



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.20(51) Int. Cl. G01N 33/574 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)(22) Дата подачи заявки
2021.08.27

(54) БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТАГОНИСТОВ MDM2

(31) 2013476.3; 2020493.9

(72) Изобретатель:

(32) 2020.08.27; 2020.12.23

Феррари Никола, Саини Харприт
Каур, Ан Чонсук (GB)

(33) GB

(86) PCT/IB2021/057853

(74) Представитель:

(87) WO 2022/043930 2022.03.03

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

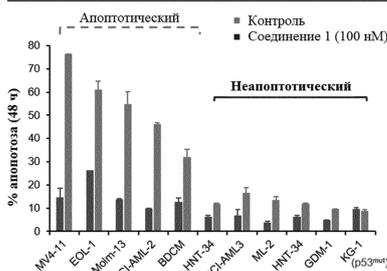
(88) 2022.07.07

(71) Заявитель:

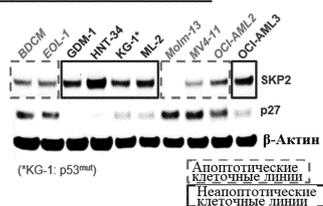
ОЦУКА ФАРМАСЬЮТИКЛ КО.,
ЛТД. (JP)

(57) В изобретении предложен SKP2 в качестве биомаркера для прогнозирования эффективности лечения рака с помощью антагониста MDM2. Идентификация этого биомаркера у больного раком пациента позволяет определить, существует ли вероятность успешного лечения рака пациента с помощью антагониста MDM2. Соответственно, изобретение в целом относится к сопутствующей диагностике для терапии антагонистами MDM2. Биомаркер SKP2 можно измерить прямо или косвенно путем обнаружения молекулы, которая функционально находится выше или ниже SKP2 и уровень которой коррелирует с уровнем биомаркера SKP2, например, путем обнаружения одного или нескольких субстратов SKP2.

Вызванный соединением 1 апоптоз в клеточных линиях OML



Базальные уровни SKP2 в апоптотических OML относительно неапоптотических



БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТАГОНИСТОВ MDM2

5

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к биомаркерам для противораковой терапии. В частности, в изобретении предложены биологические маркеры, которые позволяют идентифицировать раковую клетку как вероятно чувствительную к антагонисту MDM2. Эти биомаркеры могут быть включены в способы, системы и наборы для прогнозирования ответа на лечение, а также в персонализированные варианты лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Точная медицина или персонализированная медицина представляет новый подход к лечению и предотвращению заболеваний, который учитывает индивидуальную вариабельность генов, окружающую среду и образ жизни каждого пациента. Часто говорят, что это практика введения правильной дозировки правильного лекарственного препарата в правильное время.

Особое внимание в точной медицине уделяется необходимости спрогнозировать, будет ли данный пациент реагировать на конкретный лекарственный препарат. Тест, который способен спрогнозировать, будет ли конкретный лекарственный препарат эффективно лечить отдельного пациента, часто называют сопутствующей диагностикой. Эффективная сопутствующая диагностика крайне необходима из-за возможности улучшать результаты лечения для пациентов, а также избегать значительных экономических затрат на предоставление неэффективных вариантов лечения. Эффективная сопутствующая диагностика нового терапевтического агента также может увеличить шансы на то, что эта терапия будет испытана на правильной популяции и в конечном итоге будет одобрена.

Точные лекарственные средства и сопутствующая диагностика часто полагаются на биомаркеры, которые способны надежно прогнозировать, будет ли пациент отвечать на конкретное лечение. Идентификация надежных биомаркеров для каждой терапии и заболевания является очень важной задачей.

Iorio *et al* (Cell. 2016 Jul 28;166(3):740-75) В “A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer” сообщается, как вызванные раком изменения, идентифицированные в 11289 опухолях из 29 тканей (интеграция соматических мутаций, изменение числа копий, метилирование ДНК и экспрессия генов), могут быть картированы на 1001 молекулярно аннотированную линию раковых клеток человека и коррелировать с чувствительностью к 265 лекарственным препаратам. Хотя такие исследования обеспечивают ресурсы для того, чтобы связать генотипы с клеточными фенотипами и идентифицировать терапевтические варианты для отдельных раковых субпопуляций, разработка клинически релевантных молекулярно-нацеленных вариантов противораковой терапии остается сложной задачей.

Остается потребность в идентификации надежных биомаркеров для применения в точной медицине.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение основано на идентификации биомаркеров, которые можно применять для прогнозирования эффективности лечения рака с помощью антагониста MDM2. Идентификация одного или более из этих биомаркеров у ракового пациента позволяет определить, существует ли вероятность лечения рака пациента или вероятность его успешного лечения с помощью антагониста MDM2. Соответственно, в некоторых аспектах изобретение в целом относится к сопутствующей диагностике для терапии антагонистами MDM2.

