

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390152** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.28

(22) Дата подачи заявки
2021.06.24

(51) Int. Cl. *A61K 31/437* (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)

**(54) КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРА БРОМОДОМЕНА СВР/p300 И ИНГИБИТОРА KRAS
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) **20182364.8**

(32) **2020.06.25**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/067349**

(87) **WO 2021/260111 2021.12.30**

(71) Заявитель:
ТОЛРЕМО ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

**Флюкигер-Мангуал Штефани, Грубер
Доротеа, Бонакер Томас, Швилл
Мартин, Шмитц-Ромер Дебора,
Фабрициус Чарлз-Генри, Лаудато
Сара (CH)**

(74) Представитель:

**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)**

(57) Изобретение, среди прочего, относится к (i) комбинации ингибитора бромодомена СВР/p300 и ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS; (ii) к набору, содержащему (a) фармацевтическую дозированную форму, содержащую ингибитор бромодомена СВР/p300, и (b) фармацевтическую дозированную форму, содержащую ингибитор KRAS; и (iii) к фармацевтической дозированной форме, содержащей ингибитор бромодомена СВР/p300 и ингибитор KRAS.

A1

202390152

202390152

A1

КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРА БРОМОДОМЕНА СВР/Р300 И ИНГИБИТОРА KRAS ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к области лечения рака. В частности, настоящее изобретение относится к комбинации ингибитора бромодомена СВР/р300 и ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего раком, при котором рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему фармацевтическую дозированную форму, содержащую ингибитор бромодомена СВР/р300, и фармацевтическую дозированную форму, содержащую ингибитор KRAS. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической дозированной форме, содержащей ингибитор бромодомена СВР/р300 и ингибитор KRAS.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Мутации KRAS имеют место в 25% случаев рака, при этом онкогенные варианты имеют разную степень распространенности при разных видах рака (см. Вох 1 в публикации Mullard, Nature Reviews DRUG DISCOVERY, Vol. 18, December 2019: 887-891). Так например, мутации KRAS у человека встречаются при раке с частотой 90% в поджелудочной железе, 30-50% в толстой кишке, 35% в тонкой кишке, 26% в желчных путях, 17% в эндометрии, 19% в легком, 1% в коже (меланома), 8% в шейке матки и 5% в мочевыводящих путях (см. Таблицу 1 в публикации Li et al, Nature Reviews Cancer 18, 767-777 (2018)). Соответственно, существует большой интерес к агентам, которые блокируют передачу сигналов пролиферации, индуцированную онкогенными вариантами KRAS.

KRAS в течение десятилетий считался мишенью, которая не поддается лечению, но в настоящее время в клинической практике имеется по меньшей мере пять средств, модулирующих KRAS (см. Таблицу 1 в публикации Mullard, указанной выше). Принимая во внимание предварительные клинические данные о применении перспективных ингибиторов KRAS в качестве средств монотерапии при немелкоклеточном раке легкого и колоректальном раке, которые выглядят многообещающе, комбинированные стратегии, которые могут обеспечить более глубокие и продолжительные ответы, уже рассматриваются и тестируются в клинических исследованиях, таких как NCT04185883 и NCT03785249. Примерами такой комбинированной терапии являются комбинация AMG510 (соторасиб) или MRTX849 с пембролизумабом, комбинация ингибитора KRAS и

ингибитора SHP2, а также ингибитора KRAS и ингибитора CDK4 (см. абзац со стр. 888 на стр. 889 в публикации Mullard, указанной выше).

Таким образом, существует потребность в дальнейших комбинированных стратегиях, которые также приводили бы к более глубоким и продолжительным ответам, и в идеале - к комбинированной стратегии, которая преодолевает снижение эффекта действия ингибитора KRAS с течением времени при введении его в виде одного агента (или при введении в комбинации с другими противораковыми средствами).

Цели и краткое раскрытие настоящего изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что ингибитор бромодомена CBP/p300, т.е. ингибитор бромодомена, селективно связывающийся с бромодоменом CBP/p300, обеспечивает эффективное лечение рака с онкогенным изменением в KRAS при введении его в комбинации с ингибитором KRAS, в то время как ингибитор бромодомена CBP/p300 не влияет на клеточную пролиферацию раковых клеток при введении его отдельно. Другими словами, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что комбинация ингибитора бромодомена CBP/p300 и ингибитора KRAS более эффективна при лечении рака, характеризующегося онкогенным изменением в KRAS, по сравнению с эффектом, который любой из этих двух активных агентов, применяемых отдельно, оказывает на рак, характеризующийся онкогенным изменением в KRAS. Таким образом, как отмечено выше, ингибитор бромодомена CBP/p300 не оказывает эффекта в случае его отдельного применения (где «отсутствие эффекта», в частности, означает отсутствие объективных ответов, определенных критериями ответа RECIST 1.1, в отношении целевых поражений или нецелевых поражений у субъекта), а эффект от действия ингибитора KRAS, в случае его отдельного применения, снижается со временем, вероятно, из-за развития резистентности к ингибитору KRAS.

В первом аспекте настоящее изобретение направлено на комбинацию (i) ингибитора бромодомена CBP/p300 и (ii) ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. Первый аспект может также представлять собой комбинацию (i) ингибитора бромодомена CBP/p300 и (ii) ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется мутационным профилем KRAS, в одном или нескольких показаниях для применения ингибитора KRAS (такого как KRAS G12C), указанных на этикетке/вкладыше комбинации, или где рак характеризуется мутационным профилем

KRAS, на который в условиях клинического испытания нацелен ингибитор KRAS (такой как KRAS G12C), используемый в этой комбинации.

В предпочтительном варианте осуществления первого аспекта онкогенное изменение в KRAS приводит к сверхактивации сигнального пути KRAS. Онкогенное изменение в KRAS может даже привести к конститутивно активному сигнальному пути KRAS (в том смысле, что сигнальная активность KRAS, а именно связывание KRAS с GTP, конститутивно активна).

В другом предпочтительном варианте осуществления первого аспекта онкогенное изменение в KRAS вызвано по меньшей мере одной мутацией оснований в гене KRAS, приводящей к аминокислотной замене в KRAS, выбранной из группы, состоящей из G12C, G12V, G12D, G13D, Q61H, Q61L, Q61R, K117N и их комбинации. Может быть предпочтительным, чтобы онкогенное изменение было вызвано по меньшей мере одной мутацией оснований в гене KRAS, приводящей к аминокислотной замене в KRAS, выбранной из группы, состоящей из G12C, G12V и G12D. Наиболее предпочтительно, чтобы онкогенное изменение в KRAS было вызвано по меньшей мере одной мутацией в гене KRAS, приводящей к аминокислотной замене G12C в KRAS.

В другом варианте осуществления первого аспекта рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, колоректального рака и рака поджелудочной железы. Рак легкого предпочтительно представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) и может быть местно-распространенным или метастатическим НМРЛ, наиболее предпочтительно местно-распространенным или метастатическим НМРЛ с мутацией G12C в KRAS (как используется здесь, это эквивалентно альтернативной формулировке как лечение пациента, страдающего НМРЛ, необязательно местно-распространенного или метастатического НМРЛ, где НМРЛ характеризуется онкогенным изменением G12C в KRAS).

В другом варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/p300 представляет собой низкомолекулярный ингибитор. Таким образом, в таком варианте осуществления изобретения ингибитор бромодомена СВР/p300 не является ингибитором на основе нуклеиновой кислоты, таким как, например, кшРНК или РНКи, действие которых направлено на СВР и/или p300.

В другом варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения ингибитор KRAS представляет собой низкомолекулярный ингибитор. Таким образом, в таком варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор KRAS не является ингибитором на основе нуклеиновой кислоты, таким как, например, кшРНК или РНКи, направленные на KRAS. В дополнительном варианте осуществления первого аспекта

настоящего изобретения ингибитор KRAS нацелен на KRAS G12C, т.е. нацелен на лечение рака, который характеризуется онкогенным изменением G12C в KRAS. Такой ингибитор может, в частности, представлять собой ковалентный ингибитор, который нацелен на цистеин в положении 12, присутствующий в KRAS G12C, посредством ковалентных взаимодействий.

Ингибитор бромодомена CBP/p300 может быть выбран из группы, состоящей из соединения А, соединения С, соединения 00030, соединения 00071, соединения CCS1477, соединения GNE-781, соединения GNE-049, соединения SGC-CBP30, соединения CPI-637, соединения FT-6876, соединения 462, соединения 424 и соединения 515. Эти соединения либо коммерчески доступны, либо публично раскрыты, как описано ниже, или их синтез и структуры показаны в примерах настоящей заявки. Предпочтительно, чтобы ингибитор бромодомена CBP/p300 был выбран из группы, состоящей из соединения А, соединения С, соединения CCS1477, соединения GNE-781, соединения GNE-049, соединения CPI-637, соединения 462, соединения 424 и соединения 515.

Ингибитор KRAS может быть выбран из группы, состоящей из соединений AMG510, MRTX849, JNJ-74699157/ARS-3248, BI 1701963, BI 1823911, BAY-293, GDC-6036, MRTX1133, ингибитора RAS(ON) (где ингибитор RAS(ON) предпочтительно представляет собой соединения RMC-6291 или RMC-6236) и их комбинаций. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор KRAS представляет собой соединение AMG510 или MRTX849. Наиболее предпочтительно, чтобы ингибитор KRAS представлял собой соединение AMG510.

Следует понимать, что комбинация (i) и (ii), упоминаемая здесь, может быть открытой или закрытой комбинацией. Таким образом, комбинация (i) и (ii) настоящего изобретения может быть использована для лечения пациента, страдающего от рака, при котором рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS, и при этом (i) и (ii) являются единственными активными агентами («закрытая» комбинация). Однако альтернативно комбинация (i) и (ii) может быть использована для лечения пациента, страдающего раком, при котором рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS, и где может быть введен по меньшей мере один дополнительный активный агент (iii), например, активный агент (iii), выбранный из группы, состоящей из ингибитора PD1, ингибитора MEK, аллостерического ингибитора SHP2, ингибитора тирозинкиназы Pan-ErbB, ингибитора PD-L1, ингибитора EGFR, химиотерапевтического препарата, ингибитора mTOR, ингибитора CDK, ингибитора VEGF, пембролизумаба, цетуксимаба, атезолизумаба, бевацизумаба и комбинаций любого из вышеперечисленных («открытая» комбинация).

В предпочтительном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения комбинацию вводят пациенту во время каждого цикла лечения.

В другом варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/р300 и ингибитор KRAS вводят в виде отдельных дозированных лекарственных форм или их включают в одну дозированную лекарственную форму. Если ингибитор бромодомена СВР/р300 и ингибитор KRAS вводят в виде отдельных дозированных лекарственных форм, то введение в течение каждого цикла лечения может осуществляться одновременно или последовательно. Это включает вариант, при котором сначала вводят ингибитор бромодомена СВР/р300, а затем вводят ингибитор KRAS.

В еще одном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения лечение приводит к увеличению продолжительности терапевтического действия ингибитора KRAS по сравнению с продолжительностью терапевтического действия ингибитора KRAS, при введении его в качестве единственного активного агента. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения лечение приводит к повышенной терапевтической эффективности ингибитора KRAS по сравнению с терапевтической эффективностью ингибитора KRAS при введении его в качестве единственного активного агента. В другом варианте осуществления настоящего изобретения лечение приводит к предотвращению резистентности к ингибитору KRAS.

В другом варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/р300 вводят в суточной дозе от приблизительно 1 мг до приблизительно 3000 мг, предпочтительно от приблизительно 10 мг до приблизительно 2000 мг, более предпочтительно от приблизительно 15 мг до приблизительно 1000 мг. Может быть предпочтительным введение ингибитора бромодомена СВР/р300 в суточной дозе равной приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 1000 мг, приблизительно 1500 мг, приблизительно 2000 мг, приблизительно 2500 мг или приблизительно 3000 мг. Введение может происходить с перерывами, т.е. не каждый день, но в день введения может быть введено вышеуказанное суточное количество. Если в качестве ингибитора бромодомена СВР/р300 используют соединение CCS1477, соединение 462, соединение 424 или соединение 515, то соответствующее соединение можно вводить в суточной дозе от приблизительно 10 мг до приблизительно 600 мг.

В другом варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения ингибитор KRAS вводят в суточной дозе, которая находится в диапазоне типичной суточной дозы (в частности, суточной дозы, указанной для ингибитора KRAS на этикетке/вкладыше, если она указана), когда ингибитор KRAS назначают в качестве

единственного активного агента. Типичная суточная доза (или указанная суточная доза, если она указана) зависит от конкретного ингибитора KRAS, который будет использоваться. Обычно ингибитор KRAS вводят в суточной дозе от приблизительно 10 мг до приблизительно 2000 мг. Так, например, AMG510 можно вводить в комбинации для применения по настоящему изобретению в суточной дозе от приблизительно 240 мг до приблизительно 1200 мг, от приблизительно 480 мг до приблизительно 1200 мг или от приблизительно 600 мг до приблизительно 1200 мг, предпочтительно от приблизительно 240 мг до приблизительно 1200 мг, предпочтительно от приблизительно 720 мг до приблизительно 1080 мг, и более предпочтительно - от приблизительно 840 мг до приблизительно 960 мг, или в дозе приблизительно равной 960 мг. Например, MRTX849 можно вводить в комбинации для применения по настоящему изобретению в суточной дозе от приблизительно 200 мг до приблизительно 1400 мг или от приблизительно 400 мг до приблизительно 1300 мг, предпочтительно от приблизительно 600 мг до приблизительно 1200 мг, и наиболее предпочтительно - в дозе приблизительно равной 1200 мг.

В другом варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения ингибитор KRAS вводят в суточной дозе, которая ниже указанной выше типичной суточной дозы, когда ингибитор KRAS вводят в качестве единственного активного агента. Другими словами, если ингибитор KRAS вводят не в качестве единственного активного агента, а в комбинации для применения в соответствии с настоящим изобретением, то ингибитор KRAS можно вводить в меньшем количестве, чем количество, используемое при введении ингибитора KRAS в качестве единственного активного агента. Например, для приведенных выше примеров это означает, что суточное количество будет находиться у нижних границ заданных диапазонов или даже ниже границ этих диапазонов.

В еще одном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) ингибитора бромодомена CBP/p300 и (ii) ингибитора KRAS G12D (предпочтительно MRTX1133) для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется онкогенным изменением G12D в KRAS. Кроме того, в этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы рак был выбран из группы, состоящей из рака легкого, предпочтительно NSCLC, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) ингибитора бромодомена CBP/p300 и (ii) ингибитора KRAS G12C для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется онкогенным изменением G12C в

KRAS. Кроме того, в этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы рак был выбран из группы, состоящей из рака легкого, предпочтительно NSCLC, колоректального рака и рака поджелудочной железы. Рак легкого может быть предпочтительным. Также может быть предпочтительным, чтобы ингибитор KRAS G12C был выбран из группы, состоящей из соединений AMG510, MRTX849, JNJ-74699157/ARS-3248, BI 1823911, GDC-6036, ингибитора RAS G12C (ON) (где RAS G12C (ON) ингибитор предпочтительно представляет собой RMC-6291) и их комбинаций; предпочтительно, когда ингибитор KRAS G12C представляет собой AMG510 или MRTX849.

В другом предпочтительном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) ингибитора бромодомена CBP/p300 и (ii) ингибитора KRAS G12C, предпочтительно AMG510 или MRTX849, для применения при лечении пациента, страдающего от местно-распространенного или метастатического НМРЛ, который получил по крайней мере одну предшествующую системную терапию, где НМРЛ характеризуется онкогенным изменением G12C в KRAS.

В еще одном варианте осуществления первого аспекта осуществления настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) соединения А и (ii) ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. В этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительным, чтобы ингибитор KRAS представлял собой ингибитор KRAS G12C, предпочтительно AMG510 или MRTX849, и чтобы рак характеризовался онкогенным изменением G12C в KRAS. Кроме того, в этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы рак был выбран из группы, состоящей из рака легкого, предпочтительно NSCLC, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

В еще одном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) соединения С и (ii) ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. В этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительным, чтобы ингибитор KRAS представлял собой ингибитор KRAS G12C, предпочтительно AMG510 или MRTX849, и чтобы рак характеризовался онкогенным изменением G12C в KRAS. Кроме того, в этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы рак был выбран из группы, состоящей из рака легкого, предпочтительно NSCLC, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

В еще одном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) соединения CCS1477 и (ii) ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего от рака, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. В этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительным, чтобы ингибитор KRAS представлял собой ингибитор KRAS G12C, предпочтительно AMG510 или MRTX849, и чтобы рак характеризовался онкогенным изменением G12C в KRAS. Кроме того, в этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы рак был выбран из группы, состоящей из рака легкого, предпочтительно NSCLC, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

В еще одном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) соединения GNE-781 или GNE-049 и (ii) ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. В этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительным, чтобы ингибитор KRAS представлял собой ингибитор KRAS G12C, предпочтительно AMG510 или MRTX849, и чтобы рак характеризовался онкогенным изменением G12C в KRAS. Кроме того, в этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы рак был выбран из группы, состоящей из рака легкого, предпочтительно NSCLC, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

В еще одном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) соединения CPI-637 и (ii) ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего от рака, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. В этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительным, чтобы ингибитор KRAS представлял собой ингибитор KRAS G12C, предпочтительно AMG510 или MRTX849, и чтобы рак характеризовался онкогенным изменением G12C в KRAS. Кроме того, в этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы рак был выбран из группы, состоящей из рака легкого, предпочтительно NSCLC, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

В еще одном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) соединения 462, соединения 424 или соединения 515 и (ii) ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. В этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительным, чтобы

ингибитор KRAS представлял собой ингибитор KRAS G12C, предпочтительно AMG510 или MRTX849, и чтобы рак характеризовался онкогенным изменением G12C в KRAS. Кроме того, в этом варианте осуществления настоящего изобретения может быть предпочтительно, чтобы рак был выбран из группы, состоящей из рака легкого, предпочтительно NSCLC, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

В особенно предпочтительном варианте осуществления первого аспекта настоящего изобретения, изобретение направлено на комбинацию (i) ингибитора бромодомена CBP/p300, где ингибитор бромодомена CBP/p300 представляет собой низкомолекулярный ингибитор, и (ii) ингибитора KRAS, где ингибитор KRAS представляет собой низкомолекулярный ингибитор KRAS G12C (предпочтительно выбранный из группы, состоящей из AMG510, MRTX849, JNJ-74699157/ARS-3248, BI 1823911, GDC-6036, ингибитора RAS G12C (ON) [предпочтительно RMC-6291] и их комбинаций, наиболее предпочтительно - из AMG510 или MRTX849), для применения при лечении пациента, страдающего раком, где рак характеризуется онкогенным изменением G12C в KRAS. Кроме того, в этом варианте осуществления может быть предпочтительно, чтобы рак был выбран из группы, состоящей из рака легкого, предпочтительно NSCLC, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

Во втором аспекте настоящего изобретения, изобретение относится к набору, включающему (i) фармацевтическую дозированную форму, содержащую ингибитор бромодомена CBP/p300, и (ii) фармацевтическую дозированную форму, содержащую ингибитор KRAS.

Фармацевтические дозированные формы (i) и (ii) могут быть пероральными дозированными формами, такими как, например, таблетки. Количество ингибитора бромодомена CBP/p300, содержащегося в дозированной форме, предпочтительно соответствует суточному количеству, которое необходимо вводить, как указано выше в отношении первого аспекта настоящего изобретения. Таким образом, количество ингибитора бромодомена CBP/p300 в дозированной форме может составлять полную суточную дозу при введении ее один раз в сутки. Однако оно также может быть меньше, чем суточное количество, например половину суточного количества, если ее вводят два раза в сутки или ее вводят один раз в сутки в виде двух таблеток. Количество ингибитора KRAS, содержащегося в дозированной форме, предпочтительно соответствует суточному количеству, которое необходимо вводить, как указано выше в отношении первого аспекта настоящего изобретения. Таким образом, количество ингибитора KRAS в дозированной форме может составлять полную суточную дозу при введении ее один раз в сутки. Однако оно также может быть меньше, чем суточное количество, например половину суточного

количества, если ее вводят два раза в день или ее вводят один раз в сутки в виде двух таблеток. Для AMG510 количество может составлять в частности 120 мг, и при этом дозированная форма предпочтительно представляет собой таблетку.

Каждая фармацевтическая дозированная форма обычно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент, как определено в разделе 3 настоящего описания, представленного ниже.

В предпочтительном варианте осуществления второго аспекта настоящего изобретения ингибитор бромодомена CBP/p300 выбран из группы, состоящей из соединения А, соединения С, соединения 00030, соединения 00071, соединений CCS1477, GNE-781, GNE-049, SGC-CBP30, CPI-637, FT-6876, соединения 462, соединения 424 и соединения 515.

В другом предпочтительном варианте осуществления второго аспекта настоящего изобретения ингибитор KRAS выбран из группы, состоящей из соединений AMG510, MRTX849, JNJ-74699157/ARS-3248, BI 1701963, BI 1823911, BAY-293, GDC-6036, MRTX1133, ингибитора RAS(ON) (предпочтительно соединений RMC-6291 или RMC-6236) и их комбинаций.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления второго аспекта настоящего изобретения набор содержит (i) фармацевтическую дозированную форму, содержащую ингибитор бромодомена CBP/p300, и (ii) фармацевтическую дозированную форму, содержащую соединение AMG510 или MRTX849.

В третьем аспекте настоящего изобретения, изобретение относится к фармацевтической дозированной форме, содержащей (i) ингибитор бромодомена CBP/p300 и (ii) ингибитор KRAS.

Фармацевтическая дозированная форма может быть дозированной формой для перорального применения, такой как, например, таблетка. Количество ингибитора бромодомена CBP/p300, содержащегося в дозированной форме, предпочтительно соответствует суточному количеству, которое необходимо вводить, как указано выше в отношении первого аспекта настоящего изобретения. Таким образом, количество ингибитора бромодомена CBP/p300 в дозированной форме может составлять полную суточную дозу при введении ее один раз в сутки. Однако оно также может быть меньше, чем суточное количество, например половину суточного количества, если ее вводят два раза в сутки или ее вводят один раз в сутки в виде двух таблеток. Количество ингибитора KRAS, содержащегося в дозированной форме, предпочтительно соответствует суточному количеству, которое необходимо вводить, как указано выше в отношении первого аспекта настоящего изобретения. Таким образом, количество ингибитора KRAS в дозированной

форме может составлять полную суточную дозу при введении ее один раз в сутки. Однако оно также может быть меньше, чем суточное количество, например половину суточного количества, если ее вводят два раза в сутки или ее вводят один раз в сутки в виде двух таблеток. Для AMG510 количество может, в частности, составлять 120 мг, и при этом дозированная форма предпочтительно представляет собой таблетку.

Фармацевтическая дозированная форма обычно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент, как определено в разделе 3 настоящего описания, представленного ниже.

В предпочтительном варианте осуществления третьего аспекта настоящего изобретения ингибитор бромодомена CBP/p300 выбран из группы, состоящей из соединения А, соединения С, соединения 00030, соединения 00071, соединений CCS1477, GNE-781, GNE-049, SGC-CBP30, CPI- 637, FT-6876, соединения 462, соединения 424 и соединения 515.

В другом предпочтительном варианте осуществления третьего аспекта настоящего изобретения ингибитор KRAS выбран из группы, состоящей из соединений AMG510, MRTX849, JNJ-74699157/ARS-3248, BI 1701963, BI 1823911, BAY-293, GDC-6036, MRTX1133, ингибитора RAS(ON) (предпочтительно соединений RMC-6291 или RMC-6236) и их комбинаций.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления третьего аспекта настоящего изобретения фармацевтическая дозированная форма содержит (i) ингибитор бромодомена CBP/p300 и (ii) соединения AMG510 или MRTX849.

В четвертом аспекте настоящего изобретения, изобретение направлено на способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, где указанный способ предусматривает введение пациенту эффективного количества (i) ингибитора бромодомена CBP/p300 и эффективного количества (ii) ингибитора KRAS, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS.

В пятом аспекте настоящего изобретения, изобретение направлено на способ увеличения продолжительности терапевтического эффекта действия ингибитора KRAS у нуждающегося в этом пациента, где указанный способ предусматривает введение пациенту эффективного количества (i) ингибитора бромодомена CBP/p300 и эффективного количества (ii) ингибитора KRAS, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. Другими словами, продолжительность терапевтического эффекта действия ингибитора KRAS (при введении в комбинации) увеличивается по сравнению с продолжительностью терапевтического эффекта действия ингибитора KRAS при введении его в качестве единственного активного агента при лечении рака.

В шестом аспекте настоящего изобретения, изобретение направлено на способ повышения терапевтической эффективности ингибитора KRAS у нуждающегося в этом пациента, где указанный способ предусматривает введение пациенту эффективного количества (i) ингибитора бромодомена СВР/p300 и эффективного количества (ii) ингибитора KRAS, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS. Другими словами, терапевтическая эффективность действия ингибитора KRAS (при введении в комбинации) повышается по сравнению с терапевтической эффективностью ингибитора KRAS при введении его в качестве единственного активного агента при лечении рака.

В седьмом аспекте настоящего изобретения, изобретение направлено на способ блокирования пролиферации раковых клеток, предусматривающий введение в клетку эффективного количества (i) ингибитора бромодомена СВР/p300 и эффективного количества (ii) ингибитора KRAS, где раковая клетка характеризуется онкогенным изменением в KRAS.

В восьмом аспекте настоящего изобретения, изобретение направлено на способ замедления пролиферации раковых клеток, где указанный способ предусматривает введение в клетку эффективного количества (i) ингибитора бромодомена СВР/p300 и эффективного количества (ii) ингибитора KRAS, где раковая клетка характеризуется онкогенным изменением в KRAS.

Варианты осуществления, описанные выше для первого аспекта осуществления изобретения, в равной степени применимы для способов по аспектам осуществления изобретения с четвертого по восьмой.

Краткое описание фигур

Фигура 1: На этой фигуре показана карта исходной модели разности электронной плотности Fo-Fc (контур при $4,0\sigma$), полученная в результате уточнения исходной модели перед моделированием с помощью REFMAC5 при определении кристаллической структуры бромодомена CREBBP человека в комплексе с соединением 00004.

Фигура 2 А-Е: На этой фигуре показаны результаты слияния клеток SNU-1411 в течение 32 дней, при этом клетки обрабатывали как указано на графиках, а именно либо ДМСО (контроль), либо только AMG510, либо любым из различных ингибиторов бромодомена СВР/p300, применяемым отдельно, либо комбинацией (i) AMG510 и (ii) любым из различных ингибиторов бромодомена СВР/p300. Подробности представлены в Примере 6.

Фигура 3 А-Е: На этой фигуре показаны результаты слияния клеток SNU-1411 в течение 32 дней, при этом клетки обрабатывали как указано на графиках, а именно либо

ДМСО (контроль), либо только MRTX849, либо любым из различных ингибиторов бромодомена СВР/р300, применяемым отдельно, либо комбинацией (i) MRTX849 и (ii) любым из различных ингибиторов бромодомена СВР/р300. Подробности представлены в Примере 7.

