(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292915 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.13

(22) Дата подачи заявки
2021.04.13

(51) Int. Cl. *C12Q 1/6886* (2018.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ KIF18A ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕОПЛАСТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

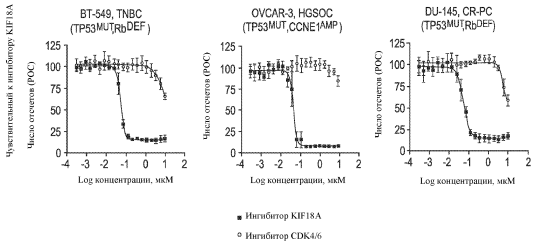
(31) **63/009,637; 63/055,111; 63/085,607**
(32) **2020.04.14; 2020.07.22; 2020.09.30**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/027042**
(87) **WO 2021/211549 2021.10.21**

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Пэйтон Марк Ноэль (US)

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

(57) В изобретении предусмотрены способы лечения субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, включающие введение субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для лечения неопластического заболевания, неопластического заболевания у субъекта. Также предусмотрены способы стимулирования или усиления регресса опухоли у субъекта с опухолью и способы уменьшения опухоли или скорости роста рака у субъекта. В иллюстративных аспектах способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A. Способы стимулирования или усиления гибели опухолевых или раковых клеток у субъекта, включающие введение субъекту ингибитора KIF18A, также предусмотрены в данном документе. Преимущественно ингибиторы KIF18A обеспечивают селективное лечение неопластического заболевания, стимулируют или усиливают регресс опухоли и/или стимулируют или усиливают гибель опухолевых или раковых клеток без выраженной токсичности для нормальных соматических клеток.



202292915 A1

202292915 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576084EA/061

ИНГИБИТОРЫ KIF18A ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕОПЛАСТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет в соответствии с §119(e) статьи 35 свода законов США по предварительной заявке на патент США № 63/009637, поданной 14 апреля 2020 года, предварительной заявке на патент США № 63/055111, поданной 22 июля 2020 года, и предварительной заявке на патент США № 63/085607, поданной 30 сентября 2020 года. Полное содержание каждой заявки включено в данный документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки во всей своей полноте, подается одновременно с данной заявкой и обозначен следующим образом: файл в формате ASCII (текстовый) размером 227 954 байт под названием "A-2607-WO-PCT_Seqlisting.txt", созданный 22 марта 2021 года.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Рак представляет собой одно из наиболее распространенных заболеваний, поражающих человечество, и лидирующую причину смертей по всему миру. Только в США рак является второй наиболее распространенной причиной смерти, которую превосходят только сердечные заболевания. В попытке найти эффективные средство лечения или излечения для одного или нескольких из многих различных видов рака, в течение последней пары десятилетий, многочисленные группы вложили огромное количество времени, усилий и финансовых ресурсов. Однако, на сегодняшний день, что касается доступных средств лечения и видов терапии рака, лишь немногие предлагают сколько-нибудь значительную степень успеха.

[0004] Рак часто характеризуется нарушением регуляции нормальных клеточных процессов или нерегулируемой пролиферацией клеток. Клетки, которые превратились в раковые клетки пролиферируют неконтролируемым и нерегулируемым образом, что приводит, в некоторых случаях, к метастазированию или распространению рака. Повреждение одного или нескольких генов, ответственных за клеточные пути, которые контролируют ход пролиферации на протяжении клеточного цикла и цикла центросомы, может обуславливать утрату нормальной регуляции клеточной пролиферации. Такие разрегулированные гены могут кодировать многие супрессоры опухоли или онкогенные белки, которые участвуют в каскаде событий, приводящих к беспрепятственному ходу клеточного цикла и клеточной пролиферации. Идентифицировали многие киназные и кинезиновые белки, которые играют ключевые роли в клеточном цикле, и митотической регуляции, и течении нормальных делящихся клеток и раковых клеток.

[0005] Раковые пути, фенотипы, состояние дифференцировки, ассоциированные с

митотическим и репликативным стрессом, могут приводить к появлению конкретных уязвимостей, ассоциированных с вхождением в митотический цикл, образованием митотического веретена, целостностью и размещением центросом, прикреплению кинетохора к МТ, сцеплением сестринских хроматид и контролем SAC. Таким образом, стратегия для улучшения клинического потенциала новых подавляющих митоз видов терапии должна пользоваться опухоль-специфическими уязвимостями, при этом избавляясь или уменьшая сопутствующий ущерб нормальным тканям. KIF18A представляет собой перспективную и многообещающую противораковою мишень, поскольку ингибирование KIF18A приводит к активации SAC при митозе, индукции мультиполярности и апоптозу, и подавляет рост ряда линий раковых клеток человека, при этом будучи щадящим в отношении нормальных делящихся соматических клеток.

[0006] Митоз представляет собой процесс, с помощью которого в эукариотической клетке происходит сегрегация удвоенных хромосом в два идентичных дочерних ядра. В общем затем непосредственно следует цитокинез, с помощью которого разделяются ядра, цитоплазма, органеллы и клеточные мембраны на две дочерние клетки, содержащие условно равные части таких клеточных компонентов. Митоз и цитокинез вместе определяют митотическую (М) фазу клеточного цикла - деление материнской клетки на две дочерние клетки, генетически идентичные друг с другом и их родительской клеткой. Процесс митоза является сложным и четко регулируемым. Последовательность событий подразделяется на различные фазы, соответствующие завершению одного набора действий и началу следующего. Эти стадии называются профаза, прометафаза, метафаза, анафаза и телофаза. Во время процесса митоза удвоенные хромосомы конденсируются и прикрепляются к волокнам микротрубочек (МТ) веретена деления, которые оттягивают сестринские хроматиды к противоположным сторонам клетки. Контрольная точка сборки веретена деления (SAC) является активной до тех пор, пока все сестринские хроматиды должным образом не присоединятся к волокнам кинетохора веретена деления, и натяжение веретена деления достигается во время метафазы, если не выявлено ошибок, клетки переходят в анафазу. Затем клетки делятся при цитокинезе с обеспечением двух идентичных дочерних клеток.

[0007] Обычно контрольные точки клеточного цикла активируются, если выявлены ошибки (например, повреждение ДНК, торможение/разрушение репликационной вилки ДНК, аберрации центросом, ошибочная сегрегация хромосом, образование микроядер). Если такие ошибки в отношении генома не могут быть исправлены, обычно клетка подвергается остановке клеточного цикла и апоптозу. Однако, если клетке было обеспечено продвижение далее по ее клеточному циклу и прогресс не был проверен, то мутации, ошибочная сегрегация хромосом, аберрации центросом со временем могут накапливаться. Количество таких изменений гена/кариотипа/центросом может нарастать и в конечном итоге приводить к получению клеточного потомства с презлокачественными или злокачественными неопластическими характеристиками (например, неконтролированной пролиферацией) посредством адаптации.

[0008] Виды рака с высокой внутриопухолевой гетерогенностью и хромосомной нестабильностью (CIN) характеризуются сложными кариотипами из-за непрерывных хромосомных изменений, появляющихся в результате количественных (увеличения или потери) и структурных изменений. Механизмы, которые, как считается, вносят вклад в CIN, включают дефекты в динамике присоединения кинетохора к МТ, числе копий центросомы, функционировании митотической контрольной точки, сцеплении хромосом и регуляции клеточного цикла. Хромосомная нестабильность (CIN) ассоциирована с повышенным уровнем репликативного и митотического стресса, потенциированного генетическими повреждениями в ряду антионкогенов и онкогенов (примеры включают без ограничения TP53, RB1, BRCA1, BRCA2, гены недостаточности по гомологичной рекомбинации (HRD), FBXW7, CCNE1, MYC), которые обеспечивают регуляцию прогрессирования/контрольных точек клеточного цикла, центросомный цикл и репарацию ДНК (SL Thompson et al Current Biology. 2010;20:285-95 and R Nagel et al EMBO Reports 2016;17:1516-1531).

[0009] Митоз, или клеточное деление, является валидированной точкой вмешательства в лечении рака. Одобренные подавляющие митоз лекарственные средства представляют собой противораковые средства, которые подавляют функцию микротрубочек. Микротрубочки представляют собой белковые полимеры, образованные α-тубулиновыми и β-тубулиновыми гетеродимерами, которые выполняют важную роль в образовании митотического веретена деления и цитокинезе в конце митоза. Противораковые средства, которые нацеливаются на микротрубочки, представляют собой хорошо зарекомендовавший себя подход для вмешательства в пролиферацию раковых клеток. Таксаны являются наиболее известным классом подавляющих митоз средств, который включает паклитаксел (taxol) и доцетаксел (taxotere). Алкалоиды барвинка представляют собой класс дестабилизаторов микротрубочек, который включает винкристин, винбластин и винорелбин. Другие новые тубулин-связывающие противораковые лекарственные средства включают иксабепилон и эрибулин. Такие подавляющие митоз средства действуют с предотвращением пролиферации раковых клеток путем либо стабилизирования, либо дестабилизирования микротрубочек. Данное прямое ингибирование микротрубочек приводит к остановке клеточного цикла и гибели посредством апоптоза, митотической катастрофе и летальному многополюсному делению. Паклитаксел был первым открытым соединением из ряда таксанов. Доцетаксел, структурный аналог паклитаксела, был открыт позже. Паклитаксел и доцетаксел обычно применяются для лечения разнообразия злокачественных опухолей человека, включая рак яичника, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак легкого, рак желудка, рак пищевода, рак предстательной железы и ассоциированная со СПИДом саркома Капоши. Первичный побочный эффект таксанов представляет собой миелосупрессию, в основном нейтропению, в то же время другие побочные эффекты включают периферическую отечность и нейротоксичность (периферическую невропатию).

[0010] Устойчивость к подавляющим митоз средствам, таким как таксаны, является

усложняющим фактором для успешного лечения рака и часто ассоциирована с повышенной экспрессией гена MDR-1 и его продукта, P-гликопротеина (P-gp). Другие задокументированные механизмы приобретенной устойчивости к таксанам включают мутации, сверхэкспрессию, амплификацию и переключение изотипов тубулинов. Мутации в α- или β-тубулине подавляют связывание таксанов с правильным участком на микротрубочках; это делает лекарственное средство неэффективным. Устойчивость к другим классам противораковых лекарственных средств, включающим без ограничения химиотерапевтические средства (например, средства на основе платины, антрациклины) и виды целенаправленно воздействующей терапии (например, ингибиторы TKI, PARP), стала большим недостатком для эффективного лечения рака и неминуемо приводит к смерти пациента. Следовательно, развитие устойчивости к лекарственным средствам остается проблемой для всех видов противораковой терапии.

[0011] Точная медицина направлена на улучшение степеней ответа пациента с раком путем уменьшения токсичности для нормальных тканей и использования маркеров для разделения на группы для повышения количества пациентов, которые наиболее вероятно получат пользу от терапевтического лечения, или, что важно, для исключения пациентов, которые, вероятно, не получат пользы. Направляемый биомаркерами подход имеет потенциал для подстройки лечения пациента с раком с достижением более высоких степеней ответа и приведением к улучшению исходов и качества жизни пациентов. Существует недостаток признанных маркеров (биомаркеров) для разделения на группы, доступных для отбора пациентов, которые наиболее вероятно получат пользу от используемых в настоящее время подавляющих митоз видов терапии.

[0012] Таким образом, существует необходимость в биомаркерах для идентификации пациентов, которые получат пользу от лечения ингибитором KIF18A.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0013] В данном документе впервые представлены данные, свидетельствующие о биомаркерах чувствительности к лечению ингибитором KIF18A. Раковые клетки, у которых проявляется инактивированный ген TP53 и/или по меньшей мере одно из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, демонстрировали чувствительность к лечению ингибитором KIF18A. Также в данном документе предоставлены данные, демонстрирующие, что у чувствительных к ингибитору KIF18A раковых клеток проявляется уменьшенная или утраченная чувствительность или устойчивость к ингибиторам CDK4/6. Данные дополнительно обосновывают, что у чувствительных к ингибитору CDK4/6 раковых клеток проявляется уменьшенная или утраченная чувствительность или устойчивость к ингибиторам KIF18A.

[0014] В настоящем изобретении предусмотрены способы определения лечения для субъекта с неопластическим заболеванием (например, раком). В иллюстративных вариантах осуществления способ включает анализирование образца, полученного от

субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. В разных аспектах лечение, определенное для субъекта, включает ингибитор KIF18A, если образец является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором CDK4/6. В разных аспектах лечение для субъекта определяется как лечение, включающее ингибитор KIF18A, если неопластическое заболевание является нечувствительным или устойчивым к ингибитору CDK4/6. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIF18A. В разных аспектах лечение для субъекта определяется как лечение, включающее ингибитор CDK4/6, если неопластическое заболевание является нечувствительным или устойчивым к ингибитору KIF18A.

[0015] В данном документе предусмотрены способы идентификации субъекта с неопластическим заболеванием как чувствительного к лечению ингибитором KIF18A. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает анализирование образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. В разных случаях субъект идентифицируется как чувствительный к лечению ингибитором KIF18A, если образец является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

[0016] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ идентификации субъекта с неопластическим заболеванием как восприимчивого к лечению ингибитором KIF18A. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIF18A. В разных аспектах субъект идентифицируется как восприимчивый к лечению ингибитором KIF18A, если раковые клетки из образца нечувствительные к ингибитору CDK4/6.

[0017] В данном документе предусмотрены способы поддержания чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором CDK4/6 у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение

субъекту ингибитора KIF18A.

[0018] В данном документе предусмотрены способы лечения субъекта с неопластическим заболеванием, например способы лечения неопластического заболевания у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение ингибитора KIF18A для лечения пациента. Необязательно неопластическое заболевание является устойчивым к лечению ингибитором CDK4/6. В разных случаях субъект подвергается или подвергался лечению ингибитором CDK4/6. В разных аспектах ингибитор KIF18A вводят совместно с ингибитором CDK4/6. В разных случаях способ включает введение фармацевтической комбинации, содержащей ингибитор CDK4/6 и ингибитор KIF18A. Соответственно, в данном документе предусмотрена фармацевтическая комбинация, содержащая ингибитор KIF18A и ингибитор CDK4/6.

[0019] Дополнительно в данном документе предусмотрены способы стимулирования или усиления регресса опухоли у субъекта с опухолью. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для стимулирования или усиления регресса опухоли. В настоящем изобретении также предусмотрены способы уменьшения скорости роста опухоли или скорости роста рака у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для уменьшения опухоли или скорости роста рака. В данном документе предусмотрены способы стимулирования или усиления гибели опухолевых клеток или раковых клеток у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для стимулирования или усиления гибели опухолевых клеток или раковых клеток. В разных аспектах неопластическое заболевание представляет собой рак, необязательно рак молочной железы, рак яичника или рак предстательной железы. В разных случаях неопластическое заболевание представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC), нелюминальный рак молочной железы или низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC). В иллюстративных аспектах неопластическое заболевание представляет собой рак эндометрия, необязательно серозный рак эндометрия. Необязательно рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительными в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессированного продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. В некоторых аспектах рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении мутантного гена TP53. В разных случаях рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении амплифицированного гена CCNE1, подвергшегося сайленсингу BRCA1, дефектного гена Rb1 или их комбинации. Необязательно ингибитор KIF18A вводят путем перорального введения, необязательно один раз в день. В иллюстративных аспектах количество ингибитора KIF18A является эффективным для стимулирования по меньшей мере 50% или по меньшей мере 75%

(например, по меньшей мере 80% или 85% или по меньшей мере 90% или 95%) регресса опухоли по сравнению с контролем. В разных случаях ингибитор KIF18A обеспечивает селективное лечение неопластического заболевания, селективно стимулирует или усиливает регресс опухоли, селективно обеспечивает уменьшение опухоли или скорости роста рака и/или селективно стимулирует или усиливает гибель опухолевых или раковых клеток, и ингибитор KIF18A не токсичный для нормальных соматических клеток. В разных аспектах ингибитор KIF18A обеспечивает лечение неопластического заболевания, стимулирует или усиливает регресс опухоли, обеспечивает уменьшение опухоли или скорости роста рака и/или стимулирует или усиливает гибель опухолевых или раковых клеток, и пролиферация нормальных соматических клеток у субъекта является по сути такой же, как пролиферация нормальных соматических клеток контрольного субъекта. В иллюстративных случаях ингибитор KIF18A обеспечивает лечение неопластического заболевания, стимулирует или усиливает регресс опухоли, обеспечивает уменьшение опухоли или скорости роста рака и/или стимулирует или усиливает гибель опухолевых или раковых клеток, и уровень апоптоза нормальных соматических клеток не повышается у субъекта относительно уровня апоптоза нормальных соматических клеток контрольного субъекта, при этом необязательно уровень апоптоза нормальных соматических клеток является по сути таким же, как уровень апоптоза нормальных соматических клеток контрольного субъекта.

[0020] В разных аспектах настоящего изобретения ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I). В иллюстративных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой соединение C1, соединение C2, соединение C3, соединение C4, соединение C5, соединение C6, соединение C7, соединение C8, соединение C9, соединение C10, соединение C11, соединение C12, соединение C13 или соединение C14 или любую их фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе.

[0021] В альтернативных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой высокомолекулярный ингибитор KIF18A, такой как некодирующая РНК, например siRNA.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0022] На фигурах 1A-1C представлены таблицы, на которые ссылаются в примере 1. На фигуре 1A представлена таблица 1A, в которой перечислены условия выращивания культур тканей для указанной клеточной линии, происходящей из указанной ткани. На фигуре 1B представлена таблица 1B, в которой перечислена плотность высевания для NCA для каждой испытуемой клеточной линии. На фигуре 1C представлена таблица 1C, в которой перечислены линии клеток рака и их чувствительность к первому ингибитору KIF18A.

[0023] Фигуры 2A - 2F представляют собой графики POC, построенные в виде функции концентрации ингибитора KIF18A (закрашенные квадраты) или ингибитора CDK4/6 (незакрашенные круги). На фигурах 2A - 2C продемонстрированы чувствительные к ингибитору KIF18A клетки, нечувствительные к ингибитору CDK4/6

клетки, а на фигурах 2D - 2F продемонстрированы нечувствительные к ингибитору KIF18A клетки, чувствительные к ингибитору CDK4/6 клетки.

[0024] Фигура 3A представляет собой график, на котором построено POC в виде функции концентрации ингибитора KIF18A для клеточной линии HGSOC OVCAR-8. Фигура 3B представляет собой график, на котором построено POC в виде функции концентрации ингибитора KIF18A для клеточной линии TNBC MX-1. Фигура 3C представляет собой график, на котором построено POC в виде функции концентрации ингибитора KIF18A для клеточной линии TNBC MAX401NL. Фигура 3D представляет собой график, на котором построено POC в виде функции концентрации ингибитора KIF18A для клеточной линии TNBC HCC-1937. Фигура 3E представляет собой график, на котором построено POC в виде функции концентрации соединения C14 на основе ингибитора KIF18A, олапариба, паклитаксела, доксорубицина или карбоплатина для линии клеток рака OVCAR-8.

[0025] На фигуре 4A представлена таблица 2, в которой перечислены линии клеток рака и их чувствительность к второму ингибитору KIF18A. На фигуре 4B представлена таблица 3, в которой перечислены линии клеток рака и их чувствительность ко второму ингибитору KIF18A. Фигура 4C представляет собой график, на котором построено POC в виде функции концентрации ингибитора KIF18A для клеточных линий рака молочной железы и яичника, которые продемонстрировали чувствительность к лечению ингибитором KIF18A. Фигура 4D представляет собой график, на котором построено POC в виде функции концентрации ингибитора KIF18A для клеточных линий рака молочной железы и яичника, которые были нечувствительными к лечению ингибитором KIF18A. Фигура 4E представляет собой график, на котором построено POC в виде функции концентрации ингибитора KIF18A для второй группы клеточных линий рака молочной железы и яичника, которые продемонстрировали чувствительность к лечению ингибитором KIF18A. Фигура 4F представляет собой график, на котором построено POC в виде функции концентрации ингибитора KIF18A для второй группы клеточных линий рака молочной железы и яичника, которые были нечувствительными к лечению ингибитором KIF18A.

[0026] Фигура 5A представляет собой график объема опухоли у обработанных ингибитором KIF18A или обработанных средой-носителем мышей, построенный в виде функции времени после имплантации клеток. Фигура 5B представляет собой график веса тела обработанных ингибитором KIF18A или обработанных средой-носителем мышей, построенный в виде функции времени после имплантации клеток.

[0027] Фигура 6A представляет собой график объема опухоли у обработанных ингибитором KIF18A или обработанных средой-носителем мышей, построенный в виде функции времени после имплантации клеток. Фигура 6B представляет собой график веса тела обработанных ингибитором KIF18A или обработанных средой-носителем мышей, построенный в виде функции времени после имплантации клеток.

[0028] Фигура 7A представляет собой изображение обработанных DMSO клеток

или обработанных ингибитором KIF18A клеток, как описано в данном документе. Фигура 7B представляет собой пару графиков, демонстрирующую % окрашенных по фосфо-гистону или перицентрину участков, построенных в виде функции концентрации ингибитора KIF18A. Фигура 7C представляет собой таблицу, в которой перечислены EC50 ингибитора KIF18A относительно окрашенных по фосфо-гистону или перицентрину участков, как описано в данном документе.

[0029] Фигура 8A представляет собой серию изображений двух типов раковых клеток, окрашенных по центрину-3, процентрину или маркерам центросом, при обработке ингибитором KIF18A или контролем DMSO. Фигура 8B представляет собой вестерн-блотт, показывающий уровни белка cI-PARP в клетках, обработанных контролем DMSO, ингибитором KIF18A или ингибитором Eg5. GADPH представляет собой контроль нагрузки.

[0030] Фигура 9 представляет собой серию вестерн-блоттов, показывающих уровни указанных белков (cI-PARP, циклин B1, Mcl-1 циклин E1, KIF18A, BubR1) в синхронизированных или асинхронизированных клетках, обработанных контролем DMSO или ингибитором KIF18A. B-актин представляет собой контроль нагрузки.

[0031] Фигура 10A представляет собой серию вестерн-блоттов, показывающую уровни указанных белков (фосфо-гистон H3, y-H2A.X, cI-PARP, BubR1, общий HEC1, p-Hec1) в клетках, обработанных контролем DMSO или ингибитором KIF18A. GADPH представляет собой контроль нагрузки. Фигура 10B представляет собой пару изображений, на которых показаны клетки, окрашенные по cGAS (зеленый цвет), yH2A.X (красный цвет) или с помощью DAPI (синий цвет). Клетки были обработаны контролем DMSO или ингибитором KIF18A.

[0032] Фигура 11 представляет собой пару изображений, на которых показаны клетки, окрашенные по центрину-3 (зеленый цвет), KIF18A (красный цвет) или ДНК (DAPI (синий цвет)). Клетки были обработаны контролем DMSO или ингибитором KIF18A.

[0033] Фигура 12 представляет собой график, показывающий фосфо-гистон H3 в клетках, обработанных указанным количеством ингибитора KIF18A или контролем со средой-носителем.

[0034] Фигура 13A представляет собой график POC, построенный в виде функции концентрации (log-концентрация) клеток, обработанных соединением C14 на основе ингибитора KIF18A в присутствии (незакрашенные круги) или отсутствие (закрашенные круги) ингибитора P-gp. Фигура 13B представляет собой график POC, построенный в виде функции концентрации (log-концентрация) клеток, обработанных паклитакселом (тубулин) в присутствии (незакрашенные круги) или в отсутствие (закрашенные круги) ингибитора P-gp.

[0035] Фигура 14A представляет собой серию кривых FACS, демонстрирующих содержание ДНК в мононуклеарных клетках костного мозга человека (HBMNC), обработанных DMSO, соединением C11 или соединением C9 на основе ингибитора

KIF18A или, испинесибом, паклитакселом или палбоциклибом. Фигура 14B представляет собой график демонстрирующий % мононуклеарных клеток костного мозга человека (HBMNC) от донора 37612 или донора 37534, окрашенных антителами к BrdU (верхний график) или в отношении SubG1 клеточного цикла (нижний график), где HBMNC были обработаны DMSO, соединением C9 или соединением C11 на основе ингибитора KIF18A, испинесибом (Eg5), паклитакселом (тубулин) или палбоциклибом (CDK4/6) в течение 48 часов. Фигура 14C представляет собой график количества живых клеток (на 1×10^6) среди клеток от донора 37612 или донора 37534 после обработки DMSO, соединением C9 или соединением C11 на основе ингибитора KIF18A, испинесибом (Eg5), паклитакселом (тубулин) или палбоциклибом (CDK4/6) в течение 96 часов. Фигура 14D представляет собой серию графиков, на которых построен % фибробластов крайней плоти человека (hFSF) среди клеток, положительно крашенных по BrdU, обработанных DMSO или разными дозами соединения C11 на основе ингибитора KIF18A, испинесиба (Eg5) или палбоциклиба (CDK4/6) в течение 48 часов. Фигура 14E представляет собой серию графиков, на которых построен % маммарных эпителиальных клеток человека (HMEC) среди клеток, положительно крашенных по BrdU, обработанных DMSO или разными дозами соединения C11 на основе ингибитора KIF18A, испинесиба (Eg5) или палбоциклиба (CDK4/6) в течение 48 часов.

[0036] Фигуры 15A - 15E представляют собой тепловые карты, демонстрирующие относительное общее количество объектов (фигура 15A), включение BrdU (фигура 15B), экспрессию cl-PARP (фигура 15C), экспрессию белка p21 (фигура 15D) и экспрессию γHH2X (фигура 15E) в клетках, обработанных DMSO, соединением C9 или соединением C11 на основе ингибитора KIF18A, BI-2536 PLK1, паклитакселом (тубулин), испинесибом (Eg5), GSK923295 (CENP-E), нутлином-3A (MDM2) или палбоциклибом (CDK4/6).

[0037] Фигура 16 представляет собой серию вестерн-блоттов лизатов нормальных HMEC (левая панель) и клеток TNBC BT-549 (правая панель), обработанных отдельными siRNA к KIF18A или ненацеливающимися контрольными (NTC) siRNA или положительным контролем (+-контроль; клетки HeLa, обработанные нокодазолом (NOC) или клетки Jurkat, обработанные стауроспорином). Вестрен-блотты в отношении маркера апоптоза, расщепленного PARP (cl-PARP), и β-актина проводили для демонстрации равной белковой нагрузки в каждой дорожке.

[0038] Фигура 17A представляет собой серию графиков, демонстрирующих POC клеток, обработанных siRNA к KIF18A, ненацеливающимися контрольными (NTC) siRNA или siRNA положительного контроля (siRNA к Eg5). Пунктирная линия указывает 50% подавление роста клеток на основе контроля, NTC siRNA. siRNA к KIF18A уменьшали количество клеток на >50% по сравнению с NTC siRNA, и клетки считались чувствительными к siRNA к KIF18A с p-значением <0,05. Фигура 17B представляет собой таблицу, в которой представлена пояснительная легенда для графика на фигуре 16A с информацией о клеточных линиях (тканевое происхождение, подтип опухоли и генетический статус), p-значения и подавление роста клеток с помощью siRNA к KIF18A

относительно NTC. siRNA к KIF18A уменьшали количество клеток на >50% по сравнению с NTC siRNA, и клетки считались чувствительными к siRNA к KIF18A с p-значением <0,05. Фигура 17C представляет собой вестерн-блотт лизатов чувствительных или нечувствительных к siRNA к KIF18A клеток, показывающий уровни экспрессии белков KIF18A и β-актина.

[0039] Фигура 18 представляет собой график чувствительности к соединению C9 на основе ингибитору KIF18A для каждой из четырех групп клеточных линий рака молочной железы и яичника, отличающихся статусом WGD и статусом TP53.

[0040] На фигуре 19A представлены профили ответа моторной активности KIF18A в зависимости от концентрации АДФ-Glo, представленные в виде сигнала люминесценции MT-АТФазы относительно контроля с DMSO (POC), при этом значения представляют собой среднее значение ± SEM на основе трех независимых экспериментов.

[0041] Анализ эффективности в отношении опухоли и переносимости соединений C9 и C12 в опухолевых ксенотрансплантатах на основе HGSOC OVCAR-3 (фигура 19B) или на основе TNBC CAL-51 (фигура 19C). Мышам с приживленными опухолями, вводили дозу IP среды-носителя отдельно, соединения C9 при 100 мг/кг или соединения C12 при 25 мг/кг каждый день в течение 18 последовательных дней. На графиках показаны измерения объема опухоли (слева, эффективность) и веса тела (справа, переносимость), представленные в виде среднего значения ± SEM относительно времени (дни) (n=10 на группу). Группы обработки по сравнению с группой со средой-носителем отдельно, ****p <0,0001 согласно RMANOVA с последующим тестом Даннетта для множественных сравнений.

[0042] Анализы эффективности в отношении опухоли, переносимости, повторного роста опухоли для C9 и C12 в опухолевых ксенотрансплантатах на основе HGSOC OVCAR-8. На графиках на фигуре 19D показаны измерения объема опухоли (слева, эффективность) и веса тела (справа, переносимость), представленные в виде среднего значения ± SEM относительно времени (дни) (n=10 на группу). Группы обработки по сравнению с группой со средой-носителем отдельно, ****p <0,0001 согласно RMANOVA с последующим тестом Даннетта для множественных сравнений.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0043] *Способы определения лечения, способы идентификации пациентов, отвечающих на лечение, и связанные способы*

[0044] В настоящем изобретении предусмотрены способы определения лечения для субъекта с неопластическим заболеванием (например, раком). В иллюстративных вариантах осуществления способ включает анализирование образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. В разных аспектах лечение, определенное для субъекта, включает ингибитор KIF18A, если образец является

положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

[0045] В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором CDK4/6. В разных аспектах лечение для субъекта определяется как лечение, включающее ингибитор KIF18A, если неопластическое заболевание является нечувствительным или устойчивым к ингибитору CDK4/6.

[0046] В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIF18A. В разных аспектах лечение для субъекта определяется как лечение, включающее ингибитор CDK4/6, если неопластическое заболевание является нечувствительным или устойчивым к ингибитору KIF18A.

[0047] В данном документе предусмотрены способы идентификации субъекта с неопластическим заболеванием как чувствительного к лечению ингибитором KIF18A. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает анализирование образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. В разных случаях субъект идентифицируется как чувствительный к лечению ингибитором KIF18A, если образец является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

[0048] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ идентификации субъекта с неопластическим заболеванием как восприимчивого к лечению ингибитором KIF18A. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIF18A. В разных аспектах субъект идентифицируется как восприимчивый к лечению ингибитором KIF18A, если раковые клетки из образца нечувствительные к ингибитору CDK4/6.

[0049] В данном документе предусмотрены способы поддержания чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором CDK4/6 у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A.

[0050] Кроме того, в данном документе предусмотрены способы определения

эффективности лечения ингибитором KIF18A у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает анализирование образца, полученного от субъекта после начала лечения ингибитором KIF18A, в отношении одного или нескольких из

уровня экспрессии фосфо-гистона H3,

отличительных признаков центросомы (маркеров центриоли и PCM, включающих без ограничения центрин-1-3, перицентрин, γ-тубулин; показателя окрашенных участков или фрагментации, расстояния от полюса к полюсу), nsis,

отличительных признаков хромосомы (окрашивания ДНК; показателя размеров митотического хроматина, замедленного расхождения хромосом к полюсам делящейся клетки/анафазных мостов, образования микроядер),

отличительных признаков веретена деления (маркеров тубулина, показателя мультиполярности и геометрии веретена деления),

локализации белка KIF18A (маркера KIF18A; показателя локализации KIF18A при митозе,

посттрансляционных модификаций белка KIF18A (обнаружение дублетов белка KIF18A анализом с использованием вестерн-блоттинга),

модуляции экспрессии белков или генов (таких как циклин B1, секурин, фосфо-гистон H3 (ser-10), циклин E1, Mcl-1, BubR1, компоненты SAC, cl-PARP, cl-каспаза-3/-7),

маркеров апоптоза (таких как TUNEL), повреждения и репарации ДНК (таких как γ-H2AX (Ser-139).

[0051] *Ингибиторы KIF18A*

[0052] Настоящее изобретение относится к ингибиторам KIF18A. Термин "ингибитор KIF18A" означает любое соединение, применимое для модулирования белка KIF18A отдельно или в связанном комплексе с микротрубочками (MT) для лечения KIF18A-опосредованных состояний и/или заболеваний, включающих неопластические заболевания (например, рак), воспаления или цилиопатологий. Соединения на основе ингибитора KIF18A, раскрытые в данном документе, обладают основанной на MT модулирующей KIF18A активностью и, в частности, ингибирующей KIF18A активностью. В связи с этим в настоящем изобретении также предусмотрено применение таких соединений, а также их фармацевтически приемлемых солей, в получении и изготовлении фармацевтической композиции или лекарственного препарата для терапевтического, профилактического, острого или хронического лечения KIF18A-опосредованных заболеваний и нарушений, включающих без ограничения рак. Таким образом, соединения по настоящему изобретению применимы в изготовлении противораковых лекарственных препаратов.

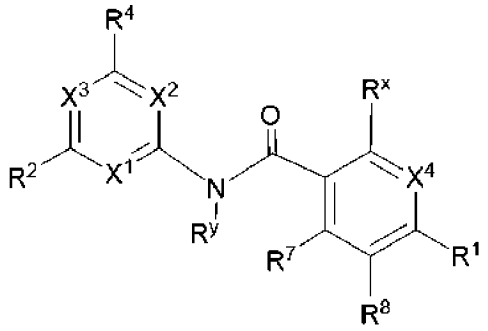
[0053] В разных аспектах термин "ингибитор KIF18A" означает любое соединение или молекулу, которые целенаправленно воздействуют на KIF18A и уменьшают или подавляют активность KIF18A. Ген KIF18A принадлежит к подсемейству кинезин-8 и представляет собой направленный в отношении положительного конца мотор. Полагают, что KIF18A влияет на движущую силу в области положительного конца кинетохорных

микротрубочек для контроля корректной расстановки хромосом и натяжения веретена. Истощение KIF18A у человека приводит к более длинным веретенам, повышенной степени колебания хромосомы при метафазе и активации контрольной точки митотической сборки веретена в клетках рака шейки матки HeLa (MI Mayr et al, Current Biology 17, 488-98, 2007). KIF18A сверхэкспрессируется при многих типах видов рака, в том числе без ограничения при видах рака толстой кишки, молочной железы, легкого, поджелудочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, головы, шеи, шейки матки и яичника. Сверхэкспрессия KIF18A ослабляет колебательное движение сестринских хроматид, что приводит к образованию плотных метафазных пластинок. Инактивация моторной функции KIF18A у мышей с нокаутом KIF18A или путем обработки мутагенным этилметаносульфонатом (EMS) у мышей с $KIF18A^{gcd2/gcd2}$ (миссенс-мутация (R308K) в моторном домене) приводит к получению жизнеспособных мышей с отсутствием явных аномалий в основных органах, помимо явной атрофии семенников и стерильности (J Stumpff et al Developmental Cell. 2008;14:252-262; J Stumpff et al Developmental Cell. 2012;22:1017-1029; XS Liu et al. Genes & Cancer. 2010;1:26-39; CL Fonseca et al J Cell Biol. 2019;1-16; A Czechanski et al Developmental Biology. 2015;402:253-262. O Rath, F Kozielski. Nature Reviews Cancer. 2012;12:527-539). Было показано, что нормальные дефектные по KIF18A соматические клетки человека и мыши завершают клеточное деление с относительно нормальным продвижением по стадиям митоза, но без надлежащего выравнивания хромосом, что приводит к получению дочерних клеток с нормальным кариотипом, при этом отмечались некоторые дефекты при выходе из митоза в ряду нормальных клеток, что приводило к образованию микроядер или медленной пролиферации (CL Fonseca et al J Cell Biol. 2019;1-16). Такие генетические исследования свидетельствуют о том, что нормальные генеративные и соматические клетки характеризуются разной зависимостью от требований относительно выравнивания хромосом, и указывают, что KIF18A может быть необязательным при нормальном делении эуплоидных соматические клеток (XS Liu et al Genes & Cancer. 2010;1:26-39; A Czechanski et al Developmental Biology. 2015;402:253-262). В нормальных тканях человека экспрессия KIF18A повышается в тканях с активно делящимися клетками, при этом наивысшая экспрессия отмечается в семенниках (GTEx Portal, GTEx Portal, J Lonsdale et al Nature Genetics. 2013:29;45:580). В разных аспектах ингибитор KIF18A подавляет активность АТФазы. Например, ингибитор KIF18A подавляет активность МТ-АТФазы, а не активность основной АТФазы.

[0054] Уменьшение или ингибирование, обеспечиваемое ингибитором KIF18A, может не представлять собой 100% или полное ингибирование, или упразднение, или уменьшение. Напротив, существуют разнящиеся степени уменьшения или ингибирования, которые специалист в данной области распознает как оказывающие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В связи с этим ингибитор KIF18A может ингибировать белок(белки) KIF18A до любого количества или уровня. В иллюстративных вариантах осуществления уменьшение или ингибирование, обеспечиваемое ингибитором

KIF18A, составляет по меньшей мере или приблизительно 10% уменьшение или ингибирование (например, по меньшей мере или приблизительно 20% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 30% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 40% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 50% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 60% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 70% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 80% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 90% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 95% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 98% уменьшение или ингибирование).

[0055] В иллюстративных вариантах осуществления соединения на основе ингибитора KIF18A, которые можно использовать в данных способах по настоящему изобретению, представляют собой низкомолекулярное соединение формулы (I),



(I);

или его любую фармацевтически приемлемую соль, где

X^1 представляет собой N или $-CR^6$;

X^2 представляет собой N или $-CR^5$;

X^3 представляет собой N или $-CR^3$;

X^4 представляет собой N или $-CR^9$;

где 0, 1 или 2 из X^1, X^2, X^3 и X^4 представляют собой N;

R^1 представляет собой -CN или группу $-Z-R^{12}$, где Z представляет собой $-C_{0-4}$алк-, $-NR^{11}-$, $-NR^{11}SO_2-$, $-SO_2NR^{11}-$, $-NR^{11}-S(=O)(=NH)$, -S(=O)(=NH)-, -S-, -S(=O)-, $-SO_2-$, C_{0-4}алк-O-, -(C=O)-, $-(C=O)NR^{11}-$, -C=N(OH)- или $-NR^{11}(C=O)$; или

группа $-Z-R^{12}$ представляет собой $-N=S(=O)-(R^{12})_2$, где два R^{12} в паре в качестве альтернативы могут быть объединены с атомом серы, присоединенным к каждому из них, с образованием насыщенного или частично насыщенного 3-, 4-, 5- или 6-членного моноциклического кольца, содержащего 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранных из O и S;

R^2 представляет собой галоген или группу $-Y-R^{13}$, где Y представляет собой $-C_{0-4}$алк-, $-N(C_{0-1}$алк$)-C_{0-4}$алк-, $-C(=O)NR^aR^a(C_{1-4}$алк), $-O-C_{0-4}$алк-, S, S=O, $S(=O)_2$, $-SO_2NR^{13}$ или -S(=O)(=NH)-;

R^3 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^4 представляет собой H, галоген, R^{4a} или R^{4b};

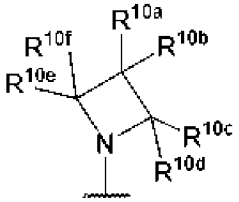
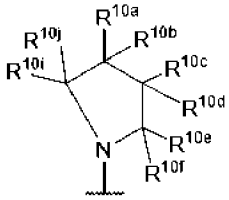
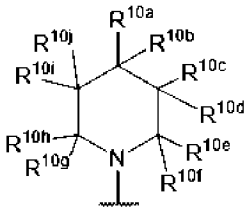
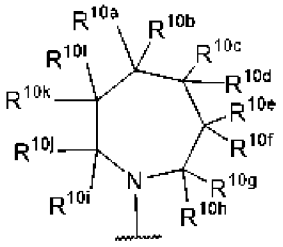
R^5 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^6 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк, C_{1-4}галогеналк, -O-C_{1-8}алк или -O-R^{6a}; где R^{6a} представляет собой насыщенное или частично насыщенное 3-, 4-, 5- или 6-членное моноциклическое кольцо, содержащее 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранных из атомов O и S;

R^7 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^8 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк, C_{1-4}галогеналк, -OH, -O-R^{8a} или -O-R^{8b};

R^9 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^x выбран из группы, состоящей из  ,  ,  и  ;

каждый из R^{10a}, R^{10b}, R^{10c}, R^{10d}, R^{10e}, R^{10f}, R^{10g}, R^{10h}, R^{10i} и R^{10j} представляет собой H, галоген, R^{10k} или R^{10l};

или в качестве альтернативы каждая из пары R^{10a} и R^{10b}, пары R^{10c} и R^{10d}, пары R^{10e} и R^{10f}, пары R^{10g} и R^{10h} или пары R^{10i} и R^{10j} может быть независимо объединена с атомом углерода, присоединенным к каждой из них, с образованием насыщенного или частично насыщенного 3-, 4-, 5-, 6-членного моноциклического спиро-кольца с кольцом R^x; где указанное 3-, 4-, 5-, 6-членное моноциклическое кольцо содержит 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранных из атомов O и S, и дополнительно где указанное 3-, 4-, 5-, 6-членное моноциклическое кольцо замещено 0, 1, 2 или 3 группами, выбранными из F, Cl, Br, C_{1-6}алк, C_{1-4}галогеналк, -OR^a, -OC_{1-4}галогеналк, CN, -NR^aR^a или оксо;

R^y представляет собой H, C_{1-4}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^{11} представляет собой H, R^{11a} или R^{11b};

R^{12} представляет собой H, R^{12a} или R^{12b};

R^{13} представляет собой R^{13a} или R^{13b};

в каждом случае R^{4a}, R^{8a}, R^{10k}, R^{11a}, R^{12a} и R^{13a} независимо выбраны из группы, состоящей из насыщенного, частично-насыщенного или ненасыщенного 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членного моноциклического или 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11- или 12-членного бициклического кольца, содержащего 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранные из O и S, которое замещено 0, 1, 2 или 3 группами, выбранными из F, Cl, Br, C_{1-6}алк, C_{1-}

$_4$галогеналк, -OR^a, -OC$_{1-4}$галогеналк, CN, -C(=O)R^b, -C(=O)OR^a, -C(=O)NR^{a}R^a, -C(=NR^a)NR^{a}R^a, -OC(=O)R^b, -OC(=O)NR^{a}R^a, -OC$_{2-6}$алк-NR^{a}R^a, -OC$_{2-6}$алк-OR^a, -SR^a, -S(=O)R^b, -S(=O)$_2$R^b, -S(=O)$_2$NR^{a}R^a, -NR^{a}R^a, -N(R^a)C(=O)R^b, -N(R^a)C(=O)OR^b,-N(R^a)C(=O)NR^{a}R^a, -N(R^a)C(=NR^a)NR^{a}R^a, -N(R^a)S(=O)$_2$R^b, -N(R^a)S(=O)$_2$NR^{a}R^a, -NR^{a}C$_{2-6}$алк-NR^{a}R^a, -NR^{a}C$_{2-6}$алк-OR^a, -C$_{1-6}$алк-NR^{a}R^a, -C$_{1-6}$алк-OR^a, -C$_{1-6}$алк-N(R^a)C(=O)R^b, -C$_{1-6}$алк-OC(=O)R^b, -C$_{1-6}$алк-C(=O)NR^{a}R^a, -C$_{1-6}$алк-C(=O)OR^a, R^{14} и оксо;

в каждом случае R^{4b}, R^{8b}, R^{10l}, R^{11b}, R^{12b} и R^{13b} независимо выбраны из группы, состоящей из C$_{1-6}$алк, замещенного 0, 1, 2, 3, 4 или 5 группами, выбранными из F, Cl, Br, -OR^a, -OC$_{1-4}$галогеналк или CN;

в каждом случае R^{14} независимо выбран из группы, состоящей из насыщенного, частично-насыщенного или ненасыщенного 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членного моноциклического или 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11- или 12-членного бициклического кольца, содержащего 0, 1, 2 или 3 атома N и 0 или 1 атом, выбранный из O и S, которое замещено 0, 1, 2 или 3 группами, выбранными из F, Cl, Br, C$_{1-6}$алк, C$_{1-4}$галогеналк, -OR^a, -OC$_{1-4}$галогеналк, CN, -C(=O)R^b, -C(=O)OR^a, -C(=O)NR^{a}R^a, -C(=NR^a)NR^{a}R^a, -OC(=O)R^b, -OC(=O)NR^{a}R^a, -OC$_{2-6}$алк-NR^{a}R^a, -OC$_{2-6}$алк-OR^a, -SR^a, -S(=O)R^b, -S(=O)$_2$R^b, -S(=O)$_2$NR^{a}R^a, -NR^{a}R^a, -N(R^a)C(=O)R^b, -N(R^a)C(=O)OR^b,-N(R^a)C(=O)NR^{a}R^a, -N(R^a)C(=NR^a)NR^{a}R^a, -N(R^a)S(=O)$_2$R^b, -N(R^a)S(=O)$_2$NR^{a}R^a, -NR^{a}C$_{2-6}$алк-NR^{a}R^a, -NR^{a}C$_{2-6}$алк-OR^a, -C$_{1-6}$алк-NR^{a}R^a, -C$_{1-6}$алк-OR^a, -C$_{1-6}$алкN(R^a)C(=O)R^b, -C$_{1-6}$алкOC(=O)R^b, -C$_{1-6}$алкC(=O)NR^{a}R^a,

-C$_{1-6}$алкC(=O)OR^a и оксо;

в каждом случае R^a независимо представляет собой H или R^b; и

в каждом случае R^b независимо представляет собой C$_{1-6}$алк, фенил или бензил, при этом C$_{1-6}$алк замещен 0, 1, 2 или 3 заместителями, выбранными из галогена, -OH, -OC$_{1-4}$алк, -NH$_2$, -NHC$_{1-4}$алк, -OC(=O)C$_{1-4}$алк или -N(C$_{1-4}$алк)C$_{1-4}$алк; и фенил или бензил замещены 0, 1, 2 или 3 заместителями, выбранными из галогена, C$_{1-4}$алк, C$_{1-3}$галогеналк, -OH, -OC$_{1-4}$алк, -NH$_2$, -NHC$_{1-4}$алк, -OC(=O)C$_{1-4}$алк или -N(C$_{1-4}$алк)**C$_{1-4}$алк.**

[0056] Получение соединений формулы (I) можно найти в ранее поданных предварительных заявках на патенты США под серийными № 62/783061 и 62/783069; каждая из которых была подана 20 декабря 2018 года; и 62/882255 и 62/882268; каждая из которых была подана 02 августа 2019 года.

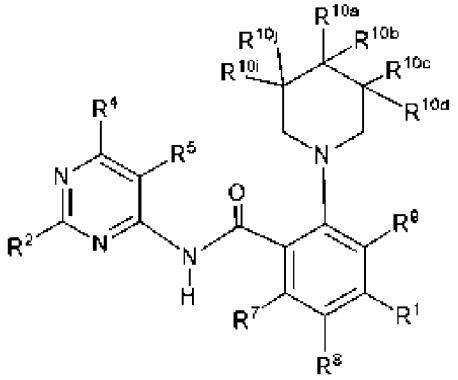
[0057] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где 0 из X^1, X^2, X^3 и X^4 представляет собой N.

[0058] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где 1 из X^1, X^2, X^3 и X^4 представляет собой N.

[0059] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A

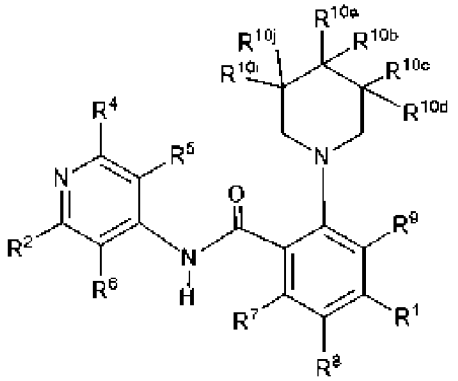
представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где 2 из X^1, X^2, X^3 и X^4 представляет собой N.

[0060] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый из X^1 и X^3 представляет собой N; X^2 представляет собой $-CR^5$; и X^4 представляет собой $-CR^9$; характеризующееся формулой (Ia),



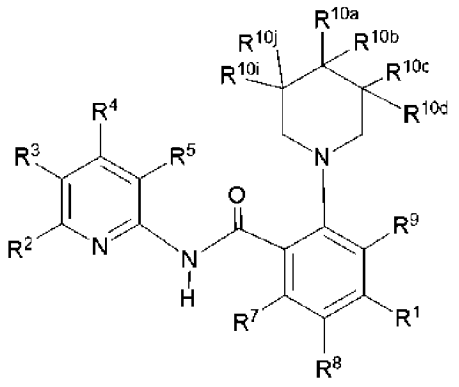
(Ia).

[0061] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где X^1 представляет собой $-CR^6$; X^2 представляет собой $-CR^5$; X^3 представляет собой N; и X^4 представляет собой $-CR^9$; характеризующееся формулой (Ib),



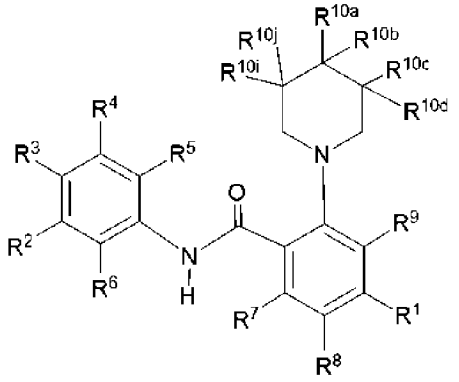
(Ib).

[0062] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где X^1 представляет собой N; X^2 представляет собой $-CR^5$; X^3 представляет собой $-CR^3$; и X^4 представляет собой $-CR^9$; характеризующееся формулой (Ic),



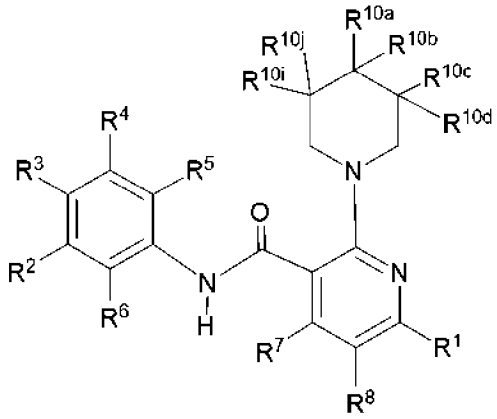
(Ic).

[0063] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где X^1 представляет собой $-CR^6$; X^2 представляет собой $-CR^5$; X^3 представляет собой $-CR^3$; и X^4 представляет собой $-CR^9$; характеризующееся формулой (Id),



(Id).

[0064] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где X^1 представляет собой $-CR^6$; X^2 представляет собой $-CR^5$; X^3 представляет собой $-CR^3$; и X^4 представляет собой -N; характеризующееся формулой (Ie),



(Ie).

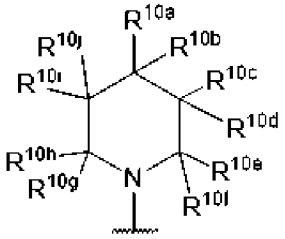
[0065] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль,

где R^y представляет собой H или метил. В другом подварианте осуществления R^y представляет собой H.

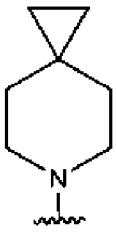
[0066] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый из R^{10c}, R^{10d}, R^{10e}, R^{10f}, R^{10g}, R^{10h}, R^{10i} и R^{10j} представляет собой H, галоген, C_{1-6}алк или C_{1-4}галогеналк; и каждый из R^{10a} и R^{10b} в паре объединен с атомом углерода, присоединенным к каждому из них, с образованием насыщенного 3-, 4- или 5-членного моноциклического спиро-кольца с кольцом R^x; где указанное кольцо содержит 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранные из O и S.

[0067] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый из R^{10c}, R^{10d}, R^{10e}, R^{10f}, R^{10g}, R^{10h}, R^{10i} и R^{10j} представляет собой H, метил или этил; и каждый из R^{10a} и R^{10b} в паре объединен с атомом углерода, присоединенным к каждому из них, с образованием циклопропильного, циклобутильного или циклопентильного спиро-кольца с кольцом R^x.

[0068] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль,



где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, где группа



представляет собой .

[0069] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^1 представляет собой группу $-Z-R^{12}$; где Z представляет собой -S(=O)(=NH)-, $-NHSO_2-$, $-SO_2-$, $-SO_2NH-$ или -NH-; и R^{12} представляет собой циклопропил, $-CH_2CH_2-OH$, $-CH(CH_3)CH_2-OH$, $-C(CH_3)_2CH_2-OH$, **метилоксетанил или трет-бутил**.

[0070] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль,

где R^1 представляет собой группу -Z-R^{12}; где Z представляет собой -$NHSO_2$- или -NH-; и R^{12} представляет собой -CH_2CH_2-OH, -$CH(CH_3)CH_2$-OH или -$C(CH_3)_2CH_2$-OH.

[0071] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^1 представляет собой группу -Z-R^{12}; где Z представляет собой -$NHSO_2$- и R^{12} представляет собой -CH_2CH_2-OH.

[0072] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой группу -Y-R^{13}; где Y представляет собой -C_{0-4}алк-, -O-C_{0-4}алк-, S, S=O, $S(=O)_2$ или -SO_2NH-; и -R^{13} представляет собой 4,4-дифтор-1-пиперидинил; -CH_2CH_2-CF_3, трет-бутил, циклопентил или 2-метилморфолинил.

[0073] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой пиперидинил или морфолинил, замещенные 1, 2 или 3 группами, выбранными из F, Cl, Br, метила или CF_3; или R^2 представляет собой -O-CH_2CH_2-CF_3, -SO_2NH-$C(CH_3)_3$ или -SO_2-циклопентил.

[0074] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой группу -Y-R^{13}; где Y представляет собой -C_{0-4}алк-; и -R^{13} представляет собой 4,4-дифтор-1-пиперидинил или 2-метилморфолинил.

[0075] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^4 представляет собой H или метил.

[0076] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^5 представляет собой H.

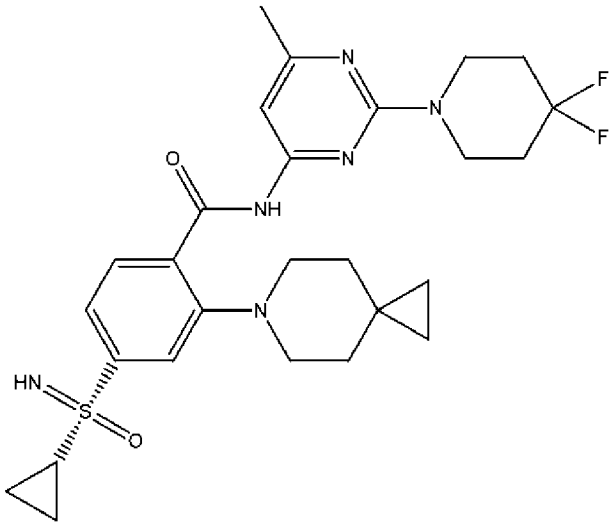
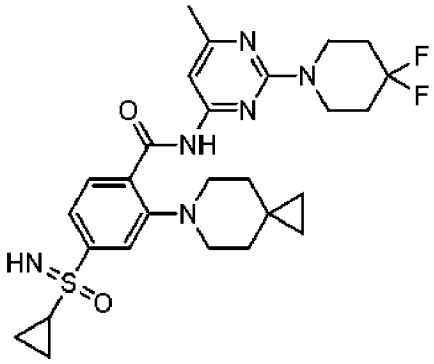
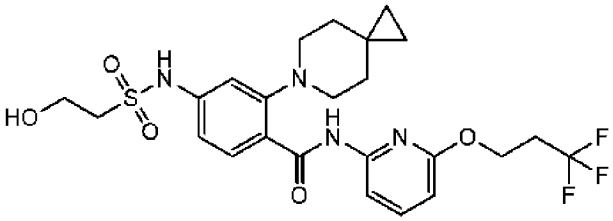
[0077] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^6 представляет собой H.

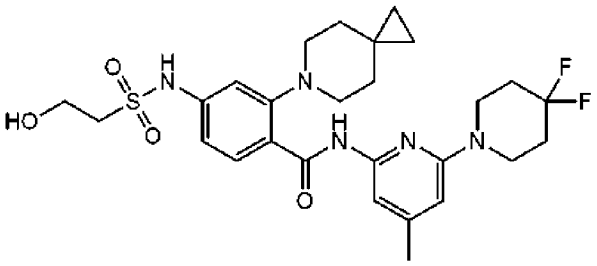
[0078] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^7 представляет собой H.

[0079] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^8 представляет собой H.

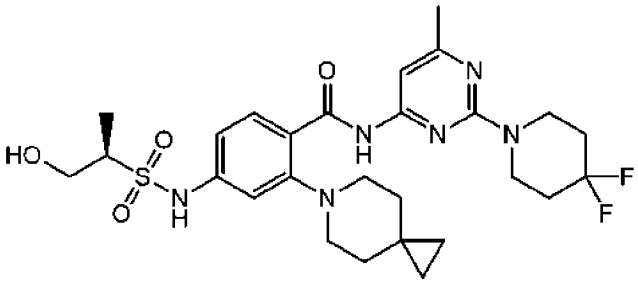
[0080] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^9 представляет собой H.

[0081] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где указанное соединение выбрано из группы, состоящей из:

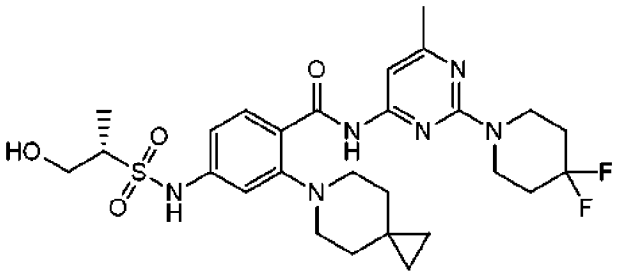
№ пр.*	Химическая структура	Химическое название
C1		2-(6-Азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(R-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид
C2		2-(6-Азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(S-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид
C3		4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-N-(6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-ил)бензамид

C4 

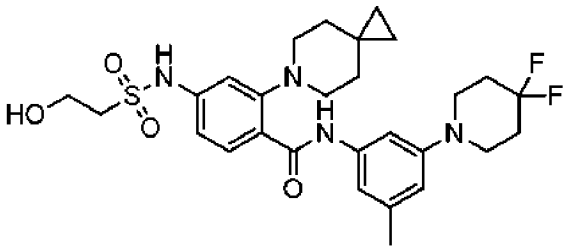
N-(6-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

C5 

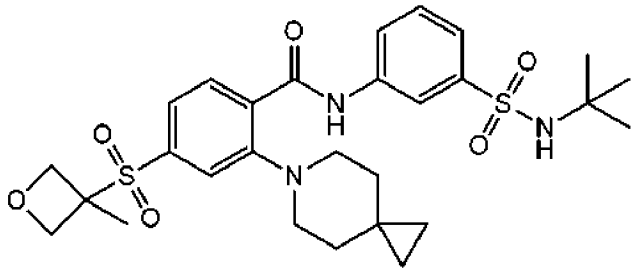
(R)-N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

C6 

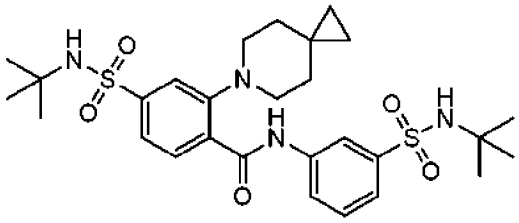
(S)-N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

C7 

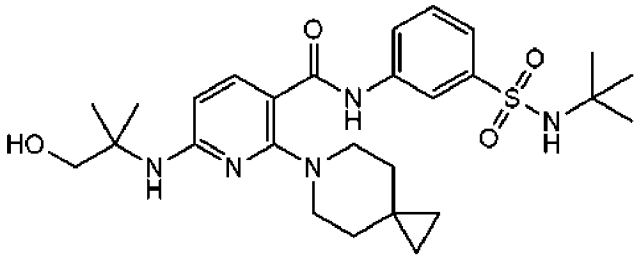
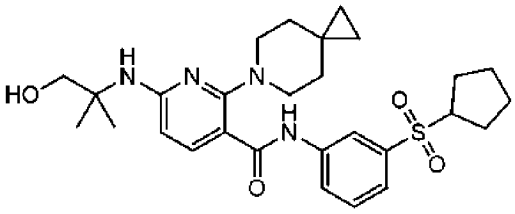
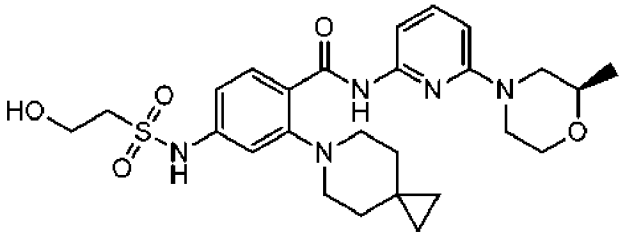
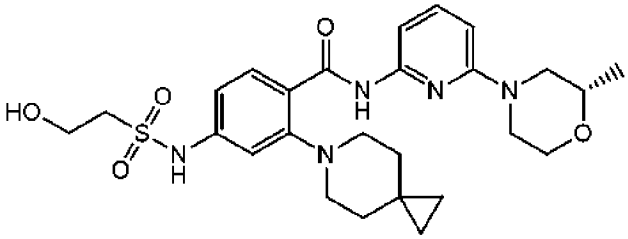
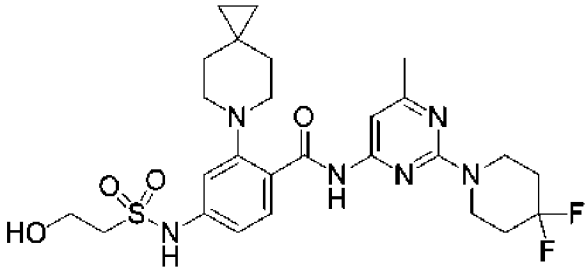
N-(3-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-5-метилфенил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

C8 

N-(3-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)фенил)-4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

C9 

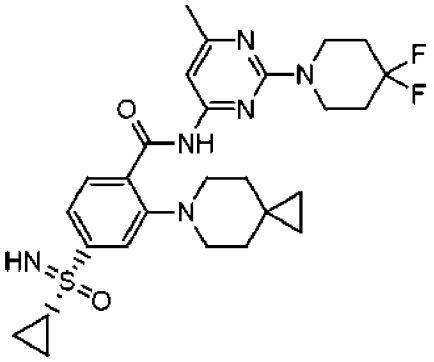
4-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)-N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

C10		N-(3-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид
C11		N-(3-(Циклопентилсульфонил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид
C12		(R)-4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид
C13		(S)-4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид
C14		N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

* № пр. обозначает № примера, а также короткое название соединения на основе ингибитора KIF18A, применяемое в данном документе, например в разделе Примеры.

[0082] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная,

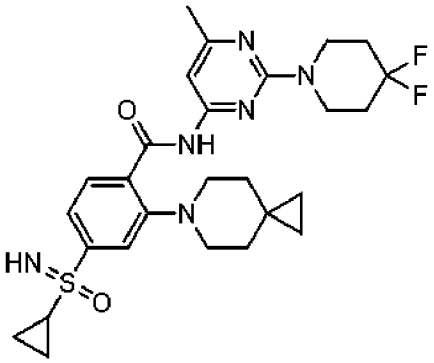
тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется 2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(R-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид 2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(R-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамида.

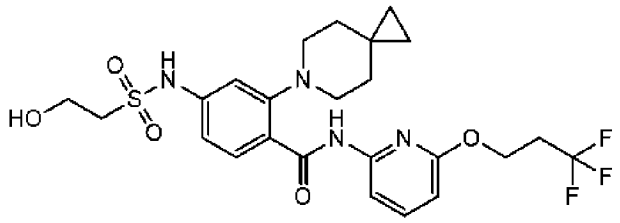
[0083] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется 2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(S-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид 2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(S-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамида.

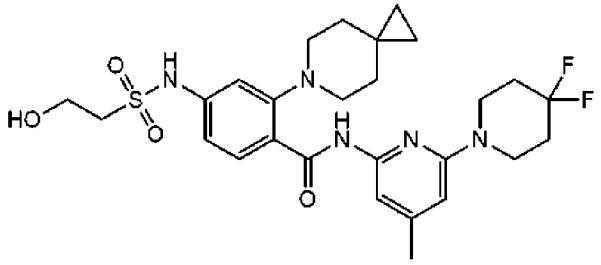
[0084] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется 4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-N-(6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид 4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-N-(6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-ил)бензамида.

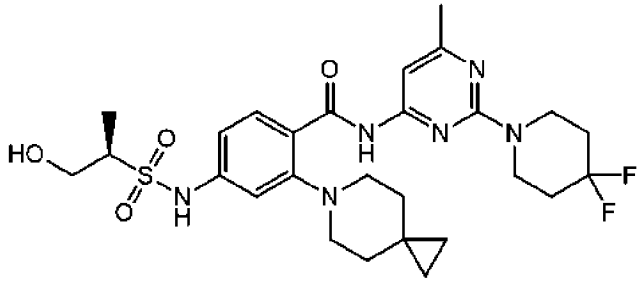
[0085] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое представляет собой **N-(6-(4,4-**дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид N-(6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида.

[0086] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой

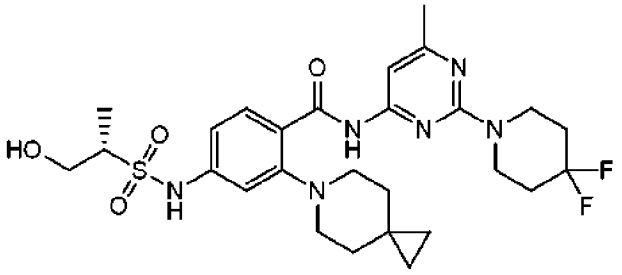


;

которое называется (R)-N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В

подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид (R)-N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида.

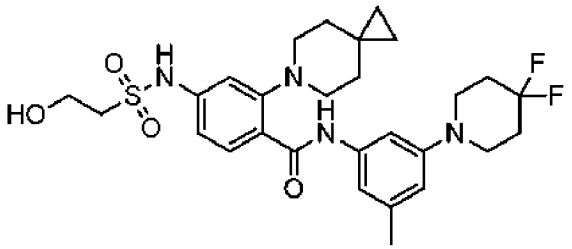
[0087] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется (S)-N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид (S)-N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида.

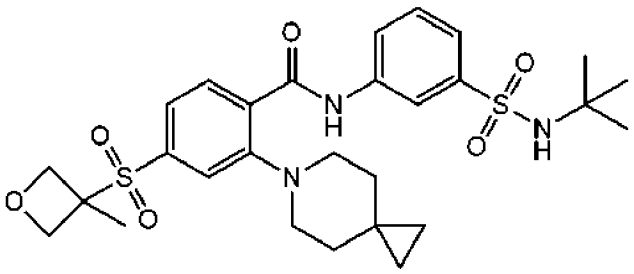
[0088] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется N-(3-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-5-метилфенил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид N-(3-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-5-метилфенил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида.

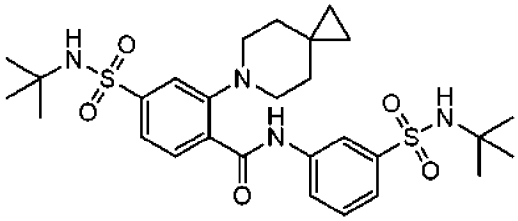
[0089] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида.

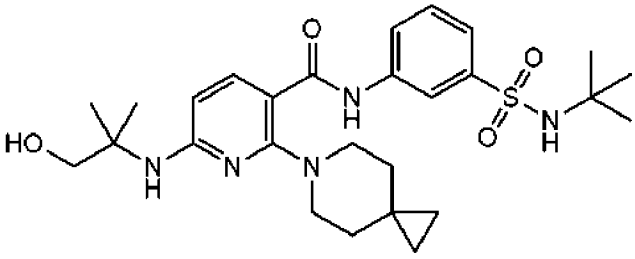
[0090] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется 4-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)-N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид 4-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)-N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида.

[0091] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой

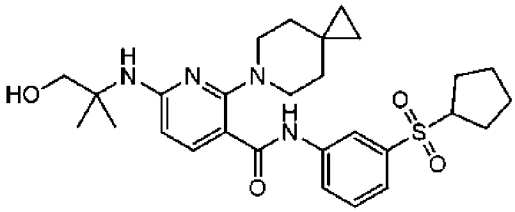


;

которое называется N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид. В подварианте

осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамида.

