

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290085** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.04.27

(22) Дата подачи заявки
2020.06.16

(51) Int. Cl. **A61K 31/5383** (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 498/22 (2006.01)

(54) **ПОЛИМОРФЫ МАКРОЦИКЛИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА КИНАЗЫ**

(31) **62/863,493; 62/959,940; 63/036,102**

(32) **2019.06.19; 2020.01.11; 2020.06.08**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/037892**

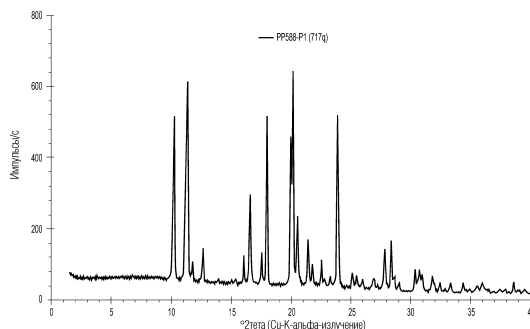
(87) **WO 2020/257169 2020.12.24**

(71) Заявитель:
**ТЁРНИНГ ПОИНТ ТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Дэн Вэй, Роджерс Эван В., Лу Юэле,
Чжан Хань, Лю Цзин (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к полиморфам (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, которые полезны для лечения заболеваний, таких как рак, у млекопитающих. Настоящее изобретение также относится к композициям, включающим такие полиморфы, и к способам применения таких композиций для лечения заболеваний, таких как рак, у млекопитающих, особенно у человека.



A1

202290085

202290085

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572678EA/032

ПОЛИМОРФЫ МАКРОЦИКЛИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА КИНАЗЫ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

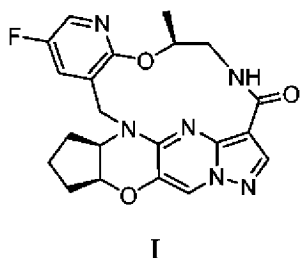
По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C. § 119(e) согласно предварительной заявке на патент США No. 62/863493, поданной 19 июня 2019 г., предварительной заявке на патент США No. 62/959940, поданной 11 января 2020 г., и предварительной заявке на патент США No. 63/036102, поданной 8 июня 2020 г., содержания которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к полиморфам (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, или его гидрату, которые применимы для лечения заболеваний, таких как рак, у млекопитающих. Настоящее изобретение также относится к композициям, включающим такие полиморфы, и к способам применения таких композиций для лечения заболеваний, таких как рак, у млекопитающих, особенно у человека.

Уровень техники

Соединение (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-он (также называемое в настоящем документе «Соединение I»), представленное формулой I



представляет собой мощный низкомолекулярный многоцелевой ингибитор киназы, проявляющим активность в отношении дикого типа и мутантных RET, SRC и FGFR1/2. Соединение I обладает свойствами, включая противоопухолевые свойства, которые фармакологически опосредованы за счет ингибирования рецепторов тирозинкиназы. Соединение I раскрыто в международной патентной публикации No. WO 2019/126121 A1 (Международная заявка на патент No. PCT/US2018/066158), поданной 18 декабря 2018 г., которая включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

Протеинкиназы являются ключевыми регуляторами роста, пролиферации и выживания клеток. Было показано, что различные заболевания, такие как рак, боль, неврологические заболевания, аутоиммунные заболевания и воспаление, опосредуются рецепторными тирозинкиназами, такими как активация мутированного RET или FGFR1/2.

Например, в раковых клетках могут накапливаться генетические и эпигенетические изменения, приводящие к аномальной активации путей передачи сигнала, которые запускают злокачественные процессы. Manning, G. et al., Science 2002, 298, 1912-1934. Фармакологическое ингибирование этих сигнальных путей открывает многообещающие возможности для таргетной терапии рака. Sawyers, C., Nature 2004, 432, 294-297.

Хотя соединение I нашло применение для лечения заболеваний, связанных с рецепторными тирозинкиназами, таких как RET активирующие мутации, выгодно иметь полиморфные формы, обладающие улучшенными свойствами, такими как улучшенная кристалличность, способность к растворению и/или пониженная гигроскопичность, при сохранении химических свойств и свойства энантиомерной стабильности.

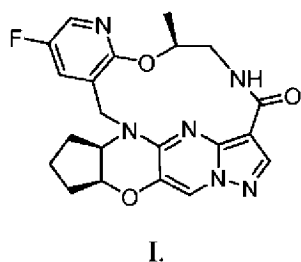
Сущность изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает кристаллическую форму (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-1][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, или его гидрат.

В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-1][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она представляет собой гидрат.

В другом варианте осуществления, кристаллическая полиморфная форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-1][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она является безводной.

В другом варианте осуществления, кристаллическая полиморфная форма A или D соединения I может быть представлена формулой



В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $20,1 \pm 0,1$. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) $11,3 \pm 0,1$ и $20,1 \pm 0,1$. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) $11,3 \pm 0,1$, $20,1 \pm 0,1$ и $23,9 \pm 0,1$. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) $11,3 \pm 0,1$, $18,0 \pm 0,1$,

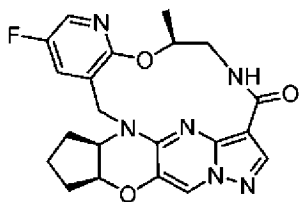
20,1±0,1 и 23,9±0,1. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) 10,3±0,1, 11,3±0,1, 18,0±0,1, 20,1±0,1 и 23,9±0,1. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) 10,3±0,1, 11,3±0,1, 16,6±0,1, 18,0±0,1, 20,1±0,1 и 23,9±0,1. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) 10,3±0,1, 11,3±0,1, 16,6±0,1, 18,0±0,1, 20,1±0,1, 20,5±0,1 и 23,9±0,1.

В еще одном аспекте кристаллическая форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ), по существу, такие же, как показано на фиг. 1.

В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) 18,8±0,1. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) 18,8±0,1 и 20,9±0,1. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) 12,3±0,1, 18,8±0,1 и 20,9±0,1. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) 12,3±0,1, 18,8±0,1, 19,4±0,1 и 20,9±0,1. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) 12,3±0,1, 13,1±0,1, 18,8±0,1, 19,4±0,1 и 20,9±0,1. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) 12,3±0,1, 13,1±0,1, 15,3±0,1, 18,8±0,1, 19,4±0,1 и 20,9±0,1. В другом варианте осуществления кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ) 9,4±0,1, 12,3±0,1, 13,1±0,1, 15,3±0,1, 18,8±0,1, 19,4±0,1 и 20,9±0,1.

В еще одном аспекте кристаллическая форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пики при углах дифракции (2θ)? по существу, такие же, как показано на фиг. 3.

Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую полиморфную форму А или форму D соединения I формулы



I.

Настоящее изобретение также обеспечивает капсулу, содержащую фармацевтические композиции, как описано в настоящем документе.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания, особенно рака, у млекопитающего, включая человека, включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества полиморфной формы А или D (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-1][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, как описано в настоящем документе, или фармацевтической композиции, содержащей полиморфную форму А или D (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-1][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, как описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения аномального роста клеток у млекопитающего, включая человека, нуждающегося в таком лечении, включающий введение указанному млекопитающему терапевтически эффективного количества полиморфной формы А или D соединения I в форме свободного основания. В некоторых вариантах осуществления, аномальный рост клеток опосредован по меньшей мере одной генетически измененной тирозинкиназой.

В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток опосредован RET, SRC, FGFR1/2 или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток опосредован RET дикого типа или мутантным RET. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток опосредован SRC дикого типа или мутантным SRC. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток опосредован FGFR1/2 дикого типа или мутантным FGFR1/2.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения аномального роста клеток у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения I. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения аномального роста клеток у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества полиморфной формы А или D свободного основания соединения I. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток представляет собой рак, опосредованный генетически измененным RET. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток представляет собой рак,

опосредованный генетически измененным RET, содержащей по меньшей мере одну точечную мутацию, выбранную из группы, состоящей из A883F, E762Q, G691S, L790F, M918T, R749T, R813Q, S891A, S904A, S904F, V778I, V804L, V804M, Y791F и Y806H.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения аномального роста клеток у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения I. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения аномального роста клеток у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества полиморфной формы A или D свободного основания соединения I. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток представляет собой рак, опосредованный слитым белком, содержащим фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, который может образовывать суперспиральное взаимодействие для облегчения димеризации или олигомеризации белка. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток представляет собой рак, опосредованный слитым белком, содержащим фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, кодируемый геном, выбранным из группы, состоящей из KIF5B, CCDC6, NCOA4, TRIM24, TRIM33, PRKAR1A, GOLGA5, KTN1, ERC1, MBD1 и TRIM27. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, кодируемый геном KIF5B. В некоторых вариантах осуществления, генетически измененный RET представляет собой слитый белок KIF5B-RET, CCDC6-RET, NCOA4-RET, TRIM24-RET, TRIM33-RET, PRKAR1A - RET, GOLGA5-RET, KTN1-RET, ERC1-RET, MBD1-RET или TRIM27-RET. В некоторых вариантах осуществления, генетически измененный RET представляет собой слитый белок KIF5B-RET. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET представляет собой белок дикого типа. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности гейткипера. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности, связанную с фронтом растворителя. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из A883F, E762Q, G691S, L790F, M918T, R749T, R813Q, S891A, S904A, S904F, V778I, V804L, V804M, Y791F, Y806H, V804M, G810R, G810C и G810S. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из V804M, G810R, G810C и G810S.

В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, кожной или интраокулярной меланомы, рака матки, рака яичников, рака

прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака фаллопиевых труб, рака эндометрия, рака шейки матки, рака влагалища, рака вульвы, болезни Ходжкина, видов рака желудка и пищевода, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, рака предстательной железы, хронического или острого лейкоза, лимфоцитарных лимфом, такого как анапластическая крупноклеточная лимфома, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, почечно-клеточного рака, рака почечной лоханки, новообразований центральной нервной системы (ЦНС), глиобластомы, первичной лимфомы ЦНС, опухолей оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, воспалительных миофибробластических опухолей и их комбинаций.

Дополнительные варианты осуществления, признаки и преимущества раскрытия будут очевидны из следующего подробного описания и при осуществлении на практике раскрытия. Соединения по настоящему изобретению могут быть описаны как варианты осуществления в любом из следующих перечисленных пунктов. Следует понимать, что любой из описанных в настоящем документе вариантов осуществления может быть использован в связи с любыми другими вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, в той степени, в какой эти варианты осуществления не противоречат друг другу.

1. Кристаллическая полиморфная форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, или его гидрат.

2. Кристаллическая полиморфная форма по пункту 1, где кристаллическая форма представляет собой полиморфную форму свободного основания (7S,13R)-11-фтор-7,13-диметил-6,7,13,14-тетрагидро-1,15-этенпиразоло[4,3-f][1,4,8,10]бензоксатриазациклотридецин-4(5H)-она, или его гидрата.

3. Кристаллический полиморф по пункту 1 или 2, где кристаллическая форма представляет собой моногидрат.

4. Кристаллический полиморф по пункту 1 или 2, где кристаллическая форма является безводной.

5. Кристаллическая полиморфная форма А (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, имеющая порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $20,1 \pm 0,1$.

6. Кристаллическая полиморфная форма по пункту 5, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $11,3 \pm 0,1$ и $20,1 \pm 0,1$.