Фигура 4 А-Е: На этой фигуре показаны результаты слияния клеток SW837 в течение 49 дней, при этом клетки обрабатывали как указано на графиках, а именно либо ДМСО (контроль), либо только AMG510, либо любым из различных ингибиторов бромодомена СВР/р300, применяемым отдельно, либо комбинацией (i) AMG510 и (ii) любым из различных ингибиторов бромодомена СВР/р300. Подробности представлены в Примере 8.

Фигура 5 А-В: На этой фигуре показаны результаты пролиферации клеток NCI-H358 в течение >20 дней, при этом клетки обрабатывали как указано на графиках, а именно либо ДМСО (контроль), либо только AMG510, либо одним из двух различных ингибиторов бромодомена СВР/р300, либо комбинацией (i) AMG510 и (ii) одного из двух различных ингибиторов бромодомена СВР/р300. Подробности представлены в Примере 9.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Перед подробным описанием настоящего изобретения ниже приведены определения терминов.

1. Определения

Как используется в описании и формуле изобретения, термины, представленные в форме единственного числа, также охватывают соответствующие формы во множественном числе, если из контекста явным образом не следует иное.

Термин «приблизительно» в контексте настоящего изобретения обозначает интервал точности, который понятен специалисту в данной области, чтобы обеспечить технический эффект и результат, связанный с конкретным признаком. Этот термин обычно указывает на отклонение от указанного конкретного числового значения на $\pm 10\%$, и предпочтительно – на $\pm 5\%$.

Следует понимать, что термин «содержащий» не является ограничивающим. Для целей настоящего изобретения термин «состоящий из» считается предпочтительным вариантом термина «содержащий». Если определено, что группа признаков включает по меньшей мере определенное количество вариантов их осуществления, это то также означает охват группы, которая предпочтительно состоит только из этих вариантов осуществления.

Белок p300 (также известный как EP300 и KAT3B) представляет собой большой белок с множеством различных доменов, который связывается с различными белками, включая многие ДНК-связывающие факторы транскрипции. Белок, связывающий циклический АМР-чувствительный элемент белка СВР (CREB), (также известный как CREBBP и KAT3A), представляет собой белок, который очень тесно связан с p300, и эти два белка обычно называют паралогами ввиду высокой идентичности их последовательностей и функционального сходства, и здесь он обозначается как «СВР/p300». Белки СВР/p300 представляют собой лизиновые ацетилтрансферазы, которые, как известно, катализируют присоединение ацетильной группы к боковой лизиновой цепи гистонов и других белков. Было высказано предположение, что СВР/p300 активирует транскрипцию, и при этом механизм действия, по-видимому, заключается в связывании ДНК-связывающих факторов транскрипции при действии РНК-полимеразы или в содействии сборке комплекса пре-инициации транскрипции. Считается, что для этой цели различные домены СВР/p300 взаимодействуют с наборами различных факторов транскрипции, собранных на промоторах и энхансерах для транскрипции различных генов (см. Dyson and Wright, JBC Vo. 291, no. 13, pp. 6714-6722, Fig. 2).

Одним из множества доменов в СВР/p300 является бромодомен. Бромодомен как таковой был впервые идентифицирован у дрозофилы в 1992 г., и примерно через 10 лет он описан как модуль связывания с ацетиллизином. У человека имеется множество белков, содержащих бромодомены, которые можно разделить на восемь групп на основе последовательностей и структурного сходства. По-видимому, все содержащие бромодомены белки участвуют в регуляции программ транскрипции. Предполагается, что исходя из сведений об онкогенных перегруппировки, нацеливание на содержащие бромодомены белки, и, более конкретно, на их бромодомены, может быть полезным, в частности, при лечении рака.

Исходя из этого, было разработано несколько лекарственных препаратов-кандидатов, проходящих в настоящее время клинические испытания, которые нацелены на так называемые белки «бромодомен и экстратерминальный мотив», обычно называемые белками BET, которые составляют одну группу белков, содержащих бромодомены. Примерами препаратов, нацеленных на белок BET, являются INCB054329 (Incyte Corporation), ABBV-075 (AbbVie) и I-BET762 (GlaxoSmithKline). Существуют также препараты, избирательно воздействующие на бромодомены СВР и p300, входящие в состав отдельной группы белков, содержащих бромодомены. Такие ингибиторы включают, например, CCS1477 (CellCentric), который в настоящее время проходит клинические исследования в отношении лечения метастатического резистентного к

кастрации рака предстательной железы и гематологических злокачественных новообразований, или FT-7051 (Forma Therapeutics Inc.), который в настоящее время проходит испытания в отношении лечения метастатического резистентного к кастрации рака предстательной железы.

Термин «ингибитор бромодомена СВР/p300», используемый здесь, означает низкомолекулярное соединение, которое сильно и селективно связывается с бромодоменом СВР и с бромодоменом p300. Этот термин является синонимом терминов «ингибитор бромодомена, селективно связывающийся с бромодоменом СВР/p300» и «ингибитор бромодомена, селективно ингибирующий СВР/p300». «Сильное связывание» в этом отношении означает, что величина K_d для соединения, при связывании его с бромодоменом СВР и бромодоменом p300, меньше значения, равного приблизительно 300 нМ, и предпочтительно меньше значения, равного приблизительно 100 нМ. «Селективное связывание» в этом отношении означает, что низкомолекулярное соединение связывается с бромодоменом СВР и бромодоменом p300 с K_d , величина которой по меньшей мере приблизительно в 20 раз ниже, предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 30 раз ниже, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 50 раз ниже, и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 70 раз ниже, чем величина K_d для связывания любого другого белка, содержащего бромодомен, или для связывания бромодомена из BROMOscan™, предпочтительно по сравнению с дополнительными содержащими бромодомены белками или бромодоменами, указанными в числе генных элементов, согласно DiscoveRx, в Таблице в Примере 4, представленном в настоящей заявке, и при проведении анализа BROMOscan™, как указано в Примере 4. Для целей сравнения самое низкое значение величины K_d для любого содержащего бромодомен белка или бромодомен из BROMOscan™, за исключением СВР и p300, сравнивают с самым высоким значением K_d для СВР и p300. Таким образом, например, если значение K_d для BRD4 (полноразмерный, короткий, изо.) является самым низким значением K_d для всех содержащих бромодомены белков или бромодоменов, за исключением СВР и p300, и оно составляет 7100 нМ, то это значение сравнивают с K_d для СВР, составляющее 29 нМ (а не со значением K_d для p300, которое составляет 12 нМ, и, таким образом, оно ниже чем K_d для СВР). Вышеприведенный пример сделан для соединения А, представленного в Таблице Примера 4, приведенного ниже.

Как указано выше, взаимодействия с партнерами по взаимодействию в клетке, обычно происходящие за счет сильного и селективного связывания через бромодомен СВР/p300, ингибируются, и поэтому соединение по изобретению упоминается здесь как «ингибитор». Термин «ингибирование взаимодействий» означает, что предпочтительно

вообще не происходит никакого взаимодействия (по меньшей мере, на определяемом уровне) между бромодоменом СВР/p300 и партнером по взаимодействию. Однако, когда данное взаимодействие между бромодоменом СВР/p300 и партнером по взаимодействию (принятое за 100%) значительно снижается, например, до уровня, равного приблизительно 50%, приблизительно 40%, приблизительно 30%, предпочтительно приблизительно 20%, более предпочтительно приблизительно 10% или наиболее предпочтительно приблизительно 5% или менее, такое сниженное взаимодействие также охватывается термином «ингибирующие взаимодействия». С точки зрения медицинского применения соединения, ингибирующего указанное взаимодействие, для достижения необходимого и достаточного терапевтического эффекта полного ингибирования взаимодействия может не требоваться. Таким образом, следует понимать, что используемый здесь термин «ингибирование» также относится к снижению взаимодействия, которое достаточно для достижения желаемого эффекта и результата.

Термин «KRAS», используемый в данном документе, относится к белку-гомологу вирусного онкогена саркомы крысы Кирстена. KRAS представляет собой GTP-азу, которая является важным медиатором внутриклеточных сигнальных путей, участвующих в росте и выживании опухолевых клеток. В нормальных клетках KRAS функционирует как молекулярный переключатель, попеременно находящийся в неактивном состоянии, связанным с GDP, и активным состоянием, связанным с GTP. Переходу между этими состояниями способствуют факторы обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF), которые нагружают GTP и активируют KRAS, а также гидролиз GTP, который катализируется белками, активирующими GTP-азу (GAP), для инактивации KRAS. Связывание GTP с KRAS способствует связыванию эффекторов с запуском путей передачи сигнала, включая сигнальный путь RAF-МЕК-ERK (MAPK). Соматически активирующие мутации в KRAS являются отличительной чертой рака и предотвращают ассоциацию GAP, тем самым стабилизируя эффекторное связывание и усиливая передачу сигналов KRAS. Пациенты с опухолями с мутантным KRAS имеют значительно худшие исходы и худший прогноз.

Термин «ингибитор KRAS», используемый в данном документе, относится к молекулам, способным действовать на KRAS таким образом, что ингибируется внутриклеточная нижестоящая передача сигналов, которая в конечном итоге приводит к пролиферации клеток. Термин «ингибированный» в этом контексте означает, что предпочтительно больше не происходит передачи сигналов в нисходящем направлении. Однако, когда данная сигнализация в нисходящем каскаде передачи сигналов (принятая за 100%) значительно снижается, например, до уровня, равного приблизительно 70%, приблизительно 60%, приблизительно 50%, приблизительно 40%, приблизительно 30%,

предпочтительно приблизительно 20%, более предпочтительно 10% или наиболее предпочтительно приблизительно 5% или менее, такое снижение нижестоящей передачи сигналов по-прежнему охватывается термином «ингибирование внутриклеточной передачи сигналов в нисходящем направлении». С точки зрения медицинского применения соединения по изобретению, ингибирующего нисходящий каскад передачи сигналов, для достижения необходимого и достаточного терапевтического эффекта полного ингибирования передачи сигналов может не потребоваться. Таким образом, необходимо понимать, что термин «ингибирование», используемый в настоящем документе и в данном контексте, также относится к снижению уровня сигналов в нисходящем каскаде передачи сигналов, достаточного для достижения желаемого эффекта. Ингибитор KRAS может ковалентно связываться с KRAS, в частности с цистеином в положении 12 в KRAS G12C. Если ингибитор KRAS нацелен на этот цистеин и/или связывается с ним, ингибитор обычно называют «ингибитором KRAS G12C», и примерами таких ингибиторов являются AMG510 (номер 2296729-00-3 в CAS), MRTX849 (номер 2326521-71-3 в CAS), JNJ-74699157/ARS-3248, BI 1823911, GDC-6036 и RMC-6291. Совсем недавно первый агент, модулирующий KRAS G12C, получил одобрение FDA, а именно таблетки LUMAKRAS (соторасиб, соответствующий AMG510 от Amgen) для лечения местно-распространенного или метастатического немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) с мутацией KRAS G12C. Ожидается, что вскоре появится еще один агент, модулирующий KRAS G12C, а именно адаграсиб (соответствующий MRTX849 от Mirati Therapeutics). «Ингибитор KRAS G12D» представляет собой ингибитор, специфичный для KRAS G12D и т.д. Примером ингибитора KRAS G12D является MRTX1133. Альтернативно, ингибитор KRAS может блокировать взаимодействие KRAS с другими белками, в частности блокировать взаимодействие KRAS-SOS1. Такими ингибиторами, блокирующими взаимодействие KRAS-SOS1 являются, например, BI 1701963 и BAY-293 (номер 2244904-70-7 в CAS). Также известны так называемые ингибиторы RAS(ON), которые связываются с мутированными GTP-связанным KRAS (например, GTP-связанный KRAS G12C или GTP-связанный KRAS G12V, или GTP-связанный KRAS G12D, или GTP-связанный KRAS G13D, или GTP-связанный KRAS Q61H, или GTP-связанный KRAS Q61L, или GTP-связанный KRAS Q61R), и которые предотвращают участие RAF, блокируя эффекторную поверхность соответствующего KRAS, поскольку они образуют трехкомпонентный комплекс между ингибитором RAS(ON) (синтетический лиганд), KRAS и циклофилином А (для дополнительной информации см. публикации от Revolution Medicines, например, WO 2021/091956). RMC-6291 представляет собой ингибитор RAS G12C (ON) от Revolution Medicines, который воздействует на KRAS G12C

с помощью вышеуказанного механизма действия. RMC-6236 представляет собой ингибитор RAS(ON) от Revolution Medicines, который воздействует на множественные мутации RAS, включая мутации KRAS, с помощью вышеуказанного механизма.

Термин, что «рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS», используемый в настоящем документе, означает, что опухоль несет мутантный вариант KRAS, причем этот мутантный вариант KRAS вовлечен в развитие рака. Другими словами, мутантный вариант KRAS можно рассматривать как фактор, связанный с развитием рака или как его причину его развития, необязательно среди других факторов. Мутированный вариант KRAS присутствует в опухоли из-за изменений в гене KRAS, где такое изменение, в частности, представляет собой мутацию по меньшей мере одного основания в гене KRAS, приводящую к аминокислотной замене в белке KRAS. Соответствующие конкретные изменения описаны выше, при этом существенным и значимым изменением является, в частности, изменение KRAS G12C. Как отмечено выше, мутации KRAS присутствуют в 25% случаев рака, при этом онкогенные варианты имеют разную степень распространенности при разных видах рака (см. Box 1 в публикации Mullard, указанной выше).

Используемый здесь термин «сверхактивация» KRAS означает, что KRAS является более активным по сравнению с диким типом, и, в частности, он более активен в отношении последующей активации и передачи сигналов, что приводит к росту раковых клеток.

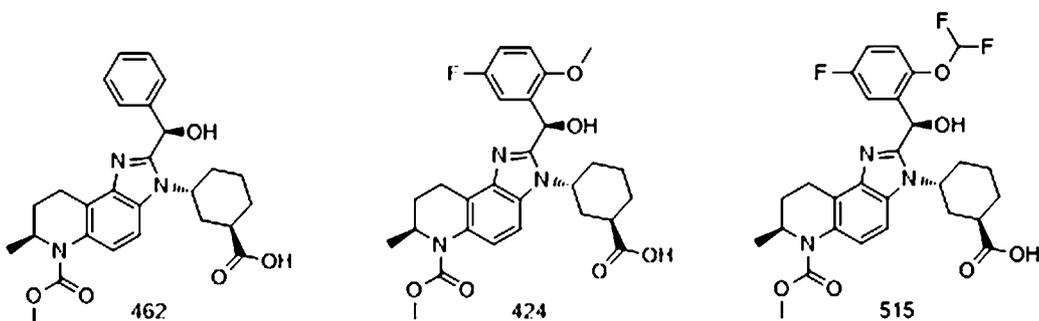
Используемый здесь термин «низкомолекулярное соединение» относится к небольшому органическому соединению, имеющему низкую молекулярную массу. В контексте настоящего изобретения низкомолекулярное соединение предпочтительно имеет молекулярную массу менее 5000 дальтон, более предпочтительно менее 4000 дальтон, более предпочтительно менее 3000 дальтон, более предпочтительно менее 2000 дальтон или еще более предпочтительнее - менее 1000 дальтон. В контексте настоящего изобретения низкомолекулярное соединение особенно предпочтительном варианте имеет молекулярную массу менее 800 дальтон. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения низкомолекулярное соединение в контексте настоящего изобретения имеет молекулярную массу от 50 до 3000 дальтон, предпочтительно от 100 до 2000 дальтон, более предпочтительно от 100 до 1500 дальтон и еще более предпочтительнее - от 100 до 1000 дальтон.

Используемый здесь термин «лечение» относится к клиническому вмешательству с целью излечения заболевания или облегчения тяжести заболевания, предотвращения рецидива заболевания, облегчения симптомов заболевания, уменьшения любых прямых

или косвенных патологических последствий заболевания, достижения стабилизации (т.е. без ухудшения) состояния при заболевании, предотвращения метастазирования, снижения скорости прогрессирования заболевания и/или увеличения выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Используемый здесь термин «цикл лечения» означает, что лекарственное средство вводят в течение определенного периода времени после первоначальной оценки состояния пациента, при этом состояние пациента затем обычно повторно оценивают перед началом следующего цикла лечения.

Подробная информация об ингибиторах бромодомена СВР/p300, упомянутых здесь, представлена в разделе «Примеры» настоящей заявки. В частности, в этом разделе показаны структуры соединения А, соединения С, соединения 00030 и соединения 00071. Кроме того, в разделе «Примеры» настоящей заявки показаны пути синтеза этих соединений. Соединение CCS1477 коммерчески доступно, например от Aobious, и оно имеет номер 2222941-37-7 в CAS. Соединение GNE-781 коммерчески доступно, например от MCE (MedChemExpress), и оно имеет номер 1936422-33-1 в CAS. Соединение GNE-049 коммерчески доступно, например от MCE (MedChemExpress), и оно имеет номер 1936421-41-8 в CAS. Соединение SGC-CBP30 коммерчески доступно, например от MCE (MedChemExpress), и оно имеет номер 1613695-14-9 в CAS. Соединение CPI-637 коммерчески доступно, например от MCE (MedChemExpress), и оно имеет номер 1884712-47-3 в CAS. Соединение FT-6876 коммерчески доступно, например от MCE (MedChemExpress), и оно имеет номер 2304416-91-7 в CAS (FT-6876 также упоминается как «CBP/p300-IN-8»). Структуры соединений 462, 424 и 515 показаны ниже; эти структуры и пути синтеза раскрыты в публикации международной заявки WO 2020/006483 (см., в частности, стр. 33 и 34 для соединения 424; стр. 42 и 43 для соединения 462; и стр. 47 и 48 для соединения 515):



2. Неожиданные открытия авторов настоящего изобретения

Авторы настоящего изобретения идентифицировали новые соединения, которые прочно связываются с бромодоменом СВР/p300, и показали, что связывание с

бромодоменом CBP/p300 также является селективным, поскольку хорошо известно, что существует множество белков, которые содержат бромодомены.

CBP/p300 были идентифицированы как центральные узлы в регуляторных сетях транскрипции эукариотов, как взаимодействующие с более чем 400 транскрипционными факторами и другими регуляторными белками. Белок CBP/p300 регулирует перекрестные помехи и интерференцию между многочисленными клеточными сигнальными путями, и он является мишенью опухолевых вирусов для механизма захвата клеточной регуляции (см. Dyson and Wright, выше, стр. 6714, правая колонка). CBP/p300 представляют собой большие белки, которые содержат несколько доменов, как видно из рисунка 1 в публикации Dyson and Wright (см. выше). Эти домены представляют собой домены NR1D, TAZ1, TAZ2, KIX, CRD1, BRD, CH2 (с доменом PHD и доменом пальца RING), домены NAT, ZZ и NCBD. Из размера этих белков и наличия в них различных доменов очевидно, что их клеточные функции очень разнообразны, например, благодаря взаимодействию со многими различными партнерами по взаимодействию из-за разнообразия взаимодействий, на которые способен белок CBP/p300. Ферментативная активность CBP/p300 как гистонацетилтрансферазы локализована в домене NAT. Как отмечено выше, эта ферментативная функция в основном связана с активацией транскрипции. Белок CBP/p300 также подвергается посттрансляционным модификациям, в частности фосфорилированию. Собственная ферментативная активность белка CBP/p300, также как и белков с посттрансляционными модификациями, вносят еще один уровень сложности в различные функции и эффекты обеспечиваемые белками CBP/p300. То, что этим функциям и эффектам можно противодействовать, показано в общем плане во вступительном разделе к соответствующей главе в монографии Goodman and Smolnik, *Genes & Development* 2000, 14:1553-1577, где отмечено, что один из главных парадоксов функций CBP/p300 заключается в том, что эти белки, по-видимому, способны вносить вклад в диаметрально противоположные клеточные процессы, и, по всей видимости, их функции и эффекты сильно зависят от контекста их действия, в частности от того, способствуют ли CBP/p300 апоптозу или же клеточной пролиферации. Что касается влияния на заболевания, и, в частности на рак, то это означает, что контекст конкретного заболевания и конкретного типа рака будет иметь решающее значение для того, как будут вовлечены в клеточный процесс белки CBP/p300, и будут ли они вообще вовлечены.

Принимая во внимание вышеизложенное, неудивительно, что белок CBP/p300 не может быть отнесен к какой-либо одной функции в клеточном процессе, на который можно было бы воздействовать, например, с помощью общего «ингибитора CBP/p300». Скорее, из-за огромного уровня комплексного действия этого белка, анализ различных

функций белка СВР/p300 представляется возможным только при исследовании конкретных доменов СВР/p300, то есть путем анализа эффектов, достигаемых, например, при ингибировании ферментативной активности СВР/p300 в своих доменах НАТ или при невозможности определенных взаимодействий с партнерами по взаимодействию путем блокировки (или «ингибирования») определенных доменов. Кроме того, это следует рассматривать в соответствующем контексте, например, при конкретном заболевании или типе рака, как указано выше.

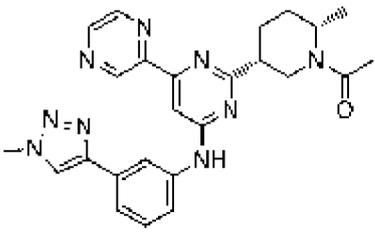
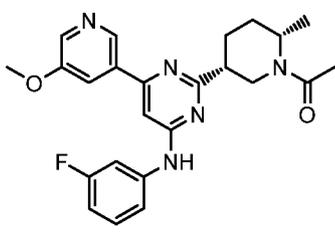
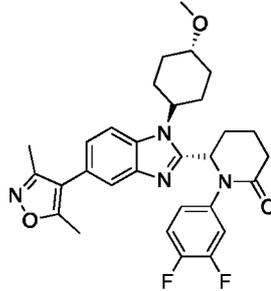
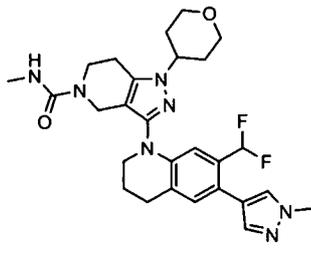
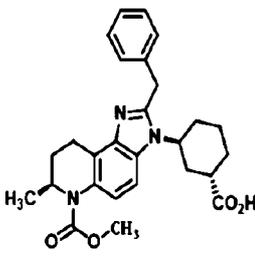
Таким образом, авторы настоящего изобретения стали изучать эффекты их действия в конкретных условиях, когда ингибиторы делают невозможным их взаимодействие с партнерами по взаимодействию через бромодомен СВР/p300, и первоначально исследовали действие предложенных ими ингибиторов на клетки немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), руководствуясь сведениями, представленными в публикации Hou et al. (Hou et al., BMC Cancer (2018) 18:641). Однако авторы настоящего изобретения не обнаружили влияния на пролиферацию тестируемых клеточных линий НМПЛ при применении только одного ингибитора. Но авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что предложенные ими ингибиторы бромодомена СВР/p300 продлевают действие ингибитора EGFR в клетках NSCLC, характеризующихся онкогенным изменением в EGFR, по сравнению с введением только одного ингибитора EGFR. Другими словами, хотя сами по себе ингибиторы бромодомена СВР/p300, использованные авторами настоящего изобретения, не оказывали влияния на пролиферацию НМПЛ, который характеризуется наличием онкогенного изменения в EGFR, эти ингибиторы бромодомена СВР/p300 обеспечили получение желаемого эффекта при использовании их вместе с ингибитором EGFR. Кроме того, неожиданно оказалось, что эта комбинация предложенная авторами изобретения, работает не только в отношении передачи сигналов EGFR и, соответственно, с ингибиторами EGFR, но также и в отношении передачи сигналов KRAS и ингибиторов KRAS, соответственно, как описано далее.

Авторы настоящего изобретения использовали в экспериментах клеточные линии колоректального рака (SNU-1411 и SW837, которые представляют собой клеточные линии аденокарциномы прямой кишки, несущие мутацию KRAS G12C), а также клеточную линию NSCLC (клетки NCI-H358, несущую мутацию KRAS G12C). Таким образом, эти клеточные линии можно рассматривать как модельную систему для лечения пациентов с раком средствами первой линии, где клетки рака имеют мутацию KRAS, в частности мутацию KRAS G12C. В качестве ингибитора KRAS использовали соответственно

AMG510 и MRTX849 в комбинации с ингибиторами бромодомена CBP/p300 (см. Примеры, представленные ниже).

Наблюдаемое значительное ингибирование пролиферации при длительном инкубировании комбинации во всех протестированных клеточных линиях заслуживает особого внимания, поскольку из-за развития резистентности ингибирование пролиферации с течением времени не будет оставаться полным в случае использования только одного ингибитора KRAS. Как показывают данные, представленные ниже в экспериментальном разделе, это относится как к AMG510, так и к MRTX849, когда они применяются отдельно.

Учитывая результаты для ингибиторов CBP/p300, использованных авторами настоящего изобретения, исследование было продолжено для установления того, можно ли обобщить наблюдаемый эффект на все ингибиторы CBP/p300 как таковые. С этой целью были протестированы дополнительные ингибиторы бромодомена CBP/p300, а именно CCS1477, FT-6876 и GNE-781. Следует отметить, что структуры различных ингибиторов CBP/p300, которые были протестированы авторами настоящего изобретения, не связаны между собой, так что их общий признак относится исключительно к эффекту, обеспечиваемому этими ингибиторами, а именно селективному ингибированию бромодомена CBP/p300. Ниже представлены структуры протестированных ингибиторов CBP/p300:

		
Соединение С	Соединение А	
		
CCS1477	GNE-781	FT-6876

Следует также отметить, что протестированные ингибиторы KRAS AMG510 и MRTX849 весьма различны по своей структуре, но все имеют общую ингибирующую функцию в отношении KRAS G12C (действуя как ковалентные ингибиторы).

Кроме того, авторы настоящего изобретения тестировали не только одну линию раковых клеток, несущих онкогенную мутацию в KRAS, но и три других различных линий раковых клеток (клеточные линии аденокарциномы прямой кишки SNU-1411 и SW837, и клеточную линию HMPJ NCI-H358).

3. Фармацевтическая композиция соединений по изобретению

«Ингибитор бромодомена CBP/p300» и «ингибитор KRAS» представляют собой «фармацевтически активные агенты» для заявленного здесь применения. Как отмечено выше, они могут быть представлены в отдельных дозированных лекарственных формах, либо находиться в одной дозированной лекарственной форме.

Используемый здесь термин «фармацевтически активные агенты» означает, что соединения способны модулировать реакцию у пациента, т.е. у человека или животного, *in vivo*. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к эксципиентам, которые известны специалисту в данной области, как обычно включаемые в фармацевтические композиции. Примеры таких эксципиентов перечислены ниже. Принимая во внимание определение «фармацевтически активные агенты», представленное выше, фармацевтически приемлемый эксципиент может быть определен как фармацевтически неактивный агент.

