(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292410 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.18

(22) Дата подачи заявки
2021.03.22

(51) Int. Cl. ***A61K 31/5395*** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ СУБЪЕКТОВ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ИНГИБИТОРУ IDH1

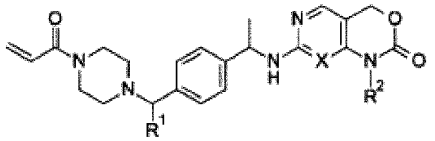
(31) **62/993,135; 63/024,761; 63/151,905**
(32) **2020.03.23; 2020.05.14; 2021.02.22**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/023452**
(87) **WO 2021/194953 2021.09.30**

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Брукс Нейтан Артур, Гилмоур Рэймонд (US)

(74) Представитель:
Гизатуллина Е.М., Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М., Строкова О.В., Джермакян Р.В., Христофоров А.А. (RU)

(57) Изобретение относится к лечению субъектов-людей с раком ингибитором мутантной изоцитратдегидрогеназы 1 формулы I.



202292410 A1

202292410 A1

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ СУБЪЕКТОВ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ИНГИБИТОРУ IDH1

Настоящее изобретение относится к лечению рака у субъектов ингибитором мутантной изоцитратдегидрогеназы 1 (IDH1), раскрытым в настоящем документе.

IDH1 представляет собой фермент, катализирующий превращение изоцитрата в α-кетоглутарат (α-KG) и восстанавливающий никотинамидадениндинуклеотидфосфат ($НАДФ^+$) до НАДФ (Megias-Vericat J, *et al.*, *Blood Lymph. Cancer: Targets and Therapy 2019*; 9: 19-32).

Неоморфные (*de novo*) мутации в IDH1, например, в аминокислотном остатке R132 в IDH1, вносят вклад в онкогенез при некоторых видах рака, включая солидные опухоли и гематологические злокачественные новообразования (Badur MG, *et al.*, *Cell Reports 2018*; 25: 1680). Мутации IDH1 могут приводить к высоким уровням 2-гидроксиглутарата (2-HG), который ингибирует клеточную дифференцировку, а ингибиторы мутантного IDH1 могут снижать уровни 2-HG, что способствует клеточной дифференцировке (Molenaar RJ, *et al.*, *Oncogene 2018*; 37: 1949-1960).

Например, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) характеризуется широким спектром мутированных генов и многоклональной геномной архитектурой, включающей предлейкозные и лейкозные клоны, которые динамично развиваются с течением времени и под селективным давлением терапии (Bloomfield CD, *et al.*, *Blood Revs. 2018*: 32: 416-425).

Индукционная химиотерапия цитарабином и антрациклином («7 + 3») уже более 4 десятилетий является стандартом лечения пациентов с впервые диагностированным ОМЛ. За последние годы пять лекарственных средств были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения ОМЛ: мидостаурин, энасидениб, CPX-351, гемтузумаб озогамицин (Bloomfield CD, *et al.*, *Blood Revs. 2018*; 32: 416-425) и ивосидениб (Megias-Vericat J, *et al.*, *Blood Lymph. Cancer: Targets and Therapy 2019*; 9: 19-32).

Можно ожидать, что примерно от 60% до 70% взрослых с ОМЛ достигнут статуса полной ремиссии (ПР) после подходящей индукционной терапии, и можно ожидать, что более 25% взрослых с ОМЛ (около 45% из тех, кто достиг ПР) выживут в течение 3 и более лет и могут быть вылечены.

Однако мутации IDH1, придающие резистентность, наблюдаются у 7–14% пациентов с ОМЛ, и связанный с ними высокий уровень 2-HG может привести к фенотипу эпигенетического гиперметилирования и блокированию дифференцировки, что приводит к лейкемогенезу (Megias-Vericat J, *et al.*, *Blood Lymph. Cancer: Targets and Therapy 2019*; 9:

19-3). Кроме того, мутации киназы Flt3 наблюдаются примерно у трети пациентов с ОМЛ (Lee HJ, *et al.*, *Oncotarget 2018*; 9: 924-936).

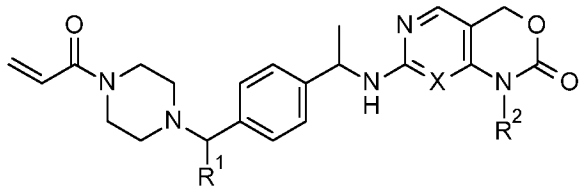
Так называемые «вторичные» мутации IDH1, как определено в настоящем документе, могут способствовать рецидиву после лечения ингибитором мутантного IDH1. Например, на сегодняшний день сообщалось о шести вторичных мутациях IDH1 после лечения ивосиденибом: R119P, G131A, D279N, S280F, G289D или H315D (Choe S, *et al.*, "Molecular mechanisms mediating relates following ivosidenib monotherapy in subjects with *IDH1*-mutant relapsed or refractory acute myeloid leukemia," *61st Am. Soc. Hematol. (ASH) Annual Meeting poster*, Dec. 7-10, 2019, Orlando, FL, USA; Choe, S., *et al.*, Blood Adv. 2020; 4(9): 1894-1905).

Таким образом, сохраняется потребность в альтернативных методах лечения рака, связанного с мутантным IDH1, особенно для субъектов, у которых возникают вторичные мутации IDH1 после первоначальной терапии ингибитором мутантного IDH1.