7. Кристаллическая полиморфная форма по пункту 5 или 6, где кристаллическая

полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $11,3\pm 0,1$, $20,1\pm 0,1$ и $23,9\pm 0,1$.

8. Кристаллическая полиморфная форма по любому из пунктов 5-7, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $11,3\pm 0,1$, $18,0\pm 0,1$, $20,1\pm 0,1$ и $23,9\pm 0,1$.

9. Кристаллическая полиморфная форма по любому из пунктов 5-8, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $10,3\pm 0,1$, $11,3\pm 0,1$, $18,0\pm 0,1$, $20,1\pm 0,1$ и $23,9\pm 0,1$.

10. Кристаллическая полиморфная форма по любому из пунктов 5-9, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $10,3\pm 0,1$, $11,3\pm 0,1$, $16,6\pm 0,1$, $18,0\pm 0,1$, $20,1\pm 0,1$ и $23,9\pm 0,1$.

11. Кристаллическая полиморфная форма по любому из пунктов 5-10, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $10,3\pm 0,1$, $11,3\pm 0,1$, $16,6\pm 0,1$, $18,0\pm 0,1$, $20,1\pm 0,1$, $20,5\pm 0,1$, и $23,9\pm 0,1$.

12. Кристаллическая полиморфная форма D (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, имеющая порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $18,8\pm 0,1$.

13. Кристаллическая полиморфная форма по пункту 12, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $18,8\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

14. Кристаллическая полиморфная форма по пункту 12 или 13, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $12,3\pm 0,1$, $18,8\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

15. Кристаллическая полиморфная форма по любому из пунктов 12-14, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $12,3\pm 0,1$, $18,8\pm 0,1$, $19,4\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

16. Кристаллическая полиморфная форма по любому из пунктов 12-15, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $12,3\pm 0,1$, $13,1\pm 0,1$, $18,8\pm 0,1$, $19,4\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

17. Кристаллическая полиморфная форма по любому из пунктов 12-16, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $12,3\pm 0,1$, $13,1\pm 0,1$, $15,3\pm 0,1$,

18,8±0,1, 19,4±0,1 и 20,9±0,1.

18. Кристаллическая полиморфная форма по любому из пунктов 12-17, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) 9,4±0,1, 12,3±0,1, 13,1±0,1, 15,3±0,1, 18,8±0,1, 19,4±0,1 и 20,9±0,1.

19. Кристаллическая полиморфная форма по любому из пунктов 1-11, имеющая спектры Raman, включающие по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь или по меньшей мере примерно 8 пиков, выбранных из таблицы 3.

20. Кристаллическая полиморфная форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, имеющая порошковую рентгеновскую дифрактограмму, по существу такую же, как показано на фиг. 1.

21. Кристаллическая полиморфная форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, имеющая порошковую рентгеновскую дифрактограмму, по существу такую же, как показано на фиг. 3.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая кристаллическую полиморфную форму по любому из предшествующих пунктов.

23. Способ лечения заболевания у млекопитающего, включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества кристаллической полиморфной формы по любому из пунктов 1-21.

24. Способ по пункту 23, где млекопитающее представляет собой человека.

25. Способ по пункту 23 или 24, где заболевание выбрано из группы, состоящей из рака, боли, неврологических заболеваний, аутоиммунных заболеваний и воспаления.

26. Способ по любому из пунктов 22-25, где заболевание представляет собой рак.

27. Способ по пункту 26, где рак выбран из групп, состоящих из рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, кожной или интраокулярной меланомы, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака фаллопиевых труб, рака эндометрия, рака шейки матки, рака влагалища, рака вульвы, болезни Ходжкина, видов рака желудка и пищевода, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, рака предстательной железы, хронического или острого лейкоза, лимфоцитарных лимфом, таких как анапластическая крупноклеточная лимфома, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, почечно-клеточного рака, рака почечной лоханки, новообразований центральной нервной системы (ЦНС),

глиобластомы, первичной лимфомы ЦНС, опухолей оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, воспалительных миофибробластических опухолей, и их комбинаций.

28. Способ по любому из пунктов 23-27, где заболевание представляет собой рак, опосредованный генетически измененной RET.

29. Способ по любому из пунктов 23-27, где заболевание представляет собой рак, опосредованный генетически измененной RET, содержащей по меньшей мере одну точечную мутацию, выбранную из группы, состоящей из A883F, E762Q, G691S, L790F, M918T, R749T, R813Q, S891A, S904A, S904F, V778I, V804L, V804M, Y791F и Y806H.

30. Способ по любому из пунктов 23-27, где заболевание представляет собой рак, опосредованный слитым белком, содержащим фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, который может образовывать суперспиральное взаимодействие для облегчения димеризации или олигомеризации белка.

31. Способ по любому из пунктов 23-27, где заболевание представляет собой рак, опосредованный слитым белком, содержащим фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, кодируемый геном, выбранным из группы, состоящей из KIF5B, CCDC6, NCOA4, TRIM24, TRIM33, PRKAR1A, GOLGA5, KTN1, ERC1, MBD1 и TRIM27.

32. Способ по любому из пункта 31, где слитый белок содержит фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, кодируемый геном KIF5B.

33. Способ по пункту 28, где генетически измененный RET представляет собой слитый белок KIF5B-RET, CCDC6-RET, NCOA4-RET, TRIM24-RET, TRIM33-RET, PRKAR1A-RET, GOLGA5-RET, KTN1-RET, ERC1-RET, MBD1-RET или TRIM27-RET.

34. Способ по пункту 28 или 33, где генетически измененный RET представляет собой слитый белок KIF5B-RET.

35. Способ по пункту 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET представляет собой белок дикого типа.

36. Способ по пункту 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности.

37. Способ по пункту 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности гейткиспера.

38. Способ по пункту 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности, связанную с фронтом растворителя.

39. Способ по пункту 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из A883F, E762Q, G691S, L790F, M918T, R749T, R813Q, S891A, S904A, S904F, V778I, V804L, V804M, Y791F, Y806H, V804M, G810R, G810C и G810S.

40. Способ по пункту 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из V804M, G810R, G810C и G810S.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Используемый в настоящем документе, если не указано иное, термин «аномальный рост клеток» относится к росту клеток, который не зависит от нормальных механизмов регуляции (например, потеря контактного ингибирования).

Используемый в настоящем документе, если не указано иное, термин «лечение» означает регрессию, облегчение, ингибирование прогрессирования (т.е. радикальное лечение) или предотвращение расстройства или состояния, к которому применяется такой термин, или одного или нескольких симптомов такого расстройства или состояния. Термин «лечение», используемый в настоящем документе, если не указано иное, относится к акту лечения как «лечение», как определено непосредственно выше. «Профилактическое» лечение означает отсрочку развития заболевания, симптома заболевания или медицинского состояния, подавление симптомов, которые могут появиться, или снижение риска развития или рецидива заболевания или симптома. «Радикальное» лечение включает снижение тяжести или подавление ухудшения существующего заболевания, симптома или состояния. Таким образом, лечение включает облегчение или предотвращение ухудшения существующих симптомов заболевания, предотвращение появления дополнительных симптомов, облегчение или предотвращение основных системных причин симптомов, ингибирование расстройства или заболевания, например, остановку развития расстройства или заболевания, облегчение расстройства или заболевания, вызывающее регрессию расстройства или заболевания, облегчение состояния, вызванного заболеванием или расстройством, или купирование симптомов заболевания или расстройства.

Термин «субъект» относится к пациенту-млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении, например к человеку.

Используемый в настоящем документе термин «по существу такой же» в отношении положений пиков дифракции рентгеновских лучей означает, что рассматривается типичное положение пика и изменчивость интенсивности. Например, специалисту в данной области должно быть понятно, что положения пиков (2θ) будут демонстрировать некоторую вариабельность между приборами, обычно такую, как $0,1^\circ$. Более того, специалисту в данной области должно быть понятно, что относительные интенсивности пиков показывают вариабельность между приборами, а также вариабельность вследствие степени кристалличности, предпочтительной ориентации, поверхности подготовленного образца и других факторов, известных специалисту в данной области, и должны приниматься только в качестве качественных измерений.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На фиг. 1 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-1][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она моногидрата, полиморфная форма A..

На фиг. 2 показана термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) кристаллической формы (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-

гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она моногидрат, полиморфная форма A.

На фиг. 3 показана порошковая рентгеновская дифрактограмма кристаллической формы (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она (не содержащая растворителя и безводная), полиморфная форма D.

На фиг. 4 показана термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) кристаллической формы (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она (не содержащая растворителя и безводная), полиморфная форма D.

На фиг. 5A представлен график, показывающий активность соединения I, Loxo-292 и BLU-667 в анализе пролиферации клеток Ba/F3 KIF5B-RET. (▲) Соединение I; (■) BLU-667; (●) Loxo-292.

На фиг. 5B представлен график, показывающий активность соединения I, Loxo-292, и BLU-667 в анализе пролиферации клеток Ba/F3 KIF5B-RET. (▲) Соединение I; (■) BLU-667; (●) Loxo-292.

На фиг. 6A представлено гель-изображение эффекта соединения I на фосфорилирование RET-G810C по остатку Y905 в сконструированных клетках Ba/F3 при различных концентрациях в нМ.

На фиг. 6B представлено гель-изображение эффекта LOXO-292 на фосфорилирование RET-G810C по остатку Y905 в сконструированных клетках Ba/F3 при различных концентрациях в нМ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Перед дальнейшим описанием настоящего раскрытия должно быть понятно, что настоящее раскрытие не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, могут конечно, варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего раскрытия будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее раскрытие. Все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, упомянутые в настоящем документе, включены путем ссылки в их полном объеме. Если определение, изложенное в этом разделе, противоречит или иным образом несовместимо с определением, изложенным в патенте, заявке или другой публикации, которая включена в настоящий документ

посредством ссылки, определение, изложенное в этом разделе, имеет преимущественную силу над определением, включенным в настоящий документ посредством ссылки.

Используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Далее следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключать любой необязательный элемент. В связи с этим, данное предупреждение призвано служить предшествующей основой для использования такой исключительной терминологии, как «исключительно», «только» и тому подобное, в связи с перечислением заявленных элементов или использованием «отрицательного» ограничения.

Уникальная физическая форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20а-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она моногидрата, полиморфная форма А, была получена в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. Порошковая рентгеновская дифрактограмма (PXRD) полиморфной формы А свободного основания показана на фиг. 1, с соответствующими табличными данными, приведенными в таблице 1.

Таблица 1

°2-тета	межатомное расстояние [Å]	Относительная интенсивность в %	Качественная интенсивность*
10,28	8,6	78	vs
11,33	7,8	97	vs
11,74	7,5	15	m
12,64	7,0	23	m
13,88	6,4	8	w
16,04	5,52	19	m
16,58	5,34	45	s
17,54	5,05	21	m
17,98	4,93	80	vs
19,97	4,44	72	vs
20,14	4,41	100	vs
20,51	4,33	35	s
21,43	4,14	25	m
21,78	4,08	15	w
22,04	4,03	8	w
22,52	3,94	18	m
22,78	3,90	9	w

23,27	3,82	10	w
23,88	3,72	81	vs
25,08	3,55	12	w
25,47	3,49	10	w
25,95	3,43	9	w
26,88	3,31	9	w
27,81	3,21	22	m
28,34	3,15	26	m
29,00	3,08	8	w
30,33	2,94	13	w
30,68	2,91	14	w
31,77	2,81	10	w
32,42	2,76	8	w
32,83	2,73	5	vw
33,28	2,69	7	w
34,34	2,61	8	w
35,50	2,53	6	w
35,93	2,50	7	w
37,40	2,40	4	vw
37,87	2,37	5	vw
38,59	2,33	7	w
39,49	2,28	5	vw

* vs=очень сильная, s=сильная, m=средняя, w=слабая, vw=очень слабая

Термограмма DSC кристаллической полиморфной формы А показана на фиг. 2.