Если коммерчески доступный ингибитор KRAS используется в комбинации с ингибитором бромодомена CBP/p300, то предпочтительно, чтобы введение осуществлялось в виде отдельных дозированных лекарственных форм и чтобы ингибитор KRAS вводился в дозированной лекарственной форме и официально разрешенным/утвержденным путем введения (это относится, например, для AMG510 (как одобрено для LUMAKRAS)). Ингибитор бромодомена CBP/p300 можно вводить в дозированной лекарственной форме, которая описана ниже, или в дозированной лекарственной форме, в которой он в настоящее время проходит клинические испытания.

Дозированная лекарственная форма для применения согласно настоящему изобретению может быть приготовлена в форме для перорального, трансбуккального, назального, ректального, местного, чрескожного или парентерального введения. Пероральное введение может быть предпочтительным. Парентеральное введение также может быть предпочтительным, и оно включает внутривенное, внутримышечное или

подкожное введение. Дозированная лекарственная форма по изобретению также может быть названа здесь как лекарственная форма или фармацевтическая композиция.

В целом, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать различные фармацевтически приемлемые эксципиенты, которые выбирают в зависимости от того, какую функциональность они должны обеспечить для композиции. В контексте настоящего изобретения «фармацевтически приемлемый эксципиент» может представлять собой любое вещество, используемое для приготовления фармацевтических дозированных форм, включая материалы для покрытия, пленкообразующие материалы, наполнители, дезинтегрирующие агенты, материалы, модифицирующие высвобождение, материалы-носители, разбавители, связующие вещества и другие вспомогательные вещества. Типичные фармацевтически приемлемые эксципиенты включают такие вещества, как сахароза, маннит, сорбит, крахмал и производные крахмала, лактоза, а также смазывающие агенты, такие как стеарат магния, разрыхлители/дезинтегранты и буферные агенты.

Термин «носитель» обозначает фармацевтически приемлемые органические или неорганические вещества-носители, с которыми объединяют активный ингредиент для облегчения применения/введения. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, например, воду, растворы солей, спирты, масла, предпочтительно растительные масла, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, поверхностно-активные вещества, парфюмерное масло, моноглицериды и диглицериды жирных кислот, сложные эфиры жирных кислот в петролейном эфире, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п. Фармацевтические композиции можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными агентами, такими как смазывающие агенты, консерванты, стабилизаторы, смачивающие агенты, эмульгаторы, регулирующие осмотическое давление соли, буферы, красители, вкусовые и/или ароматические вещества и т.п., которые не оказывают вредного воздействия на организм и не взаимодействуют с активным соединением.

Если для целей настоящего изобретения предусматривается применение жидких дозированных лекарственных форм, то такие формы могут включать фармацевтически приемлемые эмульсии, растворы, суспензии и сиропы, содержащие обычно используемые в данной области инертные разбавители, такие как вода. Эти лекарственные формы могут содержать, например, микрокристаллическую целлюлозу для придания объема, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве суспендирующего агента, метилцеллюлозу в качестве усилителя вязкости, а также подсластители/ароматизаторы.

Для парентерального введения композиции особенно подходящие носители состоят из растворов, предпочтительно масляных или водных растворов, а также суспензий, эмульсий или имплантатов. Фармацевтические композиции для парентерального введения являются особенно предпочтительными, и они включают водорастворимые формы в виде водного раствора. Кроме того, могут быть приготовлены суспензии в виде подходящих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран.

Особенно предпочтительными дозированными лекарственными формами являются инъекционные препараты фармацевтической композиции по изобретению. Таким образом, стерильные водные или масляные суспензии для инъекций могут, например, быть получены в соответствии с методами, известными из уровня техники, с использованием подходящих диспергирующих агентов, смачивающих агентов и/или суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций также может представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном разбавителе или растворителе, приемлемом для парентерального введения. В число приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, входят вода и изотонический раствор хлорида натрия. Стерильные масла также обычно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды.

Для ректального введения фармацевтической композиции по изобретению могут быть приготовлены суппозитории, например, путем смешивания соединения с подходящим нераздражающим эксципиентом, таким как масло какао, синтетические триглицериды и полиэтиленгликоли, которые являются твердыми при комнатной температуре, но жидкими при ректальной температуре, так что они будут таять в прямой кишке и высвободить активный агент из указанных суппозиториях.

Для ингаляционного введения фармацевтическую композицию, содержащую соединение по изобретению, удобно доставлять в виде аэрозольного спрея из укупок под давлением или из распылителей с использованием подходящего пропеллента, например дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортetraфторэтана, двуокиси углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля, получаемого из укупки под давлением, доза может быть отмерена за счет использования клапана для подачи заданного количества. Для введения композиции с помощью ингалятора или инсуффлятора могут быть изготовлены капсулы и картриджи, например, из желатина, с

использованием порошковой смеси активного соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Дозированные лекарственные формы для перорального введения могут быть жидкими или твердыми, и они могут включать, например, таблетки, пастилки, пилюли, капсулы, порошки, шипучие составы, драже и гранулы. Фармацевтические препараты для перорального введения можно получать с использованием твердого эксципиента, необязательно измельчая полученную смесь и обрабатывая смесь гранул после добавления подходящих вспомогательных веществ, если это желательно, получая ядра таблеток или драже. В этом случае подходящими эксципиентами являются, в частности, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (ПВП). При желании могут быть добавлены разрыхлители, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия. Лекарственные формы для перорального введения могут быть изготовлены таким образом, чтобы обеспечить немедленное высвобождение активного агента или пролонгированное высвобождение активного агента.

4. Дополнительное раскрытие изобретения и дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения

Клинический противоопухолевый эффект ингибиторов рецепторной тирозинкиназы (РТК) и других ингибиторов киназы непродолжителен. Обычно к этим ингибиторам развивается резистентность. Более конкретно, клинический противоопухолевый эффект ингибиторов EGFR (EGFRi) непродолжителен. Резистентность к ингибиторам EGFR обычно развивается в течение 9–19 месяцев в зависимости от используемого терапевтического агента и клинических условий. Поэтому желательно разработать способ лечения рака, который предотвратил бы лекарственную резистентность у больных раком. Исторически сложилось так, что большинство подходов к борьбе с лекарственной резистентностью были сосредоточены на генетических факторах рецидивирующих опухолей. В попытке преодолеть уже установленную лекарственную резистентность новый мутировавший белок, который запускает повторный рост опухоли, будет терапевтической мишенью для лекарственного средства, используемого отдельно или в сочетании с основным противораковым препаратом. Одним из механизмов резистентности к лечению EGFRi является развитие контролирующей (гейткиперной)

мутации в белке EGFR, т.е. мутации, которая делает EGFRi неэффективным. Чаще всего эта контролирующая мутация представляет собой мутацию T790M. Специфичные для мутаций ингибиторы, такие как осимертиниб, используются для преодоления возникшей лекарственной резистентности к ингибиторам EGFR первого поколения, которые не ингибируют мутантный EGFR с мутацией T790M. Другим механизмом резистентности к лечению EGFRi является обходная передача сигналов, которая активируется через другие рецепторные тирозинкиназы, например, посредством амплификации, сверхэкспрессии или активации MET, EгbB2, HGF, EгbB3, IGF1R, AXL, NTRK1, BRAF, FGFR3 или FGFR1. Терапевтические вмешательства для подавления обходной передачи сигналов были протестированы в клинике, но при этом были получены неоднозначные результаты.

Раскрытия документов уровня техники, например, заявки WO 2018/022637, описывают применение ингибиторов CBP/p300 в качестве новых методов лечения рака, в частности, для лечения рака с мутациями в p300. Заявка WO 2011/085039 описывает способы лечения рака, включающие ингибирование активности гистонацетилтрансферазы CBP/p300 (НАТ) и применение ингибиторов НАТ CBP/p300 для лечения субъекта, страдающего раком, в частности, в комбинации с химиотерапевтическими противораковыми агентами, повреждающими ДНК.

Таким образом, существует потребность в новых эффективных способах и композициях для предотвращения развития лекарственной резистентности рака. Среди прочего, это рассматривается в вариантах осуществления настоящего изобретения, представленных в разделе 4 настоящего описания.

Вариант осуществления настоящего изобретения 1: Ингибитор бромодомена CBP/p300 для применения в способе лечения рака у животного, где способ предусматривает введение нуждающемуся в этом животному ингибитора бромодомена CBP/p300 и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, выбранного из группы, состоящей из ингибиторов EGFR, ALK, MET, HER2, ROS1, RET, NTRK1 и AXL, или ингибитора KRAS (гомолог вирусного онкогена саркомы крыс Кирстена) или BRAF (протоонкоген B-Raf и гомолог v-Raf вирусного онкогена В саркомы мышей), где рак включает изменение в соответствующей рецепторной тирозинкиназе, или в KRAS, или в BRAF, и где ингибитор бромодомена CBP/p300 сам по себе не замедляет прогрессирования рака.

Вариант осуществления настоящего изобретения 2: Ингибитор бромодомена CBP/p300 для применения в способе увеличения продолжительности ответа на лечение рака у животного ингибитором рецепторной тирозинкиназы, или ингибитором KRAS или BRAF, где способ предусматривает введение животному с раком ингибитора бромодомена CBP/p300 или его фармацевтически приемлемой соли, и при этом

увеличивается продолжительность ответа на противораковую терапию при введении ингибитора бромодомена СВР/р300 или его фармацевтически приемлемой соли, по сравнению с продолжительностью ответа на противораковую терапию в отсутствие введения ингибитор бромодомена СВР/р300 или его фармацевтически приемлемой соли, и где ингибитор рецепторной тирозинкиназы выбран из группы, состоящей из ингибиторов EGFR, ALK, MET, HER2, ROS1, RET, NTRK1 и AXL.

Вариант осуществления настоящего изобретения 3: Композиция для лечения рака, содержащая синергическую комбинацию ингибитора бромодомена СВР/р300 или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, выбранного из группы, состоящей из ингибиторов EGFR, ALK, MET, HER2, ROS1, RET, NTRK1 и AXL, или ингибитора KRAS или BRAF, где рак включает изменение в соответствующей рецепторной тирозинкиназе, или в KRAS или BRAF, и где ингибитор бромодомена СВР/р300 сам по себе не замедляет прогрессирование рака.

Вариант осуществления настоящего изобретения 4: Способ ингибирования роста раковой клетки, предусматривающий введение ингибитора бромодомена СВР/р300 и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, выбранного из группы, состоящей из ингибиторов EGFR, ALK, MET, HER2, ROS1, RET, NTRK1 и AXL, или ингибитора KRAS или BRAF, и где раковая клетка имеет изменения в соответствующей рецепторной тирозинкиназе или KRAS или BRAF, и где ингибитор бромодомена СВР/р300 сам по себе не ингибирует роста раковой клетки.

Вариант осуществления настоящего изобретения 5: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где изменение в рецепторной тирозинкиназе, или в KRAS или BRAF представляет собой онкогенное изменение.

Вариант осуществления настоящего изобретения 6: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор EGFR.

Вариант осуществления настоящего изобретения 7: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с вариантом осуществления 6, где изменение в рецепторной тирозинкиназе представляет собой мутацию в EGFR.

Вариант осуществления настоящего изобретения 8: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где композиция или комбинация ингибитора

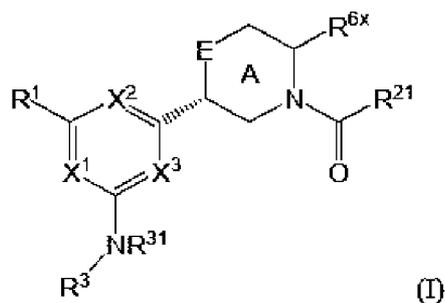
бромодомена СВР/р300 или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, является синергической при лечении рака, по сравнению с одним только ингибитором СВР/р300 или рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, используемых отдельно.

Вариант осуществления настоящего изобретения 9: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где композиция или комбинация ингибитора бромодомена СВР/р300 или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, задерживает или снижает риск резистентности рака к ингибитору рецепторной тирозинкиназы или к ингибитору KRAS или BRAF.

Вариант осуществления настоящего изобретения 10: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где ингибитор бромодомена СВР/р300 вводят в количестве, эффективном для предотвращения резистентности раковой клетки к ингибитору рецепторной тирозинкиназы, или к ингибитору KRAS или BRAF.

Вариант осуществления настоящего изобретения 11: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где ингибитор EGFR выбран из группы, включающей цетуксимаб, панитумумаб, залутумумаб, нимотузумаб, матузумаб, гефитиниб, эрлотиниб, дакомитиниб, лапатиниб, нератиниб, вандетаниб, нецитумумаб, осимертиниб, афатиниб, AP26113, ингибитор EGFR (№ 879127-07-8 в CAS), ингибитор EGFR/ErbB2/ErbB-4 (№ 881001-19-0 в CAS), ингибитор EGFR/ErbB-2 (№ 17924861-4 в CAS), ингибитор EGFR II (BIBX 1382, № 196612-93-8 в CAS), ингибитор EGFR III (№ 733009-42-2 в CAS), ингибитор EGFR/ErbB-2/ErbB-4 II (№ 944341-54-2 в CAS) или ингибитор РКСβII/EGFR (№ 145915-60-2 в CAS).

Вариант осуществления настоящего изобретения 12: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где ингибитор СВР/р300 представляет собой соединение формулы (I)



в которой

R^1 выбран из галогена и необязательно замещенной углеводородной группы, которая содержит от 1 до 20 атомов углерода, и необязательно от 1 до 15 гетероатомов, выбранных из O, N и S;

R^{21} выбран из водорода, необязательно замещенного C_{1-6} алкила, который может содержать от одного до трех атомов кислорода между атомами углерода, и необязательно замещенного C_{3-6} циклоалкила;

R^3 выбран из необязательно замещенного гетероциклила, необязательно замещенного карбоциклила, необязательно замещенного C_{1-6} алкилена, необязательно замещенного гетероциклила и необязательно замещенный C_{1-6} алкилен-необязательно замещенный карбоциклил;

каждый из X^1 , X^2 и X^3 независимо выбран из N, CH и CR^x , где по меньшей мере один из указанных X^1 , X^2 и X^3 представляет собой N;

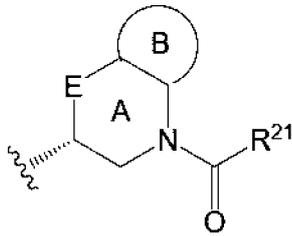
R^{31} выбран из водорода, C_{1-6} -алкила и C_{1-6} -алкила, замещенного одним или несколькими F; где R^3 и любой R^{31} могут быть необязательно соединены; и

E либо отсутствует, либо выбран из CH_2 , CHR^x , CR^{x_2} , NH, NR^x , O, L^1-L^2 и L^2-L^1 , где L^1 выбран из CH_2 , CHR^x , CR^{x_2} , NH, NR^x и O, и L^2 выбран из CH_2 , CHR^x и CR^{x_2} ;

R^{6x} представляет собой галоген, OH, =O, C_{1-6} алкил, C_{1-6} галогеналкил, C_{1-6} алкил, замещенный одним или несколькими OH, моноциклический арил, необязательно замещенный одним или несколькими R^{xb} , моноциклический гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими R^{xb} , моноциклический циклоалкил, необязательно замещенный одним или несколькими R^{xb} , моноциклический гетероциклоалкил, необязательно замещенный одним или несколькими R^{xb} , моноциклический циклоалкенил, необязательно замещенный одним или несколькими R^{xb} , моноциклический гетероциклоалкенил, необязательно замещенный одним или несколькими R^{xb} , где указанный R^{xb} независимо выбран из галогена, OH, =O, C_{1-4} алкила, C_{1-2} галогеналкила, C_{1-2} -алкила, замещенного одним или двумя OH;

где кольцо A может быть дополнительно замещено одной или несколькими группами R^x , где любые две группы R^x в кольце A могут быть необязательно соединены,

и/или любая группа R^x в кольце А может быть необязательно соединена с R^{21} ; и/или где кольцо А может быть дополнительно замещено одной группой R^x с образованием вместе с R^{6x} бициклического фрагмента, имеющего следующую структуру:



в которой

кольцо В представляет собой необязательно замещенный гетероцикл или необязательно замещенный карбоцикл;

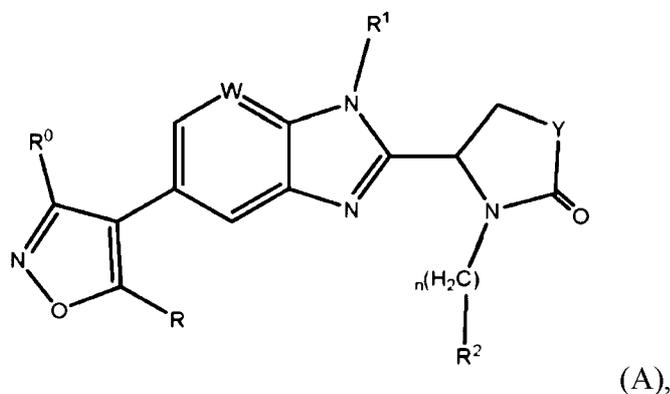
каждый R^x независимо выбран из галогена, ОН, О-необязательно замещенного C_{1-6} алкила, NH-необязательно замещенного C_{1-6} алкила, N(необязательно замещенный C_{1-6} алкил)₂, =O, необязательно замещенного C_{1-6} алкила, необязательно замещенного карбоциклила, необязательно замещенного гетероциклила, (необязательно замещенный C_{1-6} алкилен)-(необязательно замещенный карбоциклил), (необязательно замещенный C_{1-6} алкилен)-(необязательно замещенный гетероциклил), O-(необязательно замещенный C_{1-6} алкилен)-(необязательно замещенный карбоциклил), и O-(необязательно замещенный C_{1-6} алкилен)-(необязательно замещенный гетероциклил), и

где необязательный заместитель необязательно замещенной углеводородной группы, необязательно замещенный C_{3-6} циклоалкил, необязательно замещенный гетероциклил, необязательно замещенный гетероцикл, необязательно замещенный карбоциклил, необязательно замещенный карбоцикл и необязательно замещенный C_{1-6} алкилен независимо выбраны из C_{1-6} алкила, который необязательно замещен одним или несколькими галогенами, галогена, CN, NO₂, оксо, C(O)R*, COOR*, C(O)NR*R*, NR*R*, N(R*)-C(O)R*, N(R*)-C(O)-OR*, N(R*)-C(O)-NR*R*, N(R*)-S(O)₂R*, OR*, O-C(O)R*, O-C(O)-NR*R*, SR*, S(O)R*, S(O)₂R*, S(O)₂-NR*R*, N(R*)-S(O)₂-NR*R*, гетероциклила, необязательно замещенного галогеном или C_{1-6} алкилом, и карбоциклила, необязательно замещенного галогеном или C_{1-6} алкилом; где каждый R* независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, который необязательно замещен галогеном, гетероциклила, который необязательно замещен галогеном или C_{1-6} алкилом, и карбоциклила, который необязательно замещен галогеном или C_{1-6} алкилом; где любые два R*, связанные с одним и тем же атомом азота, могут быть необязательно соединены, и

где необязательный заместитель необязательно замещенного C_{1-6} алкила и необязательно замещенного C_{1-6} алкилена независимо выбран из галогена, CN, NO₂, оксо,

$C(O)R^{**}$, $COOR^{**}$, $C(O)NR^{**}R^{**}$, $NR^{**}R^{**}$, $N(R^{**})-C(O)R^{**}$, $N(R^{**})-C(O)-OR^{**}$, $N(R^{**})-C(O)-NR^{**}R^{**}$, $N(R^{**})-S(O)_2R^{**}$, OR^{**} , $O-C(O)R^{**}$, $O-C(O)-NR^{**}R^{**}$, SR^{**} , $S(O)R^{**}$, $S(O)_2R^{**}$, $S(O)_2-NR^{**}R^{**}$ и $N(R^{**})-S(O)_2-NR^{**}R^{**}$; где R^{**} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, который необязательно замещен галогеном, гетероциклила, который необязательно замещен галогеном или C_{1-6} алкилом, и карбоциклила, который необязательно замещен галогеном или C_{1-6} алкилом, где любые два R^{**} , связанные с одним и тем же атомом азота, могут быть необязательно соединены.

Вариант осуществления настоящего изобретения 13: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где ингибитор СВР/р300 представляет собой арилимидазолилзоксазол формулы (A)

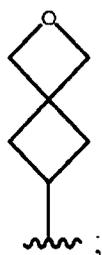


в которой

каждый R^0 и R , одинаковые или разные, представляет собой H или C_{1-6} алкил, незамещенный или замещенный OH, $OC(O)R'$ или OR' , где R' представляет собой незамещенный C_{1-6} алкил;

W представляет собой N или CH;

R^1 представляет собой группу, которая является незамещенной или замещенной, и которая выбрана из C-связанного 4-6-членного гетероциклила; C_3-C_6 циклоалкила; C_{1-6} алкила, незамещенного или замещенного C_6-C_{10} арила, 5-12-членного N-содержащего гетероарила, C_3-C_6 циклоалкила, OH, $OC(O)R'$ или OR' , где R' представляет собой группу, определенную выше; и спирогруппу следующей формулы:



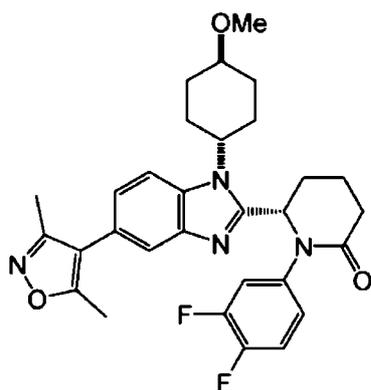
в которой

Y представляет собой CH₂, CH₂CH₂ или CH₂CH₂CH₂;

n равняется 0 или 1;

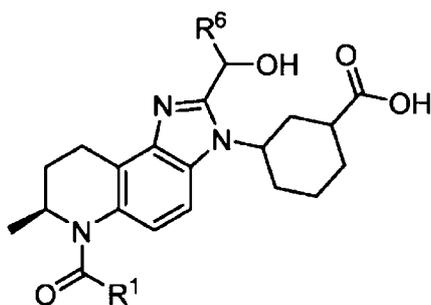
R² представляет собой группу, выбранную из C₆-C₁₀ арила, 5-12-членного N-содержащего гетероарила, C₃-C₆ циклоалкила и C₅-C₆ циклоалкенила, где эта группа является незамещенной или замещенной, и где C₆-C₁₀ арил необязательно сконденсирован с 5- или 6-членным гетероциклическим кольцом;

или его фармацевтически приемлемую соль, где указанный арилимидазолилзоксазол предпочтительно имеет формулу (Aa*):



(Aa *; CCS1477 [№ 2222941-37-7 в CAS]).

Вариант осуществления настоящего изобретения 14: Ингибитор бромодомена СВР/p300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где ингибитор СВР/p300 представляет собой соединение формулы (Ba)



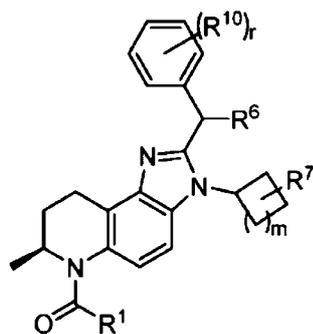
(Ba),

в которой

R¹ представляет собой O(C₁-C₃ алкил);

R⁶ представляет собой фенил, необязательно замещенный независимо одним или несколькими R^B, где R^B выбран из OC₁₋₆ алкила, OC₃₋₆ циклоалкила, O-арила или O-гетероарила, где каждый алкил, циклоалкил, арил или гетероарил необязательно независимо замещены одним или несколькими галогенами;

или где ингибитор СВР/p300 представляет собой соединение формулы (Bc)



(Bc),

в которой

R^1 представляет собой OR^5 ;

R^5 представляет собой C_{1-6} алкил, C_{3-8} циклоалкил, гетероциклил, арил или гетероарил;

R^6 представляет собой OH , галоген, оксо, NO_2 , CN , NH_2 , C_{1-6} алкил, C_{3-8} циклоалкил, C_{4-8} циклоалкенил, гетероциклил, арил, спироциклоалкил, спирогетероциклил, гетероарил, OC_{3-6} циклоалкил, O -арил, O -гетероарил, $(CH_2)N-OR^8$, $C(O)R^8$, $C(O)OR^8$ или $C(O)NR^8R^9$, NHC_{1-6} алкил, $N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $S(O)_2NH(C_{1-6}$ алкил), $S(O)_2N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $S(O)_2C_{1-6}$ алкил, $N(C_{1-6}$ алкил) SO_2C_{1-6} алкил, $S(O)(C_{1-6}$ алкил), $S(O)N(C_{1-6}$ алкил) $_2$ или $N(C_{1-6}$ алкил) $S(O)(C_{1-6}$ алкил), где каждый алкил, циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклил, спироциклоалкил, спирогетероциклил, гетероарил или арил необязательно замещен одним или несколькими R^{10} ;

R^7 в каждом случае независимо представляет собой H , галоген, OH , CN , OC_{1-6} алкил, NH_2 , $NH(C_{1-6}$ алкил), $N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $S(O)_2H(C_{1-6}$ алкил), $S(O)_2N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $S(O)_2(C_{1-6}$ алкил), $S(O)_2OH$, $C(O)C_{1-6}$ алкил, $C(O)NH_2$, $C(O)NH(C_{1-6}$ алкил), $C(O)N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $C(O)OH$, $C(O)OC_{1-6}$ алкил, $N(C_{1-6}$ алкил) SO_2C_{1-6} алкил, $S(O)(C_{1-6}$ алкил), $S(O)N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $S(O)_2NH_2$, $N(C_{1-6}$ алкил) $S(O)(C_{1-6}$ алкил) или тетразол;

R^{10} в каждом случае независимо представляет собой C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил, C_{2-6} алкинил, C_{3-8} циклоалкил, C_{4-8} циклоалкенил, гетероциклил, гетероарил, арил, OH , галоген, оксо, NO_2 , CN , NH_2 , OC_{1-6} алкил, OC_{3-6} циклоалкил, O -арил, O -гетероарил, NHC_{1-6} алкил, $N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $S(O)_2NH(C_{1-6}$ алкил), $S(O)_2N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $S(O)_2C_{1-6}$ алкил, $C(O)C_{1-6}$ алкил, $C(O)NH_2$, $C(O)NH(C_{1-6}$ алкил), $NHC(O)C_{1-6}$ алкил, $C(O)N(C_{1-6}$ алкил) $_2$, $C(O)OC_{1-6}$ алкил, $N(C_{1-6}$ алкил) SO_2C_{1-6} алкил, $S(O)(C_{1-6}$ алкил), $S(O)N(C_{1-6}$ алкил) $_2$ или $N(C_{1-6}$ алкил) $S(O)(C_{1-6}$ алкил), где каждый алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклил, гетероарил или арил необязательно замещен одним или несколькими R^{12} ;

R^{12} в каждом случае независимо представляет собой галоген;

m представляет собой целое число от 0 до 5;

r представляет собой целое число от 0 до 5.

Вариант осуществления настоящего изобретения 15: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где медленное прогрессирование рака измеряют с использованием критериев ответа RECIST 1.1. для целевых поражений или нецелевых поражений у животного.

