

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044971**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.18

(21) Номер заявки
202191302

(22) Дата подачи заявки
2019.11.14

(51) Int. Cl. *A61K 31/519* (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРА MCL-1 И МИДОСТАУРИНА, ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

(31) 62/767,007; 62/824,515; 62/912,160

(32) 2018.11.14; 2019.03.27; 2019.10.08

(33) US

(43) 2021.10.01

(86) PCT/EP2019/081291

(87) WO 2020/099542 2020.05.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЛЕ ЛАБОРАТУАР СЕРВЬЕ (FR);
НОВАРТИС АГ (CH)**

(72) Изобретатель:
**Халилович Энсар, Ван Ючжэнь,
Моррис Эрик, Коноплева Марина,
Скварская Анна (US)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) WO-A1-2015097123

WO-A1-2018126898

WO-A1-2018078064

ANDRÁS KOTSCHY ET AL.: "The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models", NATURE, vol. 538, no. 7626, 19 October 2016 (2016-10-19), pages 477-482, XP055571783, London, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature19830, abstract, page 477, right-hand column, paragraph 3 - page 480, right-hand column, paragraph 1 figures 1-5

MARLISE R. LUSKIN ET AL.: "Midostaurin/PKC412 for the treatment of newly diagnosed FLT3 mutation-positive acute myeloid leukemia", EXPERT REVIEW OF HEMATOLOGY, vol. 10, no. 12, 2 December 2017 (2017-12-02), pages 1033-1045, XP055665097, UK, ISSN: 1747-4086, DOI: 10.1080/17474086.2017.1397510, abstract, page 1034, left-hand column, paragraph 1 - page 1035, right-hand column, paragraph 1 - page 1037, left-hand column, paragraph 3 - page 1038, right-hand column, paragraph 3 - page 1039, right-hand column, paragraph 2 - page 1041, left-hand column, paragraph 1 tables 1,2

(57) Комбинация (а) мидостаурина, или его фармацевтически приемлемой соли, или его комплекса, или его сокристалла, или его сольвата, включая гидрат, и (б) ингибитора Mcl-1 и ее композиции и применения.

B1

044971

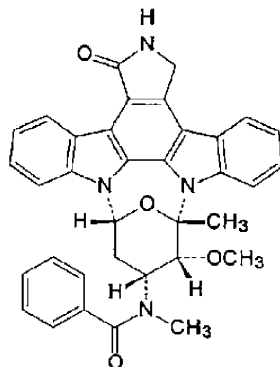
044971 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к комбинации Мидостаурина, ингибитора многоцелевой тирозинкиназы, как определено ниже, и ингибитора Mcl-1. Изобретение также относится к указанной комбинации для применения для лечения злокачественного новообразования, в частности, острого миелоидного лейкоза, и фармацевтическому составу, подходящему для введения такой комбинации.

Предпосылки создания изобретения

Мидостаурин также называется как 4'-N-бензоилстауроспорин или РКС412. Химическая структура Мидостаурина представлена ниже:



Мидостаурин, который также обозначается в настоящей заявке как соединение А, его синтез, его применения для лечения злокачественного новообразования и его фармацевтические составы, описаны в патенте US № 5,093,330, содержание которого включено путем ссылки. Мидостаурин специфически описан в примере 18 патента US № 5,093,330. В качестве единственного средства для лечения солидных опухолей на первой стадии клинических исследований Мидостаурин продемонстрировал низкую токсичность, но ограниченную эффективность (Propper и др., *Journal of Clinical Oncology* 2001, 19, 1485-1492). При добавлении к стандартной схеме лечения индукции цитарабина и даунорубицина и консолидации цитарабина, Мидостаурин продемонстрировал статистически достоверную эффективность и повышенную общую выживаемость у пациентов с AML с FLT3 мутацией (Stone и др., *New England Journal of Medicine* 2017, 377, 454-464).

Мидостаурин получил разрешение Управления по контролю за продуктами и лекарствами США (US FDA) в апреле 2017 г. в качестве активного компонента RYDAPT™ для лечения пациентов с впервые диагностированным острым миелоидным лейкозом (AML), которые заякоривают FLT3 мутацию, в комбинации с индукцией цитарабина и даунорубицина и консолидацией цитарабина.

Индукция цитарабина и даунорубицина с последующей консолидацией цитарабина является стандартной схемой лечения для AML. Цитарабин и даунорубицин представляют собой химиотерапевтические лекарственные средства, которые действуют путем уничтожения пролиферирующих клеток. Цитарабин представляет собой ингибитор ДНК-полимеразы и даунорубицин -антрациклин, которые блокирует репликацию. Введение цитарабина или даунорубицина может вызывать тошноту и рвоту, а также более серьезные побочные эффекты. Оба лекарственных средства должны вводиться путем инъекции и должны вводиться в специализированных учреждениях, таким образом, чтобы была возможность тщательного наблюдения за пациентами после введения.

Ингибитор Mcl-1 согласно настоящему изобретению представляет собой соединение формулы (I), как описано в настоящей заявке. Указанные соединения формулы (I), их синтез, их применения для лечения злокачественного новообразования и их фармацевтические составы, описаны в WO 2015/097123, WO 2016/207216, WO 2016/207217, WO 2016/207225, WO 2016/207226, и WO 2017/125224, содержание которых включено в настоящую заявку путем ссылки.

В частности, ингибитор Mcl-1 представляет собой соединение В: (2R)-2-{{(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксифенил]-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль, которое описано в примере 30 заявки WO 2015/097123, содержание которой включено путем ссылки.

В другом варианте осуществления, ингибитор Mcl-1 представляет собой соединение С (S63845):

(2R)-2-{{(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этоксифенил]-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пирозол-5-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль, которое описано в примере 185 заявки WO 2015/097123, содержание которой включено путем ссылки.

Апоптоз представляет собой строго регулируемый путь гибели клеток, который инициируется различными цитотоксическими стимулами, включая онкогенный стресс и химиотерапевтические средства. Было показано, что уклонение от апоптоза является отличительным признаком злокачественного новообразования и что эффективность многих химиотерапевтических средств зависит от активации внутрен-

него митохондриального пути. Три разные подгруппы белков семейства Bcl-2 контролируют внутренней апоптотический путь: (I) проапоптотические BH3 (Bcl-2 гомология 3)-только белки; (II) способствующие выживанию представители, такие как сам Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w, Mcl-1 и Bcl-2a1; и (III) проапоптотические эффекторные белки BAX и BAK (Czabotar и др., Nature Reviews Molecular Cell Biology 2014, 15, 49-63). Сверхэкспрессия анти-апоптотических представителей семейства Bcl-2 наблюдается при различных злокачественных новообразованиях, в особенности, при злокачественных новообразованиях системы крови, такие как лимфома из клеток зоны мантии (MCL), фолликулярная лимфома/диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (FL/DLBCL) и множественная миелома (Adams and Cory, Oncogene 2007, 26, 1324-1337). Фармакологическое ингибирование анти-апоптотических белков Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w и Mcl-1 с помощью разработанных недавно BH3-миметических лекарственных средств, таких как АВТ-199 (венетоклакс), АВТ-263 (навитоклакс) и S63845, является терапевтической стратегией для индуцирования апоптоза и вызывает регрессию опухоли при злокачественном новообразовании (Zhang и др., Drug Resist. Updat. 2007, 10, 207-217; Kotschy и др., Nature 2016, 538, 477-482). Тем не менее, наблюдаются механизмы резистентности к BH3 миметикам (Choudhary и др., Cell Death and Disease 2015, 6, e1593) и применение комбинированных терапий может улучшить эффективность и замедлить или даже отменить развитие резистентности.

Острый миелоидный лейкоз (AML) представляет собой стремительно развивающееся смертельное злокачественное заболевание крови, возникающее при клоновой трансформации гемопоэтических стволовых клеток, что приводит к параличу нормального функционирования костного мозга и смерти вследствие осложнений от абсолютной панцитопении. AML отвечает за 25% всех лейкозов у взрослых, и самый большой коэффициент заболеваемости наблюдается в Соединенных Штатах Америки, Австралии и Европе (WHO. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer). Во всем мире, ежегодно диагностируется приблизительно 88 тыс. новых случаев. AML продолжает сохранять наиболее низкий коэффициент выживаемости из всех лейкозов, с предполагаемым 5-ти летним выживанием только 24%. Несмотря на то, что стандартная терапия для AML (цитарабин в комбинации с антрациклином, таким как даунорубицин) была разработана более 4 десятилетий тому назад, введение успешных нацеленных терапий для этого заболевания остается труднодостижимой целью. Концепция нацеленной терапии при AML затруднена тем, что это заболевание развивается как многоклональная иерархия, с быстрым ростом лейкоэмических субклонов в качестве основной причины резистентности к лекарственным средствам и рецидивирования заболевания (Ding и др., Nature 2012, 481, 506-510).

Активирующие мутации FLT3 (главным образом FLT3-ITD) присутствуют приблизительно у 30% пациентов с AML при постановке диагноза, что приводит к последующей активации нижерасположенного каскада передачи сигналов, включая пути передачи сигналов FLT3/JAK/STAT, MAPK и PI3K.

Активация передачи сигналов FLT3 подавляет сигналы апоптоза путем индуцирования фосфорилирования про-апоптотического белка BAD и экспрессирования представителей анти-апоптотического семейства Bcl2. Ингибирование активности FLT3-ITD киназы индуцирует апоптоз посредством понижающей регуляции фосфорилирования BAD и экспрессии Bcl-xL в клетках FLT3-ITD (Minami и др., Blood 2003, 102, 2969-2975).

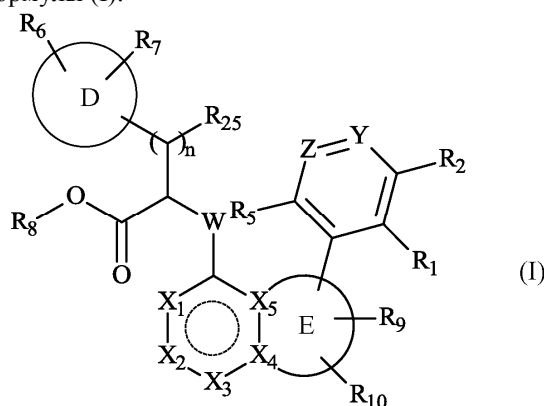
Сохраняется потребность в новых леченных и терапиях для лечения злокачественного новообразования. Неожиданно было обнаружено, что Мидостаурин, в комбинации с ингибитором Mcl-1 формулы (I), как описано в настоящей заявке, взаимодействуют синергетическим образом, сильно ингибируя пролиферацию клеток, в частности при AML, и более предпочтительно, при FLT3 мутантном AML.

Сущность изобретения

В соответствии с первым аспектом изобретения, обеспечивается новая комбинация

(а) мидостаурина или его фармацевтически приемлемой соли, или его комплекса, или его сокристалла, или его сольвата, включая гидрат, и

(б) ингибитора Mcl-1 формулы (I):



где:

D представляет собой циклоалкильную группу, гетероциклоалкильную группу, арильную группу или гетероарильную группу,

E представляет собой фурильное, тиенильное или пирролильное кольцо,

X₁, X₃, X₄ и X₅ независимо друг от друга представляют собой атом углерода или атом азота,

X₂ представляет собой C-R₂₆ группу или атом азота,



обозначает, что кольцо является ароматическим,

Y представляет собой атом азота или C-R₃ группу,

Z представляет собой атом азота или C-R₄ группу,

R₁ представляет собой атом галогена, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкенильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкинильную группу, линейную или разветвленную (C₁-C₆)полигалоалкильную группу, гидроксигруппу, гидроксигруппу (C₁-C₆)алкильную группу, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкоксигруппу, -S-(C₁-C₆)алкильную группу, цианогруппу, нитрогруппу, -Cy₈, -алкил(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-алкил(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁',

-O-алкил(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR_n, -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁',

-NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -алкил(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', или -SO₂-алкил(C₁-C₆),

R₂, R₃, R₄ и R₅ независимо друг от друга представляют собой атом водорода, атом галогена, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкенильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкинильную группу, линейную или разветвленную (C₁-C₆)полигалоалкил, гидроксигруппу, гидроксигруппу (C₁-C₆)алкильную группу, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкоксигруппу, -S-(C₁-C₆)алкильную группу, цианогруппу, нитрогруппу, -алкил(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-Cy₁, -алкил(C₀-C₆)-Cy₁, -алкенил(C₂-C₆)-Cy₁, -алкинил(C₂-C₆)-Cy₁, -O-алкил(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-алкил(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -алкил(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', или -SO₂-алкил(C₁-C₆),

или заместители пары (R₁, R₂), (R₂, R₃), (R₃, R₄), (R₄, R₅) образуют, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, ароматическое или неароматическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которое может содержать от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, подразумевается, что полученное кольцо может быть замещено 1-2 группами, выбранными из галогена, линейного или разветвленного (C₁-C₆)алкила, -алкил(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₃R₁₃', -алкил(C₀-C₆)-Cy₁ или оксо,

R₆ и R₇ независимо друг от друга представляют собой атом водорода, атом галогена, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкенильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкинильную группу, линейный или разветвленный (C₁-C₆)полигалоалкил, гидроксигруппу, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкоксигруппу, -S-(C₁-C₆)алкильную группу, цианогруппу, нитрогруппу, -алкил(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁',

-O-алкил(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁', -O-Cy₁, -алкил(C₀-C₆)-Cy₁, -алкенил(C₂-C₆)-Cy₁, -алкинил(C₂-C₆)-Cy₁, -O-алкил(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁, -O-C(O)-R₁₁, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -NR₁₁-C(O)-OR₁₁', -алкил(C₁-C₆)-NR₁₁-C(O)-R₁₁', -SO₂-NR₁₁R₁₁', или -SO₂-алкил(C₁-C₆), или заместители пары (R₆, R₇), когда привиты на два смежных атома углерода, образуют, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, ароматическое или неароматическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которое может содержать от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, подразумевается, что полученное кольцо может быть замещено группой, выбранной из линейной или разветвленной (C₁-C₆)алкильную группу, -NR₁₃R₁₃', -алкил(C₀-C₆)-Cy₁ или оксо,

W представляет собой -CH₂- группу, -NH- группу или атом кислорода,

R₈ представляет собой атом водорода, линейную или разветвленную (C₁-C₈)алкильную группу, -CHR_aR_b группу, арильную группу, гетероарильную группу, арилалкил(C₁-C₆) группу, или гетероарилалкил(C₁-C₆) группу,

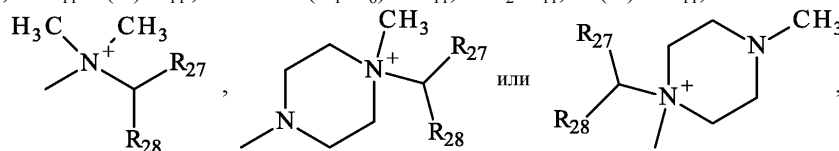
R₉ представляет собой атом водорода, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкенильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкинильную группу, -Cy₂, -алкил(C₁-C₆)-Cy₂, -алкенил(C₂-C₆)-Cy₂, -алкинил(C₂-C₆)-Cy₂, -Cy₂-Cy₃, -алкинил(C₂-C₆)-O-Cy₂, -Cy₂-алкил(C₀-C₆)-O-алкил(C₀-C₆)-Cy₃, атом галогена, цианогруппу, -C(O)-R₁₄, или -C(O)-NR₁₄R₁₄',