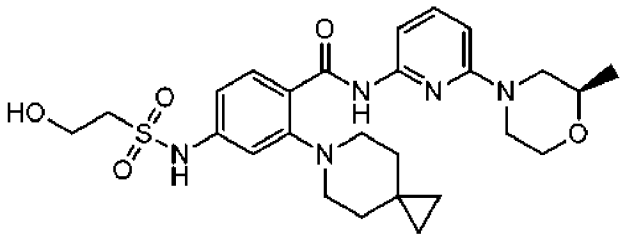
[0092] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется 4-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)-N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид N-(3-(циклопентилсульфонил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамида.

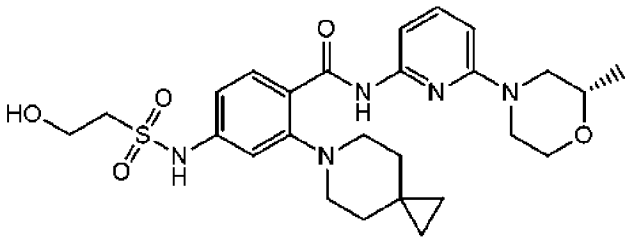
[0093] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется (R)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид (R)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида.

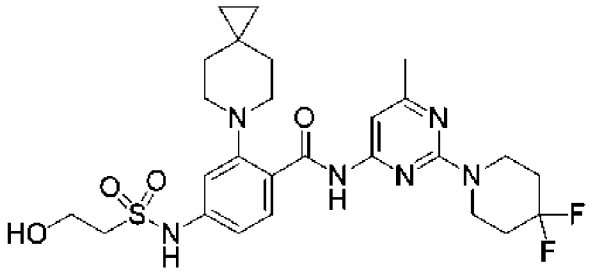
[0094] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется (S)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид (S)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида.

[0095] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где KIF18A или его фармацевтически приемлемая соль, такая как сульфатная, соль HCl, мезилатная, тозилатная или безилатная соль, где указанное соединение представляет собой



;

которое называется N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид. В подварианте осуществления соль представляет собой соль HCl, где указанное соединение называется гидрохлорид N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида.

[0096] Предполагается, что соединения на основе ингибитора KIF18A включают все фармацевтически приемлемые изотопно-меченые соединения по настоящему изобретению, где один или несколько атомов заменены на атомы, характеризующиеся таким же атомным числом, а атомной массой или массовым числом, отличным от атомной массы или массового числа, которое преобладает в природе.

[0097] Примеры изотопов, подходящих для включения в соединения по настоящему изобретению, включают без ограничения изотопы водорода, такие как ^{2}H и ^{3}H, углерода, такие как ^{11}C, ^{13}C и ^{14}C, хлора, такие как ^{38}Cl, фтора, такие как ^{18}F, йода, такие как ^{123}I и ^{125}I, азота, такие как ^{13}N и ^{15}N, кислорода, такие как ^{15}O, ^{17}O и ^{18}O, фосфора, такие как ^{32}P, и серы, такие как ^{35}S.

[0098] Определенные изотопно-меченые соединения по настоящему изобретению, например, соединения, в которые включен радиоактивный изотоп, являются

применимыми в исследованиях распределения лекарственного средства и/или субстрата в тканях. Радиоактивные изотопы тритий, т. е. ^{3}H, и углерод-14, т. е. ^{14}C, являются, в частности, применимыми для данной цели с учетом легкости их введения и готовых средств для их обнаружения.

[0099] Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, т. е. ^{2}H, может предоставлять определенные терапевтические преимущества, возникающие вследствие более высокой устойчивости к инактивации в процессе метаболизма, например, повышенный период полувыведения in vivo или сниженные требования к дозе, и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах.

[00100] Замещение позитронно-активными изотопами, такими как ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O и ^{13}N, может применяться в исследованиях с использованием позитронно-эмиссионной топографии (PET) для определения степени занятости рецептора субстратом.

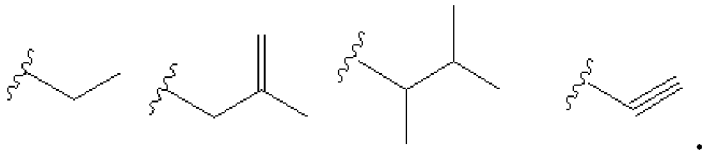
[00101] Меченные изотопами соединения по настоящему изобретению, как правило, могут быть получены с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области, или с помощью способов, аналогичных способам, описанным в прилагаемых примерах и вариантах получения, с применением соответствующего меченного изотопом реагента вместо немеченого реагента, используемого ранее.

[00102] Фармацевтически приемлемые сольваты в соответствии с настоящим изобретением включают сольваты, где растворитель кристаллизации может быть изотопно замещен, например, D_2O, d_6-ацетон, d_6-DMSO.

[00103] Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения включают соединения, проиллюстрированные в примерах ниже, и их фармацевтически приемлемые соли, комплексы, сольваты, полиморфы, стереоизомеры, метаболиты, пролекарства и их другие производные.

[00104] Если не указано иное, то следующие определения применяют по отношению к терминам, встречающимся в описании и формуле изобретения.

[00105] "$C_{\alpha-\beta}$алк" означает алкильную группу, содержащую наименьшее α и наибольшее β атомов углерода в разветвленном или линейном взаимном расположении или любой комбинации из трех, где α и β представляют собой целые числа. Алкильная группа, описанная в данном разделе, также может содержать одну или две двойных или тройных связи. Обозначение C_0алк обозначает прямую связь. Примеры C_{1-6}алкил включают без ограничения следующие:



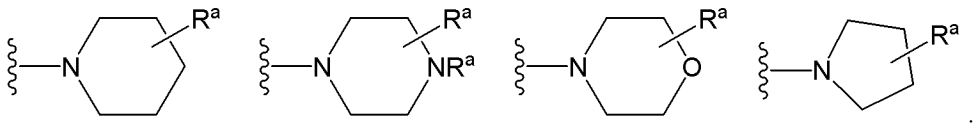
[00106] Термины "оксо" и "тиоксо" представляют собой соответственно группу =O (как в карбониле) и =S (как тиокарбониле).

[00107] "Галогено" или "галоген" означает атом галогена, выбранный из F, Cl, Br и

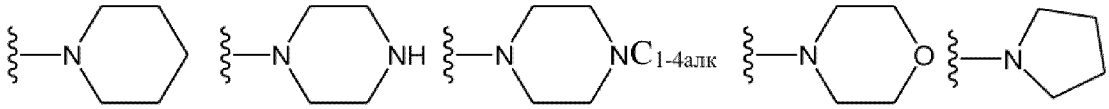
I.

[00108] "$C_{\alpha-\beta}$галогеналк" означает алк-группу, которая описана выше, где любое количество, по меньшей мере один, атомов водорода, присоединенное к алк-цепи, замещено атомами F, Cl, Br или I.

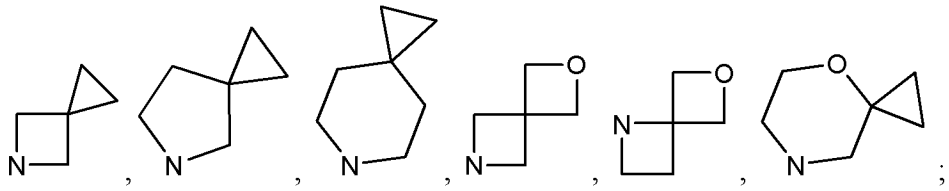
[00109] Группа $N(R^a)R^a$ и т. п. предусматривает заместители, где две группы R^a вместе образуют кольцо, необязательно включающее атом N, O или S атом, и предусматривает группы, такие как:



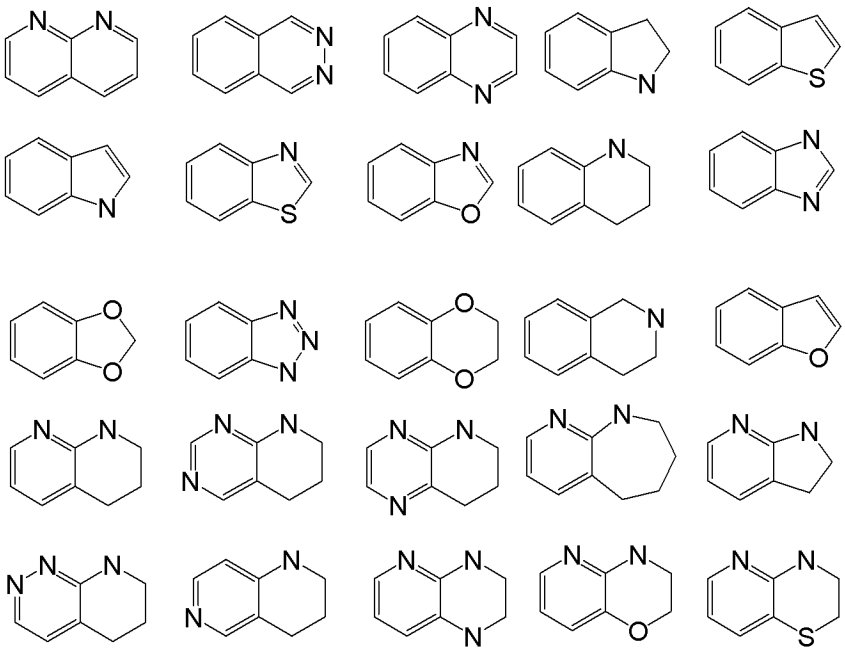
[00110] Группа $N(C_{\alpha-\beta}алк)C_{\alpha-\beta}алк$, где α и β являются такими, как определено выше, предусматривает заместители, где две группы $C_{\alpha-\beta}алк$ вместе образуют кольцо, необязательно включающее атом N, O или S, и предусматривает группы, такие как .



[00111] "Бициклическая" структура означает группу, которая предусматривает два соединенных кольца. Бициклическое кольцо может быть карбоциклическим (все из кольцевых атомов представляют собой атомы углерода) или гетероциклическим (кольцевые атомы состоят, например, из 1, 2 или 3 гетероатомов, таких как N, O или S, в дополнение к атомам углерода). Два кольца оба могут быть алифатическими (например, декалин и норборнан), или могут быть ароматическими (например, нафталин), или комбинацией алифатического и ароматического (например, тетралин). Бициклические кольца включают (a) спироциклические соединения, где два кольца имеют общий только один атом, спиро-атом, которым обычно является четвертичный углерод. Примеры спироциклического соединения включают без ограничения:



[00112] (b) Сочлененные бициклические соединения, где два кольца имеют два общих смежных атома. Другими словами, кольца имеют одну общую ковалентную связь, т. е. атомы в голове моста являются непосредственно соединенными (например, α-туйен и декалин). Примеры сочлененных бициклических колец включают без ограничения:



[00113] ; и (c) мостиковые бициклические соединения, где два кольца имеют три или более общих атомов, разделяя два мостиковых атома мостом, содержащим по меньшей мере один атом. Например, норборнан, также известный как бицикло[2.2.1]гептан, можно рассматривать как пару циклопентановых колец, каждое из которых имеет общих три из пяти атомов углерода. Примеры мостиковых бициклических колец включают без ограничения:

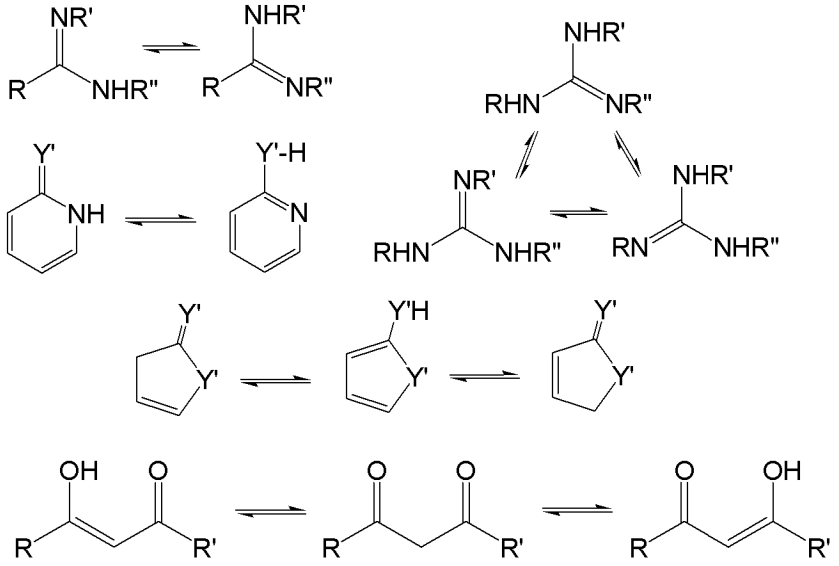
[00114] "Карбоцикл" или "карбоциклический" означает кольцо, содержащее само по себе или в комбинации с другими терминами, представляющее собой, если не указано иное, циклическую версию "$C_{\alpha-\beta}$алк". Примеры карбоцикла включают циклопентил, циклогексил, 1-циклогексенил, 3-циклогексенил, циклогептил, циклобутилен, циклогексилен и т. п.

[00115] "Фармацевтически приемлемая соль" означает соль, полученную традиционными средствами, и является широко известной специалистам в данной области. "Фармакологически приемлемые соли" включают основные соли неорганических и органических кислот, в том числе без ограничения хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, фосфорной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, яблочной кислоты, уксусной кислоты, щавелевой кислоты, винной кислоты, лимонной кислоты, молочной кислоты, фумаровой кислоты, янтарной кислоты, малеиновой кислоты, салициловой кислоты, бензойной кислоты, фенилуксусной кислоты, миндальной кислоты и т. п. В тех случаях, когда соединения по настоящему изобретению включают кислотную функциональную группу, такую как карбокси-группа, тогда подходящие фармацевтически приемлемые катионные пары для

карбокси-группы являются широко известными специалистам в данной области и включают щелочные, щелочноземельные, аммонийные катионы, катионы четвертичного аммония и т. п. Для дополнительных примеров "фармакологически приемлемых солей" см. ниже и Berge et. al., J. Pharm. Sci. 66:1 (1977).

[00116] "Насыщенный, частично-насыщенный или ненасыщенный" предусматривает заместители, насыщенные атомами водорода, заместители, полностью ненасыщенные атомами водорода, и заместители, частично насыщенные атомами водорода.

[00117] Следует отметить, что соединения по настоящему изобретению могут содержать группы, которые могут существовать в таутомерных формах, как, например, циклические и ациклические амидиновые и гуанидиновые группы, замещенные гетероатомом гетероарильные группы (Y'=O, S, NR) и т. п., которые проиллюстрированный в следующих примерах:



и хотя одна форма названа, описана, отображена и/или заявлена в данном документе, все таутомерные формы предназначены для включения по определению в такие название, описание, отображение и/или пункт формулы изобретения.

[00118] Пролекарства на основе соединений по настоящему изобретению также предусмотрены к применению в способе по настоящему изобретению. Пролекарство представляет собой активное или неактивное соединение, которое химически модифицируется посредством in vivo физиологических действий, таких как гидролиз, метаболизм и т. п., в соединение по настоящему изобретению после введения пролекарства пациенту. Пригодность и методики, применяемые для получения и использования пролекарств, широко известны специалистам в данной области. В отношении общего обсуждения пролекарств, включающих сложные эфиры, см. Svensson and Tunek Drug Metabolism Reviews 165 (1988) и Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985). Примеры замаскированного карбоксилат-аниона включают множество сложных эфиров, таких как алкиловый (например, метиловый, этиловый), циклоалкиловый

(например, циклогексиловый), аралкиловый (например, бензиловый, п-метоксибензиловый) и алкилкарбонилоксиалкиловый (например, пивалоилоксиметиловый). Амины маскируют как арилкарбонилоксиметиловые замещенные производные, которые расщепляются эстеразами in vivo с высвобождением лекарственного средства и формальдегида (Bungaard J. Med. Chem. 2503 (1989)). Также, лекарственные средства, содержащие кислотную NH-группу, такие как имидазол, имид, индол и т. п., маскируют с помощью N-ацилоксиметильных групп (Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985)). Гидроксигруппы маскируют как сложные эфиры и эфиры. В EP 039051 (Sloan и Little, 11.04.81) раскрыты пролекарства на основе гидроксамовой кислоты с основанием Манниха, их получение и применение.

[00119] Описание и формула изобретения содержат перечень видов соединений с применением выражения "выбранный из . . и . . ." и "представляет собой . . . или . . ." (иногда называемые группами Маркуша). В тех случаях, когда данное выражение применяют в данной заявке, если не указано иное, тогда это означает включение группы в целом или ее любых отдельных членов или ее любых подгрупп. Данное выражение применяют только для целей сокращения, и оно не обозначает ограничение каким-либо образом удаления отдельных элементов или подгрупп по мере необходимости.

[00120] В разных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой высокомолекулярное соединение, например нуклеиновую кислоту, олигонуклеотид, полинуклеотид, полипептид, белок. В разных случаях ингибитор KIF18A представляет собой молекулу, которая целенаправленно воздействует на нуклеиновою кислоту, кодирующую KIF18A, и/или связывается с ней. В разных аспектах нуклеиновая кислота, кодирующая KIF18A, представляет собой последовательность гена KIF18A человека (представленную в данном документе под SEQ ID NO: 30) или последовательность мРНК KIF18A человека (представленную в данном документе под SEQ ID NO: 31), а кодируемый KIF18A белок содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11.

[00121] Необязательно ингибитор KIF18A включает нуклеиновую кислоту, которая целенаправленно воздействует на нуклеиновую кислоту, кодирующую KIF18A, необязательно под SEQ ID NO: 30 или 31, и/или связывается с ней. В иллюстративных аспектах ингибитор KIF18A включает нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая комплементарная части нуклеиновой кислоты, кодирующей KIF18A (например, SEQ ID NO: 30 или 31). Необязательно ингибитор KIF18A включает нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, которая связывается с частью, состоящей из экзона 3, экзона 4 или экзона 7 гена KIF18A.

[00122] Термин "нуклеиновая кислота", используемый в данном документе, включает "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "молекулу нуклеиновой кислоты" и, как правило, означает полимер ДНК или РНК или их модифицированные формы, которые могут быть однонитевыми или двухнитевыми, синтезированными или полученными (например, выделенными и/или очищенными) из природных источников, которые могут

содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды и которые могут содержать природную, неприродную или измененную межнуклеотидную связь, такую как фосфорамидатная связь или фосфотиоатная связь, вместо фосфодиэфирной, находящейся между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида. В разных аспектах нуклеиновая кислота содержит любую нуклеотидную последовательность, которая целенаправленно воздействует на нуклеиновую кислоту, кодирующую KIF18A, и/или связывается с ней. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота не содержит каких-либо вставок, делеций, инверсий и/или замен. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит одну или несколько вставок, делеций, инверсий и/или замен. Нуклеиновые кислоты в некоторых аспектах конструируют на основе реакций химического синтеза и/или ферментативного лигирования с применением процедур, известных из уровня техники. См., например, Sambrook et. al., выше; и Ausubel et. al., выше. Например, нуклеиновую кислоту можно синтезировать химическим путем с использованием встречающихся в природе нуклеотидов или различным образом модифицированных нуклеотидов, разработанных для повышения биологической стабильности молекулы или для повышения физической стабильности дуплекса, образующегося при гибридизации (например, фосфотиоатных производных и акридинзамещенных нуклеотидов). Примеры модифицированных нуклеотидов, которые можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включают без ограничения 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеуозин, инозин, N^6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N^6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутозин, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый сложный эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил и 2,6-диаминопурин. В качестве альтернативы, одна или несколько нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут быть приобретены у компаний, таких как Macromolecular Resources (Форт-Коллинс, Колорадо) и Synthegen (Хьюстон, Техас).

[00123] В разных аспектах ингибитор KIF18A уменьшает экспрессию KIF18A. В разных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой некодирующую РНК (ncRNA), которая уменьшает экспрессию KIF18A. В иллюстративных аспектах ингибитор KIF18A уменьшает экспрессию гена KIF18A и/или продукта этого гена (например, мРНК KIF18A, белка KIF18A). Уменьшение экспрессии гена KIF18A и/или продукта этого гена (например, мРНК KIF18A, белка KIF18A), обеспечиваемое ингибитором KIF18A, может не представлять собой 100% или полное уменьшение, или ингибирование, или

упразднение. Напротив, существуют разнящиеся степени уменьшения, которые специалист в данной области распознает как оказывающие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В связи с этим ингибитор KIF18A может уменьшать экспрессию гена KIF18A и/или продукта этого гена до любого количества или уровня. В иллюстративных вариантах осуществления уменьшение, обеспечиваемое ингибитором KIF18A, представляет собой по меньшей мере или приблизительно 10% уменьшение (например, по меньшей мере или приблизительно 20% уменьшение, по меньшей мере или приблизительно 30% уменьшение, по меньшей мере или приблизительно 40% уменьшение, по меньшей мере или приблизительно 50% уменьшение, по меньшей мере или приблизительно 60% уменьшение, по меньшей мере или приблизительно 70% уменьшение, по меньшей мере или приблизительно 80% уменьшение, по меньшей мере или приблизительно 90% уменьшение, по меньшей мере или приблизительно 95% уменьшение, по меньшей мере или приблизительно 98% уменьшение). Подходящие способы определения уровней экспрессии нуклеиновых кислот (например, генов KIF18A, РНК KIF18A, например мРНК) известны в уровне техники и включают без ограничения количественную полимеразную цепную реакцию (qPCR) (например, количественную ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR)), RNAseq и нозерн-блоттинг. Методики измерения экспрессии генов включают, например, анализы экспрессии генов с или без применения генных чипов или микрочипов для анализа экспрессии генов описаны в Onken et. al., J Molec Diag 12(4): 461-468 (2010) и Kirby et. al., Adv Clin Chem 44: 247-292 (2007). Генные чипы РНК-чипы от Affymetrix и наборы для анализа экспрессии генов (например, анализы экспрессии генов на основе TaqMan® Applied Biosystems™) также коммерчески доступны от компаний, таких как ThermoFisher Scientific (Уолтем, Массачусетс). Подходящие способы определения уровней экспрессии белков известны в уровне техники и включают иммуноанализы (например, вестерн-блоттинг, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), иммуногистохимический анализ и иммуногистохимический анализ) или мультиплексные анализы на основе гранул, например такие, которые описаны в Djoba Siawaya JF, Roberts T, Babb C, Black G, Golakai HJ, Stanley K, et al. (2008) An Evaluation of Commercial Fluorescent Bead-Based Luminex Cytokine Assays. PLoS ONE 3(7): e2535.

[00124] В разных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой ncRNA, которая не подвергается трансляции в белок. В иллюстративных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой короткую ncRNA, например, содержащую менее чем приблизительно 30 нуклеотидов). В альтернативных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой длинную ncRNA, например, содержащую более чем приблизительно 200 нуклеотидов), в том числе без ограничения длинную некодирующую РНК (lncRNA). Необязательно, короткая ncRNA представляет собой микроРНК (miRNA), короткую интерферирующую РНК (siRNA) или взаимодействующую с PIWI РНК (piRNA). В разных аспектах ncRNA представляет собой малую ядрышковую РНК (snoRNA), малую ядерную РНК (snRNA), внеклеточную РНК (exRNA) или малую специфичную для телец Кахаля РНК (scaRNA).

См., например, Esteller, Nature Reviews Genetics 12: 861-874 (2011).

[00125] В иллюстративных случаях ингибитор KIF18A представляет собой молекулу, которая опосредует или инициирует РНК-интерференцию (RNAi). В иллюстративных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой фактор инициации RNAi. RNAi представляет собой универсальный механизм регуляции генов у растений и животных, при котором целевые мРНК могут быть разрушены специфичным в отношении последовательности образом (Setten et. al., Nature Reviews Drug Discovery 18: 421-446 (2019); Sharp, Genes Dev., 15, 485-490 (2001); Hutvagner et. al., Curr. Opin. Genet. Dev., 12, 225-232 (2002); Fire et. al., Nature, 391, 806-811 (1998); Zamore et. al., Cell, 101, 25-33 (2000)). Способ разрушения РНК опосредован dsRNA-специфичной эндонуклеазой Dicer, которая способствует расщеплению длинных dsRNA-предшественников на двухнитевые фрагменты длинной от 21 до 25 нуклеотидов, называемые малыми интерферирующими РНК (siRNA; также известная как короткая интерферирующая РНК) (Zamore, et. al., Cell. 101, 25-33 (2000); Elbashir et. al., Genes Dev., 15, 188-200 (2001); Hammond et. al., Nature, 404, 293-296 (2000); Bernstein et. al., Nature, 409, 363-366 (2001)). siRNA включаются в большой белковый комплекс, который распознает и расщепляет целевые мРНК (Nykanen et. al., Cell, 107, 309-321 (2001). Потребность в Dicer при созревании siRNA в клетках можно опустить путем введения синтетических 21-нуклеотидных дуплексов siRNA, которые подавляют экспрессию трансфицированных и эндогенных генов в ряду разных клеток млекопитающих (Elbashir et. al., Nature, 411: 494-498 (2001)).

[00126] siRNA могут быть сконструированы и/или синтезированы так, чтобы проникать в клетку посредством эндоцитоза, и непосредственно взаимодействовать с ферментами RNAi, Dicer и TAR-РНК-связывающим белков (TRBP), в цитозоле с образованием комплекса нагрузки RISC (RLC), и претерпевать отбор нити с получением полноценного РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). Полноценный RISC регулирует экспрессию генов путем подавления трансляции мРНК, стимулирования секвестрирования мРНК до цитоплазматических телец, способствования разрушению мРНК и направления транскрипционного сайленсинга генов. siRNA обычно характеризуются полной комплементарностью в отношении одной целевой мРНК для стимулирования сильного и узко направленного сайленсинга генов.

[00127] В иллюстративных аспектах ингибитор KIF18A опосредует RNAi и в разных случаях представляет собой молекулу siRNA, специфичную для подавления экспрессии нуклеиновой кислоты (например, мРНК), кодирующей белок KIF18A. Термин "siRNA", используемый в данном документе, относится к РНК (или аналогу РНК), содержащей от приблизительно 10 до приблизительно 50 нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов), которая способна направлять или опосредовать RNAi. В иллюстративных вариантах осуществления молекула siRNA содержит от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов) или от приблизительно 18 до приблизительно 25 нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов), например 19-21 нуклеотидов (или аналогов нуклеотидов). siRNA может быть двух- или однонитевой.

[00128] В альтернативных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой короткую молекулу РНК в конформации "шпильки" (shRNA), специфичную для подавления экспрессии нуклеиновой кислоты (например, мРНК), кодирующей белок KIF18A. Термин "shRNA", используемый в данном документе, относится к молекуле из приблизительно 20 или более пар оснований, в которой однонитевая РНК частично включает палиндромную последовательность оснований и образует в ее пределах двухнитевую структуру (т. е., шпилькообразную структуру). shRNA может представлять собой siRNA (или аналог siRNA), которая свернута в шпилькообразную структуру. shRNA, как правило, содержат от приблизительно 45 до приблизительно 60 нуклеотидов, включая примерно 21-нуклеотидные антисмысловую и смысловую части шпильки, необязательные выступы на не относящейся к петле стороне длинной от приблизительно 2 до приблизительно 6 нуклеотидов и петельную часть, длина которой может составлять, например, от приблизительно 3 до 10 нуклеотидов. shRNA может быть синтезирована химически. В качестве альтернативы shRNA может быть получена путем соединения смысловой и антисмысловой ниток последовательности ДНК в противоположных направлениях и синтезирования РНК in vitro с помощью РНК-полимеразы T7 с применением ДНК в качестве матрицы. Без привязки к какой-либо теории или механизму полагают, что после введения shRNA в клетку shRNA разрушается на части длиной приблизительно 20 оснований или более (например, в качестве иллюстрации 21, 22, 23 оснований) и вызывает RNAi, что приводит к подавляющему эффекту. Таким образом, shRNA вызывает RNAi и, следовательно, может использоваться в качестве эффективного компонента по настоящему изобретению. shRNA предпочтительно может содержать выступающий 3'-конец. Длина двухнитевой части конкретным образом не ограничена, но предпочтительно составляет приблизительно 10 или более нуклеотидов, и более предпочтительно приблизительно 20 или более нуклеотидов. В данном документе выступающий 3'-конец предпочтительно может представлять собой ДНК, более предпочтительно ДНК длинной по меньшей мере 2 нуклеотида и еще более предпочтительно ДНК длинной 2-4 нуклеотида.

[00129] В иллюстративных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой микроРНК (miRNA). Используемый в данном документе термин "микроРНК" относится к малой (например, 15-22 нуклеотидов), некодирующей молекуле РНК, которая спаривается по основаниям с молекулами мРНК с сайленгингом экспрессии генов посредством репрессии трансляции или целевого разрушения. микроРНК и ее терапевтический потенциал описаны в уровне техники. См., например, Mulligan, MicroRNA: Expression, Detection, and Therapeutic Strategies, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, 2011; Bader and Lammers, "The Therapeutic Potential of microRNAs" Innovations in Pharmaceutical Technology, pages 52-55 (March 2011).

[00130] В разных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой РНК-фактор инициации, который идеально спаривается по основаниям с dsRNA или короткими РНК в конформации "шпилька" (shRNA), общая длина которых находится в диапазоне от 15 до

30 п. о. длина. В разных случаях ингибитор KIF18A представляет собой больший (>21 п. о.) дуплекс РНК, который взаимодействует с ферментом Dicer RNAi-пути для расщепления и передачи в RLC. В альтернативных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой более короткую (<21 п. о.) siRNA или ее аналог, которые способны пропускать расщепление с помощью Dicer и проникать в RISC посредством взаимодействий, опосредованных TRBP. Данный второй путь все еще может функционировать и при отсутствии Dicer. В разных аспектах ингибитор KIF18A представляет собой ss-siRNA, sshRNA, гидрофобно модифицированную siRNA, sisiRNA, siRNA (ESC), siRNN, GalXC, DsiRNA или shRNA, описанные в Setten et. al., 2019 выше. В данном документе описаны иллюстративные ингибиторы KIF18A, которые опосредуют редактирование генома с обусловливанием уменьшенной экспрессии гена KIF18A или с обусловливанием полного устранения функции гена KIF18A, например нокаута гена. В иллюстративных аспектах ингибитор KIF18A включает последовательность под SEQ ID NO: 12-18.

[00131] *Фармацевтические композиции, введение доз и пути введения*

[00132] В разных аспектах ингибитор KIF18A представлен в качестве части фармацевтической композиции. Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, включающие соединение, раскрытое в данном документе, вместе с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, таким как, например, разбавитель или носитель. Соединения и фармацевтические композиции, подходящие для применения в настоящем изобретении, предусматривают таковые, где соединение может быть введено в эффективном количестве для достижения своего предназначения. Введение соединения описано более подробно ниже.

[00133] Подходящие фармацевтические составы могут быть определены специалистами в данной области в зависимости от пути введения и необходимой дозы. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1435-712 (18th ed., Mack Publishing Co, Истон, Пенсильвания, США, 1990 г.). Составы могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость in vivo высвобождения и скорость in vivo выведения введенных средств. В зависимости от пути введения подходящая доза может быть рассчитана в соответствии с весом тела, площадью поверхности тела или размером органов. Специалисты в данной области обычно проводят дальнейшее уточнение расчетов, необходимых для определения соответствующей лечебной дозы, без излишних экспериментов, особенно с учетом информации о дозе и анализов, раскрытых в данном документе, а также фармакокинетических данных, которые можно получить в клинических испытаниях на животных или людях.

[00134] Фразы "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают нежелательных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животному или человеку. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" включает все возможные растворители, дисперсионные

среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и т. п. Применение таких вспомогательных веществ для фармацевтически активных веществ широко известно в уровне техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство несовместимы с терапевтическими композициями, предполагается их применение в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции. В иллюстративных вариантах осуществления состав может содержать сухую кукурузную патоку, высокоолеиновое сафлоровое масло, кокосовое масло, соевое масло, L-лейцин, трехосновный фосфат кальция, L-тирозин, L-пролин, L-лизина ацетат, DATEM (эмульгатор), L-глутамин, L-валин, двухосновный фосфат калия, L-изолейцин, L-аргинин, L-аланин, глицин, L-аспарагин моногидрат, L-серин, цитрат калия, L-треонин, цитрат натрия, хлорид магния, L-гистидин, L-метионин, аскорбиновую кислоту, карбонат кальция, L-глутаминовую кислоту, L-цистина дигидрохлорид, L-триптофан, L-аспарагиновую кислоту, холинхлорид, таурин, м-инозитол, сульфат железа(II), аскорбилпальмитат, сульфат цинка, L-карнитин, альфа-токоферилацетат, хлорид натрия, ниацинамид, смешанные токоферолы, пантотенат кальция, сульфат меди(II), тиаминхлорид гидрохлорид, витамин А пальмитат, сульфат марганца, рибофлавин, пиридоксин гидрохлорид, фолиевую кислоту, бета-каротин, иодид калия, филлохинон, биотин, селенат натрия, треххлористый хром, молибдат натрия, витамин D3 и цианокобаламин.

[00135] Соединение может присутствовать в фармацевтической композиции в виде фармацевтически приемлемой соли. Используемая в данном документе фраза "фармацевтически приемлемые соли" включает, например, соли присоединения основания и соли присоединения кислоты.

[00136] Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания могут быть образованы с помощью металлов или аминов, таких как щелочные и щелочноземельные металлы или органические амины. Фармацевтически приемлемые соли соединений также могут быть получены с помощью фармацевтически приемлемого катиона. Подходящие фармацевтически приемлемые катионы широко известны специалистам в данной области и включают щелочной, щелочноземельный, аммонийный катионы и катионы четвертичного аммония. Также возможным является использование карбонатов или гидрокарбонатов. Примеры металлов, применяемых в качестве катионов, представляют собой натрий, калий, магний, аммоний, кальций или трехвалентное железо и т. п. Примеры подходящих аминов включают изопропиламин, триметиламин, гистидин, N, N'-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, дициклогексиламин, этилендиамин, N-метилглюкамин и прокаин.

[00137] Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты включают соли неорганических или органических кислот. Примеры подходящих солей присоединения кислоты включают гидрохлориды, формиаты, ацетаты, цитраты, салицилаты, нитраты, фосфаты. Другие подходящие фармацевтически приемлемые соли

широко известны специалистам в данной области и включают, например, соли, образованные с помощью муравьиной, уксусной, лимонной, щавелевой, винной или миндальной кислот, хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты или фосфорной кислоты; с помощью органических карбоновых, сульфоновых, сульфо- или фосфокислот или N-замещенных сульфаминовых кислот, например, уксусной кислоты, трифторуксусной кислоты (TFA), пропионовой кислоты, гликолевой кислоты, янтарной кислоты, малеиновой кислоты, гидроксималеиновой кислоты, метилмалеиновой кислоты, фумаровой кислоты, яблочной кислоты, винной кислоты, молочной кислоты, щавелевой кислоты, глюконовой кислоты, глюкаровой кислоты, глюкуроновой кислоты, лимонной кислоты, бензойной кислоты, коричной кислоты, миндальной кислоты, салициловой кислоты, 4-аминосалициловой кислоты, 2-феноксибензойной кислоты, 2-ацетоксибензойной кислоты, эмбоновой кислоты, никотиновой кислоты или изоникотиновой кислоты и с помощью аминокислот, таких как 20 альфа-аминокислот, вовлеченных в синтез белков в природе, например, глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота, а также с помощью фенилуксусной кислоты, метансульфоновой кислоты (мезилата), толуолсульфоновых кислот (тозилата), этансульфоновой кислоты, 2-гидроксиэтансульфоновой кислоты, этан-1,2-дисульфоновой кислоты, бензолсульфоновой кислоты (безилата), 4-метилбензолсульфоновой кислоты, нафталин-2-сульфоновой кислоты, нафталин-1,5-дисульфоновой кислоты, 2- или 3-фосфоглицерата, глюкозо-6-фосфата, N-циклогексилсульфаминовой кислоты (с образованием цикламатов) или с помощью других кислотных органических соединений, таких как аскорбиновая кислота.

[00138] Фармацевтические композиции, содержащие соединения, раскрытые в данном документе, могут быть изготовлены традиционным способом, например, посредством способов традиционного смешивания, растворения, гранулирования, изготовления драже, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсуляции, захвата или лиофилизации. Надлежащий состав зависит от выбранного пути введения.

[00139] Подходящие композиции для перорального введения могут быть легко составлены путем объединения соединения, раскрытого в данном документе, с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, такими как носители, широко известные в уровне техники. Такие вспомогательные вещества и носители позволяют составлять соединения по настоящему изобретению в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и т. п. для перорального приема внутрь пациентом, который подлежит лечению. Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены путем добавления к соединению, раскрытому в данном документе, твердого вспомогательного вещества, необязательно измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления при необходимости подходящих вспомогательных средств с получением таблеток или ядер драже. Подходящие вспомогательные вещества включают, например, наполнители и целлюлозные препараты. При необходимости могут быть добавлены вещества для улучшения распадаемости таблеток. Фармацевтически приемлемые ингредиенты хорошо

известны для различных типов составов и могут представлять собой, например, связующие (например, природные или синтетические полимеры), смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества, подсластители и ароматизирующие средства, материалы для нанесения покрытия, консерванты, красители, загустители, вспомогательные вещества, антимикробные средства, антиоксиданты и носители для различных типов составов.

[00140] Если терапевтически эффективное количество соединения, раскрытого в данном документе, вводят перорально, то композиция, как правило, находится в форме твердого состава (например, таблетки, капсулы, пилюли, порошка или пастилки) или жидкого состава (например, водной суспензии, раствора, настойки или сиропа).

[00141] При введении в форме таблетки композиция может дополнительно содержать функциональное твердое вещество и/или твердый носитель, такой как желатин или вспомогательное средство. Таблетка, капсула и порошок могут содержать от приблизительно 1 до приблизительно 95% соединения и предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 90% соединения.

[00142] При введении в форме жидкости или суспензии могут быть добавлены функциональная жидкость и/или жидкий носитель, такой как вода, углеводородный носитель или масла животного или растительного происхождения. Жидкая форма композиции может дополнительно содержать физиологический раствор, растворы сахарных спиртов, растворы декстрозы или других сахаридов или гликоли. При введении в форме жидкости или суспензии композиция может содержать от приблизительно 0,5 до приблизительно 90% по весу соединения, раскрытого в данном документе, и предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 50% соединения, раскрытого в данном документе. В одном варианте осуществления предусмотрено, что жидкий носитель является неводным или по сути неводным. Композиция, предназначенная для введения в форме жидкости, может поставляться в виде быстрорастворимого твердого состава или суспензии для растворения непосредственно перед введением.

[00143] Если терапевтически эффективное количество соединения, раскрытого в данном документе, вводят посредством внутривенной, кожной или подкожной инъекции, то композиция находится в форме апирогенного, приемлемого для парентерального введения водного раствора. Получение таких приемлемых для парентерального введения растворов, имеющих соответствующие pH, изотоничность, стабильность и т. п., находится в пределах квалификации специалистов в данной области. Предпочтительная композиция для внутривенной, кожной или подкожной инъекции, как правило, содержит в дополнение к соединению, раскрытому в данном документе, изотоническую среду-носитель. Такие композиции могут быть получены для введения в виде растворов свободного основания или фармакологически приемлемых солей в воде, соответствующим образом смешанных с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. В обычных условиях хранения и применения такие препараты могут

необязательно содержать консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

[00144] Инъекционные композиции могут включать стерильные водные растворы, суспензии или дисперсии и стерильные порошки для немедленного получения стерильных инъекционных растворов, суспензий или дисперсий. Во всех вариантах осуществления форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она должна быть устойчивой в условиях изготовления и хранения и должна противостоять загрязняющему действию микроорганизмов, таких как бактерии и грибы, благодаря необязательному включению консерванта. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси, а также растительные масла. В одном варианте осуществления предусмотрено, что носитель является неводным или по сути неводным. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц соединения в варианте осуществления в виде дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть вызвано различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тиомерсалом и т. п. Во множестве вариантов осуществления будет предпочтительным включение изотонических средств, например сахаров или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута путем применения в композициях средств, замедляющих абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

[00145] Стерильные инъекционные растворы получают путем дополнения по мере необходимости активных соединений в требуемом количестве в соответствующем растворителе различными другими ингредиентами, перечисленными выше, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В варианте осуществления, представляющем собой стерильные порошки, предназначенные для получения стерильных инъекционных растворов, предпочтительные способы получения представляют собой методики вакуумной сушки и лиофильной сушки, которые обеспечивают получение порошка активного ингредиента плюс любого дополнительного необходимого ингредиента из его предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

[00146] Составы с медленным высвобождением или замедленным высвобождением также могут быть получены с целью достижения контролируемого высвобождения активного соединения в контакте с жидкостями организма в желудочно-кишечном тракте и для обеспечения по сути постоянного и эффективного уровня активного соединения в плазме крови. Например, высвобождение может контролироваться одним или

несколькими из растворения, диффузии и ионного обмена. Кроме того, подход с медленным высвобождением может усиливать абсорбцию через насыщаемые или ограничивающие пути в желудочно-кишечном тракте. Например, для данной цели соединение может быть встроено в полимерную матрицу из биологически разлагаемого полимера, водорастворимого полимера или смеси обоих и необязательно подходящих поверхностно-активных веществ. В данном контексте встраивание может означать включение микрочастиц в матрицу полимеров. Составы с контролируемым высвобождением также получают путем инкапсуляции диспергированных микрочастиц или эмульгированных микрокапель с помощью известных технологий дисперсионного или эмульсионного покрытия.

[00147] Для введения путем ингаляции соединения по настоящему изобретению удобно доставлять в форме подачи распыляемого аэрозоля из упаковок под давлением или с помощью небулайзера с использованием подходящего пропеллента. В варианте осуществления аэрозоля под давлением единица дозирования может быть определена путем предоставления клапана для доставки отмеренного количества. Для применения в ингаляторе или инсуффляторе могут быть составлены капсулы и картриджи, например из желатина, содержащие порошковую смесь соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

[00148] Соединения, раскрытые в данном документе, могут быть составлены для парентерального введения путем инъекции (например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии). Составы для инъекции могут быть представлены в стандартной лекарственной форме (например, в ампулах или в многодозовых контейнерах) с добавленным консервантом. Композиции могут принимать формы, такие как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных средах-носителях, и могут содержать вспомогательные средства для составления, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства.

[00149] Фармацевтические составы, предназначенные для парентерального введения, включают водные растворы соединений в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии соединений могут быть получены в виде соответствующих масляных инъекционных суспензий. Подходящие липофильные растворители или среды-носители включают жирные масла или синтетические сложные эфиры жирной кислоты. Водные инъекционные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии. Необязательно суспензия также может содержать подходящие стабилизаторы или средства, которые повышают растворимость соединений и обеспечивают получение высококонцентрированных растворов. Альтернативно композиция по настоящему изобретению может находиться в форме порошка, предназначенного для разбавления подходящей средой-носителем (например, стерильной апирогенной водой) перед применением.

[00150] Соединения, раскрытые в данном документе также могут быть составлены в композиции для ректального введения, такие как суппозитории или удерживающие

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

[00151] В частности, соединение, раскрытое в данном документе, можно вводить перорально, буккально или сублингвально в форме таблеток, содержащих вспомогательные вещества, такие как крахмал или лактоза, или в капсулах или вагинальных суппозиториях, либо отдельно, либо в смеси со вспомогательными веществами, или в форме настоек или суспензий, содержащих ароматизирующие или красящие средства. Такие жидкие препараты могут быть получены с использованием фармацевтически приемлемых добавок, таких как суспендирующие средства. Соединение также можно вводить парентерально, например внутривенно, внутримышечно, подкожно или интракоронарно. Для парентерального введения соединение лучше всего применять в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например соли или сахарные спирты, такие как маннит или глюкоза, для придания раствору изотоничности с кровью.

[00152] Для ветеринарного применения соединение, раскрытое в данном документе, вводят в виде подходящего приемлемого состава в соответствии с обычной ветеринарной практикой. Ветеринарный врач может легко определить режим дозирования и путь введения, который наиболее подходит для конкретного животного.

[00153] В некоторых вариантах осуществления все необходимые компоненты для лечения расстройства, связанного с KIF18A, с применением соединения, раскрытого в данном документе, либо отдельно, либо в комбинации с другим средством, или для вмешательства, традиционно выполняемого для лечения такого заболевания, могут быть упакованы в набор. Конкретно, в настоящем изобретении предусмотрен набор для применения при терапевтическом вмешательстве при заболевании, содержащий упакованный комплект лекарственных препаратов, которые включают соединение, раскрытое в данном документе, а также буферы и другие компоненты, предназначенные для получения доставляемых форм указанных лекарственных препаратов, и/или устройства для доставки таких лекарственных препаратов, и/или любые средства, которые применяют в комбинированной терапии с соединением, раскрытым в данном документе, и/или инструкции для лечения заболевания, находящиеся в упаковке с лекарственными препаратами. Инструкции могут быть зафиксированы на любом материальном носителе, таком как печатная бумага или считываемый компьютером магнитный или оптический носитель, или инструкции могут предоставляться в виде ссылки на удаленный компьютерный источник данных, такой как страница всемирной компьютерной сети,

доступная через интернет.

[00154] "Терапевтически эффективное количество" означает количество, эффективное для лечения или предупреждения развития или для ослабления существующих симптомов у субъекта, лечение которого осуществляют. Определение эффективных количеств находится в пределах компетенции специалистов в данной области, особенно в свете подробного раскрытия, представленного в данном документе. Как правило, "терапевтически эффективная доза" относится к такому количеству соединения, которое приводит к достижению требуемого эффекта. Например, в одном предпочтительном варианте осуществления терапевтически эффективное количество соединения, раскрытого в данном документе, снижает активность KIF18A на по меньшей мере 5% по сравнению с контролем, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%.

[00155] Количество вводимого соединения может зависеть от субъекта, лечение которого осуществляют, от возраста, состояния здоровья, пола и веса субъекта, вида одновременного лечения (если оно применяется), тяжести заболевания, характера необходимого эффекта, способа и частоты лечения и решения лечащего врача. Частота введения доз также может зависеть от фармакодинамических эффектов в отношении давления кислорода в артериальной крови. Хотя индивидуальные потребности варьируются, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств соединения находится в пределах квалификации специалистов в данной области. Такие дозы могут быть введены в однократной дозе или они могут быть поделены на несколько доз.

[00156] *Анализирование в отношении инактивированных генов, амплифицированных генов и уровней экспрессии*

[00157] В различных вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способы включают анализирование образца в отношении инактивированного гена (например, инактивированного гена TP53, инактивированного гена Rb1 и/или инактивированного BRCA). Используемый в данном документе термин "инактивированный" в контексте гена относится к уменьшению или потере функции гена или продукта гена, кодируемого геном. Инактивация гена может быть обусловлена одним или несколькими известными механизмами. Например, инактивация гена может быть обусловлена вариациями в (в том числе, например, потерей) последовательности ДНК, последовательности РНК или последовательности белка относительно соответствующего гена, РНК или белка дикого типа или может быть обусловлена эпигенетическими вариациями, которые не вовлекают какие-либо изменения в последовательности ДНК гена.

[00158] В разных аспектах стадия анализирования включает обнаружение наличия вариации или аномалии в гене или продукте гена, кодируемом геном, где вариация или

аномалия является относительной соответствующего гена или продукта гена дикого типа и наличие вариации приводит к сайленсингу гена или ассоциирована с ним, уменьшению или потере экспрессии гена или продукта гена, кодируемого геном, уменьшению или потере функции гена или продукта гена, кодируемого геном, или комбинации вышеизложенного. В разных случаях продукт гена представляет собой РНК-транскрипт или белок. В разных случаях вариация приводит к по меньшей мере уменьшению или потере функции гена или продукта гена, кодируемого геном. В разных случаях вариация приводит к по меньшей мере уменьшению или потере функции гена TP53 или продукта гена, кодируемого геном TP53. В разных случаях вариация приводит к по меньшей мере уменьшению или потере функции гена Rb1 или продукта гена, кодируемого геном Rb1. В разных случаях вариация приводит к по меньшей мере уменьшению или потере функции гена BRCA или продукта гена, кодируемого геном BRCA.

[00159] Вариация в гене может находится где-либо в гене, например, в пределах интрона или экзона, в пределах 5'-нетранслированного участка (5'-UTR) или 3'-нетранслированного участка (3'-UTR). Вариация может находится в пределах или в любой части транскрипта (например, РНК-транскрипта, первичного транскрипта, пре-мРНК, мРНК), кодируемого геном, или может находится в пределах или в любой части белка, кодируемого геном.

[00160] В разных аспектах вариация представляет собой отличие в последовательности ДНК, последовательности РНК или последовательности белка относительно соответствующего гена РНК или белка дикого типа. В разных аспектах образец анализируют в отношении инактивированного гена путем анализирования нуклеотидной последовательности гена, анализирования нуклеотидной последовательности РНК, кодируемой геном, или анализирования аминокислотной последовательности белка, кодируемого геном, и сравнения последовательности гена из образца с соответствующей последовательностью гена, РНК или белка человека дикого типа. В иллюстративных аспектах вариация включает делецию, вставку или замену одного или нескольких нуклеотидов в последовательности ДНК или последовательности РНК, делецию, вставку или замену одной или нескольких аминокислот в последовательности белка относительно соответствующих гена, РНК или белка дикого типа. В иллюстративных аспектах вариация включает делецию, вставку или замену одного или нескольких нуклеотидов в последовательность ДНК или последовательности РНК, делецию, вставку или замену одной или нескольких аминокислот в последовательности белка относительно соответствующих гена, РНК или белка дикого типа, что может привести к увеличению числа копий гена или амплификации ДНК, РНК или белка. В разных аспектах анализирование включает обнаружение наличия генной мутации в гене. В разных аспектах анализирование включает обнаружение наличия генной мутации в гене или потери нуклеотидов в гене. В иллюстративных случаях генная мутация является миссенс-мутацией, нонсенс-мутацией, вставкой, делецией, дупликацией, мутацией со сдвигом рамки считывания, усечением или экспансией повторов. В разных

случаях инактивированный ген TP53 предусматривает мутацию, делецию или усечение, инактивированный ген Rb1 предусматривает мутацию, делецию или усечение и/или инактивированный ген BRCA предусматривает мутацию, делецию или усечение. Используемый в данном документе термин "ген BRCA" относится к гену BRCA1 или BRCA2. В иллюстративных случаях ген BRCA представляет собой BRCA1. В иллюстративных аспектах ген BRCA представляет собой BRCA2.

[00161] В разных случаях вариация является эпигенетической и не вовлекает каких-либо изменений в последовательности ДНК гена. В иллюстративных аспектах инактивированный ген является подвергнутым эпигенетическому сайленсингу и необязательно включает ковалентную модификацию ДНК или гистоновых белков. Ковалентная модификация ДНК может, например, представлять собой метилирование или гидроксиметилирование цитозина. Ковалентная модификация гистонового белка может, например, представлять собой ацетилирование лизина, метилирование лизина или аргинина, фосфорилирование серина или треонина или убиквитинирование или сумоилирование лизина. Механизмы сайленсинга генов могут встречаться во время транскрипции или трансляции. Иллюстративные механизмы сайленсинга генов включают без ограничения метилирование ДНК, модификацию гистонов и РНК-интерференцию (RNAi). В разных аспектах инактивированный ген является подвергнутым эпигенетическому сайленсингу, при этом содержит подвергнутый эпигенетическому сайленсингу промотор. Необязательно, инактивированный ген TP53 содержит подвергнутый эпигенетическому сайленсингу промотор TP53 или инактивированный ген Rb1 содержит подвергнутый эпигенетическому сайленсингу промотор Rb1 или инактивированный ген BRCA содержит подвергнутый эпигенетическому сайленсингу промотор BRCA. Подходящие методики анализа в отношении эпигенетического сайленсинга включают без ограничения иммунопреципитацию хроматина (ChIP на чипе, ChIP-Seq), флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH), чувствительные к метилированию рестрикционные ферменты, идентификация ДНК-аденин-метилтрансферазы (DamID) и бисульфитное секвенирование. См., например, Verma et. al., Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention 23: 223-233 (2014).

[00162] В разных аспектах инактивированный ген инактивирован посредством вирус-индуцированного сайленсинга генов (VIGS). В разных случаях инактивированный ген TP53 инактивирован вирусным белком, например белком E6 папилломавируса человека (HPV). Необязательно белок E6 HPV взаимодействует с белком p53, кодируемым геном TP53, и делает белок p53 неактивным. В разных случаях инактивированный ген Rb1 инактивирован вирусным белком, например белком E7 HPV. Необязательно белок E7 HPV взаимодействует с белком Rb, кодируемым геном Rb1, и делает белок Rb неактивным. Такие способы сайленсинга известны в уровне техники. См., например, Jiang and Milner, Oncogene 21: 6041-6048 (2002).

[00163] В различных вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способы включают анализирование образца в отношении амплификации

гена, например амплификации CCNE1, или повышения числа копий гена, например увеличения числа копий гена конкретного гена. В разных случаях образец анализируют в отношении увеличения или амплификации гена с помощью методик на основе ДНК или РНК (анализ экспрессии генов [сравнительная геномная гибридизация, гибридизация на основе РНК], NGS, ПЦР или саузерн-блоттинг) или с помощью методик молекулярной цитогенетики (FISH2 с геноспецифичными зондами, CISH (хромогенная гибридизация in situ). В разных аспектах для определения амплификации гена или увеличения числа копий гена проводят конкурентную или количественную ПЦР, геномную гибридизацию с cDNA на микрочипах, гибридизацию и количественное определение генных зондов к РНК. См., например, Harlow and Stewart, Genome Res 3: 163-168 (1993); Heiskanen et. al., Cancer Res 60(4): 799-802 (2000). В разных случаях способ включает анализирование образца в отношении увеличения числа копий гена или амплификации гена MDM2 и/или увеличения числа копий гена, или амплификации, или мутации гена FBXW7. В иллюстративных аспектах способ включает анализирование образца в отношении увеличения числа копий гена или амплификации гена MDM2 и уменьшения уровней белка p53. В иллюстративных аспектах способ включает анализирование образца в отношении мутации в гене FBXW7 и сверхэкспрессии продукта гена, кодируемого геном CCNE1. Секвенирование нового поколения (NGS) также можно использовать в качестве способа, с помощью которого определяют увеличение или потерю числа копий гена или амплификацию гена, посредством которого генные области секвенируют и полученные с помощью сиквенса считывания сравнивают с другими генами с установлением увеличения количества или потери гена, представляющего интерес.

[00164] В иллюстративных аспектах инактивированный ген TP53 (i) предусматривает мутацию, делецию, усечение гена TP53 и/или эпигенетический сайленсинг промотора TP53, (ii) инактивирован вирусным белком или посредством генной амплификации гена MDM2 или (iii) описан комбинацией вышеизложенного. Необязательно вирусный белок представляет собой белок E6 папилломавируса (HPV) человека. В иллюстративных аспектах инактивированный ген Rb1 (i) предусматривает мутацию, делецию, усечение гена Rb1 и/или эпигенетический сайленсинг промотора Rb1, (ii) инактивирован вирусным белком или (iii) описан комбинацией вышеизложенного. Необязательно вирусный белок представляет собой белок E7 папилломавируса (HPV) человека. В иллюстративных аспектах инактивированный ген BRCA (i) предусматривает мутацию, делецию, усечение гена BRCA и/или эпигенетический сайленсинг промотора BRCA. Необязательно ген BRCA представляет собой ген BRCA1. В качестве альтернативы ген BRCA представляет собой ген BRCA2.

[00165] В разных аспектах инактивированный ген TP53, инактивированный ген Rb1, увеличение числа копий или амплификация гена CCNE1 и/или инактивированный ген BRCA присутствуют в зародышевых клетках неопластического заболевания (например, рака). В разных аспектах инактивированный ген TP53, инактивированный ген Rb1, увеличение числа копий или амплификация гена CCNE1 и/или инактивированный

ген BRCA присутствуют в зародышевых клетках неопластического заболевания (например, рака) и отсутствуют в соматических клетках неопластического заболевания (например, рака). Необязательно, вследствие соматических мутаций при неопластическом заболевании соматические клетки неопластического заболевания вернулись к генотипу дикого типа и таким образом в них не проявляется инактивированный ген TP53, инактивированный ген Rb1, увеличение числа копий или амплификация гена CCNE1 и/или инактивированный ген BRCA несмотря на то, что в зародышевых клетках неопластического заболевания все еще демонстрируется наличие инактивированного гена TP53, инактивированного гена Rb1, увеличения числа копий или амплификации гена CCNE1 и/или инактивированного гена BRCA. Например, неопластическое заболевание может представлять собой устойчивый к ингибитору PARP рак, и только зародышевые клетки рака содержат инактивированный ген BRCA1, при этом в соматических клетках рака проявляется восстановленные кодирующий участок и функция BRCA1.

[00166] В иллюстративных случаях стадия анализирования включает цитогенетический способ и/или молекулярный способ определения наличия инактивированного или амплифицированного гена или увеличения числа копий гена, например инактивированного гена TP53, инактивированного гена Rb1, амплифицированного гена CCNE1 или инактивированного гена BRCA. В иллюстративных аспектах стадия анализирования включает прямое секвенирование ДНК, гибридизацию ДНК и/или расщепление с помощью рестрикционных ферментов. Необязательно цитогенетический способ предусматривает кариотипирование, флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH), сравнительную геномную гибридизацию (CGH) или их комбинацию. В разных случаях молекулярный способ предусматривает анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP), амплификационную систему для идентификации мутаций (ARMS), полимеразную цепную реакцию (ПЦР), мультиплексную амплификацию лигированных зондов (MLPA), электрофорез в градиенте денатурирующего геля (DGGE), анализ однонитевого конформационного полиморфизма (SSCP), анализ гетеродуплексов, химическое расщепление ошибочных нуклеотидов (CCM), испытание на усечение белков (PTT), анализ с лигированием олигонуклеотидных зондов (OLA) или их комбинацию. Необязательно, ПЦР представляет собой мультиплексную ПЦР, вложенную ПЦР, RT-PCR или количественную ПЦР в режиме реального времени. В разных аспектах стадия анализирования включает анализирование уровней экспрессии РНК или белка, кодируемых генов TP53, геном Rb1, геном CCNE1 и/или геном BRCA. В разных аспектах стадия анализирования включает ARMS, FISH, IHC или NGS. Такие методики описаны в Su et al., J Experimental Clin Cancer Research 36: 121 (2017) and He et al., Blood 127(24): 3004-3014 (2016). В разных случаях стадия анализирования включает полноэкзомное секвенирование или полногеномное секвенирование. В иллюстративных аспектах анализирование включает жидкую биопсию. Методики жидкой биопсии подробно описаны в уровне техники. См., например, Poulet et al., Acta Cytol 63(6): 449-455 (2019), Chen and Zhao, Hum Genomics 13(1): 34 (2019).

[00167] В разных аспектах увеличение числа копий или амплификация гена приводит к сверхэкспрессированным или повышенным уровням продуктов гена (например, РНК и/или белка), кодируемых геном. Способы определения повышенных уровней РНК и/или белка известны в уровне техники. В иллюстративных аспектах увеличение числа копий гена или амплификация гена CCNE1 приводит к сверхэкспрессированным или повышенным уровням продуктов гена, кодируемых геном CCNE1. В иллюстративных аспектах сверхэкспрессия продукта гена CCNE1 обусловлена мутацией в гене FBXW7. В разных аспектах образец является положительным в отношении сверхэкспрессии продуктов гена CCNE1 и мутации в гене FBXW7.

[00168] В разных случаях способы по настоящему изобретению включают измерение уровня экспрессии гена, с помощью РНК-транскриптов, например матричной РНК (мРНК), или белка в образце (например, образце, содержащем ткань или кровь), полученном от субъекта. В иллюстративных аспектах способов, раскрытых в данном документе, способ включает измерение уровня экспрессии TP53, Rb1, BRCA, CCNE1 или любого продукта гена, кодируемого геном, или любой их комбинации. Подходящие способы определения уровней экспрессии нуклеиновых кислот (например, генов, РНК, мРНК) известны в уровне техники и включают без ограничения количественную полимеразную цепную реакцию (qPCR) (например, количественную ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR)), RNAseq, технологии Nanostring и нозерн-блоттинг. Методики измерения экспрессии генов также включают, например, анализы экспрессии генов с или без применения генных чипов или микрочипов для анализа экспрессии генов описаны в Onken et. al., J Molec Diag 12(4): 461-468 (2010) и Kirby et. al., Adv Clin Chem 44: 247-292 (2007). Генные чипы РНК-чипы от Affymetrix и наборы для анализа экспрессии генов (например, анализы экспрессии генов на основе TaqMan® Applied Biosystems™) также коммерчески доступны от компаний, таких как ThermoFisher Scientific (Уолтем, Массачусетс), и технологии Nanostring (Geiss et. al., Nature Biotechnology 26: 317-325 (2008)). Подходящие способы определения уровней экспрессии белков известны в уровне техники и включают иммуноанализы (например, вестерн-блоттинг, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) и иммуногистохимический анализ) или мультиплексные анализы на основе гранул, например такие, которые описаны в Djoba Siawaya JF, Roberts T, Babb C, Black G, Golakai HJ, Stanley K, et al. (2008) An Evaluation of Commercial Fluorescent Bead-Based Luminex Cytokine Assays. PLoS ONE 3(7): e2535. Известны протеомные анализы, которые представляют собой систематическую идентификацию и количественное определение белков конкретной биологической системы. Масс-спектрометрия, как правило, является применяемой методикой для данной цели.

[00169] В иллюстративных аспектах способ включает измерение уровня комплементарной ДНК (cDNA) на основе РНК, кодируемой указанным геном. Вкратце, способ включает экстрагирование или выделение РНК из образца (например, из опухолевой(опухолевых) клетки(клеток) образца) и синтезирование cDNA на основе РНК,

выделенной из образца. В качестве альтернативы или дополнительно в некоторых аспектах измерение уровня экспрессии включает выделение РНК из образца с получением комплементарной ДНК (cDNA) из РНК, амплифицированием cDNA и гибридизированием cDNA с микрочипами для анализа экспрессии генов. Соответственно, в некоторых аспектах измерение уровня экспрессии включает выделение РНК из образца и количественное определение РНК с помощью RNA-Seq. В альтернативных или дополнительных аспектах уровень экспрессии определяют с помощью иммуногистохимического анализа. В иллюстративных аспектах измерение уровня экспрессии включает приведение образца в контакт со средством, связывающимся с TP53, Rb1, BRCA или CCNE1, или продуктом этих генов, или их комбинацией. В некоторых аспектах связывающие средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах связывающее средство представляет собой зонд на основе нуклеиновой кислоты, специфичный к TP53, Rb1, BRCA или CCNE1, или их РНК-транскрипту, или их комплементарной последовательности.

[00170] Как только уровень экспрессии TP53, Rb1, BRCA или CCNE1 или продукта этих генов измерен в образце, полученном от субъекта, измеренный уровень экспрессии может быть сравнен с эталонном уровнем, нормализованным по гену домашнего хозяйства, математически преобразованным. В иллюстративных случаях измеренный уровень экспрессии TP53, Rb1, BRCA или CCNE1 или продукта этих генов центрируют и масштабируют. Подходящие методики центрирования и масштабирования биологических данных известны в уровне техники. См., например, van den Berg et. al., BMC Genomics 7: 142 (2006).

[00171] Гены TP53, Rb1, CCNE1 и BRCA дикого типа, а также РНК и белки, кодируемые этими генами, известны в уровне техники. Иллюстративные последовательности каждого из них доступны на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и представлены в перечне последовательностей, прикрепленном к данному документу.

ТАБЛИЦА А

Название гена (сокращение, полное)	NCBI, HUGO ID № гена	№ доступа мРНК	SEQ ID NO:	№ доступа белка	SEQ ID NO:
TP53	7157, 11998	NM_000546.6	1	NP_000537.3	2
RB1	5925, 9884	NM_000321.3	3	NP_000312.2	4
CCNE1	898, 1589	NM_001238.4	5	NP_001229.1	6
BRCA1	672, 1100	NM_007294.4	7	NP_009225.1	7
BRCA2	675, 1101	NM_000059.4	9	NP_000050.3	10

[00172] В иллюстративных вариантах осуществления способы включают измерение дополнительных генов, РНК и/или белков, не перечисленных в таблице А. В

иллюстративных вариантах осуществления способы включают измерение уровня экспрессии по меньшей мере одного дополнительного гена, РНК или белка. В иллюстративных случаях способы включают измерение уровня экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или более дополнительных генов, по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или более дополнительных РНК и/или по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или более дополнительных белков в образце. В иллюстративных случаях способы включают измерение уровня экспрессии по меньшей мере 10, 15, 20 или более дополнительных генов, по меньшей мере 10, 15, 20 или более дополнительных РНК и/или по меньшей мере 10, 15, 20 или более дополнительных белков в образце. В иллюстративных случаях способы включают измерение уровня экспрессии по меньшей мере 50, 100, 200 или более дополнительных генов, по меньшей мере 50, 100, 200 или более дополнительных РНК и/или по меньшей мере 50, 100, 200 или более дополнительных белков в образце. В иллюстративных случаях способы включают измерение уровня экспрессии нескольких разных генов, нескольких РНК и/или нескольких белков в дополнение к одному или нескольким перечисленным в таблице А. В иллюстративных аспектах способы включают измерение экспрессии одного или нескольких генов недостаточности по гомологичной рекомбинации (HRD), включающих без ограничения BRCA1, BRCA2, ATM, ATRX, BARD1, BLM, BRIP1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCI, FANCL, FANCM, MRE11, NBN, PALB2, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD52, RAD54L и RPA1 (DR Hodgson et al British Journal of Cancer. 2018;119:1401-9; AL Heeke et al JCO Precis Oncol. 2018;2:1-3). В иллюстративных аспектах способы включают измерение экспрессии одного или нескольких генов кинезина, генов ABC-транспортеров, генов SAC, генов кинетохора, генов EMT, сигнатуры PAM50 (B Wallden et al BMC Medical Genomics. 2015;8(1):54), генов генных сигнатур CIN25/70 (SL Carter et al Nature Genetics. 2006;38(9):1043-8) или их комбинации.

[00173] Стадия анализирования позволяет идентифицировать образец как "положительный" или "отрицательный" в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. Используемый в данном документе термин "положительный" в контексте образца означает, что в образце присутствуют(присутствует) инактивированный ген TP53 и/или (b) по меньшей мере одно из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. Используемый в данном документе термин "отрицательный" в контексте образца означает, что в образце отсутствует(отсутствуют) инактивированный ген TP53 и/или (b) по меньшей мере одно из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их

комбинации, например, образец не содержит инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одно из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

[00174] *Восприимчивость, чувствительность и устойчивость*

[00175] Настоящее изобретение относится к восприимчивости, чувствительности и/или устойчивости к лекарственному средству, например ингибитору KIF18A, ингибитору CDK4/6. В данном документе в настоящем изобретении предусмотрен способ идентификации субъекта с неопластическим заболеванием как чувствительного или восприимчивого к лечению ингибитором KIF18A. В данном документе раскрыт способ определения лечения для субъекта с неопластическим заболеванием, включающий определение чувствительности неопластического заболевания к ингибитору KIF18A или определение чувствительности неопластического заболевания к ингибитору CDK4/6. Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта с неопластическим заболеванием, который устойчив к лечению ингибитором CDK4/6.

[00176] Используемый в данном документе термин "чувствительность" относится к способу реагирования неопластического заболевания (например, рака, опухоли) на лекарственное средство/соединение, например ингибитор KIF18A, ингибитор CDK4/6. В иллюстративных аспектах "чувствительность" означает "восприимчивый к средству лечения" и понятия "чувствительности" и "восприимчивости" связаны положительно в том смысле, что указывается, что неопластическое заболевание (например, опухолевая или раковая клетка), которое является восприимчивым к лечению лекарственным средством/соединением, является чувствительным к этому лекарственному средству. "Чувствительность" в иллюстративных случаях определено в соответствии с Pelikan, Edward, Glossary of Terms and Symbols used in Pharmacology (Pharmacology and Experimental Therapeutics Department Glossary at Boston University School of Medicine) как способность популяции, индивидуума или ткани, относительно способности других, отвечать качественно нормальным образом на конкретную дозу лекарственного средства. Чем меньшая доза необходима для получения эффекта, тем более чувствительным является отвечающая система. "Чувствительность" может быть измерена или описана количественно в пределах точки пересечения кривой доза-эффект с осью значений абсцисс или параллельной ей прямой; такая точка соответствует дозе, конкретно необходимой для получения данной степени эффекта. Аналогично "чувствительность" измеряемой системы определена как самая низкая единица внесения (наименьшая доза), необходимая для получения данной степени конечного результата (эффекта). В иллюстративных аспектах "чувствительность" противоположна "устойчивости", и понятие "устойчивость" отрицательно связано с "чувствительностью". Например, опухоль, которая устойчива к лечению лекарственным средством не является ни чувствительной, ни восприимчивой к этому лекарственному средству или изначально была чувствительна к лекарственному средству и перестает быть чувствительной вследствие приобретения

устойчивости; так что лекарственное средство является не эффективным средством лечения для данной опухолевой или раковой клетки.

