

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292409 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.18

(22) Дата подачи заявки
2021.03.22

(51) Int. Cl. *A61K 31/5395* (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ИНГИБИТОРОМ МУТАНТНОГО IDH

(31) 62/993,254; 63/024,713; 63/053,875

(32) 2020.03.23; 2020.05.14; 2020.07.20

(33) US

(86) PCT/US2021/023436

(87) WO 2021/194946 2021.09.30

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

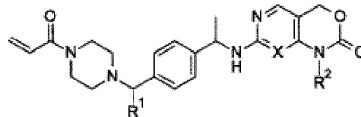
(72) Изобретатель:

Брукс Нейтан Артур, Гилмоур
Рэймонд (US)

(74) Представитель:

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

(57) Изобретение относится к комбинированной терапии (а) ингибитором мутантного IDH, имеющим формулу I, и (b) одним или более из антимаетаболита, гипометилирующего агента и ингибитора мутантного Flt3 (Flt3) для лечения рака.



202292409
A1

202292409

A1

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ИНГИБИТОРОМ МУТАНТНОГО IDH

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии ингибитором мутантной изоцитратдегидрогеназы (IDH) и одним или более из антиметаболита, гипометилирующего агента и ингибитора мутантной FMS-подобной тирозинкиназы 3 (Flt3) для лечения рака.

IDH1 и IDH2 представляют собой ферменты, катализирующие превращение изоцитрата в α -кетоглутарат и восстанавливающие никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ⁺) до НАДФ (Megias-Vericat J, *et al.*, *Blood Lymph. Cancer: Targets and Therapy* 2019; 9: 19-32).

Неоморфные (*de novo*) мутации в IDH1, например, в аминокислотном остатке R132 в IDH1, вносят вклад в онкогенез при некоторых видах рака, включая раковые заболевания в виде солидных опухолей и гематологические злокачественные заболевания (Badur MG, *et al.*, *Cell Reports* 2018; 25: 1680). Мутации IDH1 могут приводить к высоким уровням 2-гидроксиглутарата (2-HG), который ингибирует клеточную дифференцировку, а ингибиторы мутантного IDH1 могут снижать уровни 2-HG, что способствует клеточной дифференцировке (Molenaar RJ, *et al.*, *Oncogene* 2018; 37: 1949-1960). Мутации также имеют место в IDH2, например, в аминокислотных остатках R172, R140 и R172 (Yang H, *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 2012; 18: 5562-5571; Mondesir J, *et al.*, *J. Blood Med.* 2016; 7: 171-180).

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

Индукционная химиотерапия цитарабином и антрациклином («7 + 3») уже более 4 десятилетий является стандартом лечения пациентов с впервые диагностированным ОМЛ.

За последние годы еще пять лекарственных средств были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для лечения ОМЛ: мидостаурин, энаседениб, CPX-351, гемтузумаб озогамицин (Bloomfield CD, *et al.*, *Blood Revs.* 2018; 32: 416-425) и ивосидениб (Megias-Vericat J, *et al.*, *Blood Lymph. Cancer: Targets and Therapy* 2019; 9: 19-32).

Можно ожидать, что примерно от 60% до 70% взрослых с ОМЛ достигнут статуса полной ремиссии (ПР) после подходящей индукционной терапии, и можно ожидать, что

более 25% взрослых с ОМЛ (около 45% из тех, кто достиг ПР) выживут в течение 3 и более лет и могут быть вылечены.

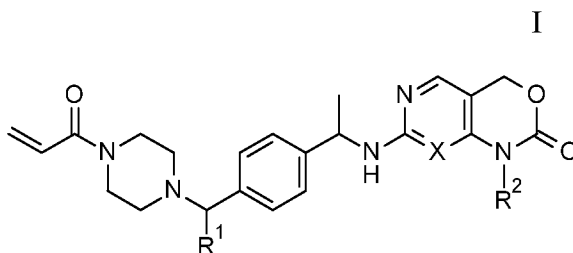
Однако мутации IDH1, придающие резистентность, наблюдаются у 7–14% пациентов с ОМЛ, и связанный с ними высокий уровень 2-HG может привести к фенотипу эпигенетического гиперметилирования и блокированию дифференцировки, что приводит к лейкемогенезу (Megias-Vericat J, *et al.*, *Blood Lymph. Cancer: Targets and Therapy* 2019; 9: 19-3). Кроме того, мутации киназы Flt3 наблюдаются примерно у трети пациентов с ОМЛ (Lee HJ, *et al.*, *Oncotarget* 2018; 9: 924-936).

Таким образом, сохраняется потребность в альтернативных методах лечения рака, связанного с мутантным IDH.

Некоторые ингибиторы мутантного IDH1 и IDH2 раскрыты в публикации WO 2018/111707 A1, включая соединение, определенное в настоящем документе как «Соединение А», которое является ковалентным ингибитором мутантного IDH1, который модифицирует один цистеин (Cys269) в кармане аллостерического связывания, быстро инактивирует фермент и селективно ингибирует продукцию 2-HG, не влияя на уровни (α -KG) (WO 2018/111707 A1).

Настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение субъекту-человеку с раком, имеющему мутацию IDH, терапевтически эффективного количества

(а) первого соединения формулы I:



где:

R^1 представляет собой $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ или $-\text{CH}_2$ -циклопропил;

R^2 представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_3$; и

X представляет собой N или CH;

или его фармацевтически приемлемой соли; и

(b) одного или более вторых соединений, которые представляют собой антиметаболит или его фармацевтически приемлемую соль, гипометилирующий агент или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор мутантного Flt3 или его фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления мутация IDH представляет собой мутацию IDH1 или мутацию IDH2. В другом варианте осуществления мутация IDH представляет собой мутацию IDH1. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой мутацию R132 в IDH1. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132H. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132C, R132G, R132L или R132S. В другом варианте осуществления мутация R132 в IDH1 представляет собой R132H. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132C. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132G. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132L. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132S.

В другом варианте осуществления мутация IDH представляет собой мутацию IDH2. В другом варианте осуществления мутация IDH2 представляет собой мутацию R140 в IDH2 или мутацию R172 в IDH2. В другом варианте осуществления мутация IDH2 представляет собой мутацию R140. В другом варианте осуществления мутация R140 представляет собой R140Q, R140L или R140W. В другом варианте осуществления мутация IDH2 представляет собой мутацию R172. В другом варианте осуществления мутация R172 представляет собой R172K, R172M, R172G, R172S или R172W.

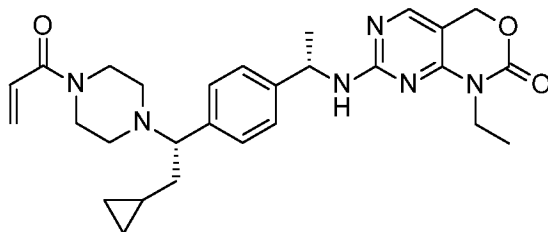
В одном варианте осуществления способа согласно изобретению в первом соединении формулы I или его фармацевтически приемлемой соли X представляет собой N. В другом варианте осуществления в первом соединении X представляет собой N, R¹ представляет собой -CH₂-циклопропил и R² представляет собой -CH₂CH₃, или его фармацевтически приемлемая соль. В другом варианте осуществления в первом соединении X представляет собой N, R¹ представляет собой -CH₂-циклопропил и R² представляет собой -CH₂CH₃.

В другом варианте осуществления первое соединение представляет собой:

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;
7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он; или
1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;
или его фармацевтически приемлемую соль.

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

В другом варианте осуществления первое соединение представляет собой:



5

Соединение А

или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления первое соединение представляет собой Соединение А.

10 В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий мутацию IDH1, например, мутацию R132 в IDH1. В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий мутацию IDH2, например, мутацию R172, R140 или R172 в IDH2. В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий мутацию IDH в ткани.

15 В другом варианте осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание, и субъект идентифицирован как имеющий мутацию IDH в крови, костном мозге, лимфатическом узле или лимфатической жидкости. В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий мутацию IDH в клетках крови, клетках костного мозга, клетках лимфатического узла или клетках лимфатической
20 жидкости.

В другом варианте осуществления рак представляет собой рак в виде солидной опухоли, и субъект идентифицирован как имеющий мутацию IDH1 в ткани солидной опухоли. В другом варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий мутацию IDH в клетках ткани солидной опухоли.

25 В другом варианте осуществления перед введением ингибитора мутантного Flt3 субъект-человек был идентифицирован как имеющий мутацию Flt3. В другом варианте осуществления мутация Flt3 представляет собой внутреннюю тандемную мутацию Flt3 (Flt3-ITD). В другом варианте осуществления мутация Flt3 представляет собой мутацию тирозинкиназного домена Flt3 (Flt3-TKD). В другом варианте осуществления мутация
30 Flt3 представляет собой мутацию D835 в Flt3.

В другом варианте осуществления первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят перед вторым соединением или его фармацевтически приемлемой солью.

5 В другом варианте осуществления первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят после второго соединения или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом варианте осуществления первое соединение или его фармацевтически приемлемую соль включают в комбинированную лекарственную форму со вторым соединением или его фармацевтически приемлемой солью.

10 В другом варианте осуществления способа согласно изобретению рак представляет собой рак в виде солидной опухоли. В другом варианте осуществления рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному, рак головы и шеи, хондросаркому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рак поджелудочной железы, астроцитому, олигодендроглиому, глиому, глиобластому, карциному мочевого пузыря, колоректальный рак, рак легкого или синоназальную недифференцированную карциному.
15 В другом варианте осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В другом варианте осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, и также осуществляют введение ингибитора α -KR G12C и/или ингибитора EGFR. В другом варианте осуществления солидная опухоль
20 представляет собой холангиокарциному. В другом варианте осуществления субъекту также проводят лучевую терапию.

В другом варианте осуществления рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В другом варианте осуществления гематологическое злокачественное заболевание представляет собой ОМЛ (острый миелоидный лейкоз),
25 миелодиспластический синдром/миелопролиферативное новообразование, ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, истинную полицитемию, эссенциальную тромбоцитемию, первичный миелофиброз или хронический миелогенный лейкоз. В другом варианте осуществления гематологическое злокачественное заболевание
30 представляет собой ОМЛ.