R₁₀ представляет собой атом водорода, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкенильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкинильную группу, арилалкил(C₁-C₆) группу, циклоалкилалкил(C₁-C₆) группу, линейный или разветвленный (C₁-C₆)полигалоалкил, или -алкил(C₁-C₆)-O-Cy₄, или заместители пары (R₉, R₁₀), когда привиты на два смежных атома углерода, образуют, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, ароматическое или неароматическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которое может содержать от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота,

R₁₁ и R₁₁' независимо друг от друга представляют собой атом водорода, необязательно замещенную линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, или -алкил(C₀-C₆)-Cy₁, или заместители пары (R₁₁, R₁₁') образуют, вместе с атомом азота, к которому они присоединены, ароматическое или неарома-

тическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которые могут содержать, дополнительно к атому азота, от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, подразумевается, что данный азот может быть замещен 1-2 группами, представляющими атом водорода, или линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу и подразумевается, что один или несколько атомов углерода возможных заместителей, могут быть дейтерированы,

R₁₂ представляет собой -C_{у5}, -C_{у5}-алкил(C₀-C₆)-О-алкил(C₀-C₆)-C_{у6}, -C_{у5}-алкил(C₀-C₆)-C_{у6}, -C_{у5}-алкил(C₀-C₆)-NR₁₁-алкил(C₀-C₆)-C_{у6}, -C_{у5}-C_{у6}-О-алкил(C₀-C₆)-C_{у7}, -C_{у5}-алкил(C₀-C₆)-О-алкил(C₀-C₆)-C_{у9}, -C_{у5}-алкил(C₀-C₆)-C_{у9}, -NH-C(O)-NH-R₁₁, -C_{у5}-алкил(C₀-C₆)-NR₁₁-алкил(C₀-C₆)-C_{у9}, -C(O)-NR₁₁R₁₁', -NR₁₁R₁₁', -OR₁₁, -NR₁₁-C(O)-R₁₁', -О-алкил(C₁-C₆)-OR₁₁, -SO₂-R₁₁, -C(O)-OR₁₁,



представляется возможным для аммония, определенного таким образом, существовать в цвиттер-ионной форме или иметь моновалентный анионный противоион,

R₁₃, R₁₃', R₁₄ и R₁₄' независимо друг от друга представляют собой атом водорода, или необязательно замещенную линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу,

R_a представляет собой атом водорода или линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу,

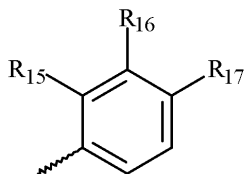
R_b представляет собой -O-C(O)-O-R_c группу, -O-C(O)-NR_cR_c' группу, или -O-P(O)(OR_c)₂ группу,

R_c и R_c' независимо друг от друга представляют собой атом водорода, линейную или разветвленную (C₁-C₈)алкильную группу, циклоалкильную группу, (C₁-C₆)алкокси(C₁-C₆)алкильную группу или (C₁-C₆)алкоксикарбонил(C₁-C₆)алкильную группу,

или заместители пары (R_c, R_c') образуют, вместе с атомом азота, к которому они присоединены, неароматическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которые могут содержать, дополнительно к атому азота, от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода и азота,

подразумевается, что данный азот может быть замещен группой, представляющей линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, C_{у1}, C_{у2}, C_{у3}, C_{у4}, C_{у5}, C_{у6}, C_{у7}, C_{у8} и C_{у10} независимо друг от друга представляют собой циклоалкильную группу, гетероциклоалкильную группу, арильную группу или гетероарильную группу,

C_{у9} представляет собой



или C_{у9} представляет собой гетероарильную группу, которая замещена группой, выбранной из -O-P(O)(OR₂₀)₂; -O-P(O)(O⁻M⁺)₂; -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀; гидроксид;

гидроксид(C₁-C₆)алкила; -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-гетероциклоалкила; или -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁'

R₁₅ представляет собой атом водорода; -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀ группу; линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкокси(C₁-C₆)алкильную группу; -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' группу; или -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-гетероциклоалкильную группу,

R₁₆ представляет собой атом водорода; гидроксид(C₁-C₆)алкильную группу; -(CH₂)_r-и-(CH₂)_s-гетероциклоалкильную группу; (CH₂)_r-U-V-O-P(O)(OR₂₀)₂ группу; -O-P(O)((O⁻M⁺)₂ группу; -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀ группу; -(CH₂)_p-O-C(O)-NR₂₂R₂₃ группу; или -U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' группу,

R₁₇ представляет собой атом водорода; -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀ группу;

-O-P(O)(OR₂₀)₂ группу; -O-P(O)(O⁻M⁺)₂ группу; гидроксид(C₁-C₆)алкильную группу; -(CH₂)_r-U-(CH₂)_s-гетероциклоалкильную группу;

-U-(CH₂)_q-NR₂₁R₂₁' группу; или альдоновую кислоту,

M⁺ представляет собой фармацевтически приемлемый моновалентный катион,

U представляет собой связь или атом кислорода,

V представляет собой -(CH₂)_s группу или -C(O)- группу,

R₁₈ представляет собой атом водорода или (C₁-C₆)алкокси(C₁-C₆)алкильную группу,

R₁₉ представляет собой атом водорода или гидроксид(C₁-C₆)алкильную группу,

R₂₀ представляет собой атом водорода или линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу,

R₂₁ и R₂₁' независимо друг от друга представляют собой атом водорода, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, или гидроксид(C₁-C₆)алкильную группу,

или заместители пары (R₂₁, R₂₁') образуют, вместе с атомом азота, к которому они присоединены,

ароматическое или неароматическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которые могут содержать, дополнительно к атому азота, от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, подразумевается, что полученное кольцо может быть замещено группой, представляющей атом водорода или линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу,

R₂₂ представляет собой (C₁-C₆)алкокси(C₁-C₆)алкильную группу, -(CH₂)_p-NR₂₄R₂₄' группу, или -(CH₂)_p-O-(CHR₁₈-CHR₁₉-O)_q-R₂₀ группу,

R₂₃ представляет собой атом водорода или (C₁-C₆)алкокси(C₁-C₆)алкильную группу,

или заместители пары (R₂₂, R₂₃) образуют, вместе с атомом азота, к которому они присоединены, ароматическое или неароматическое кольцо, состоящее из 5-18 кольцевых членов, которые могут содержать, дополнительно к атому азота, от 1 до 5 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, подразумевается, что полученное кольцо может быть замещено группой, представляющей атом водорода, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу или гетероциклоалкильную группу,

R₂₄ и R₂₄' независимо друг от друга представляют собой атом водорода или линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу,

или заместители пары (R₂₄, R₂₄') образуют, вместе с атомом азота, к которому они присоединены, ароматическое или неароматическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которые могут содержать, дополнительно к атому азота, от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, подразумевается, что полученное кольцо может быть замещено группой, представляющей атом водорода или линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу,

R₂₅ представляет собой атом водорода, гидроксильную группу, или гидроксильную(C₁-C₆)алкильную группу,

R₂₆ представляет собой атом водорода, атом галогена, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, или циано группу,

R₂₇ представляет собой атом водорода или линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу,

R₂₈ представляет собой -O-P(O)(O')(O') группу, -O-P(O)(O')(OR₃₀) группу, -O-P(O)(OR₃₀)(OR₃₀') группу, -O-SO₂-O' группу, -O-SO₂-OR₃₀ группу, -Cu₁₀, -O-C(O)-R₂₉ группу, -O-C(O)-OR₂₉ группу или -O-C(O)-NR₂₉R₂₉' группу;

R₂₉ и R₂₉' независимо друг от друга представляют собой атом водорода, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу или линейную или разветвленную амино(C₁-C₆)алкильную группу,

R₃₀ и R₃₀' независимо друг от друга представляют собой атом водорода, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу или арилалкил(C₁-C₆) группу,

p представляет собой целое число, равное 0 или 1,

r представляет собой целое число, равное 0, 1 или 2,

q представляет собой целое число, равное 1, 2, 3 или 4,

г и s независимо представляют собой целое число, равное 0 или 1,

подразумевается, что

"арил" обозначает фенильную, нафтильную, бифенильную, инданильную или инденильную группу,

"гетероарил" обозначает любую моно- или бициклическую группу, состоящую из 5-10 кольцевых членов, имеющую по меньшей мере один ароматический компонент и содержащую от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота,

"циклоалкил" обозначает любую моно- или бициклическую неароматическую карбоциклическую группу, содержащую от 3 до 10 кольцевых членов,

"гетероциклоалкил" обозначает любую моно- или бициклическую неароматическую карбоциклическую группу, содержащую от 3 до 10 кольцевых членов, и содержащую от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, которая может включать сопряженные, мостиковые или спиро циклические системы,

представляется возможным для арильных, гетероарильных, циклоалкильных и гетероциклоалкильных групп, определенных таким образом, и алкила, алкенила, алкинила, алкокси, быть замещенными от 1 до 4 групп, выбранных из необязательно замещенного линейного или разветвленного (C₁-C₆)алкила, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C₂-C₆)алкенильной группы, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C₂-C₆)алкинильной группы, необязательно замещенного линейного или разветвленного (C₁-C₆)алкокси, необязательно замещенного

(C₁-C₆)алкил-S-, гидроксильной, оксо (или N-оксид, при необходимости), нитро, циано, -C(O)-OR',

-O-C(O)-R', -C(O)-NR'R", -NR'R", -(C=NR')-OR", линейного или разветвленного (C₁-C₆)полигалогеналкила, трифторметокси, или галогена, подразумевается, что R' и R" независимо друг от друга представляют собой атом водорода или необязательно замещенную линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, и подразумевается, что один или несколько атомов углерода предшествующих возможным заместителям, могут быть дейтерированы,

или их энантиомеры, диастереоизомеры, атропизомеры, или их соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием,

подходящие для одновременного, последовательного или раздельного применения.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает комбинацию, как описано в настоящей заявке, для применения для лечения злокачественного новообразования, в частности острого миелоидного лейкоза.

В дальнейшем аспекте, изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую комбинацию, как описано в настоящей заявке, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показано влияние на активность каспазы 3.7 при комбинировании FLT3 ингибитора соединения А (мидостаурин), с ингибитором Mcl-1 соединением В, в AML клеточных линиях Molm13 и MV-4-11.

Фиг. 2. Комбинированное нацеливание FLT3 и Mcl-1 является эффективным в FLT3-ITD AML первичных образцах. Профилирование мутации первичных AML образцов и чувствительность к комбинированному лечению 863845/Мидостаурин в течение 24 ч. Рост клеток измеряли с помощью CellTiter-Glo. Показатель аддитивности (ПА) рассчитывали, используя программное обеспечение CalcuSyn, и представляет собой среднее ПА при ED50, ED75, и ED90. ПА<1 указывает на синергетический эффект и ПА>1 антагонизм. Первичные AML образцы лечили с применением следующих серийных разведений доз комбинации: мидостаурин, от 3,1 нМ до 800 нМ; и S63845, от 0,31 нМ до 80 нМ. Соотношение мидостаурина к S63845 составляло 10:1. На присутствие мутации указывали заполненные синие боксы для каждого образца.

Фиг. 3. Мидостаурин индуцирует накопление Bim, которое способствует летальности мидостаурин/863845 (соединение С).

А. Мидостаурин повышает уровень проапоптотического Bim, который может, в свою очередь, связывать и сводить к нулю оставшуюся активность Mcl-1. Повышенный Bim сохраняется при совместном лечении S63845, свидетельствуя о том, что Bim играет функциональную роль в опосредованной мидостаурин/863845 летальности.

В. Вестерн-блоттинг FLT3-опосредованных путей передачи сигналов и экспрессия белков семейства Bcl-2 в MV-4-11 клетках, леченных в течение 6 ч с применением мидостаурина, S63845 отдельно или в комбинации. Дефосфорилирование FLT3-ITD приводит к инактивации STAT5 и MAPK и сопровождается существенной понижающей регуляцией MAPK-опосредованного фосфорилирования Mcl-1 на Thr163, сайте, необходимом для стабильности Mcl-1. Следовательно, мидостаурин уменьшает уровень Mcl-1.

Фиг. 4 и 5. Комбинированное нацеливание FLT3 и Mcl-1 облегчает апоптоз.

Активацию каспазы измеряли с помощью анализа Caspase-Glo® 3/7 через 6 ч лечения с применением лекарственных средств. Процентное значение апоптотических клеток измеряли с помощью проточной цитометрии, используя окрашивание Аннексин-V-APC/DAPI. AML первичные клетки лечили в течение 16 ч.

Фиг. 6. Антилейкемический синергизм S63845 (Соединение С) и FLT3 Tki.

Чувствительность AML клеточных линий к S63845 (соединение С) и выбранным FLT3 ингибиторам (FLT3 TKi) после воздействия в течение 24 ч. Рост клеток измеряли с помощью CellTiter-Glo. Рассчитывали значения показателя аддитивности (ПА), используя программное обеспечение CalcuSyn, и представлены средние значения ПА при ED50, ED75, и ED90. Соотношения, при которых комбинировали лекарственные средства, представлены в скобках.

Фиг. 7 и 8. Антилейкемический синергизм S63845 и FLT3 Tki.

Репрезентативные синергетические взаимодействия между S63845 в комбинации с мидостаурином на MV4-11 FLT3-ITD клетках определяли с помощью синергизма лекарственных средств на модели независимости увеличенного размера BLISS. Клетки обрабатывали с применением девяти 2-х кратных серийных разведений каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке. Рост клеток оценивали через 24 ч (фиг. 7). Синергетические взаимодействия оценивали, используя модель независимости BLISS. Значения BLISS индекса для каждой дозы комбинации >0 представляют собой синергизм, в то время как значения BLISS индекса <0 представляют собой антагонизм (фиг. 8).

Фиг. 9. ВНЗ профилирование: мидостаурин повышает митохондриальное примирование для апоптоза в FLT3-ITD клетках, подвергнутых воздействию S63845.

Анализ ВНЗ профилирования показал, что мидостаурин повышает митохондриальное примирование в MV4-11 FLT3-ITD на ингибитор Mcl-1 S63845 и в особенности Bim пептид. Клетки подвергали анализу ВНЗ профилирования через 4 ч после лечения с применением мидостаурина (100 нМ). Повышение высвобождения цитохрома С является количественным показателем инициации митохондриального апоптоза.

Фиг. 10, 11, 12 и 13. Комбинация S63845 и мидостаурина является эффективной в резистентных к венетоклаксу AML клетках с FLT3-ITD, но не в FLT3-WT.