[00177] Термин "восприимчивость", используемый в данном документе, относится к степени терапевтического ответа или восприимчивости раковой клетки или опухоли к лекарственному средству/соединению (например, ингибитору KIF18A, ингибитору CDK4/6) или другому лечению (например, лучевой терапии) согласно критериям оценки ответа солидных опухолей (RECIST) или другим подобным критериям. RECIST представляет собой ряд критериев для оценки прогрессирования, стабилизации или восприимчивости опухолей и/или раковых клеток, созданный совместно Национальным институтом рака США, группой, занимающейся клиническими исследованиями, Национального института рака Канады и Европейской организацией по исследованию и лечению рака. В соответствии с RECIST некоторые опухоли измеряют в начале оценивания (например, клинического испытания) с целью предоставления изначального уровня для сравнения после лечения лекарственным средством (например, ингибитором CDK4/6). Оценка ответа и критерии оценки для опухолей опубликованы в Eisenhauer et. al., Eur J Cancer 45:228-247 (2009) and Litière et. al., Journal of Clinical Oncology 37(13): 1102-1110 (2019) DOI: 10.1200/JCO.18.01100. Вкратце, в разделе 4.3 Eisenhauer et. al., 2009 выше сообщаются следующие критерии ответа, подлежащие применению для определения объективного ответа опухоли для целевых очагов.

Тип ответа	**Указывает на:**
Полный ответ (CR)	Исчезновение всех целевых очагов. Любые патологические лимфатические узлы (не важно целевые или не целевые) должны характеризоваться уменьшением по короткой оси до <10 мм.
Частичный ответ (PR)	По меньшей мере 30% снижение суммы диаметров целевых очагов, принимая в качестве эталона сумму диаметров на исходном уровне.
Стабилизация заболевания (SD)	Не наблюдается ни достаточного уменьшения размера для того, чтобы отнести к PR, ни достаточного повышения для того, чтобы отнести к PD, принимая в качестве эталона наименьшую сумму диаметров во время исследования
Прогрессирование заболевания (PD)	По меньшей мере 20% повышения суммы диаметров целевых очагов, принимая в качестве эталона наименьшую суму в ходе исследования (она включает суму на исходном уровне, если она является наименьшей в ходе исследования). В дополнение к

относительному повышению на 20% сумма также должна показывать абсолютное повышение на по меньшей мере 5 мм. (Примечание: появление одного или нескольких новых очагов также считается прогрессированием).

[00178] В идеальных случаях лекарственное средство или другое лечение приводит к CR или PR в качестве наилучшего суммарного ответа с долговременной продолжительностью ответа (DOR). Ответы, представляющие собой SD с короткой DOR или PD, в некоторых аспектах применяют, чтобы продемонстрировать, что лекарственное средство является неэффективным средством лечения рака или что опухоль перестала отвечать на лечение.

[00179] В иллюстративных аспектах восприимчивость соответствует или основывается на уровне клинической пользы (CBR), который определяется как часть пациентов, у которых наилучший суммарный ответ был определен как полный ответ (CR), частичный ответ (PR) или стабилизация заболевания (SD) в течение >16 недель и 24 недель. Необязательно CBR относится к части пациентов, у которых наилучший суммарный ответ был определен как полный ответ (CR), частичный ответ (PR) или стабилизация заболевания (SD) в течение >16 недель и 24 недель, где у пациентов имеется рефрактерный или рецидивирующий рак молочной железы или рак яичника.

[00180] Как понимает специалист в данной области, такие опухоль или раковая клетка считаются такими, которые утратили чувствительность к средству лечения, и/или такими, которые стали устойчивыми к средству лечения.

[00181] В данном документе предусмотрены способы идентификации субъекта с неопластическим заболеванием как чувствительного или восприимчивого к лечению ингибитором KIF18A. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает анализирование образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, где субъект идентифицируется как чувствительный к лечению ингибитором KIF18A, если образец является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает определение чувствительности неопластического заболевания к лечению CDK4/6. В разных аспектах, если неопластическое заболевание является не чувствительным к ингибитору CDK4/6, подразумевается, что неопластическое заболевание чувствительное к ингибитору KIF18A. В разных аспектах предусмотрены способы идентификации субъекта с неопластическим

заболеванием как чувствительного или восприимчивого к лечению ингибитором CDK4/6. В иллюстративных аспектах способ включает определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIA18A. В разных аспектах, если неопластическое заболевание является не чувствительным к ингибитору KIF18A, подразумевается, что неопластическое заболевание чувствительное к ингибитору CDK4/6. В разных аспектах с помощью способов идентифицируют субъекта как такого, у которого вероятно будет достигнут полный ответ при лечении ингибитором KIF18A. В разных аспектах с помощью способов идентифицируют субъекта как такого, у которого вероятно будет достигнут по меньшей мере частичный ответ при лечении ингибитором KIF18A. В разных аспектах с помощью способов идентифицируют субъекта как такого, у которого вероятно не будет проявляться стабилизация заболевания или прогрессирование заболевания при лечении ингибитором KIF18A.

[00182] Без привязки к какой-либо конкретной теории в иллюстративных вариантах осуществления неопластическое заболевание, которое является чувствительным или восприимчивым к ингибитору CDK4/6, не является чувствительным или восприимчивым к ингибитору KIF18A, и неопластическое заболевание, которое является чувствительным или восприимчивым к ингибитору KIF18A, не является чувствительным или восприимчивым к ингибитору CDK4/6. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрен способ определения лечения для субъекта с неопластическим заболеванием, включающий определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIF18A или ингибитором CDK4/6. В разных аспектах, если неопластическое заболевание является нечувствительным к ингибитору CDK4/6, лечение для субъекта определяется как лечение, включающее ингибитор KIF18A, и, если неопластическое заболевание является нечувствительным к ингибитору KIF18A, лечение для субъекта определяется как лечение, включающее ингибитор CDK4/6. Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъекта с неопластическим заболеванием, устойчивым к лечению ингибитором CDK4/6, включающие введение ингибитора KIF18A для лечения пациента, и способы лечения неопластического заболевания у субъекта, который подвергается или подвергался лечению ингибитором CDK4/6, включающие введение субъекту ингибитора KIF18A, при этом необязательно ингибитор KIF18A вводят совместно с ингибитором CDK4/6. Также в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения субъекта с неопластическим заболеванием, устойчивым к лечению ингибитором KIF18A, включающие введение ингибитора CDK4/6 для лечения пациента, и способы лечения неопластического заболевания у субъекта, который подвергается или подвергался лечению ингибитором KIF18A, включающие введение субъекту ингибитора CDK4/6, при этом необязательно ингибитор CDK4/6 вводят совместно с ингибитором KIF18A. Предусмотрены фармацевтические комбинации, содержащий ингибитор CDK4/6 и ингибитор KIF18A.

[00183] В разных случаях раскрытых в данном документе способов способ дополнительно включают определение чувствительности к CDK4/6 или определение

чувствительности к ингибитору KIF18A. В разных случаях способ включает анализирование в отношении чувствительности к ингибитору CDK4/6. В разных аспектах анализирование чувствительности включает измерение или количественное описание в пределах точки пересечения кривой доза-эффект с осью значений абсцисс или параллельной ей прямой; где точка соответствует дозе, конкретно необходимой для получения данной степени эффекта. В разных аспектах анализирование чувствительности включает проведение одного или нескольких из анализа количества ядер, анализа количества центросом, анализа роста и/или анализа регресса опухоли, таких как те, что описаны в данном документе. См., например, примеры 1-4.

[00184] В разных случаях раскрытых в данном документе способов чувствительность к ингибитору CDK4/6 определяется путем анализирования образца, полученного от субъекта, в отношении отсутствия (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 или (iii) их комбинации.

[00185] В данном документе предусмотрены способы поддержания чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором CDK4/6 у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A. В разных аспектах поддерживается по меньшей мере 50% чувствительность к средству лечения. Необязательно поддерживается по меньшей мере или приблизительно 50% повышение, по меньшей мере или приблизительно 60% повышение, по меньшей мере или приблизительно 70% повышение, по меньшей мере или приблизительно 80% повышение, по меньшей мере или приблизительно 90% повышение, по меньшей мере или приблизительно 95% повышение или по меньшей мере или приблизительно 98% повышение, по меньшей мере или приблизительно 100% повышение чувствительности к средству лечения.

[00186] *Дополнительные стадии*

[00187] Касательно способов по настоящему изобретению способы могут включать дополнительные стадии. Например, способ может включать повторение одной или нескольких перечисленных стадий способа. Соответственно, в иллюстративных аспектах способ включает анализирование второго образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, где второй образец получают от субъекта в отличный момент времени относительно времени, в которое от субъекта получали первый образец. В иллюстративных аспектах способ включает анализирование образца, полученного от субъекта, каждый месяц, каждые 2 месяца, каждые 3 месяца, каждые 4 месяца или каждые 6-12 месяцев, где анализирование основывается на другом образце, полученном от того же субъекта.

[00188] В иллюстративных аспектах раскрытый в данном документе способ

дополнительно включает получение образца от субъекта. В разных аспектах образец получают путем сбора крови, проведения афереза, лейкафереза, биопсии или путем сбора мочи.

[00189] В иллюстративных аспектах способ дополнительно включает введение ингибитора KIF18A, как только была определена потребность в нем. Способы введения ингибитора KIF18A субъекту могут быть такими же или подобными, как любые раскрытые в данном документе способы введения фармацевтической комбинации.

[00190] В разных аспектах способ дополнительно включает анализирование образца в отношении активации контрольной точки сборки веретена деления (SAC), наличия аберраций центросомы, многополюсных веретен деления или их комбинации. Подходящие способы анализирования образца в отношении таких характеристик/отличительных признаков описаны в данном документе. См. примеры 5-10.

[00191] Любые и все возможные комбинации стадий, описанных в данном документе, предусмотрены для целей способов по настоящему изобретению.

[00192] *Фармацевтические комбинации*

[00193] В иллюстративных вариантах осуществления ингибитор KIF18A, описанный в данном документе, вводят отдельно, и в альтернативных вариантах осуществления ингибитор KIF18A, описанный в данном документе, вводят в комбинации с другим терапевтическим средством, например другим ингибитором KIF18A, но другого типа (например, другой структуры), или другим терапевтическим средством, которое не ингибирует KIF18A. В иллюстративных аспектах другое терапевтическое средство направлено на лечение или предупреждение неопластического заболевания. В иллюстративных аспектах другое терапевтическое средство представляет собой ингибитор CDK4/6. Соответственно, в данном раскрытии предусмотрены фармацевтические комбинации, содержащие ингибитор KIF18A. Фармацевтическая комбинация содержит ингибитор KIF18A и другое активное средство. В иллюстративных случаях ингибитор KIF18A составлен с другим активным средством, и два активных средства вводятся одновременно. В иллюстративных случаях ингибитор KIF18A не составлен с другим активным средством, и два активных средства могут быть введены по отдельности или вместе. В разных аспектах два активных средства вводятся субъекту последовательно.

[00194] В иллюстративных вариантах осуществления фармацевтическая комбинация содержит ингибитор KIF18A и ингибитор CDK4/6. В разных аспектах ингибитор KIF18A составлен отдельно от ингибитора CDK4/6.

[00195] В разных аспектах фармацевтическая комбинация или ингибитор KIF18A или ингибитор CDK4/6 составлены с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом, включая, например, подкисляющие средства, добавки, адсорбенты, аэрозольные пропелленты, средства для вытеснения воздуха, подщелачивающие средства, противослеживающие средства, антикоагулянты, противомикробные консерванты, антиоксиданты, антисептики, основания, связующие

средства, буферные средства, хелатирующие средства, средства для нанесения покрытий, окрашивающие средства, высушивающие средства, детергенты, разбавители, дезинфицирующие средства, разрыхлители, диспергирующие средства, средства для усиления растворения, красители, смягчающие средства, эмульгирующие средства, стабилизаторы эмульсий, наполнители, пленкообразующие средства, усилители вкуса, ароматизирующие средства, средства, препятствующие слеживанию и комкованию, гелеобразующие средства, гранулирующие средства, увлажняющие вещества, смазывающие вещества, мукоадгезивные средства, основы для мазей, мази, маслянистые среды-носители, органические основания, основы для пастилок, пигменты, пластификаторы, полирующие средства, консерванты, секвестрирующие средства, средства, способствующие проникновению через кожу, солюбилизирующие средства, растворители, стабилизирующие средства, основы для суппозиториев, поверхностно-активные средства, поверхностно-активные вещества, суспендирующие средства, подсластители, терапевтические средства, загустители, средства, регулирующие тоничность, противотоксические средства, средства, повышающие вязкость, водопоглощающие вещества, сорастворители, смешивающиеся с водой, вещества для умягчения воды или смачивающие средства.

[00196] В разных аспектах фармацевтическая комбинация или ингибитор KIF18A или ингибитор CDK4/6 составлены для перорального введения или системного или парентерального введения (например, внутривенного, подкожного, внутримышечного введения). В разных аспектах ингибитор KIF18A составлен для перорального введения. В разных аспектах ингибитор CDK4/6 составлен для перорального введения.

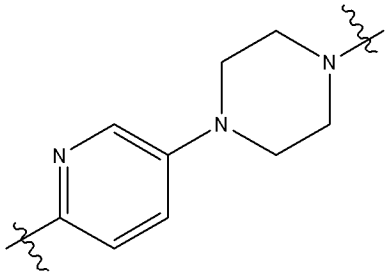
[00197] *Ингибиторы CDK4*/6

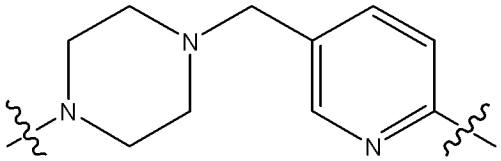
[00198] Используемый в данном документе термин "ингибитор CDK4/6" относится к любому соединению или молекуле, которая целенаправленно воздействует на циклинзависимые киназы, CDK4 и CDK6, и уменьшает или подавляет их ферментативную активность, например киназную активность. В иллюстративных аспектах ингибитор CDK4/6 влияет на CDK4 и CDK6 для стимулирования остановки клеточного цикла. Во время прогрессирования клеточного цикла CDK4 и CDK6 нацеливаются на супрессирующий рост белок, белок ретинобластомы (Rb), для фосфорилирования, и белок Rb инактивируется при фосфорилировании. Когда CDK4 и CDK6 ингибированы ингибиторами CDK4/6, Rb не фосфорилируется (или фосфорилируется в меньшей степени), так что Rb может беспрепятственно обеспечивать свою супрессирующую рост функцию. В иллюстративных вариантах осуществления ингибитор CDK4/6 представляет собой ингибитор серин/треонинкиназы, ингибитор цитохрома P450 (CYP450) 3A или оба. В разных аспектах ингибитор CDK4/6 подавляет фосфорилирование белка ретинобластомы (Rb). В разных аспектах ингибитор CDK4/6 подавляет функцию CYP4503A.

[00199] Уменьшение или ингибирование, обеспечиваемое ингибитором CDK4/6, может не представлять собой 100% или полное ингибирование, или упразднение, или

уменьшение. Напротив, существуют разнящиеся степени уменьшения или ингибирования, которые специалист в данной области распознает как оказывающие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В связи с этим ингибитор CDK4/6 может ингибировать белок(белки) CDK4 и/или CDK6 до любого количества или уровня. В иллюстративных вариантах осуществления уменьшение или ингибирование, обеспечиваемое ингибитором CDK4/6, составляет по меньшей мере или приблизительно 10% уменьшение или ингибирование (например, по меньшей мере или приблизительно 20% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 30% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 40% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 50% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 60% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 70% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 80% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 90% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 95% уменьшение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 98% уменьшение или ингибирование).

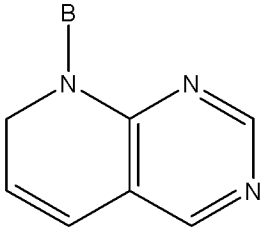
[00200] В иллюстративных аспектах ингибитор CDK4/6 включает структуру:



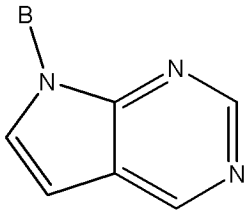


[Структура I] или [Структура II].

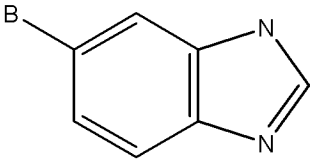
[00201] В разных аспектах ингибитор CDK4/6 включает структуру, представляющую собой структуру I или структуру II, и дополнительно включает структуру A-B, где A предусматривает бициклическую структуру, и B предусматривает моноциклическую структуру. В иллюстративных аспектах A-B включает структуру, представляющую собой структуру III, или структуру IV, или структуру V:



;



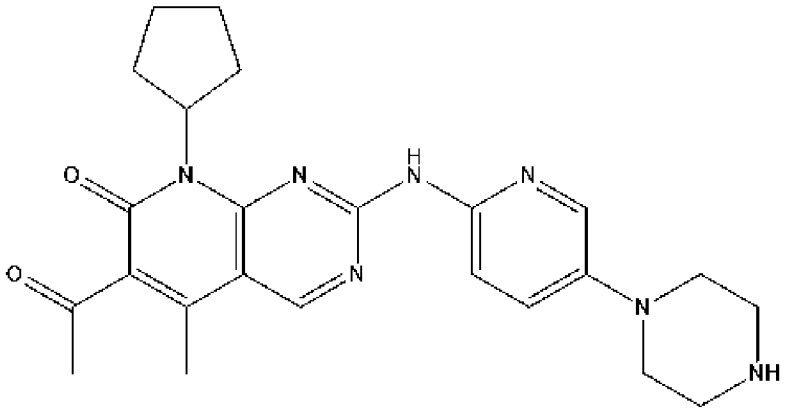
или



[Структура III] [Структура IV] [Структура V].

[00202] В иллюстративных аспектах B в структуре III или IV представляет собой циклопентан. В иллюстративных аспектах B в структуре V предусматривает пиримидин.

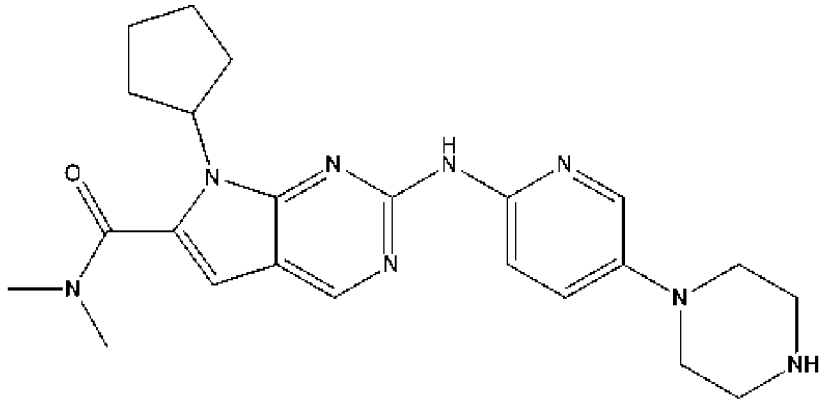
[00203] В разных аспектах ингибитор CDK4/6 содержит структуру:



[палбоциклиб],

или его фармацевтически приемлемой соли.

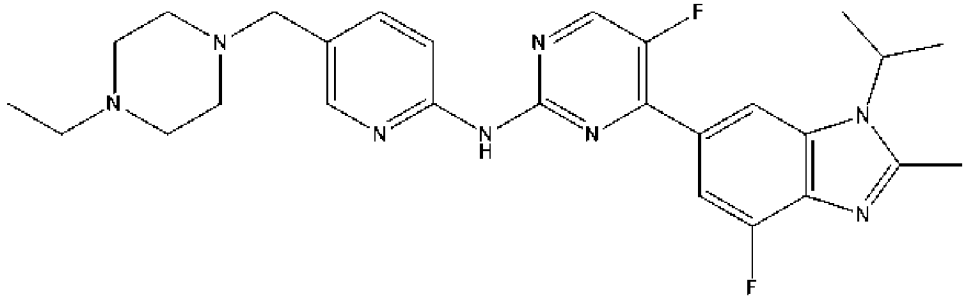
В разных аспектах ингибитор CDK4/6 содержит структуру:



[рибоциклиб],

или его фармацевтически приемлемой соли.

В разных случаях ингибитор CDK4/6 содержит структуру:



[абемациклиб],

или его фармацевтически приемлемой соли.

[00204] *Способы лечения*

[00205] Дополнительно в данном документе предусмотрены способы лечения неопластического заболевания у субъекта.

[00206] Используемый в данном документе термин "лечить", а также слова, родственные ему, не обязательно подразумевают 100% или полное лечение. Напротив, существуют разнящиеся степени лечения, которые специалист в данной области распознает как оказывающие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В

данном отношении способы лечения неопластического заболевания по настоящему изобретению могут обеспечивать любую величину или любой уровень лечения. Кроме того, лечение, предусмотренное способами по настоящему изобретению, может включать лечение одного или нескольких состояний или симптомов или признаков неопластического заболевания, подвергаемого лечению. Также лечение, предусмотренное способами по настоящему изобретению, может охватывать замедление прогрессирования неопластического заболевания. Например, способы могут обеспечивать лечение неопластического заболевания благодаря усилению Т-клеточной активности или иммунного ответа на неопластическое заболевание, уменьшению скорости роста опухоли или рака или опухолевой нагрузки, уменьшению метастазирования опухолевых клеток, усилению гибели клеток опухоли или раковых клеток или усилению регресса опухоли и т. п. В соответствии с вышеуказанным в данном документе предусмотрены способы уменьшения скорости роста опухоли или опухолевой нагрузки или усиления регресса опухоли у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A необязательно в комбинации с ингибитором CDK4/6. В иллюстративных вариантах осуществления субъект подвергается или подвергался лечению ингибитором CDK4/6, и способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A. Термины "лечить", "осуществление лечения" и "лечение", используемые в данном документе, относятся к терапии, включающей без ограничения радикальную терапию, профилактическую терапию и превентивную терапию. Профилактическое лечение, в целом, заключается либо в полном предупреждении возникновения расстройств, либо в отсрочке начала доклинически очевидной стадии расстройств у индивидуумов.

[00207] В разных аспектах способы обеспечивают лечение посредством задержки начала проявления или рецидива неопластического заболевания на по меньшей мере 1 день, 2 дня, 4 дня, 6 дней, 8 дней, 10 дней, 15 дней, 30 дней, два месяца, 3 месяца, 4 месяца, 6 месяца, 1 год, 2 года, 3 года, 4 года или более. В разных аспектах способы обеспечивают лечение посредством усиления выживаемости субъекта. В иллюстративных аспектах способы по настоящему изобретению обеспечивают лечение посредством задержки появления или начала проявления метастазов. В разных случаях способы обеспечивают лечение посредством задержки появления или начала проявления новых метастазов. Соответственно, в данном документе предусмотрены способы задержки появления или начала проявления метастазов у субъекта с раком. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение ингибитора KIF18A субъекту необязательно в комбинации ингибитором CDK4/6.

[00208] В иллюстративных случаях обеспечиваемое лечение может быть описано в терминах или обосновано с помощью данных, полученных из клинического испытания, где конечный результат испытания представляет собой выживание без прогрессирования (PFS), общее выживание (OS) или время до ухудшения показателя общего состояния согласно Восточной объединенная онкологической группе (ECOG). В разных аспектах в

настоящем изобретении предусмотрен способ повышения PFS, OS или времени до ухудшения показателя общего состояния согласно ECOG у субъекта с неопластическим заболеванием. В иллюстративных вариантах осуществления неопластическое заболевание является устойчивым к ингибитору CDK4/6 или характеризуется уменьшенной чувствительностью к нему, и способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A необязательно в комбинации ингибитором CDK4/6. Используемый в данном документе термин "выживание без прогрессирования" или "PFS" означает время, которое проходит для подданного лечению пациента без ухудшения в отношении рака (не важно какая мера применяется для измерения ухудшения). Термин "общее выживание" означает то, насколько долго пациент живет после лечения. Показатель общего состояния согласно ECOG представляет собой ступень или балл в соответствии со шкалой, применяемой врачами и исследователями для оценки заболевания пациента, например того, как прогрессирует/регрессирует заболевание, как заболевание влияет на способность вести повседневный образ жизни пациента, и определяет подходящее лечение и прогноз. Показатель общего состояния согласно ECOG определяется в соответствии со следующими критериями.

Балл	ECOG
0	Полностью активен, способен выполнять всю деятельность, выполняемую до заболевания, без ограничений
1	Ограничен в требующей физических усилий активности, но способен двигаться и выполнять легкую или сидячую работу, например легкую работу по дому, офисную работу
2	Способен двигаться и способен осуществлять все действия по уходу за собой, но неспособен выполнять какою-либо трудовую деятельность. Бодрствует приблизительно более 50% часов бодрствования
3	Способен осуществлять только ограниченные действия по уходу за собой, прикован к постели или креслу более 50% часов бодрствования
4	Полностью недееспособен. Не может выполнять никаких действий по уходу за собой. Полностью прикован к постели или креслу
5	Мертв

Oken et. al., Am. J. Clin. Oncol 5: 649-655 (1982)

[00209] В иллюстративных вариантах осуществления способ лечения субъекта от неопластического заболевания включает введение ингибитора KIF18A субъекту, при этом у субъекта присутствуют клетки, которые являются положительными в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, при этом указанный способ включает введение

ингибитора KIF18A субъекту.

[00210] В иллюстративных вариантах осуществления способ лечения субъекта с неопластическим заболеванием включает (A) анализирование образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, и (B) введение ингибитора KIF18A субъекту, который является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

[00211] В иллюстративных вариантах осуществления неопластическое заболевание является устойчивым к лечению ингибитором CDK4/6, и способ лечения субъекта с таким неопластическим заболеванием включает введение ингибитора KIF18A для лечения пациента.

[00212] В иллюстративных вариантах осуществления субъект подвергается или подвергался лечению ингибитором CDK4/6, и способ лечения такого субъекта включает введение субъекту ингибитора KIF18A, при этом необязательно ингибитор KIF18A вводят совместно с ингибитором CDK4/6.

[00213] В иллюстративных вариантах осуществления способ лечения неопластического заболевания у субъекта включает введение субъекту раскрытой в данном документе фармацевтической комбинации, содержащей ингибитор KIF18A. В иллюстративных случаях фармацевтическая комбинация содержит ингибитор KIF18A и ингибитор CDK4/6.

[00214] В разных аспектах рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительными в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

[00215] В иллюстративных аспектах ингибитор KIF18A вводят субъекту ежедневно (1 раз в день, 2 раза в день, 3 раза в день, 4 раза в день, 5 раз в день, 6 раз в день), три раза в неделю, дважды в неделю, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней, раз в неделю, раз в две недели, каждые три недели, раз в месяц или раз в два месяца. В разных случаях ингибитор CDK вводят субъекту один раз ежедневно. Необязательно ингибитор KIF18A вводят перорально один раз в день.

[00216] Дополнительно в данном документе предусмотрены способы стимулирования или усиления регресса опухоли у субъекта с опухолью. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для стимулирования или усиления

регресса опухоли. В настоящем изобретении также предусмотрены способы уменьшения скорости роста опухоли или скорости роста рака у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для уменьшения опухоли или скорости роста рака. В данном документе предусмотрены способы стимулирования или усиления гибели опухолевых клеток или раковых клеток у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для стимулирования или усиления гибели опухолевых клеток или раковых клеток. В разных аспектах неопластическое заболевание представляет собой рак, необязательно рак молочной железы, рак яичника или рак предстательной железы. В разных случаях неопластическое заболевание представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC), нелюминальный рак молочной железы или низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC). В иллюстративных аспектах неопластическое заболевание представляет собой рак эндометрия, необязательно серозный рак эндометрия. Необязательно рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительными в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессированного продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. В некоторых аспектах рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении мутантного гена TP53. В разных случаях рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении амплифицированного гена CCNE1, подвергшегося сайленсингу BRCA1, дефектного гена Rb1 или их комбинации. Необязательно ингибитор KIF18A вводят путем перорального введения, необязательно один раз в день. В иллюстративных аспектах количество ингибитора KIF18A является эффективным для стимулирования по меньшей мере 50% или по меньшей мере 75% (например, по меньшей мере 80% или 85% или по меньшей мере 90% или 95%) регресса опухоли по сравнению с контролем.

[00217] В иллюстративных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению преимущественно являются высокоспецифичными в отношении клеток неопластического заболевания. В разных аспектах ингибитор KIF18A обеспечивает эффективное лечение неопластического заболевания, стимулирует или усиливает регресс опухоли, уменьшает скорость роста опухоли или рака или стимулирует или усиливает гибель опухолевой или раковой клетки с токсичностью от небольшой до отсутствующей степени для нормальных соматических клеток у субъекта. В разных аспектах ингибитор KIF18A вводят в количестве, эффективном для лечения неопластического заболевания, поддержания чувствительности к лечению ингибитором CDK4/6, стимулирования или повышения регресса опухоли, уменьшения скорости роста опухоли или рака и/или стимулирования или повышения гибели опухолевой или раковой клетки без существенного снижения пролиферации нормальных соматических клеток у субъекта. В иллюстративных случаях ингибитор KIF18A вводят в количестве, эффективном для

лечения неопластического заболевания, поддержания чувствительности к лечению ингибитором CDK4/6, стимулирования или повышения регресса опухоли, уменьшения скорости роста опухоли или рака или стимулирования или повышения гибели опухолевой или раковой клетки без существенного повышения апоптоза нормальных соматических клеток. Используемый в данном документе термин "нормальные" со ссылкой на клетки означает клетки, которые не являются неопластическими и/или подвергшимися заболеванию. В разных аспектах нормальные соматические клетки представляют собой мононуклеарные клетки костного мозга человека. В разных случаях нормальные соматические клетки не характеризуются генетически как $TP53^{MUT}$ или характеризуются генетически как $TP53^{WT}$. В разных аспектах ингибитор KIF18A вызывает не более 25% повышение апоптоза нормальных соматических клеток. В разных аспектах ингибитор KIF18A вызывает не более 25% снижение пролиферации нормальных соматических клеток у субъекта. Необязательно повышение апоптоза нормальных соматических клеток или снижение пролиферации нормальных соматических клеток составляет менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 15%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 9%, менее чем приблизительно 8%, менее чем приблизительно 7%, менее чем приблизительно 6%, менее чем приблизительно 5%, менее чем приблизительно 4%, менее чем приблизительно 3%, менее чем приблизительно 2% или менее чем приблизительно 1%. Способы измерения пролиферации нормальных соматических клеток и/или апоптоза нормальных соматических клеток описаны в данном документе.

[00218] *Неопластическое заболевание*

[00219] Используемый в данном документе термин "неопластическое заболевание" относится к любому состоянию, которое вызывает рост опухоли. В иллюстративных аспектах опухоль представляет собой доброкачественную опухоль. В иллюстративных аспектах опухоль представляет собой злокачественную опухоль. В разных аспектах неопластическое заболевание представляет собой рак. В разных аспектах рак представляет собой острый лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, альвеолярную рабдомиосаркому, рак кости, рак головного мозга, рак молочной железы, рак анального отверстия, рак заднепроходного канала или аноректальный рак, рак глаза, рак внутрипеченочного желчного протока, рак сустава, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, носовой полости или среднего уха, рак ротовой полости, рак вульвы, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный рак, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, лимфому Ходжкина, рак гортанной части глотки, рак почки, рак гортани, рак печени, рак легкого, злокачественную мезотелиому, меланому, множественную миелому, рак носоглотки, неходжкинскую лимфому, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак брюшины, сальника, брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки (например, почечноклеточную карциному (RCC)), рак тонкой кишки, рак мягких тканей, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак мочеточника или

рак мочевого пузыря. В конкретных аспектах рак представляет собой рак головы и шеи, рак яичника, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак пищевода, рак поджелудочной железы, гастроинтестинальный рак, рак желудка, рак молочной железы, рак эндометрия, колоректальный рак, гепатоцеллюлярную карциному, глиобластому, рак мочевого пузыря, рак легкого, например немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), или бронхиолоальвеолярную карциному. В конкретных вариантах осуществления опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак головы и шеи, рак почки, трижды отрицательный рак молочной железы или рак желудка. В иллюстративных аспектах субъект имеет опухоль (например, солидную опухоль, гемобластоз или лимфолейкоз), и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения опухоли у субъекта. В других иллюстративных аспектах опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, рак почки, рак молочной железы, меланому, рак яичника, рак печени, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак предстательной железы, рак желудка, лимфому или лейкоз, и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения опухоли у субъекта.

[00220] Термины "рак" и "раковый", при применении в данном документе, относятся к физиологическому состоянию млекопитающих, которое, как правило, характеризуется неконтролируемым клеточным ростом. Примеры видов рака включают без ограничения карциному, лимфому, саркому, бластому и лейкоз. Более конкретно, примеры таких видов рака включают плоскоклеточную карциному, рак легкого, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки и рак головы и шеи, рак яичника и рак эндометрия. При этом термин "рак", используемый в данном документе, не ограничивается любой одной конкретной формой заболевания, полагают, что способы по настоящему изобретению будут, в частности, эффективны в отношении видов рака, которые, как обнаружено, сопровождаются неконтролируемыми уровнями KIF18A или зависят от KIF18A в отношении правильной сегрегации хромосом и выживания у млекопитающего.

[00221] В разных аспектах рак является метастатическим, опухоль является неоперабельной или применяется их комбинация. В разных аспектах неопластическое заболевание является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1, увеличения числа копий гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации. В разных аспектах неопластическое заболевание представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC), нелюминальный рак молочной железы (например, базальноподобный мезенхимальный) или низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC). В разных аспектах неопластическое заболевание является устойчивым или не является чувствительным (нечувствительное) к лечению ингибитором CDK4/6. В разных аспектах неопластическое заболевание является

устойчивым или не является чувствительным (нечувствительное) к лечению ингибитором CDK4/6 и достаточное по Rb1 (в отличие от дефектного по Rb1). В разных аспектах неопластическое заболевание является устойчивым к лечению ингибитором KIF18A. В разных аспектах неопластическое заболевание является устойчивым к лечению ингибитором KIF18A и дефектным по Rb1 (в отличие от достаточного по Rb1).

[00222] В иллюстративных аспектах неопластическое заболевание представляет собой рак молочной железы, необязательно люминальный рак молочной железы или TNBC. В разных аспектах было гистологически или цитологически подтверждено, что рак молочной железы является (a) метастатическим или локально рецидивирующим отрицательным по эстрогеновым рецепторам (ER) (например, <1% согласно иммуногистохимическому исследованию [IHC]), (b) отрицательным по прогестероновым рецепторам (PR) (например, <1% согласно IHC) и (c) отрицательным по рецептору эпидермального фактора роста человека 2 (Her2) (отрицательный либо согласно флуоресцентной гибридизации in situ [FISH], 0 или 1+ согласно IHC, либо IHC2+ и отрицательный согласно FISH в соответствии с определением ASCO/CAP). В иллюстративных аспектах неопластическое заболевание является рецидивирующим и/или рефрактерным в отношении по меньшей мере одной линии системной химиотерапии при терапии метастатических форм рака или непереносящим существующий(существующие) вид(виды) терапии, которые, как известно, обеспечивают клиническую пользу при неопластическом заболевании. В иллюстративных случаях рак поддавали лечению ингибитором контрольной точки иммунного ответа. В разных случаях рак молочной железы является положительным по рецепторам гормонов (HR) и/или отрицательным по HER2. В разных аспектах рак молочной железы представляет собой распространенный рак молочной железы и/или метастатический рак молочной железы. В разных аспектах рак молочной железы представляет собой HR+/HER2- распространенный или метастатический рак молочной железы, который развился после эндокринной терапии. В некоторых аспектах рак молочной железы представляет собой положительный по рецепторам гормонов (HR+)/отрицательный по HER2 (HER2-) распространенный или метастатический рак молочной железы, ранее подданный лечению с помощью эндокринной терапии и с помощью химиотерапии после распространения/метастазирования рака. В разных случаях рак представляет собой HR+/HER2- распространенный или метастатический рак молочной железы, который не поддавался лечению с помощью гормональной терапии (Arimidex (химическое название: анастрозол), Aromasin (химическое название: эксеместан) и Femara (химическое название: летрозол)). В разных случаях рак молочной железы представляет собой HR+/HER2- распространенный или метастатический рак молочной железы, который увеличился в размерах после лечения с помощью гормональной терапии. В разных случаях рак молочной железы представляет собой HER2-положительный рак молочной железы, включающий без ограничения такой, который аналогичный HER2-положительным раковым клетках молочной железы в таблице 2. Необязательно рак молочной железы

представляет собой HER2-положительный, отрицательный по эстрогеновым рецепторам (ER) рак молочной железы. В разных аспектах неопластическое заболевание представляет собой рак яичника, необязательно низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC). Необязательно рак яичника представляет собой устойчивый к платине HGSOC. В иллюстративных аспектах рак яичника представляет собой первичный перитонеальный рак или рак фаллопиевой трубы. В разных аспектах неопластическое заболевание представляет собой метастатический или неоперабельный HGSOC с устойчивостью к платине, определенной в виде прогрессирования во время или в пределах 6 месяцев схемы лечения, включающей платину. В разных аспектах рак яичника поддавался или поддается лечению с помощью терапии для платиноустойчивого рецидива. В разных аспектах неопластическое заболевание представляет собой серозный рак эндометрия. Необязательно неопластическое заболевание представляет собой метастатический или рецидивирующий серозный рак эндометрия. В разных случаях рак эндометрия является рецидивирующим и/или рефрактерным в отношении по меньшей мере одной линии системной терапии при терапии метастатических/рецидивирующих форм рака или непереносящим существующий(существующие) вид(виды) терапии, которые, как известно, обеспечивают клиническую пользу при неопластическом заболевании. В разных случаях неопластическое заболевание представляет собой распространенную или метастатическую солидную опухоль, которая является неоперабельной и рецидивирующей и/или рефрактерной в отношении по меньшей мере одной линии системной химиотерапии или непереносящей ее. Необязательно распространенная или метастатическая солидная опухоль характеризуется $TP53^{MUT}$.

[00223] В разных случаях неопластическое заболевание является устойчивым к лечению одним или несколькими лекарственными средствами. В разных аспектах неопластическое заболевание проявляет уменьшенную чувствительность к лечению одним или несколькими лекарственными средствами. Необязательно неопластическое заболевание представляет собой неопластическое заболевание с множественной лекарственной устойчивостью. В иллюстративных случаях опухолевые или раковые клетки (например, неопластического заболевания) представляют собой опухолевые или раковые клетки с множественной лекарственной устойчивостью, и/или у них проявляется повышенная экспрессия гена множественной лекарственной устойчивости 1 (MDR-1) и/или продукта этого гена. В иллюстративных случаях в опухолевых или раковых клетках (например, неопластического заболевания) проявляется повышенная экспрессия P-гликопротеина (P-gp), кодируемого геном MDR-1. В разных аспектах при неопластическом заболевании проявляется уменьшенная чувствительность или устойчивость к лечению подавляющим митоз средством или антрациклиновым антибиотиком, необязательно паклитакселом или доксорубицином. В разных аспектах в опухолевых или раковых клетках (например, неопластического заболевания) проявляются мутации в гене тубулина, сверхэкспрессия тубулина, амплификация тубулина и/или экспрессия тубулина с переключенным изотипом. В разных аспектах мутации в α- или β-

тубулине подавляют связывание таксанов с правильным участком на микротрубочках, тем самым делая таксан неэффективным. В иллюстративных аспектах при неопластическом заболевании проявляется уменьшенная чувствительность или устойчивость к лечению любым одним или несколькими средствами на основе платины, антрациклином, целенаправленно воздействующим средством терапии (например, ингибиторами TKI, PARP).

[00224] В разных аспектах неопластическое заболевание представляет собой рак, включающий одну или несколько полногеномных дупликаций или событий удвоения полного генома (WGD). WGD в контексте рака рассмотрено в Lens and Hemdema, Nature Reviews Cancer 19: 32-45 (2019); Ganem et. al., Current Opinion in Genetics & Development 17, 157-162 и Davoli et. al., Annual Review of Cell and Developmental Biology 27, 585-610.

[00225] *Субъекты*

[00226] В иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения субъект является млекопитающим, включающим без ограничения млекопитающих из отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих из отряда Lagomorpha, таких как кролики, млекопитающих из отряда Carnivora, в том числе кошачьих (кошек) и псовых (собак), млекопитающих из отряда Artiodactyla, в том числе бычьих (коров) и свиных (свиней), или отряда Perissodactyla, в том числе лошадиных (лошадей). В некоторых аспектах млекопитающие относятся к отряду Приматы, Цепкохвостые обезьяны или Обезьянообразные (нечеловекообразные обезьяны) или к отряду Человекообразные (люди и человекообразные обезьяны). В некоторых аспектах млекопитающее является человеком. В разных аспектах у субъекта имеется неопластическое заболевание, например любое из тех, которые описаны в данном документе. Термин "пациент", "субъект" или "млекопитающее", используемый в данном документе, относится к любому "пациенту", "субъекту" или "млекопитающему", в том числе людям, коровам, лошадям, собакам и кошкам. В одном варианте осуществления настоящего изобретения млекопитающее является человеком.

[00227] В иллюстративных аспектах у субъекта имеется рак с метастазами, неоперабельная опухоль или их комбинация. В разных аспектах в раке или опухоли проявляется или проявлялась устойчивость или уменьшенная чувствительность к лечению ингибитором CDK4/6. В иллюстративных аспектах у субъекта имеется рак молочной железы, необязательно люминальный рак молочной железы или трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC). В разных аспектах было гистологически или цитологически подтверждено, что рак молочной железы является (a) метастатическим или локально рецидивирующим отрицательным по эстрогеновым рецепторам (ER) (например, <1% согласно иммуногистохимическому исследованию [IHC]), (b) отрицательным по прогестероновым рецепторам (PR) (например, <1% согласно IHC) и (c) отрицательным по рецептору эпидермального фактора роста человека 2 (Her2) (отрицательный либо согласно флуоресцентной гибридизации in situ [FISH], 0 или 1+ согласно IHC, либо IHC2+ и отрицательный согласно FISH в соответствии с определением ASCO/CAP). В

иллюстративных аспектах субъект является рецидивирующим и/или рефрактерным в отношении по меньшей мере одной линии системной химиотерапии при терапии метастатических форм рака или непереносящим существующий(существующие) вид(виды) терапии, которые, как известно, обеспечивают клиническую пользу при его состоянии. В иллюстративных случаях субъект ранее поддавался воздействию ингибитора контрольной точки иммунного ответа. В разных случаях рак молочной железы является положительным по рецепторам гормонов (HR) и/или отрицательным по HER2. В разных аспектах рак молочной железы представляет собой распространенный рак молочной железы и/или метастатический рак молочной железы. В разных аспектах у субъекта имеется HR+/HER2- распространенный или метастатический рак молочной железы, который развился после получения эндокринной терапии. В некоторых аспектах субъект представляет собой пациента с положительным по рецепторам гормонов (HR+)/отрицательным по HER2 (HER2-) распространенным или метастатическим раком молочной железы, ранее поддававшегося лечению с помощью эндокринной терапии и с помощью химиотерапии после распространения/метастазирования рака. В разных случаях у субъекта имеется HR+/HER2- распространенный или метастатический рак молочной железы, который раньше не поддавался лечению с помощью гормональной терапии для женщин в периоде постменопаузы (Arimidex (химическое название: анастрозол), Aromasin (химическое название: эксеместан) и Femara (химическое название: летрозол)). В разных случаях субъект представляет собой женщину в периоде постменопаузы с HR+/HER2- распространенным или метастатическим раком молочной железы, который увеличился в размерах после лечения с помощью гормональной терапии. В определенных аспектах субъект представляет собой женщину в периоде пре/перименопаузы или постменопаузы с HR+, отрицательным по рецептору эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), распространенным или метастатическим раком молочной железы и получал терапию на основе гормонов. Необязательно субъект представляет собой женщину в периоде постменопаузы с HR+, HER2- распространенным или метастатическим раком молочной железы и получал исходную терапию на основе гормонов или характеризовался прогрессированием заболевания при лечении с помощью эндокринной терапии. В разных аспектах у субъекта имеется рак яичника, необязательно низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC). Необязательно рак яичника представляет собой устойчивый к платине HGSOC. В иллюстративных аспектах у субъекта имеется первичный перитонеальный рак и/или рак фаллопиевой трубы. В разных аспектах у субъекта имеется гистологически или цитологически подтвержденный диагноз метастатического или неоперабельного HGSOC с устойчивостью к платине, определенной в виде прогрессирования во время или в пределах 6 месяцев схемы лечения, включающей платину. В разных аспектах у субъекта имеется рак яичника, и он получал или получает терапию для платиноустойчивого рецидива. В разных аспектах у субъекта имеется серозный рак эндометрия. Необязательно у субъекта имеется гистологически или цитологически подтвержденный диагноз метастатического или рецидивирующего

серозного рака эндометрия. В разных случаях субъект является рецидивирующим и/или рефрактерным в отношении по меньшей мере одной линии системной терапии при терапии метастатических/рецидивирующих форм рака или непереносящим существующий(существующие) вид(виды) терапии, которые, как известно, обеспечивают клиническую пользу при его состоянии. В разных случаях у субъекта имеется распространенная или метастатическая солидная опухоль, которая является неоперабельной и рецидивирующей и/или рефрактерной в отношении по меньшей мере одной линии системной химиотерапии или непереносящей ее. Необязательно распространенная или метастатическая солидная опухоль характеризуется $TP53^{MUT}$.

[00228] В иллюстративных аспектах у субъекта нет ничего из следующего: (a) активные метастазы в головном мозге, (b) первичная опухоль центральной нервной системы (ЦНС), гемобластоз или лимфома, (c) неконтролируемый(неконтролируемые) плевральный(плевральные) выпот(выпоты), перикардиальный выпот или асцит, (d) заболевание желудочно-кишечного (GI) тракта, обуславливающее неспособность принимать пероральный лекарственный препарат.

[00229] *Образцы*

[00230] Касательно способов, раскрытых в данном документе, образец включает биологическую жидкость, включая без ограничения кровь, плазму крови, сыворотку крови, лимфу, материнское молоко, слюну, слизь, семенную жидкость, влагалищные выделения, клеточные экстракты, жидкости, появляющиеся при воспалении, спинномозговую жидкость, кал, жидкую часть стекловидного тела, пунктат костного мозга, жидкость из брюшной полости (например, злокачественный асцит) или мочу, полученные от субъекта. В иллюстративных аспектах образец представляет собой композитную панель из по меньшей мере двух вышеуказанных образцов. В некоторых аспектах образец представляет собой композитную панель из по меньшей мере двух из образца крови, образца плазмы крови, образца сыворотки крови и образца мочи. В иллюстративных аспектах образец содержит кровь или ее фракцию (например, плазму крови, сыворотку крови, фракцию, полученную с помощью лейкоцитофереза). В разных аспектах образец содержит раковые клетки, опухолевые клетки, клетки, отличные от опухолевых, кровь, клетки крови или плазму крови. В иллюстративных случаях образец содержит ДНК без содержания клеток (cfDNA). В иллюстративных случаях образец содержит зародышевые клетки неопластического заболевания (например, рака). В иллюстративных случаях образец содержит соматические клетки неопластического заболевания (например, рака).

[00231] *Контроли*

[00232] В способах, описанных в данном документе, определяемый уровень может быть таким же как контрольный уровень, или отсекающий уровень, или пороговый уровень, или может быть повышен или снижен относительно контрольного уровня, отсекающего уровня или порогового уровня. В некоторых аспектах контрольный субъект представляет собой аналогичного контрольного субъекта того же вида, пола, этической

принадлежности, возрастной группы, курительного статуса, BMI, статуса текущей схемы лечения, с такой же историей болезни или комбинацией вышеперечисленного, но который отличается от субъекта, который поддается диагностированию, тем, что контроль не страдает от рассматриваемого заболевания или не находится в группе риска развития заболевания.

[00233] Относительно контрольного уровня определяемый уровень может представлять собой повышенный уровень. Используемый в данном документе термин "повышенный" по отношению к уровню (например, уровню экспрессии, уровню биологической активности) относится к любому % повышения выше контрольного уровня. Повышенный уровень может представлять собой по меньшей мере или приблизительно 5% повышение, по меньшей мере или приблизительно 10% повышение, по меньшей мере или приблизительно 15% повышение, по меньшей мере или приблизительно 20% повышение, по меньшей мере или приблизительно 25% повышение, по меньшей мере или приблизительно 30% повышение, по меньшей мере или приблизительно 35% повышение, по меньшей мере или приблизительно 40% повышение, по меньшей мере или приблизительно 45% повышение, по меньшей мере или приблизительно 50% повышение, по меньшей мере или приблизительно 55% повышение, по меньшей мере или приблизительно 60% повышение, по меньшей мере или приблизительно 65% повышение, по меньшей мере или приблизительно 70% повышение, по меньшей мере или приблизительно 75% повышение, по меньшей мере или приблизительно 80% повышение, по меньшей мере или приблизительно 85% повышение, по меньшей мере или приблизительно 90% повышение, по меньшей мере или приблизительно 95% повышение относительно контрольного уровня.

[00234] Относительно контрольного уровня определяемый уровень может представлять собой сниженный уровень. Используемый в данном документе термин "сниженный" по отношению к уровню (например, уровню экспрессии, уровню биологической активности) относится к любому % снижения ниже контрольного уровня. Сниженный уровень может представлять собой по меньшей мере или приблизительно 5% снижение, по меньшей мере или приблизительно 10% снижение, по меньшей мере или приблизительно 15% снижение, по меньшей мере или приблизительно 20% снижение, по меньшей мере или приблизительно 25% снижение, по меньшей мере или приблизительно 30% снижение, по меньшей мере или приблизительно 35% снижение, по меньшей мере или приблизительно 40% снижение, по меньшей мере или приблизительно 45% снижение, по меньшей мере или приблизительно 50% снижение, по меньшей мере или приблизительно 55% снижение, по меньшей мере или приблизительно 60% снижение, по меньшей мере или приблизительно 65% снижение, по меньшей мере или приблизительно 70% снижение, по меньшей мере или приблизительно 75% снижение, по меньшей мере или приблизительно 80% снижение, по меньшей мере или приблизительно 85% снижение, по меньшей мере или приблизительно 90% снижение, по меньшей мере или приблизительно 95% снижение относительно контрольного уровня.

[00235] *Иллюстративные варианты осуществления*

[00236] Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения включают без ограничения следующее.

E1. Способ определения лечения для субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из анализирования образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, где лечение, определенное для субъекта, включает, по сути состоит или состоит из ингибитора KIF18A, если образец является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

E2. Способ лечения субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из (A) анализирования образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 , (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, и (B) введения ингибитора KIF18A субъекту, который является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 , (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, при этом необязательно способ дополнительно включает получение образца от субъекта.

E3. Способ лечения субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, где у субъекта присутствуют клетки, которые являются положительными в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 , (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из введения ингибитора KIF18A субъекту.

E4. Способ идентификации субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание как чувствительного к лечению ингибитором KIF18A, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из анализирования образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, где субъект идентифицируется как чувствительный к лечению ингибитором

KIF18A, если образец является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

E5. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где инактивированный ген TP53 (i) предусматривает мутацию, делецию, усечение гена TP53 и/или эпигенетический сайленсинг промотора TP53, (ii) инактивирован вирусным белком или посредством генной амплификации гена MDM2 или (iii) описан комбинацией вышеизложенного.

E6. Способ по варианту осуществления E5, где вирусный белок представляет собой белок E6 папилломавируса (HPV) человека.

E7. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где инактивированный ген Rb1 (i) предусматривает мутацию, делецию, усечение гена Rb1 и/или эпигенетический сайленсинг промотора Rb1, (ii) инактивирован вирусным белком или (iii) описан комбинацией вышеизложенного.

E8. Способ по варианту осуществления E7, где вирусный белок представляет собой белок E7 папилломавируса (HPV) человека.

E9. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где сверхэкспрессия продукта гена CCNE1 обусловлена мутацией в гене FBXw7.

E10. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где инактивированный ген BRCA (i) предусматривает мутацию, делецию, усечение гена BRCA и/или эпигенетический сайленсинг промотора BRCA.

E11. Способ по варианту осуществления E10, где ген BRCA представляет собой ген BRCA1.

E12. Способ по варианту осуществления E10, где ген BRCA представляет собой ген BRCA2.

E13. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, дополнительно включающий определение чувствительности к ингибитору CDK4/6 клеток из образца, необязательно анализирование в отношении чувствительности к ингибитору CDK4/6.

E14. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где стадия анализирования включает цитогенетический способ и/или молекулярный способ определения наличия инактивированного гена TP53, инактивированного гена Rb1, амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 или инактивированного гена BRCA.

E15. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где стадия анализирования включает прямое секвенирование, гибридизацию ДНК и/или расщепление рестрикционными ферментами.

E16. Способ по варианту осуществления E14, где цитогенетический способ предусматривает кариотипирование, флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH), сравнительную геномную гибридизацию (CGH) или их комбинацию

E17. Способ по варианту осуществления E14, где молекулярный способ предусматривает анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP), амплификационную систему для идентификации мутаций (ARMS), полимеразную цепную реакцию (ПЦР), мультиплексную амплификацию лигированных зондов (MLPA), электрофорез в градиенте денатурирующего геля (DGGE), анализ однонитевого конформационного полиморфизма (SSCP), анализ гетеродуплексов, химическое расщепление ошибочных нуклеотидов (CCM), испытание на усечение белков (PTT), анализ с лигированием олигонуклеотидных зондов (OLA) или их комбинацию.

E18. Способ по варианту осуществления E17, где ПЦР представляет собой мультиплексную ПЦР, вложенную ПЦР, RT-PCR или ПЦР в режиме реального времени.

E19. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где стадия анализирования включает анализирование уровней экспрессии РНК или белка, кодируемых генов TP53, геном Rb1, геном CCNE1 и/или геном BRCA.

E20. Способ определения лечения для субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из определения чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором CDK4/6, где лечение для субъекта определяется как лечение, включающее ингибитор KIF18A, если неопластическое заболевание является нечувствительным к ингибитору CDK4/6.

E21. Способ определения лечения для субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из определения чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIF18A, где лечение для субъекта определяется как лечение, включающее, по сути состоящее или состоящее из ингибитора CDK4/6, если неопластическое заболевание является нечувствительным к ингибитору KIF18A.

E22. Способ лечения субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, устойчивое к лечению ингибитором CDK4/6, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из введения ингибитора KIF18A для лечения пациента.

E23. Способ лечения неопластического заболевания у субъекта, который подвергается или подвергался лечению ингибитором CDK4/6, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из введения субъекту ингибитора KIF18A, при этом необязательно ингибитор KIF18A вводят совместно с ингибитором CDK4/6.

E24. Способ поддержания чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором CDK4/6 у субъекта, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из введения субъекту ингибитора KIF18A.

E25. Способ идентификации субъекта, у которого имеется рак, как восприимчивого к лечению ингибитором KIF18A, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из определения чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIF18A, где субъект идентифицируется как восприимчивый к лечению ингибитором KIF18A, если раковые клетки из образца нечувствительны к ингибитору

CDK4/6.

E26. Способ по любому из вариантов осуществления E20 - E25, где чувствительность к ингибитору CDK4/6 определяется путем анализирования образца, полученного от субъекта, в отношении отсутствия (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 или (iii) их комбинации.

E27. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где образец содержит раковые клетки, опухолевые клетки, клетки, отличные от опухолевых, кровь, клетки крови или плазму крови, при этом необязательно образец содержит зародышевые раковые клетки или соматические раковые клетки.

E28. Способ по варианту осуществления E27, где образец содержит ДНК без содержания клеток (cfDNA).

E29. Фармацевтическая комбинация, содержащая, по сути состоящая или состоящая из ингибитора CDK4/6 и ингибитора KIF18A.

E30. Способ или фармацевтическая комбинация по любому из вариантов осуществления E20 - E29, где ингибитор CDK4/6 представляет собой палбоциклиб, рибоциклиб и/или абемациклиб.

E31. Способ по любому из вариантов осуществления E23, E27, E28 и E30, где ингибитор KIF18A и ингибитор CDK4/6 вводят субъекту по отдельности.

E32. Способ по любому из вариантов осуществления E23, E27, E28, E30 и E31, где ингибитор KIF18A составлен и/или упакован отдельно от ингибитора CDK4/6.

E33. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где неопластическое заболевание представляет собой рак, необязательно рак молочной железы.

E34. Способ по варианту осуществления E33, где рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительными в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессированного продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

E35. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где неопластическое заболевание представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC), нелюминальный рак молочной железы или низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC).

E36. Способ или фармацевтическая комбинация по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A вводят путем перорального введения, необязательно один раз в день.

E37. Способ лечения субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из введения субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для лечения неопластического заболевания.

E38. Способ стимулирования или усиления регресса опухоли у субъекта с опухолью, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из введения субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для стимулирования или усиления регресса опухоли.

E39. Способ уменьшения скорости роста опухоли или рака у субъекта с опухолью, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из введения субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для уменьшения скорости роста опухоли или рака.

E40. Способ стимулирования или усиления гибели опухолевых или раковых клеток у субъекта, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из введения субъекту ингибитора KIF18A в количестве, эффективном для стимулирования или усиления гибели опухолевых или раковых клеток.

E41. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где неопластическое заболевание представляет собой рак, необязательно рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак легкого или рак предстательной железы.

E42. Способ по варианту осуществления E41, где неопластическое заболевание представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC), нелюминальный рак молочной железы или низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC).

E43. Способ по варианту осуществления E42, где неопластическое заболевание представляет собой TNBC.

E44. Способ по варианту осуществления E42, где неопластическое заболевание представляет собой нелюминальный рак молочной железы.

E45. Способ по варианту осуществления E42, где неопластическое заболевание представляет собой HGSOC.

E46. Способ по варианту осуществления E41, где неопластическое заболевание представляет собой рак эндометрия, необязательно серозный рак эндометрия.

E47. Способ по любому из вариантов осуществления E41 - E46, где рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительными в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессированного продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

E48. Способ по варианту осуществления E47, где рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении мутантного гена TP53.

E49. Способ по варианту осуществления E47 или E48, где рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении амплифицированного гена CCNE1, подвергшегося сайленсингу гена BRCA1, дефектного гена Rb1 или их комбинации.

E50. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A вводят путем перорального введения, необязательно один раз в день.

E51. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где количество

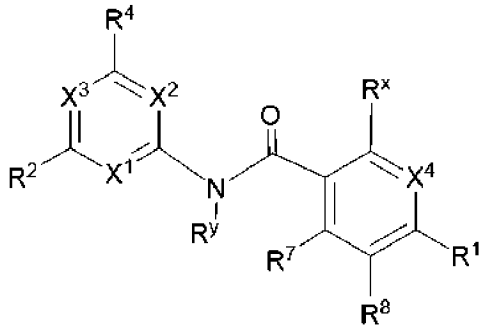
ингибитора KIF18A является эффективным для стимулирования по меньшей мере 50% регресса опухоли по сравнению с контролем.

E52. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где количество ингибитора KIF18A является эффективным для стимулирования по меньшей мере 75% регресса опухоли по сравнению с контролем.

E53. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где количество ингибитора KIF18A является эффективным для стимулирования по меньшей мере 80% или 85% регресса опухоли по сравнению с контролем.

E54. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где количество ингибитора KIF18A является эффективным для стимулирования по меньшей мере 90% или 95% регресса опухоли по сравнению с контролем.

E55. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I),



(I);

или его любую фармацевтически приемлемую соль, где

X^1 представляет собой N или $-CR^6$;

X^2 представляет собой N или $-CR^5$;

X^3 представляет собой N или $-CR^3$;

X^4 представляет собой N или $-CR^9$;

где 0, 1 или 2 из X^1, X^2, X^3 и X^4 представляют собой N;

R^1 представляет собой -CN или группу $-Z-R^{12}$, где Z представляет собой $-C_{0-4}$алк-, $-NR^{11}-$, $-NR^{11}SO_2-$, $-SO_2NR^{11}-$, $-NR^{11}-S(=O)(=NH)$, -S(=O)(=NH)-, -S-, -S(=O)-, $-SO_2-$, C_{0-4}алк-O-, -(C=O)-, $-(C=O)NR^{11}-$, -C=N(OH)- или $-NR^{11}(C=O)$; или

группа $-Z-R^{12}$ представляет собой $-N=S(=O)-(R^{12})_2$, где два R^{12} в паре в качестве альтернативы могут быть объединены с атомом серы, присоединенным к каждому из них, с образованием насыщенного или частично насыщенного 3-, 4-, 5- или 6-членного моноциклического кольца, содержащего 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранных из O и S;

R^2 представляет собой галоген или группу $-Y-R^{13}$, где Y представляет собой $-C_{0-4}$алк-, $-N(C_{0-1}$алк$)-C_{0-4}$алк-, $-C(=O)NR^aR^a(C_{1-4}$алк$)$, $-O-C_{0-4}$алк-, S, S=O, $S(=O)_2$, $-SO_2NR^{13}$ или -S(=O)(=NH)-;

R^3 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^4 представляет собой H, галоген, R^{4a} или R^{4b};

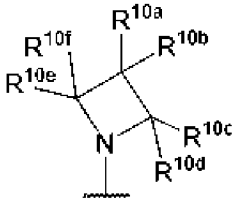
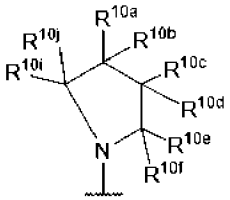
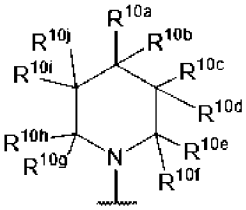
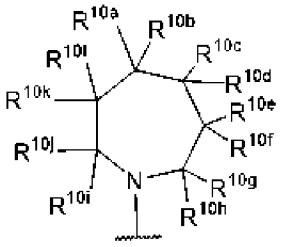
R^5 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^6 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк, C_{1-4}галогеналк, -O-C_{1-8}алк или -O-R^{6a}; где R^{6a} представляет собой насыщенное или частично насыщенное 3-, 4-, 5- или 6-членное моноциклическое кольцо, содержащее 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранных из атомов O и S;

R^7 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^8 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк, C_{1-4}галогеналк, -OH, -O-R^{8a} или -O-R^{8b};

R^9 представляет собой H, галоген, C_{1-8}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^x івыбран из группы, состоящей из  ,  ,  , и  ;

каждый из R^{10a}, R^{10b}, R^{10c}, R^{10d}, R^{10e}, R^{10f}, R^{10g}, R^{10h}, R^{10i} и R^{10j} представляет собой H, галоген, R^{10k} или R^{10l};

или в качестве альтернативы каждая из пары R^{10a} и R^{10b}, пары R^{10c} и R^{10d}, пары R^{10e} и R^{10f}, пары R^{10g} и R^{10h} или пары R^{10i} и R^{10j} может быть независимо объединена с атомом углерода, присоединенным к каждой из них, с образованием насыщенного или частично насыщенного 3-, 4-, 5-, 6-членного моноциклического спиро-кольца с кольцом R^x; где указанное 3-, 4-, 5-, 6-членное моноциклическое кольцо содержит 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранных из атомов O и S, и дополнительно где указанное 3-, 4-, 5-, 6-членное моноциклическое кольцо замещено 0, 1, 2 или 3 группами, выбранными из F, Cl, Br, C_{1-6}алк, C_{1-4}галогеналк, -OR^a, -OC_{1-4}галогеналк, CN, -NR^aR^a или оксо;

R^y представляет собой H, C_{1-4}алк или C_{1-4}галогеналк;

R^{11} представляет собой H, R^{11a} или R^{11b};

R^{12} представляет собой H, R^{12a} или R^{12b};

R^{13} представляет собой R^{13a} или R^{13b};

в каждом случае R^{4a}, R^{8a}, R^{10k}, R^{11a}, R^{12a} и R^{13a} независимо выбраны из группы, состоящей из насыщенного, частично-насыщенного или ненасыщенного 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членного моноциклического или 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11- или 12-членного бициклического кольца, содержащего 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранные из O и S, которое замещено 0, 1, 2 или 3 группами, выбранными из F, Cl, Br, C_{1-6}алк, C_{1-4}галогеналк, -OR^a, -OC_{1-4}галогеналк, CN, -C(=O)R^b, -C(=O)OR^a, -C(=O)NR^aR^a, -C(=NR^a)NR^aR^a, -OC(=O)R^b, -OC(=O)NR^aR^a, -OC_{2-6}алк-NR^aR^a, -OC_{2-6}алк-OR^a, -SR^a, -

$S(=O)R^b$, $-S(=O)_2R^b$, $-S(=O)_2NR^aR^a$, $-NR^aR^a$, $-N(R^a)C(=O)R^b$, $-N(R^a)C(=O)OR^b$,-$N(R^a)C(=O)NR^aR^a$, $-N(R^a)C(=NR^a)NR^aR^a$, $-N(R^a)S(=O)_2R^b$, $-N(R^a)S(=O)_2NR^aR^a$, $-NR^aC_{2-6}$алк-NR^aR^a, $-NR^aC_{2-6}$алк-OR^a, $-C_{1-6}$алк-NR^aR^a, $-C_{1-6}$алк-OR^a, $-C_{1-6}$алк-$N(R^a)C(=O)R^b$, $-C_{1-6}$алк-$OC(=O)R^b$, $-C_{1-6}$алк-$C(=O)NR^aR^a$, $-C_{1-6}$алк-$C(=O)OR^a$, R^{14} и оксо;

в каждом случае R^{4b}, R^{8b}, R^{10l}, R^{11b}, R^{12b} и R^{13b} независимо выбраны из группы, состоящей из C_{1-6}алк, замещенного 0, 1, 2, 3, 4 или 5 группами, выбранными из F, Cl, Br, -OR^a, -OC_{1-4}галогеналк или CN;

в каждом случае R^{14} независимо выбран из группы, состоящей из насыщенного, частично-насыщенного или ненасыщенного 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членного моноциклического или 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11- или 12-членного бициклического кольца, содержащего 0, 1, 2 или 3 атома N и 0 или 1 атом, выбранный из O и S, которое замещено 0, 1, 2 или 3 группами, выбранными из F, Cl, Br, C_{1-6}алк, C_{1-4}галогеналк, -OR^a, -OC_{1-4}галогеналк, CN, $-C(=O)R^b$, $-C(=O)OR^a$, $-C(=O)NR^aR^a$, $-C(=NR^a)NR^aR^a$, $-OC(=O)R^b$, -$OC(=O)NR^aR^a$, $-OC_{2-6}$алк-NR^aR^a, $-OC_{2-6}$алк-OR^a, $-SR^a$, $-S(=O)R^b$, $-S(=O)_2R^b$, $-S(=O)_2NR^aR^a$, -NR^aR^a, $-N(R^a)C(=O)R^b$, $-N(R^a)C(=O)OR^b$,$-N(R^a)C(=O)NR^aR^a$, $-N(R^a)C(=NR^a)NR^aR^a$, -$N(R^a)S(=O)_2R^b$, $-N(R^a)S(=O)_2NR^aR^a$, $-NR^aC_{2-6}$алк-NR^aR^a, $-NR^aC_{2-6}$алк-OR^a, $-C_{1-6}$алк-NR^aR^a, -C_{1-6}алк-OR^a, $-C_{1-6}$алк$N(R^a)C(=O)R^b$, $-C_{1-6}$алк$OC(=O)R^b$, $-C_{1-6}$алк$C(=O)NR^aR^a$,

$-C_{1-6}$алк$C(=O)OR^a$ и оксо;

в каждом случае R^a независимо представляет собой H или R^b; и

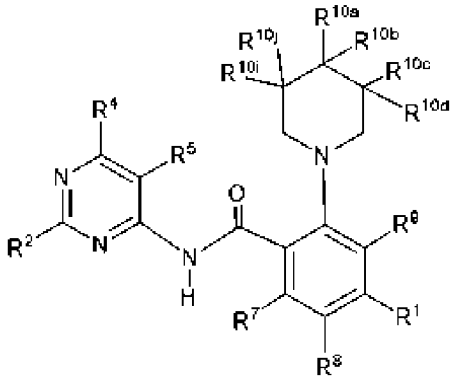
в каждом случае R^b независимо представляет собой C_{1-6}алк, фенил или бензил, при этом C_{1-6}алк замещен 0, 1, 2 или 3 заместителями, выбранными из галогена, -OH, -OC_{1-4}алк, $-NH_2$, $-NHC_{1-4}$алк, $-OC(=O)C_{1-4}$алк или $-N(C_{1-4}$алк$)C_{1-4}$алк; и фенил или бензил замещены 0, 1, 2 или 3 заместителями, выбранными из галогена, C_{1-4}алк, C_{1-3}галогеналк, -OH, -OC_{1-4}алк, $-NH_2$, $-NHC_{1-4}$алк, $-OC(=O)C_{1-4}$алк или $-N(C_{1-4}$алк$)C_{1-4}$алк.