В другом варианте осуществления способа согласно изобретению второе соединение представляет собой антиметаболит или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления способа согласно изобретению антиметаболит представляет собой цитарабин, 5-фторурацил (5-FU), 6-меркаптурин (6-MP), капецитабин,
35 флоксуридин, флударабин, гемцитабин, гидроксикарбамид, метотрексат, пеметрексед или

фототреклат, или фармацевтически приемлемую соль любого из них. В другом варианте осуществления антимераболит представляет собой цитарабин или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления антимераболит представляет собой цитарабин. В другом варианте осуществления первое соединение представляет собой

5 Соединение А и второе соединение представляет собой цитарабин. В другом варианте осуществления рак представляет собой ОМЛ, первое соединение представляет собой Соединение А и второе соединение представляет собой цитарабин. В другом варианте осуществления рак представляет собой холангиокарциному, первое соединение представляет собой Соединение А и второе соединение представляет собой цитарабин.

10 В другом варианте осуществления способа согласно изобретению второе соединение представляет собой гипометилирующий агент или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления способа согласно изобретению гипометилирующий агент представляет собой азациитин (5-азациитин), 5-аза-2'-

15 дезоксицитидин (децитабин), гуадецитабин (SGI-110), 5-фтор-2'-дезоксицитидин, зебуларин, CP-4200, RG108, нанаомицин А или фармацевтически приемлемую соль любого из них. В другом варианте осуществления гипометилирующий агент представляет собой азациитин или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления гипометилирующий агент представляет собой азациитин. В другом варианте осуществления первое соединение представляет собой Соединение А и второе

20 соединение представляет собой азациитин. В другом варианте осуществления рак представляет собой ОМЛ, первое соединение представляет собой Соединение А и второе соединение представляет собой азациитин. В другом варианте осуществления рак представляет собой холангиокарциному, первое соединение представляет собой Соединение А и второе соединение представляет собой азациитин.

25 В другом варианте осуществления первое соединение формулы I или его фармацевтически приемлемую соль вводят с гипометилирующим агентом или его фармацевтически приемлемой солью и ингибитором Bcl-2 или его фармацевтически приемлемой солью. В другом варианте осуществления первое соединение формулы I вводят с гипометилирующим агентом и ингибитором Bcl-2. В другом варианте

30 осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой венетоклакс, обатоклакс, навитоклакс или фармацевтически приемлемую соль любого из них. В другом варианте осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой венетоклакс или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой венетоклакс. В другом варианте осуществления Соединение А вводят с

35 гипометилирующим агентом и ингибитором Bcl-2. В другом варианте осуществления

Соединение А вводят с азациитидином и венетоклаксом. В другом варианте осуществления рак представляет собой ОМЛ, и Соединение А вводят с азациитидином и венетоклаксом. В другом варианте осуществления рак представляет собой холангиокарциному, и Соединение А вводят с азациитидином и венетоклаксом.

5 В другом варианте осуществления способа согласно изобретению второе соединение представляет собой ингибитор мутантного Flt3 или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления способа согласно изобретению ингибитор мутантного Flt3 представляет собой мидостаурин, гилтеритиниб, квизартиниб (АС220), сорафениб, сунитиниб, лестауртиниб или креноланиб, или фармацевтически
10 приемлемую соль любого из них. В другом варианте осуществления ингибитор мутантного Flt3 представляет собой мидостаурин или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления ингибитор мутантного Flt3 представляет собой мидостаурин. В другом варианте осуществления первого соединения представляет собой Соединение А и второе соединение представляет собой мидостаурин. В другом варианте
15 осуществления рак представляет собой ОМЛ, первое соединение представляет собой Соединение А и второе соединение представляет собой мидостаурин. В другом варианте осуществления рак представляет собой холангиокарциному, первое соединение представляет собой Соединение А и второе соединение представляет собой мидостаурин.

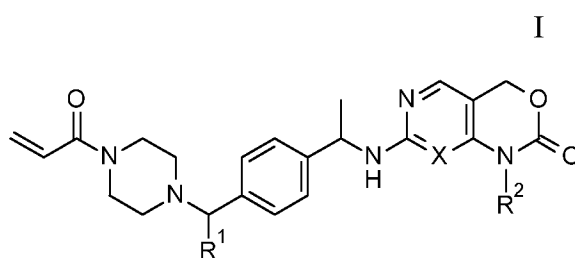
В другом варианте осуществления способа согласно изобретению Соединение А
20 вводят с антиметаболитом и гипометилирующим агентом.

В другом варианте осуществления способа согласно изобретению Соединение А вводят с антиметаболитом и ингибитором мутантного Flt3.

В другом варианте осуществления способа согласно изобретению Соединение А вводят с гипометилирующим агентом и ингибитором мутантного Flt3.

25 В другом варианте осуществления способа согласно изобретению Соединение А вводят с антиметаболитом, гипометилирующим агентом и ингибитором мутантного Flt3.

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы I:



30 где:

R¹ представляет собой -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂OCH₃ или -CH₂-циклопропил;

R² представляет собой -CH₃ или -CH₂CH₃; и

X представляет собой N или CH;

или его фармацевтически приемлемой соли;

для применения в комбинации с одним или более из антиметаболита или его

5 фармацевтически приемлемой соли, гипометилирующего агента или его фармацевтически приемлемой соли или ингибитора мутантного Flt3 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака у субъекта-человека, имеющего мутацию IDH.

В одном варианте осуществления у субъекта идентифицирована мутация IDH, например, мутация IDH1 или ID2, в крови, костном мозге, лимфатическом узле,
10 лимфатической жидкости, клетках крови, клетках костного мозга, клетках лимфатического узла или клетках лимфатической жидкости.

В другом варианте осуществления соединение формулы I применяют в комбинации с гипометилирующим агентом (например, азациитидином) или его фармацевтически приемлемой солью и ингибитором Bcl-2 или его фармацевтически приемлемой солью для лечения рака у субъекта-человека, идентифицированного как
15 имеющего мутацию R132 в IDH1.

В одном варианте осуществления мутация IDH представляет собой мутацию IDH1 или мутацию IDH2. В другом варианте осуществления мутация IDH представляет собой мутацию IDH1. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой
20 мутацию R132 в IDH1. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132H, R132C, R132G, R132L или R132S. В другом варианте осуществления мутация R132 в IDH1 представляет собой R132H. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132C. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132G. В другом варианте осуществления мутация IDH1
25 представляет собой R132L. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой R132S.

В другом варианте осуществления мутация IDH представляет собой мутацию IDH2. В другом варианте осуществления мутация IDH2 представляет собой мутацию R140 в IDH2 или мутацию R172 в IDH2. В другом варианте осуществления мутация IDH2
30 представляет собой мутацию R140. В другом варианте осуществления мутация R140 представляет собой R140Q, R140L или R140W. В другом варианте осуществления мутация IDH2 представляет собой мутацию R172. В другом варианте осуществления мутация R172 представляет собой R172K, R172M, R172G, R172S или R172W.

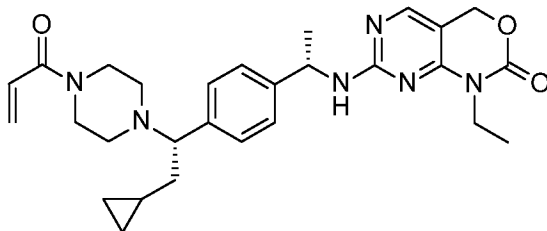
В одном варианте осуществления субъект идентифицирован как имеющий
35 мутацию IDH, например, мутацию IDH1 или IDH2.

Для соединения для применения формулы I предпочтительно, чтобы X представлял собой N, или его фармацевтически приемлемая соль; предпочтительно, чтобы R¹ представлял собой -CH₂-циклопропил, или его фармацевтически приемлемая соль; предпочтительно, чтобы R² представлял собой -CH₂CH₃, или его фармацевтически приемлемая соль; предпочтительно, чтобы X представлял собой N и R¹ представлял собой -CH₂-циклопропил, или его фармацевтически приемлемая соль; предпочтительно, чтобы R¹ представлял собой -CH₂-циклопропил и R² представлял собой -CH₂CH₃, или его фармацевтически приемлемая соль; более предпочтительно, чтобы X представлял собой N, R¹ представлял собой -CH₂-циклопропил и R² представлял собой -CH₂CH₃, или его фармацевтически приемлемая соль; наиболее предпочтительно, чтобы X представлял собой N, R¹ представлял собой -CH₂-циклопропил и R² представлял собой -CH₂CH₃.

Предпочтительными соединениями являются:

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он];
7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он; или
1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;
или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления первое соединение представляет собой:



(Соединение А) или его фармацевтически приемлемую соль.

В другом варианте осуществления первое соединение представляет собой Соединение А.

В настоящем документе представлены новые способы применения комбинации соединения формулы I и одного или более из антимаболита, гипометилирующего агента или ингибитора мутантного Flt3 для лечения рака. Соответственно, некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к соединению формулы I для одновременного, отдельного или последовательного применения в комбинации с одним или более из антимаболита, гипометилирующего агента или ингибитора мутантного Flt3 для лечения рака у субъекта, имеющего мутацию IDH, например, мутацию IDH1 или IDH2. Более

того, некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к соединению формулы I для
одновременного, отдельного или последовательного применения в комбинации с одним
или более из антиметаболита, гипометилирующего агента или ингибитора мутантного Flt3
для лечения рака в виде солидной опухоли. Кроме того, некоторые аспекты настоящего
5 изобретения относятся к соединению формулы I для одновременного, отдельного или
последовательного применения в комбинации с одним или более из антиметаболита,
гипометилирующего агента или ингибитора мутантного Flt3 для лечения
гематологического злокачественного заболевания. Другой аспект изобретения относится
к соединению формулы I для одновременного, отдельного или последовательного
10 применения в комбинации с гипометилирующим агентом и ингибитором Vcl-2 для
лечения рака у субъекта, идентифицированного как имеющего мутацию IDH, например,
мутацию IDH1 или IDH2.

В одном варианте осуществления мутация IDH представляет собой мутацию IDH1
или мутацию IDH2. В другом варианте осуществления мутация IDH представляет собой
15 мутацию IDH1. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет собой
мутацию R132 в IDH1. В другом варианте осуществления мутация IDH1 представляет
собой R132H, R132C, R132G, R132L или R132S. В другом варианте осуществления
мутация R132 в IDH1 представляет собой R132H. В другом варианте осуществления
мутация IDH1 представляет собой R132C. В другом варианте осуществления мутация
20 IDH1 представляет собой R132G. В другом варианте осуществления мутация IDH1
представляет собой R132L. В другом варианте осуществления мутация IDH1
представляет собой R132S.

