение 2
Фиг. 16В

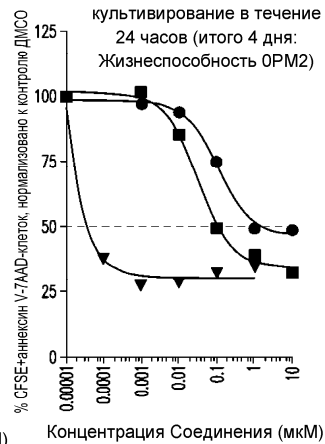
OPM2 Одиночное
культивирование
(итого 4 дня)



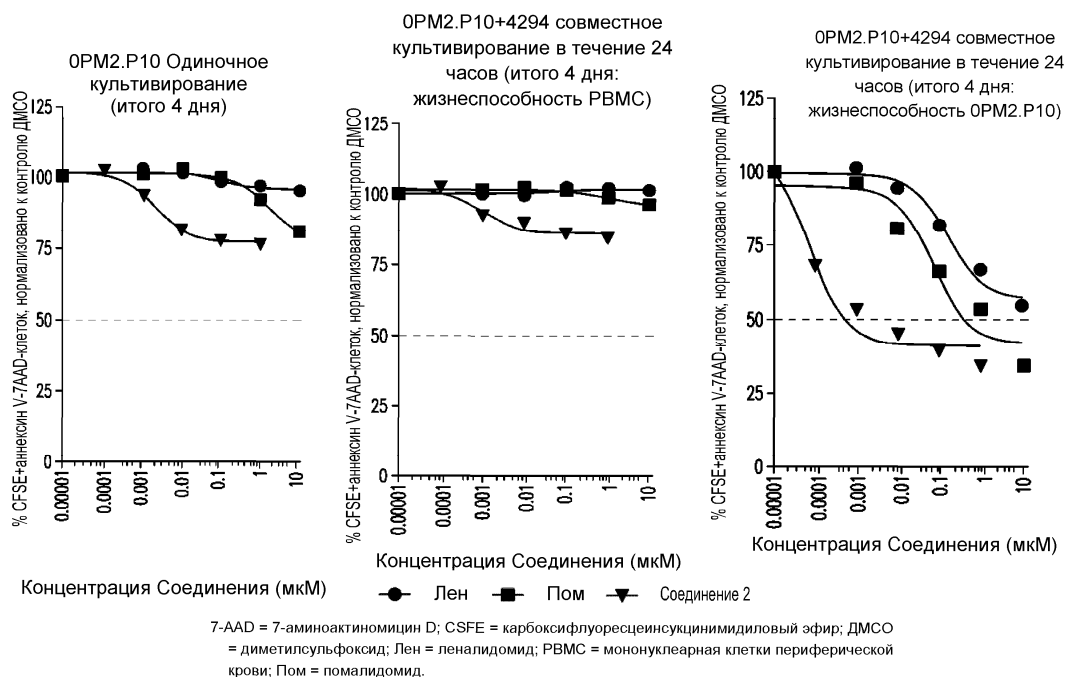
OPM2+4294 совместное
культивирование в
течение 24 часов (итого
4 дня: жизнеспособность
RBMC)



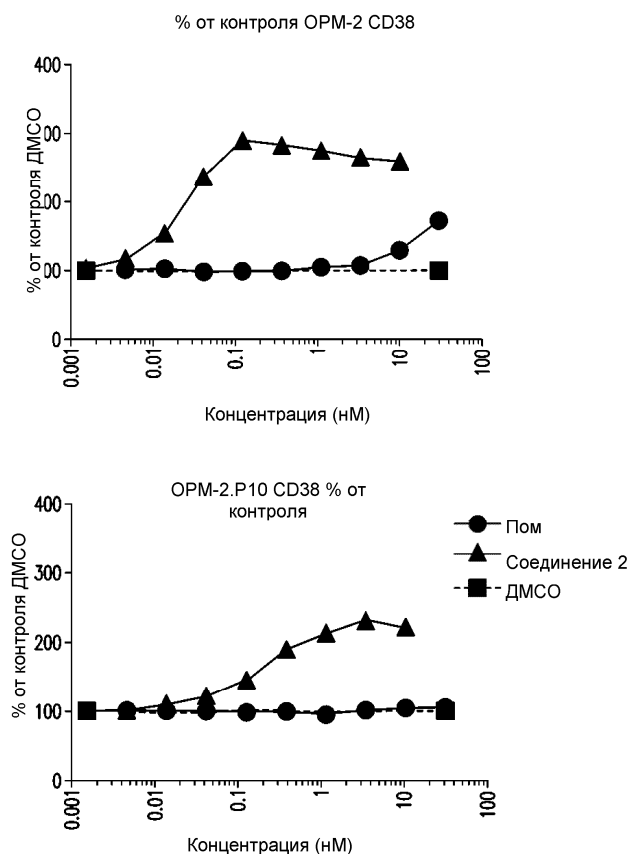
OPM2+4294 совместное
культивирование в течение
24 часов (итого 4 дня:
Жизнеспособность OPM2)