В частности, биомаркер, идентифицированный в настоящем изобретении, представляет собой SKP2. Белок SKP2 и ген, кодирующий его, известны в данной области техники, под идентификатором гена Entrez ID 6502. В контексте данного документа SKP2 называется «биомаркером по изобретению».

В частности, в одном аспекте в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, при этом рак экспрессирует невысокие уровни SKP2.

Чувствительность к антагонизму MDM2 можно определить по сниженной экспрессии SKP2.

В случае SKP2 обычно проводят измерения уровней белка и/или нуклеиновой кислоты. Уровень белка может быть получен, используя, например, иммуногистохимию (ИГХ).

SKP2 нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК. РНК может быть определена, как правило, в виде SKP2 мРНК. Поэтому способы измерения могут включать количественные способы, такие как ОТ-ПЦР или Нанострунный анализ, известные в данной области техники.

5 Также можно проводить измерения для ДНК. В некоторых вариантах осуществления для определения SKP2 статуса можно использовать анализ вариации числа копий (ВЧК) и/или мутационный анализ (например, секвенирование ДНК).

10 Существует множество показателей биомаркера, включая наличие или отсутствие гена, мутацию гена, уровень экспрессии гена и уровень экспрессии белка. Термин «истощение» может означать утрату или полную утрату гена SKP2, мутацию гена SKP2 и утрату функции, или же он может означать низкую экспрессию гена и низкую экспрессию и функцию белка, что является
15 истощения охватываются термином «истощение».

SKP2 можно выявить прямо или косвенно. Косвенное измерение обычно включает выявление молекулы, которая функционально находится после или до SKP2 и уровень которой коррелирует с уровнем биомаркера. SKP2 можно выявить косвенно путем выявления одного или нескольких SKP2 субстратов.
20 Соответственно, SKP2 субстраты в данном описании также называются биомаркерами по изобретению. Как описано ниже, типичный SKP2 субстрат представляет собой p27. В одном варианте осуществления настоящего изобретения уровень SKP2 оценивают путем измерения уровней одного или нескольких, например, двух или больше, трёх или больше, пяти или больше или
25 десяти или больше, p27, p21, p57, E2F-1, MEF, P130, Tob1, циклин D, циклин E, Smad4, Myc, Mcb, RASSF1A, Foxo1, Orc1p, Cdt1, Rag2, Brca2, CDK9, MPK1 и/или UBP43. В одном варианте осуществления истощенный SKP2 определяют путем идентифицирования повышенного или высокого уровней одного или нескольких, например, двух или больше, трёх или больше, пяти или больше или
30 десяти или больше, p27, p21, p57, E2F-1, MEF, P130, Tob1, циклин D, циклин E, Smad4, Myc, Mcb, RASSF1A, Foxo1, Orc1p, Cdt1, Rag2, Brca2, CDK9, MPK1, и/или UBP43. В некоторых вариантах осуществления может быть определена комбинация белка и нуклеиновых кислот.

Высокие уровни SKP2 субстрата являются индикатором низкого SKP2. В одном варианте осуществления биомаркерами по изобретению являются низкий SKP2, или повышенный или высокий уровни одного или нескольких, например, двух, трёх, четырёх, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более, p27, p21, p57, E2F-1, MEF, P130, Tob1, циклин D, циклин E, Smad4, Мус, Мсб, RASSF1A, Foxo1, Orc1p, Cdt1, Rag2, Brca2, CDK9, МРК1 и/или UBP43.

Данные в приведенных ниже примерах показывают, что истощение, например, утрата (также известная как тотальная или полная утрата) SKP2 являются прогностическими в отношении чувствительности раковых клеток к антагонисту MDM2. Соответственно, низкие уровни SKP2 можно использовать для выявления рака, подходящего для лечения антагонистом MDM2.

Низкая экспрессия SKP2 свидетельствует о чувствительности раковых клеток к антагонисту MDM2. И наоборот, нормальная или высокая экспрессия SKP2 свидетельствует об устойчивости к антагонисту MDM2. Когда опухоль имеет нормальный или высокий уровень SKP2 и, следовательно, показано, что она не чувствительна к антагонисту MDM2, можно использовать агент, индуцирующий чувствительность к антагонисту MDM2. Это может быть, например, агент для снижения уровня SKP2 в опухоли. Соответственно, предложен один способ лечения рака у пациента, при котором пациента выбирают на основании наличия у него нормального или высокого уровня SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента, и этому пациенту вводят терапевтически эффективное количество антагониста MDM2. и агент, индуцирующий чувствительность к антагонисту MDM2, например агент для снижения уровней SKP2 в опухоли.

В некоторых вариантах осуществления экспрессию биомаркера по изобретению определяют относительно нераковой клетки. Это сравнение рак:не-рак может быть особенно применимым для оценки утраты SKP2. Нераковая клетка, как правило, является клеткой того же типа, что и раковая клетка. Нераковая клетка может быть получена от того же пациента, или может быть получена от другого пациента, или может представлять собой значение, известное для нераковой клетки этого типа. Таким образом, экспрессию можно сравнить с контрольными уровнями, определенными для здоровых индивидов, или с контрольными уровнями, определенными в нормальной непролиферативной ткани.