В другом варианте осуществления мутация IDH представляет собой мутацию
IDH2. В другом варианте осуществления мутация IDH2 представляет собой мутацию
25 R140 в IDH2 или мутацию R172 в IDH2. В другом варианте осуществления мутация IDH2
представляет собой мутацию R140. В другом варианте осуществления мутация R140
представляет собой R140Q, R140L или R140W. В другом варианте осуществления
мутация IDH2 представляет собой мутацию R172. В другом варианте осуществления
мутация R172 представляет собой R172K, R172M, R172G, R172S или R172W.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции,
30 содержащей соединение формулы I, для применения в комбинации с одним или более из
антиметаболита или его фармацевтически приемлемой соли, гипометилирующего агента
или его фармацевтически приемлемой соли или ингибитора мутантного Flt3 или его
фармацевтически приемлемой соли для лечения рака у субъекта-человека,
35 идентифицированного как имеющего мутацию IDH. В одном варианте осуществления

мутацию IDH идентифицирует в клетках крови, клетках костного мозга или клетках крови и костного мозга.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения формулы I для изготовления лекарственного средства для лечения рака у субъекта-человека, имеющего мутацию IDH, например, мутацию IDH1 или IDH2. В одном варианте осуществления у субъекта идентифицирована мутация IDH в крови, костном мозге, лимфатическом узле, лимфатической жидкости, клетках крови, клетках костного мозга, клетках лимфатического узла или клетках лимфатической жидкости, где соединение формулы I для применения для изготовления лекарственного средства вводят в комбинации с одним или более из антимаболита или его фармацевтически приемлемой соли, гипометилирующего агента или его фармацевтически приемлемой соли или ингибитора мутантного Flt3 или его фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления способа согласно изобретению или соединения для применения согласно изобретению рак представляет собой рак первой линии. В другом варианте осуществления рак первой линии, представляет собой рак в виде солидной опухоли. В другом варианте осуществления рак первой линии, представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В другом варианте осуществления гематологическое злокачественное заболевание первой линии, представляет собой ОМЛ первой линии.

В другом варианте осуществления способа согласно изобретению или соединения для применения согласно изобретению рак представляет собой рецидив рака. В другом варианте осуществления рецидив рака представляет собой рак в виде солидной опухоли. В другом варианте осуществления рецидив рака представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В другом варианте осуществления рецидив гематологического злокачественного заболевания представляет собой рецидив ОМЛ.

В другом варианте осуществления способа согласно изобретению или соединения для применения согласно изобретению рак представляет собой рефрактерный рак. В другом варианте осуществления рефрактерный рак представляет собой рак в виде солидной опухоли. В другом варианте осуществления рефрактерный рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В другом варианте осуществления рефрактерное гематологическое злокачественное заболевание представляет собой рефрактерный ОМЛ.

В другом варианте осуществления способа согласно изобретению или соединения для применения согласно изобретению рак представляет собой распространенный рак. В другом варианте осуществления распространенный рак представляет собой

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

5 ОМЛ.

В другом варианте осуществления ОМЛ представляет собой острый промиелоцитарный лейкоз.

Способы анализа активности мутантного фермента IDH1 известны специалистам в данной области техники, например, из публикации WO 2018/111707 A1.

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

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

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

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

Термин «гематологическое злокачественное заболевание» относится к раку, возникшему в крови, костном мозге, лимфатическом узле или лимфатической жидкости.

25 Термин «рак первой линии» означает, что субъект-человек с раком никогда получал лечение от рака, лечение которого осуществляют.

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

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

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

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

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

5 Термин «субъект с гематологическим злокачественным заболеванием» означает субъекта, у которого было диагностировано гематологическое злокачественное заболевание. В одном варианте осуществления субъект с гематологическим злокачественным заболеванием представляет собой субъекта с ОМЛ. Термин «субъект с ОМЛ» означает субъекта, у которого был диагностирован ОМЛ. Способы диагностики ОМЛ известны специалистам в данной области техники, например, из Dohner H, *et al.*,
10 *Blood* 2017; 129: 424-447.

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

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

Термин «мутация R132 в IDH1» является синонимом «мутации в IDH1 R132» и относится к мутации IDH1 по аминокислотному остатку 132 в гене IDH1 субъекта, определенной, например, в нуклеиновой кислоте указанного субъекта (например, ДНК).

25 Термин «мутация Flt3» относится к мутации в гене Flt3 субъекта.

Термин «ингибитор мутантного IDH» относится к соединению, которое ингибирует ферментативную активность и/или продукцию 2-HG мутантным ферментом IDH. Способы анализа активности мутантного фермента IDH1 и IDH2 известны
30 специалистам в данной области техники, например, из публикации WO 2018/111707 A1. В термине «ингибитор мутантного IDH» слово «мутантный» относится к гену IDH, а не к ингибитору.

Термин «ингибитор мутантного Flt3» относится к соединению, которое ингибирует активность мутантной киназы Flt3. Способы анализа активности мутантного Flt3 известны
специалистам в данной области техники, например, из источника Lee HJ, *et al.*, *Oncotarget*

2018; 9: 924-936. В термине «ингибитор мутантного Flt3» слово «мутантный» относится к белку Flt3, а не к соединению-ингибитору.

Термин «идентифицированный как имеющий мутацию IDH», например, мутацию IDH1 или IDH2, означает, что нуклеиновая кислота (например, ДНК) из ткани или клеток субъекта-человека была проанализирована для определения присутствия у указанного субъекта-человека мутации IDH. В одном варианте осуществления кровь, костный мозг, лимфатический узел, лимфатическая жидкость, клетки крови, клетки костного мозга, клетки лимфатического узла или клетки лимфатической жидкости субъекта-человека были проанализированы на предмет присутствия мутации IDH. В другом варианте осуществления солидная ткань субъекта-человека была проанализирована на предмет присутствия мутации IDH.

Термин «ингибитор Vcl-2» относится к соединению, которое связывается с Vcl-2 и приводит к одному или более из цитотоксичности в раковых клетках, подавления экспрессии Vcl-2 в раковых клетках, митохондриальной дисфункции в раковых клетках и апоптоза в раковых клетках. Способы определения этих эффектов известны специалистам в данной области техники, например, из источника Wen M, *et al.*, *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 391.

В одном варианте осуществления способа согласно настоящему изобретению лицо, которое идентифицирует субъекта-человека как имеющего мутацию R132 в IDH1, может отличаться от лица, которое вводит первое и второе соединения. В другом варианте осуществления лицо, которое идентифицирует субъекта-человека как имеющего мутацию R132 в IDH1, отличается от лица, которое вводит первое и второе соединения. В другом варианте осуществления лицо, которое идентифицирует субъекта-человека как имеющего мутацию R132 в IDH1, идентично лицу, которое вводит первое и второе соединения.

Термин «идентифицированный как имеющий мутацию Flt3» означает, что нуклеиновая кислота (например, ДНК) из клеток крови, клеток костного мозга или клеток крови и клеток костного мозга субъекта-человека была проанализирована для определения присутствия у указанного субъекта-человека одной или более мутаций Flt3.

Аналитические методы идентификации мутаций IDH1 и Flt3 известны специалистам в данной области техники (Clark, O., *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 2016; 22: 1837-42), включая, не ограничиваясь перечисленным, кариотипирование (Guller JL, *et al.*, *J. Mol. Diagn.* 2010; 12: 3-16), флуоресцентную гибридизацию *in situ* (Yeung DT, *et al.*, *Pathology* 2011; 43: 566-579), секвенирование по Сэнгеру (Lutha, R *et al.*, *Haematologica* 2014; 99: 465-473), метаболическое профилирование (Miyata S, *et al.*, *Scientific Reports* 2019; 9: 9787), полимеразную цепную реакцию (Ziai, JM and AJ Siddon, *Am. J. Clin. Pathol*

2015; 144: 539-554) и секвенирование нового поколения (например, полнотранскриптомное секвенирование) (Lutha, R *et al.*, *Haematologica* 2014; 99: 465-473; Wang H-Y, *et al.*, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016; 35: 86).

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

10 «Терапевтически эффективное количество» означает такое количество соединения или его фармацевтически приемлемой соли, вводимое субъекту, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ субъекта или оказывать желаемый терапевтический эффект на субъекта.

15 Терапевтически эффективное количество может быть без труда установлено лечащим врачом как специалистом в данной области техники с использованием известных методик и посредством наблюдения результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для субъекта лечащий врач учитывает множество факторов, включая, не ограничиваясь перечисленным: размер тела, возраст и общее состояние здоровья конкретного субъекта; конкретное затрагиваемое
20 заболевание или расстройство; выраженность, или вовлечение в патологический процесс, или степень тяжести заболевания или расстройства; ответ конкретного субъекта; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему дозирования; применение сопутствующих лекарственных средств; и другие значимые обстоятельства.

25 Термин «в комбинации с» означает, что соединение формулы I применяют, или оно предназначено для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с любым одним или более из антиметаболита или его фармацевтически приемлемой соли, гипометилирующего агента или его фармацевтически приемлемой соли, необязательно в комбинации с ингибитором Vcl-2 или его фармацевтически
30 приемлемой солью, или ингибитора мутантного Flt3 или его фармацевтически приемлемой соли для лечения рака у субъекта-человека, имеющего мутацию IDH.

35 Соединения, вводимые в способе согласно изобретению, необязательно могут быть приготовлены в виде фармацевтических композиций, вводимых любым способом, обеспечивающим биодоступность соединений. В одном варианте осуществления такие композиции разработаны для перорального введения. Такие фармацевтические

композиции и способы их получения хорошо известны в данной области техники. (См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

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

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

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

20 **Материалы и методы**

Соединения и препарат. Для исследований *in vivo* каждый тестируемый образец объединяли с носителем в соответствующей концентрации. Для исследований *in vivo* Соединение А объединяли с носителем аравийской камедью (вода, 10% аравийской камеди, 0,05% пеногасителя [Dow Corning 1510-US]) с 1,1 молярными эквивалентами HCl.

25 Свежую смесь Соединения А в соответствующих концентрациях с носителем готовили каждые 7 дней и хранили при 4 °С между введением доз. Мидостаурин (Medchem Express, серия/партия № 23950) объединяли с 20% ПЭГ400 в воде и готовили свежий раствор еженедельно (хранили при 4 °С между введением доз). Свежий раствор цитарабина готовили еженедельно путем разведения стерильным физиологическим раствором из

30 исходного раствора цитарабина (инъекция 20 мг/мл, (от Pfizer injectables)). Азациитидин (Sigma, партия № МКВР7212) объединяли со стерильной водой и ежедневно готовили свежую смесь непосредственно перед введением доз.