Уникальная физическая форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она (не содержащая растворителя и безводная), полиморфная форма D, была получена в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. Порошковая рентгеновская дифрактограмма (PXRD) полиморфной формы D свободного основания показана на фиг. 3, с соответствующими табличными данными, приведенными в таблице 2.

Таблица 2

°2-тета	межатомное расстояние [Å]	Относительная интенсивность в %	Качественная интенсивность*
9,38	9,4	43	s

10,16	8,7	10	w
12,26	7,2	63	s
12,86	6,9	14	w
13,08	6,8	58	s
15,27	5,80	58	s
15,94	5,56	8	w
16,41	5,40	13	w
17,09	5,18	13	w
18,22	4,87	13	w
18,38	4,82	21	m
18,84	4,71	100	vs
19,39	4,57	59	s
20,02	4,43	40	s
20,40	4,35	37	s
20,56	4,32	12	w
20,95	4,24	96	vs
21,45	4,14	11	w
22,02	4,03	43	s
22,84	3,89	36	s
23,33	3,81	14	w
24,31	3,66	20	m
24,62	3,61	9	w
25,09	3,55	7	w
25,88	3,44	15	w
26,48	3,36	19	m
26,88	3,31	19	m
27,21	3,28	5	vw
28,05	3,18	25	m
28,29	3,15	21	m
29,01	3,08	3	vw
29,37	3,04	5	vw
29,90	2,99	5	w
30,20	2,96	11	w
30,82	2,90	13	w

31,32	2,85	3	vw
31,95	2,80	4	vw
32,35	2,76	4	vw
32,56	2,75	8	w
33,20	2,70	6	w
33,54	2,67	9	w
33,98	2,64	4	vw
34,59	2,59	8	w
35,83	2,50	4	vw
36,96	2,43	5	w
37,33	2,41	6	w
38,20	2,35	5	vw
38,52	2,34	3	vw
39,08	2,30	3	vw
39,37	2,29	4	vw
39,96	2,25	3	vw

* vs=очень сильная, s=сильная, m=средняя, w=слабая, vw=очень слабая

Термограмма DSC кристаллической полиморфной формы D показана на фиг.4.

В одном аспекте соединения и фармацевтические композиции по изобретению специфически нацелены на рецепторы тирозинкиназы, в частности RET, SRC или FGFR1/2. Таким образом, эти соединения и фармацевтические композиции можно использовать для предотвращения, купирования, замедления или ингибирования активности одной или нескольких из этих киназ. В некоторых вариантах осуществления, способы лечения заболевания, опосредованного одним или несколькими рецепторами тирозинкиназы, описаны в настоящем документе.

Примеры заболеваний включают рак, боль, неврологические заболевания, аутоиммунные заболевания и воспаление.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения рака, включающие введение терапевтически эффективного количества кристаллической полиморфной формы А или D соединения I. Рак включает, но не ограничивается этим, рак легкого, такой как немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, и тому подобное, рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, гепатоцеллюлярную карциному, кожную или интраокулярную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак фаллопиевых труб, рак эндометрия, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, болезнь Ходжкина, виды рака желудка и пищевода, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак

паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак предстательной железы, хронический или острый лейкоз, лимфоцитарные лимфомы, такие как анапластическая крупноклеточная лимфома, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточный рак, рак почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), такие как глиобластома, первичная лимфома ЦНС, опухоли оси позвоночника, глиому ствола головного мозга, и тому подобное, аденому гипофиза, воспалительные миофибробластические опухоли, и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток опосредован RET, SRC, FGFR1/2 или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток опосредован RET дикого типа или мутантным RET. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток опосредован SRC дикого типа или мутантным SRC. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток опосредован FGFR1/2 дикого типа или мутантным FGFR1/2.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения аномального роста клеток у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения I. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения аномального роста клеток у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества полиморфной формы A или D свободного основания соединения I. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток представляет собой рак, опосредованный генетически измененной RET. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток представляет собой рак, опосредованный генетически измененной RET, содержащей по меньшей мере одну точечную мутацию, выбранную из группы, состоящей из A883F, E762Q, G691S, L790F, M918T, R749T, R813Q, S891A, S904A, S904F, V778I, V804L, V804M, Y791F и Y806H.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения аномального роста клеток у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения I. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения аномального роста клеток у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение терапевтически эффективного количества полиморфной формы A или D свободного основания соединения I. В некоторых вариантах осуществления, аномальный рост клеток представляет собой рак, опосредованный слитым белком, содержащим фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, который может образовывать суперспиральное взаимодействие для облегчения димеризации или олигомеризации белка. В некоторых вариантах осуществления аномальный рост клеток представляет собой рак, опосредованный слитым белком, содержащим фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, кодируемый геном, выбранным из группы,

состоящей из KIF5B, CCDC6, NCOA4, TRIM24, TRIM33, PRKAR1A, GOLGA5, KTN1, ERC1, MBD1 и TRIM27. В некоторых вариантах осуществления, слитый белок содержит фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, кодируемый геном KIF5B. В некоторых вариантах осуществления генетически измененный RET представляет собой слитый белок KIF5B-RET, CCDC6-RET, NCOA4-RET, TRIM24-RET, TRIM33-RET, PRKAR1A -RET, GOLGA5-RET, KTN1-RET, ERC1-RET, MBD1-RET или TRIM27-RET. В некоторых вариантах осуществления генетически измененный RET представляет собой слитый белок KIF5B-RET. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET представляет собой белок дикого типа. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности гейткипера. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности, связанную с фронтом растворителя. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из A883F, E762Q, G691S, L790F, M918T, R749T, R813Q, S891A, S904A, S904F, V778I, V804L, V804M, Y791F, Y806H, V804M, G810R, G810C и G810S. В некоторых вариантах осуществления слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из V804M, G810R, G810C и G810S.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе описаны способы лечения или предотвращения боли, включающие введение терапевтически эффективного количества кристаллической полиморфной формы А или D соединения I. Боль включает, например, боль из любого источника или этиологии, включая боль при раке, боль от химиотерапевтического лечения, невралгию, боль от травмы или других источников.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения аутоиммунных заболеваний, включающие введение терапевтически эффективного количества кристаллической полиморфной формы А или D соединения I. Аутоиммунные заболевания включают, например, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, диабет I типа и волчанку. Примеры неврологических заболеваний включают болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и болезнь Гентингтона.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения воспалительных заболеваний воспаления, включающие введение терапевтически эффективного количества кристаллической полиморфной формы А или D соединения I. Примеры воспалительных заболеваний включают атеросклероз, аллергию и воспаление от инфекции или травмы.

В способах лечения согласно изобретению «эффективное количество» означает количество или дозу, достаточную для достижения желаемого терапевтического эффекта у субъектов, нуждающихся в таком лечении. Эффективные количества или дозы соединений по изобретению могут быть установлены обычными способами, такими как

моделирование, повышение дозы или клинические испытания, с учетом обычных факторов, например, способа или пути введения или доставки лекарственного средства, фармакокинетики лекарственного средства, тяжести и течения инфекции, состояния здоровья, заболевания и массы субъекта, а также заключения лечащего врача. Примерная доза находится в диапазоне примерно от примерно 0,1 мг до 1 г в день, или примерно от 1 мг до 50 мг в день, или примерно 50-250 мг в день, или примерно от 250 мг до 1 г в день. Общая доза может быть дана в разовых или разделенных единицах дозирования (например, два раза в день, три раза в день, четыре раза в день).

После улучшения заболевания пациента доза может быть скорректирована для профилактического или поддерживающего лечения. Например, доза или частота введения, или и то и другое, могут быть снижены в зависимости от симптомов до уровня, при котором сохраняется желаемый терапевтический или профилактический эффект. Конечно, если симптомы были ослаблены до соответствующего уровня, лечение может быть прекращено. Однако пациентам может потребоваться прерывистое лечение на долгосрочной основе при любом рецидиве симптомов. Пациентам также может потребоваться длительное лечение на долговременной основе.

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим полиморфную форму свободного основания А или D соединения I, описанную в настоящем документе. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть, например, в форме, подходящей для перорального введения, в виде таблетки, капсулы, пилюли, порошка, составов с замедленным высвобождением, раствора, суспензии, для парентеральной инъекции в виде стерильного раствора, суспензии или эмульсии, для местного применения в виде мази или крема или для ректального введения в виде суппозитория. Фармацевтическая композиция может быть представлена в виде стандартных лекарственных форм, подходящих для однократного введения точных доз. Фармацевтическая композиция может включать обычные фармацевтически приемлемые эксципиенты. Кроме того, фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут включать другие лекарственные или фармацевтические средства, носители, адъюванты и тому подобное.

Фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой вещество, которое нетоксично и в остальном биологически пригодно для введения субъекту. Такие эксципиенты облегчают введение соединений, описанных в настоящем документе, и совместимы с активным ингредиентом. Примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов включают стабилизаторы, скользящие вещества, поверхностно-активные вещества, разбавители, антиоксиданты, связующие вещества, красители, объемообразующие агенты, эмульгаторы или вкус-модифицирующие вещества. В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению представляют собой стерильные композиции. Фармацевтические композиции могут быть получены с использованием известных или доступных

специалистам в данной области методик смешивания.

Стерильные композиции также рассматриваются изобретением, включая композиции, которые соответствуют национальным и местным нормам, регулирующим такие композиции.

Фармацевтические композиции и соединения, описанные в настоящем документе, могут быть получены в виде растворов, эмульсий, суспензий или дисперсий в подходящих фармацевтических растворителях или носителях или в виде пилюль, таблеток, пастилок, суппозиториев, саше, драже, гранул, порошков, порошков для восстановления или капсул вместе с твердыми носителями в соответствии с обычными способами, известными в данной области, для получения различных лекарственных форм. Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить подходящим путем доставки, таким как пероральный, парентеральный, ректальный, назальный, местный или глазной пути, или путем ингаляции. В некоторых вариантах осуществления композиции получены для внутривенного или перорального введения.

Для перорального введения соединения по изобретению могут быть представлены в твердой форме, такой как таблетка или капсула, или в виде раствора, эмульсии или суспензии. Для получения пероральных композиций соединения по настоящему изобретению могут быть сформулированы с получением дозы, например, от примерно 0,1 мг до 1 г в день, или от примерно 1 мг до 50 мг в день, или примерно 50-250 мг в день, или примерно от 250 мг до 1 г в день. Таблетки для перорального применения могут включать активный ингредиент (ингредиенты), смешанный с совместимыми фармацевтически приемлемыми эксципиентами, такими как разбавители, дезинтегрирующие агенты, связующие агенты, смазывающие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты. Подходящие инертные наполнители включают карбонат натрия и кальция, фосфат натрия и кальция, лактозу, крахмал, сахар, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и т.п. Примеры жидких эксципиентов для перорального применения включают этанол, глицерин, воду и т.п. Крахмал, поливинилпирролидон (ПВП), крахмалгликолят натрия, микрокристаллическая целлюлоза и альгиновая кислота являются типичными дезинтегрирующими агентами. Связующие агенты могут включать крахмал и желатин. Смазывающим агентом, если он присутствует, может быть стеарат магния, стеариновая кислота или тальк. При желании таблетки могут быть покрыты веществом, таким как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, для замедления всасывания в желудочно-кишечном тракте, или могут быть покрыты энтеросолюбильным покрытием.