Некоторые ингибиторы мутантного IDH1 раскрыты в публикации WO 2018/111707 A1, включая соединение, определенное в настоящем документе как «Соединение A», которое является ковалентным ингибитором мутантного IDH1, который модифицирует один цистеин (Cys269) в кармане аллостерического связывания, быстро инактивирует фермент и селективно ингибирует продукцию 2-HG, не влияя на уровни α-KG (WO 2018/111707 A1).

Настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение субъекту-человеку с раком, имеющему мутацию R132 в IDH1 и одну или более вторичных мутаций IDH1, терапевтически эффективного количества соединения формулы I:

I



,

где:

R^1 представляет собой $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2OCH_3$ или $-CH_2$-циклопропил;

R^2 представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$; и

X представляет собой N или CH;

или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению в соединении формулы I X представляет собой N, или его фармацевтически приемлемая соль. В другом

варианте осуществления X представляет собой N, R^1 представляет собой $–CH_2$-циклопропил и R^2 представляет собой $-CH_2CH_3$, или его фармацевтически приемлемая соль. В другом варианте осуществления X представляет собой N, R^1 представляет собой $–CH_2$-циклопропил и R^2 представляет собой $-CH_2CH_3$.

В другом варианте осуществления соединение формулы I представляет собой:

7-[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

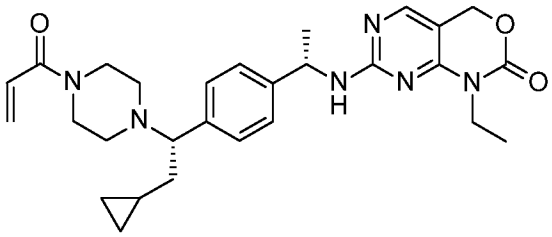
7-[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он; или

1-этил-7-[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

или фармацевтически приемлемую соль любого из них.

В другом варианте осуществления соединение формулы I представляет собой 7-[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он.

В другом варианте осуществления соединение формулы I представляет собой:



(называемое в настоящем документе «Соединение A») или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления соединение представляет собой Соединение A.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению мутация R132 представляет собой R132H. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132C. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132G. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132L. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132S.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению одна или более вторичных мутаций IDH1 представляют собой одну или более из R119P, G131A, D279N, S280F, G289D или H315D. В другом варианте осуществления вторичная мутация IDH1 представляет собой две или более из R119P, G131A, D279N, S280F, G289D или H315D.

В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий мутацию R132 в IDH1. В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий мутацию R132 в IDH1 в ткани.

В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий одну или более вторичных мутаций IDH1.

В другом варианте осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание, и субъект идентифицирован как имеющий мутацию R132 в IDH1 в крови, костном мозге, лимфатическом узле или лимфатической жидкости. В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий мутацию R132 в IDH1 в клетках крови, клетках костного мозга, или клетках крови, или клетках лимфатического узла, или клетках лимфатической жидкости. В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий одну или более вторичных мутаций IDH1.

В другом варианте осуществления рак представляет собой рак в виде солидной опухоли, и субъект идентифицирован как имеющий мутацию R132 в IDH1 в ткани солидной опухоли. В другом варианте осуществления ткань солидной опухоли представляет собой ткань холангиокарциномы. В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий мутацию R132 в IDH1 в клетках ткани солидной опухоли. В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий одну или более вторичных мутаций IDH1.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению рак представляет собой солидную опухоль. В другом варианте осуществления солидная опухоль представляет собой холангиокарциному, рак головы и шеи, хондросаркому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рак поджелудочной железы, астроцитому, олигодендроглиому, глиому, глиобластому, карциному мочевого пузыря, колоректальный рак, рак легкого или синоназальную недифференцированную карциному. В другом варианте осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте осуществления солидная опухоль представляет собой холангиокарциному.

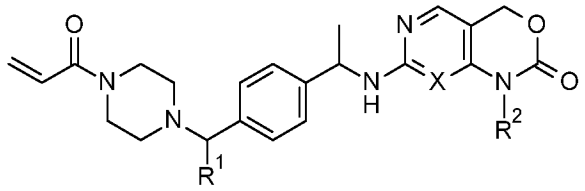
В другом варианте осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В другом варианте осуществления гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром/миелопролиферативное новообразование, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, истинную полицитемию, эссенциальную тромбоцитемию, первичный

миелофиброз или хронический миелогенный лейкоз. В другом варианте осуществления гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз.

В другом варианте осуществления субъект получал лечение ингибитором мутантного IDH1, отличным от соединения формулы I. В другом варианте осуществления ингибитор мутантного IDH1, отличный от соединения формулы I, представляет собой ворасидениб, BAY-1436032, AGI-5198, IDH305 или ивосидениб. В другом варианте осуществления ингибитор мутантного IDH1, отличный от соединения формулы I, представляет собой ивосидениб. В другом варианте осуществления субъект получал лечение ингибитором мутантного IDH1, отличным от соединения формулы I, до лечения соединением формулы I.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы I:

I



,

где:

R^1 представляет собой $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2OCH_3$ или $–CH_2$-циклопропил;

R^2 представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$;

X представляет собой N или CH; или его фармацевтически приемлемой соли;

для применения для лечения рака у субъекта-человека, имеющего мутацию p R132 в IDH1 и одну или более вторичных мутаций IDH1.