PDx-модели ОМЛ человека *in vivo*. Модели ОМЛ создавали после инъекции в хвостовую вену первичных клеток ОМЛ человека самкам мышей NOD SCID Gamma

35 (NSG, NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ [Jackson Labs, № 005557]) (в возрасте от 6 до 7

недель). В исследованиях использовали две модели: (1) IDH1(R132H), NRas(Q61H) первичный ОМЛ человека и (2) IDH1(R132H), Flt3-ITD первичный ОМЛ человека. При необходимости спленоциты от мышей с опухолями использовали для увеличения числа и расширения моделей, как описано. Готовили смесь каждого тестируемого образца, как описано выше, в подходящей концентрации с носителем для введения животным доз, тестируемых в этом исследовании, при объеме дозирования 10 мкл/грамм массы тела. Мышам, получавшим Соединение А (п/о, 1 р/сут), вводили указанные дозы в течение периода исследования. Комбинированные агенты дозировали следующим образом: мидостаурин 50 мг/кг п/о, 1 р/сут (53 дня, начиная через 7 дней после начала введения доз Соединения А), цитарабин 2 мг/кг в/б [(1 р/сут x 5, отдых 2) x 2] отдых 14 дней и повтор (2 цикла, начиная с начала введения доз Соединения А), азацитидин 1 мг/кг в/б [(1 р/сут x 5, отдых 2) x 2] отдых 14 дней и повтор (2 цикла, начиная с начала введения доз Соединения А). Мышей, которых лечили, оценивали в сравнении с контрольными мышами, получавшими носитель, и не подвергавшимися воздействию (не имеющими опухолей) контрольными мышами. Массу тела регистрировали два раза в неделю. Образцы цельной крови (<100 мкл) собирали раз в две недели путем пункции подчелюстной вены в пробирки для сбора крови с К-ЭДТА в течение периода исследования и проводили анализ методом FACS для отслеживания состояния дифференцировки и лейкозной нагрузки у подопытных мышей (плазму периодически собирали для анализа на 2-HG в течение периода исследования). Для сбора плазмы аликвоты цельной крови от пятидесяти до семидесяти мкл помещали в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл для каждого образца и центрифугировали при 300 x g в течение 8 минут (4 °C). Десять мкл плазмы собирали и переносили в новые микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, и замораживали при -80 °C для анализа на 2-HG методом ЖХ-МС. Ингибирование продукции 2-HG отслеживали путем оценки 2-HG в плазме с использованием плазмы от мышей, получавших носитель, и мышей, не подвергавшихся воздействию, в качестве контролей. Для проточной цитометрии брали 50-70 мкл цельной крови, добавляли 60 мкл буфера для окраски/промывки (5% термоинактивированной (HI)-FBS (об./об.) (Invitrogen 10082) в DPBS (HyClone SH30028)) на пробирку, перемешивали путем переливания 3-4 раз пипеткой и 100 мкл суспензии крови переносили в полипропиленовые пробирки объемом 5 мл, окрашивали и анализировали, как описано ниже.

Распространение PDx-моделей ОМЛ. У мышей, которым имплантировали клетки IDH1(R132H) ОМЛ человека, было выявлено распространенное прогрессирующее заболевание с помощью проточного цитометрического анализа образцов цельной крови в

моделях IDH1(R132H) лейкоза, полученных от пациентов. Селезенки обрабатывали и выделяли спленоциты, как описано ниже. Двести мкл препарата спленоцитов на субъекта вводили в/в (внутривенно, в хвостовую вену) мышам-реципиентам NSG. (для увеличения числа моделей использовали $10e^6$ - $25e^6$ жизнеспособных лейкоцитов на мл, $2e^6$ - $5e^6$ на мышь). Прогрессирование отслеживали с помощью анализа методом проточной цитометрии один раз в четыре недели до выявления ОМЛ в периферической крови ($>0,2\%$ клеток ОМЛ человека (%hCD33+hCD45+ от общего количества лейкоцитов) (WBC)). После подтверждения приживления за мышами наблюдали раз в две недели до тех пор, пока они не были готовы к началу исследования. Мышей рандомизировали и начинали исследование, когда средний % ОМЛ человека (от общего количества лейкоцитов) достигал 2-8%. Собирали кровь из подчелюстной вены.

Обработка и подготовка селезенки/спленоцитов. После иссечения селезенку взвешивали и $\frac{3}{4}$ селезенки помещали в стандартную стерильную полипропиленовую коническую пробирку объемом 15 мл, содержащую PBS, и помещали на лед. Оставшуюся $\frac{1}{4}$ селезенки фиксировали в 10% NBF (нейтральный забуференный формалин) и доставляли для проведения патологического исследования. Селезенку помещали в ледяной стерильный PBS в пробирке для взятия образцов объемом 15 мл. Селезенку извлекали из пробирки для взятия образцов и помещали в 100-микронное клеточное сито с конической пробиркой объемом 50 мл (BD Falcon № 352360). Селезенку обрабатывали путем осторожного трения ткани селезенки о поверхность клеточного сита концом поршня шприца на 5 мл круговыми движениями. Поверхность сита промывали 10 мл стерильного DPBS комнатной температуры (HyClone SH30028) 3 раза в ходе процесса. После того, как визуально не наблюдалось неповрежденной ткани селезенки, проводили окончательную промывку сита и перемешивали препарат клеток путем переливания 15 раз с помощью стерильной серологической пипетки на 10 мл. Клеточный осадок собирали центрифугированием ($300\times g$) и трижды промывали 30 мл стерильного DPBS. Клетки подсчитывали и ресуспендировали в DPBS при желаемой концентрации имплантата.

Сбор костного мозга. Костный мозг собирали из большеберцовой и бедренной кости с помощью иглы калибром от 27G до 25G со шприцем на 1 мл, содержащим 1 мл PBS.

Анализ лейкоцитов человека методом проточной цитометрии. Собирали образцы крови из подчелюстной вены из исследований *in vivo*. Конъюгированные с Fluor антитела

- для окраски добавляли в соответствии с инструкциями производителя (античеловеческий CD33-PE (клон WM53, кат. № BD 555450), античеловеческий CD14-APC (клон MφP9, кат. № BD 340436), античеловеческий CD15-V450 (клон HI98, кат. № BD 561584), античеловеческий CD117-BV421 (клон YB5.B8, кат. № BD 562434), античеловеческий CD11b-APCCy7 (клон ICRF44, кат. № BD 557754), античеловеческий CD45-PECy7 (клон HI30, кат. № BD 557748) и античеловеческий CD3-FITC (клон SK7, кат. № BD 340542)).
- Образцы инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. После инкубации к каждому образцу добавляли 1,5 мл 1X BD Lyse/Fix (37 °C, (№ BD 558049)) и инкубировали в течение 12 минут при комнатной температуре.
- 10 Пробирки центрифугировали при 300×g в течение 7 минут. Раствор BD Lyse/Fix аспирировали, а клеточный осадок промывали буфером для окраски/промывки 3 раза (1 этап промывки состоял из: ресуспендирования осадка в 3 мл буфера для окраски/промывки, центрифугирования при 300×g, аспирации промывочного раствора). Затем фиксированные клетки ресуспендировали в 300-400 мкл буфера для
- 15 окраски/промывки. Образцы анализировали на проточном цитометре Becton Dickinson FACSVerse (кат. № 651155, серийный № Z6511550447) с использованием стандартных принципов и методик проточной цитометрии. Образцы анализировали в тот же день, когда проводили их окраску и фиксацию. Гейтирование популяции и анализ данных процентов популяций выполняли в программном обеспечении FACSuite на цитометре
- 20 FACSVerse. Процентные значения популяций из анализа данных наносили на график в Graphpad Prism или в JMP13. Если животное погибало от болезни или если кровь невозможно было получить по техническим причинам в какой-либо конкретный день, точка на графике для этого дня отсутствовала и, таким образом, была не определена (ND).
- 25 **Анализ метаболитов в плазме в PDx-модели ОМЛ методом ЖХ-МС.** Влияние ингибирования IDH1 на концентрации общего 2-HG и α-KG определяли с помощью анализа плазмы методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС). Калибровочные кривые получали путем добавления стандартных добавок 2-HG и α-KG в воду. В этом методе применяли дериватизацию O-бензилгидроксиламином
- 30 перед проведением анализа методом ЖХ-МС. Десять микролитров каждого стандарта или образца помещали в 96-луночный планшет с глубокими лунками и объединяли со 100 мкл раствора внутреннего стандарта, содержащего 10 мкМ d5-3-гидроксиглутарата и 10 мкМ d6-α-KG. Затем образцы плазмы обрабатывали 210 мкл смеси метанол:хлороформ 4:3, центрифугировали, после чего удаляли и сушили супернатант. В каждый образец
- 35 добавляли 100 мкл 1 М O-бензилгидроксиламина в пиридиновом буфере (8,6% пиридина,

pH 5) и 100 мкл 1 М гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида (EDC) в пиридиновом буфере. Реакцию дериватизации проводили при комнатной температуре в течение одного часа. В каждый образец при помощи жидкостного манипулятора Beckman Biomek FX добавляли 300 мкл этилацетата. Запечатывали 5 планшеты и перемешивали на вортексе в течение 5 минут, а затем центрифугировали в течение 5 минут при 4000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R. 220 мкл верхнего слоя переносили в новый 96-луночный планшет. Образцы сушили в горячем азоте при 50 °C и повторно разводили 100 мкл смеси метанол/вода (1:1). Один микролитр дериватизированного образца вводили в систему ЖХ-МС, состоящую из системы ВЭЖХ 10 Shimadzu Prominence 20A и масс-спектрометра с тройным квадруполем Thermo Quantum Ultra™. Аналиты разделяли на колонке Water XBridge™ C18 (2,1 x 50 мм, 3,5 мкм) при скорости потока 0,6 мл/минута. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% муравьиную кислоту в воде, а подвижная фаза В представляла собой метанол. Профиль градиента представлял собой: 0 минут, 5% В; 2 минуты, 100% В; 4,00 минуты, 100% В; 4,1 минуты, 15 5% В; 5,50 минут, завершение. В масс-спектрометре использовали зонд HESI-II, работающий в режиме положительной ионизации путем мониторинга выбранной реакции. Калибровочные кривые строили путем построения графиков зависимости концентрации аналита от отношения площадей пиков аналита/внутреннего стандарта и проводили квадратичную аппроксимацию данных с использованием параметра взвешивания 20 1/концентрация при помощи программного обеспечения Xcalibur™. Неизвестные концентрации аналита получали путем обратных вычислений из калибровочных кривых.