Модель независимости BLISS для синергетических взаимодействий между S63845 в комбинации с Мидостаурином в MOLM13 FLT3-ITD клетках и резистентной к Венетоклаксу подлиннии. Резистентные к Венетоклаксу клетки создавали, как описано в Zhang и др. Blood, 2015, 126, 328 и поддерживали общепринятым образом в среде, содержащей 1 мкМ Венетоклакса. Венетоклакс вымывали перед экспериментами и клетки обрабатывали с применением девяти 2-х кратных серийных разведений S63845 и Мидостаурина, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке. Через 24 ч

лечения, рост клеток измеряли с помощью Cell TiterGlo. Значения BLISS индекса для каждой дозы комбинации >0 представляют собой синергизм, в то время как значения BLISS индекса <0 представляют собой антагонизм.

Фиг. 14. Предварительное исследование *in vivo*: AML FLT3-ITD ксенотрансплантат NSG мышам трансплантировали 10^6 AML клеток, имеющих происхождение от пациента, заякоривающих FLT3-ITD мутации. Опухолевую нагрузку измеряли с помощью процента hCD45+ клеток в крови мышей, используя FACS. После приживления трансплантата, мышам лечили с применением (I) наполнителя, (II) S63845 40 мг/кг в/в один раз в неделю, (III) Мидостаурина 75 мг/кг через желудочный зонд ежедневно, или (IV) комбинации.

Фиг. 15 и 16. Синергетический эффект мидостаурина и S63845 в мышинных Ba/F3 FLT3-ITD клетках. Синергетические взаимодействия между S63845 в комбинации с мидостаурином в мышинных Ba/F3 FLT3-ITD клетках определяли с помощью синергизма лекарственных средств на модели независимости увеличенного размера BLISS. Клетки обрабатывали с применением девяти 2-х кратных серийных разведений каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке. Рост клеток оценивали через 24 ч (фиг. 15). Синергетические взаимодействия оценивали, используя модель независимости BLISS. Значения BLISS индекса для каждой дозы комбинации >0 представляют собой синергизм, в то время как значения BLISS индекса <0 представляют собой антагонизм (фиг. 16).

Фиг. 17 и 18. Синергетический эффект мидостаурина и S63845 в мышинных Ba/F3 FLT3-D835Y клетках.

Синергетические взаимодействия между S63845 в комбинации с Мидостаурином в мышинных Ba/F3 FLT3-D835Y клетках определяли с помощью синергизма лекарственных средств на модели независимости увеличенного размера BLISS. Клетки обрабатывали с применением девяти 2-х кратных серийных разведений каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке. Рост клеток оценивали через 24 ч (фиг. 17). Синергетические взаимодействия оценивали, используя модель независимости BLISS. Значения BLISS индекса для каждой дозы комбинации > 0 представляют собой синергизм, в то время как значения BLISS индекса < 0 представляют собой антагонизм (фиг. 18).

Определения

"Комбинация" относится либо к комбинации с фиксированной дозой в одной единичной дозированной форме (например, капсуле, таблетке или саше), комбинации с нефиксированной дозой, или набору для комбинированного введения, где соединение согласно настоящему изобретению и один или несколько компонентов из комбинации (например, другое лекарственное средство, как объясняется ниже, также обозначается в виде "терапевтического средства" или "соагента") могут вводиться независимо в одно и то же время или раздельно в течение временных интервалов, в особенности, если эти временные интервалы предоставляют возможность для компонентов комбинации проявлять совместный, например, синергетический эффект.

Термины "совместное введение" или "комбинированное введение" или тому подобные, как используется в настоящей заявке, охватывают введение выбранного компонента комбинации единичному субъекту, который в этом нуждается (например, пациенту), и включают схемы лечения, при которых агенты не обязательно вводятся одним и тем же путем введения или в одно и то же время.

Термин "комбинация с фиксированной дозой" обозначает, что активные компоненты, например, соединение формулы (I) и один или несколько компонентов комбинации, оба вводятся пациенту одновременно в форме единого целого или дозировки.

Термин "комбинация с нефиксированной дозой" обозначает, что активные компоненты, например, соединение согласно настоящему изобретению и один или несколько компонентов комбинации, оба вводятся пациенту в виде раздельных составляющих либо одновременно или последовательно, без специфических временных ограничений, где такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также применяется для коктейльной терапии, например, введение трех или более активных компонентов.

"Злокачественное новообразование" обозначает класс заболеваний, в котором группа клеток проявляет неконтролируемый рост. Типы злокачественных новообразований включают гематологическое злокачественное новообразование (лимфома и лейкоз). В частности "злокачественное новообразование" относится к гематологическому злокачественному новообразованию, в частности острому миелоидному лейкозу.

"AML" обозначает острый миелоидный лейкоз. В предпочтительном варианте осуществления, AML присутствует у пациентов, несущих FLT3 мутацию. В дальнейшем варианте осуществления, мутация представляет собой FLT3-ITD. В другом варианте осуществления, мутация представляет собой FLT3-TKD. В частности, указанная FLT3-TKD мутация включает FLT3-D835Y или FLT3-F691 мутацию в пределах домена тирозинкиназы (TKD) из FLT3. AML, подвергаемый лечению, может быть резистентным к предшествующей противораковой терапии. Такая предшествующая терапия может включать одно или несколько соединений, используемых для лечения AML, например, венетоклак, децитабин, даунорубин, и цитарабин, в частности венетоклак. В одном варианте осуществления, AML, подвергаемый лече-

нию, представляет собой резистентный к венетоклаксу AML, в особенности, резистентный к венетоклаксу AML с FLT3-ITD мутацией.

Термин "совместно терапевтически эффективны" обозначает, что терапевтические средства могут вводиться раздельно (в хронологически установленном порядке, в особенности специфически к последовательности) в такие временные интервалы, что они могут предпочтительно, у теплокровного животного, в особенности у человека, лечить, все еще проявляя (предпочтительно синергетическое) взаимодействие (совместный терапевтический эффект). В любом случае, это может быть установлено, в частности, путем определения последующих уровней в крови, свидетельствующих о том, что оба соединения присутствуют в крови человека, подвергаемого лечению, по меньшей мере на протяжении определенных временных интервалов.

"Синергетически эффективны" или "синергизм" обозначает, что терапевтический эффект, наблюдаемый после введения двух или более агентов, является больше, чем сумма терапевтических эффектов, наблюдаемых после введения каждого единичного средства.

Как используется в настоящей заявке, термин "лечить", "лечение" или "терапия" любого заболевания или нарушения относится в одном варианте осуществления, к ослаблению заболевания или нарушения (то есть, облучение или остановка или уменьшение развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "лечить", "лечение" или "терапия" относится к ослаблению или облегчению по меньшей мере одного физического параметра, включая те, которые могут не ощущаться пациентом. В еще другом варианте осуществления, "лечить", "лечение" или "терапия" относится к модуляции заболевания или нарушения, либо физически, (например, стабилизация различного симптома), физиологически, (например, стабилизация физического параметра), или обоих.

Как используется в настоящей заявке, субъект "нуждается в" лечении, если такой субъект будет получать преимущества биологически, медицински или качества жизни от такого лечения.

"Лекарственное средство" обозначает фармацевтическую композицию, или комбинацию нескольких фармацевтических композиций, который содержат один или несколько или активных компонентов в присутствии одного или нескольких наполнителей.

Подробное описание изобретения

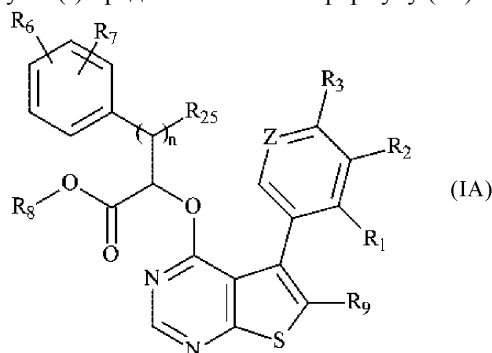
Ниже описаны пронумерованные варианты осуществления изобретения, где, для удобства, E1 является идентичным первому аспекту изобретения, описанному в настоящей заявке выше. Дальнейшие пронумерованные варианты осуществления (E) изобретения описаны в настоящей заявке. Следует принять во внимание, что характерные особенности, указанные в каждом варианте осуществления, могут быть комбинированы с другими указанными характерными особенностями, для обеспечения дальнейших характерных вариантов осуществления настоящего изобретения.

E2. Комбинация в соответствии с E1, содержащая

(а) мидостаурин или его фармацевтически приемлемую соль, или его комплекс, или его сокристалл, или его сольват, включая гидрат, и

(б) ингибитор Mcl-1 формулы (I),

где ингибитор Mcl-1 формулы (I) представляет собой формулу (IA):



где:

Z представляет собой атом азота или C-R₄ группу,

R₁ представляет собой линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкенильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкинильную группу, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкокси группу, -S-(C₁-C₆)алкильную группу, линейный или разветвленный (C₁-C₆)полигалоалкил, гидроксигруппу, циано, -NR₁₁R₁₁' , -Cu₈ или атом галогена,

R₂, R₃ и R₄ независимо друг от друга представляют собой атом водорода, атом галогена, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкенильную группу, линейную или разветвленную (C₂-C₆)алкинильную группу, линейную или разветвленную (C₁-C₆)полигалоалкил, гидроксигруппу, линейную или разветвленную (C₁-C₆)алкокси группу, -S-(C₁-C₆)алкильную группу, цианогруппу, нитрогруппу, -алкил(C₀-C₆)-NR₁₁R₁₁' , -O-Cu₁, -алкил(C₀-C₆)-Cu₁, -алкенил(C₂-C₆)-Cu₁, -алкинил(C₂-C₆)-Cu₁, -O-алкил(C₁-C₆)-NR₁₁R₁₁' , -O-алкил(C₁-C₆)-R₁₂, -C(O)-OR₁₁,

$-O-C(O)-R_{11}$, $-C(O)-NR_{11}R_{11}'$, $-NR_{11}-C(O)-R_{11}'$, $-NR_{11}-C(O)-OR_{11}'$, алкил(C_1-C_6)- $NR_{11}-C(O)-R_{11}'$, $-SO_2-NR_{11}R_{11}'$, или $-SO_2$ -алкил(C_1-C_6), или заместители одной из пар (R_2, R_3), (R_3, R_4) образуют, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, ароматическое или неароматическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которое может содержать от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, подразумевается, что полученное кольцо может быть замещено группой, выбранной из линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группы, $-NR_{13}R_{13}'$, алкил(C_0-C_6)- Su_1 или оксо,

R_6 и R_7 независимо друг от друга представляют собой атом водорода, атом галогена, линейную или разветвленную (C_1-C_6)алкильную группу, линейную или разветвленную (C_2-C_6)алкенильную группу, линейную или разветвленную (C_2-C_6)алкинильную группу, линейную или разветвленную (C_1-C_6)полигалоалкил, гидроксигруппу, линейную или разветвленную (C_1-C_6)алкоксигруппу, $-S-(C_1-C_6)$ алкильную группу, цианогруппу, нитрогруппу, алкил(C_0-C_6)- $NR_{11}R_{11}'$, $-O-Su_1$, алкил(C_0-C_6)- Su_1 , алкенил(C_2-C_6)- Su_1 , алкинил(C_2-C_6)- Su_1 , $-O$ -алкил(C_1-C_6)- R_{12} , $-C(O)-OR_{11}$, $-O-C(O)-R_{11}$, $-C(O)-NR_{11}R_{11}'$, $-NR_{11}-C(O)-R_{11}'$, $-NR_{11}-C(O)-OR_{11}'$, алкил(C_1-C_6)- $NR_{11}-C(O)-R_{11}'$, $-SO_2-NR_{11}R_{11}'$, или $-SO_2$ -алкил(C_1-C_6),

или заместители пары (R_6, R_7), когда привиты на два смежных атома углерода, образуют, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, ароматическое или неароматическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которое может содержать от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, подразумевается, что полученное кольцо может быть замещено группой, выбранной из линейной или разветвленной (C_1-C_6)алкильной группы, $-NR_{13}R_{13}'$, алкил(C_0-C_6)- Su_1 или оксо,

R_8 представляет собой атом водорода, линейную или разветвленную (C_1-C_8)алкильную группу, арильную группу, гетероарильную группу, арилалкил(C_1-C_6) группу, или гетероарилалкил(C_1-C_6) группу,

R_9 представляет собой линейную или разветвленную (C_1-C_6)алкильную группу, линейную или разветвленную (C_2-C_6)алкенильную группу, линейную или разветвленную (C_2-C_6)алкинильную группу, $-Su_2$, алкил(C_1-C_6)- Su_2 , алкенил(C_2-C_6)- Su_2 , алкинил(C_2-C_6)- Su_2 , $-Su_2-Su_3$, алкинил(C_2-C_6)- $O-Su_2$, $-Su_2$ -алкил(C_0-C_6)- O -алкил(C_0-C_6)- Su_3 , атом галогена, цианогруппу, $-C(O)-R_{14}$, или $-C(O)-NR_{14}R_{14}'$,

R_{11} и R_{11}' независимо друг от друга представляют собой атом водорода, необязательно замещенную линейную или разветвленную (C_1-C_6)алкильную группу, или алкил(C_0-C_6)- Su_1 ,

или заместители пары (R_{11}, R_{11}') образуют, вместе с атомом азота, к которому они присоединены, ароматическое или неароматическое кольцо, состоящее из 5-7 кольцевых членов, которые могут содержать, дополнительно к атому азота, от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, подразумевается, что данный азот может быть замещен группой, представляющей атом водорода, или линейную или разветвленную (C_1-C_6)алкильную группу и подразумевается, что один или несколько атомов углерода возможных заместителей, могут быть дейтерированы,

R_{12} представляет собой $-Su_5$, $-Su_5$ -алкил(C_0-C_6)- Su_6 , $-Su_5$ -алкил(C_0-C_6)- O -алкил(C_0-C_6)- Su_6 , $-Su_5$ -алкил(C_0-C_6)- NR_{11} -алкил(C_0-C_6)- Su_6 , $-Su_5-Su_6$ - O -алкил(C_0-C_6)- Su_7 , $-C(O)-NR_{11}R_{11}'$, $-NR_{11}R_{11}'$, $-OR_{11}$, $-NR_{11}-C(O)-R_{11}'$, $-O$ -алкил(C_1-C_6)- OR_{11} , $-SO_2-R_{11}$, $-C(O)-OR_{11}$, или $-NH-C(O)-NH-R_{11}$,

R_{13} , R_{13}' , R_{14} и R_{14}' независимо друг от друга представляют собой атом водорода, или необязательно замещенную линейную или разветвленную (C_1-C_6)алкильную группу,

R_{25} представляет собой атом водорода, гидроксигруппу, или гидроксигруппу, алкил(C_1-C_6)алкильную группу,

Su_1 , Su_2 , Su_3 , Su_5 , Su_6 , Su_7 и Su_8 независимо друг от друга представляют собой циклоалкильную группу, гетероциклоалкильную группу, арильную группу или гетероарильную группу,

n представляет собой целое число, равное 0 или 1,

подразумевается, что:

"арил" обозначает фенильную, нафтильную, бифенильную, инданильную или инденильную группу,

"гетероарил" обозначает любую моно- или бициклическую группу, состоящую из 5-10 кольцевых членов, имеющую по меньшей мере один ароматический компонент и содержащую от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота,

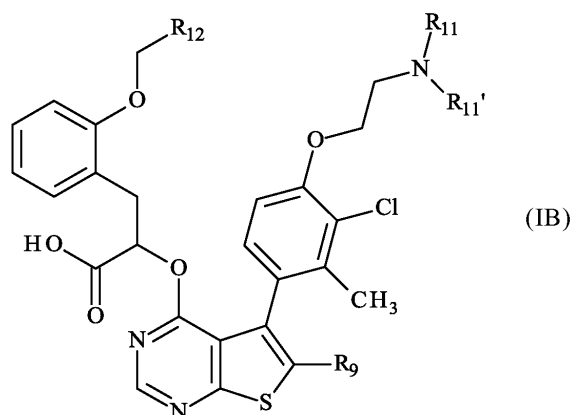
"циклоалкил" обозначает любую моно- или бициклическую неароматическую карбоциклическую группу, содержащую от 3 до 10 кольцевых членов,

"гетероциклоалкил" обозначает любую моно- или бициклическую неароматическую карбоциклическую группу, содержащую от 3 до 10 кольцевых членов, и содержащую от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из кислорода, серы и азота, которая может включать сопряженные, мостиковые или спироциклические системы, представляется возможным для арильных, гетероарильных, циклоалкильных и гетероциклоалкильных групп, определенных таким образом, и алкила, алкенила, алкинила, алкокси, быть замещенными от 1 до 4 групп, выбранных из необязательно замещенного линейного или разветвленного (C_1-C_6)алкила, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкенильной группы, необязательно замещенной линейной или разветвленной (C_2-C_6)алкинильной группы, необязательно замещенного линейного или разветвленного (C_1-C_6)алкокси, необязательно замещенного (C_1-C_6)алкил- S , гидроксид, оксо (или N -оксид, при необходимости), нитро, циано, $-C(O)-OR'$, $-O-C(O)-R'$, $-C(O)-NR'R''$, $-NR'R''$, $-(C=NR')-OR''$, линейного или разветвленного (C_1-C_6)полигалоалкила, трифторметокси, или галогена, подразумевается, что R' и R'' независимо друг от друга представляют собой атом водорода или необязательно замещенную линейную или разветвленную (C_1-C_6)алкильную группу, и подразумевается, что один или несколько атомов углерода предшествующих возможных заместителей, могут быть дейте-

рированы,

или их энантиомеры, диастереоизомеры, атропизомеры, или их соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием, подходящие для одновременного, последовательного или раздельного применения.

Е3. Комбинация в соответствии с Е1 или Е2, где ингибитор Мсl-1 формулы (I) представляет собой формулу (IB):



где R₉, R₁₁, R₁₁' и R₁₂ имеют значения, как описано в Е1 или Е2 выше.

Е4. Комбинация в соответствии с Е1, Е2 или Е3, где ингибитор Мсl-1 формулы (I) представляет собой соединение В: (2R)-2-{{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль.

Е5. Комбинация в соответствии с Е1, Е2 или Е3, где ингибитор Мсl-1 формулы (I) представляет собой Соединение С: (2R)-2-{{[(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль.

Е6. Комбинация в соответствии с Е4, где соединение В вводят внутривенно и Мидостаурин вводят перорально.

Е7. Комбинация в соответствии с любым Е1 - Е6, которая дополнительно содержит по меньшей мере одно дополнительное противораковое средство, например, цитарабин и/или даунорубин.

Е8. Комбинация в соответствии с любым Е1 - Е7, в форме комбинации с нефиксированной дозой.

Е9. Комбинация в соответствии с любым Е1 - Е7, в форме комбинации с фиксированной дозой.

Е10. Комбинация в соответствии с любым Е1 - Е9, для применения в медицине.

Е11. Комбинация в соответствии с любым Е1 - Е9, для применения в соответствии с Е10, где указанное применение предназначено для лечения злокачественного новообразования.

Е12. Комбинация в соответствии с любым Е1 - Е9, для применения в соответствии с Е11, где злокачественное новообразование представляет собой гематологическое злокачественное новообразование.

Е13. Комбинация в соответствии с любым Е1 - Е9, для применения в соответствии с Е12, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз. В частности, острый миелоидный лейкоз присутствует у пациентов, несущих FLT3 мутацию. Более предпочтительно, указанная мутация представляет собой FLT3-ITD.

Е14. Комбинация в соответствии с любым Е4 или Е6 - Е9, для применения в соответствии с любым Е10-Е13, где Мидостаурин и соединение В обеспечены в количествах, которые совместно терапевтически эффективны для лечения злокачественного новообразования.

Е15. Комбинация в соответствии с любым Е4 или Е6 - Е9, для применения в соответствии с любым Е10-Е13, где Мидостаурин и соединение В обеспечены в количествах, которые являются синергетически эффективными для лечения злокачественного новообразования.

Е16. Комбинация в соответствии с любым Е4 или Е6-Е9, для применения в соответствии с любым Е10 - Е13, где Мидостаурин и соединение В обеспечиваются в синергетически эффективных количествах, которые способны уменьшать дозу, необходимую для каждого соединения для лечения злокачественного новообразования, обеспечивая при этом эффективное лечение злокачественного новообразования, с уменьшением побочных эффектов.

Е17. Фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию в соответствии с любым Е1-Е9, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Е18. Применение комбинации в соответствии с любым Е1-Е9, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

Е19. Применение в соответствии с Е18, комбинации в соответствии с любым Е1-Е9, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз. В частности, острый миелоидный лейкоз присутствует у пациентов, несущих FLT3 мутацию. Более предпочтительно, указанная мута-

ция представляет собой FLT3-ITD или FLT3-TKD.

E20. Лекарственное средство, содержащее, отдельно или совместно,

(а) мидостаурин или его фармацевтически приемлемую соль, или его комплекс, или его сокристалл, или его сольват, включая гидрат, и

(б) соединение В: (2R)-2-{{(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил}окси}-3-(2-{{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль,

для одновременного, последовательного или отдельного введения, и где Мидостаурин и соединение В обеспечиваются в эффективных количествах для лечения злокачественного новообразования, в частности АМЛ.

E21. Способ лечения злокачественного новообразования, в частности АМЛ, включающий введение совместно терапевтически эффективного количества

(а) мидостаурина или его фармацевтически приемлемой соли, или его комплекса, или его сокристалла, или его сольвата, включая гидрат, и

(б) соединения В: (2R)-2-{{(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил}окси}-3-(2-{{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановой кислоты, или ее фармацевтически приемлемой соли.

E22. Способ сенсibilизации или лечения пациента, который (I) рефракторный к по меньшей мере одному химиотерапевтическому лечению, или (II) имеет рецидив после лечения с применением химиотерапии, или в обоих случаях (I) и (II), где способ включает введение совместно терапевтически эффективного количества (а) мидостаурина, и (б) ингибитора Мсl-1 формулы (I), как определено в настоящей заявке, указанному пациенту.

E23. соединение В для применения в комбинированной терапии с мидостаурином, для лечения злокачественного новообразования, в частности АМЛ.

E24. Мидостаурин для применения в комбинированной терапии с соединением В, для лечения злокачественного новообразования, в частности АМЛ.

E25. Комбинация для применения, способ или применение, как описано в любом из вариантов осуществления изобретения в данной заявке, для лечения АМЛ, резистентного к предшествующей терапии.

E26. Комбинация для применения, способ или применение, как описано в любом из вариантов осуществления изобретения в данной заявке, для лечения АМЛ, резистентного к одному или нескольким соединениям, выбранным из венетоклакса, децитабина, даунорубицина и цитарабина, в частности венетоклакс.

E27. Комбинация для применения, способ или применение, как описано в любом из вариантов осуществления изобретения в данной заявке, для лечения резистентного к венетоклаксу АМЛ с FLT3-ITD мутацией.

E28. Комбинация для применения, способ или применение, как описано в любом из вариантов осуществления изобретения в данной заявке, для лечения АМЛ с FLT3-TKD мутацией.

E29. Комбинация для применения, способ или применение, как описано в варианте осуществления E28, где указанная FLT3-TKD мутация включает FLT3-D835Y или FLT3-F691 мутацию в пределах домена тирозинкиназы (TKD) из FLT3.

E30. Комбинация для применения, способ или применение, как описано в настоящей заявке, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, присутствующий у пациентов, несущих FLT3-ITD мутацию в присутствии FLT3-TKD мутации.

В другом аспекте, изобретение обеспечивает комбинацию, комбинацию для применения, способ, композицию, лекарственное средство или применение, как описано в настоящей заявке, в частности, содержащую соединение В или соединение С и мидостаурин, где указанное злокачественное новообразование, в частности АМЛ, резистентно к предшествующей противораковой терапии. Такая предшествующая терапия может включать одно или несколько соединений, используемых для лечения злокачественного новообразования, такого как АМЛ, например, венетоклакс, децитабин, даунорубин, и цитарабин, в частности венетоклакс. В одном варианте осуществления, АМЛ, подвергавшийся лечению, является резистентным к венетоклаксу АМЛ, в особенности резистентным к венетоклаксу АМЛ с FLT3-ITD.

В другом варианте осуществления, АМЛ, подвергавшийся лечению, представляет собой АМЛ с FLT3-TKD мутацией. В частности, указанная FLT3-TKD мутация включает FLT3-D835Y или FLT3-F691 мутации в пределах домена тирозинкиназы (TKD) из FLT3. В дальнейшем варианте осуществления, злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, присутствующий у пациентов, несущих FLT3-ITD мутацию в присутствии FLT3-TKD мутации.

В особенности, АМЛ, подвергавшийся лечению, как описано в настоящей заявке, резистентный к лечению с применением ингибитора FLT3.

В другом варианте осуществления обеспечивается способ лечения злокачественного новообразования, в частности АМЛ, включающий введение совместно терапевтически эффективного количества:

(а) мидостаурина или его фармацевтически приемлемой соли, или его комплекса, или его сокристалла, или его сольвата, включая гидрат, и

(б) соединения В: (2R)-2-{{(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановой кислоты, или ее фармацевтически приемлемой соли, или

(в) соединения С: (2R)-2-{{(5S_a)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пирозол-5-ил]метокси}фенил)пропановой кислоты, или ее фармацевтически приемлемой соли.

В дальнейшем варианте осуществления обеспечивается способ лечения злокачественного новообразования, как описано в любом из вариантов осуществления в настоящей заявке, включающий введение совместно терапевтически эффективного количества мидостаурина и соединения В или соединения С.

В фармацевтических композициях в соответствии с изобретением, пропорция активных компонентов по весу (вес активных компонентов по отношению к общему весу композиции) составляет 5-50%.

В качестве фармацевтических композиций в соответствии с изобретением, более специфически используют те, которые являются подходящими для введения пероральным, парентеральным и в особенности внутривенным, через- или транскожным, назальным, ректальным, подъязычным, глазным или респираторным путем, более специфически таблетки, драже, подъязычные таблетки, твердые желатиновые капсулы, таблетки для медленного растворения под языком, капсулы, пастилки, инъекционные препараты, аэрозоли, глазные капли или капли в нос, суппозитории, кремы, мази, кожные гели и др.

В одном варианте осуществления, соединение формулы (I), в частности соединение В, вводят внутривенно, например, используя состав, как описано в WO 2018/078064.

Фармацевтические композиции в соответствии с изобретением могут содержать один или несколько наполнителей или носителей, выбранных из разбавителей, смазывающих веществ, связующих, дезинтеграторов, стабилизаторов, консервантов, абсорбентов, красителей, подсластителей, ароматизаторов и др.

В качестве неограничивающего примера можно указать:

в качестве разбавителей: лактоза, декстроза, сахароза, маннит, сорбит, целлюлоза, глицерин,

в качестве смазывающих веществ: диоксид кремния, тальк, стеариновая кислота и ее магниевая и кальциевая соли, полиэтиленгликоль,

в качестве связующих: алюмосиликат магния, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза и поливинилпирролидон,

в качестве дезинтеграторов: агар, альгиновая кислота и ее натриевая соль, шипучие смеси.

Соединения комбинации могут вводиться одновременно, отдельно или последовательно. Соответствующие фармацевтические композиции могут предоставлять возможность немедленного или отсроченного высвобождения активных компонентов. Соединения комбинации, кроме того, могут вводиться в форме двух отдельных фармацевтических композиций, каждая из которых содержит один из активных компонентов, или в форме единственной фармацевтической композиции, в которой активные компоненты представлены в смеси.

Пригодная схема приема лекарственного средства изменяется в зависимости от пола, возраста и веса тела пациента, пути введения, природы злокачественного новообразования и любых ассоциированных лечений и находится в диапазоне от 25 мг до 1500 мг ингибитора Mcl-1 в неделю, более предпочтительно от 50 мг до 1400 мг в неделю.

Дозировка мидостаурина для лечения AML, который является положительным по FLT3 мутации, составляет 50 мг перорально, два раза в сутки во время еды. Мидостаурин обеспечивается пациенту в комбинации со стандартной индукцией цитарабина и даунорубина и консолидацией цитарабина. Эта доза может быть адаптирована, при необходимости, при комбинированном лечении с применением соединения В.

В одном варианте осуществления, пероральное введение Мидостаурина осуществляется с помощью твердой формы. Дозированная форма мидостаурина представляет собой мягкую желатиновую капсулу с 25 мг лекарственного вещества.

Пример 1. Влияние *in vitro* на активность каспазы 3.7 при комбинировании FLT3 ингибитора соединения А (мидостаурин) с ингибитором Mcl-1 соединением В, в AML клеточных линиях Molm13 и MV-4-11.

Мы оценивали Mcl-1 и FLT3 ингибиторы в качестве монотерапии и в комбинации для определения их способности индуцировать апоптоз (то есть активацию Каспазы 3.7) в лейкемических клетках. Мы использовали две AML клеточные линии с FLT3-ITD мутацией (Molm13 и MV-4-11). Мы тестировали способность соединений А и В активировать каспазу 3.7 в комбинациях и в качестве монотерапии. Соединение А в качестве монотерапии вызывает индукцию активности каспазы с максимальным повышением 33% в Molm13 и 24% в MV-4-11. Соединение В также индуцирует активность каспазы с максимальным повышением 87% в Molm13 и 89% в MV-4-11. Когда оба соединения комбинировали, то наблюдали синергетическую индукцию активности каспазы 3.7. Синергизм наблюдали в обеих клеточных линиях с оценкой синергизма 3,1 в обоих. Сильный синергизм был особенно очевидным при наиболее низких дозах соединения В. Результаты представлены на фиг. 1.

Методы.