Для соединения формулы I предпочтительно, чтобы X представлял собой N, или его фармацевтически приемлемая соль; предпочтительно, чтобы R^1 представлял собой $–CH_2$-циклопропил, или его фармацевтически приемлемая соль; предпочтительно, чтобы R^2 представлял собой $-CH_2CH_3$, или его фармацевтически приемлемая соль; более предпочтительно, чтобы X представлял собой N, R^1 представлял собой $–CH_2$-циклопропил и R^2 представлял собой $-CH_2CH_3$, или его фармацевтически приемлемая соль; наиболее предпочтительно, чтобы X представлял собой N, R^1 представлял собой $–CH_2$-циклопропил и R^2 представлял собой $-CH_2CH_3$.

Предпочтительные соединения формулы (I) представляют собой:

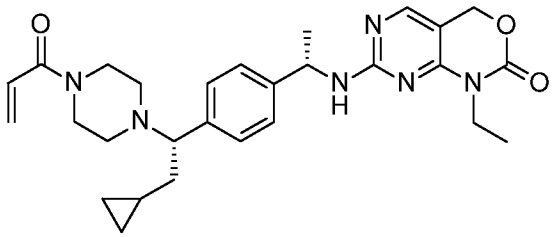
7-[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

7-[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он; или

1-этил-7-[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

или фармацевтически приемлемую соль любого из них.

Более предпочтительным соединением формулы I является:



(Соединение A) или его фармацевтически приемлемая соль.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения рак представляет собой рецидив рака. В другом варианте осуществления рецидив рака представляет собой рак в виде солидной опухоли. В другом варианте осуществления рецидив рака в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному. В другом варианте осуществления рецидив рака представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В другом варианте осуществления рецидив гематологического злокачественного новообразования представляет собой рецидив ОМЛ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения рак представляет собой рефрактерный рак. В другом варианте осуществления рефрактерный рак представляет собой рак в виде солидной опухоли. В другом варианте осуществления рефрактерный рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному. В другом варианте осуществления рефрактерный рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В другом варианте осуществления рефрактерное гематологическое злокачественное заболевание представляет собой рефрактерный ОМЛ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения рак представляет собой распространенный рак. В другом варианте осуществления распространенный рак представляет собой распространенный рак в виде солидной опухоли. В другом варианте осуществления распространенный рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному. В другом варианте осуществления распространенный рак представляет собой распространенное гематологическое злокачественное заболевание. В другом варианте осуществления распространенное гематологическое злокачественное заболевание представляет собой распространенный ОМЛ.

В другом варианте осуществления ОМЛ представляет собой острый промиелоцитарный лейкоз.

Под следующими терминами, используемыми выше и по всему тексту описания изобретения, если не указано иное, следует понимать следующее:

Термин «гематологическая ткань» относится к крови, костному мозгу, селезенке, лимфатическому узлу или лимфатической жидкости.

Термин «ткань солидной опухоли» относится к ткани, которая не является гематологической тканью. Неограничивающими примерами солидной ткани являются холангиальная ткань, ткань поджелудочной железы, ткань головы, ткань шеи, ткань печени, ткань кожи, астроцитомальная ткань, олигодендроглиальная ткань, глиальная ткань, ткань головного мозга, ткань мочевого пузыря, колоректальная ткань, легочная ткань и синоназальная недифференцированная карцинома.

Термин «рак в виде солидной опухоли» означает, что рак возник в ткани, которая не является кровью, костным мозгом, лимфатическим узлом или лимфатической жидкостью.

Термин «гематологическое злокачественное заболевание» относится к раку, поражающему кровь, костный мозг, лимфатический узел или лимфатическую жидкость.

Термин «распространенное гематологическое злокачественное заболевание» относится к злокачественному новообразованию, которое распространилось на лимфатические узлы или другие ткани за пределами крови или костного мозга.

Термин «субъект с раком» означает субъекта, у которого был диагностирован рак.

Термин «рефрактерный рак» относится к раку, который подвергался лечению, но субъект-человек с раком не ответил на лечение.

Термин «рецидив рака» означает, что субъект-человек с раком отвечал на лечение в течение некоторого периода времени, но рак возник повторно.

Термин «распространенный рак» относится к раку, который распространился на лимфатические узлы или другие ткани за пределами места возникновения рака. Например, распространенный острый миелоидный лейкоз – это острый миелоидный лейкоз, который распространился на ткань за пределами крови или костного мозга.

Термин «субъект с солидной опухолью» означает субъекта, у которого был диагностирован рак в виде солидной опухоли. В одном варианте осуществления рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному.

Термин «субъект с гематологическим злокачественным новообразованием» означает субъекта, у которого было диагностировано гематологическое злокачественное заболевание. В одном варианте осуществления субъект с гематологическим

злокачественным новообразованием, представляет собой субъекта с ОМЛ. Термин «субъект с ОМЛ» означает субъекта, у которого был диагностирован ОМЛ. Способы диагностики ОМЛ известны специалистам в данной области техники, например, из Dohner H, *et al.*, *Blood 2017*; 129: 424-447.

Термины «острый миелоидный лейкоз», «острый миелогенный лейкоз» и «острый нелимфоцитарный лейкоз» являются синонимами.