Статистические методы

Для анализа результатов можно использовать комбинированный метод анализа 25 (независимый анализ по Блисссу для исследований IVEF). Обычную модель повторных измерений аппроксимировали зависимостью логарифма объема от группы и времени. Затем использовали показатели отличия для проверки эффекта взаимодействия в каждой временной точке с использованием двух конкретных комбинируемых способов лечения. Это эквивалентно независимому анализу по Блисссу, и согласно этому методу 30 предполагается, что объем опухоли теоретически может достигнуть нуля, то есть полной регрессии.

Ожидаемый аддитивный ответ (EAR) для комбинации рассчитывали по шкале объема опухоли следующим образом: ответ (EAR) объем $EAR = V1 * V2 / V0$, где $V0$, $V1$ и $V2$ – расчетные средние объемы опухоли для контроля носителем, только метода 35 лечения 1 и только

метода лечения 2, соответственно. Если тест взаимодействия являлся значимым, эффект комбинации объявляли статистически более вероятным, чем аддитивный, или менее вероятным, чем аддитивный, в зависимости от наблюдаемого среднего объема комбинации, который был меньше или больше, чем объем EAR, соответственно. В 5 противном случае статистический вывод являлся аддитивным.

Если наилучшим ожидаемым ответом является остановка роста, анализ по Блисссу может быть применен непосредственно к значениям % дельта Т/С для получения процентного ответа EAR: $EAR \% \text{ дельта Т/С} = Y1 * Y2 / 100$, где Y1 и Y2 – процентные значения дельта Т/С для лечения одним агентом.

10 1. Комбинация Соединения А и цитарабина

В экспериментах, проведенных по существу так, как описано выше, были получены результаты для комбинации Соединения А и цитарабина, представленные в таблицах 1А-1D.

Таблица 1А. Клиренс ОМЛ (%hCD33+hCD45b+ (от общего количества лейкоцитов))							
Дни лечения	А: контроль с носителем						
-3	28,51	14,42	21,52	16,63	17,11	12,94	23,6
18	56,38	53,74	48,66	49,96	61,16	50,02	55,62
34	59,66	70,73	74,71	47,74	59,88	52,14	56,01
47	85,8	91,96	Н/О	73,64	86,69	88,64	85,45
61	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
75	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
89	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
Дни лечения	В: 3,3 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о						
-3	17,5	23,88	24,18	19,46		14,94	20,14
18	20,86	33,61	41,83	32,38	38,57	42,91	20,85
34	27,18	34,09	34,27	48,87	20,33	33,11	34,28
47	64,21	29,4	31,38	63,41	45,19	20,69	37,68
61	68,85	72,89	47,42	56,98	82,54	38,58	74,64
75	67,91	Н/О	54,26	56,55	90,69	45,05	68,73
89	66,75	Н/О	67,29	63,26	92,41	41,16	62,6
Дни лечения	С: 2 мг/кг цитарабина, в/б, (1 р/сут x 5, отдых 2)X2) 14 дней перерыва)x2						
-3	21,32	14,8	13,68	21,94	21,7	20	17,15
18	8,04	3,22	3,24	8,64	3,23	3,50	4,40
34	9,07	2,02	3,5	2,54	1,79	Н/О	2,04
47	8,25	8,31	5,29	4,92	2,29	4,71	5,51
61	17,63	29,86	14,99	42,59	15,49	29,04	29,58

75	56,57	60,59	22,85	59,75	Н/О	36,77	44,17
89	76,67	78,11	57,04	81,53	Н/О	79,57	68,92
Дни лечения	Е: 3,3 мг/кг Соединения А+ 2 мг/кг цитарабина						
-3	20,81	11,21	20,88	24,28	18,66	22,43	18,02
18	0,91	1,19	0,88	1,46	1,28	0,86	1,13
34	1,34	1,1	1,61	0,97	0,87	0,8	0,6
47	0,97	0,33	0,82	0,48	0,58	0,4	0,2
61	1,93	0,26	0,65	0,33	0,4	0,22	0,39
75	10,37	0,89	1,38	1,44	1,09	1,08	1,2
89	10,68	7,39	3,63	12,52	8,75	5,09	9,89

Каждый столбец представляет собой данные по одному животному.

На 47-й день для каждой соответствующей группы лечения % клеток ОМЛ в плазме составил:

- 5 А: носитель (86%); В: Соединение А (39%); С: цитарабин (5,2%); и Е: Соединение А + цитарабин (0,48%) ($p < 0,001$).

Таблица 1В. Дифференцировка клеток ОМЛ (%hCD33+hCD11b+ (от hCD45+ клеток))							
Дни лечения	А: контроль с носителем						
-3	13,38	16,28	18,13	13,87	14,99	11,74	11,6
18	13,02	12,85	8,29	9,35	14,10	11,42	16,30
34	12,45	12,57	12,47	10,54	15,6	12,01	13,58
47	10,67	12,15	Н/О	11,01	11,32	7,82	6,1
61	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
75	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
89	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
Дни лечения	В: 3,3 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о						
-3	11,93	12	13,59	13,22		11,07	13,07
18	23,96	27,78	22,27	22,38	22,41	29,38	24,62
34	30,68	27,59	29,94	25,81	29,79	34,39	29,26
47	37,61	35,31	38,58	39,61	31,81	41,02	35,79
61	37,61	40,23	40,06	33,82	32,55	43,95	44
75	33,98	Н/О	35,9	31,38	37,53	34,66	51,92
89	21,32		43,96	40,34	28,57	37,17	45,68
Дни лечения	С: 2 мг/кг цитарабина, в/б, (1 р/сут x 5, отдых 2)X2) 14 дней перерыва)x2						
-3	16,46	20,43	14,95	8,62	13,39	10,09	12,17
18	15,93	18,69	13,00	11,66	14,07	10,70	11,81
34	37,13	33,07	31,02	31,17	33,03	Н/О	37,1
47	8,3	7,84	7,69	5,82	16,79	5,09	7,21

61	9,5	8,65	9,29	6,94	10,6	7,78	8,46
75	5,65	7,65	11,09	11,48	Н/О	10	10,46
89	8,75	10,17	8,87	18,02	Н/О	12,49	11,08
Дни лечения	Е: 3,3 мг/кг Соединения А + 2 мг/кг цитарабина						
-3	13,16	11,76	15,11	12,6	11,18	9,52	15,03
18	40,35	44,05	46,15	27,47	35,44	46,30	49,32
34	69,05	72,97	73,74	72,31	61,4	70	67,57
47	71,93	77,78	70,83	72,41	62,16	60	76,92
61	74,24	35,85	40,91	35,42	30,65	17,31	26,15
75	84,38	18,52	48,44	36	45,78	28,57	31,82
89	60,42	46,4	48,59	49,39	49,13	39,89	48,48

Каждый столбец представляет собой данные по одному животному.

На 47-й день для каждой соответствующей группы лечения % дифференцировки клеток ОМЛ составил:

- 5 А: носитель (10%); В: Соединение А (37%); С: цитарабин (8%); и Е: Соединение А + цитарабин (71%) ($p < 0,001$).

Группа лечения	%hCD33+hCD45+ (% от лейкоцитов)	%hCD45+ (% от лейкоцитов)
І: не подвергавшиеся воздействию (без опухолей)	0,03	0,09
А: контроль с носителем	96,16	96,13
	97,02	96,97
	87,12	87,23
	94,5	94,23
В: 3,3 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о	98,6	98,36
	44,3	43,99
	98,54	98,15
	86,55	86,21
С: 2 мг/кг цитарабина, в/б, (1 р/сут x 5, отдых 2)X2) 14 дней перерыва)x2	64,38	71,88
	75,48	78,06
	39,66	44,54
	80,32	80,75
Е: 3,3 мг/кг Соединения А + 2 мг/кг цитарабина	11,51	11,53
	9,69	9,57
	20,23	20,72
	17,99	17,97

- 10 Для каждой соответствующей группы лечения % клиренса ОМЛ из костного мозга составил:

А: носитель (94%); В: Соединение А (78%); С: цитарабин (63%); и Соединение А + цитарабин (14%) ($p = 0,0011$).

Таблица 1D. Ингибирование 2-HG в плазме			
Группа лечения	2-HG (мкМ)	2-HG (мкМ) за вычетом уровня у не подвергавшихся воздействию животных	% ингибирования 2-HG
А: контроль с носителем	7,714	6,806	38,677
	18,636	17,728	-59,73
	11,329	10,42	6,112
	11,441	10,533	5,098
	11,187	10,279	7,385
	10,112	9,204	17,073
	13,629	12,721	-14,616
В: 3,3 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о	1,042	0,134	98,792
	1,717	0,809	92,715
	1,206	0,298	97,316
	0,885	-0,023	100,207
	0,924	0,016	99,855
	1,708	0,799	92,797
	1,488	0,579	94,779
С: 2 мг/кг цитарабина, в/б, (1 р/сут x 5, отдых 2)X2) 14 дней перерыва)x2	3,256	2,348	78,844
	4,42	3,512	68,361
	2,131	1,223	88,982
	3,154	2,246	79,768
	4,051	3,143	71,68
	3,496	2,588	76,685
	4,423	3,515	68,331
Е: 3,3 мг/кг Соединения А + 2 мг/кг цитарабина	2,109	1,201	89,181
	2,95	2,041	81,609
	1,573	0,665	94,011
	1,297	0,388	96,5
	3,158	2,25	79,73
	2,799	1,891	82,962
	1,124	0,216	98,056

5 Для каждой соответствующей группы лечения % 2-HG в плазме составил: А: носитель (100%); В: Соединение А (3,4%); С: цитарабин (24%); и Е: Соединение А + цитарабин (11%) ($p = 0,0004$).

Таким образом, комбинация Соединения А и цитарабина усиливает подавление ОМЛ как в костном мозге, так и на периферии.

2. Комбинация Соединения А и азациитидина

В экспериментах, проведенных по существу так, как описано выше, были получены результаты для комбинации Соединения А и азациитидина, представленные в 5 таблицах 2А-2D.