В некоторых других вариантах осуществления экспрессию биомаркера по изобретению определяют относительно образцов раковых клеток от субъектов, не восприимчивых к ингибитору MDM2, или в образце раковых клеток от субъекта, не восприимчивого к ингибитору MDM2. В некоторых вариантах осуществления уровень биомаркера понижен относительно раковых клеток в образцах от субъектов, не восприимчивых к ингибитору MDM2, или в образце раковых клеток от субъекта, не восприимчивого к ингибитору MDM2.

Невосприимчивые раковые клетки, как правило, представляют собой клетки того же типа рака, что и исследуемая раковая клетка. Невосприимчивые раковые клетки, как правило, получены от другого пациента или пациентов, чем клетки исследуемого образца, или могут представлять собой значение, известное для невосприимчивой раковой клетки этого типа рака.

В некоторых вариантах осуществления пациент может быть идентифицирован как кандидат на лечение антагонистом MDM2, когда уровень экспрессии SKP2 является низким по сравнению с верхним пределом нормы (ВПН). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления рак определяется как поддающийся лечению ингибитором MDM2, когда экспрессия SKP2 в раке ниже верхнего предела нормы (ВПН).

Необязательно, способ может включать этап введения пациенту терапевтически эффективного количества антагониста MDM2.

Во всех аспектах и вариантах осуществления, описанных в данном документе, рак, как правило, представляет собой рак p53 дикого типа.

В одном варианте осуществления в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в лечении рака, в частности рака p53 дикого типа, при этом рак характеризуется наличием биомаркера по изобретению в биологическом образце, полученном от пациента.

В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения предложен способ лечения рака у пациента, включающий этапы отбора пациента на основании профиля экспрессии еще биомаркера по изобретению. В некоторых вариантах осуществления пациента отбирают на основании:

сниженной экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента;

и необязательно затем вводят терапевтически эффективное количество антагониста MDM2 указанному пациенту.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления изобретения предложен антагонист MDM2 для применения в лечении рака у пациента, характеризующийся тем, что указанный пациент был отобран из-за наличия:

5 сниженной или низкой экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента.

В некоторых вариантах осуществления образец ткани пациента исследуют до проведения лечения для определения профиля экспрессии ракового биомаркера. Образец обычно может содержать одну или более раковых клеток, раковую ДНК или циркулирующую опухолевую ДНК. Образец может
10 представлять собой образец крови. Образец может представлять собой образец опухоли, например биопсию опухоли. Исследование может включать анализ для выявления белка, мРНК, ДНК и/или цодНК.

В другом аспекте в изобретении предложено использование уровня экспрессии SKP2 в образце раковых клеток пациента-человека в качестве
15 биомаркера для оценки того, является ли рак чувствительным к лечению антагонистом MDM2.

В дополнительном аспекте в изобретении предложен способ прогнозирования или оценки восприимчивости больного раком пациента-человека на лечение антагонистом MDM2, включающий оценку уровня
20 экспрессии биомаркера по изобретению в образце от больного раком пациента и определение свидетельствует ли исследуемый уровень экспрессии о том, что рак следует лечить антагонистом MDM2.

В некоторых вариантах осуществления биомаркер по изобретению свидетельствует о том, что рак с большой вероятностью будет эффективно
25 подвергнут апоптозу. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления с помощью изобретения можно идентифицировать тех пациентов, для которых лечение будет особенно эффективным.

В некоторых вариантах осуществления этап оценки включает анализ *in vitro* для определения уровня экспрессии биомаркера или биомаркеров.

30 В некоторых вариантах осуществления этап оценки включает сравнение уровня экспрессии с уровнем экспрессии, который, как известно, ассоциируется с восприимчивостью или невосприимчивостью к лечению антагонистом MDM2. В некоторых вариантах осуществления этап оценки включает сравнение наблюдаемого уровня экспрессии с пороговым значением, отражающим таким

же образом уровень экспрессии, ассоциируемый с восприимчивостью к лечению антагонистом MDM2, для оценки того, свидетельствует ли исследуемый уровень экспрессии о том, что рак можно лечить антагонистом MDM2.

5 В некоторых вариантах осуществления пациента классифицируют в группу на основании профиля биомаркеров. Это может включать классификацию пациента как являющегося с большой вероятностью хорошо (или сильно) восприимчивым или нет к лечению антагонистом MDM2.

10 В дополнительном аспекте в изобретении предложен способ определения того, подходит ли больной раком пациент-человек для лечения антагонистом MDM2, включающий

выявление в образце раковых клеток пациента экспрессии биомаркера по изобретению; и

оценку того, существует ли вероятность лечения рака у пациента антагонистом MDM2 на основании уровня экспрессии биомаркеров в образце.
15 Не обязательно, способ этого аспекта включает дополнительный этап лечения рака у пациента с использованием антагониста MDM2.