Оба соединения растворяли в 100% ДМСО (Sigma, номер по каталогу D2650) при концентрациях

10 мМ и хранили при -20°C до использования. Клеточную линию Molm13, используемую в этом исследовании, получали от Leibniz-Institut DSMZ (ACC 554) и MV-4-11 от Американской коллекции типовых клеток (ATCC® CRL-9591). Клеточные линии культивировали при 37°C в 5 % CO_2 инкубаторе, Molm13 в RPMI (Lonza, 12-702F) и MV-4-11 в IMDM (Hyclone, SH30228.01) среде, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Seradigm, 1500-500). Клетки перевивали два раза в неделю и среду заменяли каждые 2-3 дня.

Активность каспазы 3.7 измеряли с помощью набора Caspase-Glo® 3/7 от Promega (G8092). 9000 клеток/лунку переносили в черные планшеты на 384 лунок с прозрачным дном (Greiner, № 781091) в трех повторах с ростовой средой 30 мкл/лунку. В каждую лунку планшета на 384 лунки добавляли 10 мкл/лунку смеси соединений 4X для лечения в течение 6 ч. Затем в каждую лунку добавляли 30 мкл/лунку реагентов Caspase-Glo® 3/7 на завершающей стадии и записывали люминесценцию на планшет-ридере Envision (Perkin Elmer). Измеренная люминесценция пропорциональна присутствующему количеству активности каспазы.

Для объективной оценки активности каспазы 3.7 при действии комбинации, а также для идентификации синергетического эффекта при всех возможных концентрациях, исследования осуществляли с "матрицей доз". Для этого использовали все возможные комбинации серийных разведений соединения А и соединения В.

"Матрица доз" соединения А и соединения В, состояла из следующего: оба соединения подвергали 1:3 серийному разведению 11 доз с наивысшей дозой 3 мкМ и понижали до отсутствия соединения в контроле. При исследованиях комбинаций, агенты применяли одновременно. Значения люминесцентного сигнала для лечения с применением каждого средства отдельно и комбинации сравнивали с соответствующими значениями нелеченных контролей. Процент активности каспазы 3.7 рассчитывали, используя следующее вычисление: $(1 - \text{контроль/леченное соединением}) \times 100$. Значения процента активности каспазы 3.7 для всех лунок рассчитывали, используя программное обеспечение Chalice (CombinatoRx, Cambridge MA) и Chalice Analyser, как описано в Lehar и др., Nature Biotechnology 2009, 27(7), 659-66. В этом исследовании, данные активности каспазы 3.7 анализировали вместо данных ингибирования роста клеток с аналогичными математическими протоколами. Активность каспазы 3.7 по сравнению с контролем представлена на панели, обозначенной как "Процент активности Каспазы 3.7", и количество активности, превышающее ожидаемое количество, на панели, обозначенной как "Избыточная активность Лёве". Концентрации соединения А представлены в нижней строке слева направо, а возрастающие концентрации соединения В для крайнего левого столбца сверху вниз. Все оставшиеся точки на сетках представляют собой результаты от комбинации двух ингибиторов, которые соответствуют концентрациям отдельных агентов, обозначенным на двух осях. Анализ данных активности каспазы 3.7 осуществляли с использованием Chalice Analyser. Избыточную активность рассчитывали, используя модель синергизма Лёве, в которой определяют влияние на активность каспазы 3.7 к такому, которое ожидали, если бы два лекарственных средства действовали дозо-аддитивным образом. Положительные числа представляют собой площади возрастающего синергизма. Интерпретации оценок синергизма были такими: $SS \sim 0 =$ Дозо-аддитивный, $SS > 1 =$ Слабый Синергизм и $SS > 2 =$ Синергизм.

Пример 2. Комбинация ингибитора Mcl-1 Соединения С и Мидостаурина является синергетической в FLT3-ITD мутированных AML клетках, включая те, которые резистентны к ингибитору Vcl-2 Вентоклаксу и в первичных AML клетках.

Материалы и методы.

Фиг. 2. Комбинированное нацеливание FLT3 и Mcl-1 является эффективным в FLT3-ITD AML первичных образцах.

Анализ жизнеспособности клеток и показатель аддитивности (ПА).

Первичные AML клетки получали от взятых образцов периферической крови, собранных от пациентов в M. D. Anderson Cancer Center с впервые диагностированным или рецидивирующим AML и высоким (>40%) количеством бластных клеток. После Фиколл-очистки, AML бласты (8×10^4 /лунку) высевали в планшеты на 96 лунок в 100 мкл полной RPMI среды, содержащей 10% FBS (Sigma) и $1 \times$ Pen/Strep (Sigma). Мидостаурин и S63845 приготавливали в виде 10 мМ маточных растворов в ДМСО и выдерживали при -80°C до анализов. Каждое лекарственное средство разводили в полной RPMI среде и вводили в виде 4х концентрированного раствора, приготовленного в 50 мкл среды. Контрольные клетки получали 100 мкл среды, содержащей ДМСО (объем ДМСО, соответствующий сумме объемов маточных растворов Мидостаурина и S63845, используемых для приготовления 4х растворов). Клетки инкубировали с лекарственными средствами, используемыми отдельно или в комбинации в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа люминесценции CellTiter-Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки осторожно смешивали путем пипетирования и 35 мкл клеточной суспензии переносили в белые непрозрачные планшеты на 96 лунок. После этого, в каждую лунку добавляли 80 мкл CellTiter-Glo реагента, разведенного при 1:3 в PBS, и клетки инкубировали в течение 30 минут в темноте на встряхивателе для планшетов. Люминесценцию записывали, используя TeKan планшет-ридер (Infinite m200 pro). Анализ комбинированных эффектов лекарственных средств осуществ-

вляли, используя показатель аддитивности (ПА), рассчитанный с помощью программного обеспечения CalcuSyn (BioSoft, Ferguson, MO, USA). $PA < 1$, 1 и > 1 указывает на синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно.

Фиг. 3А/3В. Мидостаурин индуцирует накопление BIM, которое способствует летальности Mxdostaurin/S63845 (соединение С).

Вестерн-блоттинг.

Клетки (3×10^6 /лунку) высевали в планшет на 6 лунок в 5 мл полной RPMI среды и подвергали воздействию Мидостаурина и S63845, которые вводили отдельно или в комбинации. Контрольные клетки получали ДМСО. Клетки инкубировали в течение 6 ч и затем собирали, два раза промывали в PBS и лизировали в RIPA буфере (ThermoFisher Scientific), дополненном коктейлем 1x ингибиторов протеазы и фосфатазы (ThermoFisher Scientific). Лизаты выдерживали на льду в течение 20 мин с вихревым перемешиванием каждые 5 минут, затем в течение короткого периода времени обрабатывали ультразвуком и центрифугировали при 13500 об./мин. в течение 15 минут. Супернатант собирали и содержание белка измеряли с помощью BSA анализа. Клеточные лизаты (30-50 мкг белка на лунку) разделяли путем электрофореза на 4%-20% градиенте заранее приготовленных додецилсульфат натрия-полиакриламидных гелей (Bio-Rad, Hercules, CA) и переносили на PVDF мембрану (Bio-Rad). Мембраны сначала инкубировали в Odyssey блокирующем буфере (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) в течение 1 часа для блокирования неспецифического белкового связывания, затем с первичным антителом в течение ночи при 4°C, промывали с помощью TBST три раза, и инкубировали с IRDye-конъюгированным вторичным антителом (разведение 1:15000) в течение 1 часа при комнатной температуре. Мембраны сканировали, используя Odyssey Imaging System (Li-Cor).

Фиг. 4. Комбинированное нацеливание FLT3 и Mcl-1 облегчает апоптоз.

Анализ активности каспазы 3/7 для определения апоптоза.

AML клетки или AML первичные бластные клетки (3×10^6 /лунку) высевали в планшет на 6 лунок в 5 мл полной RPMI среды и подвергали воздействию мидостаурина и S63845, которые вводили отдельно или в комбинации. Контрольные клетки получали ДМСО. Клетки инкубировали в течение 6 ч и затем 100 мкл клеточной суспензии переносили в белый непрозрачный планшет на 96 лунок, смешивали с 100 мкл реагента Caspase-Glo3/7 (Promega) и инкубировали в темноте в течение 30 минут на встряхивателе для планшетов при комнатной температуре. Люминесценцию записывали, используя Tecan планшет-ридер (Infinite m200 pro). Изменения активности каспазы-3/7 после лечения с применением лекарственных средств нормировали в ДМСО отдельно. Оставшиеся клетки использовали для вестерн-блоттинга.

Фиг. 5. Комбинированное нацеливание FLT3 и Mcl-1 облегчает апоптоз.

Анализ аннексин-V/DAPI.

AML бластные клетки (8×10^5 /лунку) высевали в круглодонные планшеты на 96 лунок в 100 мкл полной RPMI среды, содержащей 10% FBS (Sigma) и 1x Pen/Strep (Sigma). Мидостаурин и S63845 разводили в полной RPMI среде и вводили в виде 4x концентрированного раствора, приготовленного в 50 мкл среды. Контрольные клетки получали 100 мкл среды, содержащей ДМСО (объем ДМСО соответствовал сумме объемов маточных растворов Мидостаурина и S63845, используемых для приготовления 4x растворов). Клетки инкубировали с лекарственными средствами, которые вводили отдельно или в комбинации в течение 24 ч. На следующий день, планшеты с клетками центрифугировали при 1500 об./мин. в течение 5 минут. После этого, клетки промывали один раз в PBS и ресуспендировали в 100 мкл Аннексин-V связывающего буфера, содержащего 0,3 мкл Аннексин-V-APC (BD Bioscience) и 5 мкл DAPI (2 мкг/мл). Клетки окрашивали в темноте в течение 20 мин, дополняли с помощью дополнительных 100 мкл Аннексин-V связывающего буфера и анализировали с применением BD LRSII проточного цитометра (Becton Dickinson). Аннексин-V-APC положительные клетки идентифицировали, используя FlowJo программное обеспечение (LLC, Ashland, Oregon, USA).

Фиг. 6. Антилейкемический синергизм S63845 (соединение С) и FLT3 TKi.

Анализ жизнеспособности клеток.

MV4-11 FLT3-ITD^{+/+} и MOLM13 FLT3-ITD^{+/n} AML клетки (8×10^5 /лунку) высевали в планшеты на 96 лунок в 100 мкл полной RPMI среды, содержащей 10 % FBS (Sigma) и 1x Pen/Strep (Sigma). Мидостаурин и S63845 разводили в полной RPMI среде и вводили в виде 4x концентрированного раствора, приготовленного в 50 мкл среды. Контрольные клетки получали 100 мкл среды, содержащей ДМСО (объем ДМСО соответствовал сумме объемов маточных растворов мидостаурина и S63845, используемых для приготовления 4x растворов). Клетки инкубировали с лекарственными средствами, которые вводили отдельно или в комбинации в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью CellTiter-Glo люминесцентного анализа (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки осторожно смешивали путем пипетирования и 35 мкл клеточной суспензии переносили в белые непрозрачные планшеты на 96 лунок. После этого, в каждую лунку добавляли 80 мкл реагента CellTiter-Glo, разведенного при 1:3 в PBS, и клетки инкубировали в течение 30 минут в темноте на встряхивателе для планшетов. Люминесценцию записывали, используя Tecan планшет-ридер (Infinite

m200 pro). Осуществляли анализ комбинированных эффектов лекарственных средств, используя показатель аддитивности (ПА), рассчитанный с помощью программного обеспечения CalcuSyn (BioSoft, Ferguson, MO, USA). ПА < 1, 1 и > 1 указывал на синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно.

Фиг. 7 и 8. Антилейкемический синергизм S63845 и FLT3 TKi.

Анализ жизнеспособности клеток и BLISS индекс.

MV4-11 FLT3-ITD^{+/+} клетки (8×10^5 /лунку) высевали в планшеты на 96 лунок в 100 мкл полной RPMI среды, содержащей 10% FBS (Sigma) и 1x Pen/Strep (Sigma). Мидостаурин и S63845 разводили в полной RPMI среде и вводили в виде 4x концентрированного раствора, приготовленного в 50 мкл среды. Клетки обрабатывали в течение 24 ч с применением девяти 2-х кратных серийных разведений каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке. Измеряли рост клеток, жизнеспособность измеряли с помощью CellTiter-Glo люминесцентного анализа (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки осторожно смешивали путем пипетирования и 35 мкл клеточной суспензии переносили в белые непрозрачные планшеты на 96 лунок. После этого, в каждую лунку добавляли 80 мкл реагента CellTiter-Glo, разведенного при 1:3 в PBS, и клетки инкубировали в течение 30 минут в темноте на встряхивателе для планшетов. Люминесценцию записывали, используя Tekan планшет-ридер (Infinite m200 pro). Рост клеток выражали в виде % клеток, обработанных ДМСО. Синергетические взаимодействия оценивали, используя модель независимости BLISS. Значения BLISS индекса для каждой дозы комбинации > 0 представляют собой синергизм, в то время как значения BLISS индекса < 0 представляют собой антагонизм.

Фиг. 9. Мидостаурин повышает митохондриальное праймирование для апоптоза в FLT3-ITD клетках, подвергнутых воздействию S63845.

Динамическое ВНЗ профилирование.

ВНЗ профилирование осуществляли в черных планшетах на 384 лунки в соответствии с методом A. Letai (<https://letailab.dana-farber.org/bh3-profiling.html>). Вкратце, клетки (3×10^6 /лунку) высевали в планшет на 6 лунок в 5 мл полной RPMI среды и подвергали воздействию Мидостаурина и S63845, которые вводили отдельно или в комбинации. Контрольные клетки получали ДМСО. Клетки инкубировали в течение 6 ч, собирали, два раза промывали в PBS и ресуспендировали в МEB буфере (150 мМ маннит, 10 мМ HEPES-КОН pH 7,5, 150 мМ KCl, 1 мМ EGTA, 1 мМ EDTA, 0,1 % BSA, 5 мМ сукцинат) при конечной плотности 1×10^6 /мл. Клетки (15 мкл) добавляли в планшет на 384 лунки, содержащий пептиды/ВНЗ миметики и 15 мкл 0,002% дигитонина в МEB буфере. Клетки инкубировали в течение 1 часа в 25°C и после этого фиксировали в 10 мкл 4% формальдегида в PBS в течение 10 минут. Для остановки фиксации, добавляли 10 мкл N2 буфера (1,7М Tris, 1,25М Глицин pH 9,1) и клетки оставляли при комнатной температуре в течение 5 минут. После этого, клетки смешивали с 10 мкл 10x CytoC окрашивающего буфера (10% BSA, 2% Tween20 в PBS), содержащего антитело к цитохрому C (Клон 6H2.B4, меченный флуоресцентной меткой, BioLegend) при разведении 1:40 и окрашивали в течение ночи при 4°C. Высвобождение цитохрома C измеряли с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 10, 11, 12 и 13. Комбинация S63845 и мидостаурина является эффективной в резистентных к венетоклаксу AML клетках с FLT3-ITD, но не в FLT3-WT. Анализ жизнеспособности клеток и BLISS индекс в резистентных к венетоклаксу AML клетках.