Таблица 2А. Клиренс ОМЛ (%hCD33+hCD45b+ (от общего количества лейкоцитов))							
Дни лечения	А: контроль с носителем						
-19	5,05	4,28	6,34	3,92	4,14	3,72	3,02
2	16,5	29,51	19,54	16,31	14	15,84	19,3
15	32,49	55,55	43,4	46,47	34,76	48,34	28,08
28	60,98	50,61	52,34	55,71	52,39	55,66	20,12
43	85,2	76,4	84,57	77,66	56,65	62,28	58,32
58	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
77	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
98	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
Дни лечения	В: 3,3 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о						
-19	6,86	3,77	4,41	2,93	5,26	4,84	2,39
2	17,05	19,48	22,89	20,16	18,6	25,83	19,49
15	35,68	39,36	39,41	22,01	44,8	40,7	29,24
28	32,12		43,09	32,66	35,22	35	33,35
43	59,89	65,62	61,99	47,87	52,96	62,25	27,91
58	67,45	59,45	67,73	53,95	44,7	48,88	71,52
77	74,81	79,27	Н/О	43,75	60,02	75,38	59,74
98	55,63	73,72	Н/О	Н/О	73,42	85,43	64,03
Дни лечения	Г: 1 мг/кг азациитидина, (1 р/сут x 5, отдых 2)X2, 14 дней перерыва						
-19	7,65	4,33	3,14	6,28	3,24	2,46	2,87
2	23,43	20,98	19,8	15,03	22,26	10,88	16,63
15	33,19	44,55	30,95	35,67	30,39	28,23	30,75
28	13,99	12,05	15,33	16,77	13,73	22,64	22,81
43	32,23	23,27	18,57	27,48	11,38	25,34	20,44
58	Н/О	11,92	32,12	11,16	7,63	9,47	13,4
77	Н/О	12,91	26,37	20,18	12,58	15,11	11,64
98	Н/О	62,54	70,18	65,61	37,53		38,23
Дни лечения	Н: 3,3 мг/кг Соединения А 1 р/сут + 1 мг/кг азациитидина						
-19	4,33	2,76	3,31	2,24	4,31	6,38	3,84
2	19,98	14,18	10,28	15,76	28,42	16,97	13,17
15	23,66	15,37	23,22	31,07	27,55	26,83	25,81
28	6,31	5,5	7,26	5,73	4,28	6,49	7,29
43	17,1	11,53	12,68	9,76	3,99	9,82	8,28
58	11,81	9,84	7,52	5,81	5,09	9,5	7,81
77	19,08	7,56	7,18	13,44	7,25	17,29	10,56
98	34,42	21,66	14,1	21,85	13,55	21,89	19,04

Каждый столбец представляет собой данные по одному животному.

На 43-й день для каждой соответствующей группы лечения % клеток ОМЛ в плазме составил:

А: носитель (71%); В: Соединение А (52%); G: азациитидин (22%); и Н: Соединение А + азациитидин (9,7%) ($p < 0,023$).

5

Таблица 2В. Дифференцировка клеток ОМЛ (%hCD33+hCD11b+ (от hCD45+ клеток))							
Дни лечения	А: контроль с носителем						
-19	0,65	1,54	1,58	0,84	2,4	0,9	2,25
2	12,96	11,83	12,77	16,62	8,2	14,12	9
15	16,18	21,86	16,82	22,7	19,61	20,66	17,46
28	17,51	14,19	17,58	15,57	15,29	14,62	9,19
43	15,41	20,79	13,79	17,18	13,07	12,15	13,56
58	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
77	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
98	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
Дни лечения	В: 3,3 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о						
-19	1,45	2,19	0,38	2,21	0,64	0,34	0,68
2	14,12	16,05	13,27	10,34	11,59	13,32	14,01
15	33,42	27,78	36,01	28,02	28,21	29,24	33,82
28	35,79		36,46	33,59	39,91	37,16	40,47
43	37,51	35,22	33,33	36,61	41,32	33,68	39,34
58	42,9	44,03	33,47	48,08	47,13	40,2	26,62
77	56,29	46,83	Н/О	42,98	48,3	51,69	48,56
98	44,09	47,66	Н/О		33,67	36,45	33,6
Дни лечения	G: 1 мг/кг азациитидина, (1 р/сут x 5, отдых 2)X2, 14 дней перерыва						
-19	1,53	0	2,59	0,27	0	2,72	1,16
2	10,07	14,27	13,08	12,37	5,55	9,38	9,55
15	12,12	16,08	11,64	18,36	13,75	11,72	18,15
28	21,14	21,62	19,07	20,9	16,95	20,64	21,18
43	10,64	9,94	11,58	6,98	6,67	12,03	10,48
58		14,45	9,99	10,78	11,33	11,72	13,55
77		10,12	10,78	8,78	6,76	10,92	11,76
98		10,31	14,59	17,5	8,29	Н/О	16,64
Дни лечения	Н: 3,3 мг/кг Соединения А 1 р/сут + 1 мг/кг азациитидина						
-19	1,89	0	1,98	1,48	1,15	2,36	1,72
2	13,61	13,16	12,2	9,95	13,66	14,2	17,39
15	36,90	35,00	39,11	28,42	34,76	36,92	41,66
28	67,13	60,83	56,32	56,89	62,35	64,41	68,63
43	59,57	54,06	60,8	68,12	53,56	58,1	53,95
58	61,38	71,75	60,91	68,19	64,34	64,74	55,81
77	59,55	61,55	63,79	62,29	58,76	45,38	57,96
98	57,86	60,39	66,97	64,17	54,5	47,71	56,11

Каждый столбец представляет собой данные по одному животному.

На 43-й день для каждой соответствующей группы лечения % дифференцировки клеток ОМЛ составил:

А: носитель (15%); В: Соединение А (37%); G: азациитидин (10%); и Н: Соединение А + азациитидин (59%) ($p < 0,001$).

5

Таблица 2С. Клиренс ОМЛ из костного мозга		
Группа лечения	%hCD33+hCD45+ (% от лейкоцитов)	%hCD45+ (% от лейкоцитов)
I: не подвергавшиеся воздействию (без опухолей)	0,03	0,09
	0	0,03
А: контроль с носителем	89,98	89,95
	97,76	97,61
	98,53	98,36
	88,68	88,66
	97,56	97,49
В: 3,3 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о	72,73	72,6
	84,3	84,16
	99,41	99,3
	91,97	91,11
G: 1 мг/кг азациитидина, (1 р/сут x 5, отдых 2)X2, 14 дней перерыва	49,81	49,85
	60,61	61
	72,4	72,52
	43,12	43,15
Н: 3,3 мг/кг Соединения А 1 р/сут + 1 мг/кг азациитидина	36,77	36,23
	15,91	15,57
	20,45	20,21
	10,57	10,32

Для каждой соответствующей группы лечения % клиренса ОМЛ из костного мозга составил:

А: носитель (94%); В: Соединение А (87%); G: азациитидин (55%); и Н: Соединение А + азациитидин (19%) ($p = 0,0032$).

10

Таблица 2D. Ингибирование 2-HG в плазме			
Группа лечения	2-HG (мкМ)	2-HG (мкМ) за вычетом уровня у не подвергавшихся воздействию животных	% ингибирования 2-HG
А: контроль с носителем	8,25	5,314	22,555
	10,67	7,733	-12,702
	9,426	6,489	5,426
	12,054	9,118	-32,879
	11,571	8,635	-25,843
	11,39	8,454	-23,204
	5,225	2,289	66,648
G: 3,3 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о	1,701	-1,236	118,011
	3,072	0,135	98,032
	2,049	-0,888	112,937
	1,022	-1,915	127,909
	1,374	-1,562	122,77
	1,654	-1,282	118,689
	2,13	-0,807	111,758
Н: 1 мг/кг азациитидина, в/б, (1 р/сут x 5, отдых 2)X2, 14 дней перерыва	7,539	4,603	32,923
	8,241	5,305	22,691
	5,896	2,959	56,872
	6,243	3,307	51,81
	4,624	1,688	75,405
	4,775	1,838	73,207
	6,422	3,486	49,201
Е: 3,3 мг/кг Соединения А + 1 мг/кг азациитидина	1,883	-1,054	115,358
	5,298	2,362	65,58
	1,379	-1,557	122,695
	1,189	-1,748	125,47
	1,602	-1,335	119,455
	2,97	0,033	99,516
	1,617	-1,32	119,232

Для каждой соответствующей группы лечения % 2-HG в плазме составил: А:

носитель (100%);

В: Соединение А (-15%); G: азациитидин (48%); и Н: Соединение А + азациитидин (-9,6%) (p

5 = 0,1714).

Таким образом, комбинация Соединения А и азациитидин усиливает подавление ОМЛ как в костном мозге, так и на периферии.

В экспериментах, проведенных по существу так, как описано выше, были получены результаты для комбинации Соединения А и мидостаурина, представленные в таблицах 3А-3D.

Таблица 3А. Клиренс ОМЛ (%hCD33+hCD45+ (от общего количества лейкоцитов))					
Дни лечения	А: контроль с носителем				
-8	4,5	13,37	3,12	2,61	Н/О
7	12,69	13,35	10,56	9,63	10,37
23	13,28	12,69	7,7	6,86	12,29
36	9,83	17,67	7,33	16,95	33,9
50	15,43	48,08	29,91	34,55	44,72
64	44,51	Н/О	Н/О	74,79	71,09
78	90,36	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
84	94,63	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
92	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
Дни лечения	В: 1 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о				
-8	6,97	3,7	3,2	7,02	11,07
7	12,21	7,04	6,97	8,4	10,28
23	16,54	9,05	Н/О	15,88	9,45
36	16,96	20,94	Н/О	15,66	13,65
50	26,13	48,71	Н/О	41,07	42,54
64	51,67	57,72	Н/О	55,61	45,53
78	65,17	75,95	Н/О	68,32	56,56
84	98,27	Н/О	Н/О	Н/О	84,52
92	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
Дни лечения	С: 10 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о				
-8	2,43	7,61	4,1	6,27	6,53
7	4,04	3,35	6,37	4,2	2,73
23	4,97	1,6	8,52	2,88	2,41
36	4,67	3,89	4,32	2,11	2,39
50	2,9	3,66	5,08	2,11	1,55
64	0,94	1,66	1,11	1,55	0,62
78	0,89	1,72	0,4	0,45	0,46
84	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
92	0,8	2,36	0,4	0,19	0,32
Дни лечения	F: 50 мг/кг мидостаурина, 1 р/сут, п/о				
-8	7,94	8,17		6,23	2,27
7	10,05	3,62	8,05	11,35	2,53
23	6,24	3,75	7,09	2,63	0,84
36	3,7	1,83	4,68	2,15	0,28
50	2,21	0,76	3,72	1,29	0,21
64	7,01	2,16	3,93	4,84	0,18
78	18,03	2,94	8,24	14,27	0,14
84	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
92	35,38	4,09	14,55	30,48	0,86
Дни лечения	I: 1 мг/кг Соединения А + 50 мг/кг мидостаурина				

-8		8,35	9,2	7,2	12,53
7	9,95	6,41	7,99	7,26	9,1
23	2,47	3,87	4,96	4,68	5,54
36	3,72	2,88	5,36	5,82	4,78
50	4,67	1,67	1,97	2,27	1,5
64	7,26	1,1	0,79	0,62	1,02
78	5,67	2,82	1,36	0,37	1,36
84	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
92	3,52	3,73	1,55	0,78	2,06
Дни лечения	L: 10 мг/кг Соединения А + 50 мг/кг мидостаурина				
-8	3,21	4,02	5,9	5,19	
7	5,44	3,71	5,65	3,23	7,26
23	5,1	3,97	1,58	2,76	2,45
36	2,55	1,5	0,89	1,67	1,31
50	Н/О	0,47	0,39	1,11	0,41
64	Н/О	0,16	0,77	0,66	0,9
78	Н/О	Н/О	0,26	0,48	0,28
84	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О
92		0,02	0,3	0,41	0,49

Каждый столбец представляет собой данные по одному животному.