Вариант осуществления настоящего изобретения 16: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с любым предыдущим вариантом осуществления, где рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).

Вариант осуществления настоящего изобретения 17: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где ингибитор бромодомена СВР/р300 представляет собой соединение формулы (I) в соответствии с вариантом осуществления 12, ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор EGFR, рецепторная тирозинкиназа представляет собой EGFR, рак представляет собой НМРЛ, и более предпочтительно, когда НМРЛ включает мутацию Т790М в EGFR, и более предпочтительно, когда ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой осимертиниб.

Вариант осуществления настоящего изобретения 18: Ингибитор бромодомена СВР/р300 или композиция для применения или способ в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где ингибитор бромодомена СВР/р300 представляет собой соединение формулы (A) в соответствии с вариантом осуществления 13, предпочтительно соединение CCS1477 (№ 222941-37-7 в CAS), ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор EGFR, рецепторная тирозинкиназа представляет собой EGFR, рак представляет собой НМРЛ, и более предпочтительно, когда НМРЛ включает мутацию Т790М в EGFR, и более предпочтительно, где ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой осимертиниб.

Что касается вышеприведенного варианта осуществления изобретения 13, то следует отметить, что соединения формулы (A) были описаны в заявках WO 2016/170324, WO 2018/073586 и WO 2019/202332; при этом содержание всех указанных заявок и их описания во всей своей полноте, и, в частности, описания в отношении синтеза соединения формулы (A), включены в настоящий документ посредством ссылки.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения рака у животного, предусматривающий введение нуждающемуся в этом животному ингибитора бромодомена СВР/р300 и ингибитора рецепторной

тирозинкиназы, выбранного из группы, состоящей из ингибиторов EGFR, ALK, MET, HER2, ROS1, RET, NTRK1 и AXL, или ингибитора KRAS или BRAF, где рак включает изменение соответствующего рецептора тирозинкиназы или KRAS или BRAF, и где ингибитор бромодомена CBP/p300 сам по себе не замедляет прогрессирование рака.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения рака с помощью композиции, содержащей синергическую комбинацию ингибитора бромодомена CBP/p300 или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, выбранного из группы, состоящей из ингибиторов EGFR, ALK, MET, HER2, ROS1, RET, NTRK1 и AXL, или ингибитора KRAS или BRAF, где рак включает изменение в соответствующей рецепторной тирозинкиназе, KRAS или BRAF, и где ингибитор бромодомена CBP/p300 сам по себе не замедляет прогрессирование рака.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ увеличения продолжительности ответа на терапию рака у животного ингибитором рецепторной тирозинкиназы или ингибитором KRAS или BRAF, предусматривающий введение животному с раком ингибитора бромодомена CBP/p300 или его фармацевтически приемлемой соли, где продолжительность ответа на противораковую терапию при введении ингибитора CBP/p300 или его фармацевтически приемлемой соли удлинняется по сравнению с продолжительностью ответа на противораковую терапию в отсутствие введения ингибитора CBP/p300 или его фармацевтически приемлемой соли, и где ингибитор рецепторной тирозинкиназы выбран из группы, состоящей из ингибиторов EGFR, ALK, MET, HER2, ROS1, RET, NTRK1 и AXL, или он представляет собой ингибитор KRAS или BRAF.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ ингибирования роста раковой клетки, который предусматривает введение в раковую клетку ингибитора бромодомена CBP/p300 и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, выбранного из группы, состоящей из ингибиторов EGFR, ALK, MET, HER2, ROS1, RET, NTRK1 и AXL, или ингибитора KRAS или BRAF, где раковая клетка имеет изменения в соответствующей рецепторной тирозинкиназе, или в KRAS или BRAF, и где ингибитор бромодомена CBP/p300 сам по себе не ингибирует роста раковой клетки, и где ингибитор бромодомена CBP/p300 вводят в количестве, эффективном для предотвращения резистентности раковой клетки к ингибитору киназы.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ индуцирования гибели раковых клеток, предусматривающий введение в раковую клетку ингибитора бромодомена CBP/p300 и ингибитора рецепторной тирозинкиназы,

выбранного из группы, состоящей из ингибиторов EGFR, ALK, MET, HER2, ROS1, RET, NTRK1 и AXL, или ингибитора KRAS или BRAF, где раковая клетка имеет изменения в соответствующей рецепторной тирозинкиназе, или в KRAS или BRAF, и где ингибитор бромодомена СВР/p300 сам по себе не вызывает гибели раковых клеток.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения изменение в рецепторной тирозинкиназе может быть онкогенным изменением, при этом термин «онкогенное изменение» в этом варианте осуществления, указанном в разделе 4, может относиться к генетическим изменениям клеточных протоонкогенов. Следствием этих генетических изменений/мутаций может быть предоставление клетке преимуществ в отношении роста. В одном варианте осуществления настоящего изобретения генетические механизмы мутации, амплификации генов, слияния генов и/или хромосомных перестроек могут активировать онкогены в новообразованиях у человека.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения онкогенное изменение представляет собой мутацию гена EGFR, выбранную из группы, включающей делецию экзона 19 в EGFR, мутации в EGFR L858R, T790M, T854A, D761Y, L747S, G796S/R, L792F/H, L718Q, вставку экзона 20 в EGFR, мутацию в EGFR G719X (где X представляет собой любую другую аминокислоту), L861X, S768I или амплификацию EGFR. В предпочтительном варианте осуществления изобретения изменение представляет собой мутацию T790M в EGFR. В другом варианте осуществления настоящего изобретения рак представляет собой НМРЛ, а изменение представляет собой мутацию, включающую делецию экзона 19 в EGFR, мутацию L858R или T790M в EGFR.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения онкогенное изменение представляет собой мутацию или реаранжировку гена RET, выбранную из группы, включающей KIF5B-RET, CCDC6-RET, NCOA4-RET, TRIM33-RET, RET-V804L, RET-L730, RET-E732, RET-V738, RET-G810A, RET-Y806, RET-A807 или RET-S904F.

В другом варианте осуществления онкогенное изменение представляет собой мутацию гена HER2, выбранную из группы, включающей вставку или мутацию экзона 20 в HER2 и мутацию HER2-C805S, HER2 T798M, HER2 L869R, HER2 G309E, HER2 S310F или амплификацию HER2.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения онкогенное изменение представляет собой слияние или реаранжировку гена ROS1, выбранную из группы, включающей CD74-ROS1, GOPC-ROS1, EZR-ROS1, CEP85L-ROS1, SLC34A2-ROS1, SDC4-ROS1, FIG-ROS1, TPM3-ROS1, LRIG3-ROS1, KDELR2-ROS1, CCDC6-ROS1, TMEM106B-ROS1, TPD52L1-ROS1, CLTC-ROS1 и LIMA1-ROS1 или мутацию в ROS1, включающую G2032R, D2033N, S1986Y/F, L2026M и/или L1951R.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения онкогенное изменение представляет собой амплификацию гена MET, мутацию гена MET, такую как Y1230C, D1227N, D1228V, Y1248H в MET, а также пропуск экзона 14 в MET, или слияние генов или реаранжировки, выбранные из группы, включающей TPR-MET, CLIP2-MET, слияние TFG-MET, слияние KIF5B-MET.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения онкогенное изменение представляет собой мутацию гена KRAS, выбранную из группы, включающей G12C, G12V, G12D, G13D, Q61H или L или R, K117N.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения онкогенное изменение представляет собой мутацию гена ALK, слияние или реаранжировку генов, выбранную из группы, включающей EML4-ALK, TFG-ALK, KIF5B-ALK, KLC1-ALK, STRN-ALK при НМРЛ, EML4-ALK, C2orf44-ALK, EML4-ALK, TPM-ALK, VCL-ALK, TPM3-ALK, EML4-ALK или VCL-ALK.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения онкогенное изменение представляет собой мутацию гена BRAF, выбранную из группы, включающей V600E или V600K.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения онкогенное изменение представляет собой слияние или реаранжировку гена NTKR, выбранную из группы, включающей TPM3-NTRK1, ETV6-NTRK3, TPM3-NTRK1, TPR-NTRK1, TFG-NTRK1, PPL-NTRK1, ETV6-NTRK3, TPR-NTRK1, MPRIP-NTRK1, CD74-NTRK1, SQSTM1-NTRK1, TRIM24-NTRK2, LMNA-NTRK, ETV6-NTRK3, BCAN-NTRK1, ETV6-NTRK3, AML, GIST, NFASC-NTRK1, BCAN-NTRK1, AGLB4-NTRK2, VCL-NTRK2, ETV6-NTRK3, BTBD1-NTRK3, RFWD2-NTRK1, RABGAP1L-NTRK1, TP53-NTRK1, AFAP1-NTRK2, NACC2-NTRK2, OKI-NTRK2, PAN3-NTRK2, или мутацию гена NTKR1, выбранную из группы, включающей F589L, G595R, G667C/S, A608D, или мутацию гена NTRK3, выбранную из группы, включающей G623R, G696A.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор EGFR. В другом варианте осуществления ингибитор EGFR выбран из группы, включающей цетуксимаб, панитумумаб, залутумумаб, нимотузумаб, матузумаб, гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, нератиниб, вандетаниб, нецитумумаб, осимертиниб, афатиниб, дакомитиниб, AP26113, poziotиниб, ингибитор EGFR (номер 879127-07-8 в CAS), ингибитор EGFR/ErbB2/ErbB-4 (номер 881001-19-0 в CAS), ингибитор EGFR/ErbB-2 (номер 17924861-4 в CAS), ингибитор EGFR II (BIBX 1382, номер 196612-93-8 в CAS), ингибитор EGFR III (номер 733009-42-2 в CAS),

ингибитор EGFR/ErbB-2/ErbB-4 II номер 944341-54-2 в CAS) или ингибитор РКСβII/EGFR (номер 145915-60-2 в CAS).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения изменение в рецепторной тирозинкиназе представляет собой мутацию в гене EGFR.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор RET. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор RET выбран из группы, включающей кабозантиниб, вандетаниб, ленватиниб, алектиниб, апатиниб, понатиниб, LOXO-292, BLU-667 или RXDX-105.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор HER2. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор HER2 выбран из группы, включающей трастузумаб, гиалуронидазу/трастузумаб фам-трастумзумаб дерукстекан, адо-трастузумаб эмтанзин, лапатиниб, нератиниб, пертузумаб, тукатиниб, позиотиниб или дакомитиниб.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор ROS1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор ROS1 выбран из группы, включающей кризотиниб, церитиниб, бригаиниб, лорлатиниб, этректиниб, кабозантиниб, DS-6051b, TPX -0005.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор MET. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор MET выбран из группы, включающей кризотиниб, кабозантиниб, MGCD265, AMG208, альтиратиниб, голватиниб, глесантиниб, форетиниб, авуматиниб, тиватиниб, саволитиниб, AMG337, капматиниб и тепотиниб, ОМО-1 [JNJ38877618] или антитела к MET, такие как онартузумаб и мибетузумаб [LY2875358], или антитела к HGF, такие как фиклатузумаб [AV-299] и рилотумумаб [AMG102].

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор KRAS. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор KRAS выбран из группы, включающей ингибиторы AMG510, MRTX849, JNJ-74699157/ARS-3248, BI1701963, BAY-293 или «RAS(ON)».

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор ALK. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор ALK выбран из группы, включающей кризотиниб, церитиниб, алектиниб, лорлатиниб или бригаиниб.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор представляет собой ингибитор BRAF. В другом варианте осуществления настоящего

изобретения ингибитор BRAF выбран из группы, включающей вемурафениб, дабрафениб, энкорафениб или любой неспецифический ингибитор RAF.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор рецепторной тирозинкиназы представляет собой ингибитор NTRK. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор NTRK выбран из группы, включающей энтректиниб, ларотректиниб (LOXO-101), LOCO-195, DS-6051b, кабозантиниб, мерестиниб, TSR-011, PLX7486, MGCD516, кризотиниб, регорафениб, довитиниб, лестауртиниб, BMS-754807, данусертиб, ENMD-2076, мидостаурин, PHA-848125 AC, BMS-777607, алтриратиниб, AZD7451, MK5108, PF-03814735, SNS-314, форетиниб, нинтеданиб, понатиниб, ONO-5390556 или TPX-0005.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения композиция или комбинация ингибитора бромодомена CBP/p300 или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, проявляет синергизм при лечении рака по сравнению с ингибитором CBP/p300 применяемым отдельно, ингибитором рецепторной тирозинкиназы, или ингибитором KRAS или BRAF применяемым отдельно. Как используется в контексте описания вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных в разделе 4, термин «синергический» относится к взаимодействию между двумя или более лекарственными средствами, которое приводит к тому, что общий эффект действия лекарственных средств превышает сумму индивидуальных эффектов действия каждого лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения синергический эффект представляет собой увеличение уровня ответа животного на комбинацию ингибитора бромодомена CBP/p300 и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF. В другом варианте осуществления настоящего изобретения увеличение уровня ответа измеряют как увеличение эффективности лечения рака.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения противораковый эффект, обеспечиваемый композицией или комбинацией ингибитора бромодомена CBP/p300 или его фармацевтически приемлемой соли и рецептора тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, превышает противораковый эффект, обеспечиваемый монотерапией при той же дозе ингибитора CBP/p300 или ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF. Как используется в контексте вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных в разделе 4, термин «противораковый» относится к лечению злокачественного или ракового заболевания. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается композиция для применения или способ, где противораковый эффект, обеспечиваемый композицией или

комбинацией ингибитора бромодомена СВР/p300 или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, по меньшей мере в 2 раза больше, по меньшей мере в 3 раза больше, по меньшей мере в 5 раз больше или по меньшей мере в 10 раз больше, чем при монотерапии.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения композиция или комбинация ингибитора бромодомена СВР/p300 или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, задерживает или снижает риск резистентности рака к ингибитору рецепторной тирозинкиназы или к ингибитору KRAS или BRAF. Как используется в контексте вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных в разделе 4, термин «резистентность рака» относится к снижению эффективности лекарственного средства; и более конкретно, этот термин может относиться к развитию лекарственной резистентности раковых клеток. В другом варианте осуществления рак не становится устойчивым к ингибитору рецепторной тирозинкиназы или ингибитору KRAS или BRAF в течение по меньшей мере 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 24 месяцев, 48 месяцев или 60 месяцев. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/p300 вводят в количестве, эффективном для предотвращения резистентности раковой клетки к ингибитору рецепторной тирозинкиназы или к ингибитору KRAS или BRAF.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/p300 ингибирует бромодомен СВР и/или p300 (также называемого гистонацетилтрансферазой p300, E1A-связывающим белком p300, E1A-ассоциированным белком p300) и СВР (также известным как CREB-связывающий белок или CREBBP), которые представляют собой два структурно очень сходных белка, коактивирующих транскрипцию.

Как используется здесь в контексте вариантов осуществления настоящего изобретения, представленных в разделе 4 описания настоящего изобретения, термин «ингибитор бромодомена СВР/p300» можно рассматривать как относящийся к соединению, которое связывается с бромодоменом СВР и/или бромодоменом p300, и ингибирует и/или снижает биологическую активность или функция СВР и/или p300. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/p300 может связываться с СВР и/или p300 преимущественно (например, исключительно) за счет контактов и/или взаимодействий с бромодоменом СВР и/или бромодоменом p300. В некоторых вариантах осуществления ингибитор бромодомена СВР/p300 может связываться с СВР и/или p300 за счет контактов и/или взаимодействий с

бромодоменом СВР и/или бромодоменом р300, а также с дополнительными остатками и/или доменами СВР и/или р300. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/р300 может существенно или полностью ингибировать биологическую активность СВР и/или р300. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биологическая активность может заключаться в связывании бромодомена СВР и/или р300 с хроматином (например, с гистонами, связанными с ДНК) и/или с другим ацетилированным белком. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения в контексте вариантов осуществления, описанных в разделе 4, ингибитор может иметь значение величины IC50 или константу связывания менее приблизительно 50 мкМ, менее приблизительно 1 мкМ, менее приблизительно 500 нМ, менее приблизительно 100 нМ, менее приблизительно 10 нМ или менее приблизительно 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/р300 может связываться с бромодоменом СВР и ингибировать его. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/р300 может связываться с бромодоменом р300 и ингибировать его. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/р300 может не ингибировать гистонацетилтрансферазную активность СВР/р300.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/р300 представляет собой соединение формулы (I). В одном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/р300 представляет собой соединение формулы (A), предпочтительно соединение CCS1477 (номер 2222941-37-7 в CAS). В другом варианте осуществления ингибитор бромодомена СВР/р300 представляет собой FT-7051. В другом варианте осуществления настоящего изобретения соединение формулы (I), соединение формулы (A), предпочтительно соединение CCS1477 или соединение FT-7051, представлено в суточной дозе лекарственного средства в количестве, выбранном из группы, включающем 10 мг, 15 мг, 25 мг, 50 мг, 100 мг, 150мг или 200мг. В другом варианте осуществления настоящего изобретения соединение CCS1477 вводят 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней в неделю. В другом варианте осуществления настоящего изобретения соединение CCS1477 вводят два раза в день. В другом варианте осуществления настоящего изобретения введение в раковую клетку включает приведение раковой клетки в контакт с ингибитором СВР/р300 и ингибитором рецепторной тирозинкиназы, или ингибитором KRAS или BRAF.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения дозировка зависит от множества факторов, включая возраст, массу тела и состояние пациента, а также способ

введения. Суточные дозировки могут варьироваться в широких пределах, и они будут корректироваться с учетом индивидуальных потребностей в каждом конкретном случае. Однако обычно доза, принятая для каждого пути введения, когда соединение вводят отдельно взрослому человеку, может находиться в диапазоне от 0,0001 до 50 мг/кг массы тела, чаще всего в диапазоне от 0,001 до 10 мг/кг массы тела, например, от 0,01 до 1 мг/кг массы тела. Такую дозу можно вводить, например, от 1 до 5 раз в день. Для внутривенной инъекции подходящая суточная доза может составлять от 0,0001 до 1 мг/кг массы тела, предпочтительно от 0,0001 до 0,1 мг/кг массы тела. Суточная доза может быть введена в виде разовой дозы или в соответствии со схемой разделенных доз.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения прогрессирующее раковое заболевание или продолжительность ответа на терапию рака можно измерить с помощью критериев ответа RECIST 1.1. на целевые или нецелевые поражения у субъекта/животного.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения термин «не замедляет прогрессирующее раковое заболевание», описанный в вариантах осуществления изобретения, представленных в разделе 4, может быть определен как ответ у субъектов, у которых нет какого-либо клинического ответа по критериям RECIST 1.1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения термин «не замедляет прогрессирующее раковое заболевание», описанный в вариантах осуществления изобретения, представленных в разделе 4, может быть определен как ответ у субъектов/животных, у которых нет частичного клинического ответа по критериям RECIST 1.1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения термин «не замедляет прогрессирующее раковое заболевание» измеряется как отсутствие уровня объективного ответа и/или отсутствие повышения выживаемости без прогрессирующего рака в соответствии с критериями ответа RECIST 1.1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения термин «не замедляет прогрессирующее раковое заболевание» измеряется как уменьшение менее чем на 30% суммы самых длинных диаметров целевых поражений, принимая в качестве эталона исходную сумму самых длинных диаметров целевых поражений.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак выбран из нейромы слухового нерва, острого лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза, острого Т-клеточного лейкоза, базальноклеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака головного мозга, рака молочной железы, бронхогенной карциномы, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хориокарциномы, хронического лейкоза, хронического лимфолейкоза, хронического миелоцитарного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, рака толстой кишки, колоректального рака, краниофарингиомы, цистаденокарциномы, диффузной

крупноклеточной В-клеточной лимфомы, диспролиферативных изменений, эмбрионального рака, рака эндометрия, эндотелиосаркомы, эпендимомы, эпителиальной карциномы, эритролейкемии, рака пищевода, рака молочной железы положительного по эстрогеновым рецепторам, эссенциальной тромбоцитемии, опухоли Юинга, фиброзной комы, фолликулярной лимфомы, герминогенного рака яичка, глиомы, глиобластомы, глиосаркомы, болезни тяжелых цепей, рака головы и шеи, гемангиобластомы, гепатомы, гепатоцеллюлярного рака, гормононечувствительного рака предстательной железы, лейомиосаркомы, лейкемии, липосаркомы, рака легкого, лимфагиоэндотелиосаркомы, лимфангиосаркомы, лимфобластного лейкоза, лимфомы, лимфоидных злокачественных новообразований Т- или В-клеточного происхождения, медуллярной карциномы, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, мезотелиомы, множественной миеломы, миелогенного лейкоза, миеломы, миксосаркомы, нейробластомы, срединного рака NUT (NMC), немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), олигодендроглиомы, рака ротовой полости, остеогенной саркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной аденокарциномы, папиллярной карциномы, пинеаломы, истинной полицитемии, рака предстательной железы, рака прямой кишки, почечно-клеточного рака, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, рака сальных желез, семиномы, рака кожи, мелкоклеточного рака легкого, солидных опухолей (карцином и сарком), мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, плоскоклеточного рака, синовиомы, рака потовых желез, рака щитовидной железы, макроглобулинемии Вальденстрема, опухоли яичек, рака матки и опухоли Вильмса. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой меланому, НМРЛ, рак почек, рак яичников, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярный рак или рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления любого из способов настоящего изобретения рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, колоректальный рак и/или меланому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой колоректальный рак.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/p300 и ингибитор рецепторной тирозинкиназы, или ингибитор KRAS или BRAF, вводят животному одновременно в виде одной композиции. В другом варианте

осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена CBP/p300 и ингибитор рецепторной тирозинкиназы, или ингибитор KRAS или BRAF, вводят животному по отдельности. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена CBP/p300 и ингибитор рецепторной тирозинкиназы, или ингибитор KRAS или BRAF, вводят животному одновременно. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена CBP/p300 вводят животному до введения ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF. В другом варианте осуществления настоящего изобретения животное представляет собой человека.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения термин «эффективное количество» агента, например, фармацевтической композиции, может относиться к количеству, эффективному в дозах и в течение времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективное количество относится к количеству ингибитора бромодомена CBP/p300 и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, которое (i) лечит конкретное заболевание, состояние или нарушение, (ii) ослабляет, улучшает или устраняет один или несколько симптомов конкретного заболевания, состояния или нарушения, или (iii) предотвращает или задерживает появление одного или нескольких симптомов конкретного заболевания, состояния или нарушения, как писано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективное количество ингибитора бромодомена CBP/p300 и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, может снижать количество раковых клеток; может уменьшить размер опухоли; может ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; может ингибировать (т.е. до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; может в некоторой степени ингибировать рост опухоли; и/или может облегчить до некоторой степени один или несколько симптомов, связанных с раком. Для терапии рака эффективность можно измерить, например, путем оценки времени до прогрессирования заболевания (TTP) и/или путем определения уровня ответа (RR). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения эффективное количество представляет собой количество ингибитора бромодомена CBP/p300 и ингибитора рецепторной тирозинкиназы, или ингибитора KRAS или BRAF, описанных в настоящем документе, достаточное для значительного снижения активности или

количества резистентных к лекарственным средствам или персистирующих раковых клеток, резистентных к лекарственным средствам.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение по изобретению можно вводить пациенту-человеку или животному в сочетании с лучевой терапией или другим химиотерапевтическим средством для лечения рака. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается комбинированная терапия, в рамках которой ингибитор CBP/P300, или ингибитор RTK, или ингибитор KRAS или BRAF, вводят одновременно или последовательно с лучевой терапией; или вводят одновременно или последовательно, или в виде комбинированного препарата с другим химиотерапевтическим агентом или агентами для лечения рака. То или иное химиотерапевтическое средство представляет собой как правило средство, обычно используемое для лечения соответствующего типа рака. Классы химиотерапевтических агентов для комбинирования могут в одном варианте осуществления настоящего изобретения включать, например, антагонисты андрогеновых рецепторов, используемых для лечения рака предстательной железы, например энзалутамид, и ингибиторы CYP17A1 (17 α -гидроксилаза/C17,20-лиаза), например абиратерон. В других вариантах осуществления настоящего изобретения другие химиотерапевтические средства в составе комбинированной терапии могут включать доцетаксел.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения термин «комбинация», используемый в вариантах осуществления изобретения, представленных в разделе 4, может относиться к одновременному, отдельному или последовательному введению. Если введение является последовательным или отдельным, то задержка введения второго компонента не должна быть такой, чтобы можно было потерять положительный эффект от применения комбинации.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения ответ на ингибитор бромодомена CBP/p300 и ингибитор рецепторной тирозинкиназы, или ингибитор KRAS или BRAF, представляет собой устойчивый ответ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения «устойчивый ответ» может относиться к устойчивому эффекту, выраженному в снижении роста опухоли после прекращения лечения. Например, размер опухоли может оставаться таким же или меньшим по сравнению с размером в начале фазы введения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения термин «лечение» (и варианты, такие как «лечить» и другие производные) может относиться к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение патологии у индивидуума или в клетке, подвергаемой лечению, и лечение может осуществляться либо для профилактики

или во время течения клинической патологии. Желательные эффекты лечения могут включать одно или несколько из следующего: предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, стабилизирование (т.е. без ухудшения) состояния при заболевании, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния, увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, когда не получают лечения, и ремиссию или улучшения прогноза. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор бромодомена СВР/p300 и рецепторной тирозинкиназы, или ингибитор KRAS или BRAF, могут быть использованы для задержки развития заболевания или расстройства, или для замедления прогрессирования заболевания или расстройства. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в число лиц, нуждающихся в лечении, могут входить лица, уже имеющие патологическое состояние или расстройство, а также лица, склонные к возникновению такого патологического состояния или расстройства (например, в результате генетической мутации или aberrантной экспрессии гена или белка), или лица, у которых необходимо предотвратить такое состояние или расстройство.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения термин «задержка» может относиться к отсрочке, препятствованию, замедлению, задержке, стабилизации и/или отсрочке развития заболевания (такого как рак) или резистентности к заболеванию. Эта задержка может быть разной продолжительности, в зависимости от истории болезни и/или индивидуума, проходящего лечение. Для специалиста в данной области очевидно, что достаточная или значительная задержка может, по своей сути включать профилактику, поскольку у индивидуума не развивается заболевание. Например, может быть отсрочена поздняя стадия рака, такая как развитие метастазов.

5. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры являются иллюстративными, и они дополнительно описывают настоящее изобретение. Эти примеры не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Получение соединения 00003 (соединение В), соединения 00004 (соединение А), 00030, 00071 и соединения С описано ниже. Также будет полезным описание пути синтеза промежуточного соединения и/или соединения, близкого к вышеуказанным соединениям.