«Ответ на лечение гематологического злокачественного новообразования (например, ОМЛ)» включает улучшение общей выживаемости, частичный ответ, длительное стабильное заболевание или улучшение долгосрочной выживаемости, характеризуемое как полная ремиссия (определяемая по менее чем 5% миелобластов в костном мозге, отсутствию циркулирующих бластов, гематологическому восстановлению (о чем свидетельствует абсолютное количество нейтрофилов в периферической крови более 1000 клеток/мкл и количество тромбоцитов более 100000/мкл, без необходимости переливания эритроцитов, и отсутствие экстрамедуллярного заболевания) (Bloomfield CD, *et al.*, *Blood Revs. 2018*; 32: 416-425).

Термин «мутация R132 в IDH1» относится к мутации IDH1 по аминокислотному остатку 132 в гене IDH1 субъекта, определенной, например, в нуклеиновой кислоте указанного субъекта (например, ДНК). В контексте настоящего документа «мутация R132 в IDH1» не является «вторичной мутацией IDH1».

Термин «вторичная мутация IDH1» относится к мутации IDH1, которая возникает в ферменте IDH1 у субъекта-человека после лечения ингибитором мутантного IDH1, отличным от соединения формулы I в настоящем документе. В одном варианте осуществления способа согласно изобретению одна или более вторичных мутаций IDH1 представляют собой одну или более из R119P, G131A, D279N, S280F, G289D или H315D в IDH1. Однако в будущем могут быть описаны и другие вторичные мутации IDH1. В контексте настоящего документа «вторичная мутация IDH1» не является «мутацией R132 в IDH1».

Термин «ингибитор мутантного IDH1» относится к соединению, которое ингибирует ферментативную активность и/или продукцию 2-HG мутантным ферментом IDH1. Способы анализа активности мутантного фермента IDH1 известны специалистам в данной области техники, например, из публикации WO 2018/111707 A1. В термине «ингибитор мутантного IDH1» слово «мутантный» относится к гену IDH1, а не к ингибитору.

Термин «идентифицированный как имеющий мутацию R132 в IDH1» означает, что нуклеиновая кислота (например, ДНК) из ткани или клеток субъекта-человека была

проанализирована для определения присутствия у указанного субъекта-человека мутации R132 в IDH1. В одном варианте осуществления одно или более из клеток крови, клеток костного мозга, лимфатического узла, клеток лимфатического узла, лимфатической жидкости или клеток лимфатической жидкости субъекта-человека были проанализированы на предмет присутствия мутации R132 в IDH1. В другом варианте осуществления солидная ткань субъекта-человека была проанализирована на предмет присутствия мутации R132 в IDH1.

В способе согласно настоящему изобретению лицо, которое идентифицирует субъекта-человека как имеющего мутацию R132 в IDH1, может отличаться от лица, которое вводит соединение. В одном варианте осуществления лицо, которое идентифицирует субъекта-человека как имеющего мутацию R132 в IDH1, отличается от лица, которое вводит соединение.

Термин «идентифицированный как имеющий одну или более вторичных мутаций IDH1» означает, что нуклеиновая кислота (например, ДНК) из одного или более из клеток крови, клеток костного мозга, лимфатического узла, клеток лимфатического узла, лимфатической жидкости или клеток лимфатической жидкости субъекта-человека была проанализирована для определения присутствия у субъекта-человека одной или более вторичных мутаций IDH1.

Аналитические методы идентификации генетических мутаций известны специалистам в данной области техники (Clark, O., *et al.*, *Clin. Cancer. Res. 2016*; 22: 1837-42), включая, не ограничиваясь перечисленным, кариотипирование (Guller JL, *et al.*, *J. Mol. Diagn. 2010*; 12: 3-16), флуоресцентную гибридизацию *in situ* (Yeung DT, *et al.*, *Pathology 2011*; 43: 566-579), секвенирование по Сэнгеру (Lutha, R *et al.*, *Haematologica 2014*; 99: 465-473), метаболические профилирование (Miyata S, et al., *Scientific Reports 2019*; 9: 9787), полимеразную цепную реакцию (Ziai, JM and AJ Siddon, *Am. J. Clin. Pathol 2015*; 144: 539-554) и секвенирование нового поколения (например, полнотранскриптомное секвенирование) (Lutha, R *et al.*, *Haematologica 2014*; 99: 465-473; Wang H-Y, *et al.*, *J. Exp. Clin. Cancer Res. 2016*; 35: 86).

Подразумевается, что термины «лечение», «лечить», «лечащий» и т. п. включают замедление, остановку или реверсию прогрессирования рака. Указанные термины включают также частичное снятие, уменьшение интенсивности, ослабление, устранение или снижение одного или более симптомов расстройства или патологического состояния, даже если рак фактически не устраняется, и даже если прогрессирование рака само по себе не замедлено, не остановлено или не реверсировано.

«Терапевтически эффективное количество» означает такое количество соединения или его фармацевтически приемлемой соли, вводимое субъекту, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ субъекта или оказывать желаемый терапевтический эффект на субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть без труда установлено лечащим врачом как специалистом в данной области техники с использованием известных методик и посредством наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для субъекта лечащий врач учитывает множество факторов, включая, не ограничиваясь перечисленным: размер тела, возраст и общее состояние здоровья субъекта; конкретное затрагиваемое заболевание или расстройство; выраженность, или вовлечение в патологический процесс, или степень тяжести заболевания или расстройства; ответ конкретного субъекта; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему дозирования; применение сопутствующих лекарственных средств; и другие значимые обстоятельства.