На 50-й день для каждой соответствующей группы лечения % клеток ОМЛ в плазме составил: А: носитель (32%); В: 1 мг Соединения А (37%); F: мидостаурин (1,1%);
5 и I: 1 мг Соединения А + мидостаурин (2,2%) ($p = 0,473$).

На 50-й день для каждой соответствующей группы лечения % клеток ОМЛ в плазме составил:

А: носитель (32%); С: 10 мг Соединения А (2,8%); F: мидостаурин (1,1%); и L: 10 мг Соединения А + мидостаурин (0,6%) ($p = 0,016$).

10 На 64-й день для каждой соответствующей группы лечения % клеток ОМЛ в плазме составил:

А: носитель (67%); В: 1 мг Соединения А (51%); F: мидостаурин (2,2%); и I: 1 мг Соединения А + мидостаурин (1,3%) ($p = 0,767$).

15 На 64-й день для каждой соответствующей группы лечения % клеток ОМЛ в плазме составил:

А: носитель (67%); С: 10 мг Соединения А (1,1%); F: мидостаурин (2,2%); и L: 10 мг Соединения А + мидостаурин (0,56%) ($p < 0,001$).

На 78-й день для каждой соответствующей группы лечения % клеток ОМЛ в плазме составил:

20 А: носитель (129%); В: 1 мг Соединения А (65%); F: мидостаурин (3,9%); и I: 1 мг Соединения А + мидостаурин (1,6%) ($p = 0,829$).

На 78-й день для каждой соответствующей группы лечения % клеток ОМЛ в плазме составил:

А: носитель (129%); С: 10 мг Соединения А (0,66%); F: мидостаурин (3,9%); и
L: 10 мг Соединения А + мидостаурин (0,25%) ($p < 0,001$).

5

Таблица 3В. Дифференцировка клеток ОМЛ (%hCD33+hCD11b+ (от hCD45+ клеток))					
Дни лечения	А: контроль носителем, 1 р/сут, п/о				
-8	22,44	21,66	26,02	23,22	Н/О
7	18,12	25,32	17,42	14,82	11,49
23	27,28	34,92	34,06	31,95	18,48
36	21,05	23,41	29,15	18,71	14,51
50	28,27	22,95	35,27	27,87	26,53
Дни лечения	В: 1 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о				
-8	19,01	16,75	18,21	15,94	14,64
7	24,79	18,62	18,4	20,43	22,79
23	57,17	53,16	Н/О	47,84	49,9
36	48,72	38,84	Н/О	42,4	42,69
50	46,97	50,22	Н/О	37,55	38,56
Дни лечения	С: 10 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о				
-8	22,89	20,16	18,9	18,51	23,52
7	28,5	44,67	21,82	37,68	30,22
23	66,4	65,68	78,04	75,09	68,25
36	76,97	73,58	78	69,41	81,2
50	78,52	72,99	88,65	77,31	73,29
Дни лечения	F: 50 мг/кг мидостаурина, 1 р/сут, п/о				
-8	19,58	13,81	Н/О	18,12	19,57
7	25,48	12,53	9	38,3	27,14
23	25,27	17,13	9,1	36,3	25,56
36	45,81	34,03	21,16	47,53	25,64
50	43,86	28,75	20,78	40	30,3
Дни лечения	I: 1 мг/кг Соединения А + 50 мг/кг мидостаурина				
-8	Н/О	27,16	14,82	13,64	15,56
7	6,19	35,53	38,62	26,25	35,64
23	21,9	47,38	57,06	49,79	49,38
36	73,19	75,68	75,81	75,25	71,95
50	82,4	81,67	81,4	78,57	83,12
Дни лечения	L: 10 мг/кг Соединения А + 50 мг/кг мидостаурина				
-8	22,32	23,13	15,11	13,9	Н/О
7	31,82	20,84	44,46	27,84	7,91
23	60,18	56,54	51,23	46,59	57,2
36	74,62	76,43	71	76,16	75,97
50	Н/О	83,67	79,55	65,22	85,37

Каждый столбец представляет собой данные по одному животному.

На 50-й день для каждой соответствующей группы лечения % дифференцировки клеток ОМЛ составил:

А: носитель (28%); В: 1 мг Соединения А (43%); F: мидостаурин (33%); и I: 1 мг Соединения А + мидостаурин (81%) ($p < 0,001$).

5 На 50-й день для каждой соответствующей группы лечения % дифференцировки клеток ОМЛ составил:

А: носитель (28%); С: 10 мг Соединения А (79%); F: мидостаурин (33%); и L: 10 мг Соединения А + мидостаурин (80%) ($p < 0,776$).

Таблица 3С. Клиренс ОМЛ из костного мозга		
Группа лечения	%hCD33+hCD45+ (% от лейкоцитов)	%hCD45+ (% от лейкоцитов)
А: контроль носителем, 1 р/сут, п/о	88,33	88,33
	83,21	84,57
В: 1 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о	87,74	88,34
	92,23	92,36
С: 10 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о	8,65	8,66
	4,27	4,28
	1,09	1,11
	0,78	0,78
	1,84	1,85
F: 50 мг/кг мидостаурина, 1 р/сут, п/о	51,84	51,3
	6,3	6,25
	22,34	22,22
	59,24	58,42
I: 1 мг/кг Соединения А + 50 мг/кг мидостаурина	25,84	25,71
	26,83	26,89
	69,53	69,55
	48,59	48,57
L: 10 мг/кг Соединения А + 50 мг/кг мидостаурина	4,78	4,77
	6,7	6,72
	0,02	0,05
	1,38	1,5
	1,17	1,32
	0,88	1,13

10

Для каждой соответствующей группы лечения % клиренса ОМЛ из костного мозга составил:

А: носитель (86%); В: 1 мг Соединения А (90%); F: мидостаурин (26%); и I: 1 мг Соединения А + мидостаурин (19%) ($p = 0,828$).

15

Для каждой соответствующей группы лечения % клиренса ОМЛ из костного мозга составил:

А: носитель (86%); С: 10 мг Соединения А (2,3%); F: мидостаурин (26%); и L: 1 мг Соединения А + мидостаурин (0,58%) ($p = 0,906$).

5

Таблица 3D. Ингибирование 2-HG в плазме			
Группа лечения	2-HG (мкМ)	2-HG (мкМ) за вычетом уровня у не подвергавшихся воздействию животных	% ингибирования 2-HG
А: контроль носителем, 1 р/сут, п/о	16,715	14,306	5,381
	18,567	16,158	-6,87
	18,538	16,129	-6,679
	16,293	13,884	8,168
В: 1 мг/кг Соединения А, 1 р/сут, п/о	9,264	6,855	54,663
	6,489	4,08	73,015
	7,318	4,909	67,532
	8,683	6,274	58,504
	8,938	6,529	56,818
С: 10 мг/кг Соединения А	4,821	2,412	84,049
	4,395	1,986	86,867
	4,286	1,877	87,584
	3,033	0,624	95,874
	2,863	0,454	97
F: 50 мг/кг мидостаурина, 1 р/сут, п/о	14,919	12,51	17,254
	11,402	8,993	40,521
	7,494	5,085	66,37
	21,55	19,141	-26,601
	10,075	7,666	49,298
I: 1 мг/кг Соединения А + 50 мг/кг мидостаурина	7,592	5,183	65,72
	3,872	1,463	90,325
	4,964	2,555	83,099
	4,405	1,996	86,799
	6,924	4,515	70,135
L: 10 мг/кг Соединения А + 50 мг/кг мидостаурина	2,011	-0,398	102,635
	3,914	1,505	90,046
	2,572	0,163	98,924
	2,728	0,319	97,888
	6,005	3,596	76,217

Для каждой соответствующей группы лечения % 2-HG в плазме составил: А: носитель (100%);

В: 1 мг Соединения А (38%); F: мидостаурин (70%); и I: 1 мг Соединения А + мидостаурин (21%) ($p = 0,789$).

Для каждой соответствующей группы лечения % 2-НГ в плазме составил: А: носитель (100%);

5 С: 10 мг Соединения А (9,2%); F: мидостаурин (70%); и L: 10 мг Соединения А + 10 мг мидостаурина (6,8%) ($p = 0,373$).

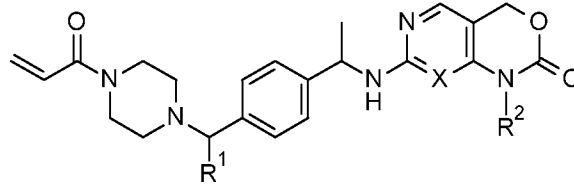
Таким образом, комбинация Соединения А и мидостаурина усиливает подавление ОМЛ как в костном мозге, так и на периферии.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий введение субъекту-человеку с раком, имеющему мутацию IDH, терапевтически эффективного количества

5

(а) первого соединения формулы:



где:

10

R¹ представляет собой -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂OCH₃ или -CH₂-циклопропил;

R² представляет собой -CH₃ или -CH₂CH₃; и

X представляет собой N или CH,

или его фармацевтически приемлемой соли; и

15

(b) одного или более вторых соединений, которые представляют собой антимеритолит или его фармацевтически приемлемую соль, гипометилирующий агент или его фармацевтически приемлемую соль или ингибитор мутантного Flt3 или его фармацевтически приемлемую соль.