Капсулы для перорального введения включают твердые и мягкие желатиновые капсулы. Для получения твердых желатиновых капсул активные ингредиенты можно смешать с твердым, полутвердым или жидким разбавителем. Мягкие желатиновые капсулы можно получить путем смешивания активного ингредиента с водой, маслом, таким как арахисовое масло или оливковое масло, жидким парафином, смесью моно- и диглицеридов короткоцепочечных жирных кислот, полиэтиленгликолем 400 или

пропиленгликолем.

Жидкости для перорального введения могут быть в форме суспензий, растворов, эмульсий или сиропов или могут быть лиофилизированы или представлены в виде сухого продукта для восстановления водой или другим подходящим носителем перед применением. Такие жидкие композиции могут необязательно содержать: фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как суспендирующие агенты (например, сорбит, метилцеллюлоза, альгинат натрия, желатин, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гель стеарата алюминия и т.п.); неводные носители, например масло (например, миндальное масло или фракционированное кокосовое масло), пропиленгликоль, этиловый спирт или вода; консерванты (например, метил- или пропил-п-гидроксibenзоат или сорбиновая кислота); смачивающие агенты, такие как лецитин; и, при необходимости, ароматизаторы или красители.

Для парентерального применения, включая внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, интраназальное или подкожное введение, агенты по настоящему изобретению могут быть предоставлены в виде стерильных водных растворов или суспензий, забуференных до соответствующего pH и изотоничности, или в масле, приемлемом для парентерального введения. Подходящие водные носители включают раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Такие формы могут быть представлены в виде стандартных дозированных форм, таких как ампулы или одноразовые устройства для инъекций, в многодозовых формах, таких как флаконы, из которых может быть извлечена соответствующая доза, или в твердой форме или предварительном концентрате, которые можно использовать для приготовления инъекционного состава. Примеры доз для инфузии находятся в диапазоне примерно 1-1000 мкг/кг/мин средства, смешанного с фармацевтическим носителем в течение периода от нескольких минут до нескольких дней.

Для назального, ингаляционного или перорального введения фармацевтические композиции по изобретению можно вводить с использованием, например, композиции для распыления, также содержащей подходящий носитель. Композиции по изобретению могут быть получены для ректального введения в виде суппозитория.

Для местного применения соединения по настоящему изобретению предпочтительно получают в виде кремов или мазей или аналогичного носителя, подходящего для местного применения. Для местного применения соединения по изобретению можно смешивать с фармацевтическим носителем в концентрации от примерно 0,1% до примерно 10% лекарственного средства на носитель. В другом способе введения средств по изобретению может использоваться пластырь для трансдермальной доставки.

Способы получения различных фармацевтических композиций с определенным количеством активного соединения известны или будут очевидны специалистам в данной области. Например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easter, Pa., 15th Edition (1975).

Комбинации лекарственных средств

Соединения по изобретению, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в фармацевтических композициях или способах в сочетании с одним или несколькими дополнительными активными ингредиентами для лечения заболеваний и расстройств, описанных в настоящем документе. Другие дополнительные активные ингредиенты включают другие терапевтические средства или средства, которые смягчают неблагоприятные эффекты терапий в отношении предполагаемых заболеваний-мишеней. Такие комбинации могут служить для повышения эффективности, ослабления других симптомов заболевания, уменьшения одного или нескольких побочных эффектов или уменьшения требуемой дозы соединения по изобретению. Дополнительные активные ингредиенты могут быть введены в виде отдельной фармацевтической композиции от соединения по настоящему изобретению или могут быть включены вместе с соединением по настоящему изобретению в единую фармацевтическую композицию. Дополнительные активные ингредиенты можно вводить одновременно, до или после введения соединения по настоящему изобретению.

Комбинированные средства включают дополнительные активные ингредиенты, которые, как известно или обнаружено, эффективны для лечения заболеваний и расстройств, описанных в настоящем документе, включая те, которые активны в отношении другой мишени, связанной с заболеванием. Например, композиции и лекарственные формы по изобретению, а также способы лечения могут дополнительно включать другие лекарственные средства или фармацевтические препараты, например, другие активные средства, полезные для лечения или паллиативного лечения целевых заболеваний или связанных с ними симптомов или состояний. При показаниях к применению при раке дополнительные такие средства включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы киназы, такие как ингибиторы EGFR (например, эрлотиниб, gefитиниб), ингибиторы Raf (например, вемурафениб), ингибиторы VEGFR (например, сунитиниб), ингибиторы ALK (например, кризотиниб) стандартные химиотерапевтические средства, такие как алкилирующие препараты, антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, лекарственные средства на основе платины, ингибиторы митоза, антитела, гормональную терапию или кортикостероиды. При симптомах боли подходящие комбинированные средства включают противовоспалительные средства, такие как НПВП. Фармацевтические композиции по изобретению могут дополнительно включать одно или несколько таких активных средств, и способы лечения могут дополнительно включать введение эффективного количества одного или нескольких таких активных средств.

Примеры

Примеры и препараты, представленные ниже, дополнительно иллюстрируют и поясняют конкретные аспекты вариантов осуществления изобретения. Следует понимать, что объем настоящего раскрытия никоим образом не ограничивается объемом следующих примеров.

Сокращения

В примерах, описанных в настоящем документе, используются вещества, включая, но не ограничиваясь этим, вещества, описанные следующими сокращениями, известными специалистам в данной области:

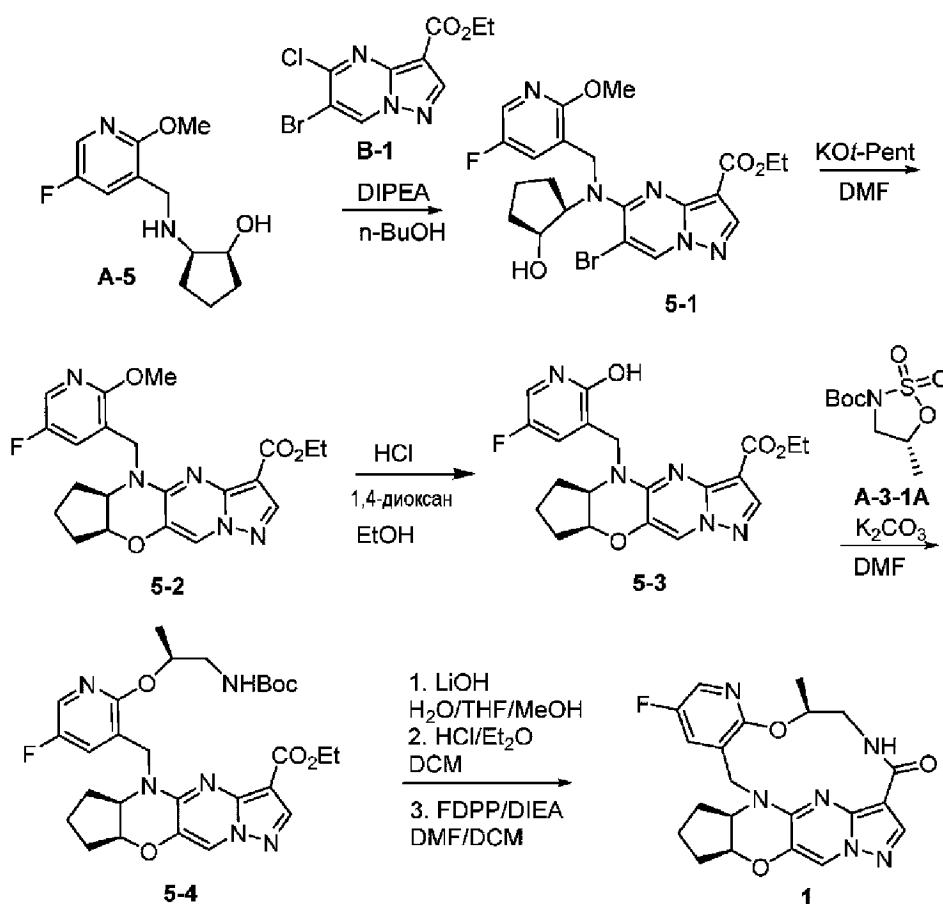
г	граммы
Экв.	эквиваленты
ммоль	миллимоли
моль	моли
мл	миллилитры
л	литры
EtOH	этанол
MeOH	Метанол
DCM	дихлорметан
МГц	мегагерц
δ	химический сдвиг
THF	тетрагидрофуран
DMSO-d ₆	дейтерированный диметилсульфоксид
CDCl ₃	дейтерированный хлороформ
t-BuOH	<i>трет</i> -бутанол
DIEA или DIPEA или основание Хунига	п, п-диизопропилэтиламин
мин	минута или минуты
час или ч	час или часы
TLC	тонкослойная хроматография
М	молярный
FDPP	Пентафторфенил дифенилфосфинат
DMF	N, N-диметилформамид
KOt-Pent	трет-пентоксид калия

Пример 1

Синтез соединения I

Соединение I получали по следующей схеме синтеза:

Получение (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она (5)



Стадия 1. К раствору В-1 (454 мг, 1,49 ммоль) и А-5 (358 мг, 1,49 ммоль) в *t*-BuOH (5,0 мл) добавляли основание Хунига (963 мг, 7,45 ммоль, 1,30 мл). Смесь нагревали до 105°C в течение 17 ч. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография (система ISCO, диоксид кремния (12 г), 10-40% этилацетата в гексане) давала 5-1 (292 мг, 38% выход).

Стадия 2. К раствору 5-1 (18,8 мг, 37 мкмоль) в DMF (3 мл) добавляли KOt-Pent (1,7 М, 65 мкл) в толуоле. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов. Реакционную смесь охлаждали до -20°C и гасили насыщенным раствором NH₄Cl (5 мл), затем экстрагировали DCM (3×10 мл). Объединенные экстракты сушили Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография (система ISCO, диоксид кремния (12 г), 0-5% метанола в дихлорметане) давала 5-2 (6,2 мг, 39% выход).

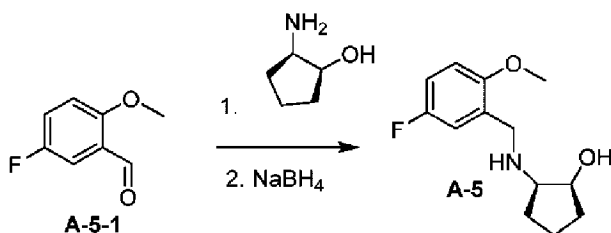
Стадия 3. К раствору 5-2 (6,2 мг, 14,5 мкмоль) в EtOH (4 мл) добавляли водный раствор HCl (4,0 М, 3,0 мл) в 1,4-диоксане. Смесь нагревали при 70°C в течение 6 часов. Смесь охлаждали, концентрировали при пониженном давлении, и сушили в высоком вакууме, с получением неочищенного продукта 5-3. Соединение использовали как есть.