Резистентные к венетоклаксу клеточные линии (MOLM13 FLT3-ITD^{+/+} и OCI-AML3 FLT3-WT), создавали путем подвешивания клеток воздействию последовательно возрастающих концентраций венетоклакса. Клетки подвешивали общепринятым образом в полной RPMI среде, содержащей 1 мкМ венетоклакса. За 24 ч до тестирования влияния комбинации мидостаурина и S63845 на жизнеспособность клеток, клетки культивировали в RPMI среде, не содержащей венетоклакс. После этого резистентные к венетоклаксу клетки и их родительские аналоги высевали в планшеты на 96 лунок в 100 мкл полной RPMI среды, содержащей 10% FBS (Sigma) и 1x Pen/Strep (Sigma). Мидостаурин и S63845 разводили в полной RPMI среде и вводили в виде 4x концентрированного раствора, приготовленного в 50 мкл среды. Клетки обрабатывали в течение 24 ч с применением девяти 2-х кратных серийных разведений каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке. Измеряли рост клеток, жизнеспособность измеряли с помощью CellTiter-Glo люминесцентного анализа (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки осторожно смешивали путем пипетирования и 35 мкл клеточной суспензии переносили в белые непрозрачные планшеты на 96 лунок. После этого, в каждую лунку добавляли 80 мкл реагента CellTiter-Glo, разведенного при 1:3 в PBS, и клетки инкубировали в течение 30 минут в темноте на встряхивателе для планшетов. Люминесценцию записывали, используя Tekan планшет-ридер (Infinite m200 pro). Рост клеток выражали в виде % клеток, обработанных ДМСО. Синергетические взаимодействия оценивали, используя модель независимости BLISS. Значения BLISS индекса для каждой дозы комбинации > 0 представляют собой синергизм, в то время как значения BLISS индекса < 0 представляют собой антагонизм.

Фиг. 14. Предварительное исследование in vivo: AML FLT3-ITD ксенотрансплантат.

AML-PDX модель.

Для AML-PDX модели, самок мышей NSG (возраст 6 недель, The Jackson Laboratory) облучали

200 сГр и в/в инъецировали AML-PDX (1×10^6 клеток/100 мкл). Периферическую кровь собирали один раз в неделю путем отбора из ретроорбитального синуса и обрабатывали для изменения hCD45 клеток с помощью проточной цитометрии, для подтверждения того, что развилась лейкемия. Когда прививание лейкемии достигло 2-10%, мышей разделяли на группы для лечения с применением наполнителя, мидостаурина (75 мг/кг, один раз в день с помощью желудочного зонда), S63845 (40 мг/кг в/в один раз в неделю) или комбинации. Один раз в две недели собирали периферическую кровь путем отбора из ретроорбитального синуса и обрабатывали для измерения лейкоцитарной нагрузки (hCD45 клетки) путем проточной цитометрии.

Эксперименты, представленные на фиг. 2-14, свидетельствуют о том, что комбинация ингибитора Mcl-1 Соединения С и мидостаурина является синергетической в FLT3-ITD мутированных AML клетках, включая те клетки, которые резистентны к ингибитору Bcl-2 венетоклаксу и в первичных AML клетках. Увеличенные уровни Vim и повышенное митохондриальное примирование в ответ на hVIM пептид после воздействия мидостаурина свидетельствует о том, что Vim может играть функциональную роль в опосредованной мидостаурин/S63845 летальности.

Пример 3. Анализ жизнеспособности клеток и BLISS индекса для Va/F3 FLT3-ITD и FLT3-D835Y клеток.

Мышиные Va/F3 FLT3-ITD и FLT3-D835Y клетки (8×10^5 /лунку) высевали в планшеты на 96 лунок в 100 мкл полной RPMI среды, содержащей 10% FBS (Sigma) и 1x Pen/Strep (Sigma). Мидостаурин и S63845 разводили в полной RPMI среде и вводили в виде 4x концентрированного раствора, приготовленного в 50 мкл среды. Контрольные клетки получали 100 мкл среды, содержащей ДМСО (объем ДМСО соответствовал сумме объемов маточных растворов Мидостаурина и S63845, используемых для приготовления 4x растворов). Клетки инкубировали с лекарственными средствами, которые вводили отдельно или в комбинации в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью CellTiter-Glo люминесцентного анализа (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки осторожно смешивали путем пипетирования и 35 мкл клеточной суспензии переносили в белые непрозрачные планшеты на 96 лунок. После этого, в каждую лунку добавляли 80 мкл реагента CellTiter-Glo, разведенного при 1:3 в PBS, и клетки инкубировали в течение 30 минут в темноте на встряхивателе для планшетов. Люминесценцию записывали, используя Tecan планшет-ридер (Infinite m200 pro). Осуществляли анализ комбинированных эффектов лекарственных средств, используя показатель аддитивности (ПА), рассчитанный с помощью программного обеспечения CalcuSyn (BioSoft, Ferguson, MO, USA). ПА < 1, 1 и > 1 указывал на синергизм, аддитивный эффект и антагонизм, соответственно.

Результаты.

На фиг. 15 и 16 представлены синергетические взаимодействия между S63845 и мидостаурином в мышинных Va/F3 FLT3-ITD клетках, определенные с помощью синергизма лекарственных средств на модели независимости увеличенного размера BLISS. Клетки обрабатывали с применением девяти 2-х кратных серийных разведений каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке. Рост клеток оценивали через 24 ч (тепловая карта, левая панель). Значения BLISS индекса для каждой дозы комбинации > 0 представляют собой синергизм, в то время как значения BLISS индекса < 0 представляют собой антагонизм.

На фиг. 17 и 18 представлены синергетические взаимодействия между S63845 и мидостаурином в мышинных Va/F3 FLT3-D835Y клетках, определенных с помощью синергизма лекарственных средств на модели независимости увеличенного размера BLISS. Клетки обрабатывали с применением девяти 2-кратных серийных разведений каждого соединения, либо индивидуально или во всех возможных комбинациях в шахматном порядке. Рост клеток оценивали через 24 ч (тепловая карта, левая панель). Значения BLISS индекса для каждой дозы комбинации > 0 представляют собой синергизм, в то время как значения BLISS индекса < 0 представляют собой антагонизм.

Комбинация S63845 и Мидостаурин проявляет хорошо выраженный синергизм в мышинных Va/F3 клетках, экспрессирующих либо FLT3-ITD или FLT3-D835Y точечные мутации в пределах домена тирозинкиназы (TKD) из FLT3. Последнее наблюдение свидетельствует о том, что комбинация S63845/мидостаурин может обеспечивать существенную эффективность в FLT3-ITD мутантах даже в присутствии FLT3 TKD мутаций, что было клинически показано для придания резистентности к лечению с применением FLT3 ингибитора.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая комбинация

(а) мидостаурина, или его фармацевтически приемлемой соли, или его комплекса, или его сокристалла, или его сольвата, включая гидрат, и

(б) ингибитора Mcl-1, который представляет собой соединение В: (2R)-2-{{(5Sa)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил}окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту, или соединение С: (2R)-2-{{(5S_a)-5-

{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту, или их энантиомеры, диастереоизомеры, атропизомеры, или их соли присоединения с фармацевтически приемлемой кислотой или основанием,

для одновременного, последовательного или раздельного применения.

2. Фармацевтическая комбинация по п.1, где ингибитор Mcl-1 формулы (I) представляет собой соединение В: (2R)-2-{{(5S_α)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(4-фторфенил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[2-(2-метоксифенил)пиримидин-4-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль.

3. Фармацевтическая комбинация по п.1, где ингибитор Mcl-1 формулы (I) представляет собой соединение С: (2R)-2-{{(5S_α)-5-{3-хлор-2-метил-4-[2-(4-метилпиперазин-1-ил)этокси]фенил}-6-(5-фторфуран-2-ил)тиено[2,3-d]пиримидин-4-ил]окси}-3-(2-{[1-(2,2,2-трифторэтил)-1H-пиразол-5-ил]метокси}фенил)пропановую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль.

4. Фармацевтическая комбинация по п.2, где соединение В вводят внутривенно и мидостаурин вводят перорально.

5. Фармацевтическая комбинация по одному из пп.1-4, которая дополнительно содержит по меньшей мере одно дополнительное противораковое средство, например цитарабин и/или даунорубин.

6. Фармацевтическая комбинация по одному из пп.1-5, в форме комбинации с нефиксированной дозой.

7. Применение фармацевтической комбинации по одному из пп.1-6, для применения в медицине.

8. Применение фармацевтической комбинации по одному из пп.1-6, для лечения злокачественного новообразования.

9. Применение по п.8, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз.

10. Применение по п.9, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, присутствующий у пациентов, несущих FLT3 мутацию.

11. Применение по п.10, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, присутствующий у пациентов, несущих FLT3-ITD мутацию.

12. Применение по п.10, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, присутствующий у пациентов, несущих FLT3-TKD мутацию.

13. Применение по п.12, где указанная FLT3-TKD мутация включает FLT3-D835Y или FLT3-F691 мутации в пределах домена тирозинкиназы (TKD) из FLT3.

14. Применение по одному из пп.8-13, где злокачественное новообразование резистентно к предшествующей терапии.

15. Применение по п.14, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, резистентный к одному или нескольким соединениям, выбранным из венетоклакса, децитабина, даунорубина и цитарабина.

16. Применение по п.15, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, резистентный к венетоклаксу.

17. Применение по п.11, где указанное злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, присутствующий у пациентов, несущих FLT3-ITD мутацию, и указанное злокачественное новообразование резистентно к венетоклаксу.

18. Применение по одному из пп.7-17, где мидостаурин и соединение В обеспечены в количествах, которые являются синергетически эффективными для лечения злокачественного новообразования.

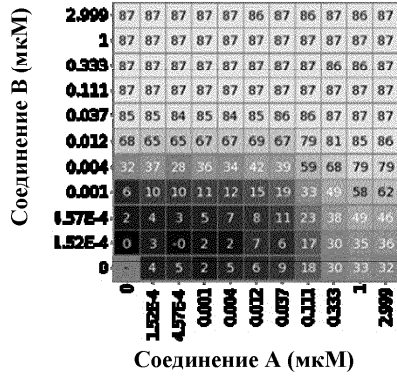
19. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтическую комбинацию по одному из пп.1-6, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

20. Применение фармацевтической комбинации по одному из пп.1-6 для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

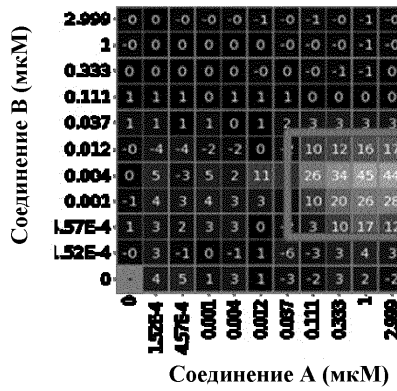
21. Применение по п.10, где злокачественное новообразование представляет собой острый миелоидный лейкоз, присутствующий у пациентов, несущих FLT3-ITD мутацию в присутствии FLT3-TKD мутации.

MOLM-13

Процент активности Каспазы3.7

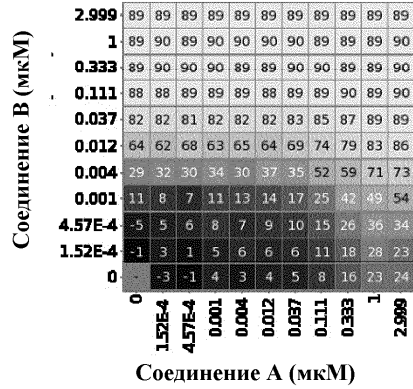


Избыточная активность Лёве

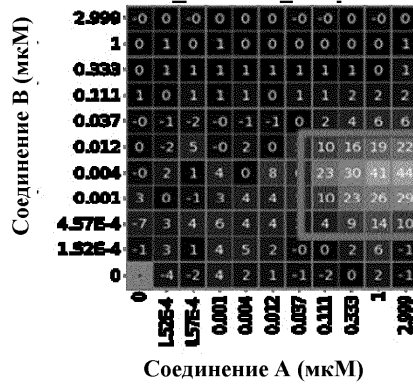


MV-4-11

Процент активности Каспазы3.7



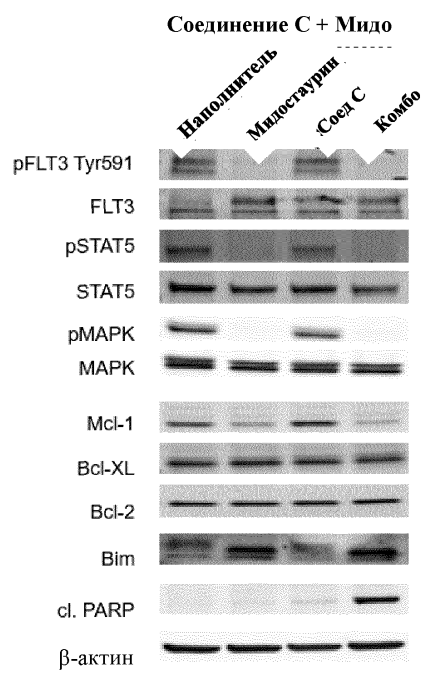
Избыточная активность Лёве



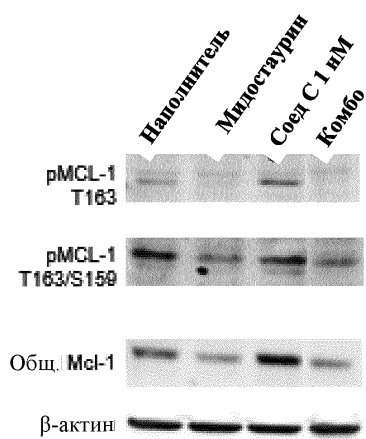
Фиг. 1

ИД образца пациента	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18
Соед С IC ₅₀ (нМ)	2,0	13,7	148	14,2	0,3	34,5	72,2	5,3	61,5	6,3	40,6	218	36,1	11,0	59,8	75,7	70,5	22,5
Соед С + Мидостаурин IC ₅₀ (нМ)	0,7	18,7	36,5	3,8	0,1	18,8	148,1	2,8	6,2	2,2	24,7	15,1	29,8	4,0	6,0	45,4	72,7	6,2
Усредненный ПА	0,3	2,5	0,2	0,3	0,4	0,6	>1	0,4	0,1	0,2	0,9	0,6	4,1	0,7	0,1	0,8	1,3	0,3
FLT3 WT																		
FLT3 ITD																		
FLT3 p.A680V																		
FLT3 p.D835																		
<i>BCOR</i>																		
<i>BCOR1</i>																		
<i>PTPN11</i>																		
<i>ASXL1</i>																		
<i>ASXL2</i>																		
<i>JAK2</i>																		
<i>MPL</i>																		
<i>ETNK1</i>																		
<i>DNMT3A</i>																		
<i>NMP1</i>																		
<i>RUNX1</i>																		
<i>SETBP1</i>																		
<i>WT1</i>																		
<i>NOTCH1</i>																		
<i>TET2</i>																		
<i>IDH1</i>																		
<i>IDH2</i>																		
<i>U2AF1</i>																		
<i>SF3B1</i>																		
<i>TP53</i>																		
<i>EVT6</i>																		
<i>NF1</i>																		
<i>IKZF1</i>																		
<i>NRAS</i>																		
<i>SRSF2</i>																		
<i>STAG2</i>																		
<i>CSF3R</i>																		
<i>SMC1A</i>																		
<i>EZH2</i>																		
<i>GATA2</i>																		
<i>CREBBP</i>																		
<i>CBLB</i>																		