E56. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где 0 из X^1, X^2, X^3 и X^4 представляют собой N.

E57. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где 1 из X^1, X^2, X^3 и X^4 представляют собой N.

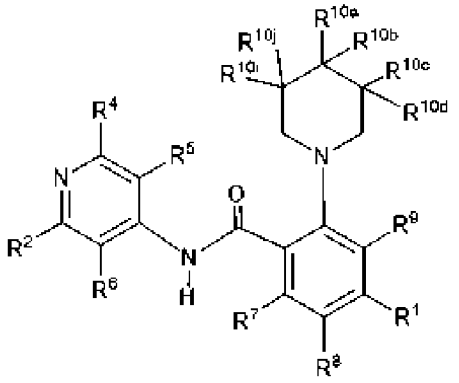
E58. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где 2 из X^1, X^2, X^3 и X^4 представляют собой N.

E59. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый из X^1 и X^3 представляет собой N; X^2 представляет собой -CR^5; и X^4 представляет собой -CR^9; характеризующееся формулой (Ia),



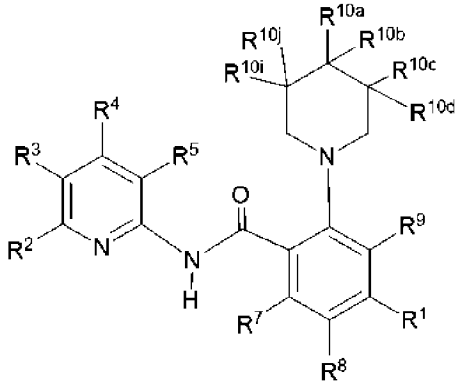
(Ia).

E60. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где X^1 представляет собой $-CR^6$; X^2 представляет собой $-CR^5$; X^3 представляет собой N; и X^4 представляет собой $-CR^9$; характеризующееся формулой (Ib),



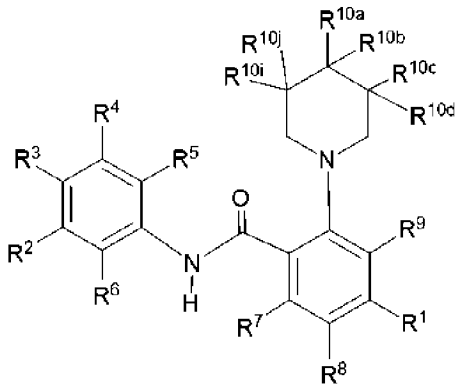
(Ib).

E61. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где X^1 представляет собой N; X^2 представляет собой $-CR^5$; X^3 представляет собой $-CR^3$; и X^4 представляет собой $-CR^9$; характеризующееся формулой (Ic),



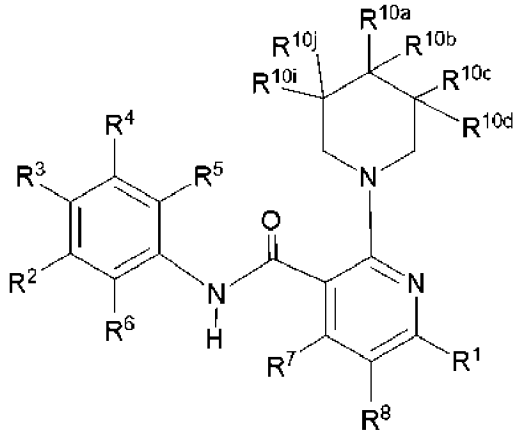
(Ic).

E62. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где X^1 представляет собой $-CR^6$; X^2 представляет собой $-CR^5$; X^3 представляет собой $-CR^3$; и X^4 представляет собой $-CR^9$; характеризующееся формулой (Id),



(Id).

E63. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где X^1 представляет собой $-CR^6$; X^2 представляет собой $-CR^5$; X^3 представляет собой $-CR^3$; и X^4 представляет собой -N; характеризующееся формулой (Ie),



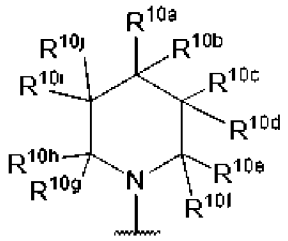
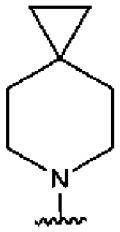
(Ie).

E64. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^y представляет собой H или метил.

E65. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый из R^{10c}, R^{10d}, R^{10e}, R^{10f}, R^{10g}, R^{10h}, R^{10i} и R^{10j} представляет собой H, галоген, C_{1-6}алк или C_{1-4}галогеналк; и каждый из R^{10a} и R^{10b} в паре объединен с атомом углерода, присоединенным к каждому из них, с образованием насыщенного 3-, 4- или 5-членного моноциклического спиро-кольца с кольцом R^x; где указанное кольцо содержит 0, 1, 2 или 3 атома N и 0, 1 или 2 атома, выбранные из O и S.

E66. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где каждый из R^{10c}, R^{10d}, R^{10e}, R^{10f}, R^{10g}, R^{10h}, R^{10i} и R^{10j} представляет собой H, метил или этил; и каждый из R^{10a} и R^{10b} в паре объединен с атомом углерода, присоединенным к каждому из них, с образованием циклопропильного, циклобутильного или циклопентильного спиро-кольца с кольцом R^x.

E67. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически

приемлемую соль, где группа  представляет собой 

E68. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^1 представляет собой группу -Z-R^{12}; где Z представляет собой -S(=O)(=NH)-, -$NHSO_2$-, -SO_2-, -SO_2NH- или -NH-; и R^{12} представляет собой циклопропил, -CH_2CH_2-OH, -$CH(CH_3)CH_2$-OH, -$C(CH_3)_2CH_2$-OH, **метилоксетанил или трет-бутил.**

E69. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^1 представляет собой группу -Z-R^{12}; где Z представляет собой -$NHSO_2$- или -NH-; и R^{12} представляет собой -CH_2CH_2-OH, -$CH(CH_3)CH_2$-OH или -$C(CH_3)_2CH_2$-OH.

E70. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I), или его фармацевтически приемлемую соль, где R^1 представляет собой группу -Z-R^{12}; где Z представляет собой -$NHSO_2$-, и R^{12} представляет собой -CH_2CH_2-OH.

E71. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой группу -Y-R^{13}; где Y представляет собой -C_{0-4}алк-, -O-C_{0-4}алк-, S, S=O, $S(=O)_2$ или -SO_2NH-; и -R^{13} представляет собой 4,4-дифтор-1-пиперидинил; -CH_2CH_2-CF_3, трет-бутил, циклопентил или 2-метилморфолинил.

E72. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой пиперидинил или морфолинил, замещенный 1, 2 или 3 группами, выбранными из F, Cl, Br, метила или CF_3; или R^2 представляет собой -O-CH_2CH_2-CF_3, -SO_2NH-$C(CH_3)_3$ или -SO_2-циклопентил.

E73. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^2 представляет собой группу -Y-R^{13}; где Y представляет собой -C_{0-4}алк-; и -R^{13} представляет собой 4,4-дифтор-1-пиперидинил или 2-метилморфолинил.

E74. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^4 представляет собой H или метил.

E75. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^5 представляет собой H.

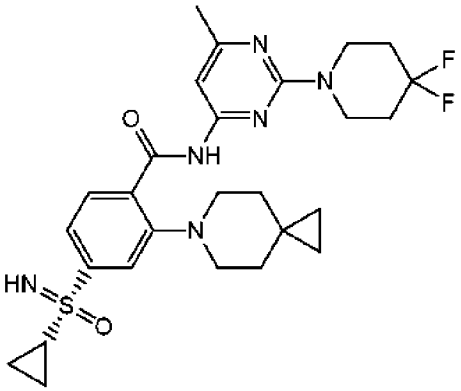
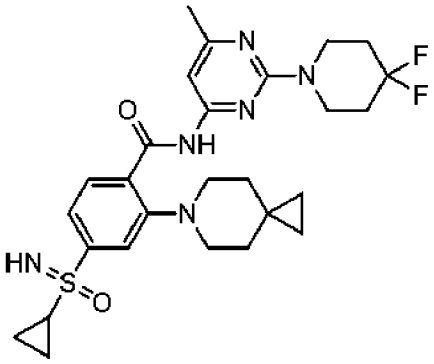
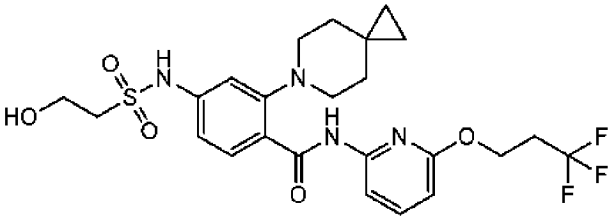
E76. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^6 представляет собой H.

E77. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^7 представляет собой H.

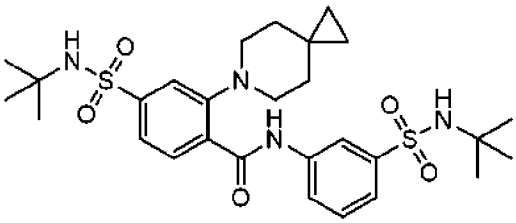
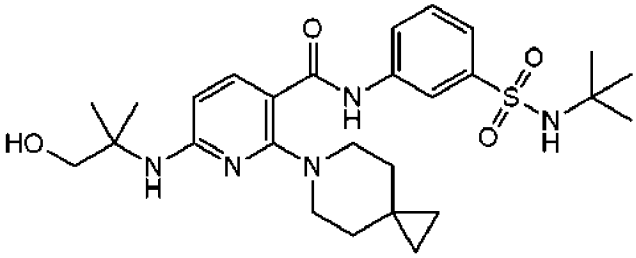
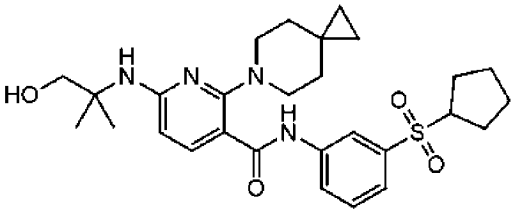
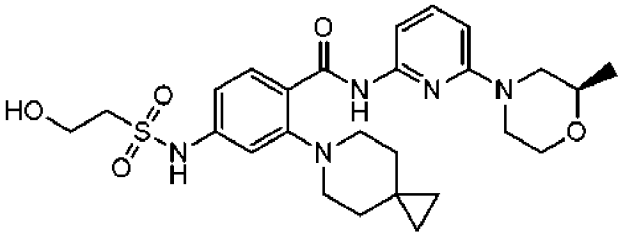
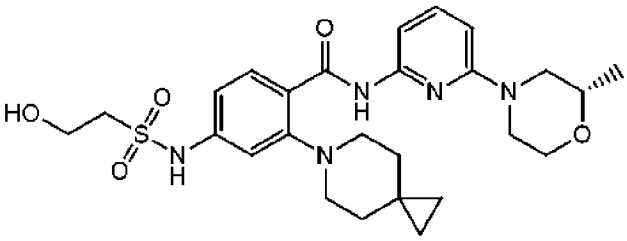
E78. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^8 представляет собой H.

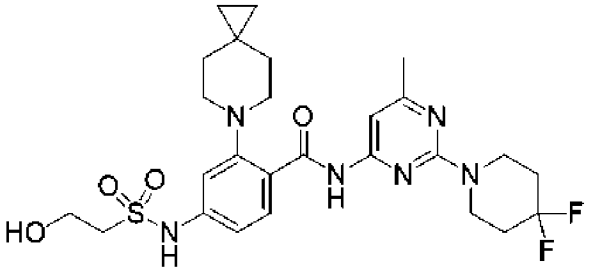
E79. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где R^9 представляет собой H.

E80. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где указанное соединение выбрано из группы, состоящей из:

№ прим.	Химическая структура	Химическое название
C1		2-(6-Азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(R-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид
C2		2-(6-Азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(S-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид
C3		4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-N-(6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-ил)бензамид

№ прим.	Химическая структура	Химическое название
C4		N-(6-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид
C5		(R)-N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид
C6		(S)-N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид
C7		N-(3-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-5-метилфенил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид
C8		N-(3-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)фенил)-4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

№ прим.	Химическая структура	Химическое название
C9		4-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)-N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид
C10		N-(3-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид
C11		N-(3-(Циклопентилсульфонил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид
C12		(R)-4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид
C13		(S)-4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

№ прим.	Химическая структура	Химическое название
C14		N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид

* № пр. обозначает № примера, а также короткое название соединения на основе ингибитора KIF18A, применяемое в данном документе, например в разделе Примеры.

E81. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где указанное соединение представляет собой любое из соединений C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, C13 или C14 или их фармацевтически приемлемой соли.

E82. Способ по варианту осуществления E81, где указанная соль представляет собой сульфатную, соль HCl, мезилатную, тозилатную или безилатную соль.

E83. Способ по варианту осуществления E82 где указанная соль представляет собой соль HCl.

E84. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A обеспечивает селективное лечение неопластического заболевания, селективно стимулирует или усиливает регресс опухоли, селективно обеспечивает уменьшение опухоли или скорости роста рака и/или селективно стимулирует или усиливает гибель опухолевых или раковых клеток, и ингибитор KIF18A не токсичный для нормальных соматических клеток.

E85. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A обеспечивает лечение неопластического заболевания, стимулирует или усиливает регресс опухоли, обеспечивает уменьшение опухоли или скорости роста рака и/или стимулирует или усиливает гибель опухолевых или раковых клеток, и пролиферация нормальных соматических клеток у субъекта является по сути такой же, как пролиферация нормальных соматических клеток контрольного субъекта.

E86. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A обеспечивает лечение неопластического заболевания, стимулирует или усиливает регресс опухоли, обеспечивает уменьшение опухоли или скорости роста рака и/или стимулирует или усиливает гибель опухолевых или раковых клеток, и уровень апоптоза нормальных соматических клеток не повышается у субъекта относительно уровня апоптоза нормальных соматических клеток контрольного субъекта, при этом необязательно уровень апоптоза нормальных соматических клеток является по сути таким же, как уровень апоптоза нормальных соматических клеток контрольного субъекта.

E87. Способ по любому из вариантов осуществления E84 - E86, где нормальные

соматические клетки представляют собой мононуклеарные клетки костного мозга человека, маммарные эпителиальные клетки человека или фибробластные клетки крайней плоти человека.

E88. Способ по любому из вариантов осуществления E84 - E87, где нормальные соматические клетки являются отличными от $TP53^{MUT}$ или где нормальные соматические клетки являются $TP53^{WT}$.

E89. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где неопластическое заболевание представляет собой неопластическое заболевание с множественной лекарственной устойчивостью.

E90. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где опухолевые или раковые клетки представляют собой опухолевые или раковые клетки с множественной лекарственной устойчивостью, и/или у них проявляется повышенная экспрессия гена множественной лекарственной устойчивости 1 (MDR-1) и/или продукта этого гена.

E91. Способ по варианту осуществления E99, где в опухолевых или раковых клетках проявляется повышенная экспрессия P-гликопротеина (P-gp).

E92. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где неопластическое заболевание является устойчивым к лечению подавляющим митоз средством или антрациклиновым антибиотиком, необязательно паклитакселом или доксорубицином.

E93. Способ лечения неопластического заболевания у субъекта, который подвергается или подвергался лечению подавляющим митоз средством или антрациклиновым антибиотиком, при этом указанный способ включает, по сути состоит или состоит из введения ингибитора KIF18A субъекту.

E94. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A уменьшает экспрессию гена KIF18A и/или продукта гена KIF18A.

E95. Способ по варианту осуществления E94, где ингибитор KIF18A представляет собой некодирующую РНК.

E96. Способ по варианту осуществления E95, где ингибитор KIF18A опосредует RNAi.

E97. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где ингибитор KIF18A представляет собой siRNA.

E98. Способ по варианту осуществления E97, где siRNA включает последовательность под любым из SEQ ID NO: 12-18.

E99. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена TP53.

E100. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена Rb1.

E101. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1.

E102. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена BRCA.

E103. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена TP53 и инактивированного гена Rb1.

E104. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена TP53 и амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1.

E105. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена TP53 и инактивированного гена BRCA.

E106. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена Rb1 и амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1.

E107. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена Rb1 и инактивированного гена BRCA.

E108. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 и инактивированного гена BRCA.

E109. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена TP53, инактивированного гена Rb1 и амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1.

E110. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена TP53, инактивированного гена Rb1 и инактивированного гена BRCA.

E111. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена TP53, амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 и инактивированного гена BRCA.

E112. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена Rb1, амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 и инактивированного гена BRCA.

E113. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, включающий, по сути состоящий или состоящий из анализирования в отношении инактивированного гена TP53, инактивированного гена Rb1, амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 и инактивированного гена BRCA.

E114. Способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, где неопластическое заболевание представляет собой рак, содержащий одну или несколько полногеномных дупликаций или событий удвоения полного генома (WGD).

[00237] Следующие примеры приведены лишь для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают каким-либо образом его объем.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

[00238] В данном примере описан анализ линий клеток рака в отношении чувствительности к ингибитору KIF18A относительно ингибиторов CDK4/6 и ингибитора Eg5.

[00239] Ингибитор KIF18A, соединение C14, оценивали в 4-дневном основанном на оценке изображений анализе количества ядер (NCA) с применением панели линий клеток рака, включающей линии клеток рака молочной железы, линии клеток рака яичника и линию клеток рака предстательной железы. Ингибитор моторного белка Eg5 (испинесиб) применяли в качестве цитотоксического контроля. Ингибитор CDK4/6 (палбоциклиб) применяли в качестве сравнительного средства, активного в линиях клеток с интактным путем Rb (T VanArsdale et al, Clinical Cancer Research. 2015;1;21:2905-2910).

[00240] Описание линий клеток рака человек и способы культивирования клеток для линий клеток представлены в таблице 1A на фигуре 1A. Все линии клеток рака человека получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC) (Манассас, Вирджиния), если не указано иное. Линию клеток рака молочной железы CAL-51 получали от DSMZ (GmbH). Линии клеток рака яичника OVCAR-8_NCI/ADR-RES Национального института рака (NCI), экспрессирующие P-гликопротеин (P-gp), и OVCAR-5 получали из клеточного банка Amgen. Линию клеток MAX401NLPDX получали от Charles River Laboratories. Подлинность линий клеток, применяемых в данном отчете, была установлена ATCC с применением способа на основе коротких тандемных повторов (STR), помимо линии клеток рака OVCAR-5, первоначально полученной ACB из NCI, STR-профиль, полученный из ATCC для клеток OVCAR-5 вносили в поиск в базе данных ExPasy, и он продемонстрировал 100% совпадение с OVCAR-5. Все культуры линий клеток поддерживали при 37°C в атмосфере 5% CO_2.

[00241] Линии клеток рака высевали в 96-луночный черный полистироловый планшет с плоским прозрачным дном Corning (Corning, Нью-Йорк) в 100 мкл подходящей полной среды при подходящей плотности и выращивали в течение 24 часов. Описание значений плотности высевания линий клеток, применяемых в исследовании NCA, представлены в таблице 1B на фигуре 1B.

[00242] В одном ряду экспериментов при подготовке к обработке клеток 2X

концентрацию одного из: соединения C14, палбоциклиба (ингибитор CDK4/6) или испинесиба (ингибитор Eg5), серийно разбавляли в 100 мкл полной среды с применением BRAVO [конечный диапазон концентраций с 20 точками составлял от 10 мкМ до 0,0003 мкМ (для соединения C14 или палбоциклиба) и от 1 мкМ до 0,00003 мкМ (испинесиб) с применением подхода постадийного внесения]. Соединение добавляли к клеткам в конечном объеме, составлявшем 200 мкл, в полной среде, содержавшей 0,5% DMSO.

[00243] Во втором ряду экспериментов при подготовке к обработке клеток 2X концентрацию одного из: соединения C14, олапариба (ингибитор PARP), паклитаксел (таксан), доксорубицина (антрациклин) и карбоплатина (платина), серийно разбавляли в 100 мкл полной среды с применением BRAVO [конечный диапазон концентраций с 20 точками составлял от 10 мкМ до 0,0003 мкМ (соединение C14), от 100 мкМ до 0,003 мкМ (олапариб, карбоплатин), от 1 мкМ до 0,00003 мкМ (паклитаксел) и от 2 мкМ до 0,00006 мкМ (доксорубицин) с применением подхода постадийного внесения]. Соединение добавляли к клеткам в конечном объеме, составлявшем 200 мкл, в полной среде, содержавшей 0,5% DMSO.

[00244] Через 4 дня (96 часов) или 6 дней (144 часа) обработки клетки фиксировали путем удаления 100 мкл полной среды из каждой лунки, и замены ее на 100 мкл 2x формальдегида (конечная концентрация 4%), и инкубирования планшетов в течение 15 минут при комнатной температуре. После фиксирования клетки пермеабилизировали и окрашивали в 200 мкл отмывочного буфера (1% BSA, 0,2% Triton X-100, 1X PBS), содержавшего 2 мкг/мл ДНК-красителя Hoechst 33342. Планшеты герметично закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Клетки хранили при 4°C в темноте до проведения сбора данных. Данные визуализирующего исследования собирали на считывающем устройстве Cellomics ArrayScan VTI HCS (SN03090745F, ThermoFisher Scientific) с применением протокола анализа с помощью Target Activation V4 (версия 6.6.0 (сборка 8153) с использованием объектива с увеличением 10X, проводили сбор 16 полей на лунку). *Количество применимых объектов* определяли с применением отличительных признаков объекта, представляющего собой ядро (площадь, общая и вариабельная интенсивность в канале 1), согласно Hoechst 33342, которое находилось в пределах±3 SD от обработанного DMSO контроля. *Общее количество применимых объектов* было представлено в виде рассчитанного POC (процента от контроля с DMSO) с применением следующей формулы:

Рассчитанный POC = (*общее количество применимых объектов* в обработанной лунке) ÷ (*общее количество применимых объектов* в обработанных DMSO лунках) x 100.

[00245] Концентрацию соединения и рассчитанные значения POC строили на графике с применением программного обеспечения GraphPad Prism (V7.0.4) и аппроксимацию кривой проводили с использованием 4-параметрического уравнения (переменный угловой коэффициент). Кривые концентрация-ответ и стандартное отклонение представляет собой два независимых эксперимента в двух повторностях.

[00246] В **таблице 1C (фигура 1C)** указано среднее рассчитанное значение EC_{50}

для каждой линии клеток и ширина диапазона (верхнее - нижнее значение POC), если ширина диапазона не превышает >50%, то линия клеток считается нечувствительной. Среднее рассчитанное значение EC_{50} (± SD) среди всех чувствительных линий клеток определяли для каждого тестируемого средства.

[00247] **Согласованная информация для таблицы 1C.** Характеристики линий клеток (тип ткани, подтип опухоли, мутационный статус TP53, статус пути Rb) получали из следующих **электронных баз данных** (Cancer DepMap и CCLE (https://depmap.org/portal/depmap), Институт Брод; Cell Model Passports (https://cellmodelpassports.sanger.ac.uk/passports), Институт Сенгера, IARC (http://p53.iarc.fr/OtherResources.aspx), Международная ассоциация изучения рака) и **литературных источников** (O'Brien et al, 2018; Konecny et al, 2012; Finn et al, 2009; Dai et al, 2017; Tilley et al, 1990; Witkiewicz et al, 2018).

[00248] **Сокращения в таблице 1C.** Миссенс-мутация (MM), нонсенс-мутация (NM), делеция со сдвигом рамки считывания (FSD), вставка со сдвигом рамки считывания (FSI), стоп-кодон (*), сдвиг рамки считывания (fs), амплификация (AMP), достаточный (PROF), дефектный (DEF), аминокислота (A.A.), положительный (POS), отрицательный (NEG), эстрогеновый рецептор (ER) и андрогеновый рецептор (AR). Информация касательно статуса амплификации HER-2 в MDA-MB-453 неопределенная (?).

[00249] **Литературные источники для таблицы 1C.**

[00250] O'Brien N, Conklin D, Beckmann R, Luo T, Chau K, Thomas J, et al. Preclinical activity of abemaciclib alone or in combination with antimitotic and targeted therapies in breast cancer. Molecular Cancer Therapeutics. 2018;17(5):897-907.

[00251] Konecny GE, et al. Expression of p16 and retinoblastoma determines response to CDK4/6 inhibition in ovarian cancer. Clinical Cancer Research. 2011 Mar 15;17(6):1591-1602.

[00252] Finn RS et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. Breast Cancer Research. 2009;11(5):R77.

[00253] Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. Journal of Cancer. 2017;8(16):3131.

[00254] Tilley WD, Wilson CM, Marcelli M, McPhaul MJ. Androgen receptor gene expression in human prostate carcinoma cell lines. Cancer Research. 1990; 50(17):5382-5386.

[00255] Witkiewicz AK, Chung S, Brough R, Vail P, Franco J, Lord CJ, Knudsen ES. Targeting the vulnerability of RB tumor suppressor loss in triple-negative breast cancer. Cell reports. 2018;22(5):1185-1199.

[00256] Как показано в таблице 1C на фигуре 1C, все линии клеток, у которых проявлялась чувствительность к ингибитору KIA18A, представляли собой мутантные по TP53 линии клеток рака. Семь из двенадцати линий клеток были оценены как "чувствительные" и продемонстрировали аналогичные значения средней за 4 дня рассчитанной EC_{50} (0,0563 мкМ с SD ±0,008). Пять достаточных по Rb линий клеток рака, включая четыре линии с $TP53^{WT}$ (CAL-51, ZR-75-1, MCF-7, OVCAR-5) и одну линию с

$TP53^{NULL}$ (MDA-MB-453), были чувствительными к палбоциклибу и нечувствительными к ингибитору KIF18A. Во всех чувствительных к ингибитору KIF18A линиях клеток, помимо одной (мутантная по BRCA1 HCC-1937), линии клеток характеризовались либо наличием амплификации CCNE1, либо статусом Rb^{DEF}. В совокупности эти данные указывают, что ингибитор KIF18A и палбоциклиб характеризуются различными и почти совершенно неперекрывающимися профилями чувствительности, что свидетельствует о том, что статус пути Rb может служить биомаркером для разделения (например потеря RB1 и амплификация CCE1). Профиль чувствительности к ингибитору KIF18A явно отличается от цитотоксических эффектов испинесиба, при этом профиль фокальной чувствительности позволяет предположить только подряд линий клеток рака, у которых проявляется повышенная митозоспецифичная уязвимость и зависимость от KIF18A.

[00257] Фигуры 2A - 2F представляют собой графики рассчитанных значений POC для шести протестированных линий клеток, построенные в виде функции концентрации ингибитора KIF18A. Шесть линий клеток на фигурах 2A - 2F представляют собой BT-549 (TNBC, характеризующаяся $TP53^{MUT}$ и RB^{DEF}), OVCAR-3 (HGSOC, характеризующаяся $TP53^{MUT}$ и $CCNE1^{AMP}$), DU-145 (CR-PC, характеризующаяся $TP53^{MUT}$ и RB^{DEF}), CAL-51(TNBC, характеризующаяся $TP53^{WT}$ и RB^{PROF}), OVCAR-5 (HGSOC, характеризующаяся $TP53^{WT}$ и RB^{PROF}) и ZR-75 (люминальный рак молочной железы, характеризующийся $TP53^{WT}$ и RB^{PROF}). Аппроксимированные кривые концентрация-ответ на фигурах 2A - 2F представлены в виде среднего рассчитанного значения на основе процента от контроля (DMSO) с планками погрешностей (SD). Анализ проводили в двух повторностях в двух независимых экспериментах. Интересно заметить, что те линии клеток, которые были чувствительными к ингибитору KIF18A, были не чувствительными к ингибитору CDK4-6, палбоциклибу, и наоборот. Эти данные указывают на то, что чувствительность раковых клеток к ингибитору CDK4/6 может служить отрицательным прогностическим фактором чувствительности раковых клеток к ингибиторам KIF18A, и что инактивация пути Rb (например, потеря RB1 и амплификация CCE1) может служить биомаркером потенциального ответа на лечение ингибитором KIF18A.

[00258] Фигуры 3A - 3D представляют собой серию графиков рассчитанных значений POC для четырех протестированных линий клеток, построенных в виде функции концентрации ингибитора KIF18A. Четыре линии клеток на фигурах 3A - 3D представляют собой OVCAR-8 (HGSOC, характеризующаяся $TP53^{MUT}$ и $BRCA1^{подвергшийся\ сайленсингу}$), MX-1 (трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC, характеризующийся $TP53^{MUT}$ и $BRCA1^{MUT}$), MAX401NL PDX (TNBC, характеризующаяся $TP53^{MUT}$ и $BRCA1^{MUT}$) и HCC-1937 (TNBC, характеризующаяся $TP53^{MUT}$ и $BRCA1^{MUT}$). Как показано на каждом графике на фигурах 3A - 3D, $TP53^{MUT}$ и дефектные по BRCA1 линии клеток рака продемонстрировали чувствительность к лечению ингибитором KIF18A с рассчитанными значениями EC50, находящимися в диапазоне от 0,051 до 0,082 мкМ.

[00259] Фигура 3E представляет собой график рассчитанных значений POC для

подлинии NCI-ADR RES OVCAR-8, построенный в виде функции концентрации ингибитора KIF18A, ингибитора PARP, паклитаксела, доксорубицина или карбоплатина. Как показано на фигуре 3E, линия клеток продемонстрировала наибольшую чувствительность к ингибитору KIF18A. Клетки NCI-ADR RES OVCAR-8 сверхэкспрессируют насос-переносчик лекарственных средств MDR1 или ген ABCB1 (кодирующий P-гликопротеин), которые, как известно, стимулируют множественную лекарственную резистентность к противораковым средствам (A Vert et al OncoTargets and Therapy 2018:11;221-37), эти данные свидетельствуют о том, что чувствительность к ингибитору KIF18A из-за оттока лекарственного средства лишь незначительно снижается по сравнению с олапарибом, паклитакселом и доксорубицином. Кроме того, сообщалось о нескольких слитых транскриптах ABCB1 при устойчивом к химиотерапии рецидивирующем раке яичника (EL Christie et al Nature Communications. 2019:20;10:1-10).

ПРИМЕР 2

[00260] В данном примере продемонстрирован анализ линий клеток рака в отношении чувствительности к соединению C9 на основе ингибитора KIF18A.

[00261] Анализ проводили для идентификации профиля чувствительности линий клеток рака к соединению C9 на основе ингибитора KIF18A. В данном анализе панель разных линий клеток рака молочной железы и яичника человека (таблица 2 на фигуре 4A и таблица 3 на фигуре 4B) применяли либо в 4-дневном, либо в 6-дневном аналитическом скрининге роста линий клеток рака.

[00262] В 4-дневном аналитическом скрининге роста линии клеток рака обрабатывали в 96-луночный планшеты для культивирования тканей при предварительно оптимизированной плотности высевания. Условия среды для выращивания определяли с помощью ChemPartners (Шанхай, Китай). Через 24 часа клетки обрабатывали ингибитором KIF18A (соединение C9; конечный диапазон концентраций с 10 точками составлял от 2,0 мкМ до 0,0001 мкМ, 3-кратное разбавление) в 4-дневном анализе роста клеток на основе количественного определения АТФ в качестве индикатора жизнеспособных клеток с применением считывания данных с помощью CellTiter-GLO 2.0 (CTG, Promega). Анализ с помощью CTG проводили в двух повторностях для каждой линии клеток. Обнаружение проводили с применением устройства, считывающего люминесценцию, для планшетов и выражали в виде относительных единиц люминесценции (RLU) на основе POC (процента от контроля с DMSO). Необработанные данные предоставляли Amgen для анализ кривой с аппроксимацией с использованием 4-параметрического уравнения (переменный угловой коэффициент) с применением программного обеспечения GraphPad Prism (V7.0.4). Изображали кривые концентрация-ответ и значения стандартного отклонения (иллюстративные кривые показаны на фигурах 4C и 4D). Указаны значения EC50 (IP) и ширина диапазона (разница между максимальным и минимальным ответом для аппроксимированных точек) для каждой линии клеток рака, и линии клеток классифицированы как чувствительные к соединению на основе ингибитора KIF18A, если значение EC50 <0,1 мкМ, и ширина диапазона ≥40.

[00263] Проводили расширенный скрининг с применением 6-дневного анализа роста, линии клеток рака обрабатывали в черных 384-луночных планшетах для культивирования тканей при 500-1500 клеток на лунку. Условия среды для выращивания определяли с помощью Horizon Discovery (Кембридж, Великобритания). Через 24 часа клетки обрабатывали ингибитором KIF18A (соединение C9; конечный диапазон концентраций с 11 точками составлял от 2,0 мкМ до 0,0000339 мкМ, 3-кратное разбавление) в 6-дневном анализе роста клеток на основе количественного определения АТФ в качестве индикатора жизнеспособных клеток с применением считывания данных с помощью CellTiter-GLO 2.0 (Promega). Люминесценцию определяли с применением считывающего устройства для планшетов Envision (Perkin Elmer) и выражали в виде относительных единиц люминесценции (RLU) на основе POC (процента от контроля). Необработанные данные предоставляли Amgen для анализ кривой с аппроксимацией с использованием 4-параметрического уравнения (переменный угловой коэффициент) с применением программного обеспечения GraphPad Prism (V7.0.4). Изображали кривые концентрация-ответ и значения стандартного отклонения (иллюстративные кривые показаны на фигурах 4E - 4F). Также проводили анализ кривой с аппроксимацией с применением программного обеспечения собственного производства Horizon. С помощью Horizon Discovery отмечали значения EC50 (IP) и максимальный ответ (наблюдаемый) для каждой линии клеток рака, и линии клеток классифицировали как чувствительные к соединению на основе ингибитора KIF18A, если значение EC50 <0,1 мкМ, и максимальный ответ ≥59,5.

[00264] Кроме того, аналитический скрининг роста в отношении количества клеток в линиях клеток проводили с использованием ингибитора KIF18A следующим образом. Подряд линий клеток рака молочной железы и яичника поддавали скринингу с использованием соединения C9 на основе ингибитора KIF18A, как описано выше с применением анализа количества ядер (NCA) на основе визуализации. Внутренние данные касательно ингибитора KIF18A либо в 4-, или в 6-дневном NCA. Аппроксимацию кривой проводили при Amgen с применением GraphPad Prism 7. Указанные значения: значение EC50 (IP) и ширина диапазона (разница между максимальным и минимальным ответом для аппроксимированных точек) для каждой линии клеток рака, и линии клеток классифицированы как чувствительные к соединению на основе ингибитора KIF18A, если значение IC50 <0,1 мкМ, и ширина диапазона ≥40.

[00265] Результаты анализа количества клеток показаны в таблице 2 и таблице 3 и фигурах 4C - 4F. Таблица 2 представляет собой сводные данные анализа для панели линий клеток рака молочной железы человека и таблица 3 представляет собой сводные данные анализа для панели линий клеток рака яичника человека.

[00266] В таблицах 2 и 3 "?" означает, что были отличия результатов в отношении чувствительности между первым скринингом и вторым скринингом, и "ND" означает не определяли. Скрининг проводили посредством либо первого скрининга, либо второго скрининга. Первый скрининг (ChemPartner, CP) представлял собой 4-дневный анализ с

помощью CellTiter-Glo® (CTG). Аппроксимацию кривой проводили с применением GraphPad Prism 7. Указанные значения в таблицах 2 и 3 представляют собой: значение EC50 (IP) и ширина диапазона или максимальный ответ (отличие между максимальным и минимальным ответом для аппроксимированных точек). Распределение баллов чувствительности в первом скрининге [группа чувствительных линий клеток определяется как ширина диапазона ≥40 со значением EC50 <0,1 мкМ]. Второй скрининг (Horizon Discovery, HR) представлял собой 6-дневный анализ с помощью CTG. Аппроксимацию кривой проводили HR. Указанные значения в таблицах 2 и 3 представляют собой: значение EC50 (IP) и максимальный ответ (наблюдаемый). Распределение баллов чувствительности во втором скрининге [группа чувствительных линий клеток определяется как ширина диапазона ≥59,5 с значением EC50 <0,1 мкМ]. Имел место третий скрининг (Amgen, AM), и он представлял собой либо 4-дневный, либо 6-дневный анализ количества ядер (NCA). Аппроксимацию кривой проводили с применением GraphPad Prism 7. Указанные значения в таблицах 2 и 3 представляют собой: значение EC50 (IP) и ширина диапазона (отличие между максимальным и минимальным ответом для аппроксимированных точек). Распределение баллов чувствительности в третьем скрининге [группа чувствительных линий клеток определяется как ширина диапазона ≥40 со значением EC50 <0,1 мкМ].

[00267] **Согласованная информация для фигур 4A - 4F.** Характеристики линий клеток (тип ткани, подтип опухоли, мутационный статус TP53, вариант TP53, изменение белка p53) получали из следующих электронных баз данных (Cancer DepMap и CCLE (https://depmap.org/portal/depmap), Институт Брод; Cell Model Passports (https://cellmodelpassports.sanger.ac.uk/passports), Институт Сенгера, IARC (http://p53.iarc.fr/OtherResources.aspx), Международная ассоциация изучения рака) и литературных источников (Dai et al Journal of Cancer, 2017; O'Brien et al Mol. Cancer Ther., 2018; Domcke et al Nature Comm., 2013).

[00268] **Сокращения для таблицы 2 и таблицы 3.** Скрининг ChemPartner (CP), скрининг Horizon Discovery (HR), скрининг Amgen (AM), не определяли (ND), (TNBC), низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC), эстрогеновый рецептор (ER), отрицательный (NEG), положительный (POS), положительный по рецептору HER2 (HER2), люминальный A (LumA), люминальный B (LumB), мутантный вариант (MUT), дикий тип (WT), потеря экспрессии (LOE), миссенс-мутация (MM), нонсенс-мутация (NM), делеция со сдвигом рамки считывания (FSD), вставка со сдвигом рамки считывания (FSI), стоп-кодон (*), сдвиг рамки считывания (FS), сплайс-сайт (SS), делеция внутри рамки считывания (IFD), вставка внутри рамки считывания (IFI), подвергшийся сайленсингу (S), аминокислота (A.A.), отличия в результатах в отношении чувствительности в столбцах между скринингами CP и HR (?) и подтип опухоли и результат поиска консенсусной последовательности TP53 в столбцах неопределены (?).

[00269] Подтипы опухолей: источник: XDai et al Journal of Cancer_2017, O'Brien et al Mol. Cancer Ther._2018 (рак молочной железы), Domcke et al_Nature Comm 2013 (рак

яичника). TNBC=трижды отрицательный рак молочной железы, HGSOC=низкодифференцированный серозный рак яичника, ER=эстрогеновый рецептор, NEG=отрицательный, POS=положительный, HER2=положительный по рецептору HER2, LumA=люминальный A, LumB=люминальный B, ?=подтип неопределен.

[00270] Статус TP53: источник: результаты поиска CCLE/Sanger/IARC: если результаты поиска консенсусной последовательности были неопределенными, то либо искали в литературе, либо указывали как неопределенный (?). MUT (мутантный вариант), WT (дикий тип), LOE (потеря экспрессии). Классификация вариантов: MM (миссенс-мутация), NM (нонсенс-мутация), SS (саплайс-сайт), IFD (Del внутри рамки считывания), FSI (Ins со сдвигом рамки считывания), FSD (Del со сдвигом рамки считывания), NULL, IFI (Ins внутри рамки считывания), подвергшийся сайленсингу.

[00271] **Литературные источники для таблицы 2 и таблицы 3.**

[00272] Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. Journal of Cancer. 2017;8(16):3131.

[00273] O'Brien N, Conklin D, Beckmann R, Luo T, Chau K, Thomas J, et al. Preclinical activity of abemaciclib alone or in combination with antimitotic and targeted therapies in breast cancer. Molecular Cancer Therapeutics. 2018;17(5):897-907.

[00274] Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz, N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. Nature Communications, 2013; 4(1): 1-10.

[00275] Как показано в таблице 2 линии клеток рака молочной железы, чувствительные к лечению ингибитором KIF18A, были положительными в отношении мутантного гена TP53, многие из которых экспрессировали мутантный вариант белка TP53 вследствие миссенс-мутации. Ни одна из девяти линий клеток рака молочной железы с TP53 дикого типа не была чувствительной к ингибитору KIF18A, включая две линии TNBC (CAL-51, DU4475). Все линии клеток рака молочной железы, которые были чувствительны к лечению ингибитором KIF18A, характеризовались отрицательным статусом эстрогенового рецептора (ER) и приблизительно три четвертые этих линий клеток также характеризовались отрицательный статусом HER2. Ни одна из люминальной A или люминальной B линий клеток рака молочной железы не была чувствительной к ингибитору KIF18A.

[00276] Как показано в таблице 3 линии клеток рака яичника, которые были чувствительны к лечению ингибитором KIF18A, были положительными в отношении мутантного гена TP53, многие из которых экспрессировали мутантный вариант белка TP53 вследствие миссенс-мутации. Ни одна из девяти линий клеток рака яичника с TP53 дикого типа не была чувствительной к ингибитору KIF18A. Для большинства из этих линий клеток рака подтип опухоли "вероятно" или "возможно" представлял собой низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC) на основе молекулярной классификации (S. Domcke et al Nature Communications 2013:4:1-10).

[00277] Иллюстративные кривые концентрация-ответ из первого скрининга (фигуры 4C - 4D) и второго скрининга (фигуры 4E - 4F) показаны на фигурах 4C - 4F

соответственно. Как показано на фигурах 4C - 4F, профили чувствительности к ингибитору KIF18A для линий клеток рака молочной железы и яичника были разделены на группы "чувствительная" (фигуры 4C, 4E) и "нечувствительная" (фигуры 4D, 4F).

ПРИМЕР 3

[00278] В данном примере продемонстрировано, что соединение C14 на основе ингибитора KIF18A стимулирует регресс опухоли в ксенотрансплантатной модели HGSOC человека OVCAR-3 ($TP53^{MUT}$, $CCNE1^{AMP}$) у самок бестимусных голых мышей.

[00279] Для демонстрации эффекта ингибитора KIF18A на регресс опухоли клетки OVCAR-3 подвергали повторному отбору in vivo и последовательно (OVCAR-3SQ3). Самкам бестимусных голых мышей в правый бок вводили подкожно с помощью инъекции 5×10^6 клеток в 0,1 мл. После приживления опухоли (средний объем опухоли составлял 150 $мм^3$) животных рандомизировали на 4 группы обработки (среда-носитель отдельно, ингибитор KIF18A при 10, 30 или 100 мг/кг) с 10 животными на группу и обрабатывали перорально один раз в день (PO, QD), начиная в день 25 после имплантации опухоли. Размерные параметры опухоли рассчитывали на основе длины, ширины и высоты опухолей, измеренных с помощью штангенциркуля с электронным цифровым отсчетом PRO-MAX (Japan Micrometer Mfg. Co. LTD). Объем опухоли рассчитывали как [L × W × H] и выражали в $мм^3$. Размерные параметры объема опухоли и веса тела животного определяли дважды в неделю (день начала исследования 25, день завершения исследования 45). Одну мышь исключали из исследования (группа с 30 мг/кг ингибитора KIF18A) вследствие вздутия живота, результата, вероятно несвязанного с соединением.

[00280] Формулы для подавления роста опухоли (TGI) и регресса опухоли.

%TGI по сравнению с таковым контроля со средой-носителем:

$$\%TGI = 100 - \left[\frac{(\text{объем после обработки} - \text{исходный объем})}{(\text{контрольный объем} - \text{исходный объем})} \times 100\right].$$

%Регресса, сравнение конечного объема опухоли с исходным объемом опухоли:

$$\%Регресса = 100 - \left[\frac{(\text{конечный объем})}{(\text{исходный объем})} \times 100\right].$$

[00281] Данные строили на графике с применением программного обеспечения GraphPad Prism (V7.0.4), данные об объеме опухоли и весе тела выражены в виде средних значений плюс или минус стандартное отклонение среднего значения и построены в виде функции времени. Статистическую значимость наблюдаемых отличий между кривыми роста рассчитывали с применением пакета программного обеспечения SLACR (v.1.0.3). Статистическую значимость для значений регресса опухоли проводили путем использования парного t-критерия Стьюдента в отношении исходных и конечных значений объема опухоли, при этом получали значимые p-значения для регресса опухоли (***$p \leq 0{,}0001$) для всех трех групп обработки ингибитором KIF18A. Дозы ингибитора KIF18A составляли 10 мг/кг (81% регресс, 5 из 10 без опухоли), 30 мг/кг (98% регресс, 8 из 9 без опухоли) и 100 мг/кг (97% регресс, 7 из 10 без опухоли). Не наблюдали доказательств выраженной токсичности в обработанных ингибитором KIF18A группах,

что было определено с помощью изменений веса тела животного относительно обработанной средой-носителем группы.

[00282] Результаты показаны на фигурах 5A - 5B. Как показано на фигуре 5A, пероральное ежедневное введение ингибитора KIF18A в значительной степени подавляло рост опухолей HGSOC OVCAR-3 (мутантный вариант TP53, амплифицированный CCNE1) и стимулировало регресс при всех трех дозах. Оценка потенциала опухоли к повторному росту после отмены ингибитора KIF18A показала долговременный регресс опухоли и излечение у ≥50% животных без доказательств выраженной токсичности, что указывает на то, что ингибитор KIF18A является хорошо переносимым.

ПРИМЕР 4

[00283] В данном примере продемонстрировано, что соединение C14 на основе ингибитора KIF18A стимулирует регресс опухоли в ксенотрансплантатной модели HGSOC человека OVCAR-8 ($TP53^{MUT}$, $BRCA1^{подвергшийся\ сайленсингу}$) у самок бестимусных голых мышей.

[00284] Самкам бестимусных голых мышей в правый бок вводили подкожно с помощью инъекции 5×10^6 клеток OVCAR-8 в 0,1 мл. Животных с прижившимися опухолями рандомизировали (средний объем опухолей составлял ~134 $мм^3$) на 4 группы обработки (среда-носитель отдельно, соединение C14 при 10, 30 или 100 мг/кг) с 10 животными на группу и обрабатывали перорально один раз в день (PO, QD), начиная в день 25 после имплантации опухоли. Размерные параметры объема опухоли и веса тела животного определяли дважды в неделю (день начала исследования 25, день завершения исследования 47). Размерные параметры опухоли, формулы и анализ регресса были такими, как описано выше для фигур 5A - 5B. Данные строили на графике с применением программного обеспечения GraphPad Prism (V7.0.4), данные об объеме опухоли и весе тела выражены в виде средних значений плюс или минус стандартное отклонение среднего значения и построены в виде функции времени. Статистическую значимость наблюдаемых отличий между кривыми роста рассчитывали с применением пакета программного обеспечения SLACR (v.1.0.3). Статистическую значимость для подавления роста опухоли определяли для группы с 10 мг/кг соединения C14 (57% TGI, p=0,003) с помощью RMANOVA с использованием сравнения Даннетта относительно группы со средой-носителем. Расчет статистической значимости для значений регресса опухоли проводили с помощью парного t-критерия Стьюдента на основе исходных x конечный значений объема опухоли, соединение C14 30 мг/кг (86% регресс, p ≤0,0001, 4 из 10 без опухоли) и соединение C14 100 мг/кг (98% регресс, p ≤0,0001, 8 из 10 без опухоли). Не наблюдали доказательств выраженной токсичности в обработанных соединением C14 группах, что было определено с помощью изменений веса тела животного относительно обработанной средой-носителем группы.

[00285] Результаты показаны на фигурах 6A - 6B. Как показано на фигурах 6A - 6B, пероральное ежедневное введение ингибитора KIF18A в значительной степени подавляло рост опухолей HGSOC OVCAR-8 (мутантный вариант TP53, $BRCA1^{подвергшийся\ сайленсингу}$) и

стимулировало регресс при дозах, составлявших 30 мг/кг и 100 мг/кг, без доказательств выраженной токсичности, что указывало на то, что ингибитор KIF18A является хорошо переносимым.

ПРИМЕР 5

[00286] В данном примере описано исследование с анализированием эффектов ингибитора KIF18A на митотический фенотип раковых клеток.

[00287] Для анализа эффектов ингибитора KIF18A на митотический фенотип раковых клеток проводили анализ количества центросом (CCA) на основе визуализации с применением ингибитора KIF18A. При подготовке к высеванию в планшеты клетки TNBC MDA-MB-157 ресуспендировали семь раз с помощью 10-мл шприца с иглой калибра 18-G с созданием суспензии отдельных клеток. Клетки высевали при плотности 30000 клеток на лунку с применением автоматизированной рабочей станция дозирования жидкостей BRAVO (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния) в 96-луночный черный полистироловый планшет с плоским прозрачным дном Corning (Corning, Нью-Йорк) в 100 мкл полной среды и выращивали в течение 24 часов. При подготовке к обработке клеток соединение C14 на основе ингибитора KIF18A с концентрацией 2X серийно разбавляли с применением BRAVO (конечный диапазон концентраций с 20 точками составлял от 5,0 мкМ до 0,00015 мкМ с применением подхода постадийного внесения) в 100 мкл полной среды и затем добавляли в 100 мкл полной среды, содержащей высеянные клетки, с конечной концентрацией DMSO 0,5%. После 24 часов обработки 100 мкл полной среды удаляли из каждой лунки, и клетки фиксировали путем добавления 100 мкл формальдегида (конечная концентрация 4%) в каждую лунку, содержащую оставшиеся 100 мкл полной среды, и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре. После фиксирования жидкость удаляли и клетки промывали 200 мкл отмывочного буфера (1% BSA, 0,2% Triton X-100, 1X PBS). Отмывочный буфер заменяли на 100 мкл на лунку блокирующего буфера (2 капли лошадиной сыворотки (Vector Labs, Бурлингейм, Калифорния) на 5 мл отмывочного буфера) и инкубировали в течение ночи при 4°C. На следующий день клетки промывали с помощью 200 мкл на лунку отмывочного буфера. Клетки окрашивали мышиным антителом к фосфо-гистону H3 (0,5 мкг/мл, 05-806, также известный как pH3 или p-HH3, Millipore) и кроличьим антителом к перицентрину (0,5 мкг/мл, ab4448-100, Abcam) в 100 мкл отмывочного буфера в течение 2 часов при комнатной температуре. Клетки дважды промывали с помощью 200 мкл отмывочного буфера. Клетки окрашивали козьим антителом к мышиным IgG-alexa-647 (A21236) и козьим антителом к кроличьим IgG-alexa-488 (A11034) Invitrogen при 1 мкг/мл в отмывочном буфере, содержавшем ДНК-краситель Hoechst 33342 (2 мкг/мл), в течение 2 часов при комнатной температуре в темноте. Клетки дважды промывали с помощью 200 мкл на лунку отмывочного буфера. После последней промывки в каждую лунку добавляли 150 мкл 1X PBS и планшеты герметично закрывали (Perkin Elmer, Волтгем, Массачусетс). Данные визуализирующего исследования собирали на считывающем устройстве Cellomics ArrayScan VTI HCS (SN03090745F, ThermoFisher Scientific) с

применением протокола анализа с помощью SpotDetector.V4 (версия 6.6.0 (сборка 8153) с использованием объектива с увеличением 20X, эксперимент #1: проводили сбор 100 полей на лунку; эксперимент #2: проводили сбор 67 полей на лунку). Сначала собираемые данные о митотическом индексе (процент объектов, положительных по фосфо-гистону H3) собирали, как описано выше. Затем, проводили виртуальное сканирование с переключением каналов (с применением объектов, положительных по фосфо-гистону H3, в качестве первичного объекта для разделения вместо объекта, представляющего собой ядро) с установкой количества окрашенных по перицентрину участков для каждого митотического объекта. Для каждой лунки определяли процент митотических объектов с > 2 окрашенными по перицентрину участками (показатель количества центросом). Для контроля с DMSO минимальное число объектов, положительных по фосфо-гистону H3, устанавливали как 250 объектов на лунку. Выходные данные включают следующее.

(1) Количество применимых объектов. Данное представляет собой общее количество применимых объектов, представляющих собой ядро, на лунку (для установки диапазона для применимых объектов применяли Object.Area.Ch1 и Object.VarIntensity.Ch1, объекты, вне данного диапазона исключались).

(2) Количество выбранных объектов, pHH3. Данное представляет собой общее количество применимых положительных по фосфо-гистону H3 митотических объектов на основе установленного порогового уровня интенсивности флуоресценции с применением alexa-647 (канал 3).

(3) % выбранных объектов, pHH3. Данное представляет собой процент объектов, положительных по фосфо-гистону H3 [(количество выбранных объектов, pHH3 ÷ количество применимых объектов) x100].

(4) %HIGH_ObjectSpotTotalCountCh2.

[00288] Процент положительных по фосфо-гистону H3 митотических объектов для каждой концентрации ингибитора KIF18A строили на графике с применением программного обеспечения GraphPad Prism (V7.0.4) и кривые концентрация-ответ аппроксимировали с применением 4-параметрического уравнения (переменный угловой коэффициент). Среднее значение EC50 и стандартное отклонение определяли на основе двух независимых экспериментов в двух повторностях.

[00289] Иллюстративные изображения уровня обработанных DMSO и ингибитором KIF18A клеток в поле зрения представлены на фигуре 7A. Аппроксимированные кривые концентрация ингибитора KIF18A-ответ, демонстрирующие средний процент митотических объектов с >2 окрашенными по перицентрину участками или средний процент объектов, положительных по фосфо-гистону H3, представлены на фигуре 7B. Показаны планки погрешностей (SD). Средние значения EC50 для количества окрашенных по перицентрину участков и фосфо-гистона H3 показаны в таблице на фигуре 7C.

[00290] Черные объекты на фигуре 7A представляет собой положительные по фосфо-гистону H3 митотические клетки. Устанавливали количество окрашенных серым

участков (положительных по перицентрину) для каждой положительной по фосфо-гистону H3 митотический клетки. Как показано на фигурах 7A - 7C, обработка ингибитором KIF18A активирует контрольную точку сборки веретена деления (SAC) в митозе, что было измерено на основе повышения положительных по фосфо-гистону H3 клеток со значением EC50, составлявшим 0,0794 мкМ. Зависимое от концентрации повышение, стимулированное ингибитором KIF18A, окрашивания по перицентрину (>2 участков на митотический объект) со значением EC50, составлявшим 0,0522 мкМ, было аналогичным значению EC50 в анализе фосфо-гистона H3, что свидетельствует о том, что такие митотические фенотипы в клетках MDA-MB-157, вероятно, являются сцепленными. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что подавление АТФазной моторной активности KIF18A с помощью низкомолекулярных ингибиторов KIF18A приводит к остановке клеточного цикла в митозе и избыточному окрашиванию по перицентрину.

ПРИМЕР 6

[00291] В данном примере описано исследование с анализированием эффектов ингибитора KIF18A на митотические отличительные признаки центросом/хромосом и апоптоз раковых клеток.

[00292] Для анализирования эффектов ингибитора KIF18A на митотические отличительные признаки центросом/хромосом и апоптоз раковых клеток анализировали отличительные признаки центросом в клетках TNBC CAL-51 и MDA-MB-157 с помощью иммунофлуоресцентного визуализирующего анализа. Клетки высевали в 96-луночный полистироловый планшет Cell Carrier Ultra (PerkinElmer) в 200 мкл полной среды и выращивали. Через 24 часа клетки обрабатывали в течение 24 часов с помощью DMSO (0,05%) или соединения C11 на основе ингибитора KIF18A (0,5 мкМ). Клетки фиксировали с помощью 2% формальдегида в течение 20 минут при комнатной температуре с последующей пермеабилизацей в 1X PBS с 0,1% Triton X-100 в течение 20 минут при комнатной температуре. Клетки дважды промывали с помощью 200 мкл отмывочного буфера (1X PBS/0,5% BSA, Rockland Immunochemicals). Клетки окрашивали с помощью 100 мкл мышиного антитела к CETN3 (1:2000, H00001070-M01, Abnova) и кроличьего антитела к перицентрину (1:2000, ab4448-100, Abcam) в 200 мкл отмывочного буфера и инкубировали в течение ночи при 4°C. Клетки дважды промывали с помощью 200 мкл отмывочного буфера. Клетки окрашивали с помощью 100 мкл вторичных антител [козьи антитела к мышиным IgG-alexa-488 (1:1000, A11029, Invitrogen) и козьи антитела к кроличьим IgG-alexa-647 (1:1000, A21244, Invitrogen) в отмывочном буфере в течение 2 часов при комнатной температуре с защитой от света. Клетки дважды промывали с последующим добавлением 100 мкл отмывочного буфера, содержавшего ДНК-краситель Hoechst 33342 (2 мкг/мл). Клетки визуализировали на конфокальном микроскопе на основе вращающегося диска PerkinElmer Ultraview Vox с применением масляного иммерсионного объектива с увеличением 60x со значениями длины волны возбуждения лазера, составлявшими 405 нм (Hoechst), 488 нм (alexa-488) и 647 нм (alexa-647). Собирали иллюстративные изображения с максимальной проекцией для митотических

объектов из каждой лунки обработки. Изображения показаны на фигуре 8A.

[00293] В отдельном эксперименте проводили анализ с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, линии клеток TNBC CAL-51 и MDA-MB-157 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 125000 и 150000 на лунку соответственно в полной среде для выращивания. На следующий день клетки обрабатывали с помощью DMSO, ингибитора KIF18A (0,5 мкМ) или ингибитора Eg5 испинесиба (0,05 мкМ) в 3 мл полной среды при конечной концентрации DMSO 0,5%. Через 48 часов получали клеточные лизаты для каждой группы обработки (объединяли среды и клетки из 3 лунок). Клетки лизировали и проводили вестерн-блоттинг, по сути как описано в примере 5. Первичные антитела включали мышиные антитела к расщепленному PARP (cl-PARP) (#51-900017, BD Pharmingen, 1:500), мышиные антитела к циклину B1 (554179, BD Pharmingen, 1:500) и кроличьи антитела к GAPDH (2118, Cell Signaling, 1:10,000). Результаты показаны на фигуре 8B.

[00294] Как показано на фигурах 8A и 8B обработка линий клеток TNBC ингибитором KIF18A селективно стимулировала изменения в отношении отличительных признаков центросом митотической клетки (изменения числовых показателей и фрагментация перицентриолярного вещества и центриоль) и апоптоза только в клетках MDA-MB-157 с мутантным вариантом TP53 и амплифицированным геном CCNE1, при этом клетки CAL-51 с TP53 дикого типа не показали изменений в отношении отличительных признаков центросомы или апоптоза относительно обработанных DMSO клеток. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что клетки TNBC с мутантным вариантом TP53 зависимы от моторной активности KIF18A для надлежащих выравнивания и сегрегации хромосом и что ингибирование KIF18A приводит к активации SAC и/или аберрирует отличительные признаки центросом, что приводит к образованию многополюсных веретен деления и апоптозу.

ПРИМЕР 7

[00295] В данном примере продемонстрировано исследование временной динамики клеточного цикла и экспрессии апоптотических белков в клетках HGSOC, обработанных ингибитором KIF18A.

[00296] Клетки HGSOC OVCAR-3 высевали при плотности 1,4 миллиона клеток в 100-мм планшеты для культивирования тканей в 10 мл полной среды для выращивания. На следующий день к клеткам добавляли полную среду для выращивания, содержавшую 2 мМ тимидина, и инкубировали их в течение 16 часов. Клетки трижды промывали в 1X PBS, затем добавляли полную среду для выращивания в течение 8 часов с последующим и вторым блокированием с помощью 2 мМ тимидина в течение 16 часов. Двойное блокирование тимидина останавливало клеточный цикл клеток на фазе G1/S клеточного цикла. Клетки освобождали от блокирования в G1/S сначала путем промывания трижды в 1X PBS, затем путем добавления полной среды для выращивания с DMSO или ингибитором KIF18A (соединение C11 при 0,5 мкМ). Получали клеточные лизаты в несколько разных моментов времени (4, 8, 10, 12, 14 и 24 часа). В качестве контролей

асинхронно выращенные клетки OVCAR-3 обрабатывали DMSO или ингибитором KIF18A (соединением C11 при 0,5 мкМ) и получали лизаты в момент времени, представлявший собой 24 часа. Первичные антитела включали мышиные антитела к расщепленному PARP (cl-PARP) (51-900017, BD Pharmingen, 1:500), мышиные антитела к циклину B1 (554179, BD Pharmingen, 1:500), кроличьи антитела к Mcl-1 (5453, Cell Signaling, 1:500), мышиные антитела к циклину E1 (MS-870-P, HE12, NeoMarkers, 1:2000), мышиные антитела к BubR1 (612503, BD Pharmingen, 1:5000), и кроличьи антитела к KIF18A (HPA039484, Simga, 1:2000), и мышиные антитела к β-актину (A5441, Simga, 1:5000). Результаты показаны на фигуре 9.

[00297] Изображение блоттинга показано на фигуре 9. Как показано на фигуре 9, обработанные ингибитором KIF18A клетки продемонстрировали повышение уровней белков циклина B1 и cl-PARP и снижение уровней Mcl-1 и циклина E1. Также продемонстрировано повышение уровней белков KIF18A и BubR1. На фигуре 9 "FL" относится к полноразмерному белку циклина E1, и "LMW" относится к низкомолекулярной форме циклина E1. Белок BubR1 при блоттинге изображается в виде белкового дублета из-за форм с посттрансляционными модификациями, например фосфорилированных и немодифицированных форм.

[00298] Результаты свидетельствуют о том, что обработка ингибитором KIF18A клеток HGSOC OVCAR-3 демонстрирует заметные изменения в отношении белков, которые обеспечивают контроль клеточного цикла и прогрессирование митоза (циклин B1, циклин E1, BubR1, KIF18A) и апоптоз (Mcl-1, cl-PARP), при этом такие изменений могут служить маркерами вовлечения мишеней при видах рака, чувствительных к ингибитору KIF18A.

ПРИМЕР 8

[00299] В данном примере продемонстрированы эффекты в отношении митоза, повреждения ДНК и апоптоза в клетках TNBC (мутантного по TP53, дефектного по RB1), обработанных двумя ингибиторами KIF18A.

[00300] С целью проанализировать эффекты в отношении митоза клетки TNBC BT-549 высевали в 6-луночные планшеты при плотности 100000 на лунку в 3 повторяющиеся лунки в 4 мл полной среды для выращивания. На следующий день клетки обрабатывали с помощью DMSO, ингибитора KIF18A № 1 (соединение C11, 0,5 мкМ) или ингибитора KIF18A № 2 (соединение C9, 0,01 мкМ) в 4 мл полной среды при конечной концентрации DMSO 0,5%. Через 48 часов получали клеточные лизаты для каждой группы обработки (объединяли среды и клетки из 3 лунок) с применением набора для экстракции тотального белка Minute™ (SD-001, Invent Biotechnologies), условия лизиса соответствовали протоколу изготовителя, предоставленному вместе со смесью ингибиторов протеаз (cOmplete™, Roche) и ингибиторов фосфатаз (PhosphoStop, Roche). Первичные антитела включали кроличьи антитела к фосфо-гистону H3 (серин-10) (06-570, Millipore, 1: 2000), мышиные антитела к γH2A.X (серин-139) (05-636, Millipore, 1: 2000), мышиные антитела к расщепленному PARP (cl-PARP) (#51-900017, BD Pharmingen, 1:500), мышиные антитела

к BubR1 (612503, BD Pharmingen, 1:5000), мышиные антитела к тотальному HEC1 (ab3613, ABCAM, 1: 1000), кроличьи антитела к pHEC1(серин-55) (GTX70017, Genetex, 1: 500) и кроличьи антитела к GAPDH (2118, Cell Signaling, 1:10,000). Изображение вестерн-блоттинга показано на фигуре 10A.

[00301] Также проводили иммуноокрашивание cGAS и γH2A.X (серин-139) в клетках TNBC BT-549. Клетки высевали на 2-луночное предметное стекло со стенками Lab-Tek при плотности 50000 клеток на лунку в полную среду для выращивания и выращивали в течение 2 дней до примерно 50% конфлюэнтности. Клетки обрабатывали в течение 48 часов с помощью DMSO (0,1%), ингибитора KIF18A (соединение C9, 0,2 мкМ) в 2 мл полной среды. Клетки фиксировали в 4% формальдегиде в течение 15 минут при комнатной температуре с последующим вторичным фиксированием в ледяном 90% метаноле в течение 10 минут при 4°C. После фиксирования клетки промывали в 2 мл отмывочного буфера (1% BSA, 0,2% Triton X-100, 1X PBS) и блокировали с помощью 1 мл блокирующего буфера (2 капли лошадиной сыворотки (Vector Labs, Бурлингейм, Калифорния) на 5 мл отмывочного буфера). Клетки окрашивали с помощью кроличьего антитела к cGAS (1:500, 15102, Cell Signaling) и мышиного антитела к γH2A.X (серин-139) (1:1000, 05-636, Millipore) в 1 мл отмывочного буфера в течение 2 часов при комнатной температуре. Клетки дважды промывали с помощью 2 мл отмывочного буфера. Клетки окрашивали вторичными антителами [козьи антитела к мышиным IgG-alexa-488 (1:2000, A11029, Invitrogen) и козьи антитела к кроличьим IgG-alexa-568 (1:2000, A11036, Invitrogen)] в отмывочном буфере, содержавшем ДНК-краситель DAPI (1:5000, 268298, Millipore) в течение 1 часа при комнатной температуре с защитой от света. Клетки дважды промывали с помощью 2 мл, и вынимали стенки, и добавляли каплю ProLong Anti-Fade (P36934, Invitrogen), затем устанавливали покровные стекла на стеклянные слайды. Снимали широкопольные изображения с применением объектива с увеличением 40x на вертикальном EPI-флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse NI-E с программным обеспечением Elements. Иллюстративные изображения, снятые с помощью широкопольного объектива с увеличением 40x, представлены на фигуре 10B.

[00302] Как показано на фигуре 10A, обработка клеток TNBC с мутантным вариантом TP53 и потерей RB1 ингибиторами KIF18A приводит к повышенной экспрессии маркеров митоза (фосфо-гистона H3, p-HEC1, дублета BubR1), маркера повреждения ДНК (γH2A.X) и маркера апоптоза (cl-PARP), что свидетельствует о том, что ингибирование KIF18A приводит к активации SAC, что приводит к усилению повреждения ДНК и апоптоза, при этом такие изменения могут служить маркерами вовлечения мишеней при видах рака, чувствительных к ингибитору KIF18A.

[00303] Как показано на фигуре 10B, цитоплазматические микроядра окрашивались положительно в отношении cGAS и/или γH2A.X, что свидетельствует о том, что обработка ингибитором KIF18A приводит к усилению повреждения ДНК и увеличению количества положительных по cGAS микроядер, которые могут служить источником иммуностимулирующей цитоплазматической ДНК.

ПРИМЕР 9

[00304] В данном примере продемонстрирован эксперимент с анализированием эффекта локализации белка KIF18A в митозе в раковых клетках, обработанных ингибитором KIF18A.

[00305] Для анализирования эффекта локализации белка KIF18A в раковых клетках, обработанных ингибитором KIF18A, проводили иммуноокрашивание по KIF18A и центрину-3 в клетках HeLa (фигура 11). Клетки высевали на 2-луночное предметное стекло со стенками Lab-Tek при плотности 100 000 клеток на лунку в полную среду для выращивания и выращивали в течение 2 дней до примерно 80% конфлюэнтности. Клетки обрабатывали в течение 6 часов с помощью DMSO, ингибитора KIF18A (соединение C9, 0,05 мкМ) в 2 мл полной среды. Клетки фиксировали в 4% формальдегиде в течение 15 минут при комнатной температуре с последующим вторичным фиксированием в ледяном 90% метаноле в течение 10 минут при 4°C. После фиксирования клетки промывали в 2 мл отмывочного буфера (1% BSA, 0,2% Triton X-100, 1X PBS) и блокировали с помощью 1 мл блокирующего буфера (2 капли лошадиной сыворотки (Vector Labs, Бурлингейм, Калифорния) на 5 мл отмывочного буфера). Клетки окрашивали кроличьим антителом к KIF18A (1:3000, A301-080A 05-806, Вэтил) и мышиным антителом к CETN3 (1:1000, H00001070-M01, Abnova) в 1 мл отмывочного буфера в течение 2 часов при комнатной температуре. Клетки дважды промывали с помощью 2 мл отмывочного буфера. Клетки окрашивали вторичными антителами [козьи антитела к мышиным IgG-alexa-488 (1:2000, A11029, Invitrogen) и козьи антитела к кроличьим IgG-alexa-568 (1:2000, A11036, Invitrogen)] в отмывочном буфере, содержавшем ДНК-краситель DAPI (1:5000, 268298, Millipore) в течение 1 часа при комнатной температуре с защитой от света. Клетки дважды промывали с помощью 2 мл, и вынимали стенки, и добавляли каплю ProLong Anti-Fade (P36934, Invitrogen), затем устанавливали покровные стекла на стеклянные слайды. Снимали широкопольные изображения с применением объектива с увеличением 40x на вертикальном EPI-флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse NI-E с программным обеспечением Elements. Иллюстративные изображения иммуноокрашенных митотических клеток представлены на фигуре 11. KIF18A показан красным цветом, а центрин-3 показан зеленым цветом.