Соединение формулы I в настоящем документе необязательно может быть представлено в виде фармацевтической композиции, которую вводят любым способом, обеспечивающим биодоступность соединения, включая пероральный, внутривенный и трансдермальный способы. Предпочтительно, чтобы такие композиции были разработаны для перорального введения. Такие фармацевтические композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. (См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

«Фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество» представляет собой среду, общепринятую в данной области техники для доставки биологически активных агентов млекопитающим, например, людям.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что соединения, вводимые в способе согласно изобретению, способны образовывать соли. Соединения вступают в реакцию с любой из ряда неорганических и органических кислот с образованием фармацевтически приемлемых кислотно-аддитивных солей. Такие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли и общие методики их получения хорошо известны в данной области техники. См., например, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2008).

«Фармацевтически приемлемые соли» или «фармацевтически приемлемая соль» относится к относительно нетоксичной неорганической и органической соли или солям соединений согласно настоящему изобретению (S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 66, No. 1, January 1977).

Материалы, методы и результаты

Соединения и препарат. Ивосидениб и Соединение А готовили в виде исходного раствора концентрацией 20 мМ в 100% ДМСО (диметилсульфоксид) (Sigma, D2438) и последовательно разводили в 100% ДМСО для достижения желаемых концентраций. Заготовки в ДМСО дополнительно разводили средой для культивирования клеток перед добавлением в анализ.

Клеточные линии. Клетки U-87 MG (ATCC, HTB-14) культивировали и анализировали в MEM (Gibco, 11095) с 2 мМ GlutaMAX (Gibco, 35050), 1 мМ пирувата (Gibco, 11360), 0,1 мМ NEAA ((заменимая аминокислота) Gibco, 11140) и 10% диализированной FBS (фетальная бычья сыворотка) (Gibco, 26400). Клетки Ba/F3 (DSMZ, ACC 300) культивировали и анализировали в RPMI 1640 (Gibco, 22400) с 10% инактивированной нагреванием FBS (Gibco, 10082-147) и 10 нг/мл мышиного IL3 (R&D systems, 403-ML-025).

Клеточные анализы ингибирования. Клеточные анализы проводили путем измерения 2-HG либо в клетках U-87 MG, либо в клетках Ba/F3, в которых экспрессируются мутации IDH.

ДНК-конструкции, кодирующие мутации IDH1, вводили в клетки U-87 MG с помощью трансфекции (Promega FuGENE HD, E2311) или лентивирусной трансдукции и отбирали клеточные линии, экспрессирующие мутантный IDH, с помощью бластицидина (5 мкг/мл) или пуромицина (1 мкг/мл). Для обработки соединением клеток U-87 MG 20000-50000 клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток (Falcon, 353377) за 2 часа до обработки. Клетки обрабатывали последовательными разведениями соединения А в стандартной питательной среде. Планшеты инкубировали в инкубаторе для культур клеток млекопитающих (увлажненная атмосфера, 37 °C, 5% CO_2) в течение 16-72 часов. После периода инкубации среду аспирировали и готовили клеточные лизаты либо путем добавления 30 мкл/лунку лизирующего буфера (25 мМ трис-HCl, pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1% Triton-X 100, 2X коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt (Pierce, 78441) (для метода ЖХ-МС с дериватизацией), либо путем добавления 100 мкл смеси 80% метанола/20% воды, содержащей внутренние стандарты для ЖХ-МС (1 мкМ $^{13}C_4$ α-KG/$^{13}C_5$ 2-HG) на лунку

(для метода ион-парной ЖХ-МС). Затем 96-луночные планшеты с образцами запечатывали, встряхивали при 450 об/мин в течение 10 мин, а затем помещали при -20 °С и хранили до анализа методом ЖХ-МС.

Клетки Ba/F3 трансфицировали ДНК-конструкциями, кодирующими конструкции IDH1R132H-myc, IDH1R132H_S280F-myc или IDH1R132C_S280F-myc, с помощью системы трансфекции NEON (Life Technologies, MPK10025) и выделяли с помощью пуромицина (2 мкг/мл) или бластицидина (10 мкг/мл). Стабильно трансфицированные линии использовали для анализа ингибиторов. 15000 клеток Ba/F3 на лунку высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток (Falcon, 353377) за 2 часа до обработки. Клетки обрабатывали последовательными разведениями желаемых соединений в стандартной питательной среде. Планшеты инкубировали в инкубаторе для культур клеток млекопитающих (увлажненная атмосфера, 37 °С, 5% CO_2) в течение желаемого времени (72 или 96 часов). После периода инкубации кондиционированные среды из каждой лунки собирали для анализа на 2-HG методом ЖХ-МС.

Анализ метаболитов в кондиционированных средах и клеточных лизатах методом ЖХ-МС. Влияние ингибиторов на концентрации 2-HG определяли с помощью анализа методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС) клеточных лизатов или кондиционированных сред с использованием либо метода с дериватизацией, либо ион-парного метода, как описано ниже.