Общие экспериментальные методы

Методы жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС):

Метод А: Установка: Agilent 1260 Бинарный градиентный насос: G1312B, дегазатор; автоматический пробоотборник: ColCom, диодно-матричный детектор (DAD): Agilent G1315D, 220–320 нм, масс-селективный детектор (MSD): Agilent LC/MSD G6130B ESI, положит./отриц. 100–800, испарительный детектор светорассеяния (ELSD) Alltech 3300, поток газа 1,5 мл/мин, температура газа: 40°C; колонка: Waters XSelect™ C18, 30 x 2,1 мм, 3,5 мкм, температура: 35°C, поток: 1 мл/мин, градиент: $t_0 = 5\% \text{ A}$, $t_{1,6 \text{ мин}} = 98\% \text{ A}$, $t_{3 \text{ мин}} = 98\% \text{ A}$, Время восстановления колонки: 1,3 мин. Элюент А: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле, Элюент В: 0,1% муравьиная кислота в воде.

Метод В: Установка: Agilent 1260 Бинарный градиентный насос: G1312B, дегазатор; автоматический пробоотборник: ColCom, DAD: Agilent G1315D, 220–320 нм, MSD: Agilent LC/MSD G6130B ESI, положит./отриц.100–800, ELSD Alltech 3300, поток газа 1,5 мл/мин, температура газа: 40°C; колонка: Waters XSelect™ C18, 50 x 2,1 мм, 3,5 мкм, температура: 35°C, поток: 0,8 мл/мин, градиент: $t_0 = 5\% \text{ A}$, $t_{3,5 \text{ мин}} = 98\% \text{ A}$, $t_{6 \text{ мин}} = 98\% \text{ A}$, Время восстановления колонки: 2 мин. Элюент А: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле, Элюент В: 0,1% муравьиная кислота в воде.

Метод С: Установка: Agilent 1260 Бинарный градиентный насос: G1312B, дегазатор; автоматический пробоотборник: ColCom, DAD: Agilent G1315C, 220–320 нм, MSD: Agilent LC/MSD G6130B ESI, положит./отриц.100–800; колонка: Waters XSelect™ CSH C18, 30 x 2,1 мм, 3,5 мкм, температура: 25°C, поток: 1 мл/мин, градиент: $t_0 = 5\% \text{ A}$, $t_{1,6 \text{ мин}} = 98\% \text{ A}$, $t_{3 \text{ мин}} = 98\% \text{ A}$, время восстановления колонки: 1,3 мин. Элюент А: 95% ацетонитрил + 5% 10 мМ бикарбоната аммония в воде в ацетонитриле. Элюент В: 10 мМ бикарбоната аммония в воде (pH=9,5).

Метод D: Установка: Agilent 1260 Бинарный градиентный насос: G1312B, дегазатор; автоматический пробоотборник: ColCom, DAD: Agilent G1315C, 220–320 нм, MSD: Agilent LC/MSD G6130B ESI, положит./отриц.100–800; колонка: Waters XSelect™ CSH C18, 50x2,1 мм, 3,5 мкм, температура: 25°C, поток: 0,8 мл/мин, градиент: $t_0 = 5\% \text{ A}$, $t_{3,5 \text{ мин}} = 98\% \text{ A}$, $t_{6 \text{ мин}} = 98\% \text{ A}$, время восстановления колонки: 2 мин. Элюент А: 95% ацетонитрил + 5% 10 мМ бикарбоната аммония в воде в ацетонитриле. Элюент В: 10 мМ бикарбоната аммония в воде (pH=9,5).

Методы сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ):

Метод А: Установка: Agilent Infinity II; Бинарный градиентный насос: G7120A, мультисэмплер, вакуумная термокамера (VTC), DAD: Agilent G7117B, 220–320 нм, детек-

тор с фотодиодной матрицей (PDA): 210–320 нм, MSD: Agilent G6135B ESI, положит./отрицат. 100–1000, ELSD G7102A: Испаритель 40°C, распылитель 50° С, поток газа 1,6 мл/мин, колонка: Waters XSelect CSH C18, 50 x 2,1 мм, 2,5 мкм, температура: 25°C, поток: 0,6 мл/мин, градиент: $t_0 = 5\% \text{ B}$, $t_{2 \text{ мин}} = 98\% \text{ B}$, $t_{2,7 \text{ мин}} = 98\% \text{ B}$, время восстановления колонки: 0,3 мин. Элюент А: 10 мМ бикарбоната аммония в воде (рН=9,5), Элюент В: ацетонитрил.

Метод В: Установка: Agilent Infinity II; Бинарный градиентный насос: G7120A, мультисэмплер, VTC, DAD: Agilent G7117B, 220–320 нм, PDA: 210–320 нм, MSD: Agilent G6135B ESI, положит./отрицат. 100–1000, ELSD G7102A: Испаритель 40°C, распылитель 40°C, поток газа 1,6 мл/мин, колонка: Waters XSelect™ CSH C18, 50 x 2,1 мм, 2,5 мкм, температура: 40°C, поток: 0,6 мл/мин, градиент: $t_0 = 5\% \text{ B}$, $t_{2 \text{ мин}} = 98\% \text{ B}$, $t_{2,7 \text{ мин}} = 98\% \text{ B}$, время восстановления колонки: 0,3 мин. Элюент А: 0,1% муравьиная кислота в воде, Элюент В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле.

Методы газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС):

Метод А: Установка: ГХ: Agilent 6890N G1530N; установка МС: MSD 5973 G2577A, EI-положит., температура выдержки: 280°C, диапазон масс: 50–550; Колонка: Rxi-5MS 20 m, внутренний диаметр 180 мкм, размер пор (df) 0,18 мкм; Средняя скорость: 50 см/с; Инжектируемый объем: 1 мкл; Температура инжектора: 250°C; Коэффициент разделения: 100/1; Газ-носитель: Не; Начальная температура: 100°C; Начальное время: 1,5 мин; Задержка растворителя: 1,0 мин; Скорость 75°C/мин; Конечная температура 250°C; Время восстановления колонки 4,3 мин.

Метод В: Установка: ГХ: Agilent 6890N G1530N, Пламенно-ионизационный детектор (FID): темп. детекции: 300°C и МС: MSD 5973 G2577A, EI-положи., температура выдержки: 280°C, диапазон масс: 50-550; Колонка: Restek Rxi-5MS 20 m, внутренний диаметр 180 мкм, df 0,18 мкм; Средняя скорость: 50 см/с; Инжектируемый объем: 1 мкл; Температура инжектора: 250°C; Коэффициент разделения: 20/1; Газ-носитель: Не; Начальная температура: 60°C; Начальное время: 1,5 мин; Задержка растворителя: 1,3 мин; Скорость 50°C/мин; Конечная температура 250°C; Время восстановления колонки 3,5 мин.

Метод С: Установка: ГХ: Agilent 6890N G1530N, FID: темп. детекции: 300°C и МС: MSD 5973 G2577A, EI-положит., температура выдержки: 280°C Диапазон масс: 50-550; Колонка: Restek Rxi-5MS 20 m, внутренний диаметр 180 мкм, df 0,18 мкм; Средняя скорость: 50 см/с; Инжектируемый объем: 1 мкл; Температура инжектора: 250°C; Коэффициент разделения: 20/1; Газ-носитель: Не; Начальная температура: 100°C; Начальное время:

1,5 мин; Задержка растворителя: 1,3 мин; Скорость 75°C/мин; Конечная температура 250°C; Время восстановления колонки 4,5 мин.

Хиральная жидкостная хроматография (ЖХ):

Метод А: (Установка: Agilent 1260 Quart. Насос: G1311C, автоматический пробоотборник, ColCom, DAD: Agilent G4212B, 220–320 нм, колонка: Chiralcel® OD-H 250 x 4,6 мм, температура: 25°C, скорость потока: 1 мл/мин., Изократность: 90/10, время: 30 мин, Элюент А: гептан, Элюент В: этанол).

Препаративная обращенно-фазовая хроматография:

Метод А: Установка: Reveleris™ Prep MPLC; Колонка: Phenomenex LUNA C18 (150 x 25 мм, 10 мкм); Поток: 40 мл/мин; Температура колонки: комнатная температура; Элюент А: 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в воде, Элюент В: 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в ацетонитриле; Градиент: t=0 мин 5% В, t=1 мин 5% В, t=2 мин 30% В, t=17 мин 70% В, t=18 мин 100% В, t=23 мин 100% В; Детекция УФ: 220/254 нм. Соответствующие фракции объединяли и лиофилизировали.

Метод В: Установка: Reveleris™ Prep MPLC; Колонка: Waters XSelect™ CSH C18 (145 x 25 мм, 10 мкм); Поток: 40 мл/мин; Температура колонки: комнатная температура; Элюент А: 10 мМ бикарбоната аммония в воде, pH = 9,0; Элюент В: 99% ацетонитрил + 1% 10 мМ бикарбоната аммония в воде; Градиент: t=0 мин 5% В, t=1 мин 5% В, t=2 мин 30% В, t=17 мин 70% В, t=18 мин 100% В, t=23 мин 100% В; Детекция УФ: 220/254 нм. Соответствующие фракции объединяли и лиофилизировали.

Хиральная (препаративная) сверхэффективная флюидная хроматография (СФХ)

Метод А: Колонка: приборные модули SFC: Waters Prep100q SFC System, PDA: Waters 2998, коллектор фракций: Waters 2767; колонка: Phenomenex Lux Amylose-1 (250 x 20 мм, 5 мкм), температура колонки: 35°C; поток: 100 мл/мин, автоматизированный регулятор противодавления (ABPR): 170 бар, Элюент А: CO₂, Элюент В: 20 мМ аммиак в метаноле, изократность 10% В, время: 30 мин, детектирование: PDA (210-320 нм), сбор фракций по сигналу PDA.

Метод В: Колонка: приборные модули SFC: Waters Prep100q SFC System, PDA: Waters 2998, коллектор фракций: Waters 2767; колонка: Phenomenex Lux Celulose-1 (250 x 20 мм, 5 мкм), температура колонки: 35°C; поток: 100 мл/мин, ABPR: 170 бар, Элюент А: CO₂, Элюент В: 20 мМ аммиак в метаноле, изократность 10% В, время: 30 мин, детектирование: PDA (210-320 нм), сбор фракций по сигналу PDA.

Метод С: Колонка: приборные модули SFC: Waters Prep100q SFC System, PDA: Waters 2998; колонка: Chiralpak IC (100 x 4,6 мм, 5 мкм), температура колонки: 35°C; поток: 2,5 мл/мин; ABPR: 170 бар; Элюент А: CO₂, Элюент В: метанол с 20 mM аммиака, t=0 мин 5% В, t=5 мин 50% В, t=6 мин 50% В, Детектирование: PDA (210-320 нм); сбор фракций по сигналу PDA.

Метод D: Колонка: приборные модули SFC: Waters Prep 100 SFC UV/MS directed system; детектор с фотодиодной матрицей (PDA) Waters 2998; МС-детектор Waters Acquity QDa; Система управления отбором проб Waters 2767; Колонка: Waters Torus 2-PIC 130A OBD (250 x 19 мм, 5 мкм); Температура колонки: 35°C; Поток: 70 мл/мин; ABPR: 120 бар; Элюент А: CO₂, Элюент В: 20 mM аммиак в метаноле; Линейный градиент: t=0 мин 10% В, t=4 мин 50% В, t=6 мин 50% В; Детектирование: PDA (210-400 нм); Сбор фракций по сигналу PDA для предварительно идентифицированных соединений (TIC).

Исходные материалы

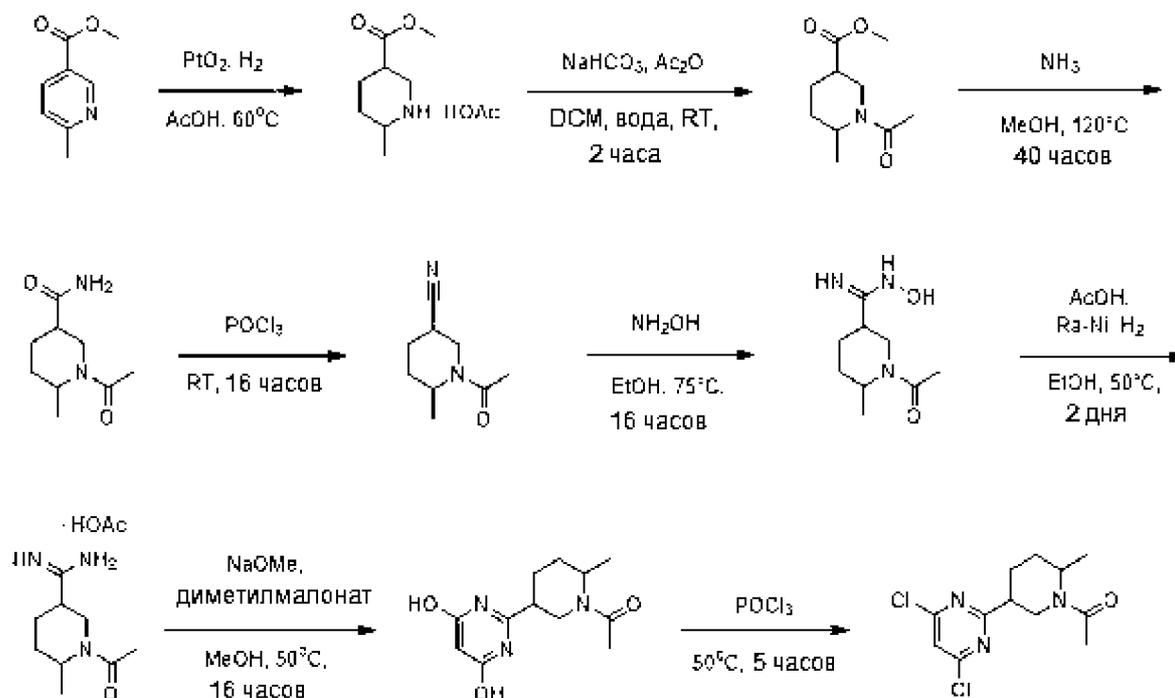
Покупные стандартные реагенты и растворители имели наивысшую коммерческую чистоту, и они использовались как таковые; эти реагенты описаны ниже.

Название соединения	Поставщик	Номер в CAS
Тетракис(трифенилфосфин)палладий(0)	Sigma-Aldrich	14221-01-3
Дихлорид 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроценпалладия(II)	Sigma-Aldrich	72287-26-4
2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропилбифенил	Sigma-Aldrich	564483-18-7
Дихлорид бис(трифенилфосфин)палладия(II)	Fluorochem	13965-03-2
2-трибутилстаннилпиразин	Combi-Blocks	205371-27-3
N-ацетил-D-лейцин	Accela Chembio	19764-30-8
Метил 6-метилпиперидин-3-карбоксилат	Combi-Blocks	908245-03-4
3-бром-5-фторанилин	Combi-Blocks	134168-97-1
1-метил-4-(трибутилстаннил)-1H-имидазол	Synthonix	446285-73-0
3-фтор-5-иоданилин	Combi-Blocks	660-49-1
4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол	Combi-Blocks	269410-08-4
3-броманилин	Combi-Blocks	591-19-5
1,3,5-триметил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол	Combi-Blocks	844891-04-9

3-фтор-5-нитробензойная кислота	Combi-Blocks	14027-75-9
Ацетогидразид	Combi-Blocks	1068-57-1
Гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида	Fluorochem	25952-53-8
1-гидрокси-7-азабензотриазол	Enamine	39968-33-7
Гидроксид (метоксикарбонилсульфамил)триэтиламмония (реактив Берджесса)	Combi-Blocks	29684-56-8
3-нитрофенилацетилен	Combi-Blocks	3034-94-4
Натриевая соль L-аскорбиновой кислоты	Sigma-Aldrich	134-03-2
2-азидопропан, 2,5 М в ДМФА	Enamine	691-57-6
Азидоксетан, 0,5 М в МТБЭ	Enamine	81764-67-2
Азидотриметилсилан	Acros	4648-54-8
1-фтор-3-йод-5-нитробензол	Combi-Blocks	3819-88-3
1-бром-3-хлор-5-нитробензол	Combi-Blocks	219817-43-3
2-йодо-1-метил-4-нитробензол	Fluorochem	7745-92-8
3-бром-5-нитротолуол	Combi-Blocks	52488-28-5
4-бром-1-метил-1,2,3-триазол	Combi-Blocks	13273-53-5
3-нитробензальдегид	Acros	99-61-6
3-нитрофенилацетилен	Combi-Blocks	3034-94-4
Хлор(пентаметилциклопентадиенил)бис(трифенил фосфин)рутений(II)	STREM chemicals	92361-49-4
Фторид тетрабутиламмония 1,0 М раствор в ТГФ	Fluorochem	429-41-4
3-этинил-4-фторанилин	Synthonix	77123-60-5
Трет-бутил 3-цианопиперидин-1-карбоксилат	Combi-Blocks	91419-53-3
Никель Ренея®, 50% суспензия в воде	Acros Organics	7440-02-0
Трис(дибензилиденацетон) дипалладий (0)	Sigma-Aldrich	51364-51-3
Эксфос	Sigma-Aldrich	564483-18-7
2-(трибутилстаннил)-пиримидин	Sigma-Aldrich	153435-63-3
10% палладия на активированном угле	ACROS	7440-05-3

Синтетические процедуры для основных промежуточных продуктов

Промежуточное соединение 1: 1-(5-(4,6-дихлорпиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он



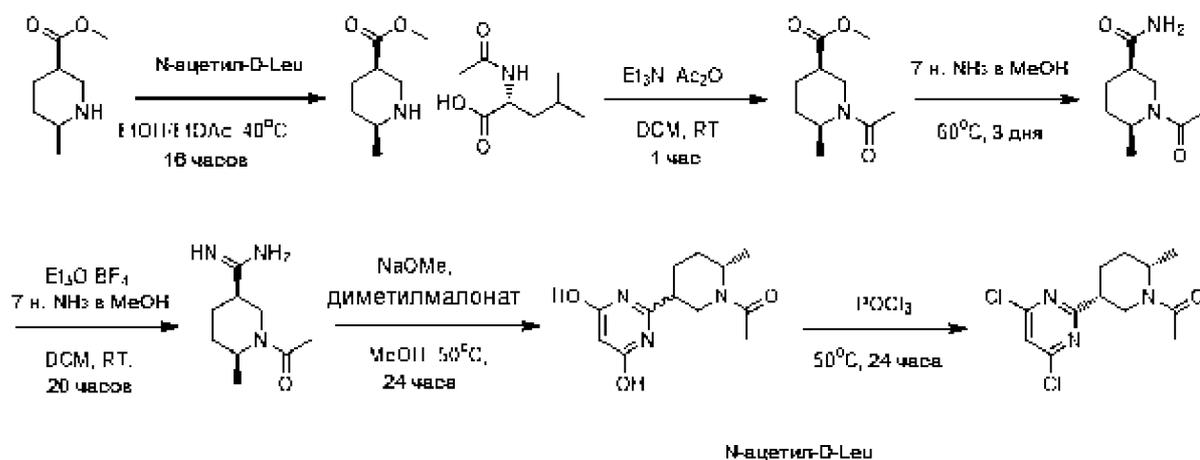
RT - комнатная температура

К раствору метил-6-метилникотината (100 г, 662 ммоль) в уксусной кислоте (250 мл) в стальном автоклаве объемом 1 литр добавляли 0,5 г, 2,202 ммоль оксида платины(IV), после чего реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода при давлении 10 бар и температуре 60°C . Наблюдали быстрое потребление водорода, и автоклав повторно заполняли несколько раз до прекращения потребления водорода и завершения восстановления. Смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через целит. Фильтрат концентрировали, получая ацетат метил-6-метилпиперидин-3-карбоксилата в виде смеси диастереоизомеров (143,8 г, 100%), которую использовали как таковую на следующей стадии. ГХ-МС (метод А): t_{R} 2,40 (80%) и 2,48 мин (20%), 100%, МС (EI) 157,1 (M)⁺, 142,1 (M-Me)⁺. К раствору ацетата метил-6-метилпиперидин-3-карбоксилата (53 г, 244 ммоль) в смеси воды (500 мл) и дихлорметана (DCM; 500 мл) осторожно добавляли бикарбонат натрия (82 г, 976 ммоль) (вскипание!), после чего медленно добавляли уксусный ангидрид (29,9 г, 293 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Органический слой отделяли, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме, получая метил-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксилат (49 г, 100%) в виде желтого масла. Раствор метил-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксилата (49 г, 246 ммоль) в аммиаке в метаноле (7 н., 500 мл, 3,5 моль) перемешивали в автоклаве при 120°C в течение 40 часов. Смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали, получая твердое вещество светло-желтого цвета.

Это твердое вещество растворяли в дихлорметане и фильтровали через слой кремнезема. Фильтрат концентрировали, получая 1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксамид в виде не совсем белого твердого вещества, которое использовали как таковое на следующей стадии. Раствор 1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксамид (266 ммоль) с предыдущей стадии в оксихлориде фосфора (500 мл, 5,37 моль) перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь упаривали в вакууме, получая густое масло. Это масло дважды выпаривали совместно с толуолом и осторожно распределяли между холодным насыщенным карбонатом натрия (вскипание!) и этилацетатом. Органический слой отделяли от основного водного слоя, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали в вакууме, получая продукта в виде густого масла, которое затвердевало при стоянии. Неочищенный продукт растворяли в дихлорметане и фильтровали через слой кремнезема (элюируя 10% метанолом в дихлорметане). ЭВ результате получали 1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбонитрил (28 г, 63%) в виде масла, которое затвердевало при стоянии. ГХ-МС (метод А): t_R 3,78 (63%) и 3,89 мин (378%), 100%, МС (EI) 166,1 (M)⁺. К раствору 1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбонитрила (23 г, 138 ммоль) в этаноле (300 мл) добавляли раствор гидроксиламина (50% в воде, 25,4 мл, 415 ммоль), после чего реакционную смесь перемешивали при температуре кипения с обратным холодильником в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали и трижды упаривали совместно с этилацетатом досуха, получая 1-ацетил-N-гидрокси-6-метилпиперидин-3-карбоксимидамид в виде липкого твердого вещества. ЖХ-МС (метод А): t_R 0,13 мин, 100%, МС (ESI) 200,2 (M+H)⁺. Предполагая количественный выход, продукт использовали как таковой на следующей стадии. К раствору 1-ацетил-N-гидрокси-6-метилпиперидин-3-карбоксимидамида (23 г, 138 ммоль) с предыдущей стадии в этаноле (500 мл) и уксусной кислоте (23,79 мл, 416 ммоль) добавляли и 50% суспензию никеля Ренея (Raney®-Nickel) в воде (5 мл), после чего реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода в течение 2 дней при 50°C. Смесь фильтровали через целит, промывали небольшим количеством этанола и концентрировали, получая 70 г вязкого масла. Его дважды выпаривали совместно с этилацетатом и интенсивно сушили в вакууме, получая ацетат 1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксимидамида (33 г, 98%) в виде зеленовато-желтого масла, которое использовали как таковое на следующей стадии. ЖХ-МС (метод А): t_R 0,14 мин, 90%, МС (ESI) 184,1 (M+H)⁺. К раствору натрия (18,14 г, 789 ммоль) в сухом метаноле в атмосфере азота (60 мл) добавляли ацетат 1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксимидамида (32 г, 132 ммоль) и диметилмалонат (26,1 г, 197 ммоль), после чего реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали, растворяли в воде (300 мл), подкисляли до pH 4, используя 6 н. хлористоводородную кисло-

ту, и оставляли осаждаться. Осадок отфильтровывали, получая 1-(5-(4,6-дигидроксипиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он в виде твердого вещества желтого цвета (10,4 г, 31%), которое использовали как таковое на следующей стадии. Суспензию 1-(5-(4,6-дигидроксипиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она (10,4 г, 41,4 ммоль) в оксихлориде фосфора (200 мл, 2146 ммоль) перемешивали при 50°C. Твердые вещества медленно растворились приблизительно через 3 часа. Через 5 часов реакционную смесь концентрировали в вакууме и дважды выпаривали совместно с толуолом. Оставшееся масло осторожно гасили льдом, нейтрализовали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия и экстрагировали этилацетатом (2 x 100 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме, получая 1-(5-(4,6-дихлорпиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (промежуточное соединение 1, 6,8 г, 57%) в виде желтого масла, которое затвердевало при стоянии. ЖХ-МС (метод А): t_R 1,88 мин, 100%, МС (ESI) 288,1 (M+H)⁺.