Стадия 4. Добавляли K₂CO₃ (14,0 мг, 101 мкмоль) к 5-3 (6,2 мг, 14,5 мкмоль) и А-3-1А (17 мг, 73 мкмоль, трет-бутил (R)-5-метил-1,2,3-оксатиазолидин-3-карбоксилат 2,2-диоксид, доступный, например, от Advanced ChemBlocks Inc) в DMF (250 мкл) и перемешивали в течение 2 часов. Смесь охлаждали и гасили водой (5 мл), затем экстрагировали DCM (3×10 мл). Объединенные экстракты сушили Na₂SO₄ и

концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография (система ISCO, диоксид кремния (12 г), 20-100% этилацетата в гексане) давала 5-4 (6,1 мг, 73% выход).

Стадия 5. К раствору 5-4 (6,1 мг, 10,7 мкмоль) в MeOH (3 мл) и THF (1 мл) при температуре окружающей среды добавляли водный раствор LiOH (2,0 М, 1,0 мл). Смесь нагревали при 60°C в течение 16 ч, охлаждали до -20°C, затем гасили водным раствором HCl (2,0 М) до кислотного. Смесь экстрагировали DCM (3×5 мл), сушили Na₂SO₄, концентрировали при пониженном давлении, и сушили в высоком вакууме. Неочищенное вещество растворяли в DCM (4 мл), с последующим добавлением HCl в 1,4-диоксане (4 М, 3 мл). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч, концентрировали при пониженном давлении, и сушили в высоком вакууме. Неочищенное вещество растворяли в DMF (2,0 мл) и DCM (4,0 мл) и основании Хюнига (185 мг, 1,4 ммоль, 250 мкл), затем одной порцией добавляли FDPP (34,5 мг, 89 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа, затем гасили 2 М раствором Na₂CO₃ (5 мл). Смесь перемешивали в течение 5 мин, затем экстрагировали DCM (4×10 мл). Объединенные экстракты сушили Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография (система ISCO, диоксид кремния (12 г), 0-5% метанола в дихлорметане) давала 5 (3,21 мг, 71% выход).

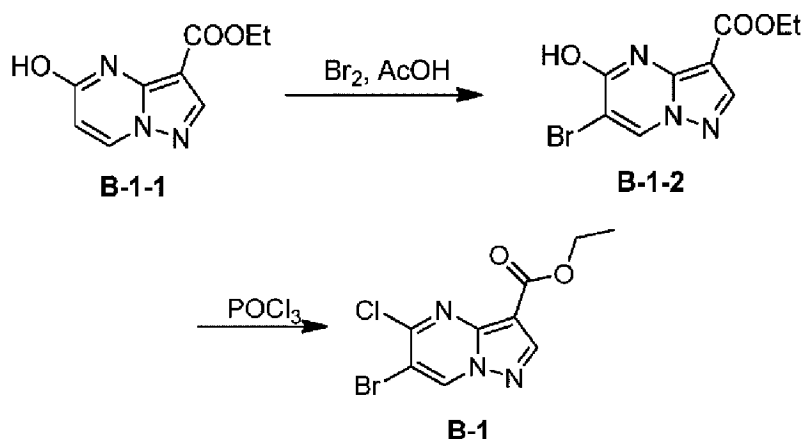
Получение (1S,2R)-2-(((5-фтор-2-метоксипиридин-3-ил)метил)амино)циклопентан-1-ола (A-5)



Раствор (1S,2R)-2-аминоциклопентанола HCl соли (69 мг, 504 мкмоль), основания Хюнига (196 мг, 0,26 мл, 1,5 ммоль) и A-1-4 (150,00 мг, 504 мкмоль) в сухом MeOH (2,50 мл) нагревали до 65°C в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли NaBH₄ (38 мг, 1,0 ммоль). Смесь перемешивали в течение 2 ч, затем гасили водой (3 мл) и перемешивали в течение 5 мин. Смесь экстрагировали DCM (3×5 мл), сушили Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Флэш-хроматография (система ISCO, диоксид кремния (12 г), 25-50% этилацетата в гексане) давала A-1 (125,3 мг, 327 мкмоль, 64,9% выход).

Соединение A-5 получали в соответствии с общим способом A с использованием 5-фтор-2-метоксиникотинальдегида на стадии 2.

Получение этил 6-бром-5-хлорпиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксилата (B-1).



Стадия 1. К раствору **B-1-1** (10,00 г, 47,80 ммоль, 1,00 экв., этил 5-гидроксипиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксилат, доступный, например, от Suzhou Devi Pharma Technology Co, Ltd.) в уксусной кислоте (100,00 мл) добавляли бром (7,64 г, 47,80 ммоль, 2,46 мл, 1,00 экв.). Смесь перемешивали при 180°C в течение 6 ч. TLC (петролейный эфир/этилацетат=1/1) показала, что исходное вещество израсходовано полностью, и было обнаружено одно новое пятно. Смесь гасили водой (30 мл). Смесь фильтровали и осадок концентрировали с получением **B-1-2** (10,00 г, 34,71 ммоль, 72,62% выход) в виде белого твердого вещества: ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ: 12,34 (шир. с., 1H), 9,25 (с, 1H), 8,15 (с, 1H), 4,28 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 1,29 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Стадия 2. К раствору **B-1-2** (6,00 г, 20,97 ммоль, 1,00 экв.) в оксихлориде фосфора (60 мл). Смесь перемешивали при 120°C в течение 16 ч. TLC (петролейный эфир/этилацетат=3/1) показала, что исходное вещество полностью израсходовано, и было обнаружено одно новое пятно. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали колоночной хроматографией (SiO₂, петролейный эфир/этилацетат=10/1-1/1) с получением **B-1** (2,50 г, 8,21 ммоль, 39,15% выход) в виде белого твердого вещества; ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ: 8,94 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 4,43 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 1,42 (т, J=7,2 Гц, 3H).

Пример 2

Образование кристаллической полиморфной формы А соединения I.

Раствор Соединения I (13,8 г) в этаноле (30 мл) обрабатывали водой (10 мл). Твердое соединение I, полученное непосредственно в результате осаждения, представляло собой кристаллическую полиморфную форму А соединения I.

Пример 3

Образование кристаллической полиморфной формы D соединения I.

Кристаллическую полиморфную форму А твердого соединения I (302 мг), полученную непосредственно из фракций очистки примера 1, стадия 5, уравнивали безводным 2-пропанолом (1,5 мл) с получением кристаллической полиморфной формы D соединения I.

Тестирование кристаллической полиморфной формы А соединения I

Пример 4

Порошковая рентгеновская дифракция (PXRD) кристаллической полиморфной формы А соединения I.

Образец соединения I, кристаллической полиморфной формы А, анализировали на PXRD на порошковом рентгеновском дифрактометре Stoe Stadi P, оснащенный детектором Mythen1K и излучением Cu-K α 1. Образец вращали во время сбора, чтобы ограничить пики предпочтительной ориентации. Данные собирали в диапазоне 1,5°-50,5° 2 θ с использованием размера шага 0,02° 2 θ и скорости сканирования 12 с на шаг. Результаты показаны на фиг. 1.

Пример 5

Термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) кристаллической полиморфной формы А соединения I.

Измерение DSC проводили на приборе TA Instruments DSC Q2000 с использованием герметически закрытых золотых тиглей для образцов. Образец 3,2150 мг соединения I, кристаллической полиморфной формы А, уравнивали при -70°C, а затем повышали до 200°C со скоростью 10°C/мин. Образец соединения I, кристаллическая полиморфная форма А, показал эндотермический пик с температурой пика 155,5°C. Результаты показаны на фиг. 2.

Пример 6

Спектр FT-Raman кристаллической полиморфной формы А соединения I.

FT-Raman проводили на образце соединения I, кристаллической полиморфной формы А, с использованием системы Bruker MultiRAM FT-Raman с Nd:YAG-лазером ближнего инфракрасного диапазона, работающим на длине волны 1064 нм, и германиевым детектором с охлаждением жидким азотом. Собирали 64 сканирования с разрешением 2 см⁻¹ в диапазоне от 3500 до 50 см⁻¹. Мощность лазера составляла 300 мВт. Оценивали только данные выше 100 см⁻¹ из-за эффектов отсечки фильтра. Образец соединения I, кристаллическая полиморфная форма А, показал абсорбцию, как показано в таблице 3:

Таблица 3

Волновое число см ⁻¹	произвольная интенсивность рамановского рассеяния
3093	0,70
3060	0,27
2993	0,72
2968	1,05
2945	1,16
2922	1,02
2870	0,55
1643	1,30

1594	0,32
1567	0,54
1519	1,58
1488	1,21
1456	0,45
1435	0,97
1395	1,46
1382	1,79
1359	1,22
1352	1,05
1329	2,27
1277	0,81
1244	0,46
1200	0,29
1120	0,39
1103	0,29
1052	0,28
1031	0,22
993	0,23
956	0,15
936	0,20
903	0,45
896	0,40
876	0,31
797	0,30
778	0,32
745	0,21
719	0,59
584	0,22
567	0,17
524	0,32
451	0,25
428	0,25
414	0,40

387	0,39
366	0,48
351	0,26
325	0,39
274	0,85
171	0,76
155	0,57
133	0,79

Тестирование кристаллической полиморфной формы D соединения I

Пример 7

Порошковая рентгеновская дифракция (PXRD) кристаллической полиморфной формы D соединения I.

Образец соединения I, кристаллической полиморфной формы D, анализировали на PXRD на порошковом рентгеновском дифрактометре Stoe Stadi P, оснащённом детектором Mythen1K и излучением Cu-K α 1. Образец вращали во время сбора, чтобы ограничить пики предпочтительной ориентации. Данные собирали в диапазоне 1,5°-50,5° 2 θ с использованием размера шага 0,02° 2 θ и скорости сканирования 12 с на шаг. Результаты показаны на фиг. 3.

Пример 8

Термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) кристаллической полиморфной формы D соединения I.

Измерение DSC проводили на приборе TA Instruments DSC Q2000 с использованием герметически закрытых золотых тиглей для образцов. Образец 1,8860 мг соединения I, кристаллической полиморфной формы D, уравнивали при -70°C, а затем повышали до 300°C со скоростью 10°C/мин. Образец соединения I, кристаллическая полиморфная форма D, показал эндотермический пик с температурой пика 239,5°C. Результаты показаны на фиг. 4.

Биологические примеры

Пример 9:

Метод биохимического анализа киназы

Биохимический анализ киназы проводили в Reaction Biology Corporation (www.reactionbiology.com, Malvern, PA) в соответствии с процедурами, описанными в ссылке (Anastassiadis T, et al Nat Biotechnol. **2011**, 29, 1039). Специфические пары киназа/субстрат вместе с необходимыми кофакторами получали в реакционном буфере; 20 mM Hepes pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,02% Brij35, 0,02 мг/мл BSA, 0,1 mM Na₃VO₄, 2 mM DTT, 1% DMSO. Соединения вводили в реакцию с последующим добавлением через ~20 минут смеси ATP (Sigma, St. Louis MO) и ³³P ATP (Perkin Elmer, Waltham MA) до конечной концентрации 10 мкМ. Реакции проводили при комнатной температуре в течение 120 мин с последующим нанесением реакционной смеси на

ионообменную фильтровальную бумагу P81 (Whatman Inc., Piscataway, NJ). Несвязанный фосфат удаляли путем интенсивной промывки фильтров 0,75% фосфорной кислотой. После вычитания фона, полученного из контрольных реакций, содержащих неактивный фермент, данные об активности киназы выражали как процент оставшейся активности киназы в тестируемых образцах по сравнению с реакциями с носителем (диметилсульфоксид). Значения IC_{50} и подборы кривых получали с использованием Prism (программное обеспечение GraphPad).