Для метода ЖХ-МС с дериватизацией калибровочные кривые получали путем добавления стандартных добавок 2-HG и α-KG в среду для культивирования клеток и буфер для лизиса клеток соответственно. В этом методе применяли дериватизацию О-бензилгидроксиламином перед проведением анализа методом ЖХ-МС. 10 мкл каждого стандарта или образца (среды или клеточного экстракта) помещали в 96-луночный планшет с глубокими лунками и объединяли со 100 мкл раствора внутреннего стандарта, содержащего 10 мкМ d5-3-гидроксиглутарата и 10 мкМ d6-α-KG. В каждый образец добавляли 50 мкл 1 М О-бензилгидроксиламина в пиридиновом буфере (8,6% пиридина, pH 5) и 50 мкл 1 М гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида (EDC) в пиридиновом буфере. Реакцию дериватизации проводили при комнатной температуре в течение одного часа. В каждый образец при помощи жидкостного манипулятора Beckman Biomek FX добавляли 300 мкл этилацетата. Запечатывали планшеты и перемешивали на вортексе в течение 5 минут, после чего центрифугировали в течение 5 минут при 4000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R. 220 мкл верхнего слоя переносили в новый 96-луночный планшет. Образцы сушили в горячем азоте при 50 °С и повторно разводили 100 мкл смеси метанол/вода (1:1). 1 мкл дериватизированного образца вводили в систему ЖХ-

МС, состоящую из системы ВЭЖХ Shimadzu Prominence 20A и масс-спектрометра с тройным квадруполем Thermo Quantum Ultra™. Аналиты разделяли на колонке Water XBridge™ C18 (2,1 x 50 мм, 3,5 мкм) при скорости потока 0,6 мл/минута. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% муравьиную кислоту в воде, а подвижная фаза В представляла собой метанол. Профиль градиента представлял собой: 0 минут, 5% В; 2 минуты, 100% В; 4,00 минуты, 100% В; 4,1 минуты, 5% В; 5,50 минут, завершение. В масс-спектрометре использовали зонд HESI-II, работающий в режиме положительной ионизации путем мониторинга выбранной реакции. Калибровочные кривые строили путем построения графиков зависимости концентрации аналита от отношения площадей пиков аналита/внутреннего стандарта и проводили квадратичную аппроксимацию данных с использованием параметра взвешивания 1/концентрация при помощи программного обеспечения Xcalibur™. Неизвестные концентрации аналита получали путем обратных вычислений из калибровочных кривых.

Для метода ион-парной ЖХ-МС калибровочные кривые получали путем добавления стандартных добавок 2-HG и α-KG в смесь 80% метанола/20% воды, содержащую внутренние стандарты для ЖХ-МС (1 мкМ $^{13}C_4$ α-KG/$^{13}C_5$ 2-HG). Количественное определение 2-HG и α-KG выполняли с использованием масс-спектрометра AB Sciex 6500 с зондом ESI и интерфейсом с системой СВЭЖХ (сверхвысокоэффективная ВЭЖХ) в режиме отрицательной ионизации посредством мониторинга множественных реакций (MRM). Система СВЭЖХ состояла из насоса для двухкомпонентных смесей Agilent 1290, термостатируемого колоночного отделения (TCC) и пробоотборника. Объем введения составлял 1 мкл для экстрактов клеточных культур. Экстракты хроматографически разделяли с использованием колонки Hypercarb, 2,1×20 мм, 5,0 мм Javelin HTS (Thermo Scientific, PN: 35005-022135). Подвижная фаза А представляла собой воду/10 мМ трибутиламина/15 мМ уксусной кислоты. Подвижная фаза В представляла собой ацетонитрил/20 мМ трибутиламина/30 мМ уксусной кислоты. Скорость потока растворителя составляла 1,0 мл/мин. Изократический режим поддерживали при 26% подвижной фазы В. Клапан, пробоотборную петлю и иглу промывали смесью 50% ацетонитрила: 50% метанола в течение 20 секунд. Температуру колонки поддерживали на уровне 55 °C. Калибровочные кривые рассчитывали линейной регрессией методом наименьших квадратов с взвешиванием 1/x. 2-HG и α-KG количественно определяли с помощью калибровочной кривой и отношения площадей пиков аналитов к внутреннему стандарту. Анализ данных проводили с помощью MultiQuant 3.0 (AB Sciex). Необработанные данные экспортировали в электронные таблицы Excel.

Определение кривых IC_{50}. Кривые IC_{50} для каждого соединения получали с использованием анализа четырехпараметрической аппроксимации данных в программном обеспечении GraphPad/Prism.

В экспериментах, проведенных по существу так, как описано выше, были получены результаты по IC_{50}, представленные в таблице 1.

Таблица 1. Результаты по IC_{50}

Конструкция клеточной линии	**IC_{50} ивосидениба (нМ)**	**IC_{50} Соединения А (нМ)**
U87MG R132H	27	0,32
U87MG R132H_S280F	>1000	2,58
U87MG R132C_S280F	>1000	12,48
Ba/F3 R132H	15,92	0,11
Ba/F3 R132H_S280F	>1000	1,13
Ba/F3 R132C_S280F	>1000	1,53

Результаты в таблице 1 свидетельствуют о том, что ивосидениб и Соединение А эффективно ингибируют R132H-мутантный IDH1 в каждой конструкции клеточной линии с R132H. Однако, в то время как Соединение А эффективно ингибирует R132H_S280F-мутантный и R132C_S280F-мутантный IDH1 в каждой конструкции клеточной линии, ивосидениб неэффективен в ингибировании R132H_S280F-мутантного IDH1 ни в одной из конструкций клеточных линий, и ивосидениб неэффективен в ингибировании R132C_S280F-мутантного IDH1 ни в одной из конструкций клеточных линий.