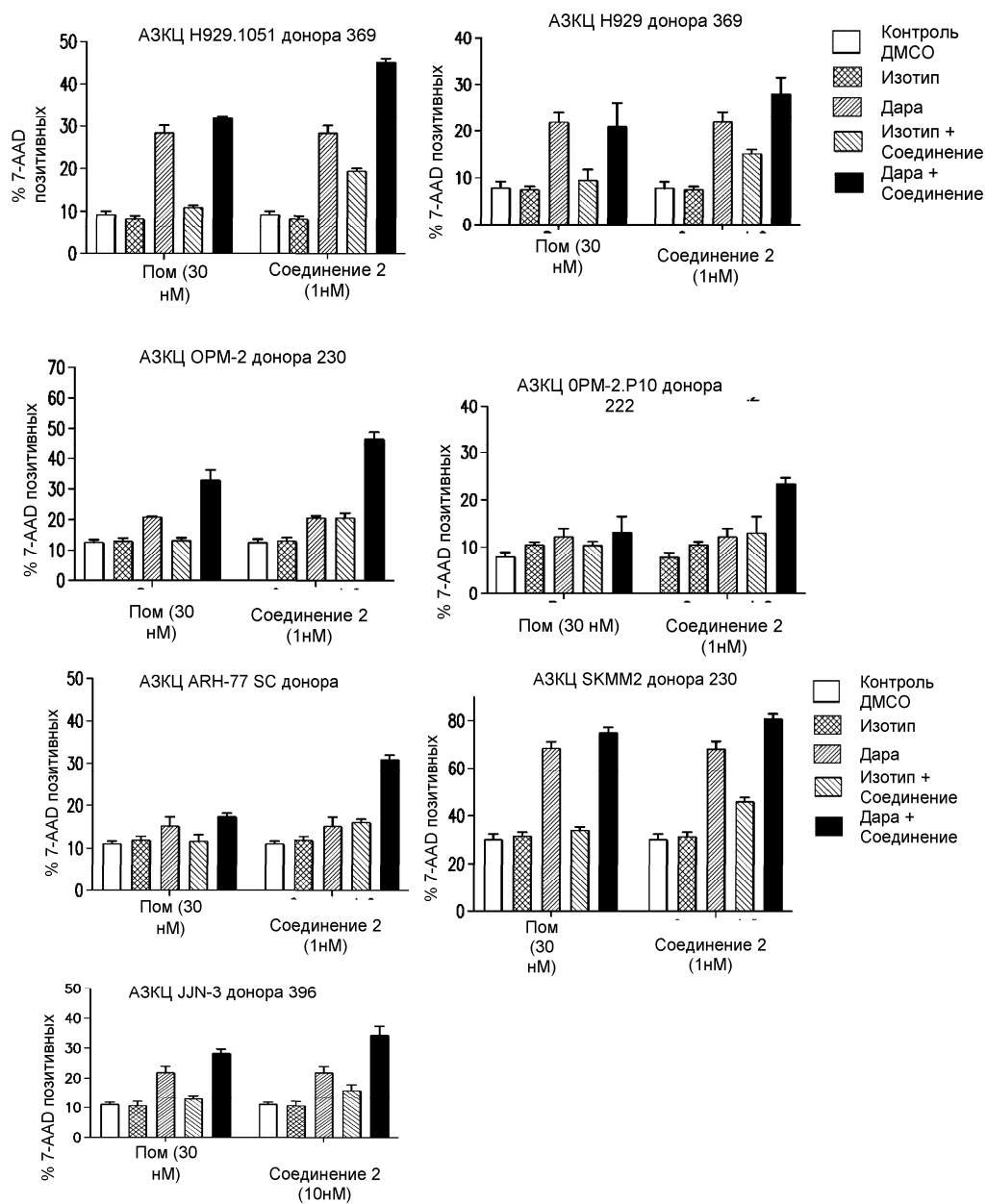
● Лен ■ Пом ▼ Соединение 2
Фиг. 16С



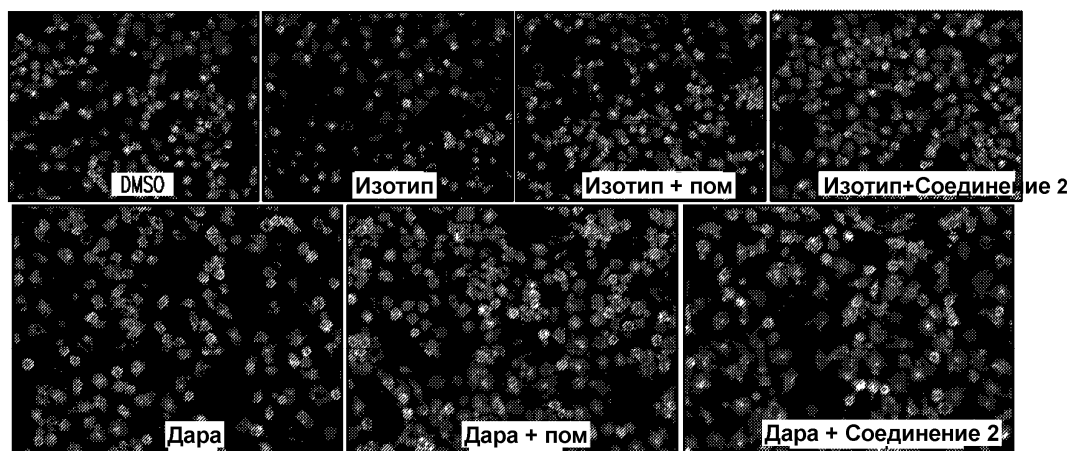
Фиг. 16D