Промежуточное соединение 2: 1-((2S,5R)-5-(4,6-дихлорпиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он



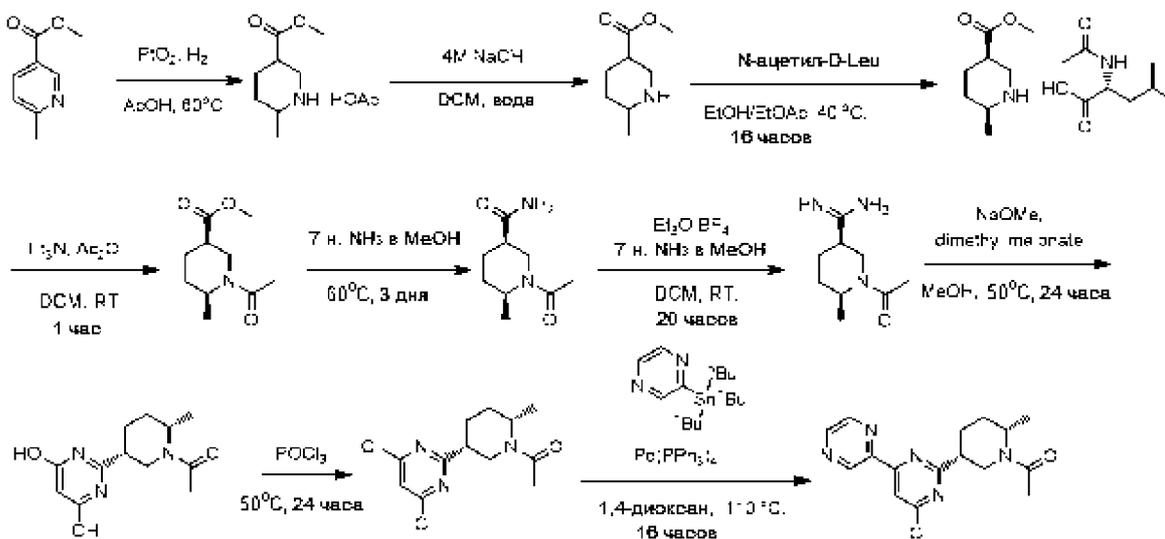
RT - комнатная температура

К раствору N-ацетил-D-лейцина (1 кг, 5,77 моль) в этаноле (1,5 л) добавляли раствор метил-6-метилпиперидин-3-карбоксилата (934 г, 2,38 моль, полученный в промежуточном соединении 1) в этилацетате (3 л) и смесь нагревали до 40°C. Полученному раствору давали возможность достичь комнатной температуры в течение 16 часов, в течение которых происходило осаждение. Осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром (500 мл) и сушили на воздухе, получая неочищенный метил-(3R,6S)-6-метилпиперидин-3-карбоксилатацетил-D-лейцинат (287 г, 34%) в виде белого твердого вещества. Неочищенный метил-(3R,6S)-6-метилпиперидин-3-карбоксилатацетил-D-лейцинат (287 г, 869 ммоль) кристаллизовали из горячей смеси этанола и этилацетата 1:2

(1 л). Осадок отфильтровывали, и осадок растирали в смеси диэтилового эфира и н-пентана 1:1 (500 мл). Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе, получая метил-(3R,6S)-6-метилпиперидин-3-карбоксилатацетил-D-лейцинат (128 г, 44%) в виде белого твердого вещества. К раствору метил-(3R,6S)-6-метилпиперидин-3-карбоксилатацетил-D-лейцината (128 г, 387 ммоль) в дихлорметане (DCM; 1 л) добавляли насыщенный раствор карбоната натрия (1 л). Двухфазную систему энергично перемешивали в течение 10 минут и слои разделяли. Органический слой сушили сульфатом натрия и фильтровали, получая прозрачный раствор. Затем добавляли триэтиламин (65 мл, 465 ммоль) и уксусный ангидрид (44 мл, 465 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали, получая метил-(3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксилат (93 г) в виде светло-желтого твердого вещества. В автоклав загружали метил-(3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксилат (93 г, 387 ммоль) в 7н. растворе аммиака в метаноле (600 мл, 4200 ммоль) и нагревали до 60°C в течение 3 дней. Смесь концентрировали, получая (3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксамида (102 г) в виде бледно-желтого масла. Предполагая количественный выход, продукт использовали как таковой на следующей стадии. Хиральная ЖХ (метод А) $t_R = 12,35$ мин, $ee >98\%$. К раствору (3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксамида (50 г, 271 ммоль) в дихлорметане (500 мл) порциями добавляли тетрафторборат триэтилоксония (77 г, 407 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Медленно добавляли 7 н. раствор аммиака в метаноле (200 мл, 9,15 моль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Смесь концентрировали, получая (3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксимидамид (50 г) в виде твердого вещества розового цвета, которое использовали как таковое на следующей стадии. К раствору 5,4 М метоксида натрия в метаноле (99 мл, 535 ммоль) в метаноле (200 мл) добавляли (3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксимидамид (49 г, 267 ммоль) в метаноле (400 мл) и диметилмалонате (61,4 мл, 535 ммоль). Смесь нагревали до 50°C и перемешивали в течение 24 часов. Смесь подкисляли (pH ~3) концентрированной хлористоводородной кислотой и концентрировали до меньшего объема. Остаток фильтровали через диоксид кремния (20% метанол в дихлорметане) и концентрировали, получая масло оранжевого цвета. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (от 0% до 20% метанола в дихлорметане), получая 1-((2S,5R)-5-(4,6-дигидроксипиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (12 г, 17%) в виде бесцветной смолы. ЖХ-МС (метод С): t_R 0,17 мин, 100%, МС (ESI) 252,1 (M+H)⁺. Раствор 1-((2S,5R)-5-(4,6-дигидроксипиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она (12 г, 47,8 ммоль) в ок-

сихлориде фосфора (80 мл, 858 ммоль) перемешивали при 60°C в течение 24 часов. Реакционную смесь концентрировали и дважды выпаривали совместно с толуолом, получая желтое масло. Масло растворяли в этилацетате и промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Водный слой дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали насыщенным соляным раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали, получая желтого масла. Масло очищали колоночной хроматографией на силикагеле (от 0% до 20% тетрагидрофурана в толуоле), получая 1-((2S,5R)-5-(4,6-дихлорпиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (промежуточное соединение 2, 1,5 г, 11%) в виде бесцветной смолы. ЖХ-МС (метод В): t_R 3,34 мин, 100%, МС (ESI) 288,0 (M+H)⁺; Хиральная СВЭЖХ (метод: А) t_R 2,54 мин, ee и de >95%.

Промежуточное соединение 3: синтез 1-((2S,5R)-5-(4-хлор-6-(пирозин-2-ил)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она



RT - комнатная температура

К раствору метил-6-метилникотината (100 г, 662 ммоль) в уксусной кислоте (250 мл) в стальном автоклаве объемом 1 литр добавляли (0,5 г, 2,202 ммоль) оксида платины(IV), после чего реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода при давлении 10 бар и температуре 60°C. Наблюдали быстрое потребление водорода, и автоклав повторно заполняли несколько раз, пока потребление водорода не прекратилось. Смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через целит. Фильтрат тщательно концентрировали, получая ацетата метил-6-метилпиперидин-3-карбоксилат в виде смеси диастереоизомеров (143,8 г, 100%), которую использовали как таковую на следующей стадии. ГХ-МС (метод А): t_R 2,40 (80%) и 2,48 мин (20%), 100%, МС (EI) 157,1 (M)⁺. Ацетат метил-6-метилпиперидин-3-карбоксилат в виде смеси диастереоизомеров (2,1 кг, 9924

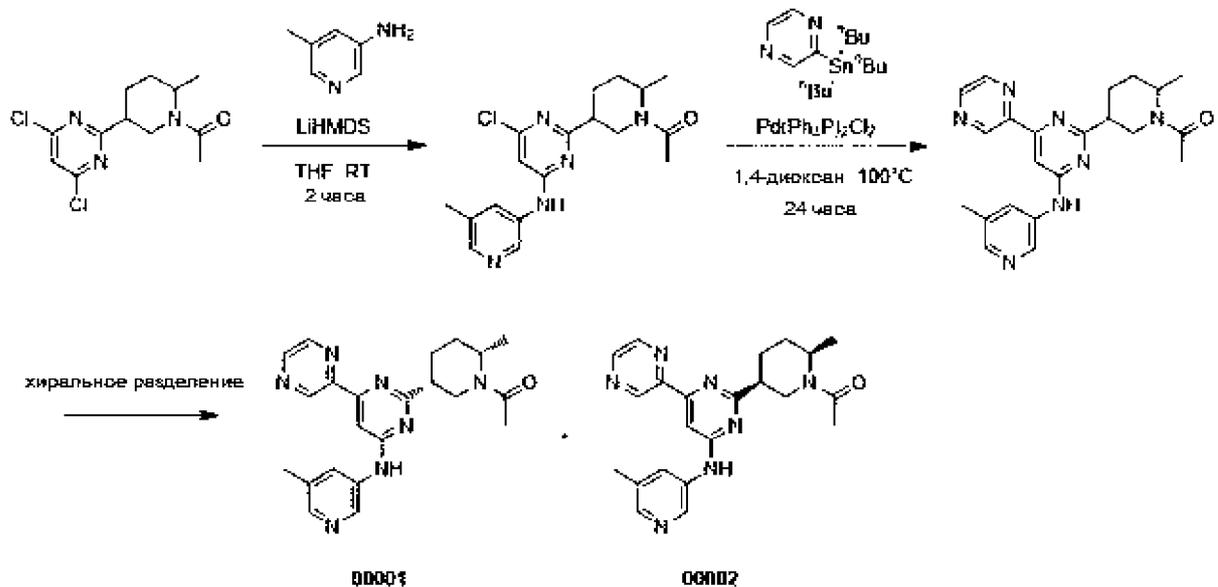
ммоль) разбавляли дихлорметаном (DCM; 4 л) и медленно добавляли 4М раствор гидроксида натрия до pH ~9. Слои разделяли, и водный слой дважды экстрагировали дихлорметаном (после каждой экстракции водный слой повторно подщелачивали 4М раствором гидроксида натрия до pH ~9). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и концентрировали (35°C, 450 мбар) до меньшего объема (~2 л), получая метил-6-метилпиперидин-3-карбоксилат (2,8 кг, 8905 ммоль) в виде ~50% желтого раствора в дихлорметане. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, смесь ротамеров) δ 5,10 (с, 3H), 3,63 (с, 1H), 3,49 – 3,42 (м, 2,2H), 3,41 – 3,34 (м, 0,8H), 3,18–3,10 (м, 0,8H), 3,09–3,03 (м, 0,2H), 2,64–2,54 (м, 0,8H), 2,53–2,34 (м, 1,2H), 2,30–2,20 (м, 1H), 1,95–1,76 (м, 1H), 1,53–1,36 (м, 1H), 1,35–1,21 (м, 1H), 1,04–0,90 (м, 1H), 0,89–0,84 (м, 0,8H), 0,83–0,76 (м, 2,2H). К раствору *N*-ацетил-*D*-лейцина (1 кг, 5,77 моль) в этаноле (1,5 л) добавляли раствор метил-6-метилпиперидин-3-карбоксилата (934 г, 2,38 моль) в этилацетате (3 л) и смесь нагревали до 40°C. Полученному раствору давали возможность достичь комнатной температуры в течение 16 часов, в течение которых происходило осаждение. Осадок отфильтровывали, промывали диэтиловым эфиром (500 мл) и сушили на воздухе, получая неочищенный метил-(3R,6S)-6-метилпиперидин-3-карбоксилатацетил-*D*-лейцинат (287 г, 34%) в виде белого твердого вещества. Неочищенный метил(3R,6S)-6-метилпиперидин-3-карбоксилатацетил-*D*-лейцинат (287 г, 869 ммоль) кристаллизовали из горячей смеси этанола и этилацетата 1:2 (1 л). Осадок отфильтровывали, и осадок растирали в смеси диэтилового эфира и *n*-пентана 1:1 (500 мл). Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе, получая метил-(3R,6S)-6-метилпиперидин-3-карбоксилатацетил-*D*-лейцинат (128 г, 44%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 7,80 (д, *J* = 8,2 Гц, 1H), 5,80–5,00 (с, 2H), 4,20–4,04 (м, 1H), 3,63 (с, 3H), 3,32–3,21 (м, 1H), 2,93–2,80 (м, 2H), 2,73–2,65 (м, 1H), 2,04–1,94 (м, 1H), 1,82 (с, 3H), 1,68–1,49 (м, 3H), 3H), 1,49–1,37 (м, 2H), 1,30–1,15 (м, 1H), 1,02 (д, *J* = 6,4 Гц, 3H), 0,85 (м, 6H). К раствору метил-(3R,6S)-6-метилпиперидин-3-карбоксилатацетил-*D*-лейцината (128 г, 387 ммоль) в дихлорметане (1 л) добавляли насыщенный раствор карбоната натрия (1 л). Двухфазную систему энергично перемешивали в течение 10 минут и слои разделяли. Органический слой сушили над сульфатом натрия и фильтровали, получая прозрачный раствор. Затем добавляли триэтиламин (65 мл, 465 ммоль) и уксусный ангидрид (44 мл, 465 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия, сушили над сульфатом натрия и концентрировали, получая метил-(3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксилат (93 г) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃, смесь ротамеров) δ 5,02–4,87 (м, 0,5H), 4,84–4,68 (м, 0,5H), 4,18–4,05 (м, 0,5H), 3,89–3,77 (м, 0,5H), 3,71 (д, *J* = 11,6 Гц, 3H), 3,31–3,18 (м, 0,5H),

2,79–2,67 (м, 0,5H), 2,51–2,31 (м, 1H), 2,11 (д, $J = 6,7$ Гц, 3H), 2,01–1,90 (м, 1H), 1,88–1,55 (м, 3H), 1,33–1,21 (м, 1,5H), 1,20–1,06 (м, 1,5H). В автоклав загружали метил-(3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксилат (93 г, 387 ммоль) в 7 н. растворе аммиака в метаноле (600 мл, 4200 ммоль) и нагревали до 60°C в течение 3 дней. Смесь концентрировали, получая (3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксамид (102 г) в виде бледно-желтого масла. Предполагая количественный выход, продукт использовали как таковой на следующей стадии. ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, смесь ротамеров) δ 7,38 (с, 1H), 6,89 (д, $J = 24,7$ Гц, 1H), 4,76–4,59 (м, 0,5H), 4,39–4,24 (м, 0,5H), 4,16–4,01 (м, 0,5H), 3,72–3,51 (м, 0,5H), 3,14–2,99 (м, 0,5H), 2,68–2,51 (м, 0,5H), 2,30–2,12 (м, 0,5H), 2,11–1,92 (м, 3,5H), 1,78–1,38 (м, 4H), 1,23–1,11 (м, 1,5H), 1,09–0,94 (м, 1,5H); Хиральная ЖХ (метод А) $t_R = 12,35$ мин, $ee >98\%$. К раствору (3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксамид (50 г, 271 ммоль) в дихлорметане (500 мл) порциями добавляли тетрафторборат триэтилоксония (77 г, 407 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Медленно добавляли 7 н. раствор аммиака в метаноле (200 мл, 9,15 моль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Смесь концентрировали, получая (3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксимид (50 г) в виде твердого вещества розового цвета, которое использовали как таковое на следующей стадии. К раствору 5,4 М метоксида натрия в метаноле (99 мл, 535 ммоль) в метаноле (200 мл) добавляли (3R,6S)-1-ацетил-6-метилпиперидин-3-карбоксимид (49 г, 267 ммоль) в метаноле (400 мл) и диметилмалонате (61,4 мл, 535 ммоль). Смесь нагревали до 50°C и перемешивали в течение 24 часов. Смесь подкисляли (pH ~3) концентрированной хлористоводородной кислотой и концентрировали до меньшего объема. Остаток фильтровали через диоксид кремния (20% метанол в дихлорметане) и концентрировали, получая масло оранжевого цвета. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (от 0% до 20% метанола в дихлорметане), получая 1-((2S,5R)-5-(4,6-дигидроксипиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (12 г, 17%) в виде бесцветной смолы. ЖХ-МС (метод С): t_R 0,17 мин, 100%, МС (ESI) 252,1 (M+H)⁺. Раствор 1-((2S,5R)-5-(4,6-дигидроксипиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она (12 г, 47,8 ммоль) в оксихлориде фосфора (80 мл, 858 ммоль) перемешивали при 60°C в течение 24 часов. Реакционную смесь концентрировали и дважды выпаривали совместно с толуолом, получая желтое масло. Масло растворяли в этилацетате и промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия. Водный слой дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали насыщенным соляным раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали, получая желтое масло. Масло очищали колоночной хроматографией на силикагеле (от 0% до 20% тетрагидрофурана в толуоле), получая 1-((2S,5R)-5-

(4,6-дихлорпиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (1,5 г, 11%) в виде бесцветной смолы. ^1H -ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, смесь ротамеров) δ 7,95 (д, $J = 7,3$ Гц, 1H), 4,85–4,72 (м, 1H), 4,69–4,62 (м, 1H), 4,23–4,13 (м, 1H), 4,07–3,98 (м, 1H), 3,97–3,88 (м, 1H), 3,00–2,89 (м, 1H), 2,81–2,67 (м, 1H), 2,09–1,72 (м, 7H), 1,71–1,58 (м, 2H), 1,25–1,14 (м, 3H), 1,12–1,05 (м, 2H); ЖХ-МС (метод В): t_r 3,34 мин, МС (ESI) 288,0 (M+H)⁺; Хиральная СВЭЖХ (метод: А) t_r 2,54 мин, ee и de >95%. Смесь 2-трибутилстаннилпиразина (607 мг, 1,65 ммоль), 1-((2S,5R)-5-(4,6-дихлорпиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она (500 мг, 1,74 ммоль) и хлорида бис(трифенилфосфин)палладия(II) (244 мг, 0,34 ммоль) в 1,4-диоксане (20 мл) нагревали до 100°C в атмосфере аргона и перемешивали в течение 32 часов. Смесь разбавляли дихлорметаном, содержащим 1% триэтиламина, и наносили на силикагель. Смесь очищали хроматографией на колонке с силикагелем (от 0% до 40% ацетонитрила в дихлорметане, содержащем 1% триэтиламина), получая 1-((2S,5R)-5-(4-хлор-6-(пиразин-2-ил)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (промежуточное соединение 3, 134 мг, 18%) в виде оранжевой смолы. ^1H -ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆, смесь ротамеров) δ 9,46–9,41 (м, 1H), 8,80–8,76 (м, 1H), 8,65–8,59 (м, 1H), 8,33–8,29 (м, 1H), 7,66–7,59 (м, 1H), 4,86–4,70 (м, 0,5H), 4,27–4,17 (м, 0,5H), 4,09–3,97 (м, 0,5H), 3,55–3,41 (м, 0,5H), 3,06–2,98 (м, 0,5H), 2,88–2,82 (м, 0,5H), 2,10–1,90 (м, 6H), 1,89–1,76 (м, 0,5H), 1,75–1,61 (м, 1,5H), 1,29–1,20 (м, 1,5H), 1,17–1,10 (м, 1,5H); ЖХ-МС (метод С): t_r 1,81 мин, МС (ESI) 331,1 (M+H)⁺.

Процедуры синтеза для конечных продуктов

Пример 1: синтез 1-((2S,5R)-2-метил-5-(4-((5-метилпиперидин-3-ил)амино)-6-(пиразин-2-ил)пиримидин-2-ил)пиперидин-1-ил)этан-1-она (соединение 00001) и 1-((2R,5S)-2-метил-5-(4-((5-метилпиперидин-3-ил)амино)-6-(пиразин-2-ил)пиримидин-2-ил)пиперидин-1-ил)этан-1-она (соединение 00002)

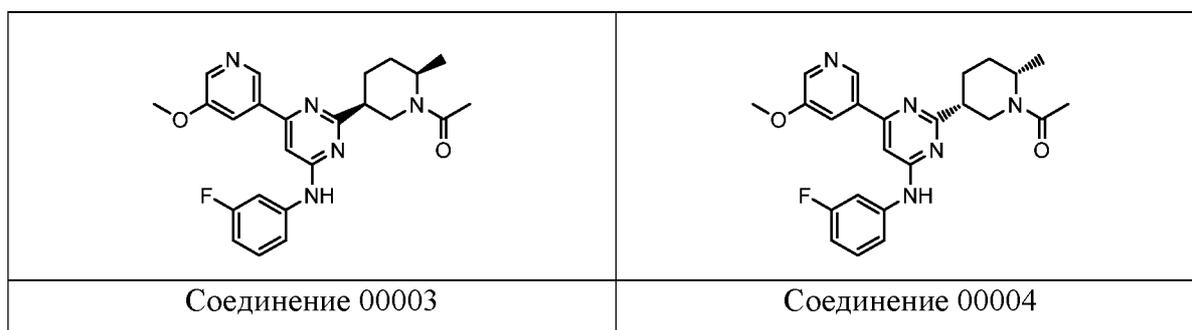


RT - комнатная температура

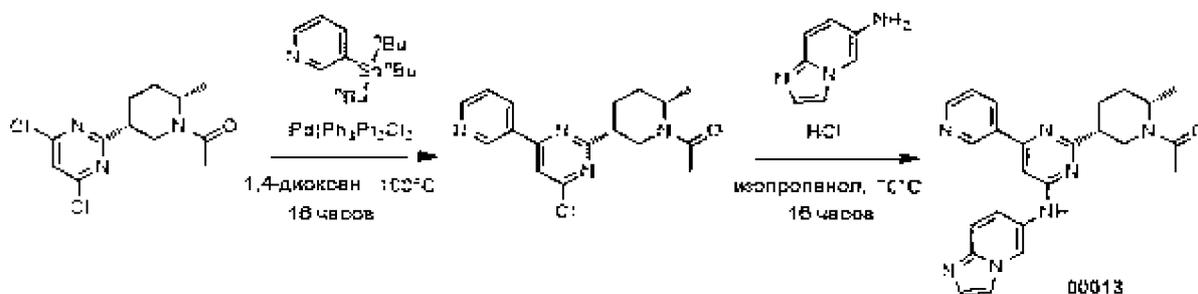
К раствору 3-амино-5-метилпиридина (0,751 г, 6,94 ммоль) в тетрагидрофуране (TNF; 20 мл) добавляли 1М бис(триметилсилил)амид лития в тетрагидрофуране (6,94 мл, 6,94 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем добавляли 1-(5-(4,6-дихлорпиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (промежуточное соединение 1,1 г, 3,47 ммоль) в тетрагидрофуране (20 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Смесь выливали в насыщенный раствор хлорида аммония и дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои один раз промывали насыщенным солевым раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали, получая твердое вещество желтого цвета. Твердое вещество очищали колоночной хроматографией на силикагеле (от 0% до 5% метанола в дихлорметане), получая 1-(5-(4-хлор-6-((5-метилпиридин-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (788 мг, 60%) в виде желтой пены. ЖХ-МС (метод В): t_R 1,81 мин, 100%, МС (ESI) 360,1 (M+H)⁺. Смесь 2-(трибутилстаннил)пиазина (103 мг, 0,28 ммоль), 1-(5-(4-хлор-6-((5-метилпиридин-3-ил)амино)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она (50 мг, 0,14 ммоль) и дихлорида бис(трифенилфосфин)палладия(II) (9,75 мг, 0,01 ммоль) в атмосфере азота растворяли в N,N-диметилформамиде (3 мл). Смесь нагревали до 80°C в течение 24 часов и охлаждали до комнатной температуры. Смесь элюировали через пробку C18 ацетонитрилом, фильтрат очищали обращенно-фазовой хроматографией (метод В) и лиофилизировали, получая 1-(2-метил-5-(4-((5-метилпиридин-3-ил)амино)-6-((пиазин-2-ил)пиримидин-2-ил)пиперидин-1-ил)этан-1-он (22 мг, 37%) в виде белого твердого вещества. Полученную смесь цис-энантиомеров подвергали хиральной препаративной сверхэффективной флюидной хроматографии (СФХ, метод А) и лиофилизировали,

получая оба стереоизомера. 1-((2S,5R)-2-метил-5-(4-((5-метилпиридин-3-ил)амино)-6-(пиразин-2-ил)пиримидин-2-ил)пиперидин-1-ил)этан-1-он (5 мг, 22%): ЖХ-МС (метод D): t_R 3,17 мин, 100%, МС (ESI) 404,1 (M+H)⁺; хиральная СВЭЖХ (метод: А): t_R 3,17 мин, ee и de >95%. 1-((2R,5S)-2-метил-5-(4-((5-метилпиридин-3-ил)амино)-6-(пиразин-2-ил)пиримидин-2-ил)пиперидин-1-ил)этан-1-он (6 мг, 27%): ЖХ-МС (метод D): t_R 3,17 мин, 100%, МС (ESI) 404,2 (M+H)⁺; хиральная СВЭЖХ (метод А): t_R 4,60 мин, ee и de >95%.

Соединение 00003 (которое также упоминается здесь как соединение В) и соединение 00004 (которое также упоминается здесь как соединение А) получали с использованием аналогичных процедур, как в Примере 1, с использованием соответствующих исходных материалов.



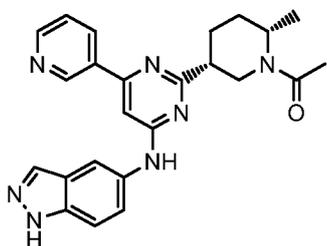
Пример 2: синтез 1-((2S,5R)-5-(4-(имидазо[1,2-а]пиридин-6-иламино)-6-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она (соединение 00013)



Смесь 3-(трибутилстаннил)пиридина (607 мг, 1,65 ммоль), 1-((2S,5R)-5-(4,6-дихлорпиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она (промежуточное соединение 2, 500 мг, 1,74 ммоль) и хлорида бис(трифенилфосфин)палладия(II) (244 мг, 0,34 ммоль) в 1,4-диоксане (20 мл) в атмосфере аргона нагревали до 100°C и перемешивали в течение 32 часов. Смесь разбавляли дихлорметаном, содержащим 1% триэтиламина, и наносили на кремнезем. Смесь очищали колоночной хроматографией на силикагеле (от 0% до 40% ацетонитрила в дихлорметане, содержащем 1% триэтиламина), получая 1-((2S,5R)-5-(4-хлор-6-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (134 мг, 18%) в виде оранжевой смолы. ЖХ-МС (метод С): t_R 1,81 мин, 100%, МС (ESI) 331,1 (M+H)⁺. К раствору 1-((2S,5R)-5-(4-хлор-6-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-

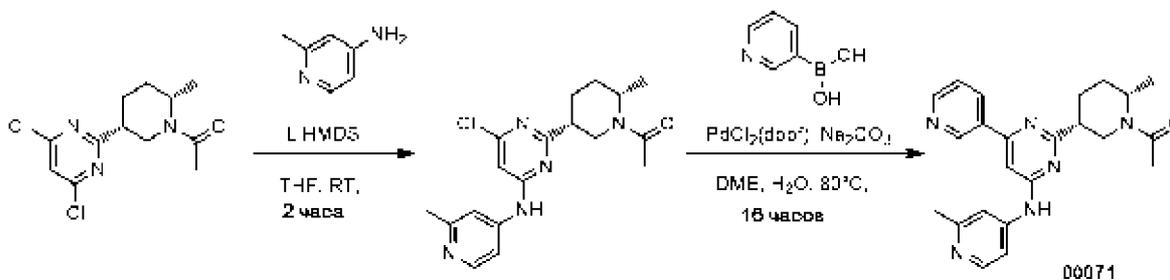
ил)этан-1-она (30 мг, 0,09 ммоль) в 2-пропанол (2 мл), добавляли имидазо[1,2-а]пиридин-6-амин (36,2 мг, 0,27 ммоль) и хлористоводородную кислоту (0,02 мл, 0,27 ммоль). Смесь перемешивали при 60°C в течение 16 часов, выливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия и дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и концентрировали, получая желтое масло. Масло очищали обращенно-фазовой хроматографией (метод В) и лиофилизировали, получая 1-((2S,5R)-5-(4-(имидазо[1,2-а]пиридин-6-иламино)-6-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он в виде голубоватого твердого вещества. ЖХ-МС (метод В): t_r 2,19 мин, 100%, МС (ESI) 428,1 (M+H)⁺.

Соединение 00030 получали с использованием аналогичных процедур, как в Примере 2, с использованием соответствующих исходных материалов.