В экспериментах, проведенных по существу так, как описано выше, были получены результаты по значениям IC_{50}, представленные в таблице 2.

Таблица 2. Результаты по IC50

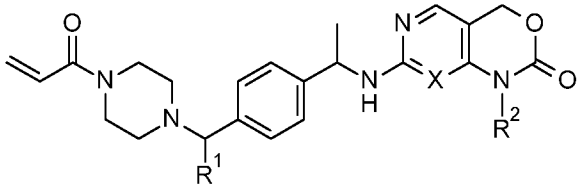
Конструкция клеточной линии	IC_{50} Соединения А (нМ)	СКО
U87MG IDH1R132H_H315D cis	1,49	0,2
U87MG IDH1R132H_R119P cis	2,52	0,46
U87MG IDH1R132H_G131A cis	5,89	0,88
U87MG IDH1R132H_D279N cis	13,8	2,5
U87MG IDH1R132C_H315D cis	1,33	0,42
U87MG IDH1R132C_R119P cis	10,5	3,8
U87MG IDH1R132C_G289D cis	23,5	1,6
U87MG IDH1R132C_G131A cis	25,6	6,5

U87MG IDH1R132C_D279N cis	101,7	13,9
U87MG IDH1R132L_H315D cis	5,07	0,5
U87MG IDH1R132L_R119P cis	89,7	31,3
U87MG IDH1R132L_G289D cis	29,4	4,1
U87MG IDH1R132L_G131A cis	64,5	65,2
U87MG IDH1R132L_S280F cis	179	62
U87MG IDH1R132L_D279N cis	645	142

Результаты в таблице 2 свидетельствуют о том, что Соединение А эффективно ингибирует резистентные мутанты IDH1 с мутацией по второму сайту в контексте драйверных мутаций R132 в IDH1H, R132C или R132L.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий введение субъекту-человеку с раком, имеющему мутацию R132 в IDH1 и одну или более вторичных мутаций IDH1, терапевтически эффективного количества соединения формулы I:



,

где:

R^1 представляет собой $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2OCH_3$ или $-CH_2$-циклопропил;

R^2 представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$; и

X представляет собой N или CH,

или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п. 1, где X представляет собой N, или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Способ по п. 1, где X представляет собой N, R^1 представляет собой $-CH_2$-циклопропил и R^2 представляет собой $-CH_2CH_3$, или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Способ по п. 1, где соединение представляет собой:

7-[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

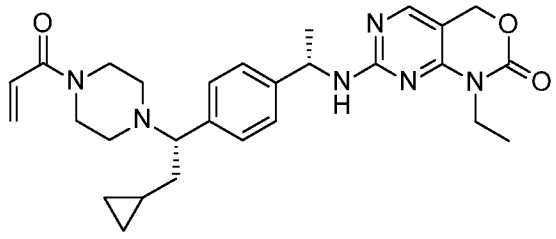
7-[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

или

1-этил-7-[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

или его фармацевтически приемлемую соль.

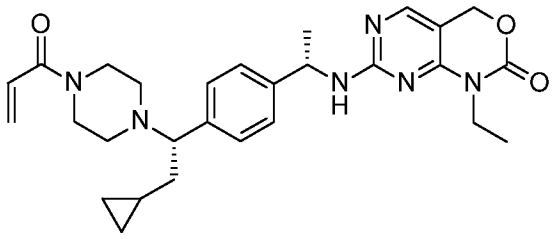
5. Способ по п. 1, где соединение представляет собой:



,

или его фармацевтически приемлемую соль.

6. Способ по п. 5, где соединение представляет собой:



.

7. Способ по п. 1, где рак представляет собой рак в виде солидной опухоли.

8. Способ по п. 7, где рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному, рак головы и шеи, хондросаркому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рак поджелудочной железы, астроцитому, олигодендроглиому, глиому, глиобластому, карциному мочевого пузыря, колоректальный рак, рак легкого или синоназальную недифференцированную карциному.

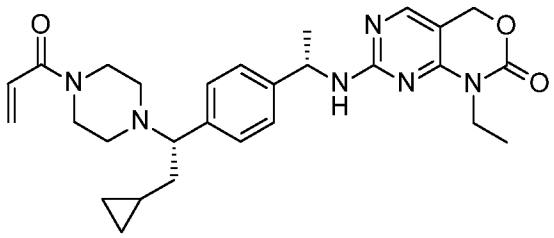
9. Способ по п. 8, где рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному.

10. Способ по п. 1, где рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание.

11. Способ по п. 10, где гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром/миелопролиферативное новообразование, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, истинную полицитемию, эссенциальную тромбоцитемию, первичный миелофиброз или хронический миелогенный лейкоз.

12. Способ по п. 11, где гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз.