Клеточные линии и клеточная культура:

Клеточную линию ТТ медуллярного рака щитовидной железы человека (содержащая мутацию RET M918T) и клеточную линию KG-1 острая миелогенного лейкоза приобретали в ATCC. Клеточную линию KM12 рака толстой кишки человека (содержащая TPM3-TRKA) получали из NCI.

Клонирование и создание стабильной клеточной линии Ba/F3

Ген EML4-ALK (вариант 1) синтезировали в GenScript и клонирован в плазмиду pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, Inc). Ba/F3-EML4-ALK дикого типа получали путем трансдукции клеток Ba/F3 лентивирусом, содержащим EML4-ALK дикого типа. Стабильные клеточные линии отбирали путем обработки пуромицином с последующим удалением IL-3. Вкратце, 5×10^6 клеток Ba/F3 трансдуцировали супернатантом лентивируса в присутствии 8 мкг/мл сульфата протамина. Затем трансдуцированные клетки отбирали с помощью 1 мкг/мл пуромицина в присутствии IL3-содержащей среды RPMI1640 плюс 10% FBS. После 10-12 дней селекции выжившие клетки дополнительно отбирали для независимого от IL3 роста.

Ген KIF5B-RET синтезировали в GenScript и клонирован в плазмиду pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (System Biosciences, Inc). Точечные мутации KIF5B-RET V804M и G810C получали в GenScript с помощью ПЦР и подтверждены секвенированием. Ba/F3-KIF5B-RET дикого типа и мутант получали путем трансдукции клеток Ba/F3 лентивирусом, содержащим KIF5B-RET дикого типа или мутант. Стабильные клеточные линии отбирали путем обработки пуромицином с последующим удалением IL-3. Вкратце, 5×10^6 клеток Ba/F3 трансдуцировали супернатантом лентивируса в присутствии 8 мкг/мл сульфата протамина. Затем трансдуцированные клетки отбирали с помощью 1 мкг/мл пуромицина в присутствии IL3-содержащей среды RPMI1640 плюс 10% FBS. После 10-12 дней селекции выжившие клетки дополнительно отбирали для независимого от IL3 роста.

Анализы пролиферации клеток:

Две тысячи клеток на лунку высевали в 384-луночный белый планшет на 24 часа, а затем обрабатывали соединениями в течение 72 часов (37°C, 5% CO₂). Пролиферацию клеток измеряли с использованием анализа обнаружения АТФ на основе люциферазы CellTiter-Glo (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Определение IC_{50} проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad, Inc., San Diego, CA).

Данные и результаты:

Ферментативная киназная активность соединения I.

Соединение I	IC ₅₀ (нМ) при 10 мкМ АТФ
RET	1,0
RET (A883F)	1,2
RET (E762Q)	1,0
RET (G691S)	1,8
RET (L790F)	0,4
RET (M918T)	0,3
RET (R749T)	0,8
RET (R813Q)	1,7
RET (S891A)	0,2
RET (S904A)	0,9
RET (S904F)	0,5
RET (V778I)	0,1
RET (V804E)	>1000
RET (V804L)	6,2
RET (V804M)	8,1
RET (Y791F)	0,4
RET (Y806H)	2,6
RET-CCDC6 (PTC1)	0,5
RET-NCOA4 (PTC3)	0,7
SRC	1,5
FYN	1,9
LYN	2,0
YES/YES1	2,6
HCK	2,7

Активность анти-клеточной пролиферации

Соед.	Ba/F3 EML4- ALK	KG-1 IC ₅₀ (нМ)	клетки Т (RET M918T) IC ₅₀ (нМ)	Ba/F3 KIF5B- RET IC ₅₀ (нМ)	Ba/F3 KIF5B- RET_V80 4M IC ₅₀ (нМ)	Клетки KM12 (TPM3- TRKA) IC ₅₀ (нМ)	Ba/F3 KIF5B- RET_G8 10C IC ₅₀ (нМ)
1	211,4	131,2	<0,5	0,25	1002	3,0	<15

Сравнение анти-клеточной пролиферации соединения I

CPD	Эксперимент 1			Эксперимент 2		
	IC ₅₀ (нМ)	IC ₇₅ (нМ)	IC ₉₀ (нМ)	IC ₅₀ (нМ)	IC ₇₅ (нМ)	IC ₉₀ (нМ)
LOXO-292	301,3	1021	3447	363,8	791,4	2374
BLU-667	18,5	115,4	720,4	44,6	214,3	1029
Cpd I	9,6	28,8	86,4	13,3	39,9	119,7

См. также фиг. 5А и фиг. 5В.

Соединение I сильно ингибирует автофосфорилирование Ba/F3 KIF5B-RET G810C

Эффект соединения I и LOXO-292 на фосфорилирование RET-G810C по остатку Y905 в сконструированных клетках Ba/F3. Различные концентрации соединения I, LOXO-292 инкубировали с Ba/F3 KIF5B-RET G810C (1 миллион клеток на лунку в 24-луночном планшете) в течение 4 часов. Клетки собирали, лизировали и определяли уровень p-RET(Y905, RET с помощью SDS-PAGE и иммуноблоттинга с использованием соответствующих антител. Актин использовали в качестве контроля нагрузки. Соединение I имело IC₅₀ в пределах 1-3 нМ, в то время как у LOXO-292 превышало 300 нМ. Результаты показаны на фиг. 6А и фиг. 6В.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кристаллическая полиморфная форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, или его гидрат.

2. Кристаллическая полиморфная форма по п. 1, где кристаллическая форма представляет собой полиморфную форму свободного основания (7S,13R)-11-фтор-7,13-диметил-6,7,13,14-тетрагидро-1,15-этенпиразоло[4,3-f][1,4,8,10]бензоксатриазациклотридецин-4(5H)-она, или его гидрата.

3. Кристаллический полиморф по п. 1 или 2, где кристаллическая форма представляет собой моногидрат.

4. Кристаллический полиморф по п. 1 или 2, где кристаллическая форма является безводной.

5. Кристаллическая полиморфная форма А (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, имеющая порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $20,1 \pm 0,1$.

6. Кристаллическая полиморфная форма по п. 5, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $11,3 \pm 0,1$ и $20,1 \pm 0,1$.

7. Кристаллическая полиморфная форма по п. 6, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $11,3 \pm 0,1$, $20,1 \pm 0,1$ и $23,9 \pm 0,1$.

8. Кристаллическая полиморфная форма по п. 7, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $11,3 \pm 0,1$, $18,0 \pm 0,1$, $20,1 \pm 0,1$ и $23,9 \pm 0,1$.

9. Кристаллическая полиморфная форма по п. 8, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $10,3 \pm 0,1$, $11,3 \pm 0,1$, $18,0 \pm 0,1$, $20,1 \pm 0,1$ и $23,9 \pm 0,1$.

10. Кристаллическая полиморфная форма по п. 9, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $10,3 \pm 0,1$, $11,3 \pm 0,1$, $16,6 \pm 0,1$, $18,0 \pm 0,1$, $20,1 \pm 0,1$ и $23,9 \pm 0,1$.

11. Кристаллическая полиморфная форма по п. 10, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $10,3 \pm 0,1$, $11,3 \pm 0,1$, $16,6 \pm 0,1$, $18,0 \pm 0,1$, $20,1 \pm 0,1$, $20,5 \pm 0,1$ и $23,9 \pm 0,1$.

12. Кристаллическая полиморфная форма D (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, имеющая

порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $18,8\pm 0,1$.

13. Кристаллическая полиморфная форма по п.12, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $18,8\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

14. Кристаллическая полиморфная форма по п. 13, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $12,3\pm 0,1$, $18,8\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

15. Кристаллическая полиморфная форма по п. 14, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $12,3\pm 0,1$, $18,8\pm 0,1$, $19,4\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

16. Кристаллическая полиморфная форма по п. 15, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $12,3\pm 0,1$, $13,1\pm 0,1$, $18,8\pm 0,1$, $19,4\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

17. Кристаллическая полиморфная форма по п. 16, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $12,3\pm 0,1$, $13,1\pm 0,1$, $15,3\pm 0,1$, $18,8\pm 0,1$, $19,4\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

18. Кристаллическая полиморфная форма по п. 17, где кристаллическая полиморфная форма имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, включающую пик при угле дифракции (2θ) $9,4\pm 0,1$, $12,3\pm 0,1$, $13,1\pm 0,1$, $15,3\pm 0,1$, $18,8\pm 0,1$, $19,4\pm 0,1$ и $20,9\pm 0,1$.

19. Кристаллическая полиморфная форма по любому из п.п. 1-11, имеющая спектры Raman, включающие по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь или по меньшей мере примерно 8 пиков, выбранных из таблицы 3.

20. Кристаллическая полиморфная форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, имеющая порошковую рентгеновскую дифрактограмму, по существу такую же, как показано на фиг.1.

21. Кристаллическая полиморфная форма (3aR,11S,20aS)-7-фтор-11-метил-2,3,3a,12,13,20a-гексагидро-1H,5H-17,19-(метено)циклопента[5,6][1,4]оксазино[3,4-i]пиразоло[4,3-f]пиридо[3,2-l][1,4,8,10]оксатриазациклотридецин-14(11H)-она, имеющая порошковую рентгеновскую дифрактограмму, по существу такую же, как показано на фиг. 3.

22. Фармацевтическая композиция, включающая кристаллическую полиморфную форму по любому из предшествующих пунктов.

23. Способ лечения заболевания у млекопитающего, включающий введение млекопитающему терапевтически эффективного количества кристаллической полиморфной формы по любому из п.п.1-21.

24. Способ по п. 23, где млекопитающее представляет собой человека.

25. Способ по п. 24, где заболевание выбрано из группы, состоящей из рака, боли, неврологических заболеваний, аутоиммунных заболеваний и воспаления.

26. Способ по п. 25, где заболевание представляет собой рак.

27. Способ по п. 26, где рак выбран из групп, состоящих из рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, кожной или интраокулярной меланомы, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака фаллопиевых труб, рака эндометрия, рака шейки матки, рака влагалища, рака вульвы, болезни Ходжкина, видов рака желудка и пищевода, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака полового члена, рака предстательной железы, хронического или острого лейкоза, лимфоцитарных лимфом, таких как анапластическая крупноклеточная лимфома, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, почечно-клеточного рака, рака почечной лоханки, новообразований центральной нервной системы (ЦНС), глиобластомы, первичной лимфомы ЦНС, опухолей оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, воспалительных миофибробластических опухолей, и их комбинаций.

28. Способ по любому из п.п. 23-27, где заболевание представляет собой рак, опосредованный генетически измененной RET.

29. Способ по любому из п.п. 23-27, где заболевание представляет собой рак, опосредованный генетически измененной RET, содержащей по меньшей мере одну точечную мутацию, выбранную из группы, состоящей из A883F, E762Q, G691S, L790F, M918T, R749T, R813Q, S891A, S904A, S904F, V778I, V804L, V804M, Y791F и Y806H.

30. Способ по любому из п.п. 23-27, где заболевание представляет собой рак, опосредованный слитым белком, содержащим фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, который может образовывать суперспиральное взаимодействие для облегчения димеризации или олигомеризации белка.

31. Способ по любому из п.п. 23-27, где заболевание представляет собой рак, опосредованный слитым белком, содержащим фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, кодируемый геном, выбранным из группы, состоящей из KIF5B, CCDC6, NCOA4, TRIM24, TRIM33, PRKAR1A, GOLGA5, KTN1, ERC1, MBD1 и TRIM27.