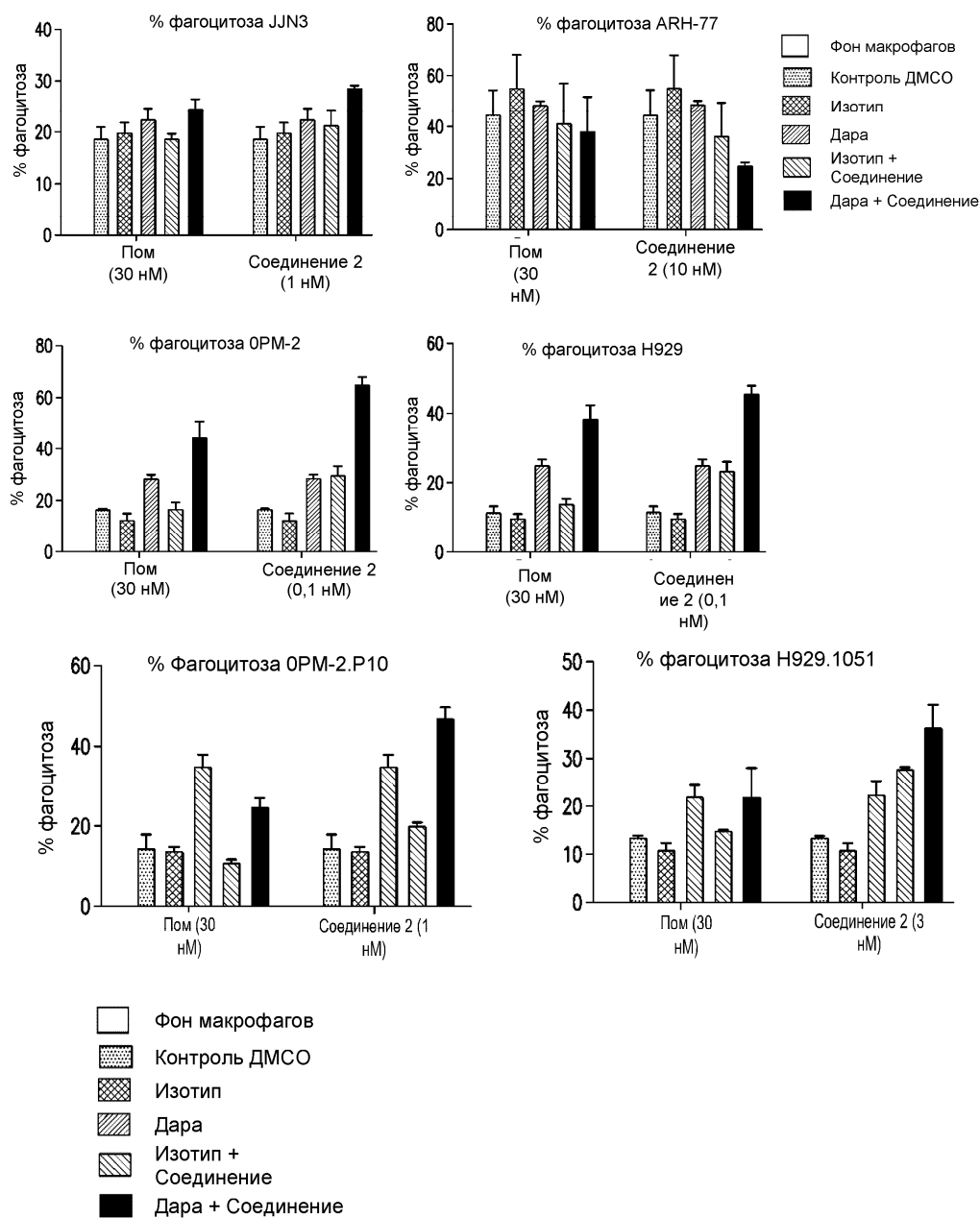
Фиг. 17



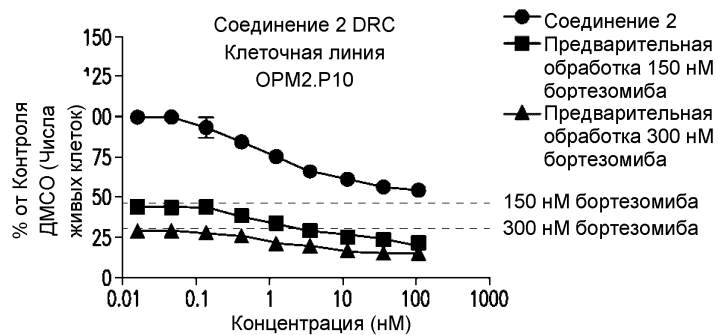
Фиг. 18



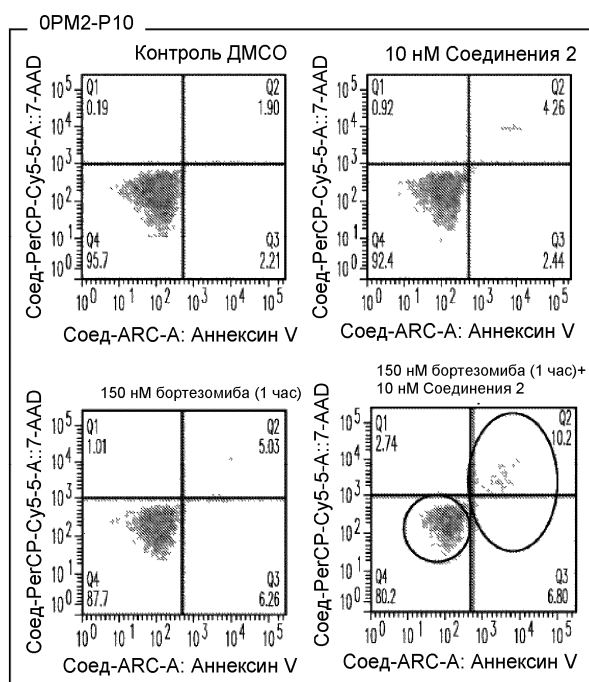