13. Способ по п. 1, где соединение представляет собой



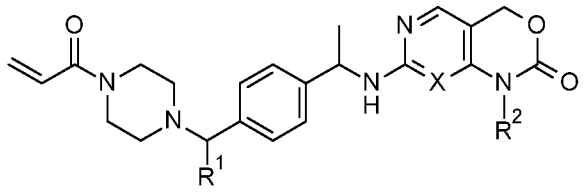
,

и рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

14. Способ по п. 1, где одна или более вторичных мутаций IDH1 представляют собой одну или более из R119P, G131A, D279N, S280F, G289D или H315D.

15. Способ по п. 13, где одна или более вторичных мутаций IDH1 представляют собой одну или более из R119P, G131A, D279N, S280F, G289D или H315D.

16. Способ по п. 1, где субъект-человек получал лечение ингибитором IDH1, отличным от соединения формулы:



,

где:

R^1 представляет собой $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2OCH_3$ или $-CH_2$-циклопропил;

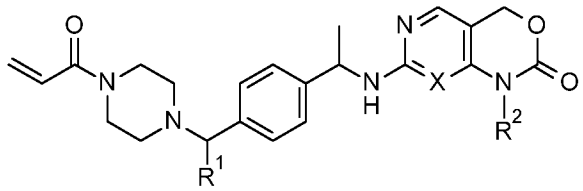
R^2 представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$; и

X представляет собой N или CH,

или его фармацевтически приемлемой соли.

17. Способ по п. 16, где субъект-человек получал лечение ивосиденибом.

18. Соединение формулы:



,

где:

R^1 представляет собой $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2OCH_3$ или $-CH_2$-циклопропил;

R^2 представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$; и

X представляет собой N или CH,

или его фармацевтически приемлемая соль;

для применения для лечения рака у субъекта-человека, имеющего мутацию R132 в IDH1 и одну или более вторичных мутаций IDH1.

19. Соединение для применения по п. 18, где X представляет собой N, или его фармацевтически приемлемая соль.

20. Соединение для применения по п. 18 или п. 19, где R^1 представляет собой $-CH_2$-циклопропил, или его фармацевтически приемлемая соль.

21. Соединение для применения по любому из пп. 18-20, где R^2 представляет собой $-CH_2CH_3$, или его фармацевтически приемлемая соль.

22. Соединение для применения по п. 18, где соединение представляет собой:

7-[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

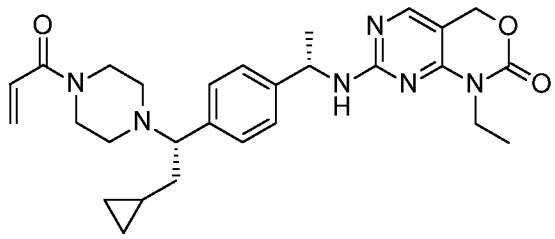
7-[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

или

1-этил-7-[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

или его фармацевтически приемлемую соль.

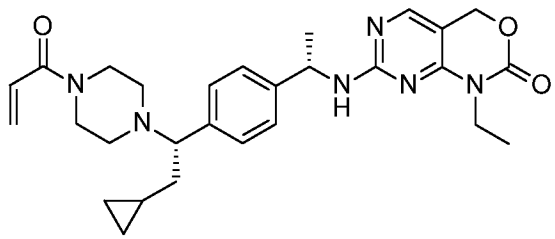
23. Соединение для применения по п. 18, где соединение представляет собой:



,

или его фармацевтически приемлемую соль.

24. Соединение для применения по п. 23, где соединение представляет собой:



.

25. Соединение для применения по любому из пп. 18-24, где одна или более вторичных мутаций IDH1 представляют собой одну или более из R119P, G131A, D279N, S280F, G289D и H315D.

26. Соединение для применения по любому из пп. 18-25, где рак представляет собой рак в виде солидной опухоли.

27. Соединение для применения по п. 26, где рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному, рак головы и шеи, хондросаркому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рак поджелудочной железы, астроцитому, олигодендроглиому, глиому, глиобластому, карциному мочевого пузыря, колоректальный рак, рак легкого или синоназальную недифференцированную карциному.

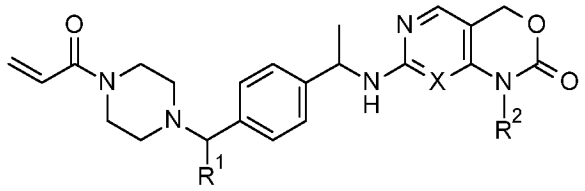
28. Соединение для применения по п. 27, где рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному.

29. Соединение для применения по любому из пп. 18-25, где рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание.

30. Соединение для применения по п. 29, где гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром/миелопролиферативное новообразование, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, истинную полицитемию, эссенциальную тромбоцитемию, первичный миелофиброз или хронический миелогенный лейкоз.

31. Соединение для применения по п. 30, где гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз.

32. Соединение для применения по любому из пп. 18-31, где субъект получал лечение ингибитором мутантного IDH1, отличным от соединения формулы:



,

где:

R^1 представляет собой $-CH_2CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH_3$, $-CH_2CH_2OCH_3$ или $-CH_2$-циклопропил;

R^2 представляет собой $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$; и

X представляет собой N или CH, или его фармацевтически приемлемой соли.

33. Соединение для применения по п. 32, где субъект получал лечение ивосиденибом.