32. Способ по п. 31, где слитый белок содержит фрагмент белка, кодируемый геном RET, и фрагмент белка, кодируемый геном KIF5B.

33. Способ по п. 28, где генетически измененный RET представляет собой слитый белок KIF5B-RET, CCDC6-RET, NCOA4-RET, TRIM24-RET, TRIM33-RET, PRKAR1A - RET, GOLGA5-RET, KTN1-RET, ERC1-RET, MBD1-RET или TRIM27-RET.

34. Способ по п. 28 или 33, где генетически измененный RET представляет собой слитый белок KIF5B-RET.

35. Способ по п. 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET представляет собой белок дикого типа.

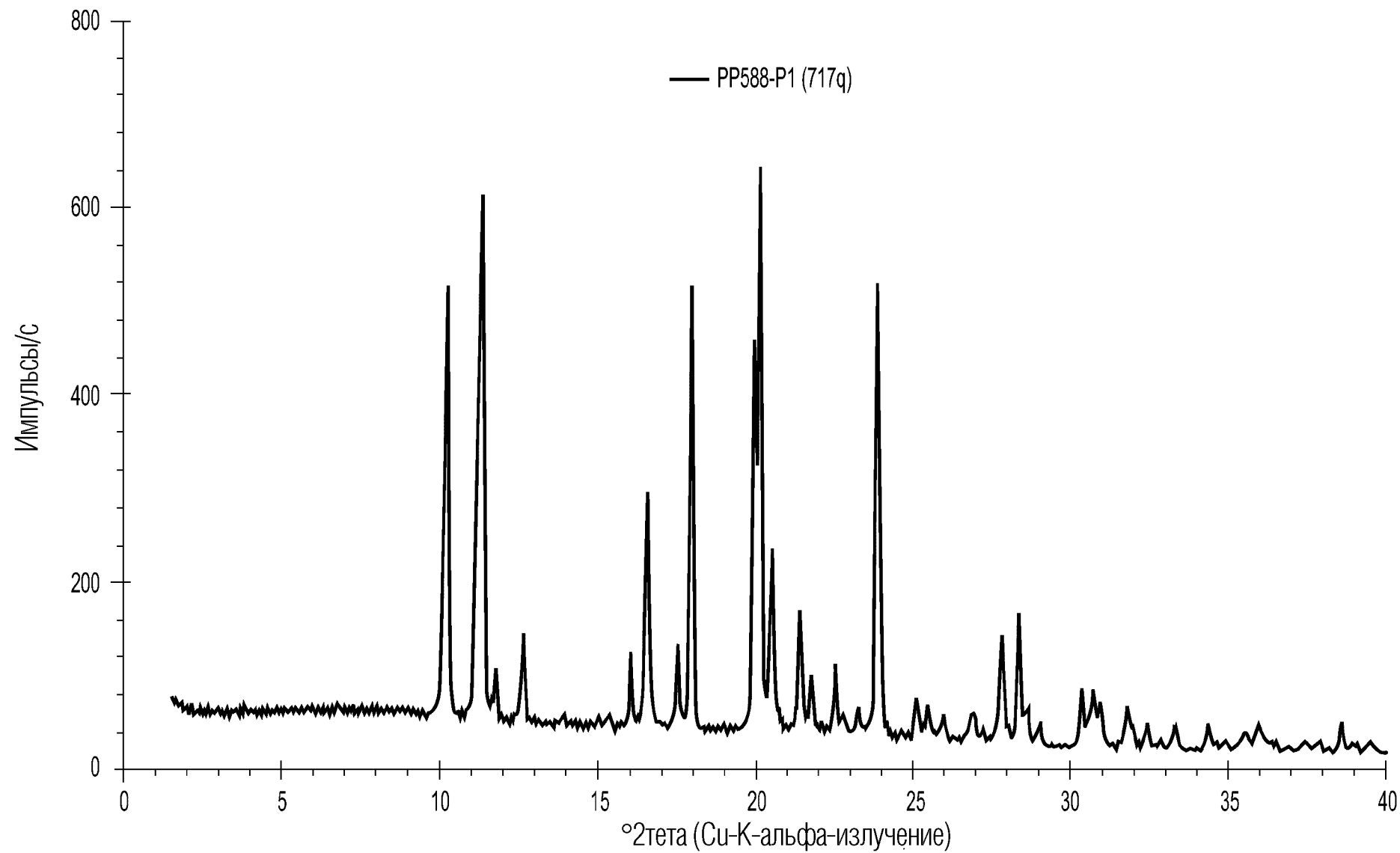
36. Способ по п. 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности.

37. Способ по п. 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности гейткипера.

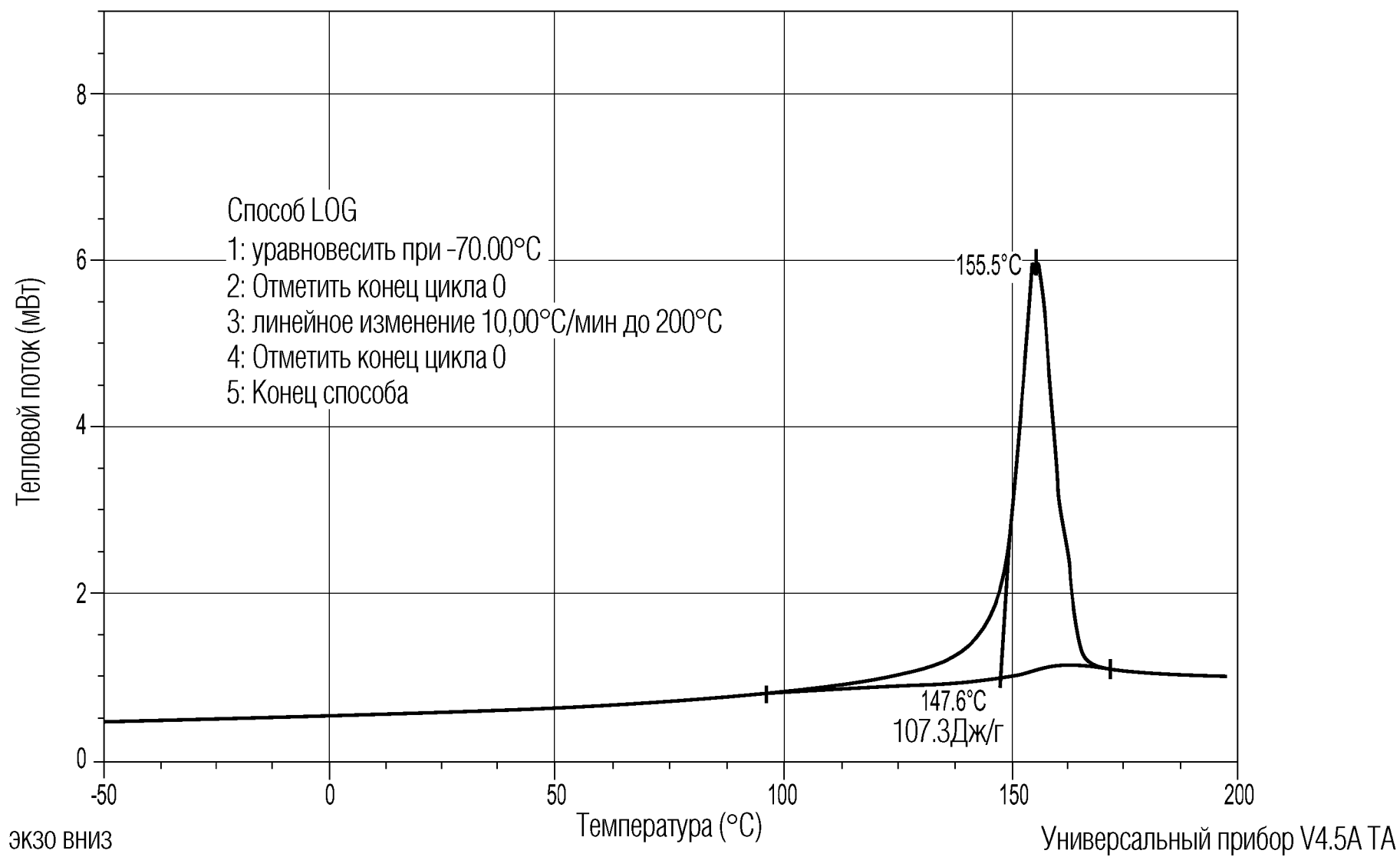
38. Способ по п. 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию резистентности, связанную с фронтом растворителя.

39. Способ по п. 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из A883F, E762Q, G691S, L790F, M918T, R749T, R813Q, S891A, S904A, S904F, V778I, V804L, V804M, Y791F, Y806H, V804M, G810R, G810C и G810S.

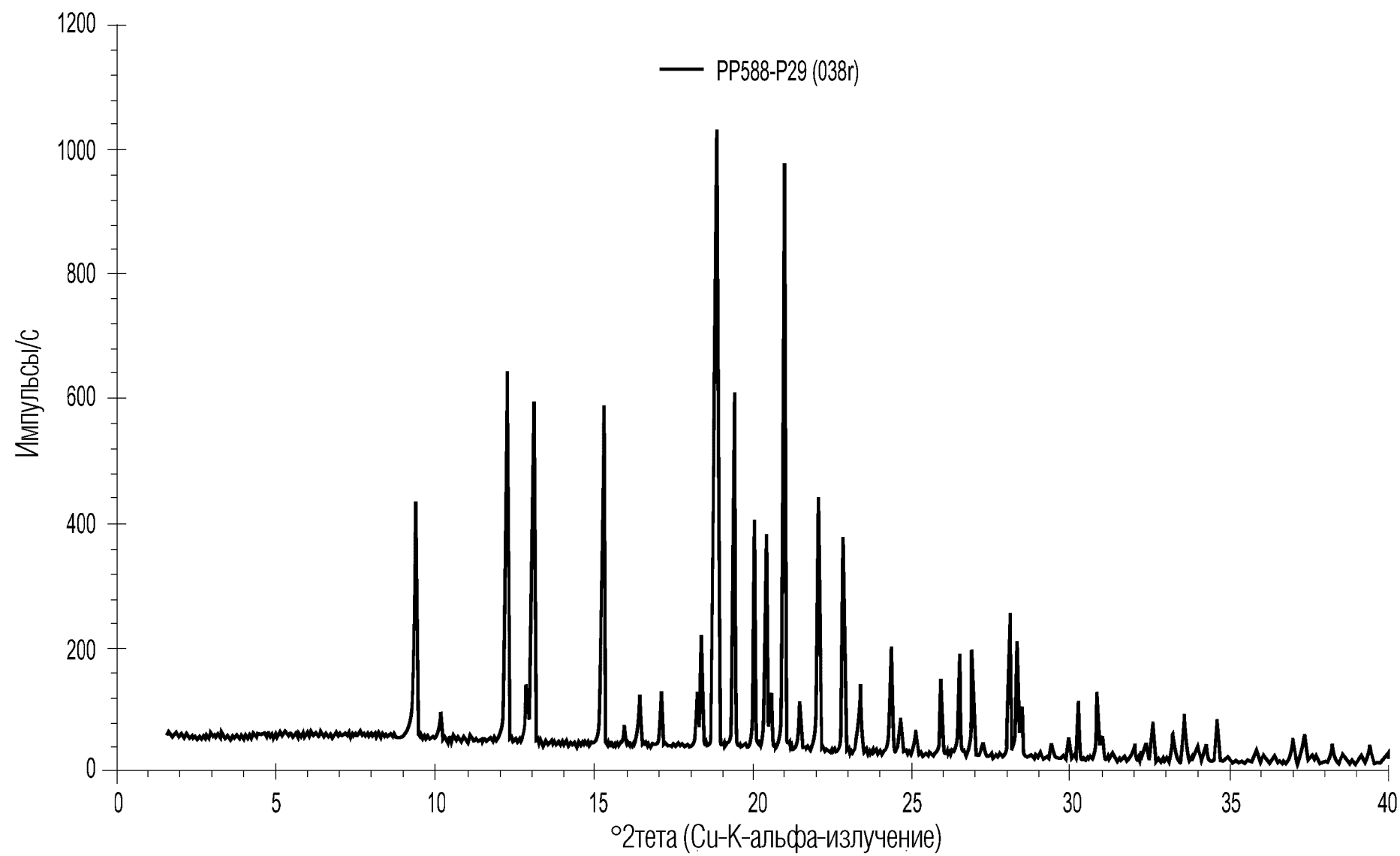
40. Способ по п. 28, 33 или 34, где слитый белок KIF5B-RET содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из V804M, G810R, G810C и G810S.