Соединение 00030

Пример 3А: синтез 1-((2S,5R)-2-метил-5-(4-((2-метилпиперидин-4-ил)амино)-6-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)пиперидин-1-ил)этан-1-она (соединение 00071)

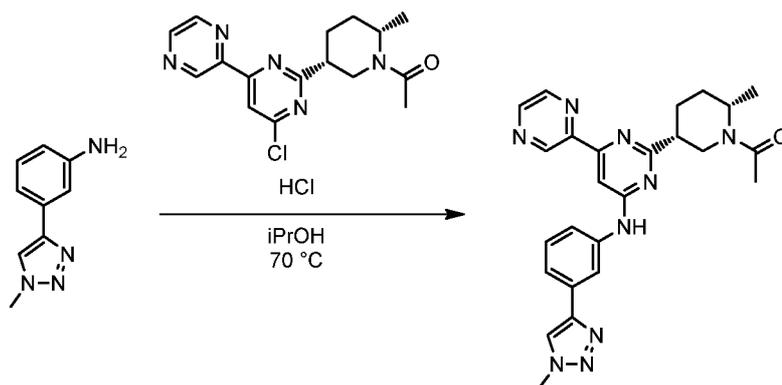


RT - комнатная температура

К раствору 2-метилпиперидин-4-амина (3,19 г, 29,5 ммоль) в сухом тетрагидрофуране (THF; 100 мл) добавляли 1M бис(триметилсилил)амид лития в тетрагидрофуране (29,5 мл, 29,5 ммоль), и смесь перемешивали в течение 10 минут. Затем добавляли 1-((2S,5R)-5-(4,6-дихлорпиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (промежуточное соединение 2, 850 мг, 2,95 ммоль) в сухом тетрагидрофуране (100 мл) в течение 10 минут, и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Смесь выливали в насыщенный раствор хлорида аммония и дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали один раз насыщенным солевым раствором, сушили над

сульфатом натрия и концентрировали, получая коричневое масло. Масло очищали колоночной хроматографией на силикагеле (от 80% до 100% этилацетата в н-гептане, затем от 0% до 10% метанола в дихлорметане), получая 1-((2S,5R)-5-(4-хлор-6-((2-метилпиримидин-4-ил)амино)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-он (275 мг, 25%) в виде желтого масла. ЖХ-МС (метод А): t_R 1,49 мин, 100%, МС (ESI) 360,1 (M+H)⁺. Смесь 1-((2S,5R)-5-(4-хлор-6-((2-метилпиримидин-4-ил)амино)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она (275 мг, 0,76 ммоль), карбоната натрия (162 мг, 1,53 ммоль), пиридин-3-бороновой кислоты (188 мг, 1,53 ммоль) и аддукта PdCl₂(dppf)-CH₂Cl₂ (62,4 мг, 0,08 ммоль) в атмосфере азота растворяли в смеси 1,2-диметоксиэтана (DME; 6 мл) и воды (2 мл). Смесь нагревали до 80°C в течение 1 часа, фильтровали через фильтр C18 и концентрировали, получая темный остаток. Остаток очищали обращенно-фазовой хроматографией (метод В) и лиофилизировали, получая твердое вещество светло-желтого цвета. Продукт дополнительно очищали с помощью хиральной препаративной СФХ (метод В) и лиофилизировали, получая 1-((2S,5R)-2-метил-5-(4-((2-метилпиримидин-4-ил)амино)-6-(пиридин-3-ил)пиримидин-2-ил)пиперидин-1-ил)этан-1-он (135 мг, 41%) в виде бежевого твердого вещества. ЖХ-МС (метод D): t_R 3,06 мин, 100%, МС (ESI) 403,2 (M+H)⁺; хиральная СФХ (метод В): t_R 3,60 мин, ee и de >95%.

Пример 3В: синтез 1-((2S,5R)-2-метил-5-(4-((3-(1-метил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)фенил)амино)-6-(пиразин-2-ил)пиримидин-2-ил)пиперидин-1-ил)этан-1-она (соединение С)



К раствору 1-((2S,5R)-5-(4-хлор-6-(пиразин-2-ил)пиримидин-2-ил)-2-метилпиперидин-1-ил)этан-1-она (промежуточное соединение 3, 120 мг, 0,36 ммоль) в 2-пропаноле (2 мл), добавляли 3-(1-метил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)анилин (188 мг, 1,08 ммоль) и хлористоводородную кислоту (0,08 мл, 1,08 ммоль). Смесь перемешивали при 70°C в течение 16 часов, выливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия и дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и концентрировали, получая желтое масло. Масло очищали обращенно-

фазовой хроматографией (метод В) и лиофилизировали, получая 1-((2S,5R)-2-метил-5-(4-((3-(1-метил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)фенил)амино)-6-(пиразин-2-ил)пиримидин-2-ил)пиперидин-1-ил)этан-1-он (соединение С, 102 мг, 60%) в виде белого твердого вещества. $^1\text{H-NMR}$ (400 МГц, ДМСО-*d*6, смесь ротамеров) δ 10,01 (д, $J = 5,6$ Гц, 1H), 9,56 (дд, $J = 11,0, 1,1$ Гц, 1H), 8,80 (д, $J = 1,5$ Гц, 2H), 8,54–8,42 (м, 2H), 7,72–7,54 (м, 2H), 7,53–7,39 (м, 2H), 4,86–4,76 (м, 1H), 4,27–4,16 (м, 0,5H), 4,15–4,03 (м, 3,5H), 3,58–3,42 (м, 0,5H), 3,00–2,86 (м, 1H), 2,86–2,68 (м, 0,5H), 2,17–1,96 (м, 5H), 1,93–1,77 (м, 0,5H), 1,76–1,64 (м, 1,5H), 1,27 (д, $J = 6,8$ Гц, 1,5H), 1,13 (д, $J = 7,0$ Гц, 1,5H); ЖХ-МС (метод D): t_R 3,31 мин, МС (ESI) 470,2 (M+H) $^+$.

Пример 4: Кристаллическая структура бромодомена CREBBP человека в комплексе с соединением 00004, и результаты анализа BROMOscanTM для соединения А, соединения С и соединения CCS1477

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

Экспериментальная установка: конструкция, использованная для кристаллизации, содержала остатки с 1081 по 1197. Кристаллы CREBBP в комплексе с соединением 00004 получали с использованием установок паровой диффузии для висячей капли. CREBBP в концентрации 20,3 мг/мл (10 mM Hesper, 500 mM NaCl, 5% глицерин, 0,5 mM TCEP, pH 7,4) предварительно инкубировали с 4,3 mM (3,0-кратный молярный избыток) соединения 00004 (150 mM в ДМСО) в течение 1 часа. Затем 1 мкл раствора белка смешивали с 1 мкл резервуарного раствора (0,1 M MgCl₂, 0,1 M сольват/NaOH, pH 6,3, 18 % (масс./об.) PEG 6000 и 10% (об./об.) этиленгликоля) и уравнивали при 4°C над 0,4 мл резервуарного раствора. Хорошо дифрагирующие кристаллы выросли до полного размера за 4 дня.

ПОЛУЧЕНИЕ ДАННЫХ

Кристаллы криозащищали путем добавления 10% глицерина (конечная концентрация) к капле кристаллизации перед установкой препарата для анализа. Полный набор данных для кристалла CREBBP/00004 размером 1,6 Å получали с использованием установки Diamond Light Source (Дидкот, Великобритания) с пучком излучения i03; полученные данные были обобщены, проанализированы и масштабированы с помощью процедур XDS, Pointless и Aimless программы autoPROC pipeline (см. Таблицу 1).

Таблица 1: Статистика для полученных данных

Пространственная группа	P2 ₁
Параметры элементарной ячейки [Å]	a=70,4, b=58,6, c=73,2 $\alpha=90,0$, $\beta=115,4$, $\gamma=90,0$

Разрешение [Å]	66,14-1,60 (1,63-1,60)
Количество уникальных отраженных сигналов	68872 (2664)
I/ σ (I)	14,9 (2,2)
Полнота [%]	97,2 (75,5)
Множественность	3,3 (2,1)
R _{изм.}	0,050 (0,460)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И УТОЧНЕНИЕ СТРУКТУРЫ

Молекулярную замену проводили с использованием ранее определенной структуры CREBBP в качестве исходной модели. В результате нескольких раундов попеременной ручной перестройки и уточнения с помощью программы REFMAC5 была получена окончательная модель (Таблица 2). Факторы атомного смещения моделировали с помощью одного изотропного B-фактора на атом.

Таблица 2: Статистика с уточнениями

Разрешение	35,00-1,60 (1,64-1,60)
R _{рабоч.}	0,151 (0,305)
R _{свобод.}	0,190 (0,351)
Полнота [%]	97,2 (77,6)

Результаты: Получены кристаллы CREBBP/00004, которые дифрагировали с разрешением 1,6 Å, и определена трехмерная структура комплекса белок-лиганд. Чистая электронная плотность на карте пропусков Fo-Fc исходной модели в месте связывания соединения в каждой цепи CREBBP выявила связывание всего соединения (Фиг. 7) и точное его размещение. Кроме того, определенная в эксперименте структура также подтверждает абсолютную стереохимию соединения 00004 (2S,5R на пиперидиновой части).

Анализ BromoKdMAX

Выполняли анализ BromoKdMAX в формате, представленном DiscoverX. Этот анализ можно использовать для определения того, связываются ли соединения с бромодоменом r300 и/или бромодоменом CBP с заданным значением величины Kd (например, 100 нМ или менее).

Принцип анализа следующий: BROMOscan™ - это новая ведущая в отрасли платформа для идентификации низкомолекулярных ингибиторов бромодомена. BROMOscan™, основанный на проверенной технологии KINOMEScan™, использует за-

патентованный анализ сайт-направленной конкуренции связывания лиганда для количественного измерения взаимодействий между тестируемыми соединениями и бромодоменами. Эта надежная и достоверная аналитическая панель подходит для высокопроизводительного скрининга, и она предоставляет количественные данные о связывании лигандов для облегчения идентификации и оптимизации сильнодействующих и селективных низкомолекулярных ингибиторов бромодомена. Анализы BROMOscan™ включают следовые концентрации бромодомена (<0,1 нМ), и, таким образом, обеспечивают получение истинных термодинамических значений K_d ингибитора в широком диапазоне значений аффинностей (от <0,1 нМ до >10 мкМ).

Анализ проводили следующим образом. Для анализа бромодомена штаммы фага T7, обеспечивающие дисплей бромодоменов, выращивали параллельно в 24-луночных блоках в клетках-хозяевах *E. coli*, полученных из штамма BL21. Клетки *E. coli* выращивали до логарифмической фазы, а затем инфицировали фагом T7 из замороженного исходного продукта (множественность заражения = 0,4) и инкубировали со встряхиванием при 32°C до лизиса (90-150 минут). Лизаты центрифугировали (5000 g) и фильтровали (0,2 мкм) для удаления клеточного остатка. Покрытые стрептавидином магнитные шарики обрабатывали в течение 30 минут при комнатной температуре биотинилированными низкомолекулярными или ацетилованными пептидными лигандами для получения аффинных смол для анализа бромодомена. Шарики с лигандом блокировали избытком биотина и промывали блокирующим буфером (SeaBlock (Pierce), 1% BSA, 0,05% Tween 20, 1 мМ DTT) для удаления несвязанного лиганда и уменьшения неспецифического связывания фага. Реакции связывания проводили при комбинировании бромодоменов, аффинных шариков с лигандами и тестируемых соединений (т.е. соединение А, соединение С или соединение CCS1477) в 1х буфере для связывания (17% SeaBlock, 0,33х PBS, 0,04% Tween 20, 0,02% BSA, 0,004% азида натрия, 7,4 мМ DTT). Испытываемые соединения готовили в виде маточных растворов 1000х в 100% ДМСО. Значения величин K_d определяли с использованием 11-точечной серии 3-кратных разведений соединения с одной контрольной точкой ДМСО. Все соединения для измерения K_d распределяли методом акустического переноса (бесконтактное дозирование) в 100% ДМСО. Затем соединения разбавляли непосредственно в анализах так, чтобы конечная концентрация ДМСО составляла 0,09%. Все реакции проводили в полипропиленовых 384-луночных планшетах. Каждый из них имел конечный объем 0,02 мл. Планшеты для анализа инкубировали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 1 часа, и аффинные шарики промывали буфером для промывки (1х PBS, 0,05% Tween 20). Затем шарики ресуспендировали в элюирующем буфере (1х PBS, 0,05% Tween 20, 2 мкМ небитинилированного аффинного лиганда) и инкубиро-

вали при комнатной температуре со встряхиванием в течение 30 минут. Концентрацию бромодомена в элюатах измеряли с помощью количественной ПЦР.

Получены следующие результаты:

	Соединение А	Соединение С	Соединение CCS1477
Обозначения DiscoverX генов, кодирующих соответствующие белки	Kd [нМ]	Kd [нМ]	Kd [нМ]
ATAD2A	>10000	>10000	>10000
ATAD2B	>10000	>10000	>10000
BAZ2A	>10000	>10000	>10000
BAZ2B	>10000	>10000	>10000
BRD1	>10000	>10000	>10000
BRD2(1)	>10000	3700	230
BRD2(1,2)	7600	4500	610
BRD2(2)	>10000	>10000	2100
BRD3(1)	>10000	3700	320
BRD3(1,2)	>10000	7300	1400
BRD3(2)	>10000	>10000	3900
BRD4(1)	>10000	2500	250
BRD4(1,2)	>10000	>10000	6900
BRD4(2)	>10000	>10000	5200
BRD4 (изоформа полноразмерного короткого белка)	7100	1200	440
BRD7	>10000	8000	5100
BRD8(1)	>10000	8400	>10000
BRD8(2)	>10000	>10000	>10000
BRD9	>10000	6300	790
BRDT(1)	>10000	3600	390
BRDT(1,2)	>10000	8500	2400
BRDT(2)	>10000	>10000	8900
BRPF1	>10000	7800	1400
BRPF3	>10000	>10000	>10000

CECR2	>10000	9800	>10000
CREBBP	29	3,2	0,47
EP300	12	2,1	0,26
FALZ	>10000	>10000	5500
GCN5L2	>10000	>10000	>10000
PBRM1(2)	>10000	>10000	>10000
PBRM1(5)	>10000	>10000	3100
PCAF	>10000	9400	>10000
SMARCA2	>10000	>10000	>10000
SMARCA4	>10000	>10000	>10000
TAF1(2)	>10000	230	7900
TAF1L(2)	>10000	1600	>10000
TRIM24(Bromo.)	>10000	7900	680
TRIM24 (PHD, Bromo.)	>10000	>10000	1900 г.
TRIM33 (PHD, Bromo.)	>10000	>10000	>10000
WDR9(2)	>10000	4100	>10000

Соответствующие данные общедоступны: i) для SGC-CBP30, например, в дополнительной информации, представленной в публикации Wu et al., NATURE COMMUNICATIONS (2019) 10:1915 <https://doi.org/10.1038/s41467-09672-2>; ii) для GNE-781, например, в публикации Romero et al., J. Med. Chem. 2017, 60, 9162-9183; и iii) для FT-6876, например, в постере № 3079 под названием «FT-6876, a potent and selective inhibitor of CBP/p300 with antitumor activity in AR-positive breast cancer» ежегодного собрания Американской ассоциации научных исследований в области раковых заболеваний 2020 года (AACR Annual Meeting 2020, Virtual Meeting II, June 22-24, 2020).

Пример 5

Материалы и методы:

Анализ связывания бромодомена CBP (TR-FRET):

Растворы соединений в ДМСО с концентрацией 10 мМ предварительно разбавляли в 25 раз в ДМСО, получая исходные растворы в ДМСО. Затем их разбавляли в 4 раза буфером для анализа. Серию разведений в буфере для анализа выполняли, сохраняя стабильной концентрацию ДМСО. В планшет для анализа (из набора для анализа) вносили 5 мкл соединения в буфере для анализа и реактивы для анализа из набора TR-FRET (Cayman; 600850) в соответствии с инструкцией производителя. Через 1 час инкубации при

комнатной температуре в темноте планшеты для анализа считывали в планшет-ридере Tecan M1000 с использованием режима, определенного в TR-FRET (считывание сверху; возбуждение 340 нМ, ширина полосы 20 нМ; эмиссия 620 нМ, ширина полосы 7 нМ; оптимальное усиление определено для первой лунки, количество количество вспышек: 5, частота вспышек 100 Гц, время интегрирования 500 мкс, время задержки 100 мкс, комнатная температура). В соответствии с инструкцией анализа TR-FRET рассчитывали показатель путем деления эмиссии при 670 нм на эмиссию при 620 нм. Вычисление значений величин EC₅₀ проводили по нормализованным значениям (ДМСО = 1) и положительному контролю (0). Значения показателей преобразовывали в логарифмические значения, и использовали нелинейную регрессию с переменным наклоном (4 параметра) для выравнивания значений в кривой доза-ответ для оценки величин EC₅₀ (см. Таблицу 3, приведенную ниже).

Таблица 3

Условные обозначения EC₅₀: A* < 0,2 мкМ < A < 1 мкМ < B < 10 мкМ < C

Соединение, №	EC ₅₀
00003	C
00004	A*
00030	A
00071	A*

Из данных анализа TR-FRET следует, что соединение 00003, характеризующееся величиной EC₅₀ >10 мкМ, не соответствует определению ингибитора бромодомена СВР/p300, как определено в рамках настоящего изобретения.

Пример 6

Материалы и методы

Безметочное определение пролиферации клеток:

В 96-луночные планшеты (Greiner BioOne 655090) в среде RPMI, содержащей 10% FCS и 2 mM L-глутамина, высевали 2000 клеток SNU-1411 [KCLB; 01411, клеточная линия CRC аденокарциномы прямой кишки, несущая мутацию KRAS G12C] за один день до обработки лекарственным соединением. На следующий день лунки визуализировали с использованием метода визуализации в светлом поле без меток на цитометре CELIGO Imaging для определения начального слияния клеток. Клетки обрабатывали либо ДМСО, либо отдельными соединениями, либо комбинациями соединений, и затем регулярно визуализировали в течение нескольких недель с использованием метода визуализации в

светлом поле (цитометр CELIGO Imaging) для отслеживания слияния клеток в каждой лунке с течением времени. Затем клетки обрабатывали либо ДМСО, либо отдельным (одним) лекарственным соединением, а именно, либо AMG510, либо любым из ингибиторов бромодомена CBP/p300, перечисленных ниже, либо комбинацией лекарственных средств, а именно: (i) AMG510 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение А», (ii) AMG510 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение С», (iii) AMG510 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение CCS1477», (iv) AMG510 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение FT-6876» », и (v) AMG510 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение GNE-781», с концентрациями лекарственных соединений, указанных ниже. Планшеты регулярно визуализировали в течение нескольких недель, используя режим светлого поля (цитометр CELIGO Imaging), отслеживая слияние клеток в каждой лунке в течение времени. Среду для выращивания и обработки пополняли два раза в неделю. Используемые соединения и их концентрации были следующими: для AMG510 (ковалентный специфический ингибитор KRAS G12C, ChemieTek #CT-AMG510): 300 нМ; для ингибиторов бромодомена CBP/p300: 1 мкМ соединения А, 0,2 мкМ соединения С, 0,2 мкМ CCS1477 (ChemieTek; CT-AMG510), 1 мкМ соединения FT-6876 («CBP/P300-IN-8», MedChemExpress; HY-136920) и 0,2 мкМ соединения GNE-781 (MedChemExpress; HY-108696). Слияние клеток определяли с помощью встроенного в CELIGO программного обеспечения для анализа «слияния» в режиме светлого поля.

На Фиг. 2 А-Е показаны результаты оценки слияния клеток SNU-1411 за 32 дня. Ингибиторы бромодомена CBP/p300 [(А) - соединение А, (В) - соединение С, (С) - соединение CCS1477, (D) - соединение FT-6876 и (Е) - соединение GNE-781)] не влияют на пролиферацию клеток КРР с мутацией KRAS G12C в отсутствие ингибитора KRAS G12C, но предотвращают развитие лекарственной резистентности в случае использования комбинации 300 нМ AMG510 с ингибитором бромодомена CBP/p300. Следует обратить внимание, что кривые для ДМСО и временные характеристики, полученные при обработке 300 нМ AMG510, идентичны на панелях Фиг. 2 А и D, а также на Фиг. 2В, С и Е, поскольку все условия (для А, D, а также для В, С и Е) были одинаковыми для всех планшетов (ДМСО: 9 лунок для каждого планшета; ингибитор бромодомена CBP/p300: 3 лунки для каждого планшета, AMG510: 6 лунок для каждого планшета; и все комбинации AMG510 + ингибитор бромодомена CBP/p300: 6 лунок для каждого планшета; показано среднее значение \pm стандартное отклонение (SD)). Показан один планшет для примера.

Результаты: На Фиг. 2 А-Е показано, что ингибиторы бромодомена CBP/p300 не влияют или в лучшем случае оказывают слабое влияние на слияние клеток SNU-1411,

когда используются отдельно, тогда как применение 300 нМ AMG510 изначально задерживало пролиферацию клеток на несколько дней. В долгосрочных культурах клетки SNU-1411 повторно росли, если их обрабатывали только AMG510, тогда как совместная обработка AMG510 в сочетании с различными ингибиторами бромодомена CBP/p300 полностью предотвращала или сильно снижала повторный рост клеток в течение исследуемого периода времени, составлявшего 32 дня.

Пример 7

Материалы и методы

Безметочное определение пролиферации клеток:

В 96-луночные планшеты (Greiner BioOne 655090) в среде RPMI, содержащей 10% FCS и 2 mM L-глутамин, высевали 2000 клеток SNU-1411 [KCLB; 01411, клеточная линия CRC аденокарциномы прямой кишки, несущая мутацию KRAS G12C] за один день до обработки лекарственным соединением. На следующий день лунки визуализировали без меток с использованием метода визуализации в светлом поле на цитометре CELIGO Image для определения начального слияния клеток. Затем клетки обрабатывали ДМСО, или отдельным (одним) лекарственным соединением, а именно либо MRTX849, либо любым из ингибиторов бромодомена CBP/p300, перечисленных ниже, либо комбинацией лекарственных средств, а именно: (i) MRTX849 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение А», (ii) MRTX849 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение С», (iii) MRTX849 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение CCS1477», (iv) MRTX849 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение FT-6876», и (v) MRTX849 и ингибитор бромодомена CBP/p300 «соединение GNE-781», с концентрациями лекарственных соединений, указанных ниже. Планшеты регулярно визуализировали в течение нескольких недель, используя режим светлого поля (цитометр CELIGO Imaging), отслеживая слияние клеток в каждой лунке в течение времени. Среду для выращивания и обработки пополняли два раза в неделю. Используемые соединения и их концентрации были следующими: для MRTX849 (ковалентный специфический ингибитор KRAS G12C, Selleckchem #S8884): 300 нМ; для ингибиторов бромодомена CBP/p300: 1 мкМ соединения А, 0,2 мкМ соединения С, 0,2 мкМ соединения CCS1477 (ChemTek; CT-CCS1477), 1 мкМ соединения FT-6876 («CBP/P300-IN-8», MedChemExpress; HY-136920) и 0,2 мкМ соединения GNE-781 (MedChemExpress; HY-108696). Слияние клеток определяли с помощью встроенного в CELIGO программного обеспечения для анализа «слияния» в режиме светлого поля.

На Фиг. 3 А-Е показаны результаты оценки слияния клеток SNU-1411 за 32 дня. Ингибиторы бромодомена СВР/р300 [(А) - соединение А, (В) - соединение С, (С) - соединение ССS1477, (D) - соединение FT-6876 и (Е) - соединение GNE-781)] не влияют на пролиферацию клеток КРР с мутацией KRAS G12C в отсутствие ингибитора KRAS G12C, но предотвращают развитие лекарственной резистентности в случае использования комбинации 300 нМ MRTX849 с ингибитором бромодомена СВР/р300. Следует обратить внимание, что кривые для ДМСО и временные характеристики, полученные при обработке 300 нМ MRTX849, идентичны на панелях Фиг. 3 А и D, а также на Фиг. 3 В, С и Е, поскольку все условия (для А и D, а также для В, С и Е) были одинаковыми для всех планшетов (ДМСО: 9 лунок для каждого планшета; ингибитор бромодомена СВР/р300: 3 лунки для каждого планшета, AMG510: 6 лунок для каждого планшета; и все комбинации MRTX849 + ингибитор бромодомена СВР/р300: 6 лунок для каждого планшета; показано среднее значение \pm стандартное отклонение (SD)). Показан один планшет для примера.

Результаты: На Фиг. 3 А-Е показано, что ингибиторы бромодомена СВР/р300 не влияют или в лучшем случае оказывают слабое влияние на слияние клеток SNU-1411, когда используются отдельно, тогда как применение 300 нМ MTRX894 изначально задерживало пролиферацию клеток на несколько дней. В долгосрочных культурах клетки SNU-1411 повторно росли, если их обрабатывали только MRTX849, тогда как совместная обработка MRTX849 в сочетании с различными ингибиторами бромодомена СВР/р300 предотвращала повторный рост в течение исследуемого периода времени, составлявшего 32 дня.

Пример 8

Материалы и методы

Безметочное определение пролиферации клеток:

В 96-луночные планшеты (Greiner BioOne 655090) в среде RPMI, содержащей 10% FCS и 2 mM L-глутамин, высевали 2000 клеток SW837 [ATCC; CCL-235, клеточная линия CRC аденокарциномы прямой кишки, несущая мутацию KRAS G12C], высевали в 96-луночные планшеты (Greiner BioOne 655090) за один день до обработки лекарственным соединением. На следующий день лунки визуализировали без меток с использованием метода визуализации в светлом поле на цитометре CELIGO Image для определения начального слияния клеток. Затем клетки обрабатывали ДМСО, или отдельным (одним) лекарственным соединением, а именно либо AMG510, либо любым из ингибиторов бромодомена СВР/р300, перечисленных ниже, либо комбинацией лекарственных средств, а именно (i) AMG510 и ингибитор бромодомена СВР/р300

«соединение А», (ii) AMG510 и ингибитор бромодомена СВР/р300 «соединение С», (iii) AMG510 и ингибитор бромодомена СВР/р300 «соединение CCS1477», (iv) AMG510 и ингибитор бромодомена СВР/р300 «соединение FT-6876», и (v) AMG510 и ингибитор бромодомена СВР/р300 «соединение GNE-781» с концентрациями лекарственных соединений, указанных ниже. Планшеты регулярно визуализировали в течение нескольких недель, используя режим светлого поля (цитометр CELIGO Imaging), отслеживая слияние клеток в каждой лунке в течение времени. Среду для выращивания и обработки пополняли два раза в неделю. Используемые соединения и их концентрации были следующими: для AMG510 (ковалентный специфический ингибитор KRAS G12C, ChemieTek #СТ-AMG510): 100 нМ; для ингибиторов бромодомена СВР/р300: 1 мкМ соединения А, 0,2 мкМ соединения С, 0,2 мкМ соединения CCS1477 (ChemieTek; СТ-AMG510), 1 мкМ соединения FT-6876 («СВР/Р300-IN-8», MedChemExpress; HY-136920) и 0,2 мкМ соединения GNE-781 (MedChemExpress; HY-108696). Слияние клеток определяли с помощью встроенного в CELIGO программного обеспечения для анализа «слияния» в режиме светлого поля.

На Фиг. 4 А-Е показаны результаты оценки слияния клеток SW837 за 49 дней. Ингибиторы бромодомена СВР/р300 [(А) - соединение А, (В) - соединение С, (С) - соединение CCS1477, (D) - соединение FT-6876 и (Е) - соединение GNE-781)] не влияют на пролиферацию клеток КРР с мутацией KRAS G12C в отсутствие ингибитора KRAS G12C, но предотвращают развитие лекарственной резистентности в случае использования комбинации 100 нМ AMG510 с ингибитором бромодомена СВР/р300.

Следует обратить внимание, что кривые для ДМСО и временные характеристики, полученные при обработке 100 нМ AMG510 идентичны на панелях Фиг. 4 А-Е, поскольку как все условия были одинаковы и эксперименты проводились параллельно (ДМСО: 18 лунок для каждого планшета, ингибитор бромодомена СВР/р300: 6 лунок для каждого планшета, AMG510: 12 лунок для каждого планшета; и все комбинации AMG510 + ингибитор бромодомена СВР/р300: 12 лунок для каждого планшета; показано среднее значение \pm стандартное отклонение (SD)).