[00306] Как показано на фигуре 11, обработка ингибитором KIF18A приводит к некорректной локализации белка KIF18A в митозе, при этом такие изменения локализации белка KIF18A могут служить маркером вовлечения мишени при видах рака и в нормальных тканях с суррогатной пролиферацией.

ПРИМЕР 10

[00307] В данном примере продемонстрировано, как соединение C14 стимулирует митотический маркер, представляющий собой фосфо-гистон H3, в ксенотрансплантатной модели опухоли HGSOC человека OVCAR-3 ($TP53^{MUT}$, $CCNE1^{AMP}$) у самок бестимусных голых мышей.

[00308] Самкам бестимусных голых мышей в правый бок вводили подкожно с

помощью инъекции 5 × 10^6 клеток OVCAR-3 в 0,1 мл. После приживления опухоли (средний объем опухоли составлял от 450 до 750 мм^3) животных рандомизировали на 5 группы обработки (среда-носитель отдельно, ингибитор KIF18A при 3, 10, 30 или 100 мг/кг) с 3 животными на группу. Опухоль и плазму крови собирали через 24 часа после обработки для фармакокинетического анализа, и опухоль - для фармакодинамического анализа. Препараты лизатов белков опухоли получали путем быстрого замораживания, размалывания в порошок и лизировали и обрабатывали с применением протокола для набора для экстракции тотальных гистонов EpiQuik (OP-0006 Epigentek, Фармингдейл, Нью-Йорк). Концентрации лизатов белков определяли с применением набора для анализа белков BCA (23227, Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Лизаты, нормализованные в отношении тотального белка на лунку, загружали в планшеты для электрохемилюминесцентного иммуноанализа Meso Scale Discovery (MSD) при 30 мкг/лунка в литическом буфере. MSD-анализ в отношении pHH3 проводили в соответствии с протоком изготовителя для одноплексных MSD-анализов с применением антитела к фосфо-гистону H3 (серин-10) (pHH3) и анализировали на обнаруживающем устройстве для считывания люминесценции Sector Imager S16000 (MSD, Гейтерсберг, Мэриленд). Лизаты нормализовали в отношении общего белка, и кратная стимуляция pHH3 представляет собой среднее по группе необработанное значение на основе MSD, деленное на среднее необработанное значение на основе MSD для обработанной средой-носителем группы. Данные строили на графике с применением программного обеспечения GraphPad Prism (V7.0.4), столбиковая диаграмма показывает уровень сигнала pHH3, представленный в виде среднего значения RU для каждой группы обработки со стандартным отклонением среднего значения (SEM). Кратная стимуляция pHH3 указана для каждой группы обработки ингибитором KIF18A относительно среднего исходного значения сигнала pHH3 для группы со средой-носителем. Микромолярная концентрация ингибитора KIF18A в плазме крови и опухоли указана на правой вертикальной оси. Статистическую значимость определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим апостериорным анализом Даннетта (***p=0,0002, ****p ≤0,0001).

[00309] График люминесценции, представляющий собой уровень фосфо-гистона H3, строили для каждой дозы ингибитора KIF18A (или контроля со средой-носителем), показан на фигуре 12. На графике показан уровень сигнала фосфо-гистона H3, представленный в виде средних значений RU для каждой группы обработки с SEM. Кратная стимуляция фосфо-гистона H3 указана для каждой группы обработки ингибитором KIF18A относительно среднего исходного значения сигнала фосфо-гистона для группы со средой-носителем. Концентрация ингибитора KIF18A (мкМ) в плазме крови (▲) и опухоли (■) указана на правой вертикальной оси. Статистическую значимость определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим апостериорным анализом Даннетта (***p=0,0002, ****p <0,0001).

[00310] Как показано на фигуре 12, ингибитор KIF18A стимулировал дозозависимое повышение уровней митотического маркера, представляющего собой

фосфо-гистон H3, в ксенотрансплантатах опухоли HGSOC OVCAR-3 ($TP53^{MUT}$, $CCNE1^{AMP}$) у мышей. Эти данные свидетельствуют о том, что повышенные уровни фосфо-гистона H3 были зависимы от дозы и экспозиции, указывая на то, что фосфо-гистон H3 представляет собой подходящий фармакодинамический маркер, где ≥4,6-кратная стимуляция сигнала фосфо-гистона H3 коррелировала с регрессом опухоли при дозах ингибитора KIF18A ≥10 мг/кг.

ПРИМЕР 11

[00311] В данном примере описаны иллюстративные стадии получения представленных в качестве примера ингибиторов KIF18A, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению.

[00312] По всему объему данного примера могут применять следующие аббревиатуры.

AcOH	уксусная кислота
водн или водн.	водный
BOC или Boc	*трет*-бутилоксикарбонил
DCE	1,2-дихлорэтан
DCM	DCM
DMAP	4-диметиламинопиридин
DMF	N, N-диметилформамид
DMSO	диметилсульфоксид
ESI или ES	ионизация электрораспылением
Et	этил
Et_2O	диэтиловый эфир
EtOH	этиловый спирт
EtOAc	EtOAc
г	граммы
ч	час
HPLC	жидкостная хроматография при высоком давлении
iPr	изопропил
iPr_2NEt или DIPEA	N-этилдиизопропиламин (основание Хунига)
KOAc	ацетат калия
LAH	алюмогидрид лития
LDA	диизопропиламид лития
LC MS, LCMS, LC-MS или LC/MS	масс-спектрометрия с жидкостной хроматографией
масса/заряд	масса, деленная на заряд

Me	метил
MeOH	метанол
мг	миллиграммы
мин	минуты
мл	миллилитры
MS	масс-спектры
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
RT или к. т.	комнатная температура
нас. или насыщ.	насыщенный
SFC	сверхкритическая флюидная хроматография
TEA или Et_3N	триметиламин
TFA	трифторуксусная кислота
THF	тетрагидрофуран
Xantphos	4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметилксантен

[00313] Если не указано иное, то все материалы получены от коммерческих поставщиков и применялись без дополнительной очистки. Все части представлены по весу, а значения температуры представлены в градусах Цельсия, если не указано иное. Все реакции под воздействием микроволнового излучения проводили с помощью Smith Synthesizer™ от Biotage™. Все соединения показали спектры ЯМР, согласующиеся с их структурами. Значения точки плавления определяли на приборе Бучи, и они являются нескорректированными. Масс-спектральные данные определяли с использованием методики ионизации электрораспылением. Все вещества из примеров очищали до > 90% чистоты, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Если не указано иное, то реакции осуществляли при комнатной температуре.

[00314] При синтезе соединений по настоящему изобретению может требоваться использование некоторых уходящих групп. Термин "уходящие группы" ("LG"), как правило, относится к группам, которые могут быть замещены нуклеофилом. Такие уходящие группы известны в уровне техники. Примеры уходящих групп включают без ограничения галогениды (например, I, Br, F, Cl), сульфонаты (например, мезилат, тозилат), сульфиды (например, SCH_3), N-гидроксисукцинимид, N-гидроксибензотриазол и т. п. Примеры нуклеофилов включают без ограничения амины, тиолы, спирты, реактивы Гриньяра, анионные формы (например, алкоксиды, амиды, карбанионы) и т. п.

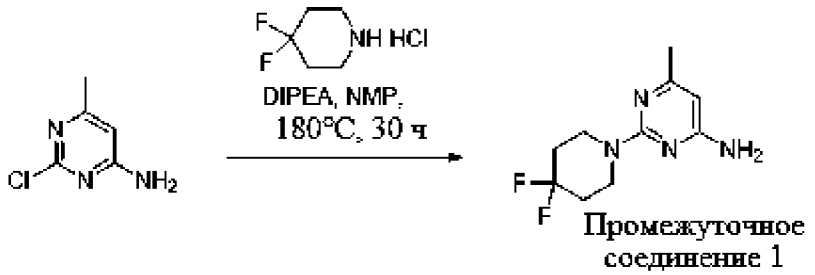
[00315] Примеры, представленные ниже, иллюстрируют конкретные варианты осуществления настоящего изобретения. Такие примеры предназначены для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема формулы изобретения каким-либо образом.

[00316] Следует отметить, что, если процент (%) применяют по отношению к жидкости, он представляет собой процент по объему относительно раствора. При применении по отношению к твердому веществу он представляет собой процент

относительно композиции твердых веществ. Материалы, полученные от коммерческих поставщиков, как правило, применяли без дополнительной очистка. Реакции, подразумевающие чувствительные к воздуху или влаге реагенты, как правило, выполняли в атмосфере азота или аргона. Чистоту измеряли с применением системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) с УФ-обнаружением при 254 нм и 215 нм (система A: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8 4,6×150 мм, 5 мкм, 5-100% CH_3CN в H_2O с 0,1% TFA в течение 15 мин. при 1,5 мл/мин.; система B: Zorbax SB-C8, 4,6×75 мм, 10-90% CH_3CN в H_2O с 0,1% муравьиной кислоты в течение 12 мин. при 1,0 мл/мин.) (Agilent Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния, США). Хроматографию на силикагеле, как правило, выполняли с использованием предварительно загруженных картриджей с силикагелем (Biotage, Упсала, Швеция или Teledyne-Isco, Линкольн, штат Небраска, США). ^{1}H ЯМР-спектры записывали на спектрометре Bruker AV-400 (400 МГц) (Bruker Corporation, Мэдисон, штат Висконсин, США) или спектрометре Varian (Agilent Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния, США) 400 МГц при температуре окружающей среды. Все наблюдаемые протоны приведены в частях на миллион (ppm) в слабом поле от тетраметилсилана (TMS) или другого внутреннего эталона в соответствующем указанном растворителе. Данные приведены следующим образом: химический сдвиг, мультиплетность (s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, br=широкий, m=мультиплет), константы взаимодействия и число протонов. Масс-спектральные (MS) данные низкого разрешения определяли на Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния, США) для LC/MS с УФ-обнаружением при 254 нм и 215 нм и в режиме электрораспыления с низким резонансом (ESI).

[00317] ПОЛУЧЕНИЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ 1-13

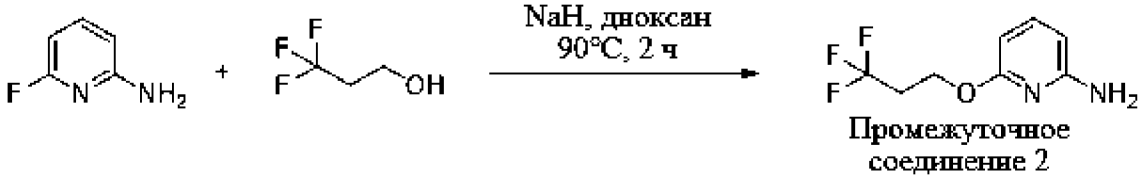
[00318] **Промежуточное соединение 1: 2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-амин**



[00319] Смесь 2-хлор-6-метилпиримидин-4-амина (46 г, 320 ммоль, Combi-Blocks, Сан-Диего, штат Калифорния, США), 4,4-дифторпиперидина гидрохлорида (76 г, 481 ммоль, Combi-Blocks, Сан-Диего, штат Калифорния, США) и DIPEA (166 мл, 961 ммоль) в NMP (460 мл, 10,00 мл/г) помещали в автоклав (1 л) и нагревали при 180°C в течение 30 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и гасили водой (500 мл), экстрагировали с помощью этилацетата (2×1000 мл). Органический слой промывали с помощью солевого раствора (500 мл), высушивали (Na_2SO_4), фильтровали и

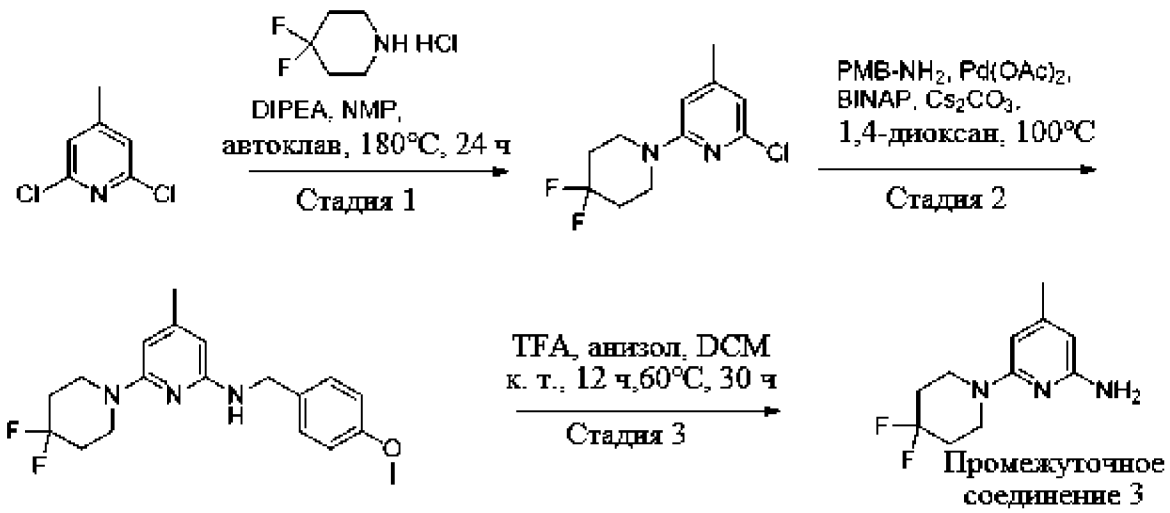
концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал адсорбировали на пробке из силикагеля и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (60-120 меш) с элюированием с помощью 50% - 100% Е в гексанах в качестве элюента с получением продукта. Данный продукт повторно растворяли в этилацетате (500 мл), промывали водой (2×500 мл). Органический слой высушивали (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Желтое твердое вещество снова суспендировали в гексанах (400 мл) и перемешивали в течение 30 мин. Взвесь фильтровали, промывали с помощью гексанов (100 мл), высушивали под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения (58 г, выход: 79%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 6,33 (s, 2H), 5,63 (s, 1H), 3,80-3,78 (dd, J=6,8, 4,7 Гц, 4H), 2,06 (s, 3H), 1,95-1,85 (tt, J=14,2, 5,7 Гц, 4H). *масса/заряд* (ESI): 229,2 $(M+H)^+$.

[00320] Промежуточное соединение 2: 6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-амин



[00321] В раствор 6-фторпиридин-2-амина (50 г, 450 ммоль, Combi-Blocks) в 1,4-диоксане (500 мл) добавляли 3,3,3-трифторпропан-1-ол (102 г, 892 ммоль, Apollo) в атмосфере азота и реакционную смесь охлаждали до 0°C. NaH (60% в минеральном масле, 42,8 г, 1780 ммоль) добавляли в реакционную смесь при 0°C и полученную смесь перемешивали при 90°C в течение 2 ч. реакционную смесь гасили холодной водой (500 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×1000 мл). Объединенные органические экстракты высушивали (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (60-120 меш) с применением 10% этилацетата в гексанах с получением указанного в заголовке соединения (45 г, выход 50%) в виде бледно-коричневого масла. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): *δ* 7,30-7,26 (t, J=7,8 Гц, 1H), 6,02-6,00 (dd, J=7,8, 0,8 Гц, 1H), 5,89-5,86 (m, 3H), 4,36-4,33 (t, J=6,2 Гц, 2H), 2,79-2,67 (qt, J=11,5, 6,2 Гц, 2H). *масса/заряд* (ESI): 207,1 $(M+H)^+$.

[00322] Промежуточное соединение 3: 6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-амин



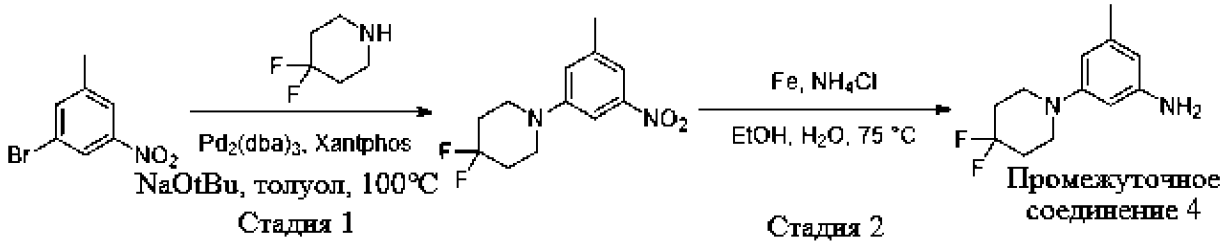
[00323] Стадия 1. В автоклав добавляли 2,6-дихлор-4-метилпиридин (80 г, 490 ммоль), гидрохлорид 4,4-дифторпиперидина (86 г, 540 ммоль) и DIPEA (342 мл, 1980 ммоль) в NMP (800 мл). Реакционную смесь нагревали при 180°C в течение 24 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и подщелачивали до pH ~9 с применением 10% водного раствора $NaHCO_3$. Реакционную смесь экстрагировали этилацетатом (2×1500 мл), промывали водой (1500 мл), высушивали (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (60-120 меш) с применением 5-10% этилацетата в гексанах с получением смеси 2,6-дихлор-4-метилпиридина и 2-хлор-6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридина в соотношении 1:3 (102 г) в виде бледно-коричневого масла. Данную смесь (102 г) дополнительно очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой с применением 60% ацетонитрила в воде в качестве элюента с получением 2-хлор-6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридина (70 г, выход 58%) в виде бледно-коричневой жидкости. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 6,76 (s, 1H), 6,57 (s, 1H), 3,66 (t, J=5,6 Гц, 4H), 2,22 (s, 3H), 2,03-1,91 (m, 4H). *масса/заряд* (ESI): 247,1 $(M+H)^+$.

[00324] Стадия 2. В раствор 2-хлор-6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридина (30,0 г, 122 ммоль) в 1,4-диоксане (300 мл) добавляли (4-метоксифенил)метанамин (23,8 мл, 182 ммоль) и Cs_2CO_3 (79 г, 240 ммоль). Реакционную смесь дегазировали и продували азотом в течение 30 мин. BINAP (7,57 г, 12,2 ммоль) и ацетат палладия(II) (2,73 г, 12,2 ммоль) добавляли в реакционную смесь и перемешивали при 100°C в течение 16 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через слой из CELITE® и промывали этилацетатом (100 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток экстрагировали с помощью EtOAc (2×500 мл), промывали водой (500 мл), затем солевым раствором (500 мл). Объединенные органические экстракты высушивали (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (60-120 меш) с применением 5-8% этилацетата в гексанах с получением 6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-N-(4-метоксибензил)-4-метилпиридин-2-амина

(48 г, выход 76%) в виде желтого масла. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 7,22 (d, J=7,2 Гц, 2H), 6,85 (d, J=7,2 Гц, 2H), 6,64 (t, J=6,0 Гц, 1H), 5,84 (s, 1H), 5,68 (s, 1H), 4,31 (d, J=6,0 Гц, 2H), 3,71 (s, 3H), 3,56 (t, J=5,6 Гц, 4H), 2,05 (s, 3H), 1,90-1,80 (m, 4H). *масса/заряд* (ESI): 348,1 $(M+H)^+$.

[00325] Стадия 3. В раствор 6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-N-(4-метоксибензил)-4-метилпиридин-2-амина (48,0 г, 138 ммоль) в сухом дихлорметане (480 мл) добавляли анизол (30,2 мл, 276 ммоль) и TFA (240 мл, 3120 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 55°C в течение 4 ч и концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в воде (200 мл), и повышали основность с помощью 10% водного раствора бикарбоната натрия до pH ~8, и экстрагировали этилацетатом (2×500 мл). Объединенные органические слои промывали водой (200 мл), затем солевым раствором (200 мл), высушивали (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением от 25% до 35% этилацетата в гексанах с получением 6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-амина (~85% согласно LCMS) в виде коричневого масла. Данный материал дополнительно очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой с применением 50-60% ацетонитрила в воде с получением 6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-амина (16,5 г, 72 ммоль, выход 53%) в виде коричневого масла. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 5,86 (s, 1H), 5,65 (s, 1H), 5,48 (s, 2H), 3,56 (t, J=5,2 Гц, 4H), 2,06 (s, 3H), 1,96-1,87 (m, 4H). *масса/заряд* (ESI): 228,2 $(M+H)^+$.

[00326] Промежуточное соединение 4: 3-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-5-метиланилин

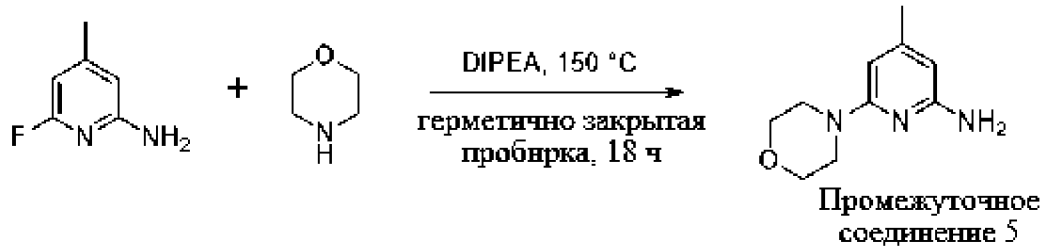


[00327] Стадия 1. Смесь 1-бром-3-метил-5-нитробензола (5 г, 23,14 ммоль), 4,4-дифторпиперидина (4,21 г, 34,7 ммоль), *трет*-бутоксида натрия (6,67 г, 69,4 ммоль), $Pd_2(dba)_3$ (2,12 г, 2,31 ммоль) и xantphos (1,34 г, 2,31 ммоль) в толуоле (50 мл) перемешивали при 100°C в течение 1,5 ч. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический экстракт промывали солевым раствором, высушивали над Na_2SO_4, фильтровали, концентрировали и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением 10% EtOAc в петролейном эфире с получением 4,4-дифтор-1-(3-метил-5-нитрофенил)пиперидина (3,70 г, 14,44 ммоль, выход 62%) в виде серого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ ppm 7,55 (t, J=2,3 Гц, 1 H), 7,45 (s, 1 H), 7,32 (d, J=2,3 Гц, 1 H), 3,46 (t, J=5,8 Гц, 4 H), 2,38 (s, 3 H), 1,96-2. 04 (m, 4 H). *масса/заряд* (ESI): 257,1 $(M+H)^+$.

[00328] Стадия 2. Смесь 4,4-дифтор-1-(3-метил-5-нитрофенил)пиперидина (3,7 г,

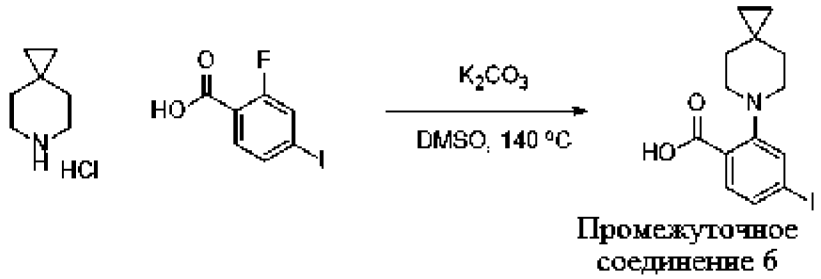
14,44 ммоль), порошка железа (8,06 г, 144 ммоль) и хлорида аммония (7,72 г, 144 ммоль) в EtOH (30 мл) и воде (7 мл) перемешивали при 75°C в течение 16 ч. Реакционную смесь фильтровали через слой из CELITE®, промывали метанолом и фильтрат концентрировали. Остаток разбавляли водой и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический экстракт промывали солевым раствором, высушивали над Na_2SO_4, фильтровали, концентрировали и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с элюированием с помощью 30-40% EtOAc в петролейном эфире с получением 3-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-5-метиланилина (2,6 г, 11,49 ммоль, выход 80%) в виде коричневого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ ppm 6,00 (s, 2 H), 5,89 (s, 1 H), 4,81 (s, 2 H), 3,16-3,22 (m, 4 H), 2,09 (s, 3 H), 1,94-2,04 (m, 4 H). *масса/заряд* (ESI): 227,1 $(M+H)^+$.

[00329] Промежуточное соединение 5: 4-метил-6-морфолинопиридин-2-амин



[00330] В 250-мл пробирку для работы под высоким давлением добавляли 6-фтор-4-метилпиридин-2-амин (10,0 г, 79 ммоль, Sibian chemicals, Китай), морфолин (8,29 г, 95 ммоль) и DIPEA (41,5 мл, 238 ммоль). Смесь нагревали при 150°C в течение 18 ч. Реакционную смесь гасили водой (100 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (2×250 мл). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором (200 мл), высушивали над безводным Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток абсорбировали на пробке из силикагеля и очищали с помощью флеш-хроматография через предварительно загруженную колонку с силикагелем Redi-Sep (40 г) с элюированием с помощью градиента от 1% до 15% EtOAc в гексанах с получением указанного в заголовке соединения (8,5 г, 44,0 ммоль, выход 56%) в виде коричневого полутвердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 5,75 (s, 1H), 5,67 (s, 1H), 5,44 (s, 2H), 3,65 (t, J=8,4 Гц, 4H), 3,30 (t, J=8,4 Гц, 4H), 2,06 (s, 3H). *масса/заряд* (ESI): 194,2 $(M+H)^+$.

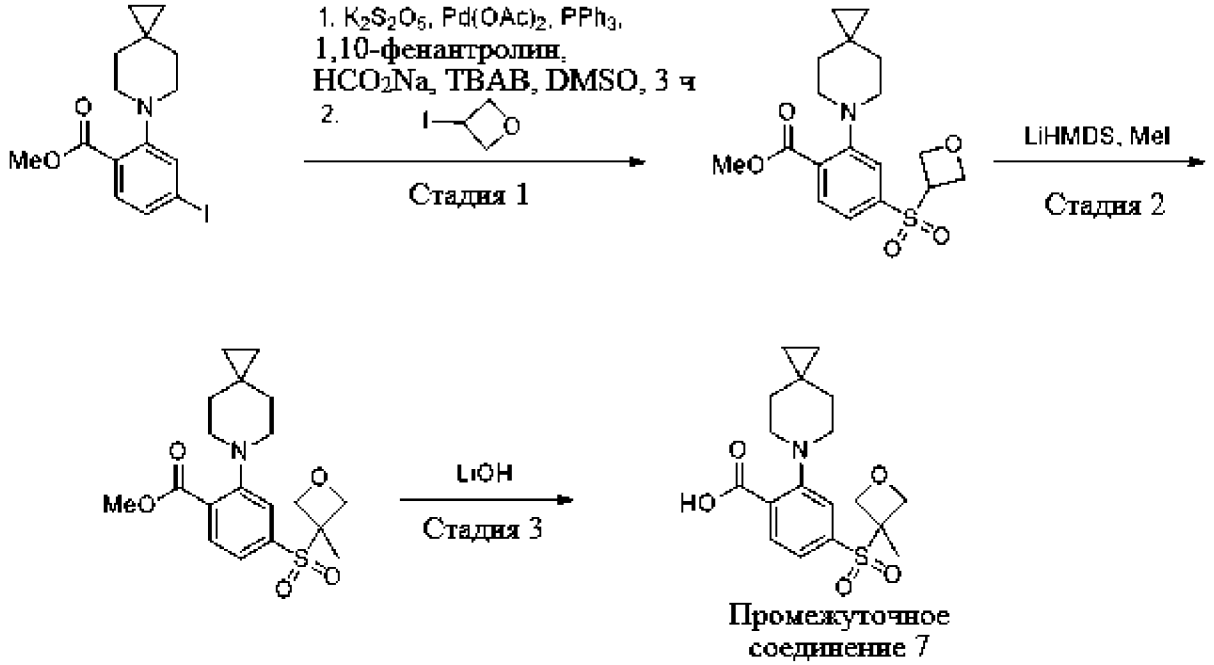
[00331] Промежуточное соединение 6: 4-йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензойная кислота



[00332] В раствор 2-фтор-4-йодбензойной кислоты (300 г, 1,13 моль, Combi-Blocks,

Сан-Диего, Калифорния) в DMSO (2,1 л) добавляли гидрохлорид 6-азаспиро[2.5]октана (216 г, 1,47 моль, Wuxi AppTec) при 20°C. Затем добавляли K_2CO_3 (468 г, 3,38 моль) и реакционный раствор перемешивали при 140°C в течение 48 часов в атмосфере N_2. Реакционный раствор медленно выливали в ледяную воду (4,20 л), затем экстрагировали гексанами (2 л x 3). Водную фазу отделяли и корректировали до pH=6 с помощью HCl (2 M). Твердое вещество осаждали и собирали. Твердое вещество промывали водой (700 мл x 3) и фильтровали. Влажное твердое вещество распределяли на большом предметном стекле и высушивали на воздухе при 25°C в течение 72 часов. 4-Йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензойную кислоту (280 г, 777 ммоль, выход 69%) получали в виде светло-желтого твердого вещества. 400 МГц DMSO-d_6 δ ppm 8,07 (s, 1H), 7,76-7,66 (m, 2H), 3,10 (t, J=5,2 Гц, 4H), 1,55 (br s, 4H), 0,41 (s, 4H).

[00333] Промежуточное соединение 7: 4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензойная кислота



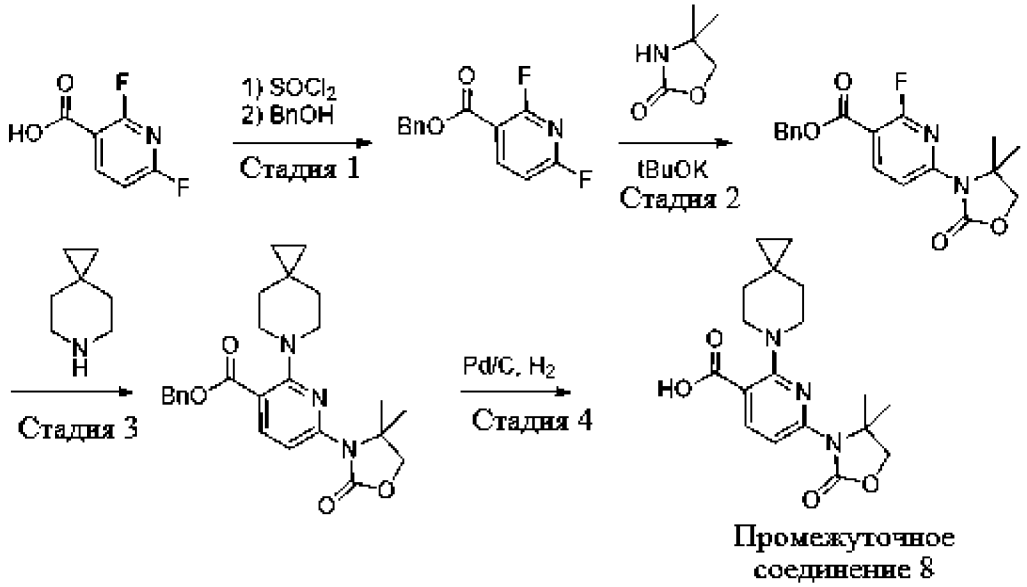
[00334] Стадия 1. В стеклянном реакционном сосуде для микроволновой обработки (20 мл) в раствор метил-4-йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензоата (2,0 г, 5,39 ммоль, полученный аналогичным способом, как описанный для пр. соед. 7) в DMSO (15,0 мл) добавляли метабисульфит калия (2,40 г, 10,78 ммоль), TBAB (1,91 г, 5,93 ммоль), формиат натрия (0,81 г, 11,85 ммоль), трифенилфосфин (0,212 г, 0,81 ммоль), 1,10-фенантролин (0,146 г, 0,81 ммоль) и ацетат палладия (0,060 г, 0,27 ммоль) в атмосфере азота. Реакционную смесь дегазировали и продували азотом в течение 10 мин. Реакционный сосуд герметично закрывали и нагревали при 70°C в течение 3 ч. Реакционную смесь охлаждали до к. т., и добавляли 3-йодоксетан (2,39 г, 12,97 ммоль), и перемешивали при 120°C в течение 4 ч. Реакционную смесь гасили водой (100 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (2×100 мл). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором (100 мл), высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали при

пониженном давлении. Неочищенный остаток адсорбировали на пробке из силикагеля (60-120 меш) и очищали с помощью хроматографии на силикагеле через предварительно загруженную колонку с силикагелем Redi-Sep (40 г) с элюированием с помощью градиента 1-40% EtOAc в гексанах с получением метил-4-(оксетан-3-илсульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензоата (360 мг, выход 15%) в виде желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d): δ 7,79 (dd, J=8,1, 1,6 Гц, 1H), 7,51 (d, J=1,8 Гц, 1H), 7,38 (dd, J=8,0, 1,8 Гц, 1H), 4,98 (dd, J=7,4, 6,2 Гц, 2H), 4,80 (dd, J=8,4, 7,1 Гц, 2H), 4,45 (tt, J=8,4, 6,2 Гц, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,22-3,10 (m, 4H), 1,52 (t, J=5,2 Гц, 4H), 0,38 (s, 4H). *масса/заряд* (ESI): 366,1 [M+1].

[00335] Стадия 2. В раствор метил-4-(оксетан-3-илсульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензоата (350 мг, 0,96 ммоль) в THF (5 мл) добавляли LiHMDS (1,0 M раствор в гексанах, 1,92 мл, 1,91 ммоль) при -78°C в атмосфере азота и перемешивали в течение 1 ч. Медленно добавляли йодметан (71,9 мкл, 1,15 ммоль) в реакционную смесь и медленно нагревали до к. т. Реакционную смесь гасили с помощью насыщ. водного раствора NH_4Cl (25 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (2×50 мл). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором (50 мл), высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток адсорбировали на пробке из силикагеля (60-120 меш) и очищали с помощью хроматографии на силикагеле через предварительно загруженную колонку с силикагелем Redi-Sep (12 г) с элюированием с помощью градиента 1-50% EtOAc в гексанах с получением метил-4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензоата (260 мг, выход 72%) в виде бледно-желтого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d): δ 7,82 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,53 (d, J=1,6 Гц, 1H), 7,41 (dd, J=8,0, 1,6 Гц, 1H), 5,20 (d, J=6,9 Гц, 2H), 4,43 (d, J=6,9 Гц, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,24-3,12 (m, 4H), 1,70 (s, 3H), 1,58 (t, J=5,4 Гц, 4H), 0,40 (s, 4H). *масса/заряд* (ESI): 380,2 [M+1].

[00336] Стадия 3. В раствор метил-4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензоата (250 мг, 0,66 ммоль) в THF (5 мл), воде (5 мл) и метаноле (1 мл) добавляли гидроксид лития (63 мг, 2,64 ммоль) и перемешивали при к. т. в течение 5 ч. Реакционную смесь подкисляли с помощью 1,5 н. HCl до pH ~4. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (3×50 мл), промывали солевым раствором (25 мл), высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением 4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензойной кислоты (200 мг, выход 83%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ 16,01 (s, 1H), 8,05 (d, J=8,1 Гц, 1H), 7,91 (d, J=1,7 Гц, 1H), 7,72 (dd, J=8,0, 1,8 Гц, 1H), 5,01 (d, J=7,4 Гц, 2H), 4,48 (d, J=7,4 Гц, 2H), 3,19 (t, J=5,2 Гц, 4H), 1,60-1,52 (m, 7H), 0,41 (s, 4H). *масса/заряд* (ESI): 366,2 [M+1].

[00337] Промежуточное соединение 8: 6-(4,4-диметил-2-оксооксазолидин-3-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотиновая кислота



[00338] Стадия 1. 2,6-Дифторникотиновую кислоту (10,6 г, 66,6 ммоль) и тионилхлорид (35 мл, 480 ммоль) объединяли в атмосфере азота и нагревали осторожно до температуры образования флегмы в течение 2 ч. Раствор концентрировали до сухого состояния при пониженном давлении. Толуол (100 мл) добавляли к неочищенному веществу, и его выпаривали до сухого состояния еще раз. Неочищенный хлорангидрид кислоты растворяли в DCM (50 мл) в атмосфере азота и охлаждали на ледяной бане. По каплям добавляли смесь триэтиламина (25 мл, 180 ммоль) и бензилового спирта (7,25 мл, 70,1 ммоль) в DCM (50 мл) в течение 10 мин и смесь перемешивали при к. т. в течение 30 мин. Затем добавляли 0,1 н. HCl (100 мл), и фазы смешивали и разделяли. Органическую фазу собирали, высушивали с помощью сульфата магния и выпаривали до сухого состояния при пониженном давлении с получением бензил-2,6-дифторникотината, который применяли без очистки. *Масса/заряд* (ESI): 250,0 $(M+H)^+$.

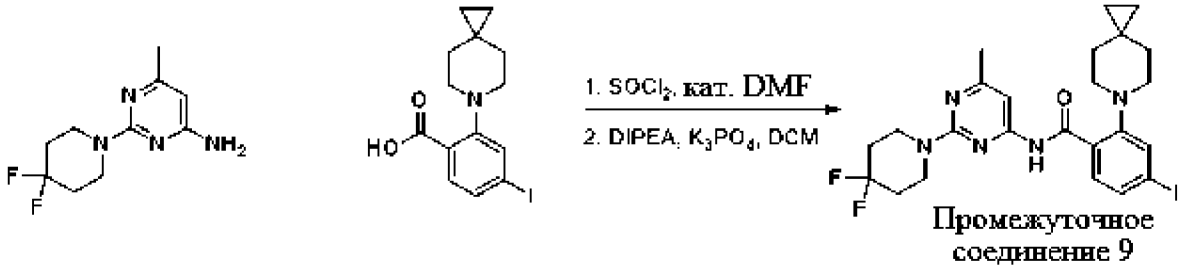
[00339] Стадия 2. 4,4-Диметилоксазолидин-2-он (0,80 г, 6,95 ммоль) растворяли в THF (15 мл) в атмосфере азота. Добавляли *трет*-бутоксид калия (0,75 г, 6,68 ммоль) и суспензию перемешивали при к. т. в течение 5 мин. Добавляли раствор бензил-2,6-дифторникотинат (1,60 г, 6,42 ммоль) в N, N-диметилацетамиде (40 мл) и смесь перемешивали при к. т. в течение 10 мин. Добавляли воду (75 мл), EtOAc (150 мл) и насыщ. хлорид аммония (25 мл), и фазы смешивали и разделяли. Органическую фазу собирали, промывали солевым раствором (50 мл) и выпаривали до сухого состояния при пониженном давлении. В результате очистки с помощью хроматографии на силикагеле (градиент от гептана до EtOAc) получали бензил-6-(4,4-диметил-2-оксооксазолидин-3-ил)-2-фторникотинат (1,82 г, 5,29 ммоль, выход 82%) в виде белого твердого вещества.

[00340] Стадия 3. Бензил-6-(4,4-диметил-2-оксооксазолидин-3-ил)-2-фторникотинат (1,81 г, 5,23 ммоль) растворяли в NMP (20 мл). Добавляли карбонат цезия (2,00 г, 6,14 ммоль) и 6-азаспиро[2.5]октан (0,60 г, 5,40 ммоль) и смесь перемешивали при к. т. в течение 18 ч. Добавляли воду (100 мл) и EtOAc (150 мл), и фазы смешивали и разделяли. Органическую фазу собирали, промывали солевым раствором и выпаривали до

сухого состояния при пониженном давлении. В результате очистки с применением хроматографии на силикагеле (от 0% до 40% EtOAc в гептане) получали бензил-6-(4,4-диметил-2-оксооксазолидин-3-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинат (1,77 г, 4,06 ммоль, выход 78%) в виде масла молочного цвета. *Масса/заряд* (ESI): 436,1 $(M+H)^+$.

[00341] Стадия 4. Бензил-6-(4,4-диметил-2-оксооксазолидин-3-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинат (1,77 г, 4,06 ммоль) растворяли в EtOAc (30 мл) и переносили в сосуд для работы под высоким давлением. Добавляли этанол (60 мл), затем 5% палладий на угле (сухой вес., 50% воды, 0,250 г, 0,117 ммоль). Суспензию перемешивали при 40 фунт/кв. дюйм водорода в течение 15 мин. Смесь фильтровали через слой CELITE® и твердое вещество промывали с помощью EtOAc (50 мл). Объединенный фильтрат выпаривали до сухого состояния при пониженном давлении с получением 6-(4,4-диметил-2-оксооксазолидин-3-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотиновой кислоты (1,15 г, 3,33 ммоль, выход 82%) в виде белого твердого вещества. *Масса/заряд* (ESI): 346,0 $(M+H)^+$.

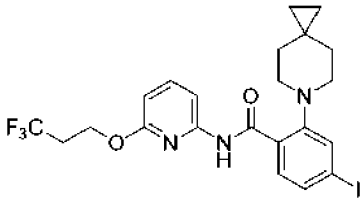
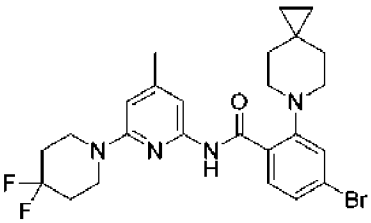
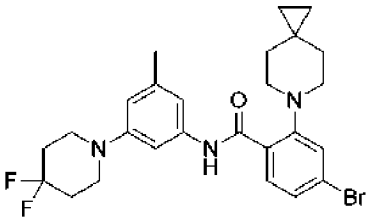
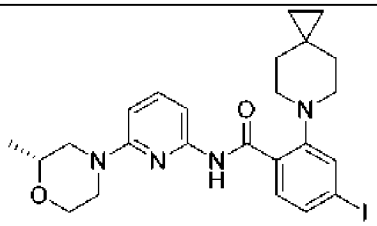
[00342] Промежуточное соединение 9: N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид



[00343] 4-Йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензойную кислоту (150,0 г, 420 ммоль, пр. соед. 6) суспендировали в дихлорметане (1000 мл) в атмосфере аргона. Добавляли каталитический DMF (1,0 мл), а затем добавляли по каплям раствор хлорида тионила (54,6 г, 28 мл, 459 ммоль, Sigma-Aldrich Corporation) в дихлорметане (500 мл) на протяжении 10 минут. После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 30 минут, смесь выпаривали до сухого состояния при пониженном давлении. Неочищенный материал подвергали азеотропной перегонке с толуолом (2×300 мл) и суспендировали в дихлорметане (300 мл) в атмосфере аргона. Добавляли трехосновный фосфат калия (267 г, 1,26 моль, Sigma-Aldrich Corporation), а затем раствор 2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-амина (100 г, 438 ммоль, пр. соед. 4) и N, N-диизопропилэтиламина (200 мл, 1,14 моль, Sigma-Aldrich Corporation) в DCM (300 мл, добавляли на протяжении 5 минут). Желтую смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 3 часов, затем выпаривали до сухого состояния при пониженном давлении. Неочищенные твердые вещества суспендировали в дихлорметане (1 л) и перемешивали в течение 10 минут. Смесь фильтровали через фритту и твердые вещества промывали с помощью дополнительного количества дихлорметана (2×100 мл). Твердые вещества отбрасывали и фильтрат выпаривали до сухого состояния при пониженном давлении. Неочищенный остаток суспендировали в ацетонитриле (750 мл) и

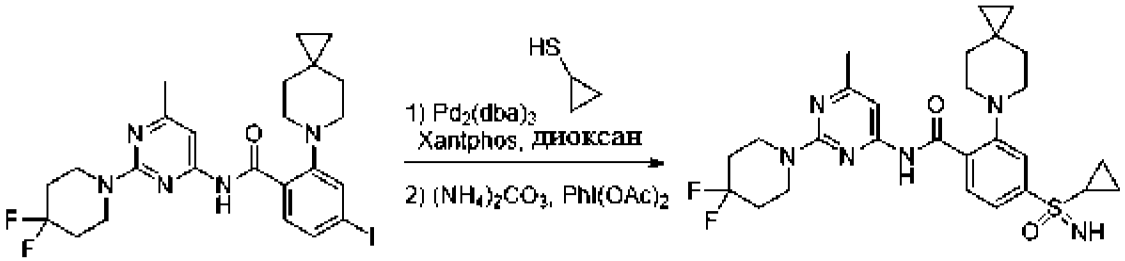
перемешивали при температуре окружающей среды в течение 15 минут. Суспензию фильтровали через стеклянную фритту и твердые вещества промывали с помощью дополнительного количества ацетонитрила (75 мл). Твердые вещества высушивали под потоком азота с получением N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида (186 г, 328 ммоль, выход 78%). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 13,38 (br s, 1 H) 7,72-7,87 (m, 3 H) 7,39 (s, 1 H) 3,91 (br s, 4 H) 2,99-3,06 (m, 4 H) 2,32 (s, 3 H) 1,92-2,07 (m, 4 H) 1,62-1,85 (m, 4 H) 0,38 (s, 4 H). *масса/заряд* (ESI): 568,0 $(M-H)^+$.

[00344] Промежуточные соединения 10-13 получали согласно подобной процедуре, описанной для промежуточного соединения 9.

№ пр. соед.	Химическая структура	Название	LRMS: (ESI, режим регистрации положительно заряженных ионов) *масса/заряд*
10		4-Йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-N-(6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-ил)бензамид	546,1
11		4-Бром-N-(6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	519,2 | 521,2
12		4-Бром-N-(3-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-5-метилфенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	518,1 | 520,1
13		(R)-4-Йод-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	533,1

[00345] **Примеры C1 и C2. 2-(6-Азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(R-**

циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид и 2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(S-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид



[00346] Стадия 1. В 20-мл сосуд для проведения реакции под воздействием микроволнового излучения помещали N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид (1,00 г, 1,762 ммоль, пр. соед. 19), трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0) (0,161 г, 0,176 ммоль) и 4,5-бис(дифенилфосфино)-9,9-диметил-ксантен (0,102 г, 0,176 ммоль), а затем 1,4-диоксан (10 мл). Полученную смесь перемешивали и продували азотом в течение 5 мин., после чего добавляли 1,1'-диметилтриэтиламин (0,616 мл, 3,52 ммоль) в атмосфере азота, а затем циклопропантиол (0,142 мл, 1,939 ммоль). Сосуд запаивали и подвергали воздействию микроволновых условий (10 ч., 90°C). Неочищенную смесь непосредственно загружали на предколонку с силикагелем и подвергали комбинированной колоночной флеш-хроматографии на золотой колонке 40-г ISCO с элюированием дважды с помощью MeOH/DCM (5 мин. при 0% и 25 мин. от 0 до 6%) с получением 4-(циклопропилтио)-N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида (0,92 г, 1,791 ммоль, выход: 102%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ДИХЛОРМЕТАН-d_2) δ ppm 13,33 (s, 1H), 8,15 (d, J=8,29 Гц, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,22-7,35 (m, 2H), 3,91-4,09 (m, 4H), 3,06 (br t, J=5,18 Гц, 4H), 2,35 (s, 3H), 2,17-2,28 (m, 1H), 1,62-2,10 (m, 6H), 1,52 (s, 2H), 1,13-1,21 (m, 2H), 0,68-0,76 (m, 2H), 0,40 (s, 4H). *масса/заряд* (ESI): 514,1 $(M+H)^+$.

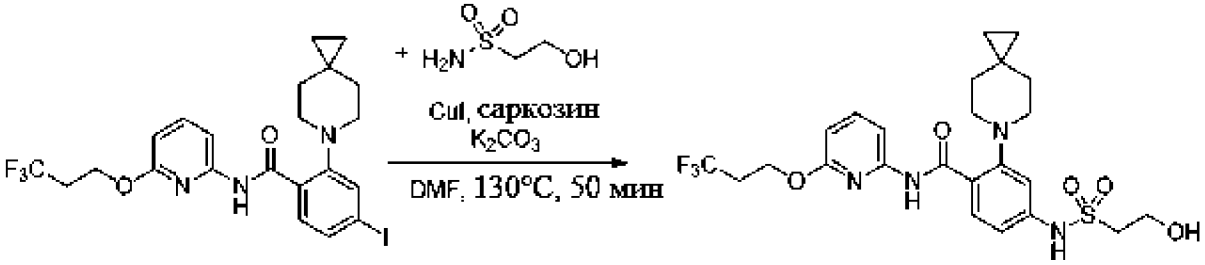
[00347] Стадия 2. К перемешиваемому раствору 4-(циклопропилтио)-N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида (0,89 г, 1,733 ммоль) и карбоната аммония (0,250 г, 2,60 ммоль) в MeOH (4,5 мл) и дихлорметане (9,0 мл) добавляли (ацетилокси)(фенил)-йоданилацетат (1,284 г, 3,99 ммоль) за один раз в виде твердого вещества. Полученную смесь перемешивали на открытом воздухе при к. т. в течение 18 ч. Полученную смесь непосредственно загружали на предколонку с силикагелем (25 г) и подвергали комбинированной колоночной флеш-хроматографии на золотой колонке 40-г ISCO с элюированием с помощью MeOH/DCM (3 мин. при 0% и 25 мин. от 0 до 14%) с получением рацемической смеси 4-(циклопропанесульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида (0,95 г, 1,744 ммоль, выход: 101%) в виде грязно-белого твердого вещества. Энантиомеры разделяли посредством препаративной

SFC с использованием Regis (S, S) Whelk-01 (250 X 21 мм, 5 мм) с подвижной фазой из 50% жидкого CO_2 и 50% MeOH с использованием скорости потока, составляющей 60 мл/мин., с получением приведенного ниже.

[00348] **Пример C1. 2-(6-Азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(R-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид** Первый элюируемый пик, ^{1}H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ ppm 13,20 (br d, J=3,73 Гц, 1H), 8,44 (d, J =8,29 Гц, 1H), 7,96 (d, J=1,45 Гц, 1H), 7,87 (dd, J=1,66, 8,29 Гц, 1H), 7,52 (s, 1H), 4,03 (br s, 4H), 3,14 (t, J=5,29 Гц, 4H), 2,53-2,63 (m, 1H), 2,44 (br s, 3H), 1,95-2,10 (m, 4H), 1,53-1,89 (m, 5H), 1,45 (tdd, J=5,08, 6,92, 10,29 Гц, 1H), 1,20-1,30 (m, 1H), 1,07-1,17 (m, 1H), 0,93-1,03 (m, 1H), 0,44 (s, 4H). *масса/заряд* (ESI): 545,2 $(M+H)^+$.

[00349] **Пример C2. 2-(6-Азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(R-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид** Второй элюируемый пик. ^{1}H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d) δ ppm 13,20 (br d, J=3,73 Гц, 1H), 8,44 (d, J=8,29 Гц, 1H), 7,96 (d, J=1,45 Гц, 1H), 7,87 (dd, J=1,66, 8,29 Гц, 1H), 7,52 (s, 1H), 4,03 (br s, 4H), 3,14 (t, J=5,29 Гц, 4H), 2,53-2,63 (m, 1H), 2,44 (br s, 3H), 1,95-2,10 (m, 4H), 1,53-1,89 (m, 5H), 1,45 (tdd, J=5,08, 6,92, 10,29 Гц, 1H), 1,20-1,30 (m, 1H), 1,07-1,17 (m, 1H), 0,93-1,03 (m, 1H), 0,44 (s, 4H). *масса/заряд* (ESI): 545,2 $(M+H)^+$. Стереохимические обозначения были произвольными.

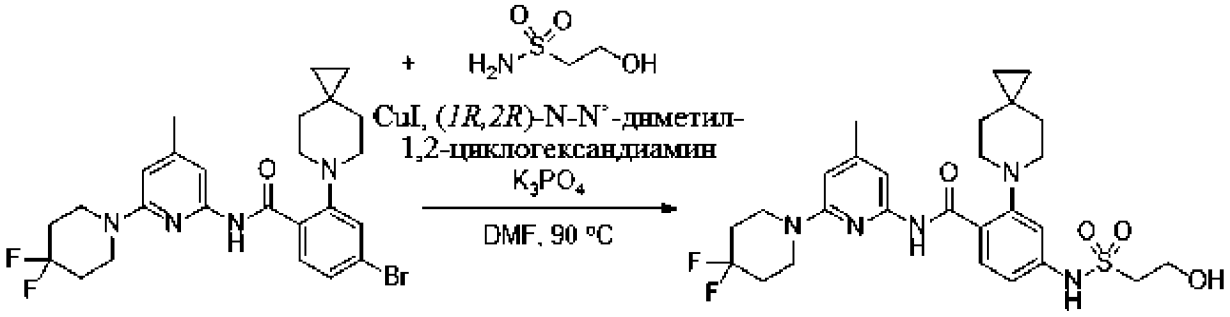
[00350] **Пример C3. 4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-N-(6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-ил)бензамид**



2-Гидроксиэтан-1-сульфонамид (0,741 г, 5,92 ммоль, Wuxi AppTec), саркозин (0,172 г, 1,93 ммоль, Ark Pharm, Inc.), йодид меди(I) (0,241 г, 1,26 ммоль, Sigma-Aldrich Corporation), карбонат калия (2,78 г, 20,1 ммоль, Thermo Fisher Scientific) и 4-йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-N-(6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-ил)бензамид (2,74 г, 5,02 ммоль, промежуточное соединение 38) объединяли в дегазированном сухом N, N-диметилформамиде (5 мл) в атмосфере аргона и нагревали до 130°C в течение 50 мин. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды, добавляли воду (100 мл) и этилацетат (150 мл), и фазы смешивали и разделяли. Органический слой промывали с помощью насыщ. NH_4Cl: NH_4OH:H_2O (1:1:8, 2×75 мл) и выпаривали до сухого состояния при пониженном давлении. Неочищенный продукт суспендировали в толуоле (30 мл) и нагревали до 90°C в течение 15 мин. Смесь охлаждали до температуры окружающей среды и твердые вещества отфильтровывали и высушивали под потоком азота. Белые твердые вещества суспендировали в воде (100 мл) и нагревали до 90°C в течение 20

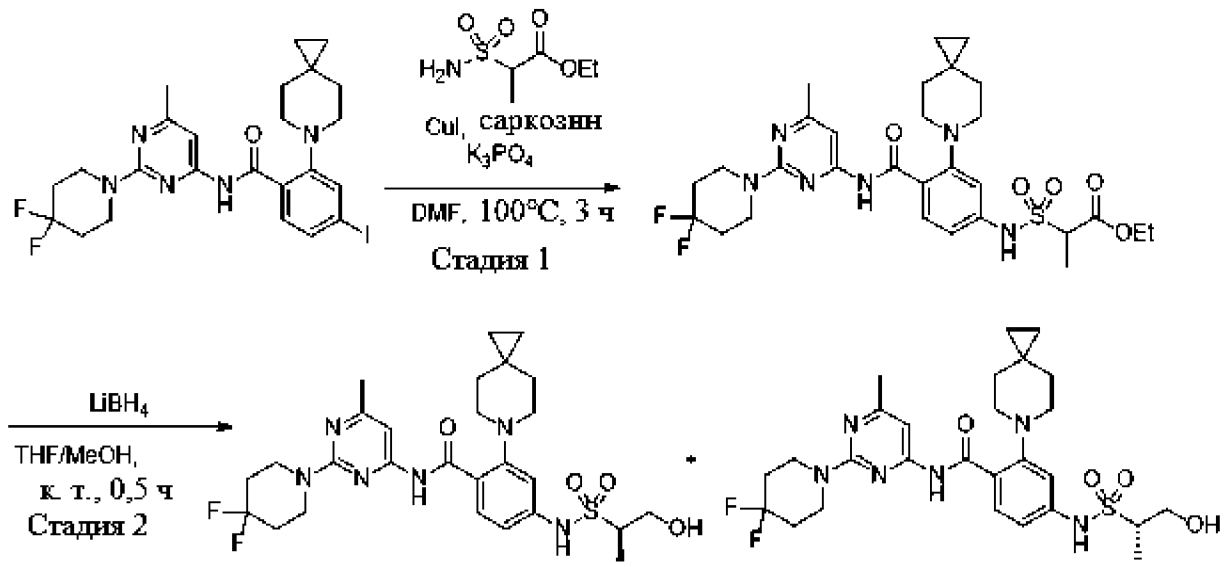
минут. Смесь охлаждали до температуры окружающей среды и твердые вещества высушивали под потоком азота с получением 4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-N-(6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-ил)бензамида (2,41 г, 4,44 ммоль, выход 88%). ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 13,18 (s, 1H), 10,19 (br s, 1H), 8,08 (d, J=8,72 Гц, 1H), 7,91 (d, J=7,80 Гц, 1H), 7,76 (t, J=7,96 Гц, 1H), 7,29 (d, J=1,99 Гц, 1H), 7,14 (dd, J=2,07, 8,64 Гц, 1H), 6,57 (d, J=7,96 Гц, 1H), 4,93 (br s, 1H), 4,52 (t, J=6,12 Гц, 2H), 3,77 (t, J=6,43 Гц, 2H), 3,37 (t, J=6,43 Гц, 2H), 3,00 (br t, J=4,74 Гц, 4H), 2,80-2,87 (m, 2H), 1,74 (br s, 4H), 0,39 (s, 4H). *масса/заряд* (ESI): 543,2.2 $(M+H)^+$.

[00351] **Пример C4. N-(6-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид**



[00352] Смесь 4-бром-N-(6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида (1,0 г, 1,9 ммоль, промежуточное соединение 27), метил-2-сульфамоилацетата (0,361 г, 2,89 ммоль, Wuxi AppTec), фосфата калия (1,23 г, 5,78 ммоль), (1R,2R)-N1,N2-диметилциклогексан-1,2-диамина (0,137 г, 0,963 ммоль) и йодида меди(I) (0,183 г, 0,963 ммоль) в DMF (20 мл) нагревали при 90°C в течение 16 ч. Затем реакционную смесь фильтровали через пробку из CELITE®. Фильтрат разбавляли с помощью EtOAc, промывали водой, солевым раствором, высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью колоночной флеш-хроматографии с элюированием с помощью градиента от 0% до 40% EtOAc в петролейном эфире с получением N-(6-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида (0,580 г, 1,02 ммоль, выход 53%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 12,85 (s, 1 H), 8,04 (d, J=8,6 Гц, 1 H), 7,51 (s, 1 H), 7,23 (d, J=2,2 Гц, 1 H), 7,09 (dd, J=8,7, 2,1 Гц, 1 H), 6,56 (s, 1 H), 3,74 (dt, J=12,5, 6,2 Гц, 6 H), 2,97 (t, J=5,2 Гц, 4 H), 2,26 (s, 3 H), 1,99 (tt, J=13,6, 5,4 Гц, 3 H), 1,79 (s, 4 H), 1,60 (br s, 4 H), 0,38 (s, 4 H). *масса/заряд* (ESI): 564,2 $(M+H)^+$.

[00353] **Примеры C5 и C6. (R)-N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид и (S)-N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид**



[00354] Стадия 1. Смесь этил-2-сульфамоилпропаноата (1,44 г, 7,93 ммоль, пр. соед. 22), йодида меди(I) (0,503 г, 2,64 ммоль, Strem), саркозина (0,47 г, 5,29 ммоль, Sigma-Aldrich Corporation) и фосфата калия (4,49 г, 21,2 ммоль) в DMF (15 мл) помещали в атмосферу аргона и нагревали до 50°C в течение 5 мин. Добавляли N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид (3,0 г, 5,29 ммоль, пр. соед. 19) и смесь нагревали до 100°C в течение 3 ч., затем охлаждали до комнатной температуры. Добавляли EtOAc (50 мл), IPA (5 мл) и воду (50 мл) и смесь энергично перемешивали в течение 5 мин. Полученную двухфазную смесь переносили в делительную воронку и слои разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2×20 мл) и объединенные экстракты затем промывали водой (2×50 мл), смесью 9:1 NH_4Cl/NH_4OH (1×50 мл), высушивали над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением масла. Неочищенное масло очищали с помощью хроматографии на силикагеле с применением предварительно загруженной колонки с силикагелем Redi-Sep (80 г) с элюированием с помощью градиента от 0 до 50% EtOAc/гептан с получением этил-2-(N-(4-((2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)карбамоил)-3-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)фенил)сульфамоил)пропаноата (2,76 г, 4,45 ммоль, выход 84%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 13,35 (s, 1 H) 10,69 (br s, 1 H) 8,07 (d, J=8,71 Гц, 1 H) 7,40 (s, 1 H) 7,31 (d, J=1,87 Гц, 1 H) 7,17 (dd, J=8,60, 1,97 Гц, 1 H) 4,06 (qd, J=7,08, 4,87 Гц, 2 H) 3,92 (br t, J=5,49 Гц, 4 H) 2,98 (br t, J=4,77 Гц, 4 H) 2,32 (s, 3 H) 1,85-2,06 (m, 5 H) 1,73 (br s, 4 H) 1,48 (d, J=6,84 Гц, 3 H) 1,14 (t, J=7,05 Гц, 3 H) 0,39 (s, 4 H). ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ ppm -94,75 (s, 1 F). *масса/заряд* (ESI): 621,2 $(M+H)^+$.

[00355] Стадия 2. В 250-мл круглодонную колбу добавляли этил-2-(N-(4-((2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)карбамоил)-3-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)фенил)сульфамоил)пропаноат (10,39 г, 16,74 ммоль) и раствор борогидрида лития (2,0 М в THF, 16,7 мл, 33,5 ммоль, Sigma-Aldrich Corporation) в THF (100 мл). Медленно добавляли метанол (4,29 мл, 134 ммоль) на протяжении 5 мин. и полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Медленно добавляли 1 н.

HCl (20 мл), а затем EtOAc (20 мл) и полученную двухфазную смесь переносили в делительную воронку и фазы разделяли. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (1×25 мл) и объединенные экстракты промывали насыщенным $NaHCO_3$ (1×50 мл), солевым раствором (1×50 мл), высушивали над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали с получением 8,9 г рацемической смеси. Данный материал разделяли с помощью препаративной SFC с использованием колонки Chiral Tech AD (250 X 30 мм, 5 мм) с подвижной фазой из 85% жидкого CO_2 и 15% MeOH с 0,2% TEA с использованием скорости потока, составляющей 150 мл/мин., с получением приведенного ниже.

[00356] **Пример C5. (R)-N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид.** Первый пик элюирования (3,50 г, 6,05 ммоль, выход: 36,1%, >99% ee). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 13,36 (s, 1 H) 8,05 (d, J=8,50 Гц, 1 H) 7,40 (s, 1 H) 7,31 (d, J=1,87 Гц, 1 H) 7,17 (dd, J=8,71, 2,07 Гц, 1H) 3,88-3,97 (m, 4 H) 3,84 (dd, J=10,99, 4,35 Гц, 1 H) 3,37-3,54 (m, 1 H) 3,25-3,30 (m, 1 H) 2,97 (br t, J=4,77 Гц, 4 H) 2,32 (s, 3 H) 1,84 -2,06 (m, 4 H) 1,57-1,84 (br s, 4 H) 1,30 (d, J=6,84 Гц, 3 H) 0,39 (s, 4 H). 2 способные к обмену протона не проявился. ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ ppm -94,74 (s, 1 F). *масса/заряд* (ESI): 579,2 $(M+H)^+$.

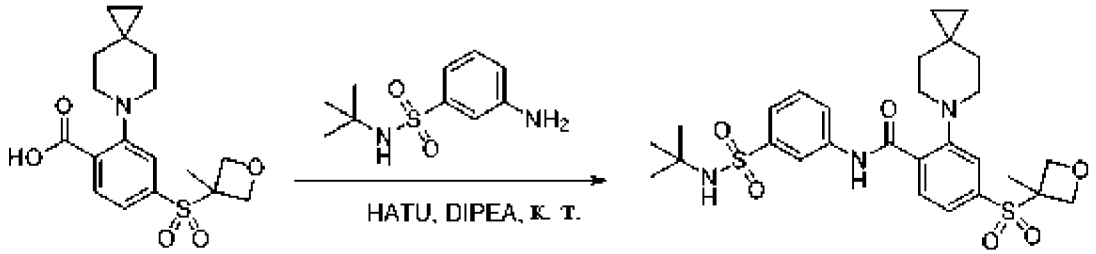
[00357] **Пример C6. (S)-N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид.** Второй пик элюирования (2,66 г, 4,60 ммоль, выход: 27,5%, 98,9% ee). ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 13,35 (s, 1 H) 8,05 (d, J=8,50 Гц, 1 H) 7,40 (s, 1 H) 7,31 (d, J=2,07 Гц, 1 H) 7,17 (dd, J=8,60, 1,97 Гц, 1H) 3,88-3,97 (m, 4 H) 3,84 (dd, J=10,99, 4,35 Гц, 1 H) 3,50 (dd, J=10,99, 7,46 Гц, 1 H) 3,25-3,32 (m, 1 H) 2,97 (br t, J=4,77 Гц, 4 H) 2,31 (s, 3H) 1,83-2,06 (m, 4 H) 1,73 (br s, 4 H) 1,30 (d, J=6,84 Гц, 3 H) 0,39 (s, 4 H). 2 способные к обмену протона не проявился. ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ ppm -94,75 (s, 1 F). *масса/заряд* (ESI): 579,2 $(M+H)^+$. Стереохимию назначали произвольно.

[00358] **Пример C7. N-(3-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-5-метилфенил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид**

[00359] Смесь 4-бром-N-(3-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-5-метилфенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида (0,5 г, 0,96 ммоль, промежуточное соединение 20), фосфата калия (0,614 г, 2,89 ммоль), 2-гидроксиэтан-1-сульфонамида (0,181 г, 1,45 ммоль), (1R,2R)-N1,N2-диметилциклогексан-1,2-диамина (0,069 г, 0,48 ммоль) и йодида меди(I) (0,092 г, 0,48 ммоль) в DMF (5 мл) перемешивали при 90°C в течение 16 ч.

Реакционную смесь гасили ледяной водой, фильтровали через слой из CELITE® и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический экстракт промывали солевым раствором, высушивали над Na_2SO_4, фильтровали, концентрировали и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением 40% EtOAc в петролейном эфире с получением N-(3-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-5-метилфенил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида (0,31 г, 0,54 ммоль, выход 56%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6): δ ppm 11,55 (s, 1 H), 10,09 (s, 1 H), 7,83 (d, J=8,5 Гц, 1 H), 7,12-7,16 (m, 3 H), 7,03 (dd, J=8,5, 2,1 Гц, 1 H), 6,60 (s, 1 H), 4,97 (br s, 1 H), 3,76 (t, J=6,6 Гц, 2 H), 3,30-3,34 (m, 6 H), 2,97 (t, J=5,3 Гц, 4 H), 2,27 (s, 3 H), 2,00-2,10 (m, 4 H), 1,55 (br s, 4 H), 0,36 (s, 4 H). *масса/заряд* (ESI): 563,2 $(M+H)^+$.

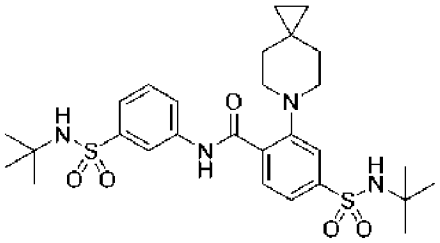
[00360] **Пример C8. N-(3-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)фенил)-4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид**



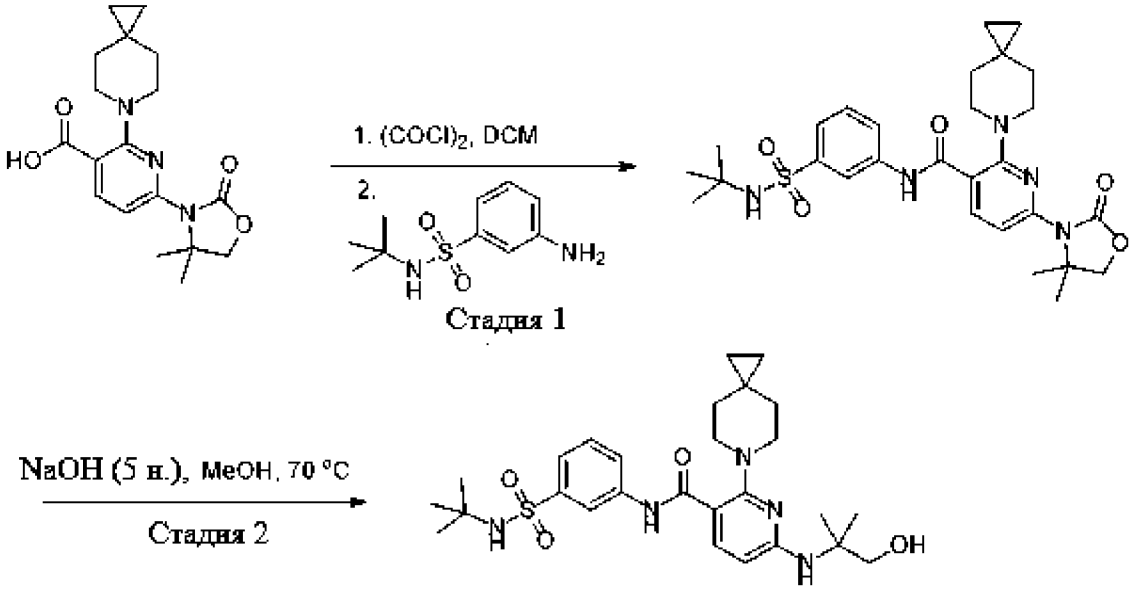
[00361] В раствор 4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензойной кислоты (120 мг, 0,33 ммоль, промежуточное соединение 15) в DMF (2 мл) добавляли HATU (187 мг, 0,49 ммоль) и DIPEA (143 мкл, 0,821 ммоль) при к. т. и перемешивали в течение 10 мин. В данную реакционную смесь добавляли 3-амино-N-(трет-бутил)бензолсульфонамид (82 мг, 0,36 ммоль) и перемешивали в течение 12 ч. при к. т. Реакционную смесь гасили водой (20 мл) и экстрагировали с помощью EtOAc (3×25 мл). Объединенные органические экстракты промывали солевым раствором (20 мл), высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с применением 30% EtOAc в гексанах с получением указанного в заголовке соединения (110 мг, выход 58%) в виде грязно-белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d): *δ* 12,33 (s, 1H), 8,47 (d, J=8,2 Гц, 1H), 8,31 (d, J=2,1 Гц, 1H), 8,06-7,95 (m, 1H), 7,87 (d, J=1,8 Гц, 1H), 7,79 (dd, J=8,2, 1,7 Гц, 1H), 7,69 (d, J=8,3 Гц, 1H), 7,54 (t, J=8,0 Гц, 1H), 5,19 (d, J=7,0 Гц, 2H), 4,52 (s, 1H), 4,47 (d, J=7,0 Гц, 2H), 3,16 (t, J=5,5 Гц, 4H), 1,73 (s, 3H), 1,70-1,60 (b s, 3H), 1,30 (s, 9H), 0,48 (s, 4H). *масса/заряд* (ESI): 576,2 [M+1].