В другом варианте осуществления в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в лечении рака у пациента в комбинации с противораковым соединением, характеризующийся тем, что указанный рак у
20 указанного пациента представляет собой рак p53 дикого типа, который был отобран из-за наличия биомаркера по изобретению.

В другом варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения рака у пациента, при этом указанный рак у указанного пациента
25 необязательно представляет собой рак p53 дикого типа, и при этом пациент был отобран как имеющий биомаркер по изобретению на уровне, который свидетельствует о том, что лечение антагонистом MDM2 будет эффективным; и введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и необязательно другого противоракового агента отобранному пациенту.

В другом варианте осуществления в изобретении предложен способ
30 идентификации пациента, имеющего рак, подходящего для лечения антагонистом MDM2, включающий выявление и, необязательно, количественное определение экспрессии SKP2.

В другом варианте осуществления в изобретении предложен способ отбора пациента (например, имеющего рак), включающий этапы отбора пациента путем выявления и, необязательно, количественного определения экспрессии SKP2.

5 В другом варианте осуществления в изобретении предложен способ определения вероятности того, что больной раком пациент будет отвечать на терапию антагонистом MDM2, включающий:

получение результата измерения сниженной экспрессии SKP2 в образце раковых клеток от пациента по сравнению с соответствующей нераковой клеткой;

10 и определение того, что пациент с большой вероятностью будет отвечать на терапию антагонистом MDM2, на основании этого измерения.

В другом варианте осуществления в изобретении предложен способ введения лекарственного препарата, включающий:

15 определение одного или более биомаркеров по изобретению введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 пациенту с одним или более биомаркерами по изобретению.

В дополнительном аспекте в изобретении предложен способ выявления экспрессии SKP2 у пациента-человека, имеющего рак. Этот способ, как правило, включает:

20 (a) получение образца раковых клеток от пациента-человека; и
(b) определение, экспрессируются ли SKP2 в образце раковых клеток, путем приведения образца в контакт с одним или более реагентами для выявления экспрессии SKP2.

25 В дополнительном аспекте в изобретении предложены набор или устройство для выявления уровня экспрессии по меньшей мере одного биомаркера чувствительности к антагонизму MDM2 в образце от пациента-человека, причем указанные набор или устройство содержат реагент для выявления или реагенты для выявления для выявления биомаркера по изобретению.

30 В дополнительном аспекте изобретение относится к системе для оценки того, восприимчив ли больной раком пациент-человек к лечению антагонистом MDM2, содержащей:

средства выявления, выполненные с возможностью выявления в образце от пациента-человека биомаркера по изобретению

процессор, выполненный с возможностью определения по определенному биомаркеру или определенным биомаркерам свидетельства вероятности того, что пациент поддается лечению антагонистом MDM2.

5 Система необязательно содержит подключение для передачи данных на интерфейс, в частности графический пользовательский интерфейс, выполненный с возможностью представлять информацию, предпочтительно также выполненный с возможностью введения такой информации, как возраст субъекта, а также, необязательно, другой информации о пациенте, такой как пол и/или информация об истории болезни, при этом указанный интерфейс является 10 либо частью системы, либо удаленным интерфейсом. Необязательно один или более из вышеперечисленных элементов, в частности процессор, могут функционировать «в облаке», то есть не на стационарной машине, а посредством интернет-приложения.

15 В изобретении также предложены способы идентификации и скрининга пациентов, комбинации и наборы.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ скрининга или идентификации пациента для лечения антагонистом MDM2, включающий определение наличия у указанного пациента:

20 сниженной экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ идентификации восприимчивого пациента, включающий исследование пациента в отношении:

25 сниженной экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения, включающий:

30 (a) идентификацию пациента, нуждающегося в лечении рака, необязательно рака p53 дикого типа, такого как миелоидный лейкоз, необязательно острый миелоидный лейкоз (ОМЛ);

(b) определение наличия у пациента сниженной экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента; и

(c) лечение пациента терапевтически эффективным количеством антагониста MDM2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения, включающий:

- (a) идентификацию пациента, нуждающегося в лечении рака, необязательно миелоидного лейкоза, такого как ОМЛ;
- 5 (b) определение биомаркера по изобретению у пациента;
- (c) выбор антагониста MDM2 для лечения пациента на основании того факта, что антагонисты MDM2 эффективны для пациентов, которые имеют один или более биомаркеров по изобретению;
- (d) лечение пациента терапевтически эффективным количеством
- 10 антагониста MDM2.

В дополнительном варианте осуществления рак представляет собой ОМЛ с транслокацией t(15;17).