Результаты: На Фиг. 4 А-Е показано, что ингибиторы бромодомена СВР/р300 не влияют или в лучшем случае оказывают слабое влияние на слияние клеток SW837, когда используются отдельно, тогда как применение 100 нМ AMG510 изначально задерживало пролиферацию клеток на несколько дней. В долгосрочных культурах клетки SW837 повторно росли, если их обрабатывали только AMG510, тогда как совместная обработка AMG510 в сочетании с различными ингибиторами бромодомена СВР/р300 полностью

предотвращала или сильно уменьшало повторный рост в течение исследуемого времени, составлявшего 49 дней.

Пример 9

Материалы и методы

Безметочное определение пролиферации клеток:

В 96-луночные планшеты (Greiner BioOne 655090) в среде RPMI, содержащей 10% FCS и 2 mM L-глутамина, высевали 2000 клеток NCI-H358 [KCLB; 25807; клеточная линия немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) с мутацией KRAS G12C] за один день до обработки лекарственным соединением. На следующий день лунки визуализировали без меток с использованием метода визуализации в светлом поле на цитометре CELIGO Image для определения начального слияния клеток. Затем клетки обрабатывали ДМСО, или отдельным (одним) лекарственным соединением, а именно либо AMG510, либо любым из ингибиторов бромодомена СВР/p300, перечисленных ниже, либо комбинацией лекарственных средств, а именно (i) AMG510 и ингибитор бромодомена СВР/p300 «соединение А», и (ii) AMG510 и ингибитор бромодомена СВР/p300 «соединение С», с концентрациями лекарственных соединений, указанных ниже. Планшеты регулярно визуализировали в течение нескольких недель, используя режим светлого поля (цитометр CELIGO Imaging), отслеживая слияние клеток в каждой лунке в течение времени. Среду для выращивания и обработки пополняли два раза в неделю. Используемые соединения и их концентрации были следующими: для AMG510 (ChemieTek #СТ-AMG510): 100 нМ; для ингибиторов бромодомена СВР/p300: 1 мкМ соединения А, 200 нМ соединения С, и для комбинации: 100 нМ AMG510 + 1 мкМ соединения А или 100 нМ AMG510 + 200 нМ соединения С. Количество клеток определяли с помощью встроенного в CELIGO программного обеспечения для анализа «прямого подсчета клеток» в режиме светлого поля.

На Фиг. 5 А и В показаны результаты оценки количества клеток NCI-H385 в течение времени [дни]. Ни соединение А (панель А), ни соединение С (панель В) не снижали пролиферации клеток NCI-H358 клеточной линии НМРЛ с мутацией KRAS G12C в отсутствие ингибитора KRAS G12C. Однако соединения А и С предотвращали развитие лекарственной резистентности в случае использования их в сочетании с ковалентным специфическим ингибитором KRAS G12C (для Фиг. 5А: ДМСО: n=6, соединение А: n=6, AMG510: n=24, AMG510 + соединение А: n = 24, показано среднее значение ± стандартное отклонение (SD); для Фиг.5В: ДМСО: n = 6, соединение С: n = 6,

AMG510: $n = 24$, AMG510 + соединение С: $n = 24$, показано среднее значение \pm стандартное отклонение (SD)).

Результаты: Показано, что соединение А и соединение С не уменьшают количества клеток NCI-H358, когда они используются отдельно, тогда как применение 100 нМ AMG510 изначально полностью блокировало пролиферацию клеток. В долгосрочных культурах клетки NCI-H358 повторно росли, если их обрабатывали только AMG510, тогда как совместная обработка AMG510 в сочетании с ингибиторами бромодомена СВР/Р300, такими как соединением А (Фиг. 5А) или соединением С (Фиг. 5В), соответственно, полностью предотвращала повторный рост клеток в течение исследуемого периода времени (>20 дней).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация (i) ингибитора бромодомена CBP/p300 и (ii) ингибитора KRAS для применения при лечении пациента, страдающего от рака, где рак характеризуется онкогенным изменением в KRAS.

2. Комбинация для применения по п. 1, где онкогенное изменение в KRAS приводит к сверхактивации сигнального пути KRAS.

3. Комбинация для применения по п. 1 или 2, где онкогенное изменение вызвано по меньшей мере одной мутацией оснований в гене KRAS, приводящей к аминокислотной замене в KRAS, выбранной из группы, состоящей из G12C, G12V, G12D, G13D, Q61H, Q61L, Q61R, K117N и их комбинаций.

4. Комбинация для применения по любому из предшествующих пунктов, где ингибитор бромодомена CBP/p300 выбран из группы, состоящей из соединения А, соединения С, соединения 00030, соединения 00071, соединения CCS1477, соединения GNE-781, соединения GNE-049, соединения SGC-CBP30, соединения CPI-637, соединения FT-6876, соединения 462, соединения 424 и соединения 515.

5. Комбинация для применения по любому из предыдущих пунктов где ингибитор KRAS выбран из группы, состоящей из соединения AMG510, соединения MRTX849, соединения JNJ-74699157/ARS-3248, соединения BI 1701963, соединения BI 1823911, соединения BAY-293, соединения GDC-6036, соединения MRTX1133, ингибитора RAS(ON) и их комбинаций.

6. Комбинация для применения по любому из пп. 1-4, где онкогенное изменение вызвано мутацией по меньшей мере одного основания в гене KRAS, приводящей к аминокислотной замене G12C в KRAS.

7. Комбинация для применения по любому из пп. 1-4, где онкогенное изменение вызвано по меньшей мере одной мутацией оснований в гене KRAS, приводящей к аминокислотной замене G12C в KRAS, и ингибитор KRAS представляет собой ингибитор KRAS G12C.

8. Комбинация для применения по любому из предшествующих пунктов, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

9. Комбинация для применения по любому из предшествующих пунктов, где комбинацию вводят пациенту во время каждого цикла лечения.

10. Комбинация для применения по любому из предшествующих пунктов, где (i) и (ii) вводят в виде отдельных дозированных лекарственных форм или они включены в одну дозированную лекарственную форму.

11. Комбинация для применения по п. 10, где введение в течение каждого цикла лечения осуществляют одновременно или последовательно, если (i) и (ii) вводят в виде отдельных дозированных лекарственных форм.

12. Комбинация для применения по любому из предшествующих пунктов, где лечение приводит к увеличению продолжительности терапевтического эффекта по сравнению с продолжительностью терапевтического эффекта действия ингибитора KRAS при введении в качестве единственного активного агента.

13. Комбинация для применения по любому из пп. 1-11, где лечение приводит к повышенной терапевтической эффективности по сравнению с терапевтической эффективностью действия ингибитора KRAS при введении его в качестве единственного активного агента.

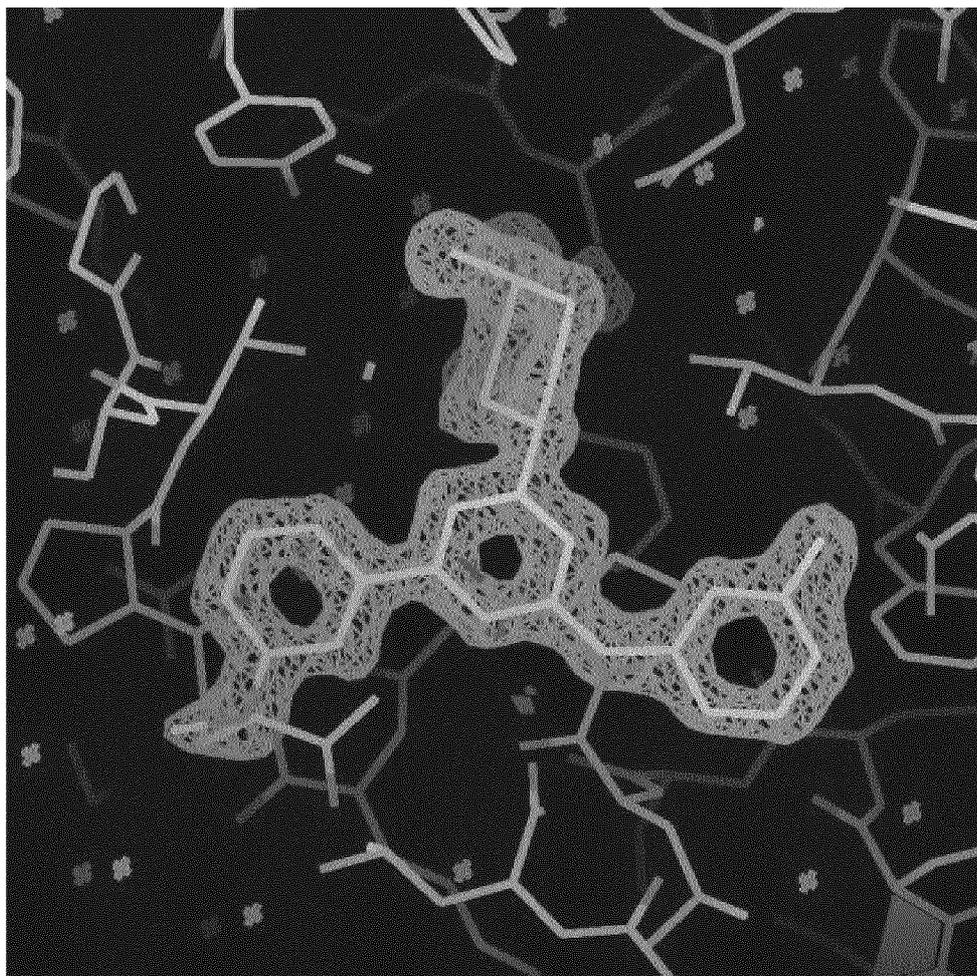
14. Комбинация для применения по любому из пп. 1-11, где лечение приводит к предотвращению резистентности к ингибитору KRAS.

15. Набор, содержащий (i) фармацевтическую дозированную форму, содержащую ингибитор бромодомена CBP/p300, и (ii) фармацевтическую дозированную форму, содержащую ингибитор KRAS.

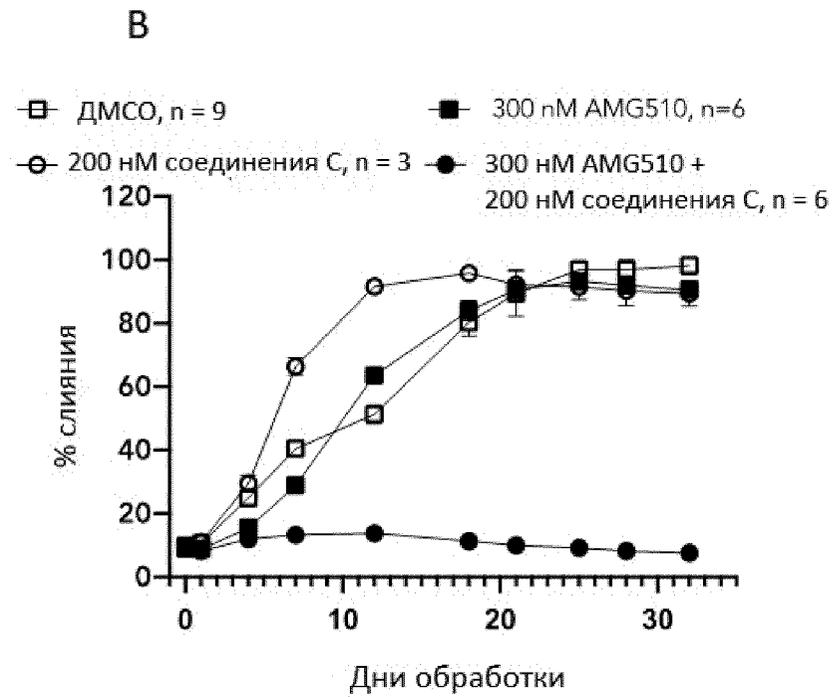
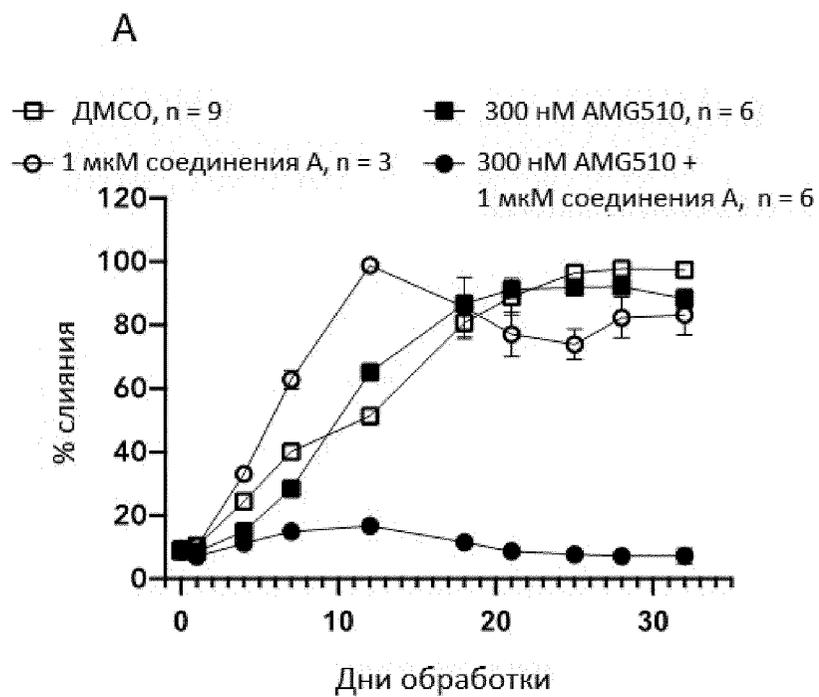
16. Фармацевтическая дозированная форма, содержащая (i) ингибитор бромодомена CBP/p300 и (ii) ингибитор KRAS.

17. Набор по п. 15 или фармацевтическая дозированная форма по п. 16, где ингибитор бромодомена CBP/p300 выбран из группы, состоящей из соединения А, соединения С, соединения 00030, соединения 00071, соединения CCS1477, соединения GNE-781, соединения GNE-049, соединения SGC-CBP30, соединения CPI-637, соединения FT-6876, соединения 462, соединения 424 и соединения 515.

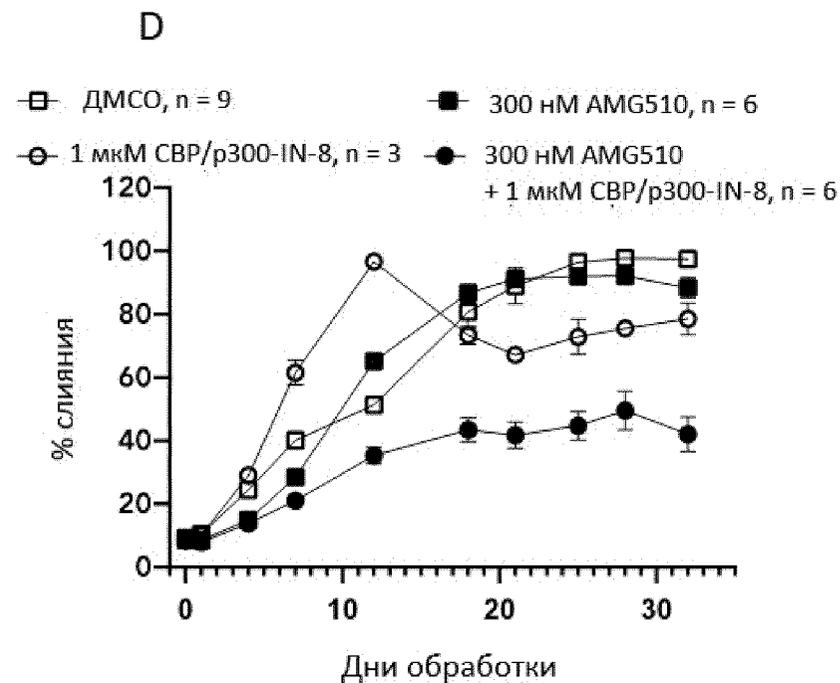
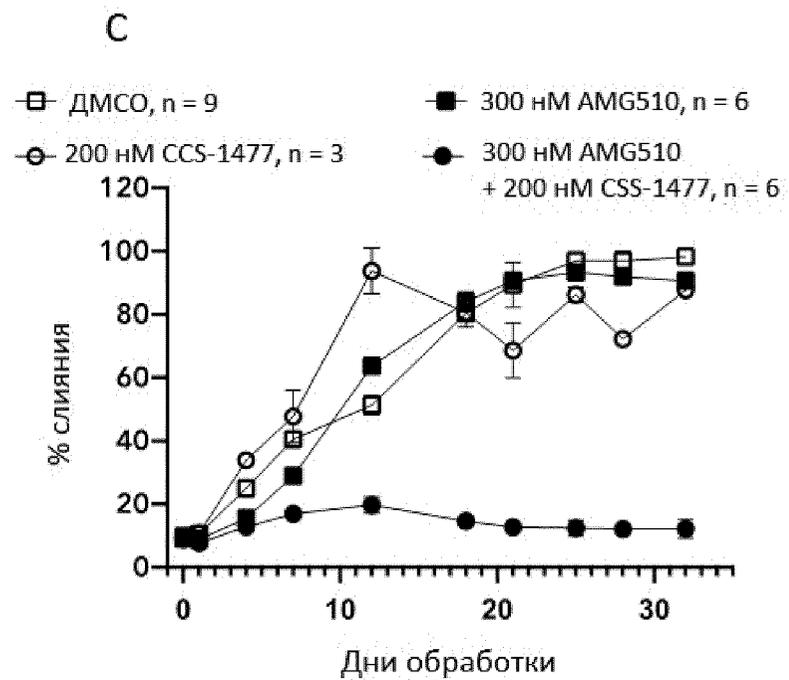
18. Набор по п. 15 или 17, или лекарственная форма по п. 16 или 17, где ингибитор KRAS выбран из группы, состоящей из соединения AMG510, соединения MRTX849, соединения JNJ-74699157/ARS-3248, соединения BI 1701963, соединения BI 1823911, соединения BAY-293, соединения GDC-6036, соединения MRTX1133, ингибитора RAS(ON) и их комбинаций.



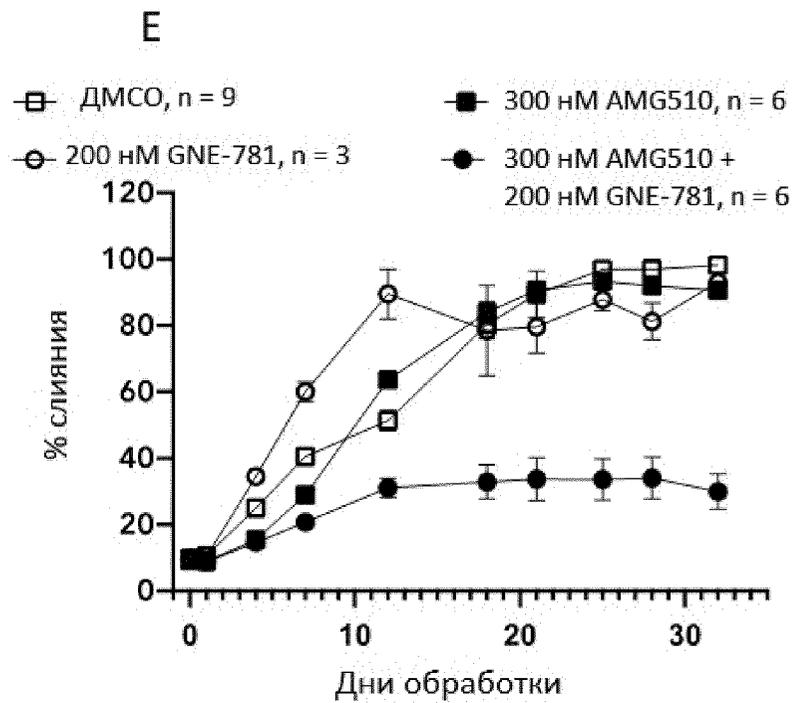
Фиг. 1



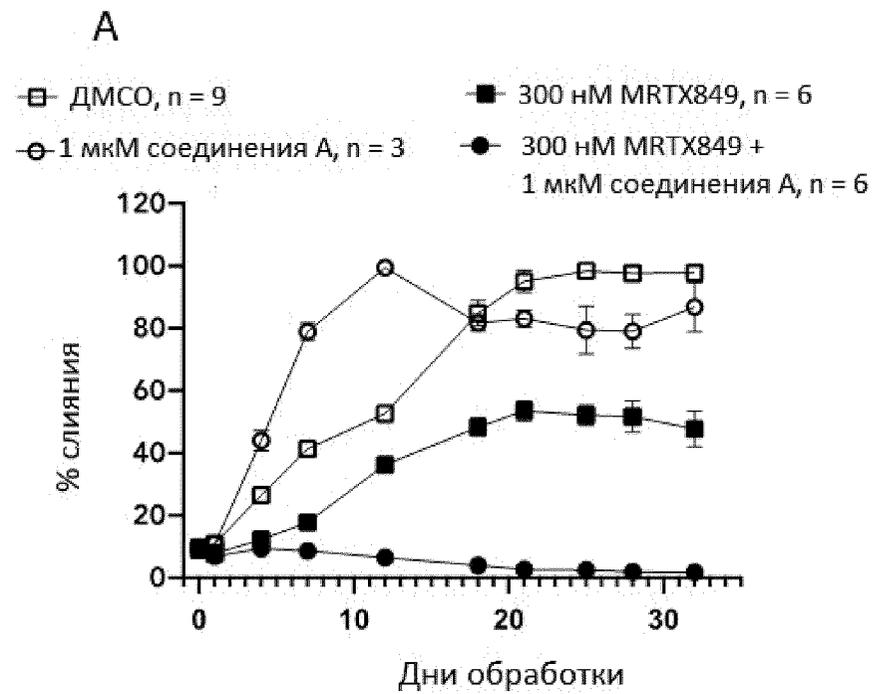
Фиг. 2



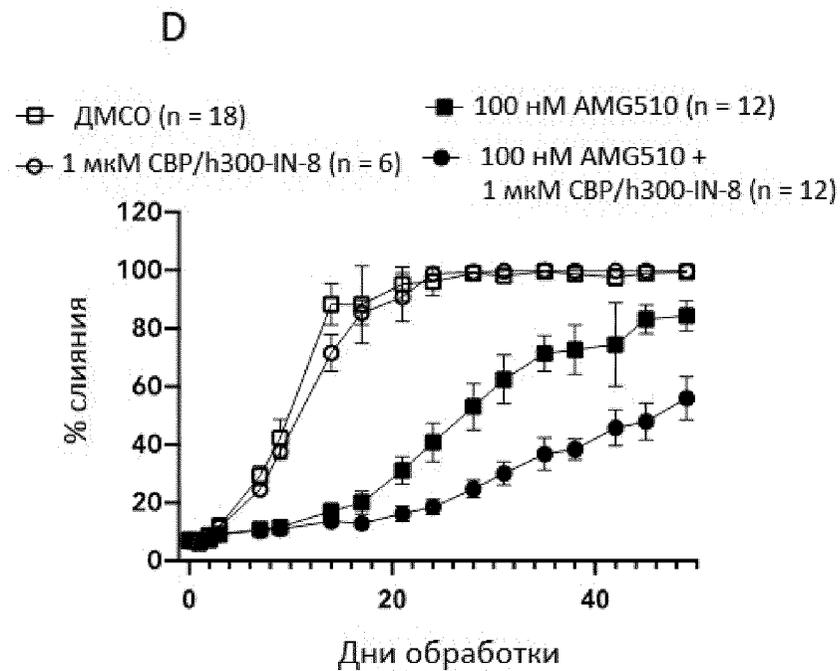
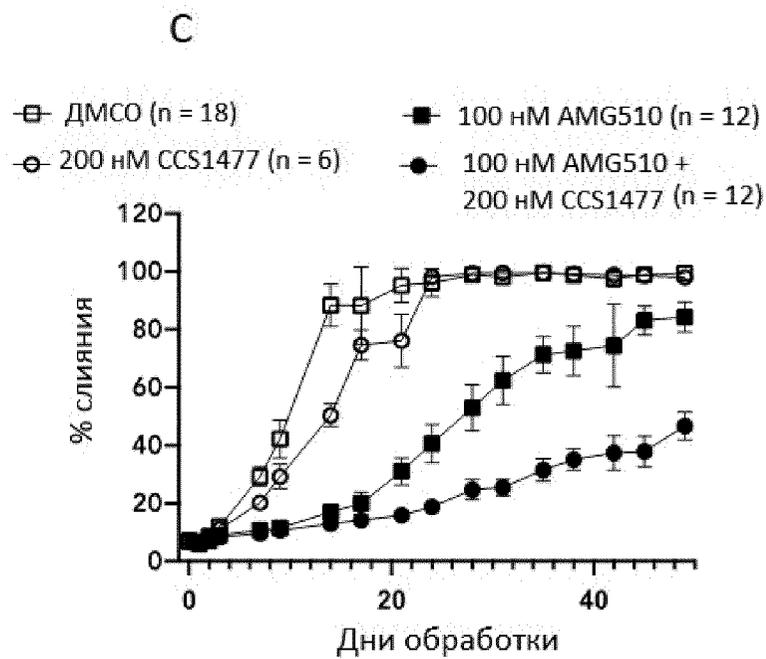
Фиг. 2 (продолжение)



Фиг. 2 (продолжение)



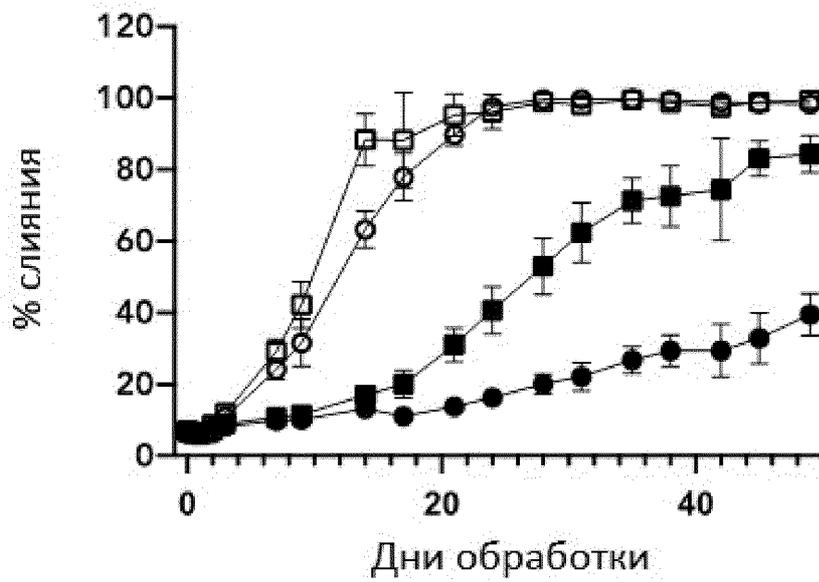
Фиг. 3



Фиг. 4 (продолжение)

E

- ДМСО (n = 18) ■ 100 нМ AMG510 (n = 12)
○ 200 нМ GNE-781 (n = 6) ● 100 нМ AMG510 +
200 нМ GNE-781 (n = 12)



Фиг. 4 (продолжение)