[00362] Пример C9 получали аналогично получению примера C8 выше.

№ прим.	Химическая структура	Название	LRMS: (ESI, режим регистрации положительно

			заряженных ионов) *масса/заряд*
C9		4-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)-N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	577,2

[00363] **Пример C10. N-(3-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид**

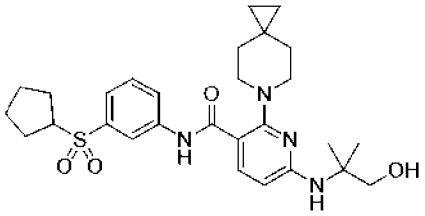


[00364] Стадия 1. В 100-мл круглодонную колбу загружали 6-(4,4-диметил-2-оксооксазолидин-3-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотиновую кислоту (549 мг, 1,59 ммоль, промежуточное соединение 11) и DCM (8 мл). В реакционную смесь при к. т. добавляли оксалилдихлорид (1,43 мл, 2,86 ммоль, 2 M в DCM), затем несколько капель DMF. Смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч. и растворитель удаляли под вакуумом. Остаток повторно растворяли в DCM (10 мл) и обрабатывали 3-амино-N-(*трет*-бутил)бензолсульфонамидом (0,38 мл, 1,67 ммоль) и DIPEA (1,39 мл, 7,95 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 18 ч., затем ее разбавляли водой и экстрагировали с помощью EtOAc. Органический экстракт промывали солевым раствором, высушивали над Na_2SO_4, фильтровали и концентрировали. Концентрат очищали с помощью колоночной флеш-хроматографии с элюированием с помощью от 0% до 60% EtOAc в гептане с получением N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-6-(4,4-диметил-2-оксооксазолидин-3-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамида (703 мг, 1,26 ммоль, выход 80%) в виде светло-желтого твердого вещества. MS (ESI,

Положительные ион) *масса/заряд*: 556,1 [M+1].

[00365] Стадия 2. В стеклянный флакон загружали N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-6-(4,4-диметил-2-оксооксазолидин-3-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид (703 мг, 1,26 ммоль), MeOH (2 мл) и гидроксид натрия (1,26 мл, 6,33 ммоль, 5 н.). Перемешивали при 70°C в течение 1 ч., охлаждали до к. т. и растворитель удаляли под вакуумом. Остаток разделяли между полунасыщенным NH_4Cl (10 мл) и EtOAc (10 мл). Водную фазу экстрагировали с помощью EtOAc (2×10 мл). Объединенные органические экстракты промывали водой (20 мл) и высушивали над Na_2SO_4. Неочищенный материал абсорбировали на пробке из силикагеля и очищали с помощью хроматографии через предварительно загруженную колонку с силикагелем Redi-Sep с элюированием с помощью градиента от 0% до 60% EtOAc в гептане с получением N-(3-(N-(трет-бутил)сульфамоил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамида (485 мг, 0,92 ммоль, выход 72%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 11,21 (s, 1 H), 8,32 (t, J=1,45 Гц, 1 H), 7,84 (dt, J=7,88, 1,45 Гц, 1 H), 7,71 (d, J=8,71 Гц, 1 H), 7,50-7,57 (m, 2 H), 7,49 (dt, J=7,88, 1,45 Гц, 1 H), 6,60 (s, 1 H), 6,28 (d, J=8,50 Гц, 1 H), 4,81 (t, J=5,70 Гц, 1 H), 3,59 (d, J=5,81 Гц, 2 H), 3,11-3,17 (m, 4 H), 1,44-1,51 (m, 4 H), 1,36 (s, 6 H), 1,12 (s, 9 H), 0,31 (s, 4 H). MS (ESI, Положительные ион) *масса/заряд*: 530,2 [M+1].

[00366] Пример C11: получали аналогично получению примера C10.

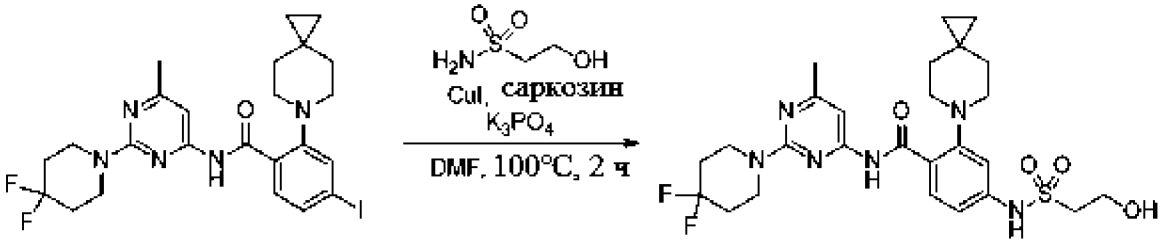
№ прим.	Химическая структура	Название	LRMS: (ESI, режим регистрации положительно заряженных ионов) *масса/заряд*
C11		N-(3-(Циклопентилсульфонил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид	527,0

[00367] **Примеры C12 - C13: получали аналогично получению примеров C3.**

№ прим.	Химическая структура	Название	LRMS: (ESI, режим регистрации положительно

			заряженных ионов) *масса/заряд*
C12		N-(6-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-4-(оксетан-3-сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	576,2
C13		(R)-4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	530,2

[00368] **Пример C14. N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид**



[00369] Смесь 2-гидроксиэтан-1-сульфонамида (1,28 г, 10,3 ммоль, Wuxi AppTec), йодида меди(I) (0,49 г, 2,56 ммоль), трехосновного фосфата калия (5,44 г, 25,6 ммоль) и саркозина (0,48 г, 5,13 ммоль) помещали в 100-мл круглодонную колбу в атмосфере аргона. Добавляли безводный DMF (20 мл) и смесь нагревали до 50°C в течение 5 минут. N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-йод-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид (2,91 г, 5,13 ммоль, пр. соед. 19) добавляли в виде твердого вещества и смесь нагревали до 100°C и перемешивали в течение 2 ч., затем охлаждали до комнатной температуры. Добавляли EtOAc (20 мл) и воду (20 мл), полученную двухфазную смесь разделяли и водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (3x). Объединенные органические экстракты затем промывали водой (2x), смесью 9:1 NH_4Cl/NH_4OH (водн.), солевым раствором, высушивали над безводным $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением масла. Масло очищали с помощью хроматографии на силикагеле с элюированием с помощью 0-50% градиента

смеси EtOAc/гептан, затем подвергали изократическому элюированию 50% смеси EtOAc/гептан с получением грязно-белого твердого вещества. Данное твердое вещество суспендировали в метаноле, фильтровали и высушивали с получением белого твердого вещества. Затем это твердое вещество суспендировали в воде, перемешивали в течение 24 ч, фильтровали и высушивали под вакуумом с получением N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамида (1,55 г, 2,75 ммоль, выход 54%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ ppm 13,37 (s, 1 H) 10,03-10,52 (m, 1 H) 8,06 (d, J=8,71 Гц, 1 H) 7,41 (s, 1 H) 7,28 (d, J=1,87 Гц, 1 H) 7,15 (dd, J=8,71, 1,87 Гц, 1 H) 4,73-5,14 (m, 1 H) 3,92 (br t, J=5,39 Гц, 4 H) 3,77 (t, J=6,43 Гц, 2 H) 3,34-3,40 (m, 2 H) 2,98 (br t, J=4,56 Гц, 4 H) 2,32 (s, 3 H) 1,93-2,07 (m, 4 H) 1,58-1,85 (m, 4 H) 0,40 (s, 4 H). ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO-d_6) δ ppm -94,74 (s, 1 F). *масса/заряд* (ESI): 565,2 $(M+H)^+$.

[00370] Специалисты в данной области поймут, что они могут преобразовывать соединения по настоящему изобретению в их соответствующую фармацевтически приемлемую соль путем применения традиционных методик, известных из уровня техники. Например, для преобразования приведенных в качестве примера соединений C-1 - C-14 в их соответствующие соли HCl специалисты в данной области поймут, что нужно использовать надлежащий эквивалент хлористоводородной кислоты, необязательно с последующими стадией кристаллизации и стадией высушивания с выделением солей HCl.

ПРИМЕР 12

[00371] В испытании иллюстративных соединений к KIF18A, которые могут использоваться в способах по настоящему изобретению, применяли следующие анализы. Данные для этих примеров, протестированных в соответствии с процедурами, описанными ниже, представлены в таблице 4 ниже.

[00372] <u>Ферментный анализ KIF18A</u> Анализ АТФазной активности, стимулированной микротрубочками, применяли для измерения ферментной активности KIF18A после обработки соединением. Соединения серийно разбавляли в 2 раза в DMSO (Sigma Inc) в пределах диапазона концентраций в 22-точки. Рекомбинантный человеческий белок KIF18A (1-467 His-меченный) экспрессировали с применением бакуловирусной системы и очищали с помощью аффинной хроматографии компании Amgen Inc. Концентрации белка KIF18A, микротрубочек (MT) и АТФ в реакционной смеси оптимизировали для стандартизированного гомогенного ферментного анализа с применением набора для анализа киназы/АТФазы ADP-Glo™ (Promega Inc). В анализе измеряли количество АДФ, образованное в результате АТФазной реакции. Получение реакционного буфера [(15 мМ Трис, pH 7,5 (Teknova Inc), 10 мМ MgCl2 (JT Baker Inc), 0,01% Pluronic F-68 (Life Technologies Inc), 1 мкМ таксол (Cytoskeleton Inc) и 30 мкг/мл микротрубочек свиньи (Cytoskeleton Inc)]. Добавляли соединение и белок KIF18A (30 нМ) с получением реакционного буфера и инкубировали в течение 15 минут при к. т., затем добавляли АТФ (при K_m, 75 мкМ) к реакционной смеси и инкубировали в течение дополнительных 15 минут при к. т. Смешивали 5 мкл реагента ADP-Glo™ и 2,5 мкл

реакционной смеси и инкубировали в течение 40 минут при к. т. Добавляли 10 мкл реагента для обнаружения ADP-Glo™ и инкубировали в течение 40 минут при к. т. Считывали люминесценцию с использованием считывающего устройства для микропланшетов EnVision с модулем ультра-люминесценции (Perkin Elmer Inc). Подгонка кривой концентрация-ответ и определение IC_{50} проводили с использованием программного обеспечения Genedata Screener (стандарт 15.0.1, Genedata Inc) с четырехпараметрической моделью подгонки логистической регрессии.

[00373] В таблице 4 представлены данные для представленных в качестве примера в данной заявке соединений в качестве иллюстративных соединений к KIF18A, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, следующим образом: название соединения и биологический данные. (IC_{50} в мкМ, при наличии. № прим. относится к номеру примера)

ТАБЛИЦА 4. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

№ прим.	Название соединения	KIF18A, АТФаза IC_{50} (мкМ)
C1	2-(6-Азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(R-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид	0,064
C2	2-(6-Азаспиро[2.5]октан-6-ил)-4-(S-циклопропилсульфонимидоил)-N-(2-(4,4-дифтор-1-пиперидинил)-6-метил-4-пиримидинил)бензамид	0,057
C3	4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)-N-(6-(3,3,3-трифторпропокси)пиридин-2-ил)бензамид	0,025
C4	N-(6-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-4-метилпиридин-2-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	0,047
C5	(R)-N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	0,062
C6	(S)-N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидрокси-1-метилэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	0,070
C7	N-(3-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-5-метилфенил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	0,034

C8	N-(3-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)фенил)-4-((3-метилоксетан-3-ил)сульфонил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	0,061
C9	4-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)-N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	0,076
C10	N-(3-(N-(*трет*-Бутил)сульфамоил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид	0,070
C11	**N**-(3-(Циклопентилсульфонил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид	0,041
C12	(R)-4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	0,030
C13	(S)-4-((2-Гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	0,046
C14	N-(2-(4,4-Дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид	0,071

ПРИМЕР 13

[00374] В данном примере продемонстрирована активность ингибитора KIF18A в клетках HGSOC с $TP53^{MUT}$ с множественной лекарственной устойчивостью.

[00375] Устойчивость к подавляющим митоз средствам, таким как таксаны, является усложняющим фактором для успешного лечения рака и часто ассоциирована с повышенной экспрессией гена MDR-1 и его продукта, P-гликопротеина (P-gp). Как показано в примере 1, все линии клеток, у которых проявлялась чувствительность к ингибитору KIA18A, представляли собой линии клеток рака с мутантным вариантом TP53. В данном примере чувствительность к обработке ингибитором KIF18A оценивали в присутствии или при отсутствии гена множественной лекарственной устойчивости в линии клеток рака с $TP53^{MUT}$.

[00376] Ингибитор KIF18A, соединение C14, оценивали в 4-дневном основанном на оценке изображений анализе количества ядер (NCA), как по сути описано в примере 1, за исключением того, что применяли клетки NCI/ADR OVCAR-8 обработанные или не обработанные ингибитором P-гликопротеина (P-gp), элакридаром (GF120918). Клетки NCI-ADR OVCAR-8 сверхэкспрессируют насос-переносчик лекарственных средств MDR1

или ген ABCB1 (кодирующий P-гликопротеин), которые, как известно, стимулируют множественную лекарственную резистентность к противораковым средствам (A Vert et al OncoTargets and Therapy 2018:11;221-37). Для целей сравнения параллельно с NCA для соединения C14 проводили 4-дневный основанный на оценке изображений NCA для паклитаксела в тех же клетках NCI/ADR OVCAR-8. Вкратце, клетки OVCAR-8 высевали в двух повторностях в 96-луночные черные полистироловые планшеты с плоским прозрачным дном Corning (Corning, Нью-Йорк) в 100 мкл подходящей полной среды при подходящей плотности и выращивали в течение 24 часов. В одном ряду планшетов концентрацию соединения C14 или паклитаксела отдельно серийно разбавляли в 100 мкл полной среды и затем добавляли к клеткам в конечном объеме, составлявшем 200 мкл, в полной среде, содержавшей 0,5% DMSO. Во втором ряду планшетов ингибитор P-gp GF120918 (1 мкМ) добавляли в питательную среду, при этом концентрацию соединения C14 или паклитаксела отдельно серийно разбавляли в 100 мкл полной среды и затем добавляли к клеткам в конечном объеме, составлявшем 200 мкл в полной среде, содержащей 0,5% DMSO. Через 4 дня (96 часов) обработки клетки фиксировали путем удаления 100 мкл полной среды из каждой лунки, и замены ее на 100 мкл 2x формальдегида (конечная концентрация 4%), и инкубирования планшетов в течение 15 минут при комнатной температуре. После фиксирования клетки пермеабилизировали и окрашивали в 200 мкл отмывочного буфера (1% BSA, 0,2% Triton X-100, 1X PBS), содержавшего 2 мкг/мл ДНК-красителя Hoechst 33342. Планшеты герметично закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Клетки хранили при 4°C в темноте до проведения сбора данных. Данные визуализирующего исследования собирали на считывающем устройстве Cellomics ArrayScan VTI HCS (SN03090745F, ThermoFisher Scientific) с применением протокола анализа с помощью Target Activation V4 (версия 6.6.0 (сборка 8153) с использованием объектива с увеличением 10X, проводили сбор 16 полей на лунку). *Количество применимых объектов* определяли с применением отличительных признаков объекта, представляющего собой ядро (площадь, общая и вариабельная интенсивность в канале 1), согласно Hoechst 33342, которое находилось в пределах±3 SD от обработанного DMSO контроля. *Общее количество применимых объектов* было представлено в виде рассчитанного POC (процента от контроля с DMSO) с применением следующей формулы:

Рассчитанный POC = (*общее количество применимых объектов* в обработанной лунке) ÷ (*общее количество применимых объектов* в обработанных DMSO лунках) x 100.

[00377] Концентрацию соединения и рассчитанные значения POC строили на графике с применением программного обеспечения GraphPad Prism (V7.0.4) и аппроксимацию кривой проводили с использованием 4-параметрического уравнения (переменный угловой коэффициент). Кривые концентрация-ответ и стандартное отклонение представляет собой два независимых эксперимента в двух повторностях.

[00378] Результаты NCA для ингибитора KIF18A и NCA для паклитаксела показаны на фигурах 13A и 13B соответственно. При отсутствии ингибитора P-gp EC50

ингибитора KIF18A было в приблизительно 10 раз выше, чем EC50 ингибитора KIF18A в присутствии ингибитора P-gp, при этом EC50 паклитаксела при отсутствии ингибитора P-gp составляло более 1 мкМ, а EC50 паклитаксела в присутствии ингибитора P-gp было еще меньшим (0,0017 мкМ). Кратное изменение действенности соединения C14 на основе ингибитора KIF18A в присутствии ингибитора P-gp по сравнению с таковой при отсутствии ингибитора P-gp составляло менее 10, при этом кратное изменение действенности паклитаксела в присутствии P-gp ингибитора по сравнению с таковой при отсутствии ингибитора P-gp составляло более 500. Эти результаты свидетельствуют о том, что ингибиторы KIF18A способны обеспечивать эффективное лечение раковых клеток, даже раковых клеток с множественной лекарственной устойчивостью.

ПРИМЕР 14

[00379] В данном примере продемонстрировано, что обработка ингибитором KIF18A оказывала минимальные эффекты в отношении нормальных соматических клеток.

[00380] Эффект, который обработка ингибитором KIF18A оказывает на пролиферацию нормальных соматических клеток (например, отличных от неопластических клеток) тестировали путем анализирования пролиферации мононуклеарных клеток костного мозга человека (HBMNC), первичных фибробластных клеток крайней плоти человека (hFSF) и маммарных эпителиальных клеток человека путем анализа включения 5-бром-2'-дезоксиуридина (BrdU), в котором BrdU, аналог тимидинового нуклеозида, применяют для идентификации пролиферирующих клеток (Payton et. al., Molecular Cancer Therapeutics, 17(12):2575-85 (2018)). Клетки анализировали на проточном цитометре BD LSRFortessa с применением программного обеспечения BD FACSDiva (BD Biosciences) и анализ данных после их сбора проводили с применением программного обеспечения FSC-Express (De Novo). Получали процент гейтированных положительно по BrdU событий на составных гистограммах содержания ДНК.

[00381] Иллюстративные результаты проточной цитометрии показаны на фигуре 14A. Как показано на фигуре 14A, профили содержания ДНК на протяжении клеточного цикла для соединения C9 и для соединения C11 аналогичны таковым для обработанных DMSO клеток, напротив, все из клеток, обработанных испинесибом (Eg5), подавляющим митоз средством (паклитакселом) или ингибитором CDK 4/6 (палбоциклибом), показали заметные эффекты в отношении профилей содержания ДНК на протяжении клеточного цикла, включая повышение популяции на суб-G1 фазе (<2N) (что указывает на гибель клеток).

[00382] Для дополнительного изучения эффектов обработки ингибитором KIF18A в отношении HBMNC двух нормальных доноров оценивали с применением анализа клеточного цикла на основе BrdU и анализа количества клеток (96 часов). Как показано на фигуре 14B, эффекты в отношении пролиферации, наблюдаемые в клетках от первого донора, повторялись в клетках от второго донора. В частности, количество BrdU-окрашенных пролиферирующих клеток, обработанных испинесибом, паклитакселом или ингибитором CDK 4/6 (палбоциклибом) было намного меньшим, чем количество BrdU-

окрашенных клеток в контроле, обработанном средой-носителем. Напротив, количество BrdU, включенного в клетки, обработанные ингибитором KIF18A, либо соединением C9, либо соединением C11, было приблизительно таким же, что и количество BrdU-окрашенных клеток в контроле, обработанном средой-носителем. Обработку ингибитором KIF18A также анализировали в отношении влияния на количество живых клеток. Через 96 часов живые клетки подсчитывали с помощью анализатора жизнеспособности клеток Vi-CELL XR (Beckman Coulter). Как показано на фигуре 14C, обработка клеток испинесибом (Eg5), подавляющим митоз средством (паклитакселом) или ингибитором CDK 4/6 (палбоциклибом) приводила к меньшему количестве клеток относительно клеток в контроле, обработанном средой-носителем, при этом обработка клеток ингибитором KIF18A (соединением C9, соединением C11) демонстрировала эффект от незначительного до отсутствующего в отношении количеств нормальных клеток. Как показано на фигуре 14D и 14E, на эффект в отношении включения BrdU в hFSF и маммарных эпителиальных клетках человека (HMEC) концентрации <10 мкМ ингибитора KIF18A (соединения C11) относительно обработанных DMSO клеток влияния не оказывали. Напротив, наблюдали снижение включения BrdU в клетках, обработанных испинесибом (Eg5) или ингибитором CDK 4/6 (палбоциклибом). Эти результаты свидетельствуют о том, что в отличие от других противораковых средств ингибиторы KIF18A не влияют на пролиферацию в нормальных соматических клетках при концентрациях, эффективных против чувствительных к ингибитору KIF18A раковых клеток.

[00383] Визуализирующие анализы также проводили для определения эффектов обработки ингибитором KIF18A в отношении нормальных соматических клеток. Мультиплексные визуализирующие анализы Arrayscan VTi проводили с использованием клеток FSF человека, как описано ниже. Вкратце, нормальные фибробластные клетки крайней плоти человека высевали при 6000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты для визуализирующих анализов (Corning) и культивировали в течение ночи. На следующий день 96-луночные планшеты в двух повторностях обрабатывали с помощью DMSO или панели тестируемых средств в диапазоне концентрации с 9 точками с применением 3-кратного разбавления с наивысшей концентрацией 10 мкМ (соединение C11 на основе ингибитора KIF18A, нутлин-3a), 1 мкМ (соединение C9 на основе ингибитора KIF18A, BI-2536, испинесиб, паклитаксел) или 5 мкМ (палбоциклиб, GSK923295). После 48 часов обработки один планшет прерывисто обрабатывали с помощью BrdU (Invitrogen) в течение 3 часов перед фиксированием. Оба 96-луночных планшета фиксировали с помощью 4% формальдегида (Thermo Scientific), дважды промывали с помощью отмывочного буфера [PBS, 1% BSA (Thermo Fisher), 0,2% Triton X-100 (Sigma)]. Первый 96-луночный планшет обрабатывали для обнаружения эпитопа BrdU с применением кислотного промывания, блокировали в течение ночи при 4°C в отмывочном буфере, дополненном лошадиной сывороткой (4 капли сыворотки на 10 мл) (Vector Labs), и окрашивали антителами к BrdU-AlexaFluor-647 (B35140, Invitrogen, мышиные, 3 мкг на мл) и антителами к p21 (12D1) (2947, Cell Signaling, кроличьи, 1:400) в течение двух часов

при комнатной температуре. Клетки дважды промывали в отмывочном буфере и окрашивали вторичным антителом [антитело к кроличьим IgG-AlexaFluor-488 (A11034, Invitrogen, 1:2000)] и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Второй 96-луночный планшет блокировали в течение ночи при 4°C в отмывочном буфере, дополненном лошадиной сывороткой (4 капли сыворотки на 10 мл) (Vector Labs) и окрашивали антителами к cl-PARP (214/215) (44-6986, Invitrogen, кроличьи, 1:1500) и антителами к γH2AX (05-636, Millipore, мышиные, 1:1000) в течение двух часов при комнатной температуре. Клетки дважды промывали в отмывочном буфере и окрашивали вторичными антителами [антитело к кроличьим IgG-AlexaFluor-647 (A21245, Invitrogen, 1:2000), антителами к мышиным IgG-AlexaFluor-488 (A11029, Invitrogen, 1:2000)] и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре. Оба 96-луночных планшета дважды промывали и докрашивали с помощью ядерного красителя Hoeschst 33342 (Invitrogen). Данные визуализирующего исследования собирали с помощью широкопольной визуализации на считывающем устройстве ArrayScan VTi HCS (Thermo Scientific) с 64 полей на лунку с применением объектива с увеличением 20X. Количество применимых объектов, представляющих собой ядро, определяли для каждой лунки, а также процент положительных по BrdU, p21, cl-PARP и γH2AX объектов для каждой концентрации тестируемого средства и контроля с DMSO. Тепловые карты концентрация-ответ создавали с применением программного обеспечения GraphPad Prism (V7.0.4).

[00384] Результаты показаны на фигурах 15A - 14E. Как показано на фигурах 15A - 15B, клетки, обработанные ингибитором KIF18A (соединением C11 или соединением C9), ведут себя как клетки в контроле, обработанном средой-носителем, в терминах общего количества объектов и включения BrdU, что указывает на минимальные эффекты в отношении клеточной пролиферации. Как показано на фигурах 15C - 15E, клетки, обработанные ингибитором KIF18A (соединением C11 или соединением C9) не демонстрировали стимулирования апоптоза, что было измерено с помощью экспрессии cl-PARP (фигура 15C), остановки клеточного цикла, что было измерено с помощью стимулирования экспрессии белка p21 (фигура 15D), или стимулирования повреждения ДНК, что было измерено с помощью повышения экспрессии γHH2X (фигура 15E). Все сравниваемые средства стимулировали один или несколько из этих маркеров по сравнению с контролем с DMSO. Эти результаты свидетельствуют о том, что в отличие от других противораковых средств ингибиторы KIF18A не влияют на пролиферацию в нормальных соматических клетках.

[00385] В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что эффект ингибиторов KIF18A является специфичным в отношении раковых клеток, оказывает токсичность от незначительного до отсутствующего уровня в или в отношении нормальных соматических клеток, и что обработка ингибитором KIF18A является эффективной для лечения неопластического заболевания, поддержания чувствительности к лечению ингибитором CDK4/6, стимулирования или усиления регресса опухоли, уменьшения скорости роста опухоли или рака и/или стимулирования или усиления гибели

опухолевой или раковой клетки без выраженной токсичности для нормальных соматических клеток, что было продемонстрировано отсутствием существенного снижения пролиферации нормальных соматических клеток у субъекта и/или отсутствием существенного повышения апоптоза нормальных соматических клеток.

ПРИМЕР 15

[00386] В данном примере продемонстрированы ингибиторы KIF18A основе РНК, которые уменьшают экспрессию гена KIF18A.

[00387] Для применения в данном исследовании получали ряд из семи siRNA к KIF18A от трех разных поставщиков (Qiagen, Dharmacon, Ambion). Также получали ненацеливающиеся контрольные (NTC) siRNA и siRNA к Eg5 (hKIF11), которые служат в качестве отрицательных контролей и положительных контролей соответственно. Нуклеотидные последовательности siRNA перечислены в таблице 5.

ТАБЛИЦА 5

Gene_siRNA_ ID	№ по каталогу, индивидуальный ID	Последовательность*	SEQ ID NO.	Анализ количества	Анализ митоза
hKIF18A_1	SI00140224	ATCCGTCTACAGTAACCTTAA	12	Да	Нет
hKIF18A_2	SI00140238	CAGGTGGAACTAATCTGGTTA	13	Да	Да
hKIF18A_3	SI00140245	CAGGAGGACTTGGACTCTACA	14	Да	Да
hKIF18A_4	J-006849-05-0005	UAAAUUACCCGAACAAGAA	15	Да	Да
hKIF18A_5	SI03090941	CTCGAAGTGTAAATTACCCGA	16	Да	Да
hKIF18A_6	J-006849-08-0005	GGAUAUAAUUGCACAGUAC	17	Да	Да
hKIF18A_7	118492	GCAGCUGGAUUUCAUAAAGTT	18	Да	Нет
hEg5_1 (hKIF11)	SI02653770	GCCGATAAGATAGAAGATCAA	19	Да	Нет
hEg5_2 (hKIF11)	SI03019793	CTCGGGAAGCTGGAAATATAA	20	Да	Нет
NTC_1	D-001810-	UGGUUUACAUGUCGA	21	Да	Да

	01-05	CUAA			
NTC_2	D-001810-02-05	UGGUUUACAUGUUGUGUGA	22	Да	Да
NTC_3	D-001810-03-05	UGGUUUACAUGUUUUCUGA	23	Да	Да
NTC_4	D-001810-04-05	UGGUUUACAUGUUUUCCUA	24	Да	Да
NTC_5	Индивидуальный случайный 2-4	AACGCAGAGTTCGACCGTTTA	25	Да	Нет
NTC_6	Индивидуальный случайный 9-1	AAGGCGGGTCCGGCAGTTTTT	26	Да	Нет
NTC_7	Индивидуальный M13-4	AATGCGCTTCCCTGTTTTTAT	27	Да	Нет
NTC_8	Индивидуальный случайный 10-1	AACCACCTTGAACACGTATTT	28	Да	Нет
NTC_9	Индивидуальный случайный 7-1	AAGGCCACTTGCGTCAGATTT	29	Да	Нет

NTC (ненацеливающийся контроль); *предоставленная поставщиком

[00388] Эффективность нокдауна KIF18A для каждой siRNA тестировали с помощью вестерн-блоттинга в клетках BT-549 и HMEC. Вкратце, клетки BT-549 и HMEC высевали в 6-луночные планшеты (Thermo Scientific) при $2{,}0\times10^5$ клеток на лунку и культивировали в течение ночи. На следующий день клетки обрабатывали комплексом РНК-липид с применением липофектамина RNAiMax в соответствии с протоколом изготовителя (Invitrogen) при 10 нМ отдельных siRNA к KIF18A (n=7) или NTC siRNA (NTC_2). Через 48 часов получали клеточные лизаты с применением буфера RIPA и обрабатывали для вестерн-блоттинга. Уровень β-актина анализировали с демонстрацией равной нагрузки белка в каждой дорожке. Клетки HeLa, обработанные нокодазолом в

течение ночи, применяли в качестве положительный контроля митотической фракции и клетки Jurkat, обработанные стауроспорином, - в качестве положительного контроля апоптоза.

[00389] Как показано на фигуре 16, каждая siRNA к KIF18A (от KIF18A_1 до KIF18A_7) эффективно понижала экспрессию белка KIF18A в клетках HMEC и BT-549, при этом клетки, трансфицированные контрольной siRNA (NTC_2), демонстрировали экспрессию KIF18A, как на исходном уровне, при этом, как и ожидалось, в митотической фракции клеток HeLa проявлялись высокие уровни экспрессии KIF18A. Эти данные демонстрируют, что ингибиторы KIF18A, такие как siRNA к KIF18A, стимулируют апоптоз клеток рака молочной железы BT-549 без доказательств наличия апоптоза в нормальных соматических (нераковых) эпителиальных клетках молочной железы.

ПРИМЕР 16

[00390] В данном примере изучаются эффекты ингибиторов KIF18A на основе РНК в отношении раковых клеток.

[00391] Для определения паттерна чувствительности и фенотипов, вызванных siRNA-опосредованным истощением по KIF18A, составляли панель из восьми линий клеток рака (7 молочной железы, 1 яичника), а также 1 нормальной линии маммарных эпителиальных клеток человека (HMEC). Линии клеток рака выбирали на основе подтипа опухоли и генетического фона (TP53, RB1, CCNE1).

[00392] Применяя анализ количества ядер на основе визуализации, применяли панель с определением антипролиферативных эффектов отдельных siRNA в отношении KIF18A (n=7) по сравнению с эффектами ненацеливающихся контролей (NTC, n=9) и цитотоксических контролей (KIF11 (Eg5), n=2), в отношении клеток, обработанных в течение четырех дней. Клетки считались чувствительными к siRNA к KIF18A, если наблюдали >50% подавление роста клеток. Как показано на фигурах 17A - 17B, чувствительность к siRNA к KIF18A наблюдали во всех трех линиях с амплифицированным геном CCNE1 HCC-1806 (TNBC), MDA-MB-157 (TNBC), OVCAR-3 (HGSOC) и в дефектной по RB1 линии TNBC BT-549. Нечувствительные к siRNA к KIF18A линии клеток рака молочной железы характеризовались TP53 дикого типа (3 из 4), достаточностью по RB1 (4 из 4), статусом эстрогеновых рецепторов (2 из 4 положительные по ER) и (2 из 4 отрицательные по ER). Клетки TNBC с TP53 дикого типа CAL-51 с почти нормальным кариотипом были нечувствительными к siRNA к KIF18A, а также линия нормальных HMEC в соответствии с результатами с использованием линии иммортализованных ретинальных пигментных эпителиальных клеток человека (hTPET-RPE1). Напротив и как было предположено, siRNA к Eg5 были цитотоксическими для всех линий клеток в панели, демонстрируя его необходимость для деления соматических клеток (фигура 17A). Результаты для siRNA к KIF18A относительно контролей с NTC представлены на фигуре 17A, обобщены в таблице (фигура 17B), обобщенная таблица содержит информация о линиях клеток, генетическом фоне, и статистической оценке группы siRNA к KIF18A относительно группы NTC siRNA (t-критерий), и уровень

снижения скорости роста клеток. Экспрессия белка KIF18A отличалась по панели линий клеток и не демонстрировала прямой корреляции с чувствительностью (фигура 17C).

[00393] В совокупности эти результаты демонстрируют, что siRNA к KIF18A, которые понижают экспрессию KIF18A, демонстрируют селективную антипролиферативную активность в отношении раковых клеток с конкретным генетическим фоном касательно TP53, CCNE1 и RB1, при этом такой результат соответствует ранним наблюдением (например, примерам 1-10). Эти результаты также свидетельствуют о том, что siRNA к KIF18A способны стимулировать апоптоз раковых клеток и подавлять рост раковых клеток.

ПРИМЕР 17

[00394] В данном примере описаны материалы и способы, применяемые в примерах 15 и 16.

[00395] **Линии клеток** Все линии клеток рака человека получали из ATCC или DSMZ (GmbH), если не указано иное. Подлинность линий клеток была установлена ATCC с применением ДНК-анализа коротких тандемных повторов (STR) и сравнения с базами данных STR ATCC или ExPasy. Нормальные маммарные эпителиальных клетки человека (HMEC) приобретали у Lonza Inc. Все культуры линий клеток поддерживали при 37°C в атмосфере 5% CO_2.

[00396] **Визуализирующие анализы.**

[00397] **Анализ количества ядер ArrayScan VTi (siRNA)** Панель линий клеток (HCC-1806, BT-549, MDA-MB-157, OVCAR-3, MCF-7, CAL-51, MDA-MB-453, ZR-75-1, HMEC) высевали в 96-луночные планшеты визуализирующих анализов (Corning) при значениях плотности, индивидуально оптимизированных для log-фазы роста клеток. На следующий день клетки обрабатывали комплексом РНК-липид, содержавшим отдельные siRNA при 10 нМ [KIF18A (n=7), Eg5 (n=2), NTC (n=9)], подробная информация о siRNA в (таблице 5), и 0,3 мкл липофектамина RNAiMax (Invitrogen), в соответствии с протоколом изготовителя (Invitrogen). Через четыре дня клетки фиксировали с помощью 4% формальдегида (Thermo Scientific), промывали с помощью PBS (Invitrogen) и окрашивали с помощью ядерного красителя Hoechst 33342 (Invitrogen) в отмывочном буфере [PBS, 1% BSA (Thermo Fisher), 0,2% Triton X-100 (Sigma)]. Количество применимых объектов, представляющих собой ядро (в пределах трех SD от среднего значения площади объектов, представляющих собой ядро, для контрольной лунки) устанавливали с применением считывающего устройства Cellomics ArrayScan VTi HCS (Thermo Scientific), оснащенного объективов с увеличением 10X, с применением биоприложения Target Activation (Thermo Scientific), данные о количестве применимых объектов, представляющих собой ядро, собирали для шестнадцати полей изображения на лунку. Построение графиков и статистический анализ проводили с применением GraphPad Prism 7.04 (программное обеспечение GraphPad). Данные представлены в виде среднего количества ядер и стандартного отклонения среднего значения (SEM) на основе агрегированных количественных данных для отдельных siRNA из двух независимых экспериментов в двух

повторностях [KIF18A (n=28), Eg5 (n=8), NTC (n=36)]. Значимость вычисляли с применением сравнения групп NTC siRNA и siRNA к KIF18A с помощью неспаренного t-критерия.

[00398] **Вестерн-блоттинг:**

[00399] **способы вестерн-блоттинга** Клеточные лизаты получали путем объединения неадгерентной и адгерентной клеточных фракций с применением либо буфера RIPA (Sigma) или набора для экстракции общего белка Minute™ (Invent Biotechnologies), поставленного со смесью ингибиторов протеаз и фосфатаз (Roche). Концентрации общего белка определяли с применением способа со связыванием красителя Bradford (Bio-Rad), лизаты хранили при -80°C. Белки разделяли на трис-глициновом геле (Invitrogen) на основе размера белка и переносили на мембрану PDVF (Bio-Rad). Мембраны с белками инкубировали в 10 мл блокирующего буфера [отмывочный буфер (PBS, 0,5% Tween-20), 5% сухого молока (Albertsons), 3 капли лошадиной сыворотки (для мышиных антител, Vector Labs) или козьей сыворотки (для кроличьих антител, Vector Labs)] в течение 60 минут при комнатной температуре на орбитальном встряхивателе. Добавляли первичные антитела с блокирующим буфером и инкубировали в течение ночи при 4°C на орбитальном встряхивателе. Мембраны трижды промывали (каждый раз по 15 минут) с последующем обработкой вторичными антителами с применением набора Vectastain ABC (PK-4002 (мышиные), PK-4001 (кроличьи), Vector Labs). Обнаружение белка проводили с использованием хемилюминесцентного реагента Western Lighting (Perkin Elmer), затем проявляли мембраны на пленке (USA Scientific).

[00400] **Вестерн-блоттинг антител** Антитело к расщепленному-PARP (cl-PARP) (51-900017, BD Pharmingen, мышиное, 1:500), антитело к β-актину (A5441, Sigma, мышиное, 1:5000), антитело к KIF18A (HPA039484, Sigma, кроличье, 1:2000).

[00401] **Оценка исходного уровня экспрессии KIF18A и циклина E1** Панель линий клеток высевали в 6-луночный планшет (Thermo Scientific) при значениях плотности, индивидуально оптимизированных для log-фазы роста клеток. При примерно 80% конфлюэнтности клетки собирали, и получали клеточные лизаты с применением буфера RIPA, и обрабатывали для вестерн-блоттинга, как описано выше.

[00402] **Оценка эффективности нокдауна с помощью siRNA к KIF18A** Клетки HMEC и BT-549 высевали в 6-луночные планшеты (Thermo Scientific) при $2{,}0\times10^5$ клеток на лунку и культивировали в течение ночи. На следующий день клетки обрабатывали комплексом РНК-липид с применением липофектамина RNAiMax в соответствии с протоколом изготовителя (Invitrogen) при 10 нМ отдельных siRNA к KIF18A (n=7) или NTC siRNA (NTC_2). Информация об отдельных siRNA показана в таблице 5. Через 48 часов получали клеточные лизаты с применением буфера RIPA и обрабатывали для вестерн-блоттинга, как описано выше. Клетки HeLa, обработанные с помощью 0,1 мкг/мл нокодазола (Millipore) в течение ночи, применяли в качестве положительного контроля митотической фракции. Клетки Jurkat, обработанные с помощью 1 мкМ стауроспорина в течение 24 часов, были в качестве положительного по cl-PARP контроля.

ПРИМЕР 18

[00403] В данном примере продемонстрировано, что линии клеток рака молочной железы и яичника человека с $TP53^{MUT}$, содержащие одно или несколько событий удвоения полного генома (WGD), коррелируют с усилением лечения ингибитором KIF18A.

[00404] Соединение C9 на основе ингибитора KIF18A подвергали скринингу с применением панели линий клеток рака с молекулярным штрих-кодом PRISM, которая включает 59 линий клеток рака молочной железы и яичника (Channing Yu et all, Nature Biotech 2016 Apr;34(4):419-23, Steven M Corsello et al Nature Cancer 2020 Feb;1(2):235-248). Вкратце, совокупность линий клеток со штрих-кодом обрабатывали соединением C9 (8 точек, от 2,5 мкМ до 0,001 мкМ) в течение 5 дней. Проводили анализ с аппроксимацией кривой и вычисляли площадь под кривой (AUC), представляющую собой значение жизнеспособности, для каждой линии клеток. Результаты определения статуса WGD для каждой линии клеток рака получали из Quinton et al BioRxiv, 2020.06.18.159095; doi: https://doi.org/10.1101/2020.06.18.159095. Балл WGD 0,1 или 2 присваивали каждой линии клеток в соответствии с Quinton et al., 2020 выше. В данном корреляционном анализе линии клеток рака распределяли в одну из двух групп: WGD-отрицательные (0 событий WGD) или WGD-положительные (1 или 2 события WGD). Результаты определения статуса TP53 для каждой линии клеток рака получали из карты зависимости для рака Института Брод (depmap.org, консорциум по DepMap для мутаций, 20Q2). Результат определения статуса "хот-спот TP53" обозначает линию клеток, несущую мутацию TP53, и результат определения статуса "*другой TP53*" обозначает линию клеток, характеризующуюся статусом дикого типа. Далее, строили график значений AUC для соединения C9 на основе ингибитора KIF18A для каждой линии клеток в четырех группах: (1) другой TP53 WGD (-), (2) другой TP53 WGD (+), (3) хот-спот TP53 WGD (-) и (4) хот-спот TP53 WGD (+). Чем более низким было значение жизнеспособности, представляющее собой AUC, для соединения C9, тем более чувствительной была линия клеток к обработке ингибитором KIF18A. Для указания чувствительности к ингибитору KIF18A был установлен пороговый уровень AUC, составляющий <0,65. Построение графика данных и статистические тесты (неспаренный t-критерий, хот-спот TP53 WGD (-) по сравнению с WGD (+)) проводили с применением программного обеспечения GraphPad Prism. Результаты показаны на фигуре 18.

[00405] Как показано на фигуре 18, чувствительность к ингибитору KIF18A статистически значимо коррелировала с положительными событиями WGD в раковых клетках с $TP53^{MUT}$ (p-значение=0,00044), что свидетельствует о том, что ингибиторы KIF18A уменьшают скорость роста и/или стимулируют апоптоз раковых клеток с $TP53^{MUT}$, содержащих одно или несколько событий WGD. Эти данные свидетельствуют о том, что виды рака человека с TP53 ^{MUT} и одним или несколькими событиями WGD вероятно ответят на терапию ингибитором KIF18A.

ПРИМЕР 19

[00406] В данном примере описано получение характеристик трех ингибиторов

KI18A.

[00407] Три ингибитора KIF18A (соединение C9, соединение C11 и соединение C12) синтезировали и тестировали in vitro в отношении ингибирующей KIF18A активности. На фигуре 19A показаны профили ответа моторной активности KIF18A в зависимости от концентрации АДФ-Glo (представленные в виде сигнала люминесценции MT-АТФазы относительно контроля с DMSO (POC)). Значения представляют собой среднее значение ± SEM на основе трех независимых экспериментов. Как показано на фигуре 19A, все три ингибитора KIF18A C9, C11 и C12 проявляли сильную ингибирующую KIF18A человека активность. Значения IC50 для C9, C11 и C12 составляли 0,180 мкМ, 0,07 мкМ и 0,04 мкМ соответственно. Поскольку были запланированы исследования на мышах in vivo, анализировали ингибирующие KIF18A мыши эффекты соединений C9 и C12 . Значения IC50 для соединений C9 и C12 у мышей составляли 0,232 мкМ и 0,039 мкМ соответственно, и таким образом было продемонстрировано, что ингибирующие KIF18A эффекты C9 и C12 по сути были эквивалентными для моторов KIF18A мыши и человека.

[00408] Профили чувствительности линий клеток рака к ингибитору KIF18A определяли для соединений C9 и C11 на основе ингибиторов KIF18A. Клетки разных линий клеток рака обрабатывали с помощью DMSO или возрастающих концентраций C9 или C11 в течение 96 ч. Иллюстративные профили концентрация-ответ линий клеток рака для C9 представлены на фигурах 4C - 4F. Профили концентрация-ответ некоторых линий клеток рака (включая, например, BT-549, OVCAR-3) для C11 были аналогичными. Средние рассчитанные значения EC_{50} для C9 и C11 в чувствительных к ингибитору KIF18A клетках (например, OVCAR-3 и BT-549) составляли 0,021 мкМ и 0,047 мкМ соответственно. Линии клеток рака CAL-51, MDA-MG-453 и OVCAR-5 были нечувствительными к C9 и C11. Интересно заметить, что профили чувствительности для C9 и C11 были противоположны таковым для ингибитора CDK 4/6: линии клеток рака, которые были чувствительными к ингибиторам KIF18A C9 и C11, были нечувствительными к ингибитору CDK 4/6, в то же время те линии клеток рака, которые были нечувствительными к ингибиторам KIF18A C9 и C11, были чувствительными к ингибитору CDK 4/6.

[00409] Для изучения того, будет ли ингибирующая KIF18A активность соединений C9, C11 и C12 переносится на клеточное окружение, определяли значения EC_{50}для образования участков pH3 и PCM в клетках MDA-MB-157, и результаты демонстрировали близкую к идеальной гармонизацию потенциала между конечными точками митоза. И действительно, клеточный потенциал существенно улучшался с соединением C11 (> 70-кратно), соединением C9 (>450-кратно) и соединением C12 (>120-кратно) относительно контрольного соединения.

[00410] Для лучшего понимания продолжительности ответа после обработки ингибитором KIF18A, все пять чувствительных к ингибитору KIF18A линий клеток рака обрабатывали с помощью DMSO или соединения C11 в 6-дневном анализе роста клеток,

где выживающие клетки промывали, собирали, подсчитывали, и повторно высевали в планшеты в среду для выращивания без лекарственного средства, и культивировали в течение дополнительных 7-9 дней. Клетки MCF-7, обработанные ингибитором CDK 4/6, были включены в качестве клеток для сравнения цитостатики. Как и ожидалось, обработка соединением C11 продемонстрировала значительное снижение скорости роста клеток и образования колоний, стоит отметить, что клетки, ранее подверженные действию соединения C11, продемонстрировали заметный потенциал к уменьшению скорости роста клеток относительно контроля с DMSO и в отличие от таковых, обработанных ингибитором CDK 4/6. Стоит отметить, что клетки HCC-1806 и BT-549 продемонстрировали больший потенциал к повторному росту относительно других линий клеток после отмены ингибитора KIF18A.

[00411] Для изучения того, могут ли ингибиторы KIF18A обойти этот барьер токсичности для нормальных клеток, авторы изобретения изучали эффекты соединений C9 и C11 в отношении панели делящихся типов нормальных соматических клеток. Сначала авторы изобретения обрабатывали мононуклеарные клетки костного мозга человека (HBMNC) от двух нормальных доноров с помощью DMSO, соединений C9 и C11 при 1 мкМ, испинесиба при 0,05 мкМ, паклитаксела при 0,05 мкМ или палбоциклиба при 1 мкМ в течение 48 ч. (клеточный цикл) или 96 ч. (рост клеток). Стоит отметить, что с помощью анализа клеточного цикла выяснили, что обработка ингибитором KIF18A оказывала минимальное сокращение включения BrdU (прямой показатель синтеза ДНК) относительно контроля с DMSO в отличии от трех средств сравнения, испинесиб и паклитаксел были явно цитотоксическими, при этом ингибитор CDK4/6 был по большей мере цитостатическим. Анализ роста клеток после 96 ч. показал сравнимые количества клеток как для ингибиторов KIF18A, так и для контроля с DMSO, при этом явное уменьшение скорости роста клеток наблюдали для испинесиба и паклитаксела (уменьшение ~88%) и в меньшей степени для палбоциклиба (уменьшение 68%).

[00412] Для того, чтобы установить, будет ли наблюдаемый PD-эффект в отношении опухоли от обоих ингибиторов KIF18A приводить к воздействию на опухоль, голым мышам с опухолями (OVCAR-3 130 мм^3, n=10) вводили IP дозу среды-носителя отдельно, соединения C9, составлявшую 100 мг/кг, или соединения C12, составлявшую 25 мг/кг, один раз ежедневно в течение 18 последовательных дней. Стоит отметить, что как C9, так и C12 стимулировали 73% и 46% регресс опухоли соответственно ($p < 0{,}0001$) (фигура 19B). Обработка с помощью C9 и C12 хорошо переносилась мышами без доказательств потери веса тела или изменений числа форменных элементов крови (нейтрофилов, ретикулоцитов, лимфоцитов, моноцитов, красных клеток крови и белых клеток крови), при этом ожидалось снижение в отношении моноцитов с помощью C12 ($p=0{,}043$). С помощью конечного анализа PK выяснили, что значения AUC, представляющие собой C9 и C12 в плазме крови, составляли 130 и 53 мкМ ч соответственно.

[00413] Для оценки противоопухолевой активности ингибиторов KIF18A в модели

практически диплоидной опухоли голым мышам с опухолями CAL-51 (140 мм^3, n=10) вводили IP дозу среды-носителя отдельно, C9, составлявшую 100 мг/кг, или C12, составлявшую 25 мг/кг, один раз ежедневно в течение 18 последовательных дней. CAL-51 представляла собой линию клеток рака, которая, как было продемонстрировано in vitro, является нечувствительной к C9 и C11. Оба ингибитора KIF18A не показали наблюдаемого эффекта в отношении роста опухоли CAL-51 относительно контроля со средой-носителем (фигура 19C). В соответствии с исследованием на OVCAR-3 обработка ингибитором KIF18A хорошо переносилась мышами без доказательств потери веса тела (фигура 19B), и с помощью конечного анализа PK показали сравнимые между исследованиями профили концентрация в плазма крови-время.

[00414] Для дополнительного изучения активности ингибиторов KIF18A в HGSOC in vivo мышам с опухолями OVCAR-8 (145 мм^3, n=10) водили IP дозу среды-носителя отдельно, C9, составлявшую 50 или 100 мг/кг, или C12, составлявшую 25 или 50 мг/кг, один раз в день в течение 18 последовательных дней. Как показано на фигуре 19D, обработка с помощью C9 или C12 приводила к 16% и 73% регрессу опухоли при 50 и 100 мг/кг ($p < 0{,}0001$) или 19% и 75% регрессу опухоли при 25 и 50 мг/кг ($p < 0{,}0001$) соответственно. Как было отмечено ранее, подавление активности KIF18A хорошо переноситься мышами без доказательств потери веса тела (фигура 19D). При согласующихся дозах значения AUC, представляющие собой концентрацию в плазме крови, были в 2,8 раз выше для C12 в исследовании на OVCAR-8 по сравнению с другим исследованием эффективности, при этом PK-профили C9 в разных исследованиях были сравнимыми.

[00415] Обобщенно эти данные in vivo предоставляют первое доказательство противораковой активности низкомолекулярных ингибиторов KIF18A с сильным PD-ответом опухоли и заметным регрессом опухоли при хорошо переносимых дозах.

ПРИМЕР 20

[00416] В примере 19 в исследовании применяли следующие материалы и способы.

[00417] **Линии клеток** Все линии клеток человека закупали у ATCC или DSMZ (GmbH), если не указано иное. Подлинность линий клеток была установлена ATCC с применением ДНК-анализа коротких тандемных повторов (STR) и сравнения с базами данных STR ATCC или ExPasy Cellosaurus (Robin et al 2020). Линии клеток OVCAR-5, OVCAR-8 и OVCAR-8 NCI/ADR-RES (также известная как ADR^{RES}) (Vert et al 2018) закупали у Национального института рака. Мононуклеарные клетки костного мозга человека (HBMNC) и маммарные эпителиальные клетки человека (HMEC) закупали у Lonza Inc. Т-клетки человека выделяли из лейкопаков, закупленных у HemaCare Inc. Линию клеток MDA-MB-157 Cas9 закупали у Cellecta Inc. Линию клеток HeLa Kyoto, экспрессирующую белки α-тубулин-EGFP и H2B-mCherry, закупали у Creative Bioarray Inc. Все культуры линий клеток поддерживали при 37°C в атмосфере 5% CO_2. Определяли, что линии клеток OVCAR-3, CAL-51 и OVCAR-8, применяемые для исследования in vivo, не контаминированы микоплазмой и панелью мышиных вирусных

патогенов. Информация о линиях клеток, включающая тип ткани опухоли, подтип опухоли, мутационный статус TP53, статус RB1 и CCNE1 и статус дублирования полного генома (WGD), основана на общедоступных источниках данных, приведенных в качестве перекрестных ссылок (консорциум DepMap, база данных TP53 IARC, паспорт клеточных моделей Sanger, CCLE, ATCC, DSMZ Института Брод), и опубликованных исследованиях (Domcke et al 2013, Dai et al 2017, Quinton et al 2020).

[00418] **Химические данные.** Молекулярные структуры были раскрыты для соединений BI-2536 (Steegmaier et al 2007), BTB-1 (Catarinella et al 2009), доксорубицина (Carvalho et al 2009), гемцитабина (Pourquier et al 2002), GF120918 (Hyafil et al 1993), GSK923295 и испинесиба (Rath и Kozielski 2012), нутлина-3а (Vassilev 2004), паклитаксела и доцетаксела (Perez 2009), палбоциклиба (O'Leary et al 2016), соединения на основе ингибитора KIF18A были синтезированы Amgen.

[00419] **Активность ингибитора KIF18A**

[00420] Соединения к KIF18A C9, C11, C12 2-кратно серийно разбавляли в диапазоне концентраций с 22 точками в DMSO с применением 384-луночного планшета (Corning). Экспрессировали и очищали рекомбинантные усеченные кинезиновые моторные белки (KIF18A человека (остатки 1-467, 4 нМ), KIF18A мыши (остатки 1-467, 4 нМ)). Применяли люминесцентный анализ с помощью ADP-Glo (Promega) для измерения МТ-АТФазной моторной активности. МТ головного мозга свиньи закупали у Cytoskeleton Inc. Соединения предварительно инкубировали в течение <30 мин в реакционном буфере (15 мМ Трис, pH 7,5, 10 мМ $MgCl_2$, 0,01% Pluronic F-68, 2% DMSO, 1 мкМ паклитаксел, 30 мкг/мл МТ) с моторными белками при концентрациях, указанных выше, добавляли 30 мкМ АТФ со стимулированием ферментативной реакции в течение 15 мин. при комнатной температуре (к. т.). Реагент ADP-Glo добавляли в соответствии с протоколом изготовителя, интенсивность люминесценции, пропорциональную присутствующему ADP, измеряли с применением считывающего устройства для планшетов EnVision (Perkin Elmer). Необработанные данные люминесцентного сигнала нормализовали в отношении POC (процента от положительного контроля) и затем вычисляли активность (%) [POC=100 × (сигнал образца - сигнал отрицательного контроля) ÷ (сигнал положительного контроля - сигнал отрицательного контроля); активность (%)=POC - 100]. Положительный контроль (фермент+субстрат) и отрицательный контроль (субстрат отдельно) содержали эквивалентные концентрации DMSO. Аппроксимацию кривой и определение значений IC_{50} проводили с помощью 4-параметрического уравнения нелинейной регрессии (переменный угловой коэффициент) с применением GraphPad Prism 7.05 (программное обеспечение GraphPad).

[00421] **Анализ роста клеток** Панель линий клеток (HCC-1806, HCC-1937, BT-549, MDA-MB-157, MCF-7, CAL-51, MDA-MB-453, ZR-75-1, OVCAR-3, OVCAR-5) высевали в 96-луночный планшет при значениях плотности, оптимизированных для 96-ч. анализа роста клеток. На следующий день клетки обрабатывали с помощью DMSO или одного из следующий соединений: соединения C9 и C11 на основе ингибиторов KIF18A или

палбоциклиб, с наивысшей концентрацией, составлявшей 6 мкМ (диапазон концентрации с 19 точками) с применением постадийного режима дозирования. Через 96 ч. клетки фиксировали, окрашивали, визуализировали и анализировали, как описано выше. Для каждой лунки определяли количество применимых объектов, представляющих собой ядро, и рассчитанное значение POC вычисляли с применением следующей формулы [рассчитанное POC=(количество применимых объектов, представляющих собой ядро, в обработанной лунке) ÷ (количество применимых объектов, представляющих собой ядро, в обработанных DMSO лунках) x 100]. Аппроксимацию кривой концентрация-ответ проводили с помощью 4-параметрического уравнения нелинейной регрессии с применением GraphPad Prism 7.05. Среднее рассчитанное значение EC_{50} вычисляли для каждой линии клеток на основе двух независимых экспериментов в двух повторностях. Если максимальный ответ, составляющий >50%, не был достигнут при наивысшей концентрации, то линиям клеток присваивали рассчитанное значение EC_{50} 6 мкМ и их считали нечувствительными. Среднее рассчитанное значение EC_{50} вычисляли среди чувствительных линий клеток для каждого тестируемого средства.

[00422] **Анализ с помощью BrdU и анализ клеточного цикла** Мононуклеарные клетки костного мозга человека (HBMNC) от двух нормальных доноров (№ 37612, № 37534) культивировали в течение 8 дней в определенной среде, как описано ранее (Payton et al 2018). HBMNC высевали в 24-луночный планшет при $1,2 \times 10^6$ клеток на лунку в планшетах в двух повторностях. Клетки обрабатывали с помощью DMSO, соединения C9 (1 мкМ), соединения C11 (1 мкМ), испинесиба (0,05 мкМ), паклитаксела (0,1 мкМ) или палбоциклиба (1 мкМ). Клетки собирали после 48 ч. (клеточный цикл) и 96 ч. (рост клеток). Первый ряд планшетов прерывисто обрабатывали с помощью BrdU в течение 2 ч. и обрабатывали для анализа клеточного цикла с помощью BrdU, как описано ранее (Payton et al 2018). Клетки анализировали на проточном цитометре BD LSRFortessa с выполнением программного обеспечения BD FACSDiva и анализ данных после их сбора проводили с применением программного обеспечения FSC-Express. Получали данные о проценте BrdU и гейтированных по суб-G_1 фазе популяциях. Брали второй ряд планшетов и подсчитывали клетки с применением анализатора жизнеспособности клеток Vi-CELL XR (Beckman Coulter). Проводили построение графиков для каждого донора с применением GraphPad Prism 7.05.

[00423] **Исследование эффективности на ксенотрансплантате опухоли OVCAR-3**

[00424] Мышам подкожно в правый бок вводили с помощью инъекции клетки OVCAR-3 человека ($5,0 \times 10^6$). Животных с прижившимися опухолями рандомизировали на четыре группы (n=10 на группу) со средним объемом опухоли, составлявшим 130 $мм^3$. Животным вводили IP дозу среды-носителя отдельно ежедневно, C9 (100 мг/кг) ежедневно или C12 (25 мг/кг) ежедневно. Обработку начинали в день 24 после имплантации опухоли и обработку оканчивали в день 42. Значения объема опухоли и веса тела записывали дважды в неделю с применением цифрового штангенциркуля и

аналитических лабораторных весов соответственно. После введения последней дозы в день 42 полный анализ числа форменных элементов крови (n=6 на группу обработки) проводили с помощью IDEXX Inc. Анализ фармакокинетики в плазме крови проводили для C9 и C12 в моменты времени, представлявшие собой 2, 4, 8, 16 и 24 ч (n=2 на момент времени), с помощью стандартных способов LC-MS/MS. Процент подавления роста опухоли (%TGI) рассчитывали в виде %TGI относительно контроля со средой-носителем: %TGI=100 - [(объем после обработки - исходный объем) / (контрольный объем - исходный объем) X 100]. Процентах регресса опухоли (%TR) рассчитывали в виде %TR, сравнения конечного объема опухоли с исходным объемом опухоли: %TR=100 - [(конечный объем) / (исходный объем) X 100]. Данные строили на графике с применением GraphPad Prism 7.05. Для групп обработки проводили статистический анализ роста опухоли и числа форменных элементов крови с применением ANOVA для повторных измерений и одностороннего ANOVA соответственно с последующим тестом множественных сравнений Даннетта.

[00425] **Исследование эффективности на ксенотрансплантате опухоли CAL-51**

[00426] Мышам подкожно в правый бок вводили с помощью инъекции клетки CAL-51 человека ($5{,}0 \times 10^6$). Животных с прижившимися опухолями рандомизировали на четыре группы (n=10 на группу) со средним объемом опухоли, составлявшим 140 мм^3. Животным вводили IP дозу среды-носителя отдельно ежедневно, C9 (100 мг/кг) ежедневно или C12 (25 мг/кг) ежедневно. Обработку начинали в день 18 после имплантации опухоли и обработку оканчивали в день 36. Оценку объема опухоли и веса тела проводили, как описано выше. После введения последней дозы в день 36 проводили анализ фармакокинетики в плазме крови, как описано выше. Весь анализ данных проводили, как описано выше.

[00427] **Исследование эффективности на ксенотрансплантате опухоли OVCAR-8**

[00428] Мышам подкожно в правый бок вводили с помощью инъекции клетки OVCAR-8 человека ($5{,}0 \times 10^6$). Животных с прижившимися опухолями рандомизировали на четыре группы (n=10 на группу) со средним объемом опухоли, составлявшим 145 мм^3. Животным ежедневно вводили IP дозу среды-носителя отдельно, C9 (50 или 100 мг/кг) или C12 (25 или 50 мг/кг). Обработку начинали в день 28 после имплантации опухоли и обработку оканчивали в день 46. Оценку объема опухоли и веса тела проводили, как описано выше. После введения последней дозы в день 46 проводили анализ фармакокинетики в плазме крови, как описано выше помимо того, что кровь забирали с помощью способа забора из ретроорбитальной зоны.

[00429] **Литературные источники**

[00430] В данном примере цитируются следующие литературные источники:

Robin T, Capes- Davis A, Bairoch A. CLASTR: The Cellosaurus STR similarity search tool- A precious help for cell line authentication. International journal of cancer. 2020 Mar 1;146(5):1299-306.

Vert A, Castro J, Ribó M, Vilanova M, Benito A. Transcriptional profiling of NCI/ADR-RES cells unveils a complex network of signaling pathways and molecular mechanisms of drug resistance. OncoTargets and therapy. 2018;11:221.

Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. Nature communications. 2013 Jul 9;4(1):1-0.

Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. Journal of Cancer. 2017;8(16):3131.

Quinton RJ, DiDomizio A, Vittoria MA, Kotýnková K, Ticas CJ, Patel S, Koga Y, Vakhshoorzadeh J, Hermance N, Kuroda TS, Parulekar N. Whole-genome doubling confers unique genetic vulnerabilities on tumour cells. Nature. 2021 Jan 27:1-6.

Steegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lénárt P, Petronczki M, Krššák M, Gürtler U, Garin-Chesa P, Lieb S, Quant J, Grauert M. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. Current biology. 2007 Feb 20;17(4):316-22.

Catarinella M, Grüner T, Strittmatter T, Marx A, Mayer TU. BTB- 1: a small molecule inhibitor of the mitotic motor protein Kif18A. Angewandte Chemie International Edition. 2009 Nov 16;48(48):9072-6.

Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. Current medicinal chemistry. 2009 Sep 1;16(25):3267-85.

Pourquier P, Gioffre C, Kohlhagen G, Urasaki Y, Goldwasser F, Hertel LW, Yu S, Pon RT, Gmeiner WH, Pommier Y. Gemcitabine (2′, 2′-difluoro-2′-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. Clinical Cancer Research. 2002 Aug 1;8(8):2499-504.

Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P, Grand-Perret T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. Cancer research. 1993 Oct 1;53(19):4595-602.

Rath O, Kozielski F. Kinesins and cancer. Nature reviews cancer. 2012 Aug;12(8):527-39.

Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science. 2004 Feb 6;303(5659):844-8.

Perez EA. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. Molecular cancer therapeutics. 2009 Aug 1;8(8):2086-95.

O'leary B, Finn RS, Turner NC. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. Nature reviews Clinical oncology. 2016 Jul;13(7):417-30.

Payton M, Cheung HK, Ninniri MS, Marinaccio C, Wayne WC, Hanestad K, Crispino JD, Juan G, Coxon A. Dual targeting of Aurora kinases with AMG 900 exhibits potent preclinical activity against acute myeloid leukemia with distinct post-mitotic outcomes. Molecular cancer therapeutics. 2018 Dec 1;17(12):2575-85.

[00431] Все литературные источники, включая публикации, заявки на патенты и

патенты, цитируемые в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждый документ был отдельно и конкретно указан как включенный посредством ссылки и был представлен во всей своей полноте в данном документе.

[00432] Применение терминов в единственном числе, множественном числе и аналогичных определений в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное число, так и множественное число, если в данном документе не указано иное, или это явно не противоречит контексту. Термины "предусматривающий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует толковать как открытые термины, включающие указанный(-ые) компонент(-ы), но не исключающие другие элементы (т. е. означающие "включающий без ограничения"), если не указано иное.

[00433] Предусматривается, что упоминание диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения отдельного указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон, и каждой конечной точки, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение и конечная точка включены в настоящее описание, как если бы они были отдельно упомянуты в данном документе.

[00434] Все способы, описанные в данном документе, можно выполнять в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе, или иное явно не противоречит контексту. Применение любых видов примеров или иллюстративных формулировок (например, "такой как"), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения и не накладывает ограничений на объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна толковаться как указывающая на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации настоящего изобретения.

[00435] В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, включая наилучший способ, известный авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения вышеуказанного описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в данной области техники будут использовать такие вариации соответствующим образом, и авторы настоящего изобретения предполагают, что настоящее изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, упомянутого в прилагаемой к данному документу формуле изобретения, в установленных применимым законом пределах. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариациях охватывается настоящим изобретением, если в данном

документе не указано иное, или иное явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения лечения для субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, включающий анализирование образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, где лечение, определенное для субъекта, включает ингибитор KIF18A, если образец является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

2. Ингибитор KIF18A для применения в лечении субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, где у субъекта присутствуют клетки, которые являются положительными в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

3. Способ идентификации субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, как чувствительного к лечению ингибитором KIF18A, включающий анализирование образца, полученного от субъекта, в отношении (a) инактивированного гена TP53 и/или (b) по меньшей мере одного из: (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации, где субъект идентифицируется как чувствительный к лечению ингибитором KIF18A, если образец является положительным в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительным в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

4. Способ определения лечения для субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, включающий определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором CDK4/6, где лечение для субъекта определяется как лечение, включающее ингибитор KIF18A, если неопластическое заболевание является нечувствительным к ингибитору CDK4/6, или определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIF18A, где лечение для субъекта определяется как лечение, включающее ингибитор CDK4/6, если неопластическое заболевание является нечувствительным к ингибитору KIF18A.

5. Способ идентификации субъекта, у которого имеется рак, как восприимчивого к лечению ингибитором KIF18A, включающий определение чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором KIF18A, где субъект идентифицируется как восприимчивый к лечению ингибитором KIF18A, если раковые

клетки из образца нечувствительны к ингибитору CDK4/6.

6. Ингибитор KIF18A для применения в (A) лечении субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, где неопластическое заболевание является устойчивым к лечению ингибитором CDK4/6 или субъект подвергается или подвергался лечению ингибитором CDK4/6, или (B) поддержании чувствительности неопластического заболевания к лечению ингибитором CDK4/6 у субъекта, при этом необязательно ингибитор KIF18A предназначен для применения вместе с ингибитором CDK4/6.

7. Способ по любому из пп. 4-6, где определение чувствительности включает анализирование образца, полученного от субъекта, в отношении отсутствия (i) инактивированного гена Rb1, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессии продукта гена CCNE1 или (iii) их комбинации.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где образец содержит раковые клетки, опухолевые клетки, клетки, отличные от опухолевых, кровь, клетки крови или плазму крови, при этом необязательно образец содержит зародышевые раковые клетки или соматические раковые клетки.

9. Фармацевтическая комбинация, содержащая ингибитор CDK4/6 и ингибитор KIF18A.