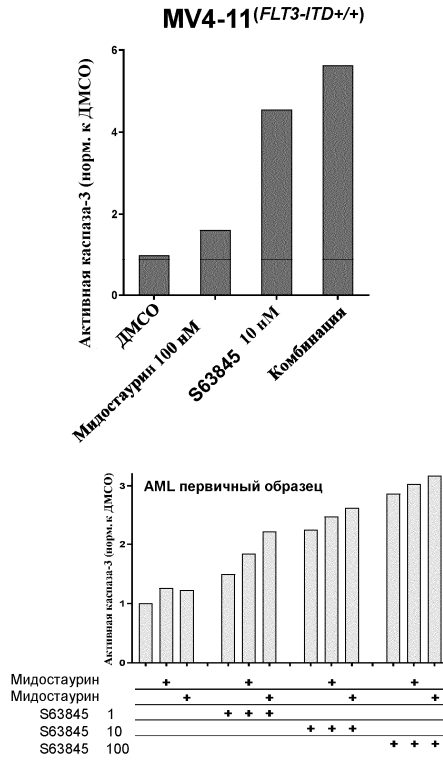
Фиг. 2



Фиг. 3А

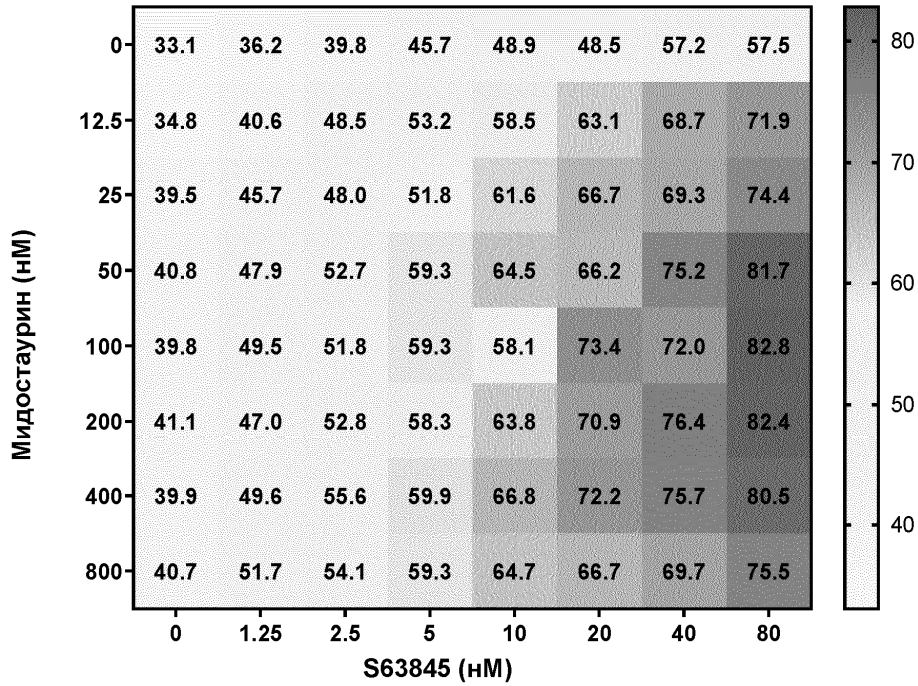


Фиг. 3В



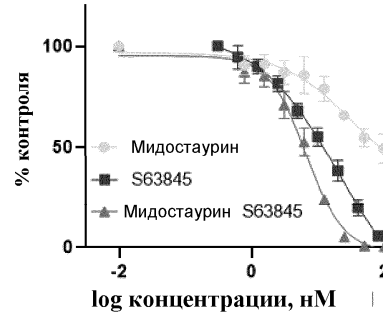
Фиг. 4

Аннексин-V-APC положительные первичные AML клетки

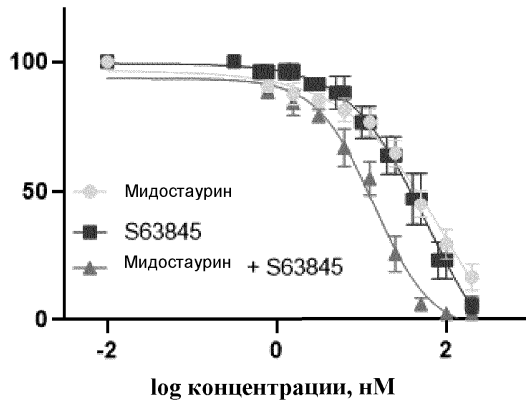


Фиг. 5

Соединение	IC ₅₀ (нМ)	
	MV4-11	MOLM13
	FLT3-ITD ^{+/+}	FLT3-ITD ^{-/-}
Соединение С	8,1	21,3
Мидостаурин	101,9	47,6

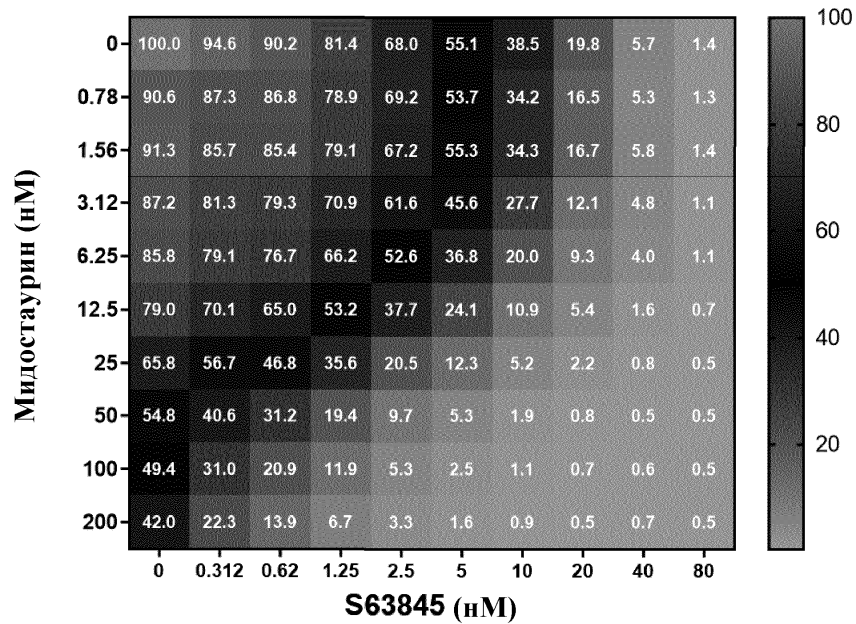


Комбинация	Усредненный ПА	
	MV4-11	MOLM13
	FLT3-ITD ^{+/+}	FLT3-ITD ^{-/-}
Соединение С + Мидостаурин	0,41 (1:2,5)	0,35 (1:2,5)

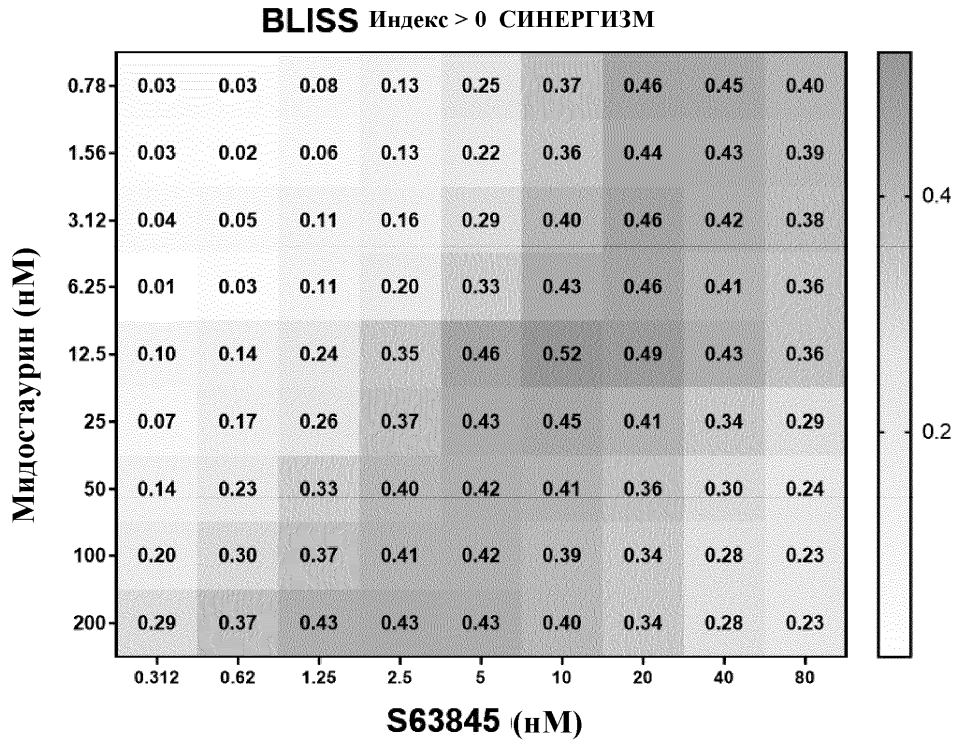


Фиг. 6

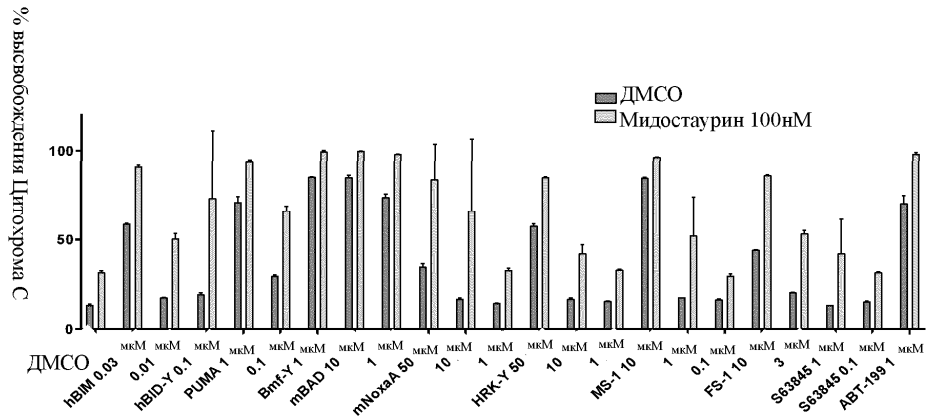
Рост клеток (% от контроля)



Фиг. 7



Фиг. 8

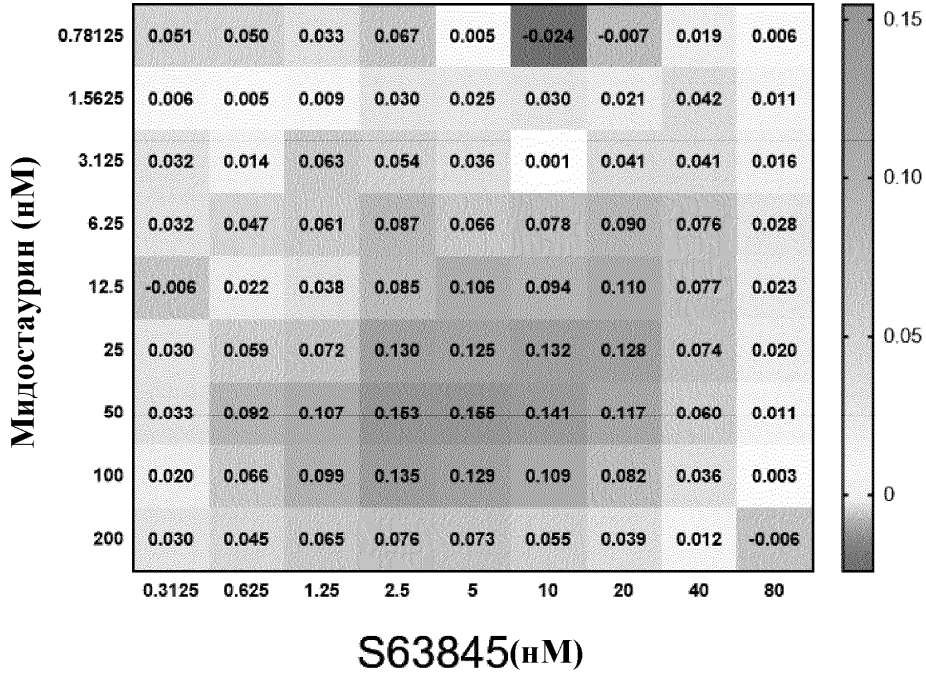


Фиг. 9

MOLM13(FLT3-ITD-/+)

родительский

S63845 IC₅₀ = 17 нМ

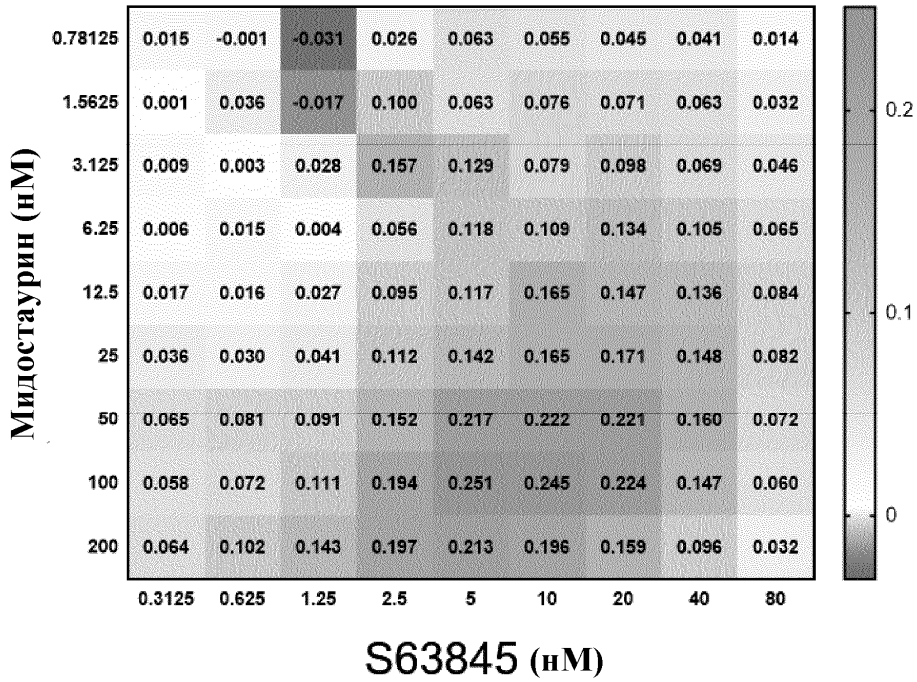


Фиг. 10

MOLM13(FLT3-ITD-/+)