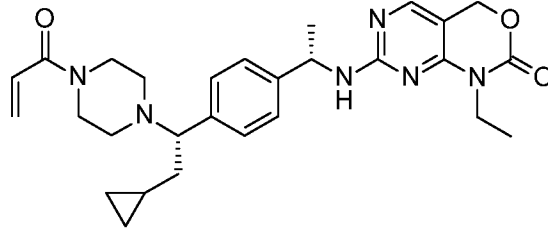
2. Способ по п. 1, где мутация IDH представляет собой мутацию IDH1.
- 20 3. Способ по п. 2, где мутация IDH1 представляет собой мутацию R132 в IDH1.
4. Способ по п. 1, где мутация IDH представляет собой мутацию IDH2.
5. Способ по п. 4, где мутация IDH2 представляет собой мутацию R140 в IDH2 или R172 в IDH2.
- 25 6. Способ по п. 1, где в первом соединении X представляет собой N, или его фармацевтически приемлемая соль.
7. Способ по п. 1, где X представляет собой N, R¹ представляет собой -CH₂-циклопропил и R² представляет собой -CH₂CH₃, или его фармацевтически приемлемая соль.
- 30 8. Способ по п. 1, где первое соединение представляет собой:

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

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

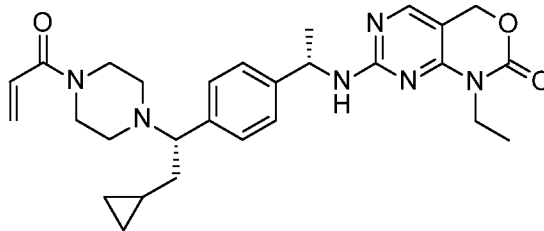
5 1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4Н-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он; или его фармацевтически приемлемую соль.

9. Способ по п. 1, где первое соединение имеет формулу:



или его фармацевтически приемлемую соль.

10 10. Способ по п. 9, где первое соединение представляет собой:



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

12. Способ по п. 11, где рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному, рак головы и шеи, хондросаркому, гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рак поджелудочной железы, астроцитому, олигодендроглиому, глиому, глиобластому, карциному мочевого пузыря, колоректальный рак, рак легкого или синоназальную недифференцированную карциному.

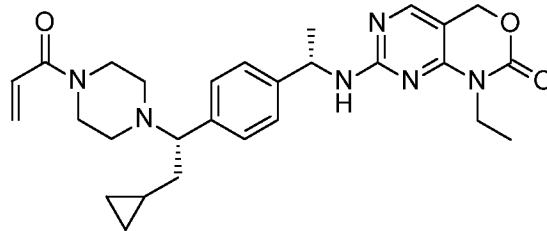
13. Способ по п. 12, где рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному.

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

15. Способ по п. 14, где гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром/миелопролиферативное новообразование, ангиоиммуобластную Т-клеточную лимфому, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, истинную полицитемию, эссенциальную

тромбоцитемии, первичный миелофиброз или хронический миелогенный лейкоз.

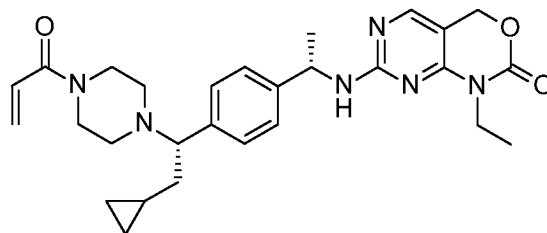
16. Способ по п. 15, где гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз.
- 5 17. Способ по п. 1, где второе соединение представляет собой антиметаболит или его фармацевтически приемлемую соль.
18. Способ по п. 17, где антиметаболит представляет собой цитарабин или его фармацевтически приемлемую соль.
19. Способ по п. 1, где первое соединение представляет собой



10

рак представляет собой острый миелоидный лейкоз и соединение, являющееся вторым агентом, представляет собой цитарабин.

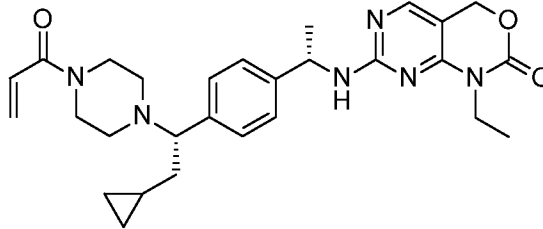
20. Способ по п. 1, где второе соединение представляет собой гипометилирующий агент или его фармацевтически приемлемую соль.
- 15 21. Способ по п. 20, дополнительно включающий введение указанному субъекту-человеку с раком терапевтически эффективного количества ингибитора Vcl-2 или его фармацевтически приемлемой соли.
22. Способ по п. 20, где гипометилирующий агент представляет собой азациитидин или его фармацевтически приемлемую соль.
- 20 23. Способ по п. 22, дополнительно включающий введение указанному субъекту-человеку с раком терапевтически эффективного количества венетоклакса или его фармацевтически приемлемой соли.
24. Способ по п. 1, где первое соединение представляет собой



25

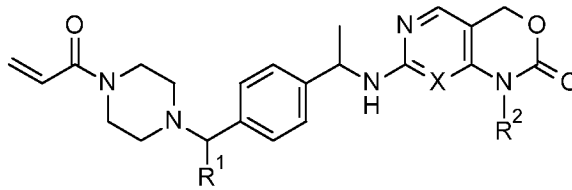
рак представляет собой острый миелоидный лейкоз и второе соединение представляет собой азациитидин.

25. Способ по п. 24, дополнительно включающий введение указанному субъекту-человеку с раком терапевтически эффективного количества венетоклакса.
26. Способ по п. 24, где ингибитор мутантного Flt3 представляет собой мидостаурин или его фармацевтически приемлемую соль.
27. Способ по п. 1, где первое соединение представляет собой



рак представляет собой острый миелоидный лейкоз и ингибитор мутантного Flt3 представляет собой мидостаурин.

28. Соединение формулы:



где:

R¹ представляет собой -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂OCH₃ или -CH₂-циклопропил;

R² представляет собой -CH₃ или -CH₂CH₃; и

X представляет собой N или CH,

или его фармацевтически приемлемой соли;

для применения в комбинации с одним или более из антималярия или его фармацевтически приемлемой соли, гипометилирующего агента или его фармацевтически приемлемой соли или ингибитора мутантного Flt3 или его фармацевтически приемлемой соли,

для лечения рака у субъекта-человека, имеющего мутацию IDH.

29. Соединение для применения по п. 28, где мутация IDH представляет собой мутацию IDH1.
30. Соединение для применения по п. 29, где мутация IDH1 представляет собой мутацию R132 в IDH1.
31. Соединение для применения по п. 28, где мутация IDH представляет собой мутацию IDH2.

32. Соединение для применения по п. 31, где мутация IDH2 представляет собой мутацию R140 в IDH2 или R172 в IDH2.

33. Соединение для применения по п. 28, где X представляет собой N, или его фармацевтически приемлемая соль.

5 34. Соединение для применения по п. 28 или п. 33, где R¹ представляет собой –CH₂-циклопропил, или его фармацевтически приемлемая соль.

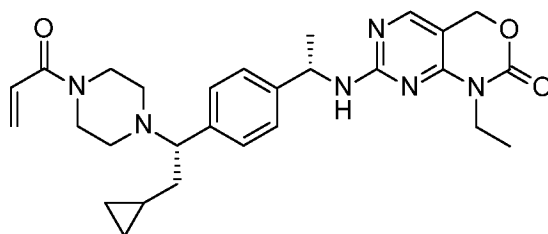
35. Соединение для применения по любому из пп. 28, 33 или 34, где R² представляет собой –CH₂CH₃, или его фармацевтически приемлемая соль.

10 36. Соединение для применения по п. 28, где соединение представляет собой:
7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-циклопропил-1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)этил]фенил]этил]амино]-1-этил-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;

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

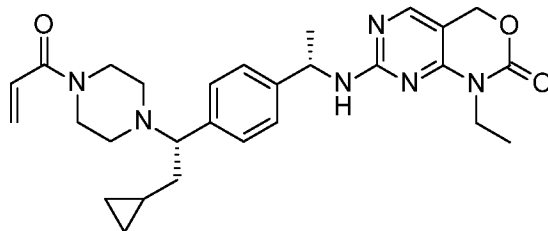
15 1-этил-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-проп-2-еноилпиперазин-1-ил)пропил]фенил]этил]амино]-4H-пиримидо[4,5-d][1,3]оксазин-2-он;
или его фармацевтически приемлемую соль.

37. Соединение для применения по п. 28, где соединение представляет собой:



20 или его фармацевтически приемлемую соль.

38. Соединение для применения по п. 37, где соединение представляет собой:



25 39. Соединение для применения по любому из пп. 28-38, где рак представляет собой рак в виде солидной опухоли.

40. Соединение для применения по п. 39, где рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному, рак головы и шеи, хондросаркому,

гепатоцеллюлярную карциному, меланому, рак поджелудочной железы, астроцитому, олигодендроглиому, глиому, глиобластому, карциному мочевого пузыря, колоректальный рак, рак легкого или синоназальную недифференцированную карциному.

- 5 41. Соединение для применения по п. 40, где рак в виде солидной опухоли представляет собой холангиокарциному.
42. Соединение для применения по любому из пп. 28-38, где рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание.
- 10 43. Соединение для применения по п. 42, где гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром/миелопролиферативное новообразование, ангиоиммуобластную Т-клеточную лимфому, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, истинную полицитемию, эссенциальную тромбоцитемию, первичный миелофиброз или хронический миелогенный лейкоз.
- 15 44. Соединение для применения по п. 43, где гематологическое злокачественное заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз.
45. Соединение для применения по любому из пп. 28-44 для применения в комбинации с антиметаболитом.
- 20 46. Соединение для применения по п. 45, где антиметаболит представляет собой цитарабин или его фармацевтически приемлемую соль.
47. Соединение для применения по любому из пп. 28-44 для применения в комбинации с гипометилирующим агентом.
48. Соединение для применения по п. 47 в дополнительной комбинации с ингибитором Vcl-2 или его фармацевтически приемлемой солью.
- 25 49. Соединение для применения по п. 47, где гипометилирующий агент представляет собой азациитидин или его фармацевтически приемлемую соль.
50. Соединение для применения по п. 48 в комбинации с венетоклаксом или его фармацевтически приемлемой солью.
- 30 51. Соединение для применения по п. 49 в комбинации с венетоклаксом.
52. Соединение для применения по п. 28, где ингибитор мутантного Flt3 представляет собой мидостаурин или его фармацевтически приемлемую соль.