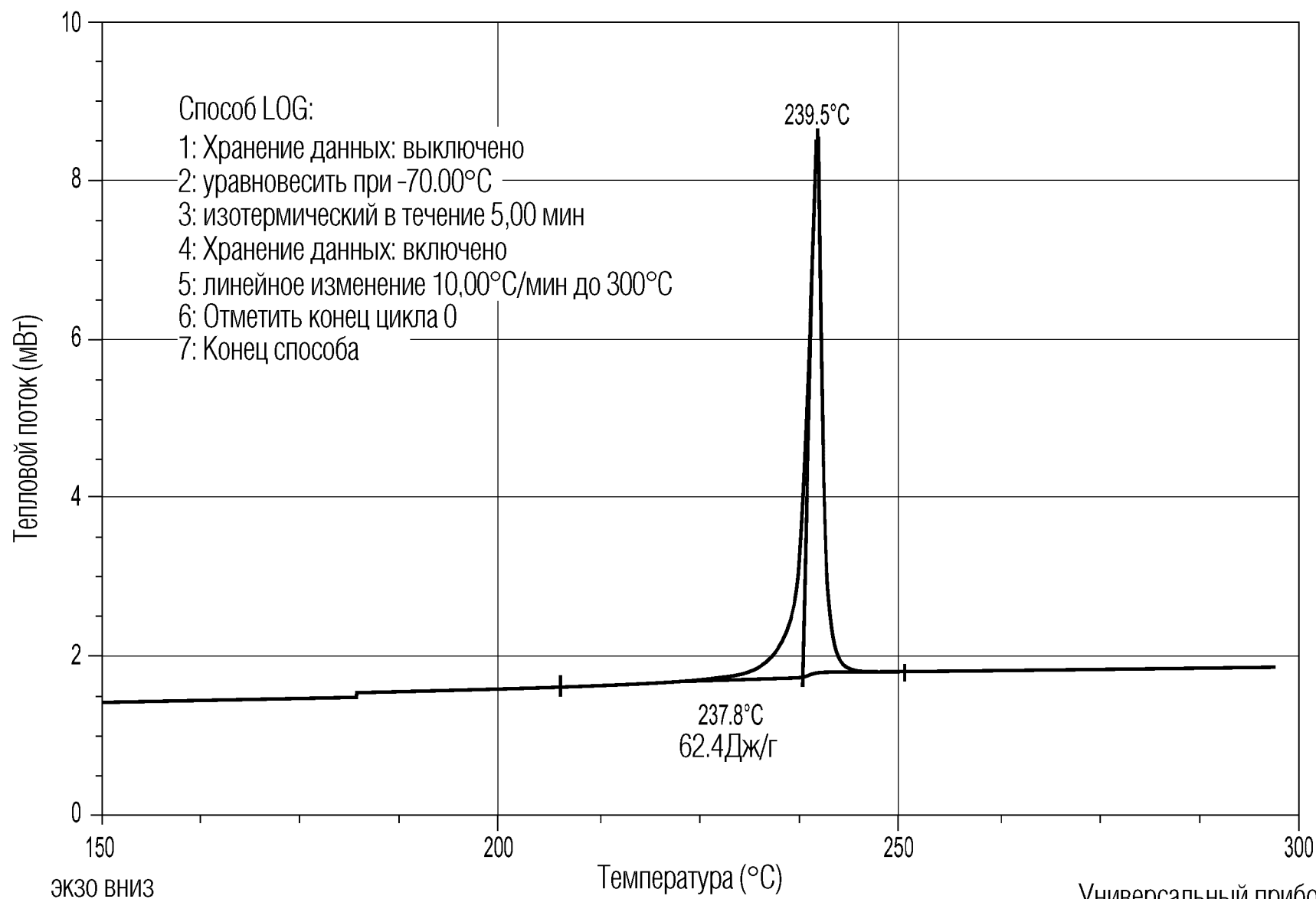
ФИГ. 1



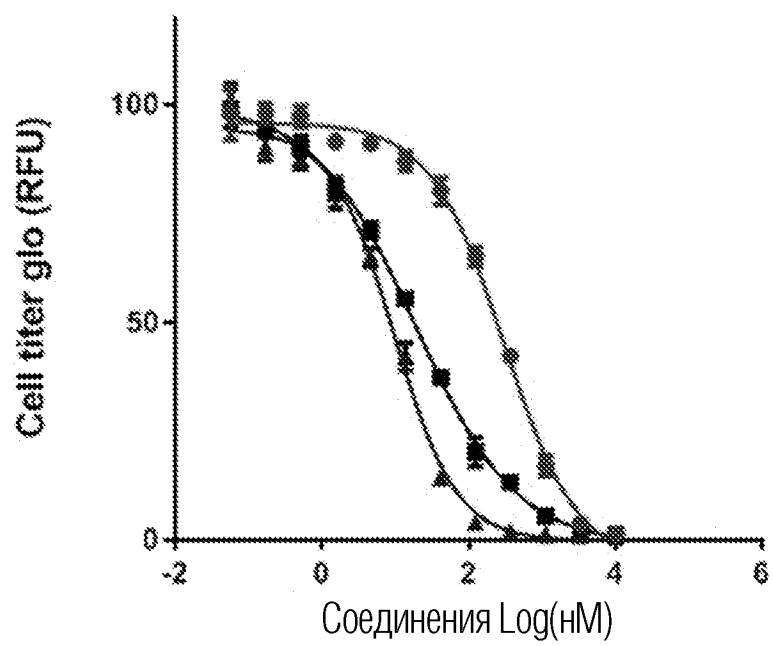
ФИГ. 2



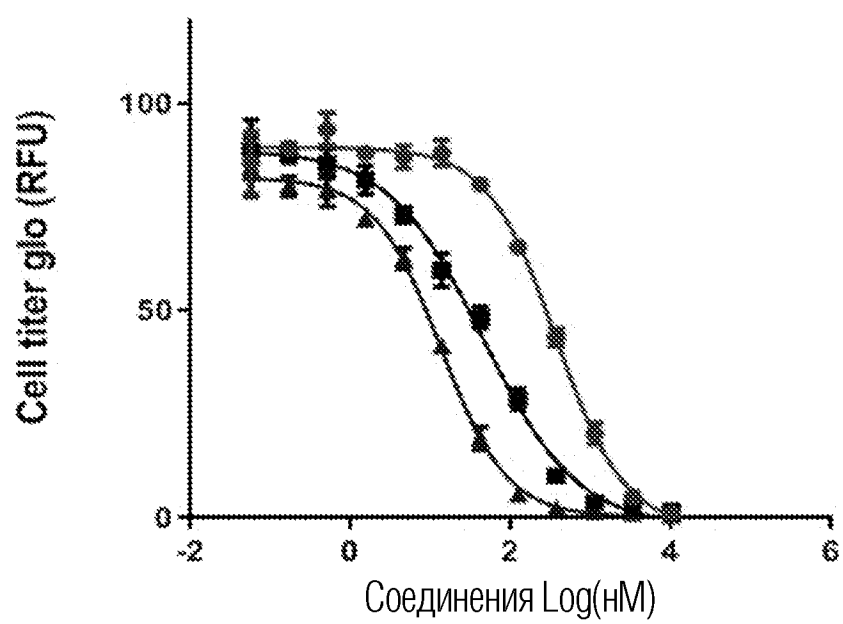
ФИГ. 3



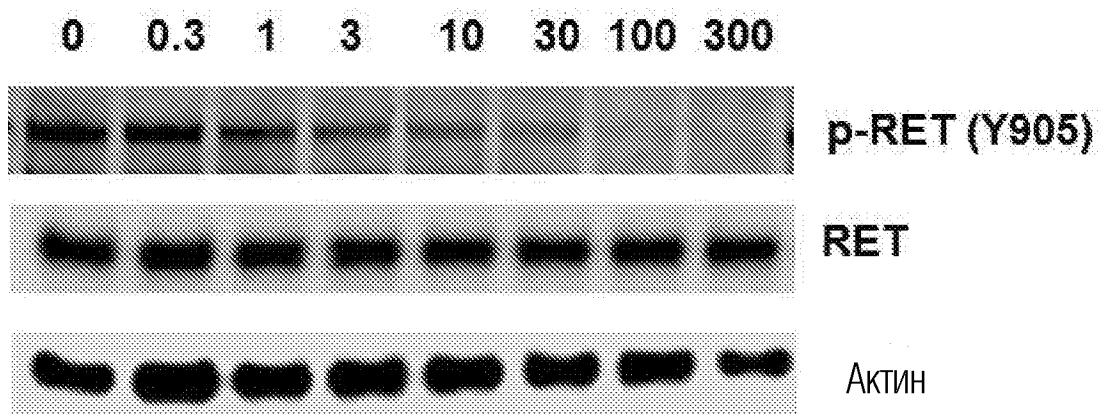
ФИГ. 4



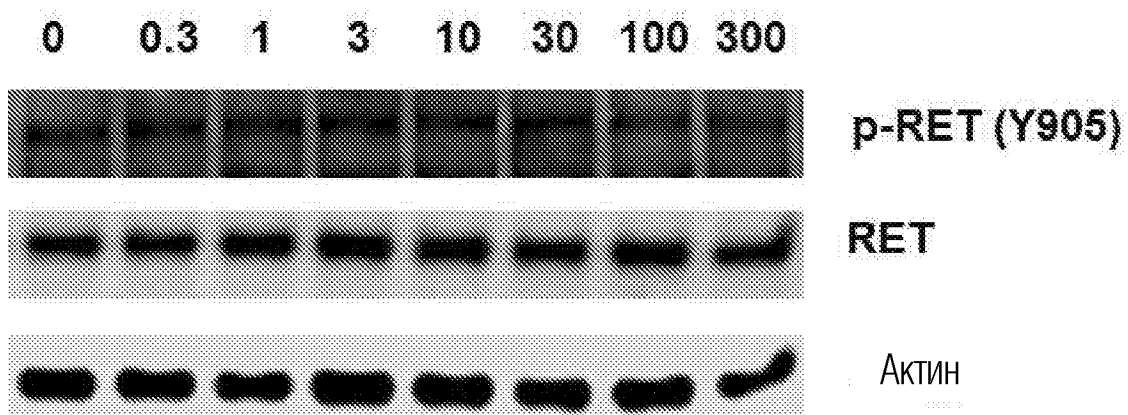
ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В