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ выбора лечения для больного раком пациента, включающий:

- 15 (a) анализ одного или более биологических образцов с определением, таким образом, биомаркера по изобретению у пациента;
- (b) на основании этого определения выбор этого пациента для лечения терапевтически эффективным количеством антагониста MDM2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ отбора пациента (например, имеющего рак) для лечения антагонистом MDM2, характеризующийся тем, что указанный пациент был отобран по

20 причине:

сниженной или низкой экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в лечении рака у пациента, характеризующийся тем, что для указанного пациента известно наличие:

сниженной экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от

25 указанного пациента.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен набор для лечения рака у пациента, содержащий биосенсор для выявления и/или

30 количественного определения SKP2 и/или реагенты для выявления SKP2, необязательно вместе с инструкциями по применению набора в соответствии со способами, определенными в данном документе.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ определения восприимчивости имеющего рак индивида к лечению антагонистом MDM2, включающий наличие:

5 сниженной экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ определения восприимчивости имеющего рак индивида к лечению антагонистом MDM2, включающий идентификацию пациента с наличием:

10 сниженной экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента; и затем

введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 указанному пациенту.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения рака у пациента, включающий этапы отбора пациента с

15 наличием:

сниженной экспрессии SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента; и

20 введение указанному пациенту, отобранному на этапах, указанных в данном документе, терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 *в комбинации с* интерфероном(ами) (например, интерфероном альфа).

В другом варианте осуществления в изобретении предложен способ введения лекарственного препарата, включающий:

(i) назначение определения экспрессии SKP2; и

(ii) введение терапевтически эффективного количества антагониста

25 MDM2 пациенту со сниженными уровнями SKP2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен упакованный фармацевтический продукт, содержащий:

(i) антагонист MDM2;

(ii) вкладыш для пациентов с подробными инструкциями по применению

30 антагониста MDM2 в лечении пациентов, идентифицированных с помощью профиля биомаркера, описанного в данном документе.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения рака у пациента, включающий:

- (i) приведение образца от пациента в контакт с праймером, антителом, субстратом или зондом для определения уровней экспрессии SKP2;
- (ii) отбор пациента, имеющего сниженные уровни SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента;
- 5 (iii) с последующим введением терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 указанному пациенту, отобранному на этапе (ii).

Уровни SKP2 можно определить путем непосредственного измерения уровней экспрессии SKP2. Уровни белка или нуклеиновой кислоты SKP2 можно измерить, как описано ранее.

- 10 В дополнительном варианте осуществления уровни SKP2 можно определить путем измерения уровней субстратов SKP2. Известные субстраты SKP2 описаны в Chan *et al.* The Scientific World Journal (2010) 10, 1001-1015, в частности описанные в Таблице 1.

Таблица 1 от Chan *et al*

Суб-страт	Функция	Регуляция
p27	Ингибирование клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение p27 и промотирует прогрессию клеточного цикла
p21	Ингибирование клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение p21 и промотирует прогрессию клеточного цикла
p57	Ингибирование клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение p57 и промотирует прогрессию клеточного цикла
E2F-1	Регуляция клеточного цикла/ апоптоз	SKP2 вызывает разложение E2F-1 и понижающе регулирует его транскрипционную активность
MEF	Регуляция клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение MEF в G1/S транзиции
p130	Ингибирование клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение p130 и промотирует G1/S транзицию
Tob1	Ингибирование клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение Tob1 и промотирует G1/S транзицию
Циклин D	Регуляция клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение Циклина D и регулирует прогрессию клеточного цикла
Циклин E	Регуляция клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение Циклина E и регулирует прогрессию клеточного цикла
Smad4	Терминация клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение Smad4 мутантов ракового происхождения
Мус	Регуляция клеточного цикла/ апоптоз	SKP2 запускает разложение Мус и усиливает его транскрипционную активность
Муб	Регуляция клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение Муб, и разложение Муб может быть необходимо для контроля прогрессии клеточного цикла

RASSF1A	Ингибирование клеточного цикла	SKP2 вызывает разложение RASSF1A и промотирует G1/S транзицию
Foxo1	Апоптоз	SKP2 запускает разложение Foxo1 и вызывает терминацию клеточного цикла и апоптоз
Orc1p	Репликация ДНК	SKP2 запускает разложение Orc1p для обеспечения того, чтобы ДНК репликация была запрещена до фазы S
Cdt1	Репликация ДНК	SKP2 запускает разложение Cdt1 в фазе S для предотвращения повторной репликации
Rag2	Рекомбинация ДНК	SKP2 запускает разложение Rag2 и регулирует V(D)J рекомбинацию
BrcA2	Репарация ДНК	SKP2 запускает разложение BrcA2 и повышает потенциал клеточной пролиферации
Cdk9	Транскрипционная элонгация	SKP2 запускает разложение Cdk9 и регулирует его транскрипционную активность
MPK1	ERK сигнализация	SKP2 запускает разложение MPK1 и обеспечивает позитивный ответ в ERK активации
UBP43	ИФН типа 1 сигнализация	SKP2 вызывает разложение UBP43 и может играть роль в модификации ИФН типа 1 сигнализации