Фиг. 19А



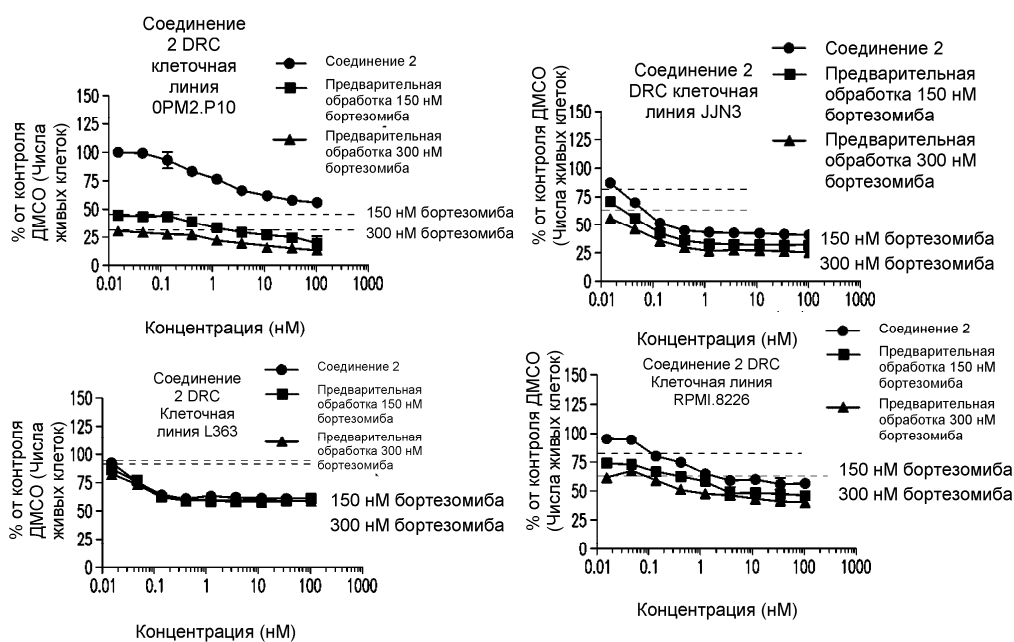
Фиг. 19B



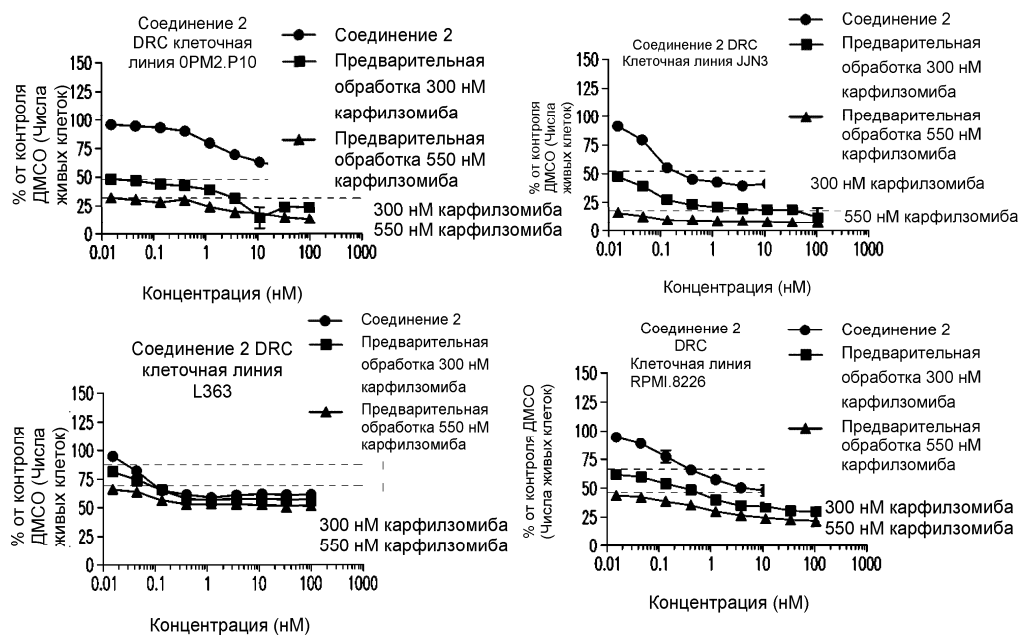
Фиг. 20A