10. Способ или фармацевтическая комбинация по любому из пп. 4-9, где ингибитор CDK4/6 представляет собой палбоциклиб, рибоциклиб и/или абемациклиб.

11. Ингибитор KIF18A для применения в лечении субъекта, у которого имеется неопластическое заболевание, стимулировании или усилении регресса опухоли у субъекта с опухолью, уменьшении опухоли или скорости роста рака у субъекта с опухолью и/или стимулировании или усилении гибели опухолевых или раковых клеток у субъекта.

12. Способ или ингибитор KIF18A для применения по любому из предыдущих пунктов, где неопластическое заболевание представляет собой рак, необязательно рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак легкого или рак предстательной железы.

13. Способ или ингибитор KIF18A для применения по п. 12, где неопластическое заболевание представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы (TNBC), нелюминальный рак молочной железы, или низкодифференцированный серозный рак яичника (HGSOC), или рак эндометрия, необязательно серозный рак эндометрия.

14. Способ или ингибитор KIF18A для применения по любому из предыдущих пунктов, где рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении инактивированного гена TP53 и/или положительными в отношении по меньшей мере одного из инактивированного гена Rb, (ii) амплифицированного гена CCNE1 или сверхэкспрессированного продукта гена CCNE1, (iii) инактивированного гена BRCA или (iv) их комбинации.

15. Способ или ингибитор KIF18A для применения по п. 14, где рак содержит клетки, которые являются положительными в отношении мутантного гена TP53, и/или содержит клетки, которые являются положительными в отношении амплифицированного

гена CCNE1, подвергшегося сайленсингу гена BRCA1, дефектного гена Rb1 или их комбинации.

16. Способ или ингибитор KIF18A для применения по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор KIF18A обеспечивает лечение неопластического заболевания, стимулирует или усиливает регресс опухоли, обеспечивает уменьшение опухоли или скорости роста рака и/или стимулирует или усиливает гибель опухолевых или раковых клеток и (A) пролиферация нормальных соматических клеток у субъекта является по сути такой же, как пролиферация нормальных соматических клеток контрольного субъекта, и/или (B) уровень апоптоза нормальных соматических клеток не повышается у субъекта относительно уровня апоптоза нормальных соматических клеток контрольного субъекта, при этом необязательно уровень апоптоза нормальных соматических клеток является по сути таким же, как уровень апоптоза нормальных соматических клеток контрольного субъекта.

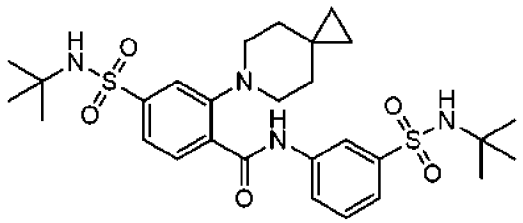
17. Способ или ингибитор KIF18A для применения по п. 16, где нормальные соматические клетки представляют собой мононуклеарные клетки костного мозга человека, маммарные эпителиальные клетки человека или фибробластные клетки крайней плоти человека, и/или нормальные соматические клетки являются отличными от $TP53^{MUT}$, или где нормальные соматические клетки являются $TP53^{WT}$.

18. Способ или ингибитор KIF18A для применения по любому из предыдущих пунктов, где (i) неопластическое заболевание представляет собой неопластическое заболевание с множественной лекарственной устойчивостью, (ii) опухолевые или раковые клетки представляют собой опухолевые или раковые клетки с множественной лекарственной устойчивостью, (iii) в опухолевых или раковых клетках проявляется повышенная экспрессия гена множественной лекарственной устойчивости 1 (MDR-1) и/или продукта этого гена, (iv) в опухолевых или раковых клетках проявляется повышенная экспрессия P-гликопротеина (P-gp) или (v) любая их комбинация.

19. Способ или ингибитор KIF18A для применения по любому из предыдущих пунктов, где неопластическое заболевание является устойчивым к лечению подавляющим митоз средством или антрациклиновым антибиотиком, при этом необязательно подавляющее митоз средство или антрациклиновый антибиотик представляет собой паклитаксел или доксорубицин.

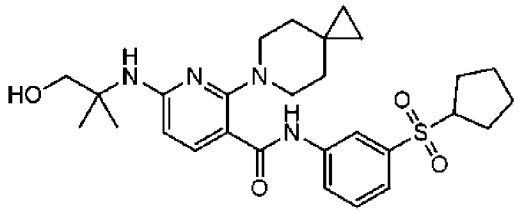
20. Способ или ингибитор KIF18A для применения или фармацевтическая комбинация по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор KIF18A вводят путем перорального введения, необязательно один раз в день.

21. Способ или ингибитор KIF18A для применения по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение C9 на основе ингибитора KIF18A, также известное как 4-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)-N-(3-(N-(*трет*-бутил)сульфамоил)фенил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид, характеризующееся структурой:



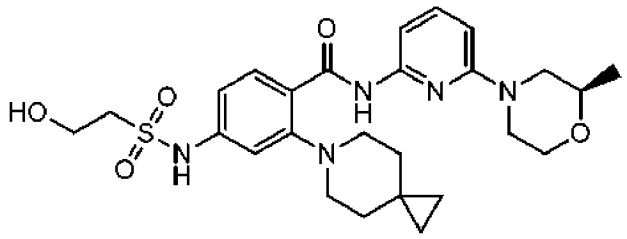
; или любую его фармацевтически приемлемую соль.

22. Способ или ингибитор KIF18A для применения по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение C11 на основе ингибитора KIF18A, также известное как N-(3-(циклопентилсульфонил)фенил)-6-((1-гидрокси-2-метилпропан-2-ил)амино)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)никотинамид, характеризующееся структурой:



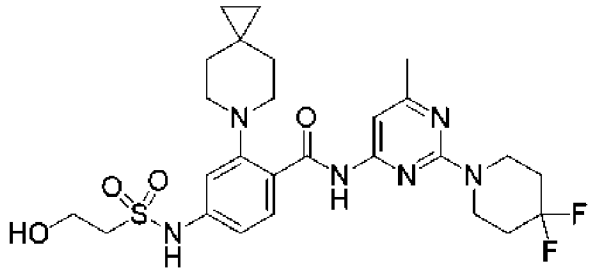
; или любую его фармацевтически приемлемую соль.

23. Способ или ингибитор KIF18A для применения по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение C12 на основе ингибитора KIF18A, также известное как (R)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-N-(6-(2-метилморфолино)пиридин-2-ил)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид, характеризующееся структурой:



; или любую его фармацевтически приемлемую соль.

24. Способ или ингибитор KIF18A для применения по любому из предыдущих пунктов, где ингибитор KIF18A представляет собой соединение C14 на основе ингибитора KIF18A, также известное как N-(2-(4,4-дифторпиперидин-1-ил)-6-метилпиримидин-4-ил)-4-((2-гидроксиэтил)сульфонамидо)-2-(6-азаспиро[2.5]октан-6-ил)бензамид, характеризующееся структурой:



; или любую его фармацевтически

приемлемую соль.

25. Ингибитор KIF18A для применения в лечении неопластического заболевания у субъекта, который подвергается или подвергался лечению подавляющим митоз средством или антрациклиновым антибиотиком, при этом необязательно ингибитор KIF18A (A) уменьшает экспрессию гена KIF18A и/или продукта гена KIF18A, (B) представляет собой некодирующую РНК, при этом необязательно ингибитор KIF18A опосредует RNAi, и/или (C) представляет собой siRNA, необязательно содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 12-18.

По доверенности

ФИГ. 1А

Линия клеток	Происхождение	Условия выращивания культур клеток (+ L-глутамин)	Источник#
DU-145	Предстательная железа	RPMI 1640, 10% FBS	ATCC
BT-549	Молочная железа	RPMI 1640, 10% FBS	ATCC
CAL-51	Молочная железа	DMEM, 10% FBS, 1XNEAA	DSMZ
OVCAR-3*	Яичник	RPMI 1640, 20% FBS, 0,01 мг/мл бычьего инсулина	ATCC
MDA-MB-157	Молочная железа	RPMI 1640, 15% FBS	ATCC
MDA-MD-453	Молочная железа	RPMI 1640, 10% FBS	ATCC
MCF-7	Молочная железа	RPMI 1640, 10% FBS	ATCC
OVCAR-5	Яичник	RPMI 1640, 10% FBS	ACB
HCC-1954	Молочная железа	RPMI, 10% FBS, 0,1 мМ NEAA	ATCC
OVCAR-8_NCI/ADR-RES	Яичник	RPMI 1640, 10% FBS	ACB
HCC-1937	Молочная железа	RPMI 1640, 10% FBS	ATCC
ZR-75-1	Молочная железа	RPMI 1640, 10% FBS	ATCC
HCC-1806	Молочная железа	RPMI 1640, 10% FBS	ATCC
MAX401NLPDX	Молочная железа	RPMI 1640, 10% FBS	CRL
OVCAR-8	Яичник	RPMI 1640, 10% FBS	ACB
HeLa	Шейка матки	DMEM+10% FBS+1X NEAA	ATCC

#Репозитарий клеток: (ATCC) Американская коллекция типовых культур, (ACB) банк клеток Amgen, (DSMZ) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. (CRL) Charles Rivers Laboratories. *OVCAR-3 (SQ3) была выбрала для выращивания in vivo в виде ксенотрансплантата опухоли у мыши при Amgen Inc.

ФИГ. 1B

ЛИНИЯ КЛЕТОК	ПРОИСХОЖДЕНИЕ ОПУХОЛИ	ПЛОТНОСТЬ ВЫСЕВАНИЯ ДЛЯ NCA* (клетки/лунка)
DU-145	Предстательная железа	4000
BT-549	Молочная железа	4000
HCC-1954	Молочная железа	4000
MDA-MB-453	Молочная железа	6000
ZR-75-1	Молочная железа	8000
OVCAR-5	Яичник	6000
MDA-MB-157	Молочная железа	8000
HCC-1806	Молочная железа	3000
OVCAR-3	Яичник	10000
MCF-7	Молочная железа	3000
CAL-51	Молочная железа	2000
MX-1 (CB)	Молочная железа	12000 (6-дневный)
HCC-1937	Молочная железа	8000, 6000 (6-дневный)
OVCAR-8_NCI/ADR-RES	Яичник	6000
MAX401NLPDX	Молочная железа	5000 (6-дневный)
OVCAR-8	Яичник	2000

ФИГ. 1C-1

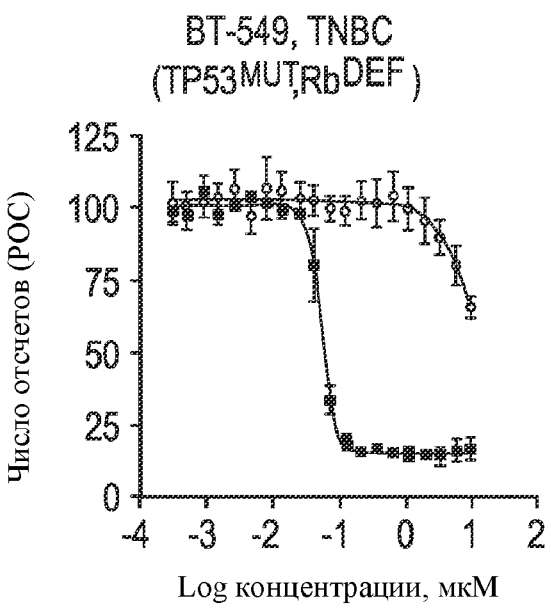
Чувствительный к ингибитору KIF18A (Да/Нет)	Название линии CHI	Тип ткани	Подтип опухоли	Статус TP53	Статус пути Rb и CCNE1	Среднее рассчитанное EC_{50} (мкМ), ширина диапазона >50%		
						Соединение C14, KIF18A	Палбоциклиб, CDK4/6	Испинесиб, Eg5
Да	MDA-MB-157	Молочная железа	TNBC	Мутантный вариант	$CCNE1^{AMP}$	0,0683, Да	>10,0, Нет	0,031, Да
Да	3T-549	Молочная железа	TNBC	Мутантный вариант	Rb^{DEF}	0,054, Да	>10,0, Нет	0,005, Да
Да	OVCAR-3	Яичник	HGSOC	Мутантный вариант	$CCNE1^{AMP}$	0,0498, Да	>10,0, Нет	0,0083, Да
Да	DU-145	Предстательная железа	AR^{NEG}	Мутантный вариант	Rb^{DEF}	0,0564, Да	>10,0, Нет	0,0052, Да
Да	HCC-1S37	Молочная железа	TNBC $BRCA1^{MUT}$	Мутантный вариант	Rb^{DEF}	0,0493, Да	>10,0, Нет	0,0026, Да
Да	HCC-1836	Молочная железа	TNBC	Мутантный вариант	$CCNE1^{AMP}$	0,0665, Да	2,712, Да	0,0017, Да
Да	HCC-1954	Молочная железа	$HER2^{AMP}/ER^{NEG}$	Мутантный вариант	Rb^{PROF}	0,0497, Да	0,0713, Да	0,0019, Да
Нет	CAL-51	Молочная железа	TNBC	Дикий тип	Rb^{PROF}	>10,0, Нет	0,1906, Да	0,0017, Да
Нет	MDA-MB-453	Молочная железа	$HER2^{?}/ER^{NEG}$	Null	Rb^{PROF}	>10,0, Нет	0,2306, Да	0,0026, Да
Нет	OVCAR-S	Яичник	HGSOC	Дикий тип	Rb^{PROF}	>10,0, Нет	0,0467, Да	0,0056, Да

ФИГ. 1C-2

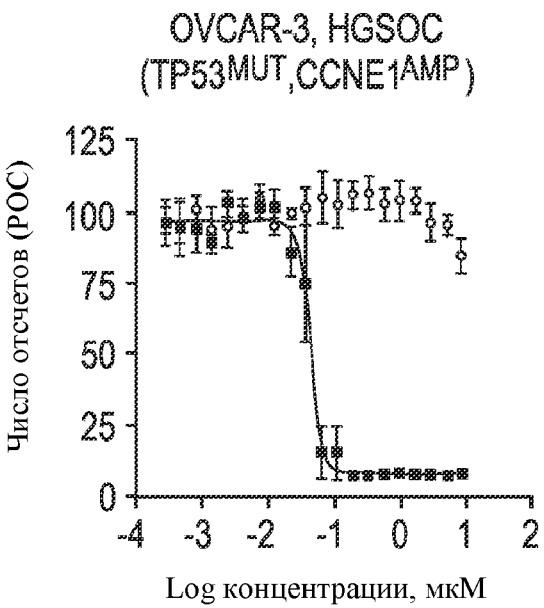
Чувствительный к ингибитору KIF18A(Да/Нет)	Название линии клеток	Тип ткани	Подтип опухоли	Статус TP53	Статус пути Rb и CCNE1	Среднее рассчитанное EC50 (мкМ), ширина диапазона >50%		
						Соединение C14, KIF18A	Палбоциклиб, CDK4/6	Испинесиб, Eg5
Нет	ZR-75-1	Молочная железа	Люминальный ER^{POS}	Дикий тип	Rb^{PROF}	>10,0, Нет	0,0713, Да	0,0029, Да
Нет	MCF-7	Молочная железа	Люминальный ER^{POS}	Дикий тип	Rb^{PROF}	0,124, Нет	0,0509, Да	0,0016, Да
	Среднее рассчитанное значение EC_{50} для чувствительных линий клеток (SD) Количество чувствительных линий клеток					**0,0563 мкМ (±0,008) 7**	**0,4818 мкМ (±0,9861) 7**	**0,0035 мкМ (±0,0021) 12**

Чувствительный к ингибитору KIF18A

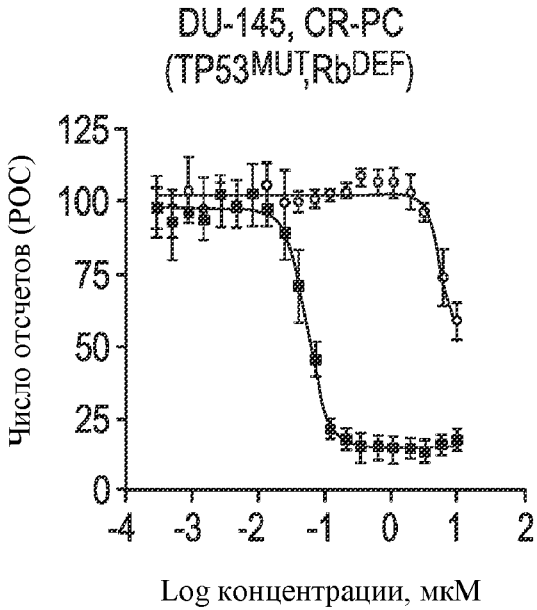
ФИГ. 2A



ФИГ. 2B



ФИГ. 2C

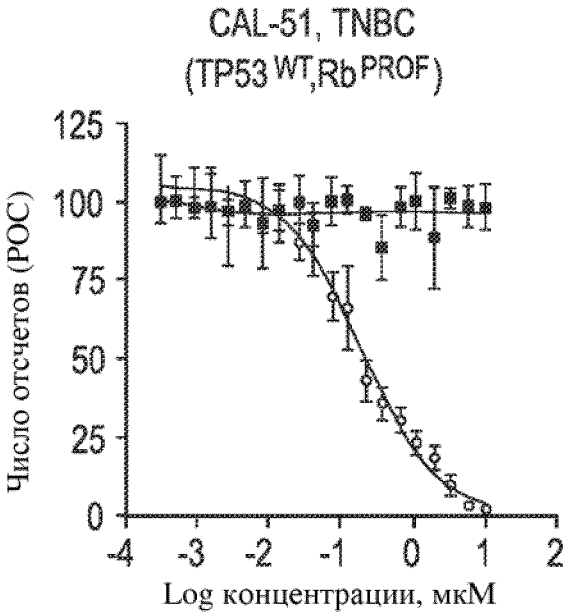


■ Ингибитор KIF18A

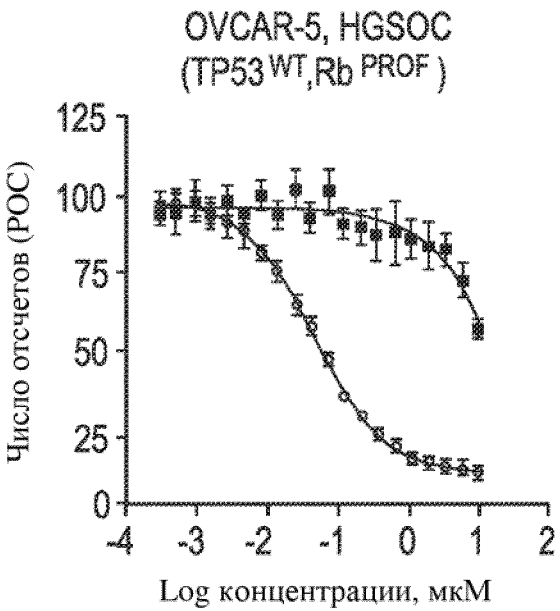
○ Ингибитор CDK4/6

Чувствительный к ингибитору CDK4/6

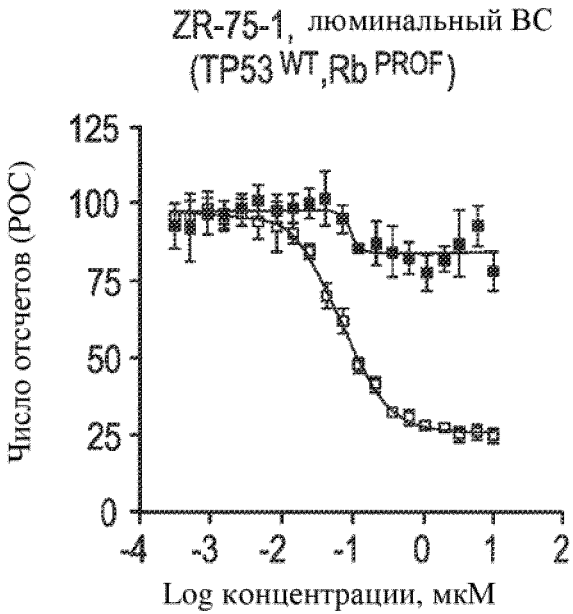
ФИГ. 2D



ФИГ. 2E



ФИГ. 2F



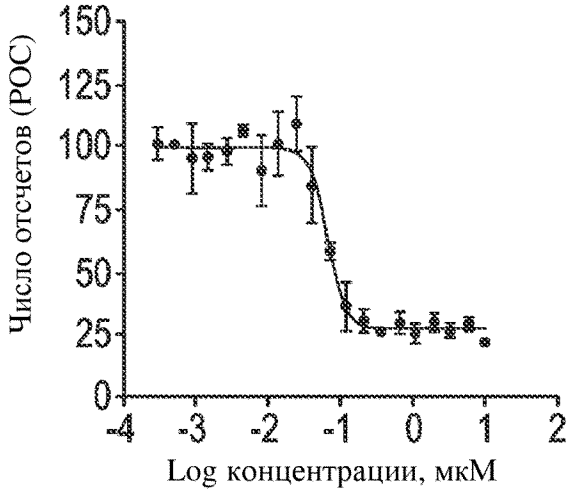
■ Ингибитор KIF18A

○ Ингибитор CDK4/6

ФИГ. 3A

OVCAR-8, HGSOC
(TP53 MUT/BRCA1 подвергшийся сайленсингу)

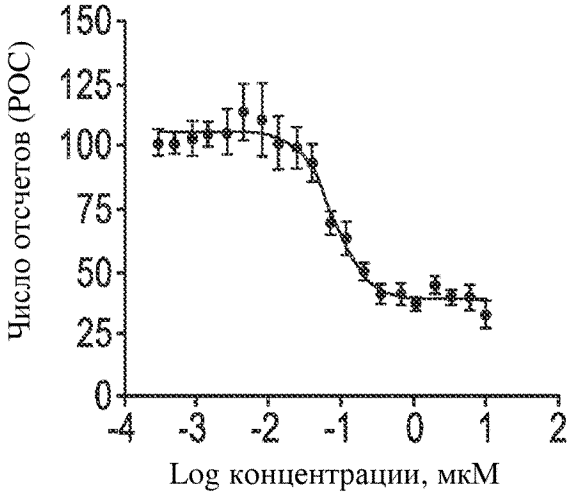
Рассчитанное на основе 4 дней
EC50 = 0,068 мкМ



ФИГ. 3B

MX-1, TNBC
53 MUT/BRCA1MUT)

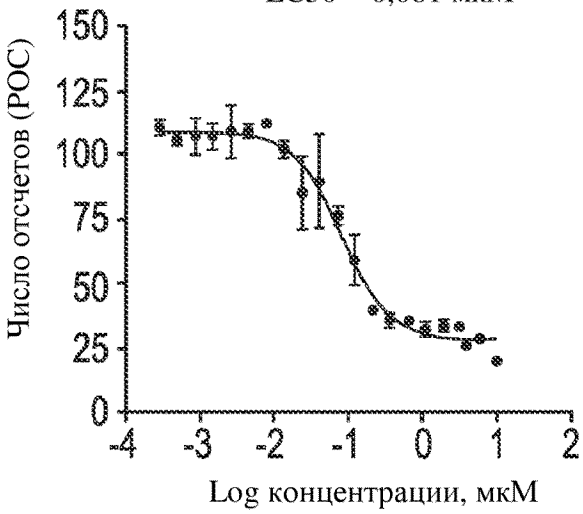
Рассчитанное на основе 6 дней
EC50 = 0,082 мкМ



ФИГ. 3C

MAX401NL PDX, TNBC
(TP53 MUT/BRCA1MUT)

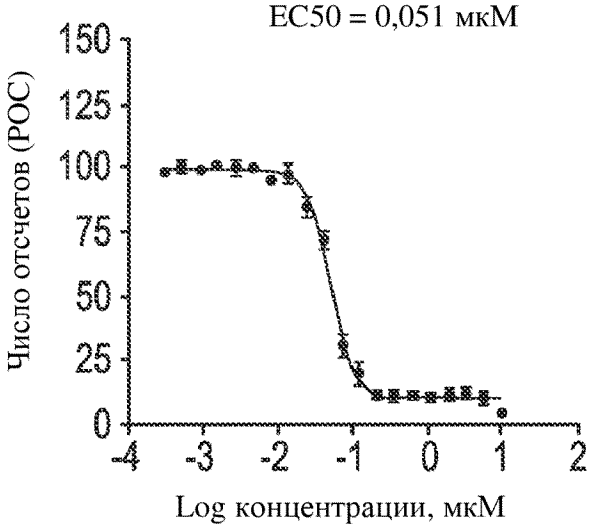
Рассчитанное на основе 6 дней
EC50 = 0,081 мкМ



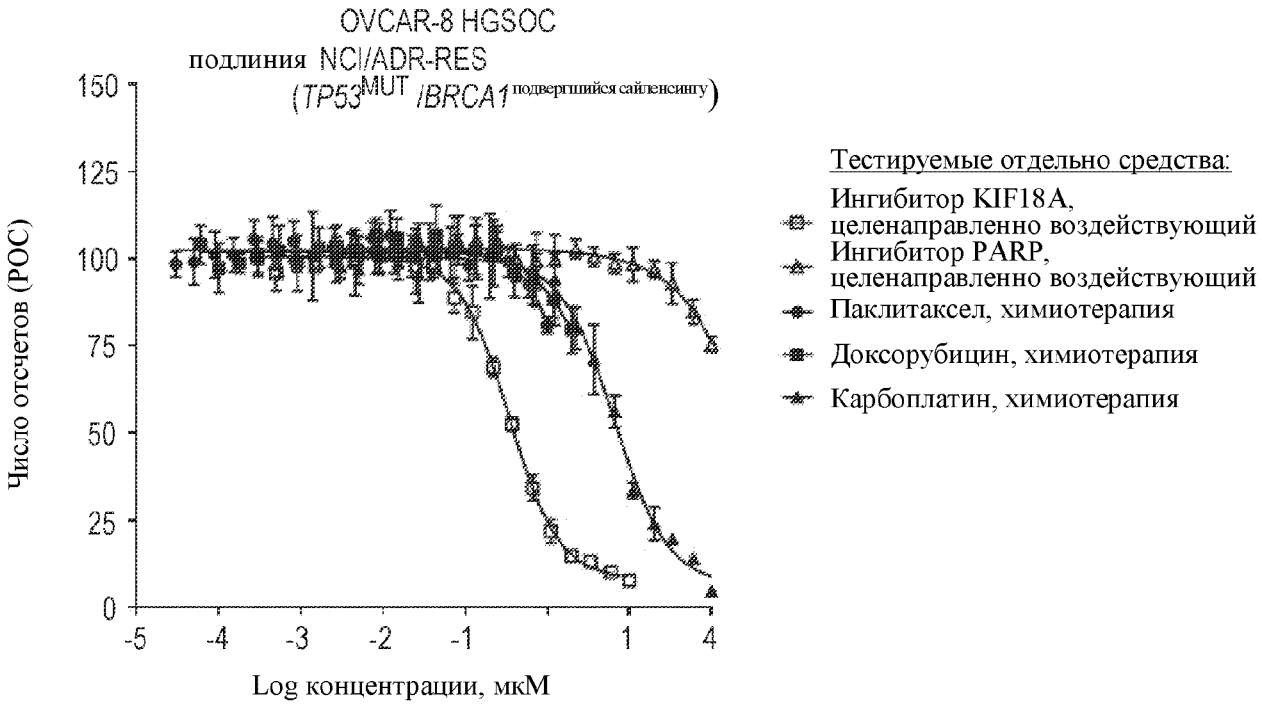
ФИГ. 3D

HCC-1937, TNBC
(TP53 MUT/BRCA1MUT)

Рассчитанное на основе 6 дней
EC50 = 0,051 мкМ



ФИГ. 3E



Мишень	KIF18A	PARP	Химиотерапевтические средства		
Тестируемое средство	Соединение C14	Олапариб	Паклитаксел	Доксорубиц	Карбоплати
Среднее рассчитанное EC_{50} (мкМ)	0,346	>100*	>1*	>2*	6,61

*указывает, что действенность более высокая, чем наивысшая концентрация соединения

ФИГ. 4А-1

ТАБЛИЦА 2

Линия клеток	Тип опухоли	Подтип опухоли	Статус ER	HER2	Чувствительность к ингибитору KIF18A	Ингибитор KIF18A, EC50 для клеток, мкМ; скрининг с помощью CP, HR, AM
AU565	Молочная железа	HER2	NEG	POS	Чувствительный	0,016, 0,0065, ND
BT-20	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный	ND, 0,0042, ND
BT-549	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный	0,01424, 0,0062, 0,0183
CAL-120	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный	ND, 0,0062, ND
HCC-1187	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный	0,017, ND, ND
HCC-1806	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный	0,0148, 0,0177, 0,029
HCC-1937	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный	ND, ND, 0,0159
HCC1954	Молочная железа	HER2	NEG	POS	Чувствительный	0,01, 0,0035, 0,01
Hs 578T	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный	0,0134, ND, ND
JIMT-1	Молочная железа	HER2	NEG	POS	Чувствительный	ND, 0,0036, ND
MDA-MB-157	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный	ND, ND, 0,0225
MDA-MB-436	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный(?)	2,0, 0,0088, ND
MDA-MB-468	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Чувствительный(?)	0,0145, 0,0095, ND
BT-474	Молочная железа	HER2	POS	POS	Нечувствительный	2,0, 0,048, ND
CAL-148	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Нечувствительный	ND, 0,676, ND
CAL-51	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Нечувствительный	ND, ND, 6,0
CAMA1	Молочная железа	LumA	POS	NEG	Нечувствительный	2,0, 0,236, ND
DU-4475	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Нечувствительный	2,0, 0,664, ND
HCC-1143	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Нечувствительный	2,0, ND, ND
HCC-1500	Молочная железа	LumB	POS	NEG	Нечувствительный	2,0, ND, ND
HCC-1569	Молочная железа	HER2	NEG	POS	Нечувствительный	2,0, ND, ND
HCC-202	Молочная железа	HER2	NEG	POS	Нечувствительный	2,0, ND, ND
HCC-2157	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Нечувствительный	2,0, ND, ND
HCC-2218	Молочная железа	HER2	NEG	POS	Нечувствительный	2,0, ND, ND
HCC-38	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Нечувствительный	2,0, 0,003, ND
HCC-70	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Нечувствительный	2,0, 0,698, ND
HDQ-P1	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Нечувствительный	ND, 2,16, ND
KPL-1	Молочная железа	LumA	POS	NEG	Нечувствительный	ND, 0,0127, ND
MCF-7	Молочная железа	LumA	POS	NEG	Нечувствительный	2,0, ND, 0,274
MDA-MB-175-VII	Молочная железа	LumA	POS	NEG	Нечувствительный	2,0, 0,0131, ND
MDA-MB-361	Молочная железа	HER2	POS	POS	Нечувствительный	2,0, 3,99, ND
MDA-MB-415	Молочная железа	LumA	POS	NEG	Нечувствительный	2,0, ND, ND
MDA-MB-453	Молочная железа	HER2	NEG	POS	Нечувствительный	2,0, 0,222, 6,0
SK-BR-3	Молочная железа	HER2	NEG	POS	Нечувствительный	ND, 0,0005, ND
SUM159PT	Молочная железа	TNBC	NEG	NEG	Нечувствительный	ND, 3,89, ND
T47D	Молочная железа	LumA	POS	NEG	Нечувствительный	ND, 0,0082, ND
UACC-812	Молочная железа	LumB	POS	POS	Нечувствительный	2,0, ND, ND
UACC-893	Молочная железа	HER2	NEG	POS	Нечувствительный	2,0, ND, ND
ZR-75-1	Молочная железа	LumA	POS	NEG	Нечувствительный	2,0, 0,003, 0,052
ZR-75-30	Молочная железа	HER2	POS	POS	Нечувствительный	2,0, 1,94, ND

ФИГ. 4А-2

TABLE 2

Ингибитор KIF18, ширина диапазона или максимальный ответ клеток, скрининг с помощью CP, HR, AM	Статус консенсусной последовательности TP53	Классификация вариантаTP53	Изменение белка p53
66,4, 82,6, ND	MUT	MM	p.R175H
ND, 59,7, HD	MUT	MM	p.K132Q
70,1, 87,8, 81,9	MUT	MM	p.R249S
ND, 63,9, ND	MUT	SS	NA
76,5, ND, ND	MUT	IFD	p.G108del
78,6, 77,8, 87,8	MUT	FSI	p.T256fs
ND, ND, 69,9	MUT	NM	p.R306*
52,4, 80,6, 65	MUT	MM	p.Y163C
84,6, ND, ND	MUT	MM	p.V157F
ND, 87,9, ND	MUT	MM	p.R248W
ND, ND, 62,6	MUT	FSD	p.APSWPLSSS88fs
19,0, 61,8, ND	MUT	FSI	p.E204fs
42,0, 52,6, ND	MUT	MM	p.R273H
7,6, 33,9, ND	MUT	MM	p.E285K
ND, 33,5, ND	MUT	MM	p.E224K
ND, ND, 28,2	WT		
1,57, 29,8, ND	MUT	MM	p.R280T
4,72, 23,5, ND	WT		
20,6, ND, ND	MUT	MM	p.R248Q
12,5, ND, ND	WT		
4,2, ND, ND	MUT	NM	p.E294*
2,9, ND, ND	MUT	FSD	p.T284fs
5,1, ND, ND	MUT	MM	p.R248W
2,9, ND, ND	?	MM	p.R283C
20,4, 32,3, ND	MUT	MM	p.R273L
19,2, 6,8, ND	MUT	MM	p.R248Q
ND, 26,5, ND	MUT	NM	p.R213*
ND, 33,5, ND	WT		
3,5, ND, 31,6	WT		
3,73, 34,6, ND	WT		
9,0, 15,1, ND	MUT	NM	p.E56*
25,5, ND, ND	MUT	MM	p.Y236C
11,7, 32,1, 27,3	NULL	NULL	
ND, 28,7, ND	MUT	MM	p.R175H
ND, 2,82, ND	MUT	IFI	p.157_158insL
ND, 42,0, ND	MUT	MM	p.L194F
6,2, ND, ND	WT		
3,9, ND, ND	MUT	NM	p.R342*
-1,5, 23,9, 24,1	WT		
12,4, 16,5, ND	WT		

ФИГ. 4B-1

ТАБЛИЦА 3

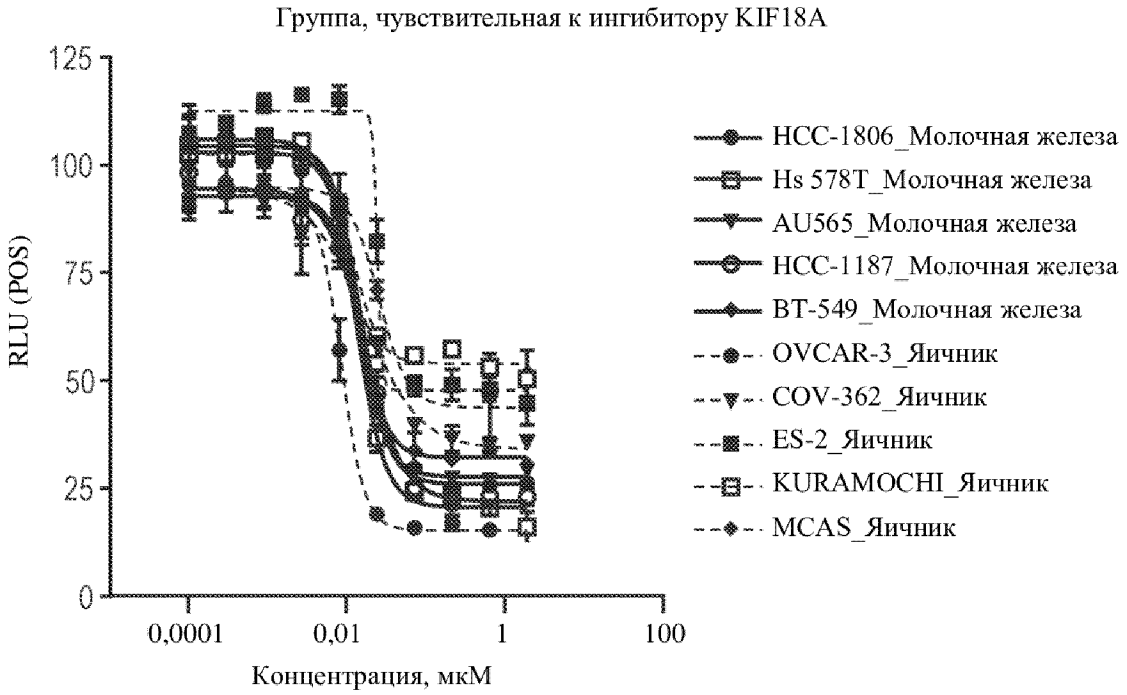
Линия клеток	Тип опухоли	Подтип опухоли	Чувствительность к ингибитору KIF18A	Ингибитор KIF18A, EC50 для клеток, мкМ; скрининг с помощью CP, HR, AM
COV362	ЯИЧНИК	Вероятно HGSOC	Чувствительный(?)	0,0168, 0,007, ND
ES-2	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Чувствительный	0,0248, 0,0191, ND
JHOM-1	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Чувствительный	ND, 0,0167, ND
JH0M-2B	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Чувствительный	ND, 0,0116, ND
KURAMOCHI	ЯИЧНИК	Вероятно HGSOC	Чувствительный	0,0123, 0,0084, ND
MCAS	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Чувствительный(?)	0,0259, 0,0934, ND
NCI-ADR-RES	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Чувствительный	ND, 0,0365, ND
OAW-28	ЯИЧНИК	Вероятно HGSOC	Чувствительный	ND, 0,0027, ND
OC-316	ЯИЧНИК	Гипермутированный	Чувствительный	ND, 0,006, ND
ONCO-DG-1	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Чувствительный	ND, 0,0055, ND
OVCAR-3	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Чувствительный	0,0086, 0,0039, 0,0201
OVCAR-8	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Чувствительный	ND, 0,0126, 0,0223
OVSAHO	ЯИЧНИК	Вероятно HGSOC	Чувствительный	ND, 0,0108, ND
SNU-119	ЯИЧНИК	Вероятно HGSOC	Чувствительный	ND, 0,0071, ND
A2780	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	0,054, ND, ND
Caov-3	ЯИЧНИК	Вероятно HGSOC	Нечувствительный	2,0, 3,99, ND
Caov-4	ЯИЧНИК	Вероятно HGSOC	Нечувствительный	ND, 3,99, ND
COV434	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	2,0, 0,135, ND
COV504	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Нечувствительный	ND, 0,0033, ND
COV644	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	2,0, 0,568, ND
EFO-21	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	ND, 0,042, ND
EFO-27	ЯИЧНИК	Гипермутированный	Нечувствительный	ND, 0,0224, ND
IGROV-1	ЯИЧНИК	Гипермутированный	Нечувствительный	ND, 0,0894, ND
JHOC-5	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	ND, 1,68, ND
OAW-42	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	2,0, 1,66, ND
OV56	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	2,0, 0,371, ND
OV90	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Нечувствительный	2,0, 0,0178, ND
OVCAR-4	ЯИЧНИК	Вероятно HGSOC	Нечувствительный	ND, 0,0622, ND
OVCAR-5	ЯИЧНИК	?	Нечувствительный	ND, 0,0110, 0,280
OVISE	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	ND, 6,029, ND
OVK18	ЯИЧНИК	Гипермутированный	Нечувствительный	ND 6,4389, ND
OVMANA	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	1,0, ND, ND
OVTOKO	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	2,0, 0,001, ND
PA-1	ЯИЧНИК	?	Нечувствительный	ND, 0,067, ND
RKN	ЯИЧНИК	?	Нечувствительный	2,0, ND, ND
RMUG-S	ЯИЧНИК	Возможно HGSOC	Нечувствительный	2,0, 0,0003, ND
SK-OV-3	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	ND, 0,0165, ND
SNU-840	ЯИЧНИК	Маловероятно HGSOC	Нечувствительный	2,0, 0,054, ND
TOV-21G	ЯИЧНИК	Гипермутированный	Нечувствительный	ND, 0,074, ND
TYK-nu	ЯИЧНИК	Вероятно HGSOC	Нечувствительный	ND, 0,107, ND

ФИГ. 4B-2

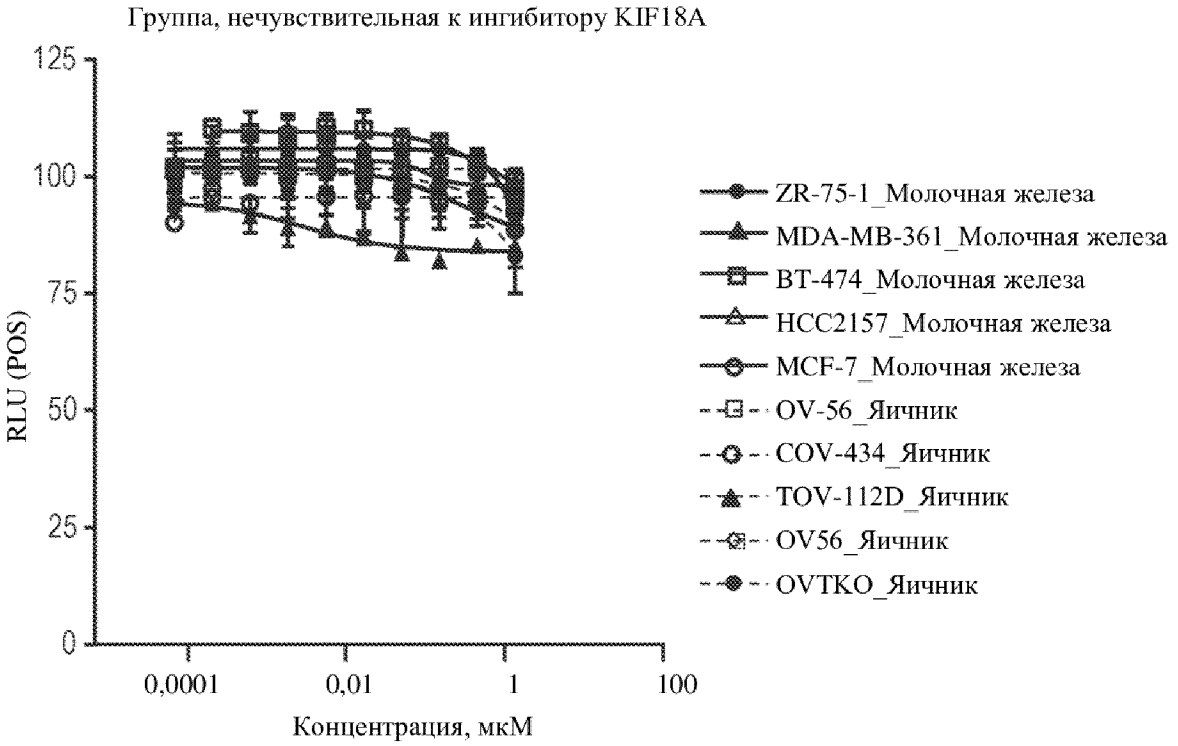
ТАБЛИЦА 3

Ингибитор KIF18, ширина диапазона или максимальный ответ клеток; скрининг с помощью CP, HR, AM	Статус консенсусной последовательности TP53	Классификация варианта TP53	Изменение белка p53
59,3, 46,8	MUT	MM	p.Y220C
58,5, 71,0, ND	MUT	MM	p.S241F
ND, 83,6, ND	MUT	NM	p.R213*
ND, 64,3, ND	MUT	MM	p.C275F
49,5, 88,4, ND	MUT	MM	p.D281Y
59,7, 39,1, ND	MUT	MM	p.L114F
ND, 95,5, ND	MUT	SS	
ND, 77,8, ND	MUT	FSD	p.P153fs
ND, 95,2, ND	MUT	MM	p.R273H
ND, 97,4, ND	MUT	MM	p.R248Q
78,6, 97,6, 88,2	MUT	MM	p.R248Q
ND, 89,1, 81,3	MUT	SS	
ND, 68,6, ND	MUT	NM	p.R342*
ND, 81,9, ND	MUT	MM	p.P151A
33,0, ND, ND	WT		
12,3, 15,2, ND	MUT	NM	p.0136*
ND, 1,34, ND	MUT	MM	p.V147D
-0,67, 11,9, ND	WT		
ND, 42,8, ND	MUT	FSD	p.L323fs
16,4, 30,8	LOE	SS	NA
ND, 17,4, ND	MUT	MM	p.C124R
ND, 9,56, ND	MUT	MM	p.R273C
ND, 25,4, ND	MUT	SS	p.Y126C
ND, 14,4, ND	WT		
11,3, 14,2, ND	WT		
-0,209, 34,8, ND	MUT	FSD	p.KT101fs
1,61, 43,8, ND	MUT	MM	p.S215R
ND, 15,8, ND	MUT	MM	p.L130V
ND, 26,7, 16,7	MUT/VVT	MM	p.R273C
ND, 19,4, ND	WT		
ND, 6,73, ND	MUT	FSD	p.P153fs
14,5, ND, ND	WT		
11,4, 14,5, ND	WT		
ND, 23,2, ND	MUT/WT	S	p.P316P
25,3, ND, ND	MUT	MM	p.R175H
7,3, 21,6, ND	MUT	MM	p.A347V
ND, 13,7, ND	MUT	FSD	p.P89fs
3,25, 29,4, ND	WT		
ND, 42,0, ND	WT		
ND, 22,6, ND	MUT	MM	p.R175H

ФИГ. 4C

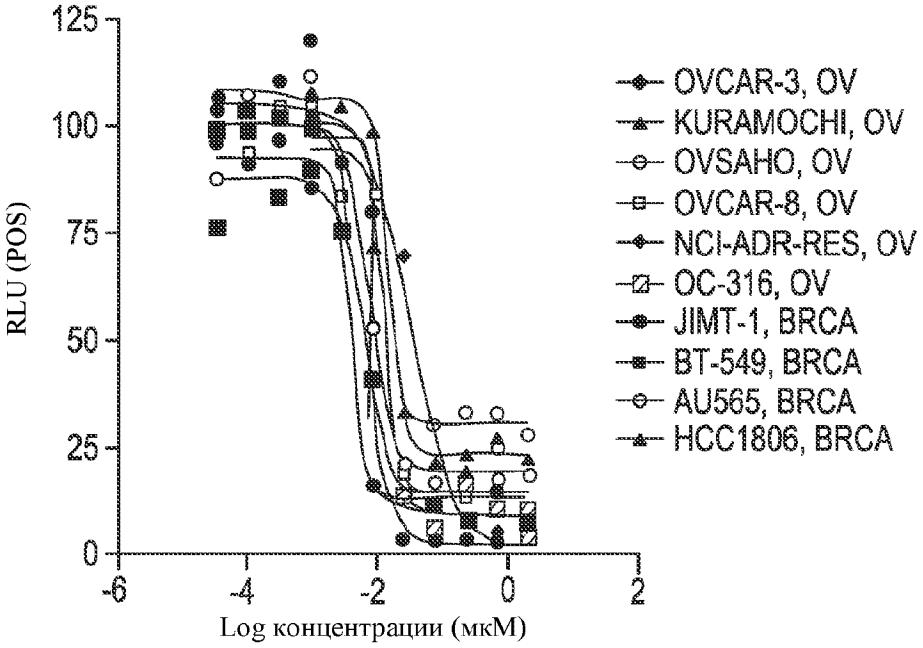

Группа, чувствительная к ингибитору KIF18A
125
100
75
50
25
0
RLU (POS)
0,0001
0,01
1
100
Концентрация, мкМ
HCC-1806_Молочная железа
Hs 578T_Молочная железа
AU565_Молочная железа
HCC-1187_Молочная железа
BT-549_Молочная железа
OVCAR-3_Яичник
COV-362_Яичник
ES-2_Яичник
KURAMOCHI_Яичник
MCAS_Яичник

ФИГ. 4D


Группа, нечувствительная к ингибитору KIF18A
125
100
75
50
25
0
RLU (POS)
0,0001
0,01
1
100
Концентрация, мкМ
ZR-75-1_Молочная железа
MDA-MB-361_Молочная железа
BT-474_Молочная железа
HCC2157_Молочная железа
MCF-7_Молочная железа
OV-56_Яичник
COV-434_Яичник
TOV-112D_Яичник
OV56_Яичник
OVTKO_Яичник

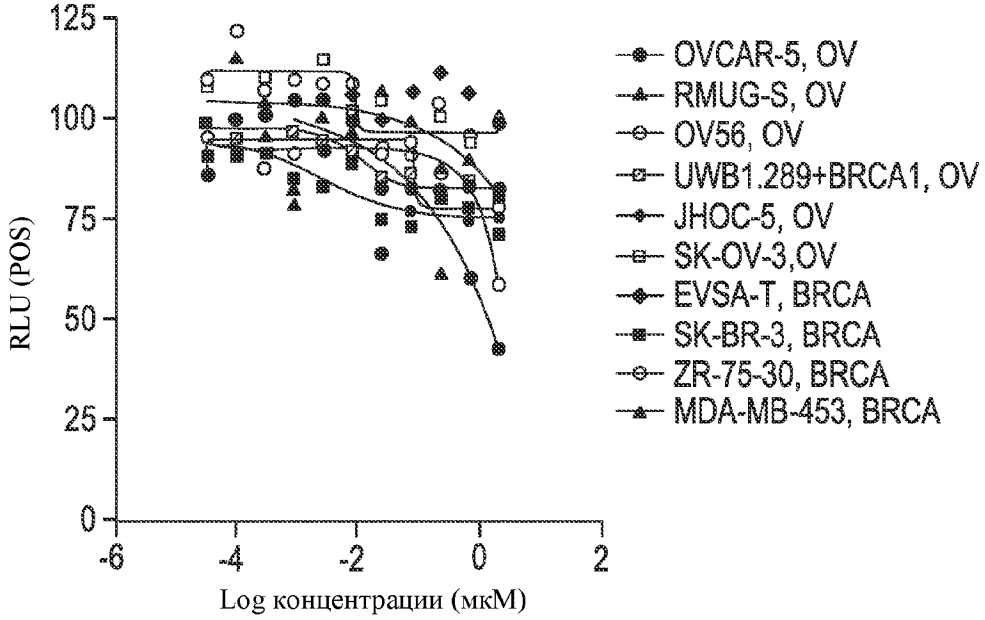
ФИГ. 4E

Группа, чувствительная к ингибитору KIF18A

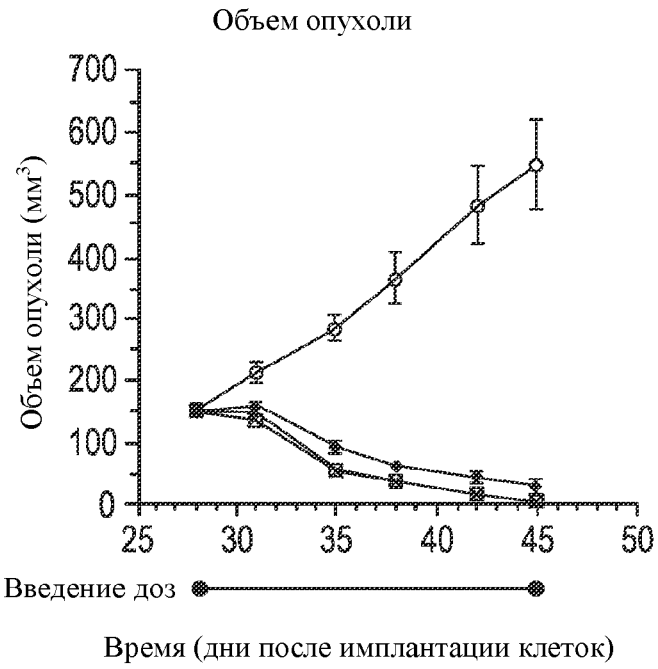


ФИГ. 4F

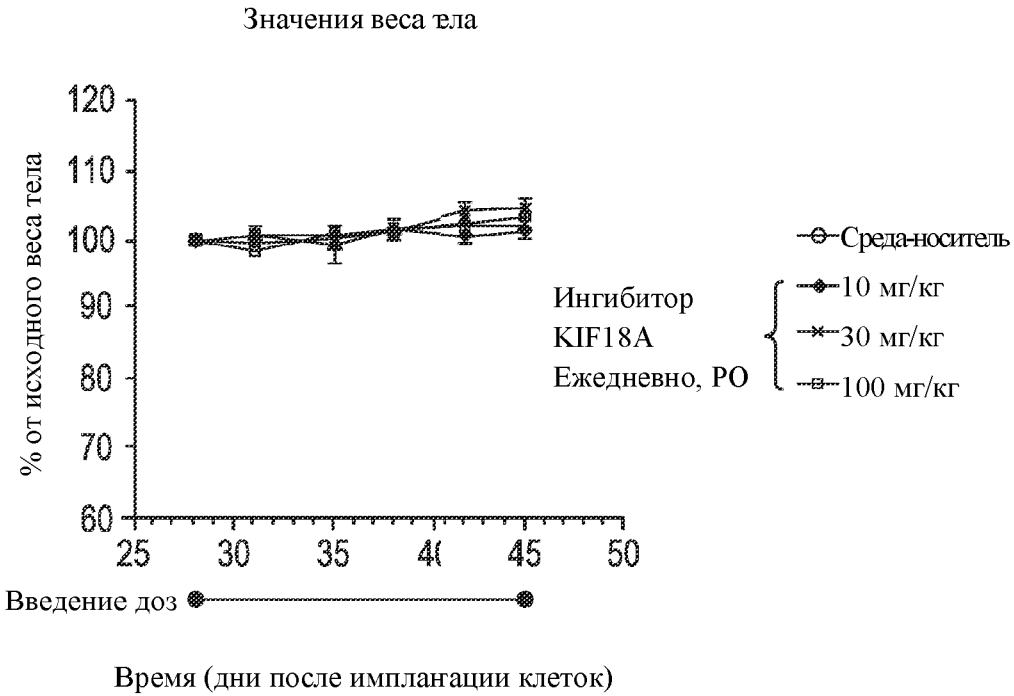
Группа, нечувствительная к ингибитору KIF18A



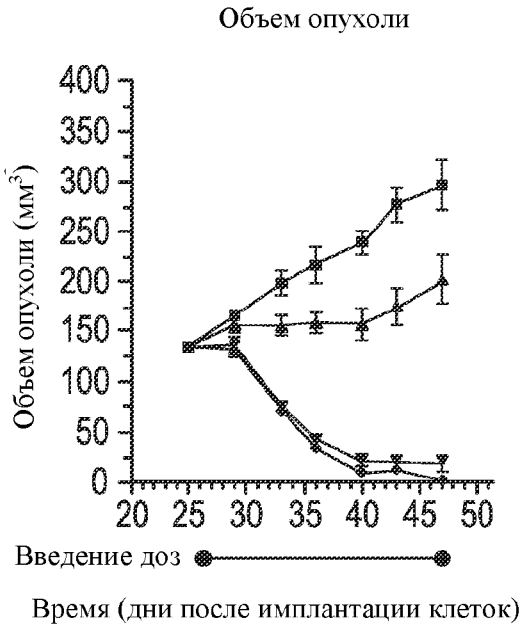
ФИГ. 5А


Объем опухоли
Объем опухоли (мм^3)
700
600
500
400
300
200
100
0
25
30
35
40
45
50
Введение доз
Время (дни после имплантации клеток)

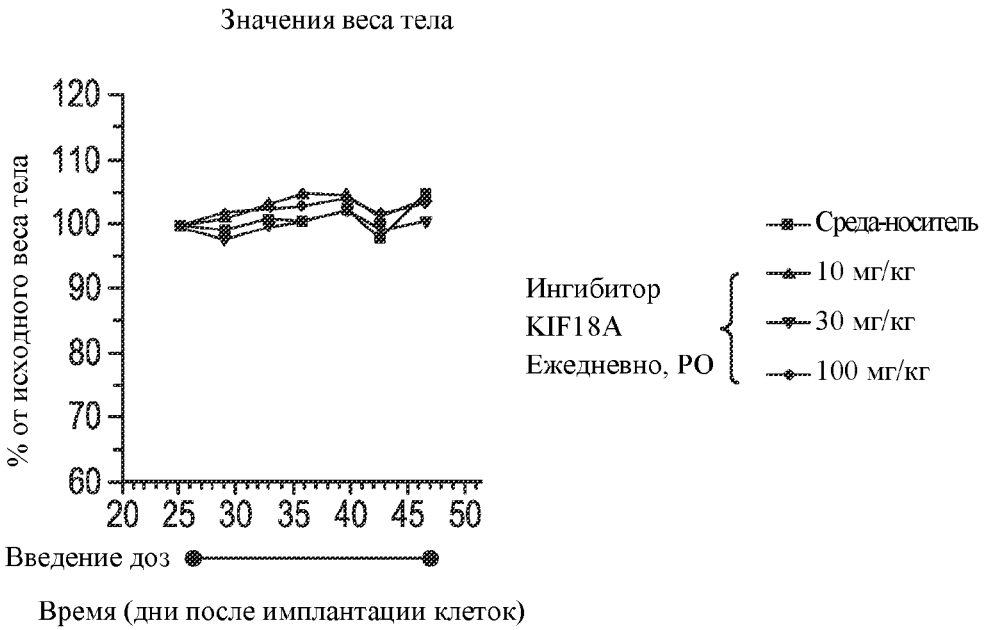
ФИГ. 5Е


Значения веса тела
% от исходного веса тела
120
110
100
90
80
70
60
25
30
35
40
45
50
Введение доз
Время (дни после имплантации клеток)
Ингибитор
KIF18A
Ежедневно, PO
Среда-носитель
10 мг/кг
30 мг/кг
100 мг/кг

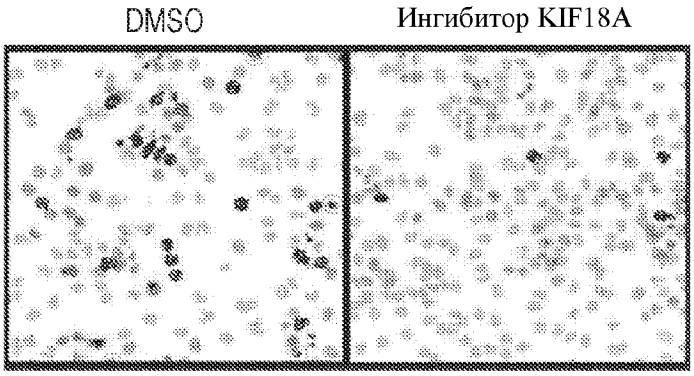
ФИГ. 6А


Объем опухоли
Объем опухоли (мм³)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
20 25 30 35 40 45 50
Введение доз
Время (дни после имплантации клеток)

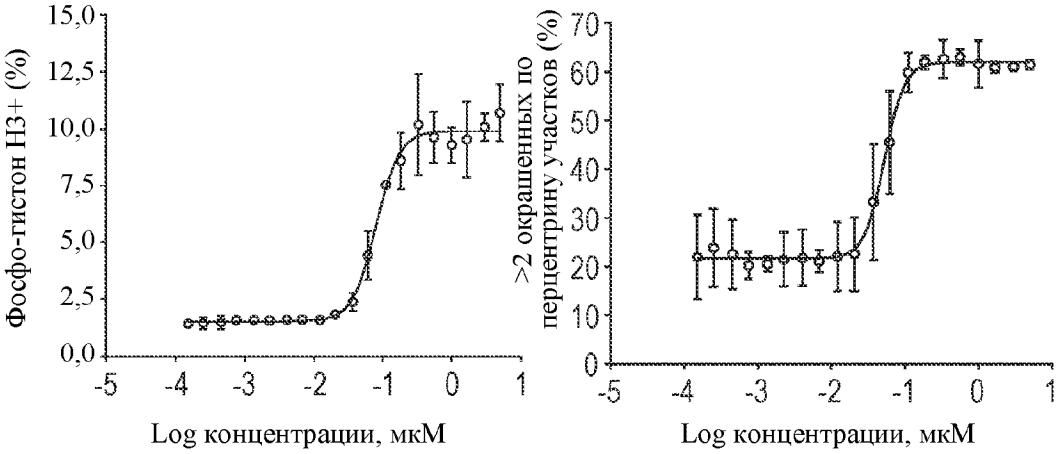
ФИГ. 6В


Значения веса тела
% от исходного веса тела
120
110
100
90
80
70
60
20 25 30 35 40 45 50
Введение доз
Время (дни после имплантации клеток)
Ингибитор
KIF18A
Ежедневно, PO
Среда-носитель
10 мг/кг
30 мг/кг
100 мг/кг

ФИГ. 7A



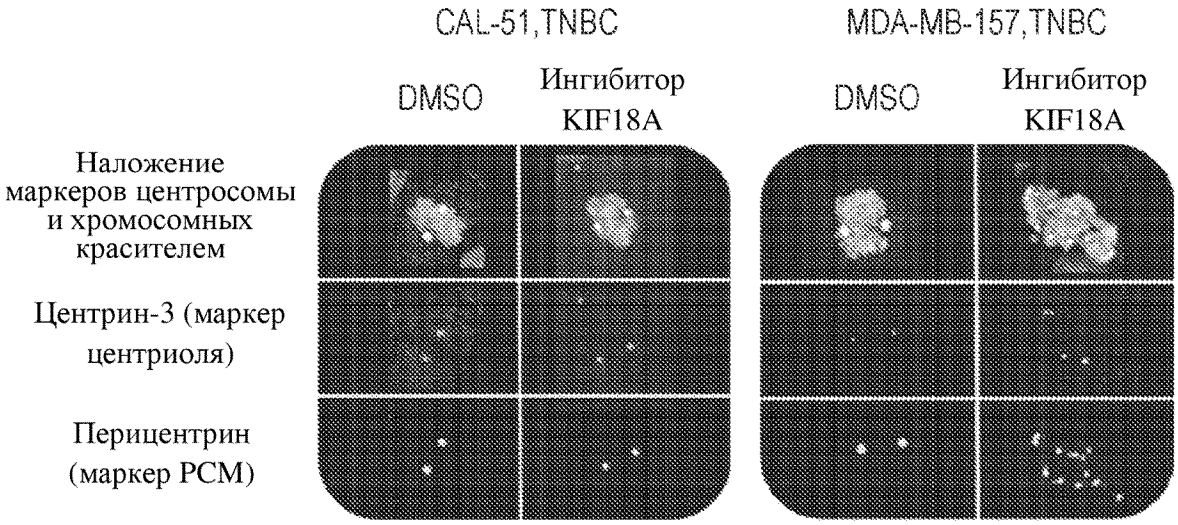
ФИГ. 7B



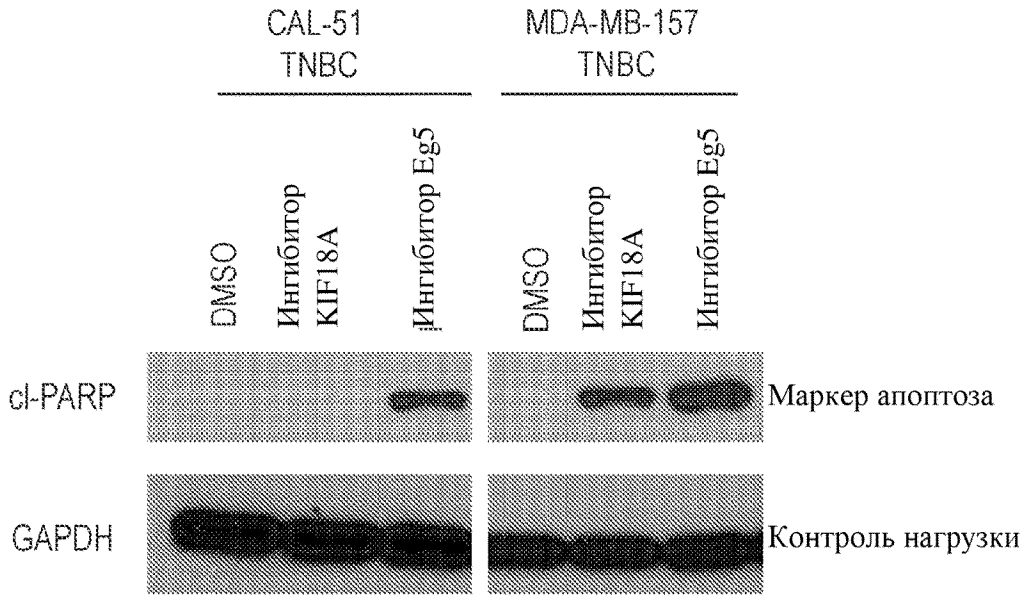
ФИГ. 7C

Конечный результат в отношении клетки	Среднее значение EC50 (мкМ)	SD
>2 окрашенных по перцентрину участков	0,0522	±0,0138
Фосфо-гистон H3	0,0794	±0,0196

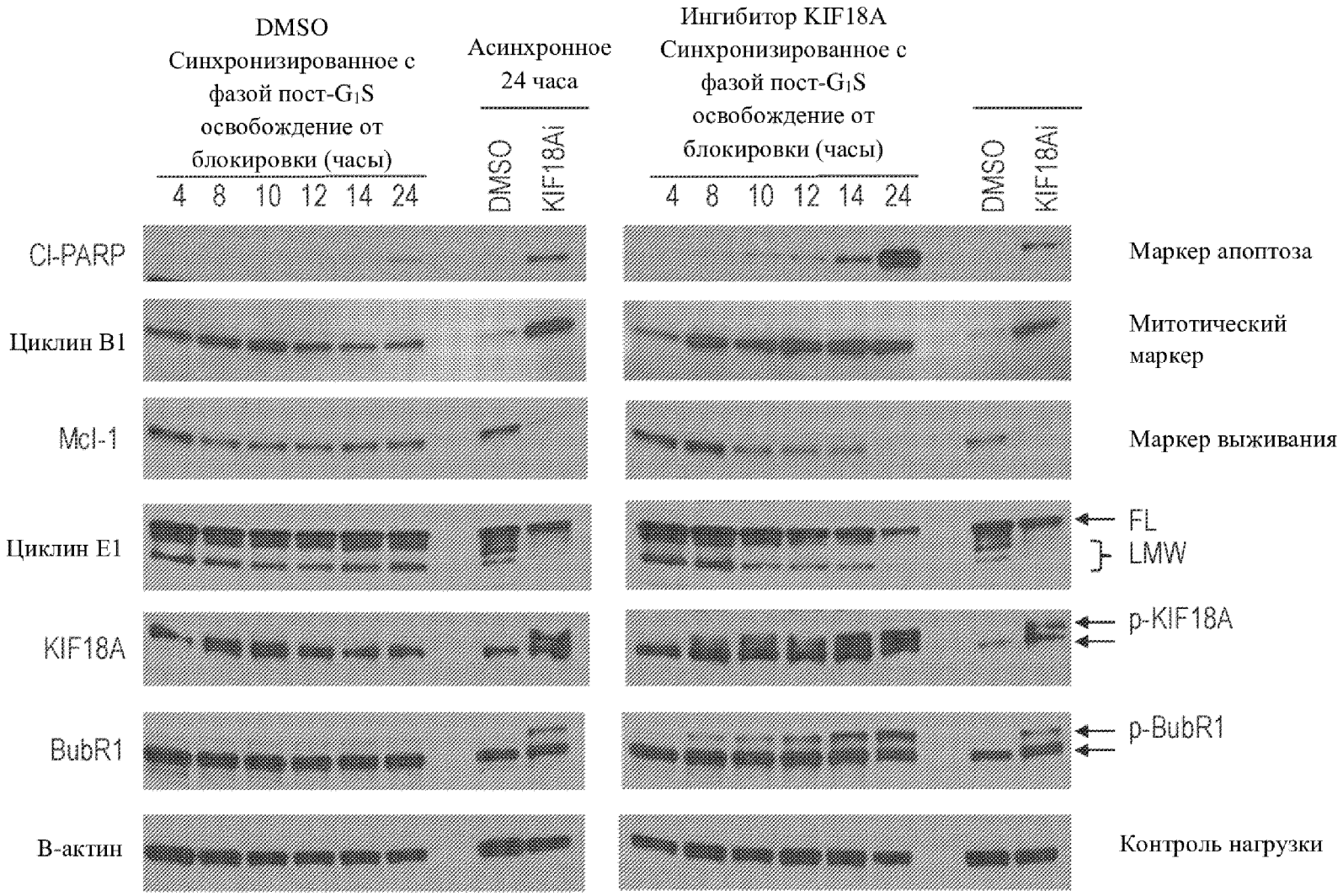
ФИГ. 8А


CAL-51,TNBC
MDA-MB-157,TNBC
DMSO
Ингибитор KIF18A
DMSO
Ингибитор KIF18A
Наложение маркеров центросомы и хромосомных красителем
Центрин-3 (маркер центриоля)
Перицентрин (маркер PCM)