В одном варианте осуществления изобретения уровень SKP2 оценивают путем измерения уровней одного или нескольких из p27, p21, p57, E2F-1, MEF, p130, Tob1, циклина D, циклина E, Smad4, Myc, Mcb, RASSF1A, Foxo1, Orc1p, Cdt1, Rag2, BrcA2, CDK9, MPK1 и/или UBP43. В одном варианте осуществления истощение SKP2 определяют путем выявления повышенных или высоких уровней одного или нескольких из p27, p21, p57, E2F-1, MEF, p130, Tob1, циклина D, циклина E, Smad4, Myc, Mcb, RASSF1A, Foxo1, Orc1p, Cdt1, Rag2, BrcA2, CDK9, MPK1 и/или UBP43. В некоторых вариантах осуществления измеряют или идентифицируют уровни двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более из этих субстратов. В одном варианте осуществления измеряют или идентифицируют уровни всех этих субстратов. В другом варианте осуществления измеряют или идентифицируют уровни одного из этих субстратов.

Обычно уровень обнаруживается, определяется или известно, что он отражает низкий уровень SKP2. Одним из вариантов осуществления может быть уровень субстрата SKP2 выше ВПН (верхний предел нормы).

В одном варианте осуществления изобретения истощение SKP2 определяют путем измерения уровней p27 в образце опухоли. Истощенный SKP2 определяется путем определения повышенного или высокого уровня p27.

Обычно измеряют уровни белка p27. Обычно уровни белка p27 измеряют с помощью иммунологических анализов (например, ИФА, MSD, WES, Вестерн-блоттинг, ИНС и т. д.). В другом варианте осуществления измеряют уровни РНК p27 (например, с помощью ПЦР, нанострунного анализа, секвенирования РНК).

5 Уровни субстратов SKP2 можно измерить в тех же образцах, что и для измерения SKP2. Обычно субстраты SKP2 измеряют в образцах опухолей.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ идентификации пациента для лечения антагонистом MDM2, включающий:

(a) приведение образца от пациента в контакт со множеством
10 олигонуклеотидных праймеров, причем указанное множество праймеров содержит по меньшей мере одну пару олигонуклеотидных праймеров для SKP2 и/или субстрата SKP2 (например, p27), как описано выше;

(b) проведение ПЦР на указанном образце для амплификации генных экспрессионных продуктов/транскриптов в образце;

15 (c) определение уровня экспрессионного продукта по меньшей мере одного из указанных генов; и

(d) идентификацию пациента как кандидата для лечения антагонистом MDM2, когда уровень экспрессии SKP2 является высоким по сравнению с верхним пределом нормы (ВПН).

20 Пациент может быть необязательно идентифицирован как кандидат на лечение антагонистом MDM2, когда уровень экспрессии SKP2 низок относительно (например, ниже) верхнего предела нормы (ВПН). В некоторых вариантах осуществления также определяют уровень экспрессии по меньшей мере одного другого биомаркера для лечения антагонистом MDM2.

25 Соответственно, можно тестировать панель биомаркеров, при этом панель содержит SKP2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ идентификации пациента для лечения антагонистом MDM2, включающий:

(a) приведение образца от пациента в контакт с антителом к SKP2;

30 (b) проведение анализа указанного образца;

(c) определение уровня SKP2; и

(d) идентификацию пациента как кандидата для лечения антагонистом MDM2, когда уровень SKP2 повышен или снижен относительно верхнего предела нормы (ВПН).

Анализ в части (b) может представлять собой или включать иммуногистохимический анализ. В некоторых вариантах осуществления анализ может представлять собой или включать ИФА. Когда образец от пациента приводят в контакт с антителом к SKP2, как правило, проводят иммуногистохимический анализ указанного образца и идентифицируют пациента как кандидата для лечения антагонистом MDM2, когда уровень SKP2 является низким (или отсутствует) относительно верхнего предела нормы (ВПН).

После того, как пациент был идентифицирован для лечения, способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать лечение рака у пациента с помощью антагониста MDM2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ отбора больного раком пациента для прохождения терапии рака антагонистом MDM2, включающий:

- (a) определение уровня SKP2 в биологическом образце от пациента; и
- (b) отбор пациента, который имеет уровень SKP2 в биологическом образце от пациента ниже predetermined значения.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ прогнозирования эффективности антагониста MDM2 в отношении рака у пациента или прогнозирования ответа больного раком пациента на антагонист MDM2 в отношении рака, включающий определение уровня SKP2 в биологическом образце от пациента, где уровень SKP2 в биологическом образце, равный или, как правило, меньший, чем заданное значение, является прогностическим признаком эффективности у пациента.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ отбора имеющего рак пациента, нуждающегося в лечении антагонистом MDM2, который включает исследование полученного от пациента образца опухоли на наличие низкого уровня SKP2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения рака, включающий (i) исследование опухолевого образца, полученного от пациента, имеющего или вероятно имеющего рак, в отношении утраты SKP2, и (ii) введение антагониста MDM2 пациенту, от которого был получен образец.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ идентификации пациента, имеющего рак, для которого наиболее

вероятно будет полезно лечение антагонистом MDM2, включающий измерение уровня одного или более биомаркеров по изобретению в опухолевом образце, полученном от пациента, и определение, существует ли вероятность того, что для пациента будет полезно лечение антагонистом MDM2, в соответствии с присутствующими уровнями.