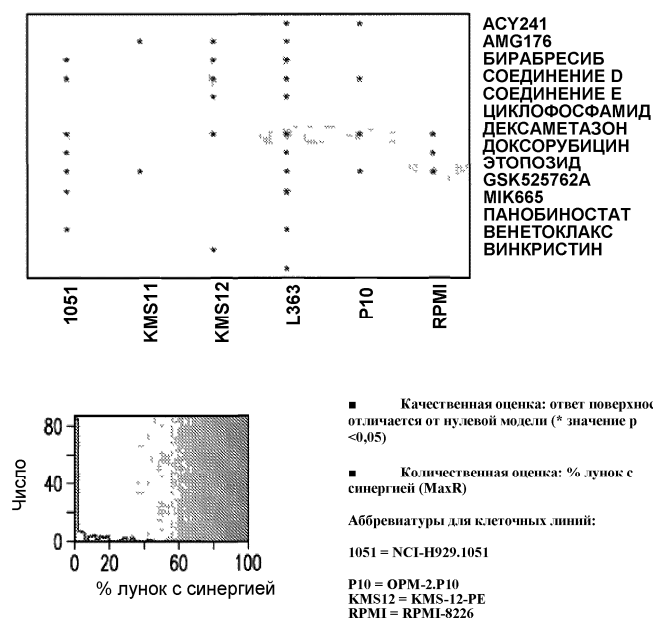
Фиг. 20В



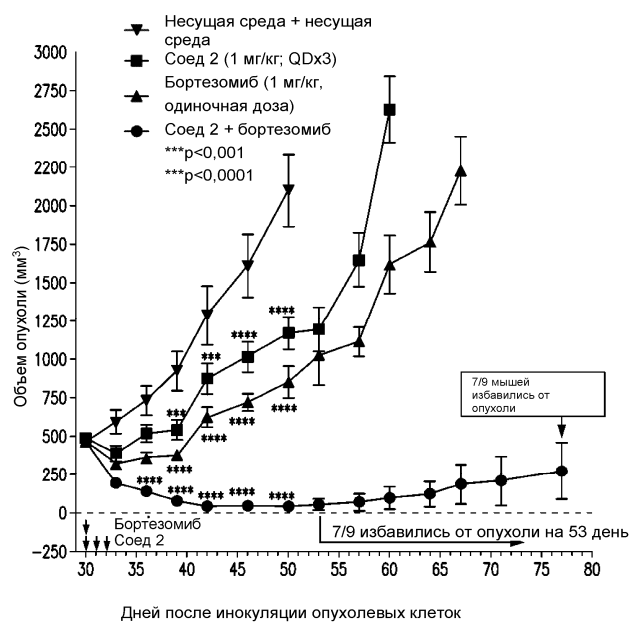
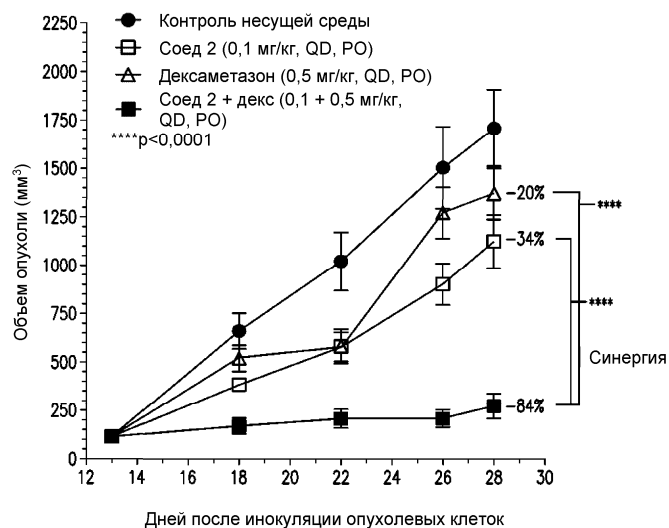
Фиг. 21А



Фиг. 21В



Фиг. 22



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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