Резистентные к Венетоклаксу

S63845 IC₅₀ = 30 нМ

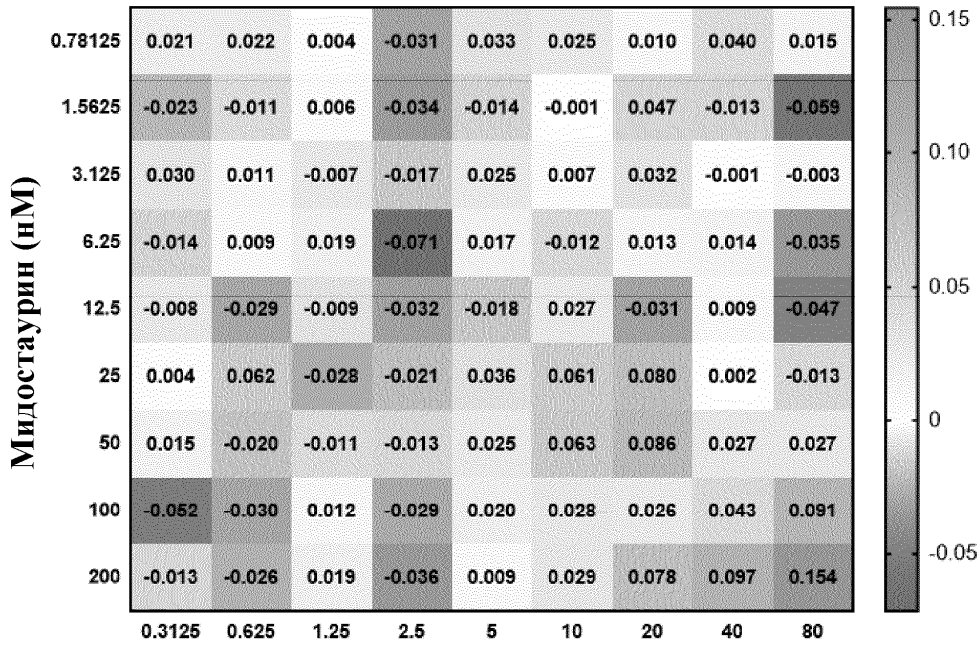


Фиг. 11

OCI-AML3^(FLT3-WT)

родительский

S63845 IC₅₀ >100 нМ

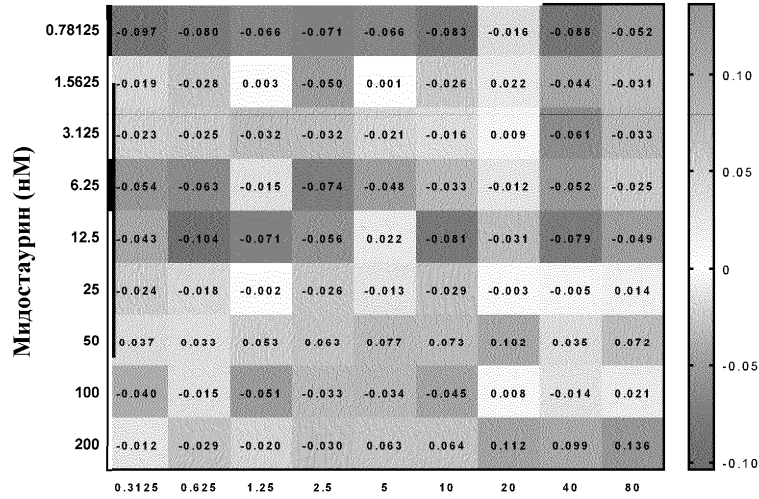


S63845 (нМ)

Фиг. 12

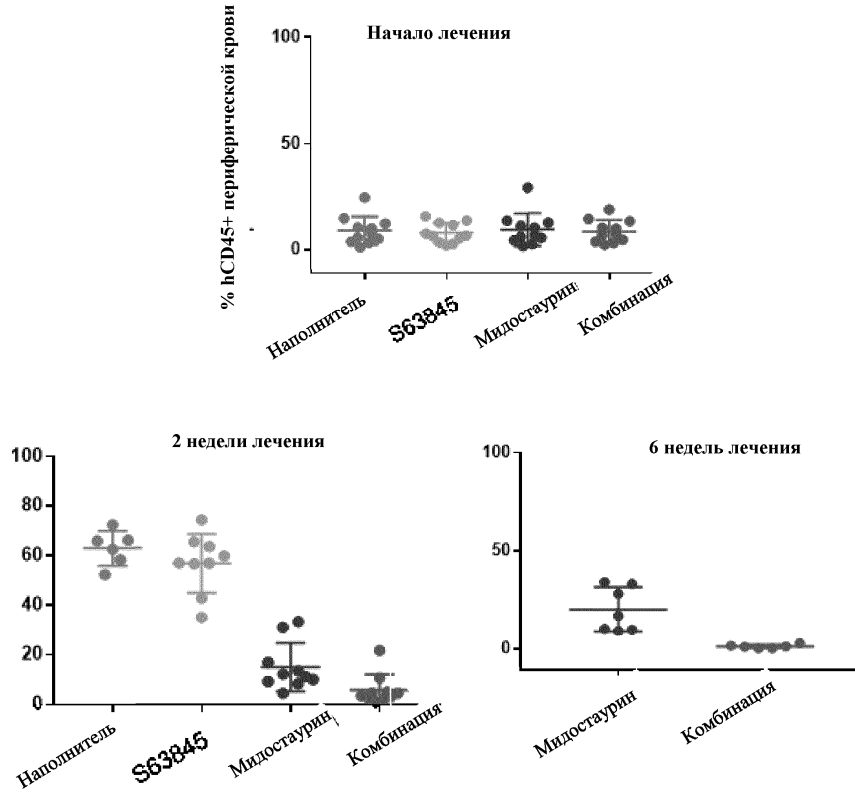
OCI-AML3^(FLT3-WT)

Резистентные к Венетоклаксу **S63845 IC₅₀ > 100 нМ**



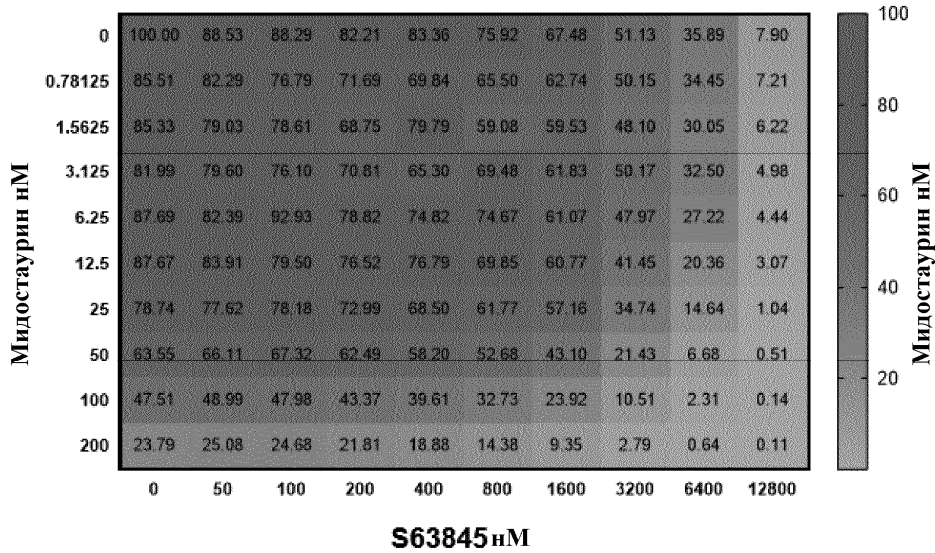
S63845(нМ)

Фиг. 13



Фиг. 14

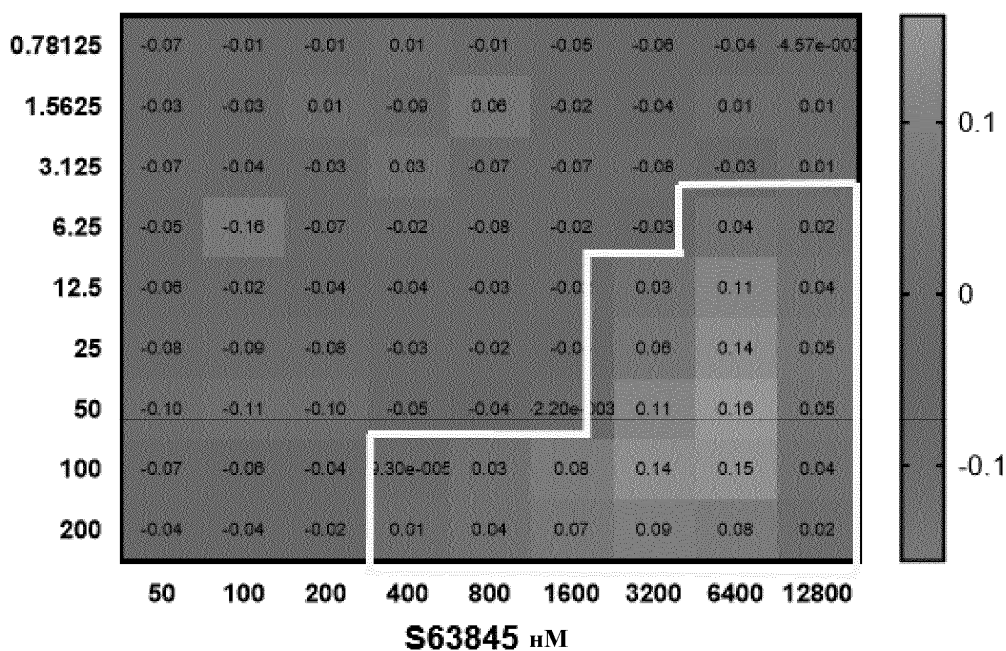
Синергетический эффект Мидостаурина и S63845 в мышиных Ba/F3 FLT3-ITD клетках
Жизнеспособность клеток (% от контроля)



Фиг. 15

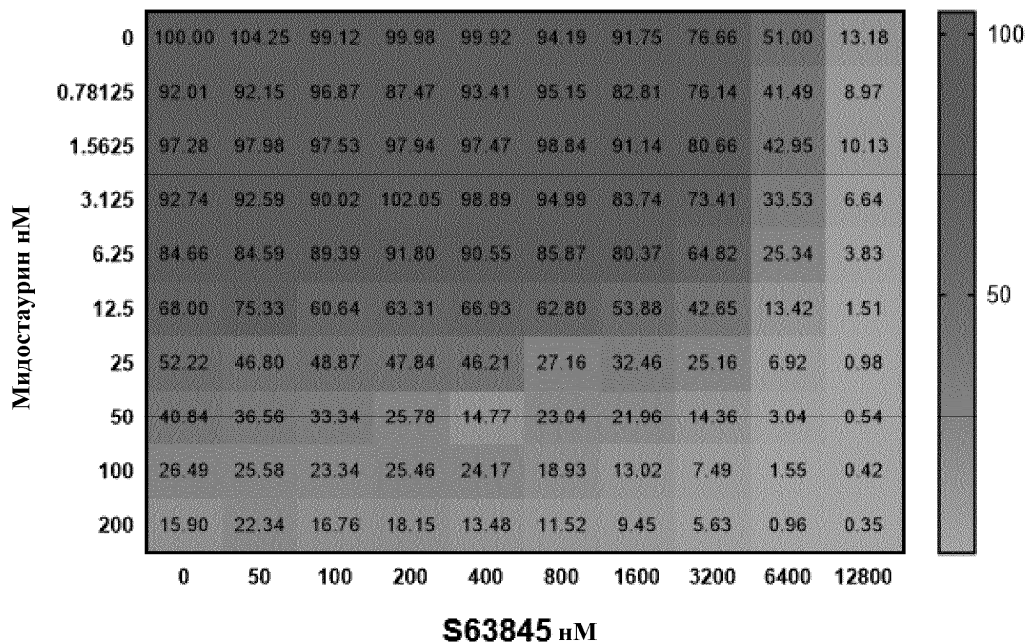
Синергетический эффект Мидостаурина и S63845 в мышинных Ва/3 FLT3-ITD клетках

BLISS индекс



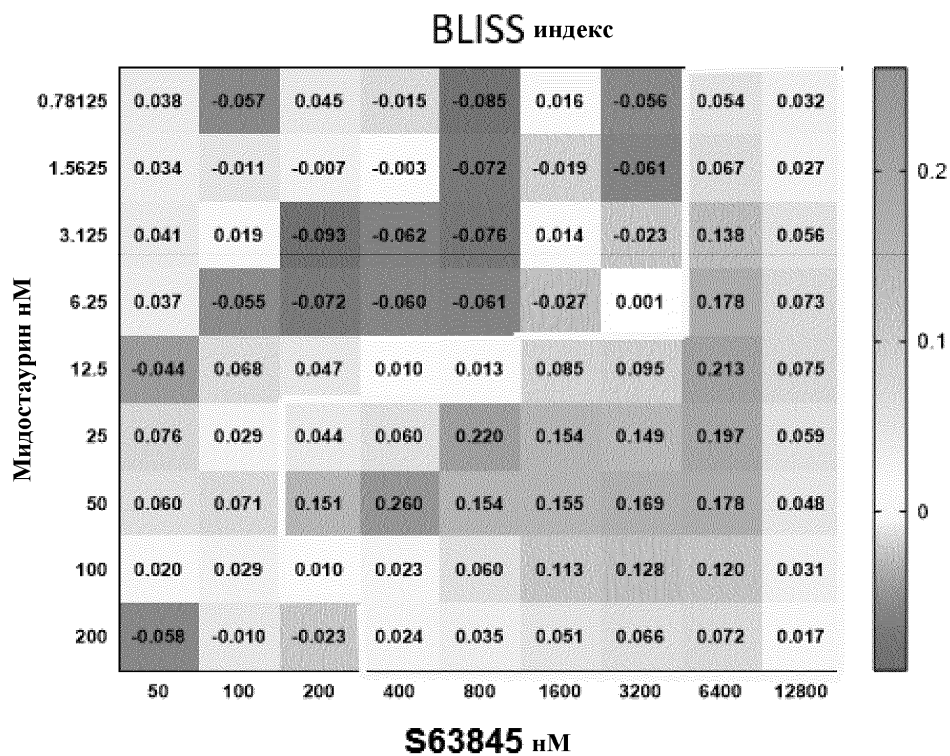
Фиг. 16

Синергетический эффект Мидостаурина и S63845 в мышинных Ва/3 FLT3-D835Y клетках
Жизнеспособность клеток (% от контроля)



Фиг. 17

Синергетический эффект Мидостаурина и S63845 в мышинных Ва/F3 FLT3-D835Y клетках



Фиг. 18



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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