Некоторые варианты осуществления изобретения включают выявление наличия мутации SKP2, свидетельствующей об утрате SKP2. Эти мутации можно сравнивать с контрольными уровнями, определенными в нормальной непролиферативной ткани или в отсутствие мутации.

В изобретении в отдельности предложено: способ определения того, поддается ли больной раком пациент лечению антагонистом MDM2; способ прогнозирования чувствительности роста опухолевых клеток к ингибированию антагонистом MDM2; способ прогнозирования восприимчивости рака у субъекта к противораковой терапии, включающей антагонист MDM2; способ разработки плана лечения для субъекта, больного раком; *in vitro* способ идентификации пациента, восприимчивого или чувствительного к лечению антагонистами MDM2. Способы, как правило, включают сравнение уровней SKP2 в образце, как правило, образце опухоли, с эталонным уровнем и прогнозирование восприимчивости рака к лечению противораковой терапией, включающей антагонист MDM2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен *in vitro* способ прогнозирования вероятности того, что пациент с опухолью, который является кандидатом для лечения антагонистом MDM2, будет демонстрировать ответ на лечение соединением, включающий этап: (a) определения уровней SKP2 в одном или более тканевых образцах, полученных от пациента, причем (i) истощение или потеря SKP2 (например, по сравнению с эталонным значением по крайней мере одной нормальной непролиферативной ткани) указывает на то, что пациент, вероятно, ответит на лечение, и/или (ii) нормальный или высокий уровень SKP2 указывает на то, что пациент с меньшей вероятностью будет демонстрировать ответ на лечение.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен анализ, включающий: (a) измерение или количественную оценку уровня SKP2; (b) сравнение уровня SKP2 (например, относительно контрольных уровней, определенных у здоровых индивидов) (например, относительно контрольных

уровней, определенных в нормальной непролиферативной ткани), и если уровень SKP2 (например, относительно контрольных уровней, определенных у здоровых индивидов) понижен и/или наблюдается утрата SKP2 (например, относительно контрольных уровней, определенных в нормальной непролиферативной ткани),

5 идентификацию пациента как подходящего для лечения антагонистом MDM2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен анализ, включающий:

- (i) приведение биологического образца, полученного от пациента, в контакт с антителом (например, антителом, специфическим к SKP2);
- 10 (ii) промывку образца для удаления несвязанного антитела;
- (iii) измерение интенсивности сигнала от связанного антитела;
- (iv) сравнение измеренной интенсивности сигнала с эталонным значением и определение, повышена ли измеренная интенсивность относительно эталонного значения;
- 15 (v) приведение биологического образца, полученного от пациента, в контакт с
 - a. праймером (например, по меньшей мере одной парой олигонуклеотидных праймеров для гена SKP2),
 - b. антителом (например, антителом, специфическим к SKP2), и/или
 - 20 c. праймером для гена или мутанта, свидетельствующем об утрате SKP2;
- (vi) проведение ПЦР, ОТ-ПЦР или секвенирования нового поколения для указанного образца для амплификации экспрессионных продуктов/транскриптов генов в образце;
- (vii) определение уровня экспрессионного продукта по меньшей мере
- 25 одного из указанных генов; и
- (viii) идентификацию субъекта как имеющего повышенную вероятность пригодности для лечения антагонистом MDM2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение антагониста MDM2 субъекту с

30 утратой SKP2 в опухолевом образце, определенной с помощью секвенирования или иммуноанализа.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ введения антагониста MDM2 нуждающемуся в этом пациенту, включающий:

(1) определение уровней SKP2 у пациента;

(2) присвоение фенотипа пациенту на основании уровней генов, перечисленных выше, и генотипа опухоли, определенного в (1), причем фенотип выбирают из слабого (С), промежуточного (П) и чувствительного (Ч), и

5 указанный фенотип присваивают на основании уровня генов в опухоли; и

(3) введение пациенту с фенотипом Ч антагониста MDM2.

В другом варианте осуществления в изобретении предложено применение антагониста MDM2 в производстве лекарственного средства для лечения рака у пациента, у которого раковая опухоль характеризуется утратой SKP2.

10 В другом варианте осуществления в изобретении предложено применение антагониста MDM2 в производстве лекарственного средства для лечения рака у пациента, который был идентифицирован как с большой вероятностью восприимчивый к лечению антагонистом MDM2 в соответствии со способом, описанным в данном документе.