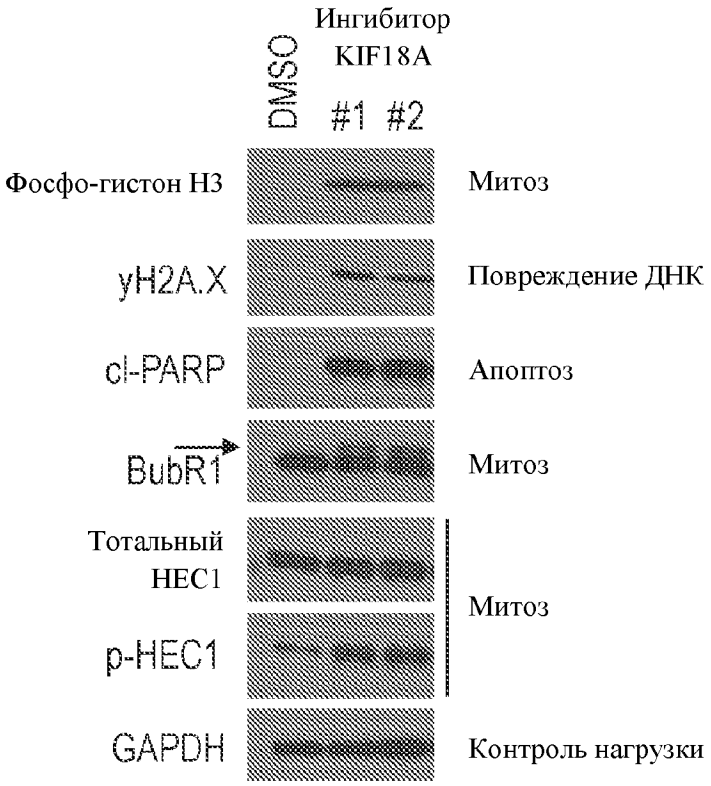
ФИГ. 8В


CAL-51 TNBC
MDA-MB-157 TNBC
DMSO
Ингибитор KIF18A
Ингибитор Eg5
DMSO
Ингибитор KIF18A
Ингибитор Eg5
cl-PARP
Маркер апоптоза
GAPDH
Контроль нагрузки

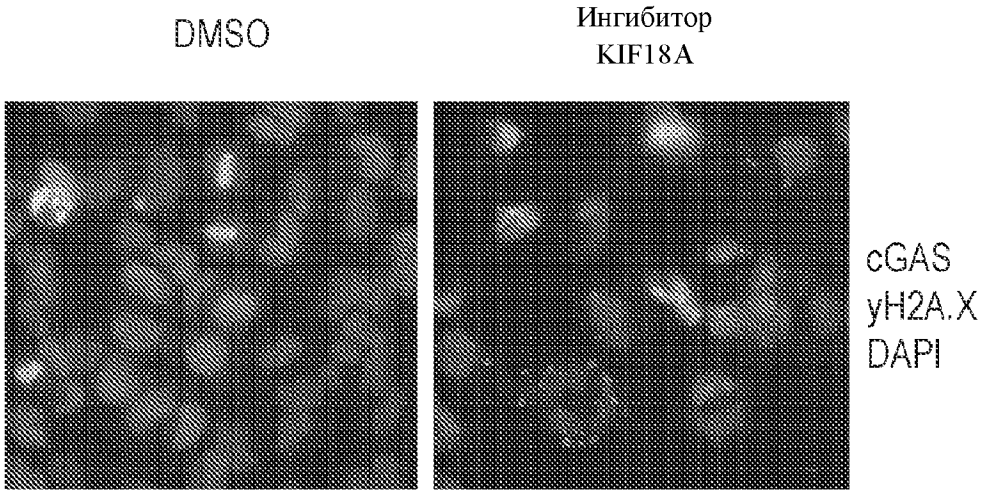
ФИГ. 9


DMSO
Синхронизированное с фазой пост-G1S освобождение от блокировки (часы)
4 8 10 12 14 24
Асинхронное 24 часа
DMSO
KIF18Ai
Ингибитор KIF18A
Синхронизированное с фазой пост-G1S освобождение от блокировки (часы)
4 8 10 12 14 24
DMSO
KIF18Ai
Cl-PARP
Маркер апоптоза
Циклин B1
Митотический маркер
Mcl-1
Маркер выживания
Циклин E1
FL
LMW
KIF18A
p-KIF18A
BubR1
p-BubR1
B-актин
Контроль нагрузки

ФИГ. 10A

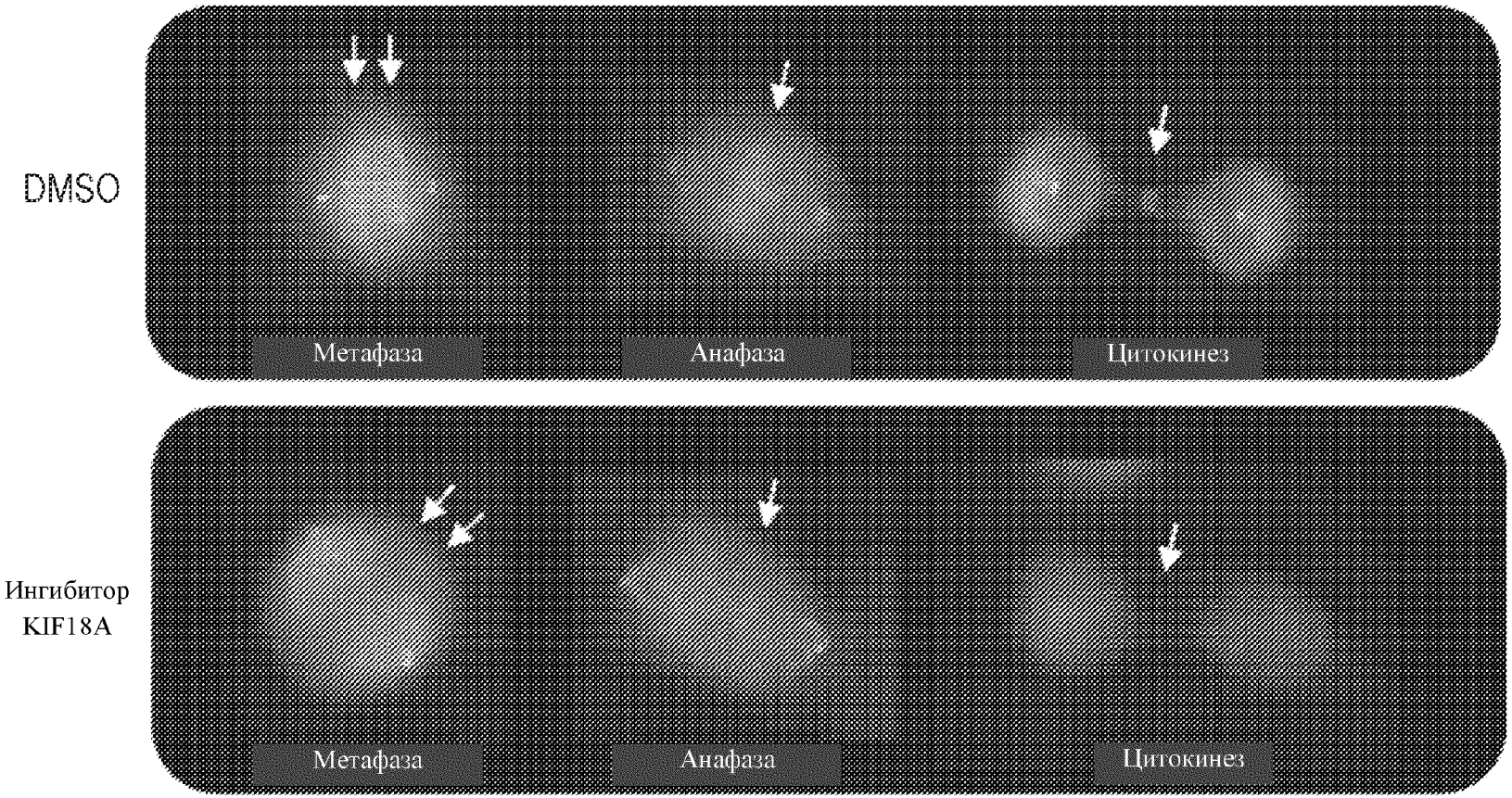


ФИГ. 10B

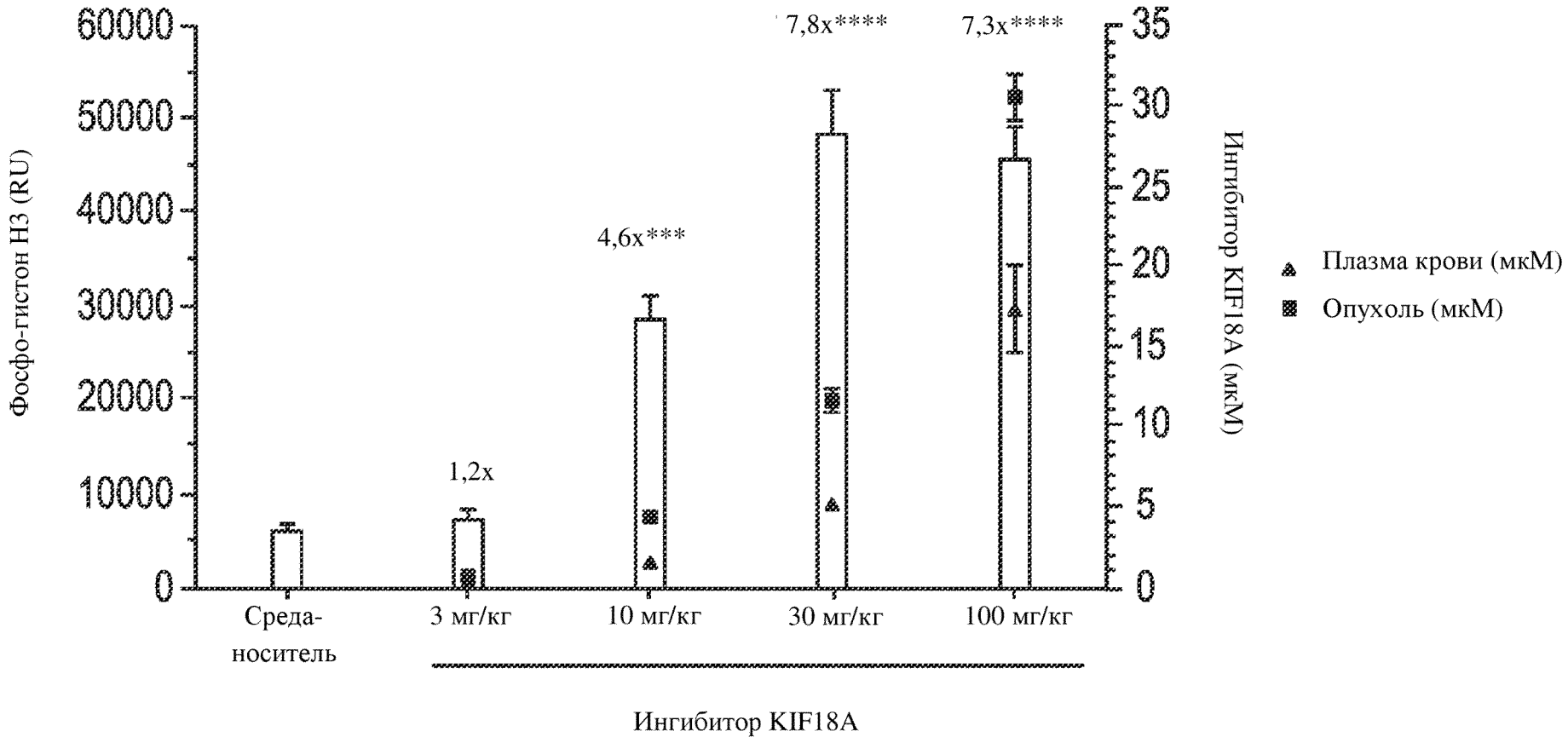


ФИГ. 11

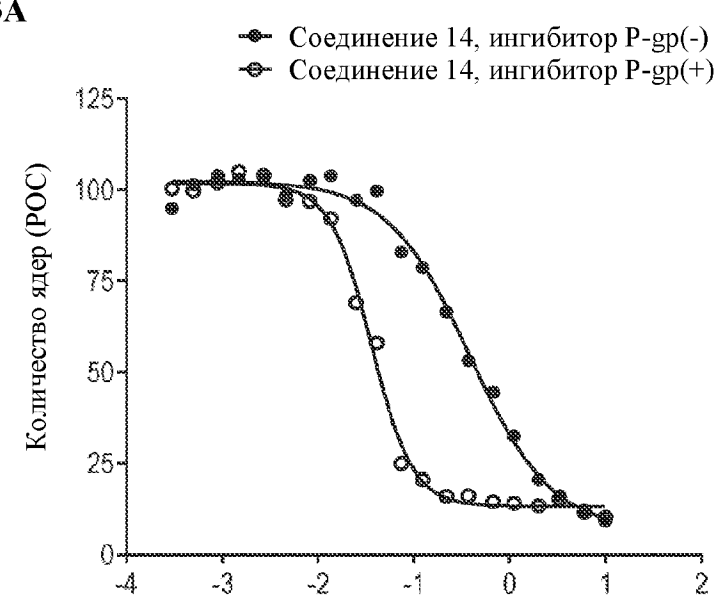
KIF18A, центрин-3, ДНК (DAPI)



ФИГ. 12

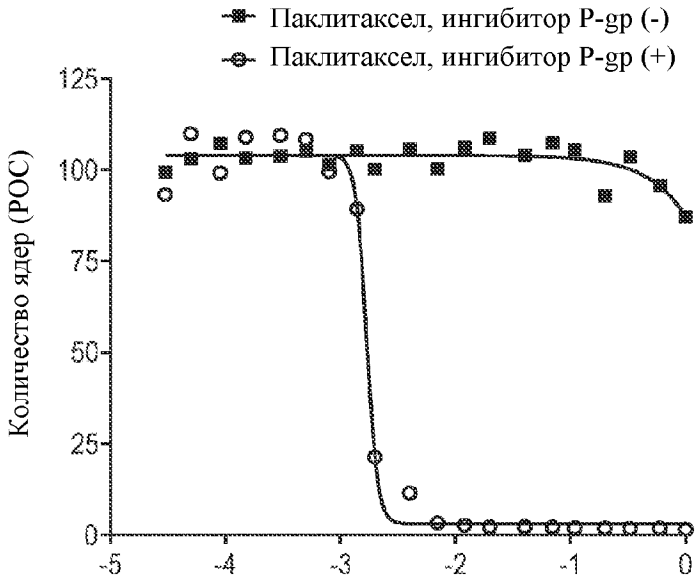

Фосфо-гистон H3 (RU)
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
1,2x
4,6x***
7,8x****
7,3x****
35
30
25
20
15
10
5
0
Ингибитор KIF18A (мкМ)
Плазма крови (мкМ)
Опухоль (мкМ)
Среда-носитель
3 мг/кг
10 мг/кг
30 мг/кг
100 мг/кг
Ингибитор KIF18A

ФИГ. 13А



Log концентрации, мкМ
Соединение С14, ингибитор P-gp (-) EC50 = 0,3361 мкМ
Соединение С14, ингибитор P-gp (+) EC50 = 0,0360 мкМ
Кратное изменение действенности 9,33

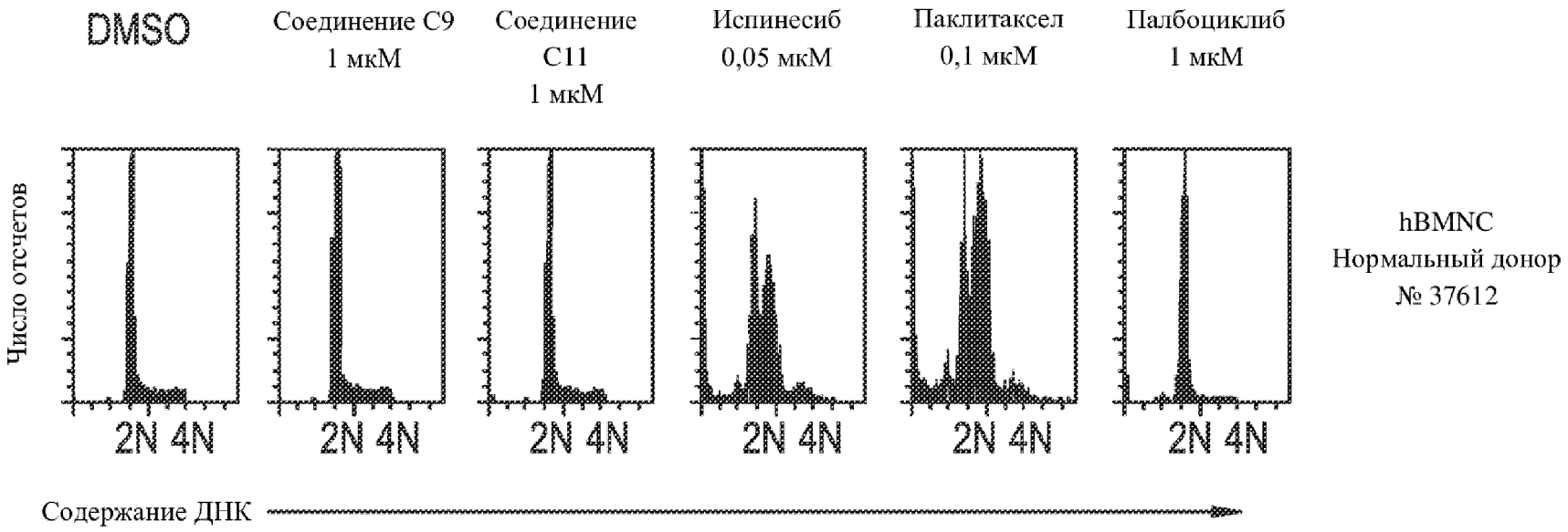
ФИГ. 13В



Log концентрации, мкМ
Паклитаксел, ингибитор P-gp (-) EC50 >1 мкМ
Паклитаксел, ингибитор P-gp (+) EC50 = 0,0017 мкМ
Кратное изменение действенности >588

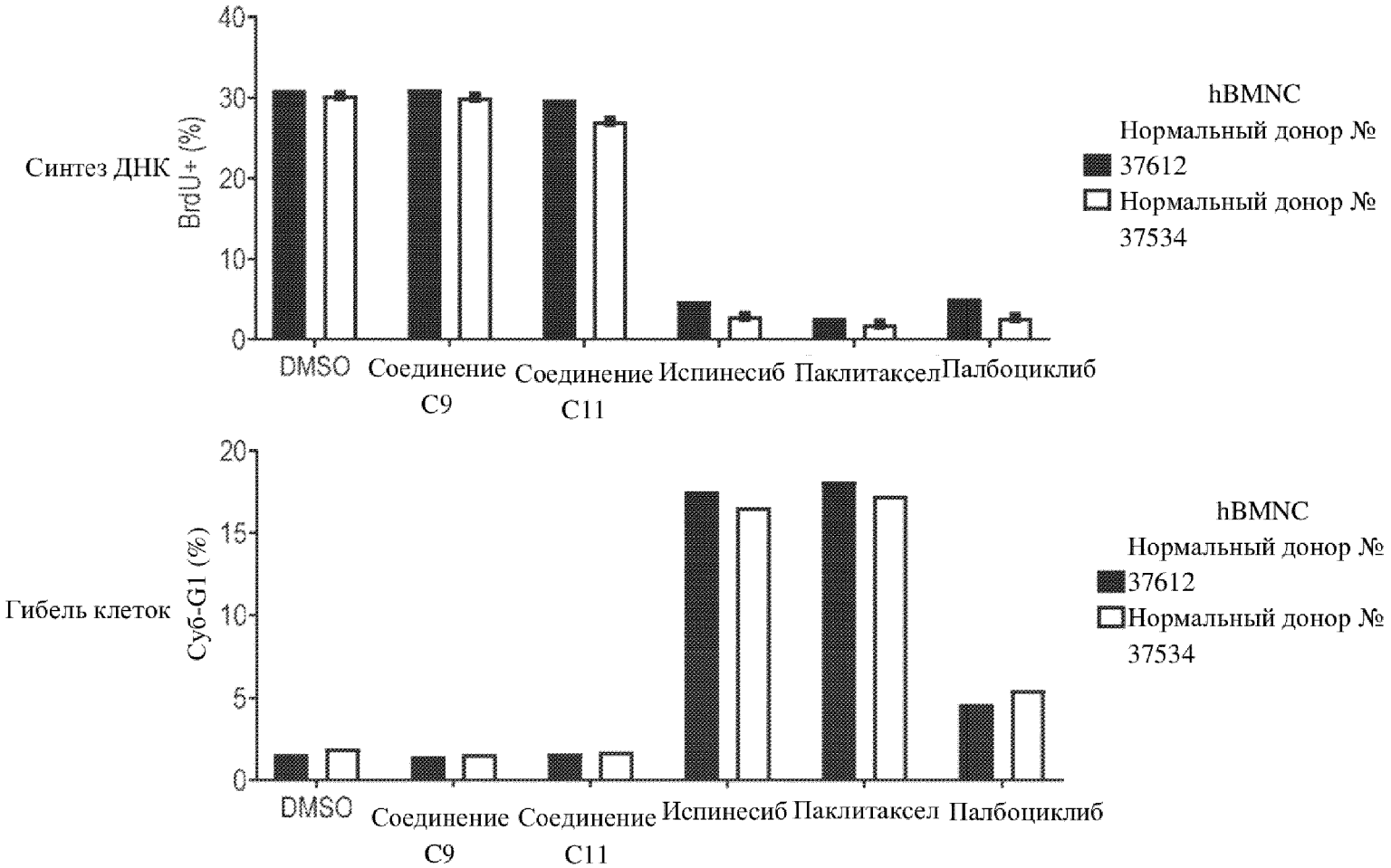
ФИГ. 14А

Анализ содержания ДНК, 48 часов



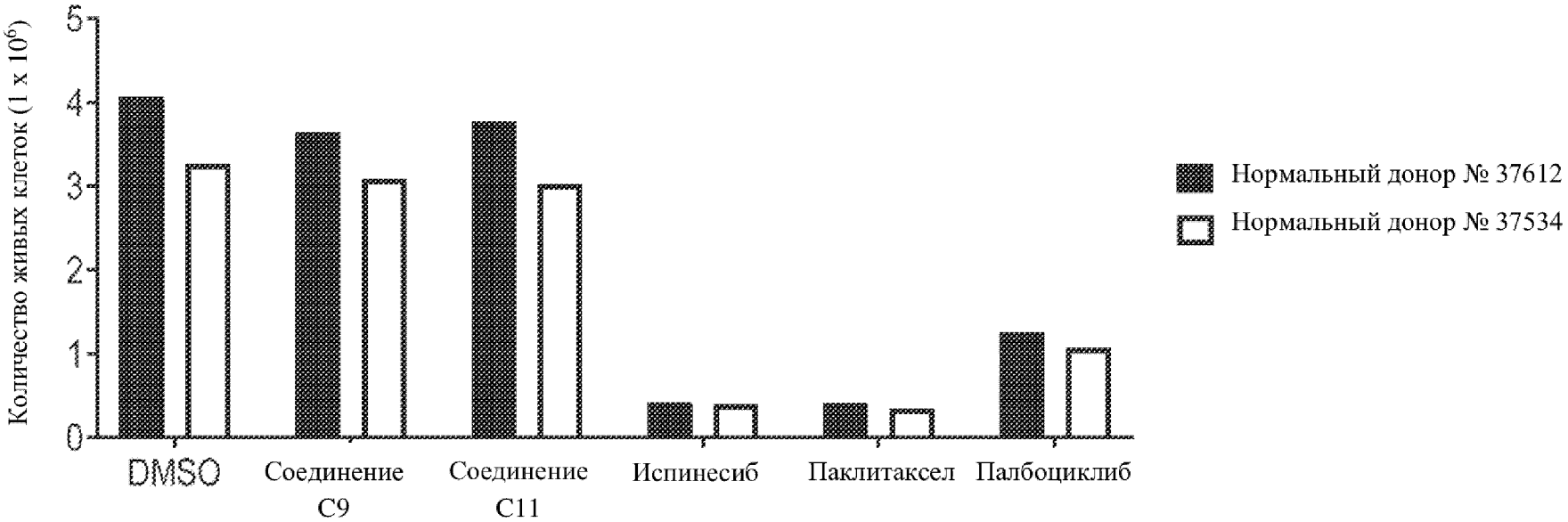
ФИГ. 14B

Анализ с помощью BrdU и Анализ содержания ДНК, 48 часов



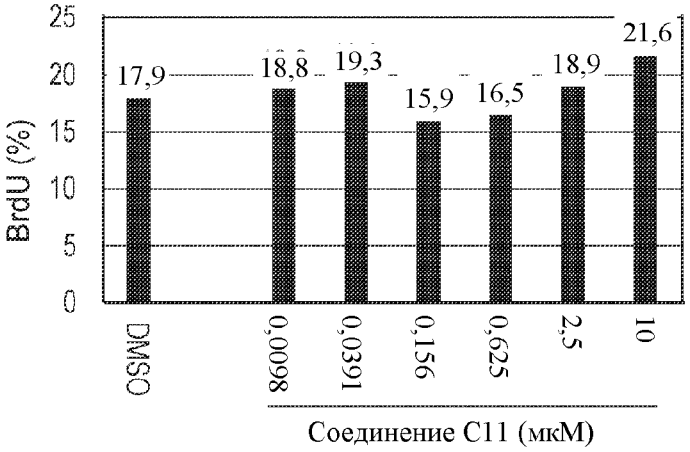
ФИГ. 14C

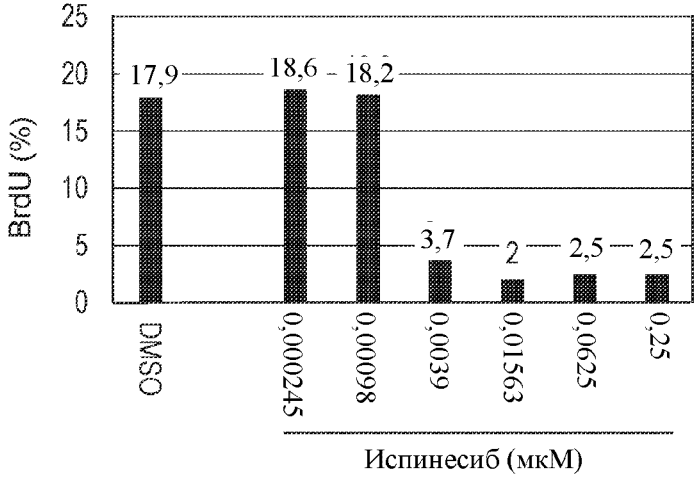
4-дневный анализ количества клеток

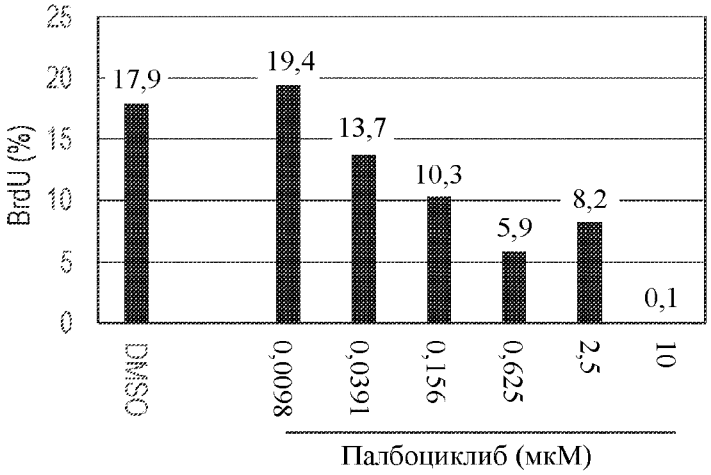


ФИГ. 14D

hFSF, включение BrdU (%)
48 часов

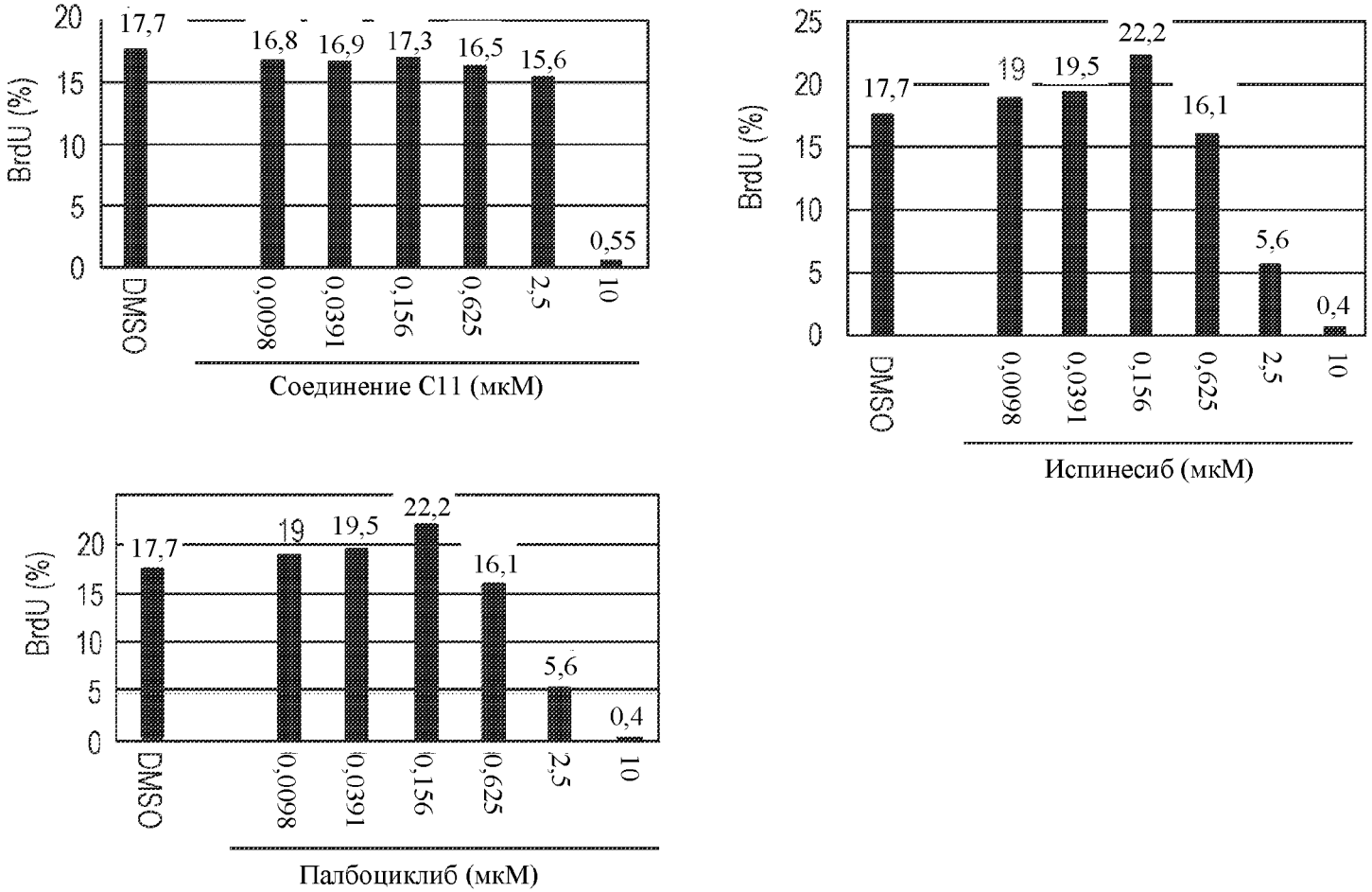




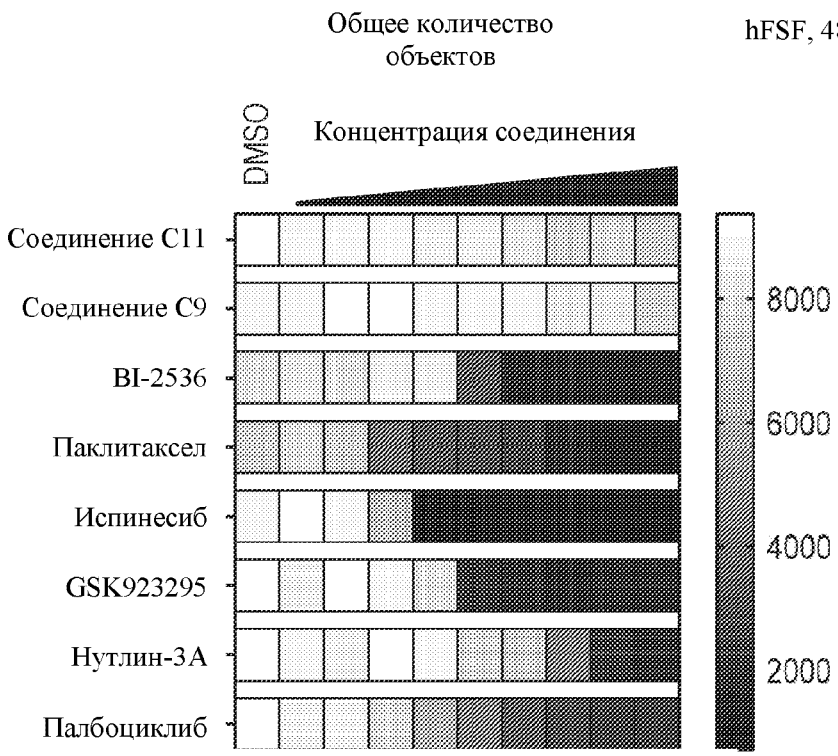


ФИГ. 14E

HMEC, включение BrdU (%)
48 часов

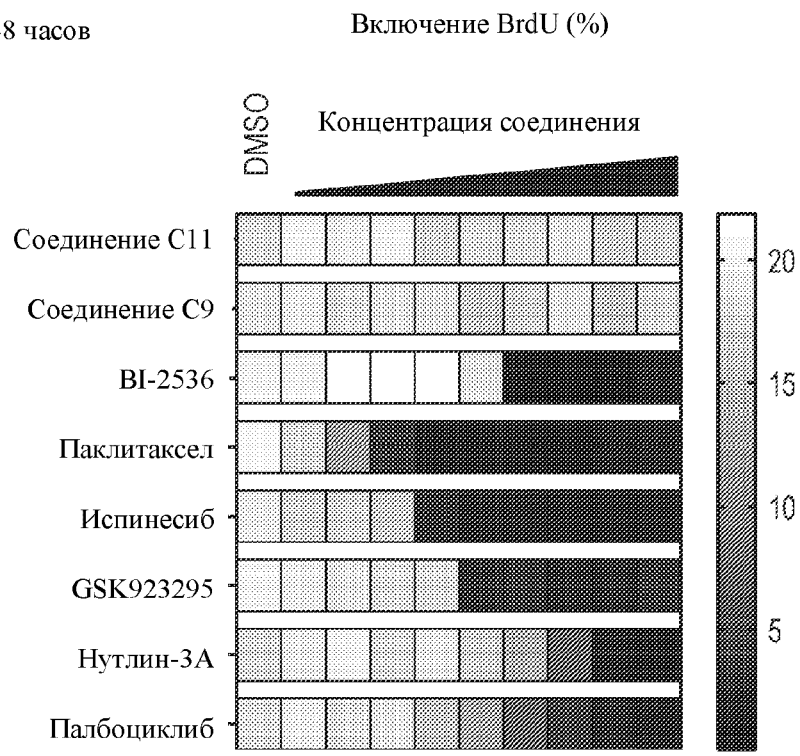


ФИГ. 15A



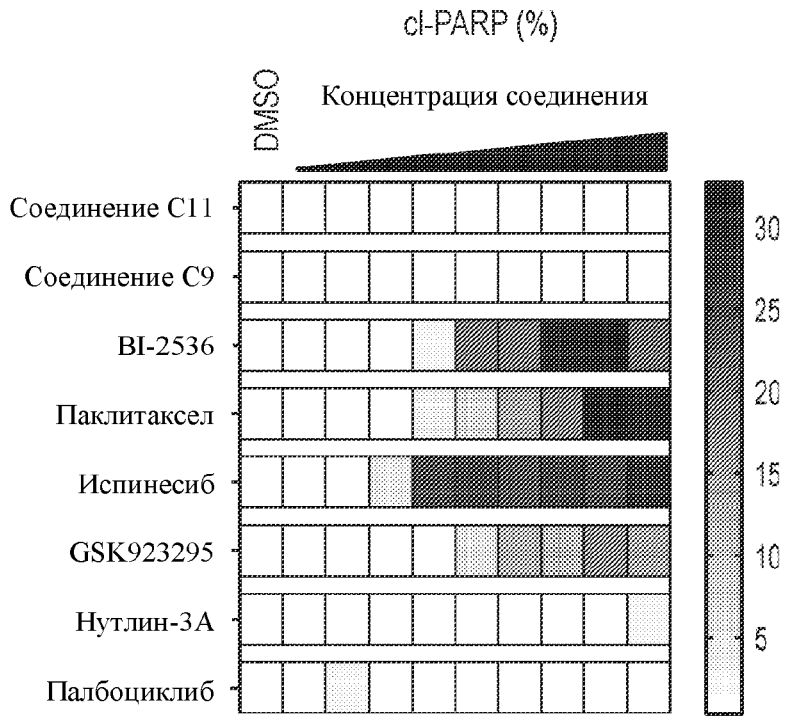
hFSF, 48 часов

ФИГ. 15B

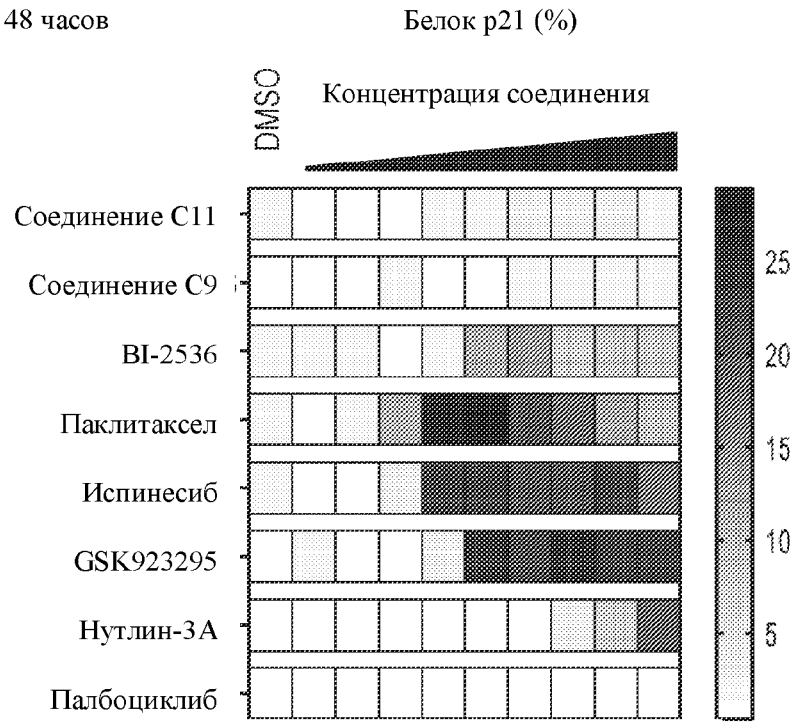


hFSF, 48 часов

ФИГ. 15C

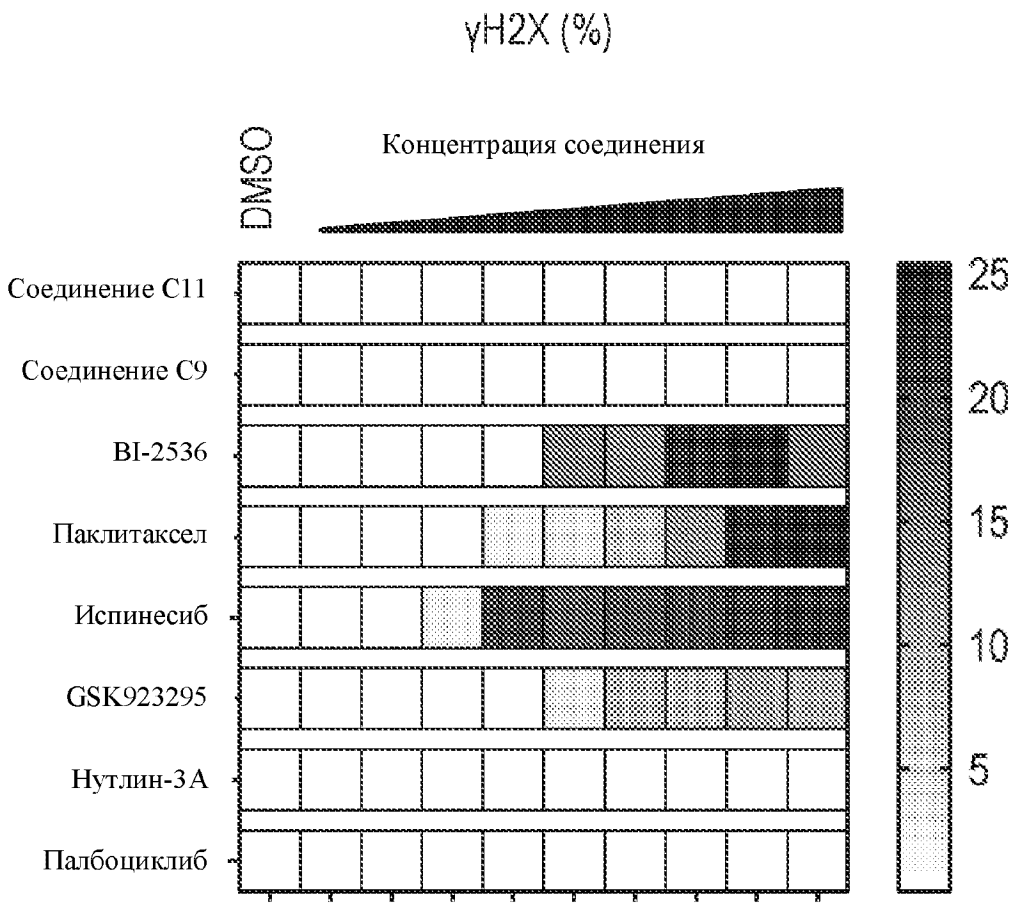


ФИГ. 15D

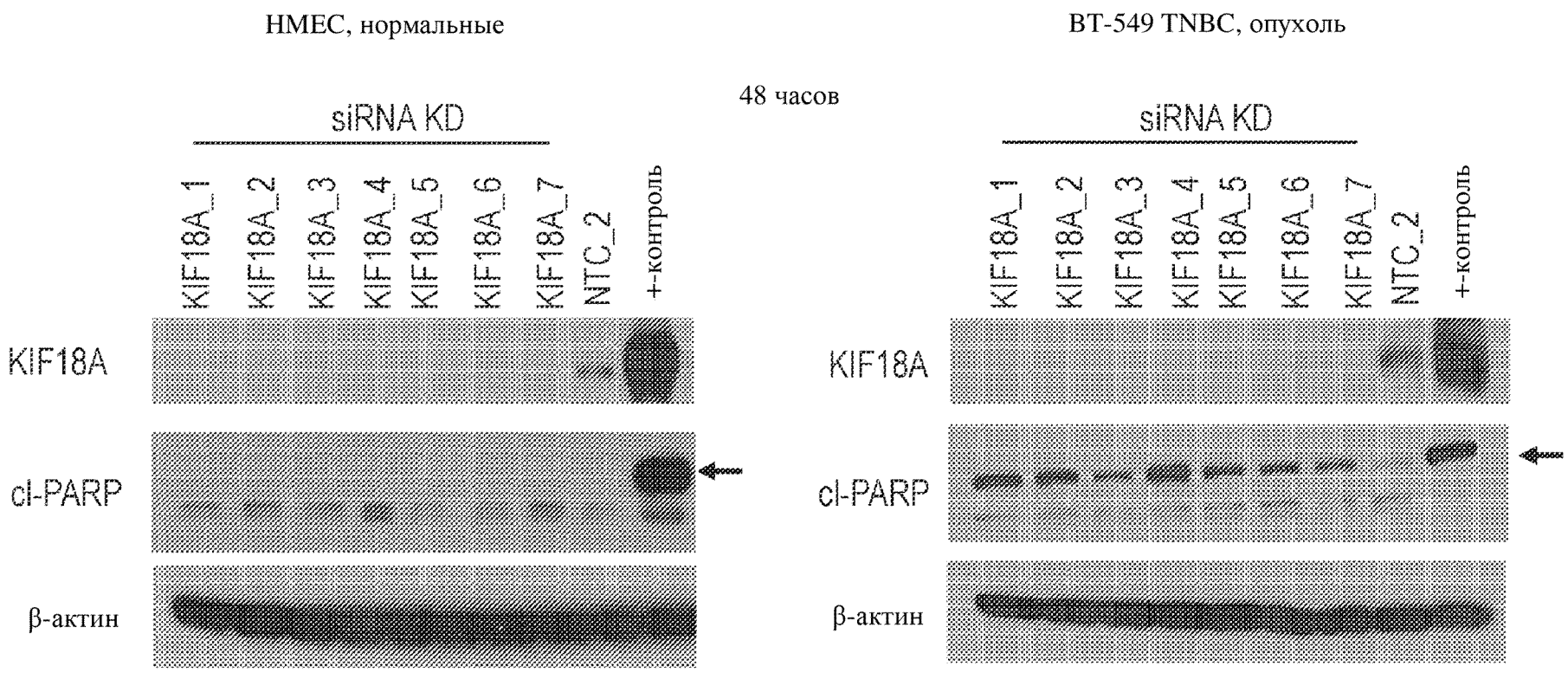


ФИГ. 15E

hFSF, 48 часов



ФИГ. 16

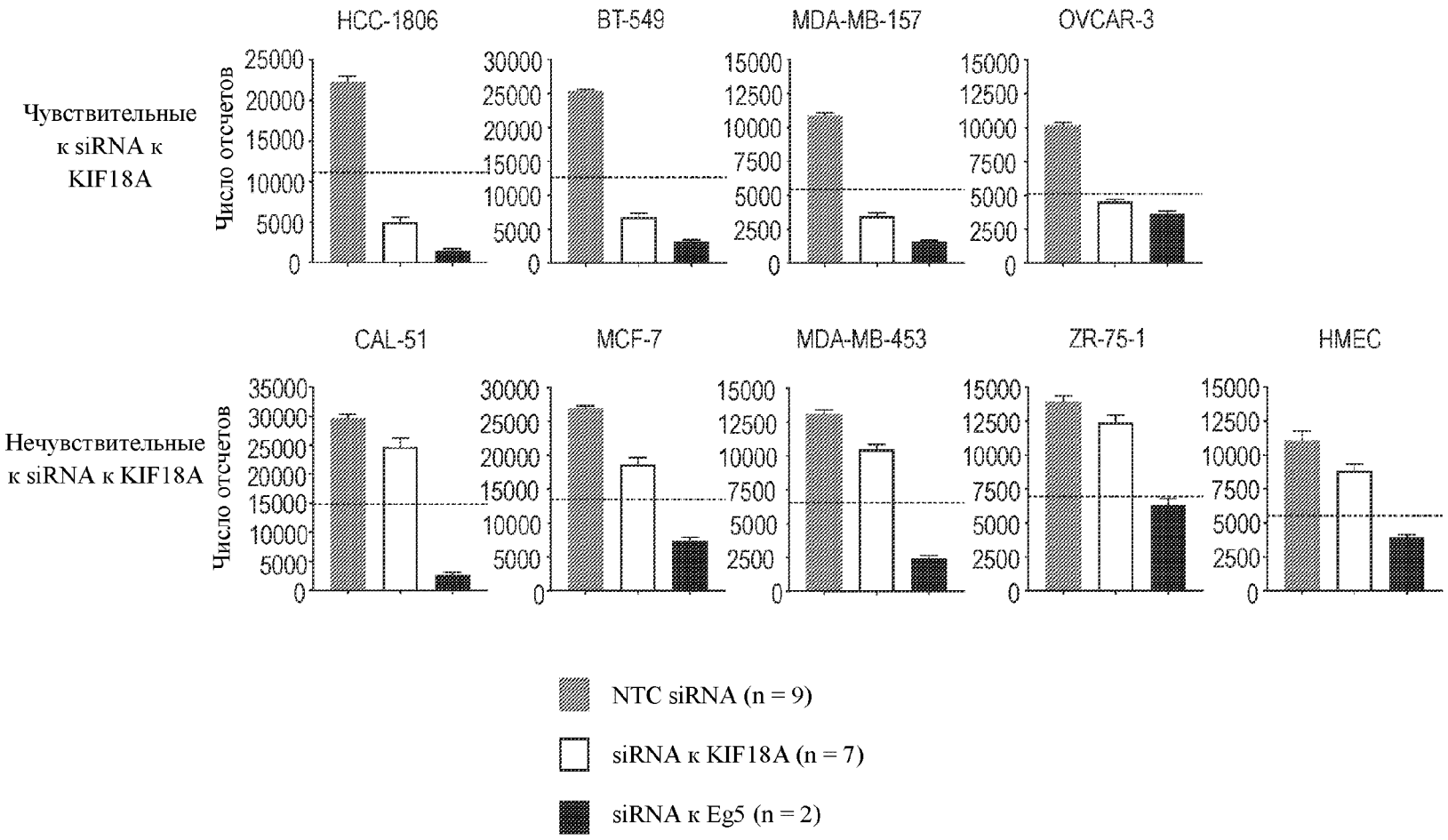


10 нМ siRNA к KIF18A (n = 7) и NTC siRNA (n = 1)

+-контроль (блот KIF18A), обработанные нокадазолом клетки HeLA

+-контроль (блот PARP), обработанные стауспорином клетки Юркат

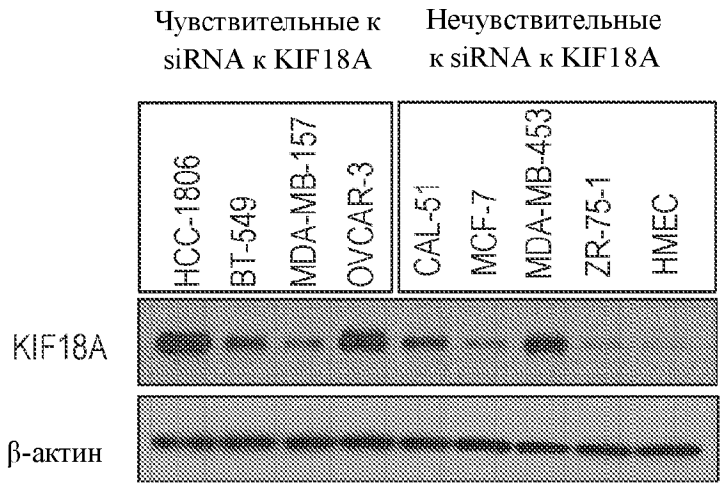
ФИГ. 17А


HCC-1806
BT-549
MDA-MB-157
OVCAR-3
Чувствительные к siRNA к KIF18A
Число отсчетов
CAL-51
MCF-7
MDA-MB-453
ZR-75-1
HMEC
Нечувствительные к siRNA к KIF18A
Число отсчетов
NTC siRNA (n = 9)
siRNA к KIF18A (n = 7)
siRNA к Eg5 (n = 2)

ФИГ. 17B

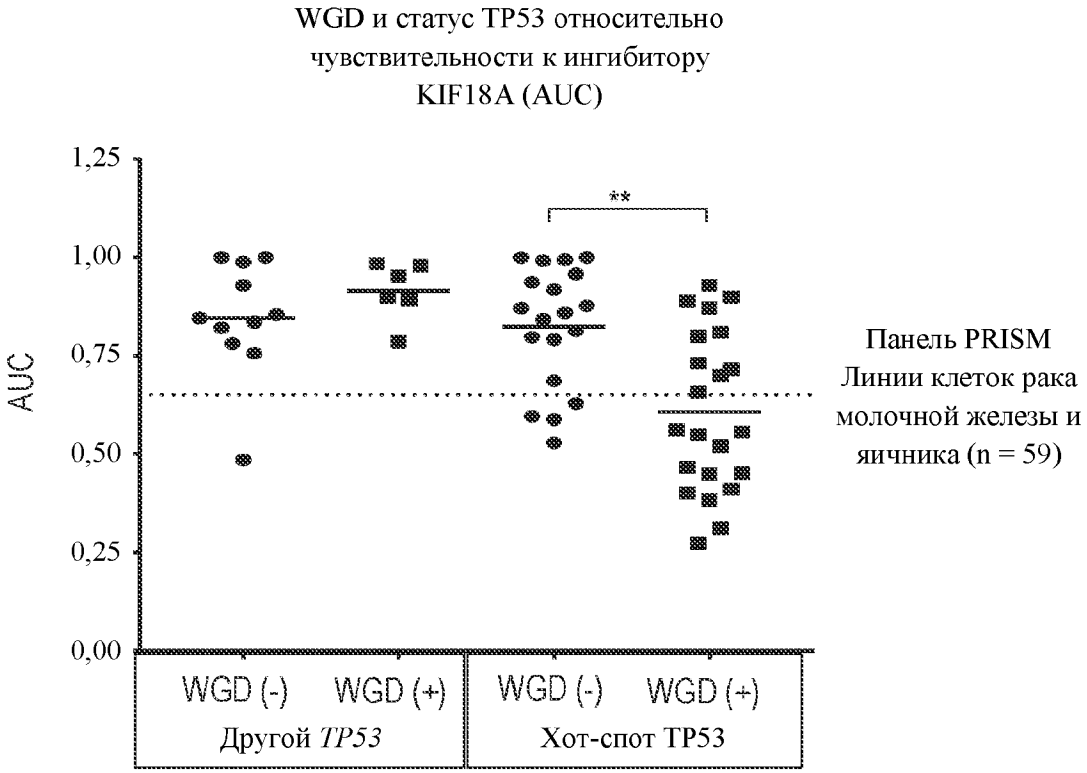
Информация о линии клеток					NTC siRNA по сравнению с siRNA к KIF18A	NTC siRNA по сравнению с siRNA к KIF18A
Линия клеток	**Происхож-дение опухоли**	**Подтип опухоли**	**Статус TP53**	**Статус RB1/CCNE1**	**t-критерий, p-значение**	**Число отсчетов (POC)**
HCC-1806	Молочная железа	TNBC	Мутантный вариант	Амплифицированный CCNE1	4,02E-27	*77,5
BT-549	Молочная железа	TNBC	Мутантный вариант	Дефектный по RB1	2,45E-36	*73,2
MDA-MB-157	Молочная железа	TNBC	Мутантный вариант	Амплифицированный CCNE1	2,36E-31	*68,3
OVCAR-3	Яичник	HGSOC	Мутантный вариант	Амплифицированный CCNE1	5,87E-31	*55,23
MCF-7	Молочная железа	Люминальный, положительный по ER	Дикий тип	Достаточный по RB1	1,24E-11	30,9
CAL-51	Молочная железа	TNBC	Дикий тип	Достаточный по RB1	3,01E-03	16,6
MDA-MB-453	Молочная железа	HER2, отрицательный по ER	Null	Достаточный по RB1	3,27E-07	20,3
ZR-75-1	Молочная железа	Люминальный, положительный по ER	Дикий тип	Достаточный по RB1	2,48E-02	10,9
HMEC	Молочная железа	-	Дикий тип	Достаточный по RB1	1,14E-02	20,3
*Подавление роста клеток >50% для siRNA к KIF18A по сравнению с NTC siRNA						

ФИГ. 17C



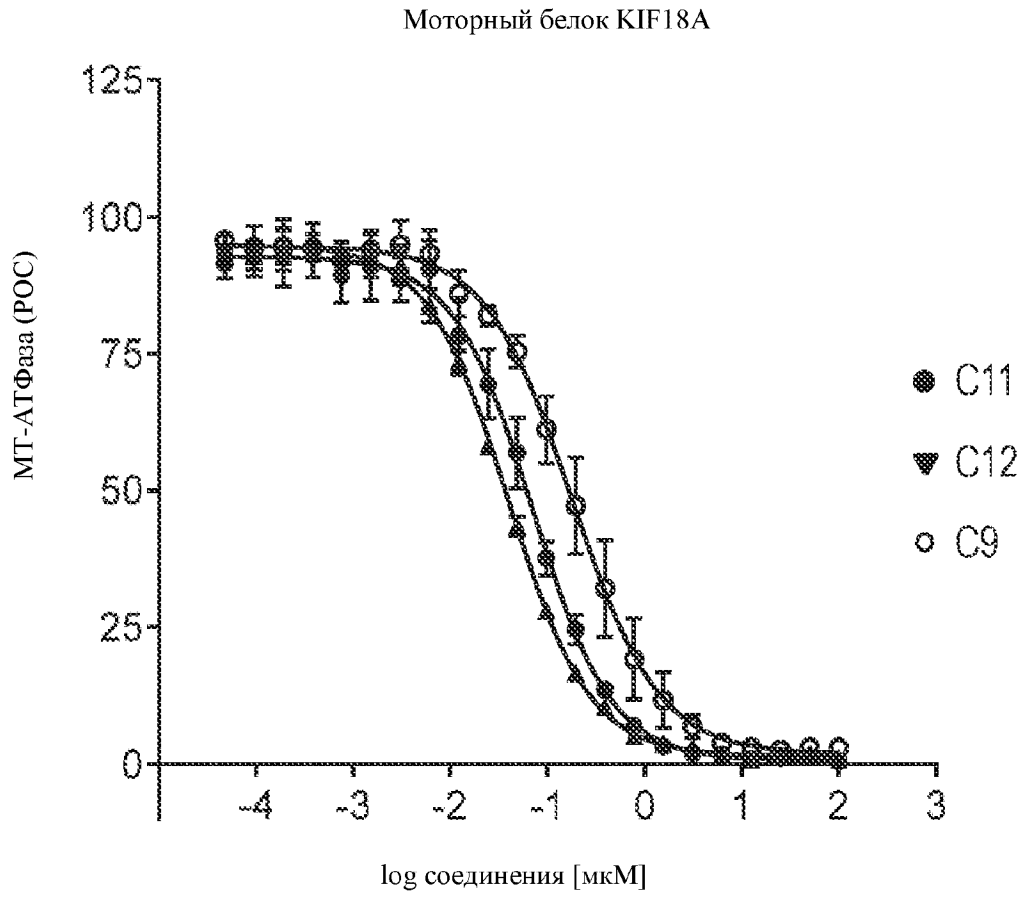
Экспрессия белка на исходном уровне

ФИГ. 18



Чувствительный к ингибитору KIF18A, если AUC <0,65
STATS **p-значение t-критерия = 0,00044

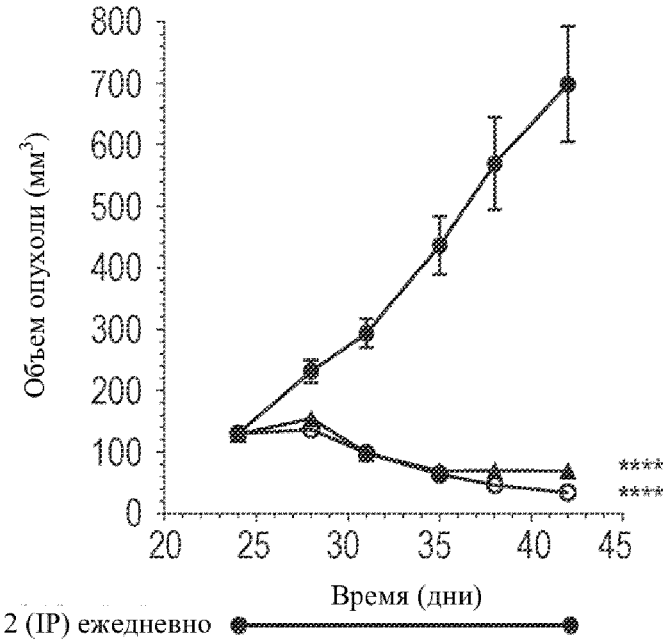
ФИГ. 19А


Моторный белок KIF18A
125
100
75
50
25
0
МТ-АТФаза (РОС)
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
log соединения [мкМ]
C11
C12
C9

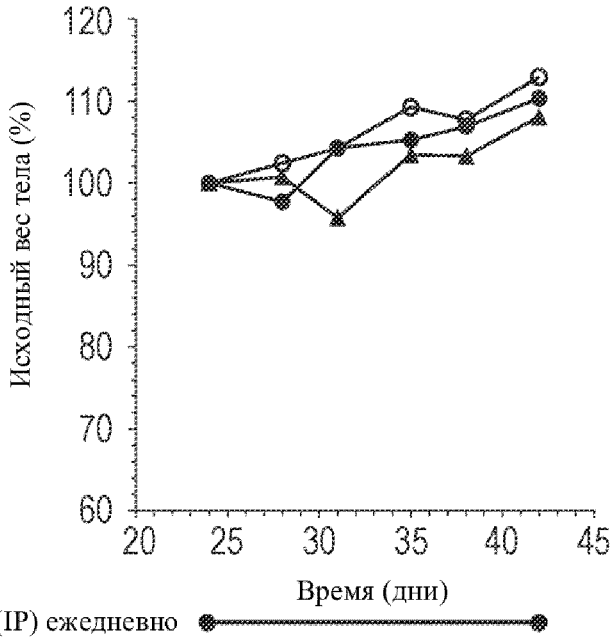
ФИГ. 19B

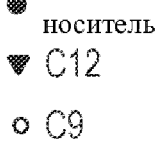
Ксенотрансплантат опухоли
OVCAR-3

Эффективность



Переносимость



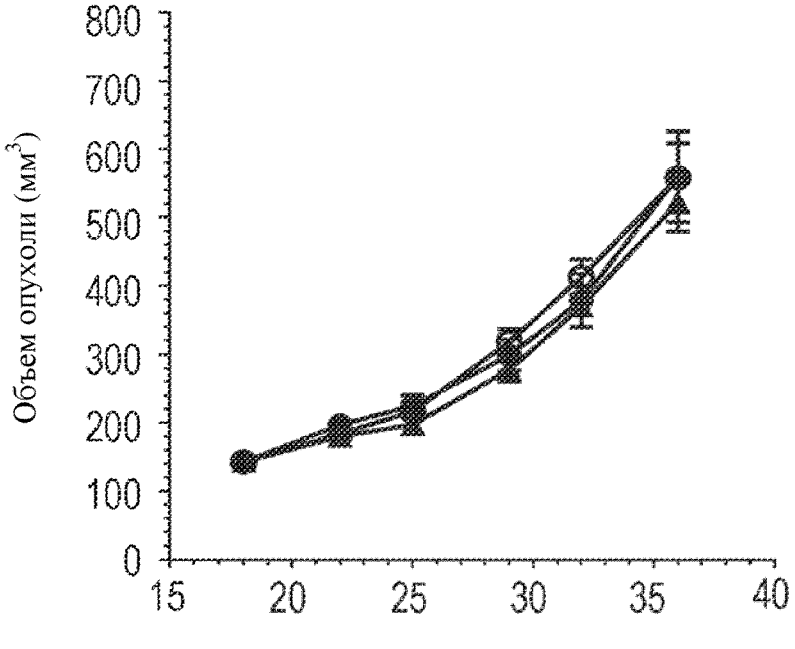


C12 = 25 мг/кг
C9 = 100 мг/кг

ФИГ. 19С

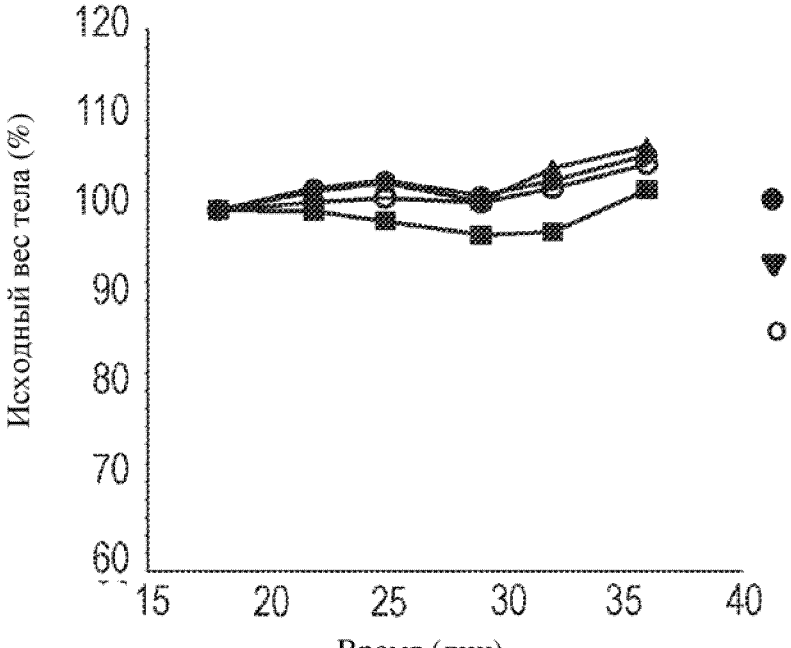
Ксенотрансплантат опухоли
CAL-51

Эффективность



C9, C12 (IP) Ежедневно

Переносимость

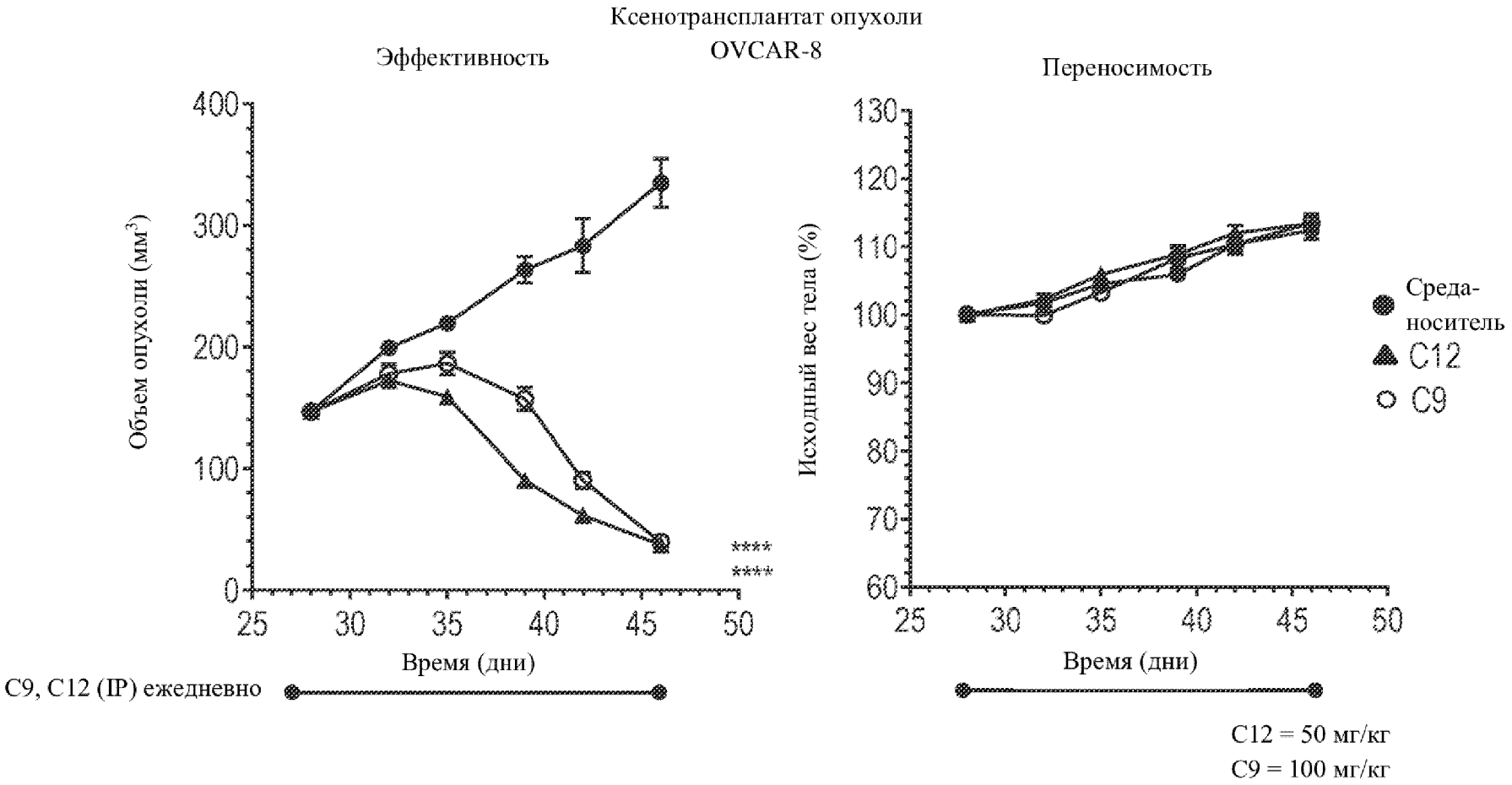


C9, C12 (IP) ежедневно

Среда-носитель
C12
C9

C12 = 25 мг/кг
C9 = 100 мг/кг

ФИГ. 19D


Ксенотрансплантат опухоли
OVCAR-8
Эффективность
Переносимость
Объем опухоли (мм³)
400
300
200
100
0
25
30
35
40
45
50
****
****
Время (дни)
Исходный вес тела (%)
130
120
110
100
90
80
70
60
Среда-носитель
C12
C9
C9, C12 (IP) ежедневно
C12 = 50 мг/кг
C9 = 100 мг/кг