15 В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложено готовое изделие, содержащее упакованные вместе лекарственное средство на основе антагониста MDM2 в фармацевтически приемлемом носителе и листок-вкладыш, указывающий, что лекарственное средство предназначено для лечения пациента с раком (например, миелоидным лейкозом, необязательно ОМЛ) на

20 основании уровней SKP2, определенных методом анализа, используемым для измерения этих уровней.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ рекламы лекарственного средства на основе антагониста MDM2, включающий продвижение среди целевой аудитории применения

25 лекарственного средства на основе антагониста MDM2 для лечения больного раком пациента с утратой SKP2.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложено устройство, выполненное с возможностью идентификации опухоли (например, миелоидного лейкоза, необязательно ОМЛ) больного раком пациента, как такой,

30 в случае которой с большой вероятностью будет полезно лечение терапевтическим агентом или комбинацией терапевтических агентов, нацеленных на MDM2, или с большой вероятностью не будет полезно лечение терапевтическим агентом или комбинацией терапевтических агентов.

Устройство может содержать запоминающее устройство, хранящее данные

секвенирования или данные иммуноанализа образцов опухоли или крови в отношении утраты SKP2, чтобы идентифицировать пациента как такого, для которого с большой вероятностью будет полезен или не будет полезен терапевтический агент или комбинация терапевтических агентов, нацеленных на MDM2.

В одном варианте осуществления описанного в данном документе способа, когда уровни SKP2 являются низкими или отсутствуют (например, утрата SKP2), тогда пациенту вводят антагонист MDM2.

В другом варианте осуществления описанного в данном документе способа, когда уровни SKP2 являются высокими (или присутствуют), тогда пациенту не вводят антагонист MDM2.

Если экспрессия биомаркера по изобретению высока, антагонист MDM2 можно вводить в сочетании с дополнительным лечением, например, дополнительным лечением для снижения уровней SKP2.

На уровни SKP2 может влиять снижение экспрессии генов, например, передача сигналов Notch1 индуцирует экспрессию генов Skp2, а ингибирование пути Notch1 снижает уровни Skp2. Путь IKK-NF-kB также регулирует экспрессию гена Skp2 посредством связывания p52/RelA или p52/RelB с промотором Skp2, а снижение передачи сигналов факторам транскрипции NFkB будет снижать экспрессию SKP2. Другим путем, регулирующим экспрессию гена Skp2, является путь фосфоинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt, таким образом, ингибирование активности PI3K с помощью PI3Ki или AKTi снижает уровни мРНК Skp2. Регуляторы в обратном направлении пути PI3K/AKT, такие как BCR-ABL и HER2, также регулируют экспрессию SKP2.

Помимо регуляции на уровне экспрессии, skp2 может регулироваться стабильностью белка. Фосфорилирование SKP2, например, с помощью AKT или CDK2, ослабляет убиквитинирование и разложение SKP2. Следовательно, ингибирование фосфорилирования SKP2 является еще одним способом снижения уровня белка SKP2.

В некоторых вариантах осуществления антагонист MDM2 можно вводить пациенту в сочетании с дополнительным противораковым средством, которое не является антагонистом MDM2.

В одном варианте осуществления биомаркер по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP2, перечисленные в настоящем документе, можно

использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с агентом, описанным в пунктах (i)-(xlix) ниже.

В одном варианте осуществления определено, что опухоль пациента не подходит для лечения одним агентом, ингибитором MDM2, из-за присутствия 5 высоких или повышенных уровней SKP2 («SKP2 высокий»), и, следовательно, лечение дополнительным агентом может быть использовано для запуска низкого или сниженного уровня SKP2 («SKP2 низкий») в сочетании с ингибитором MDM2. В одном варианте осуществления определяется, что опухоль пациента имеет высокий уровень SKP2, и ее лечат антагонистом MDM2 в сочетании с 10 дополнительным противораковым средством. В одном варианте осуществления опухоль пациента определяется как имеющая высокий уровень SKP2, и ее лечат антагонистом MDM2 в сочетании с одним или несколькими агентами, перечисленными в пунктах (i) – (xlix) ниже.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности 15 SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами АКТ, ингибиторами CDK2, ингибиторами пути Notch1, ингибиторами пути фосфоинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt, ингибиторами пути IKK-NF-kB, ингибиторами BCR-ABL и/или ингибиторами HER2.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности 20 SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами АКТ, ингибиторами CDK2, ингибиторами пути Notch1, ингибиторами пути фосфоинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt, ингибиторами 25 пути IKK-NF-kB, ингибиторами BCR-ABL и/или ингибиторами HER2.

В одном варианте осуществления опухоль пациента определяется как имеющая высокий уровень SKP2, и ее лечат антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами АКТ, ингибиторами CDK2, ингибиторами пути Notch1, ингибиторами пути фосфоинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt, ингибиторами пути 30 IKK-NF-kB, ингибиторами BCR-ABL и/или ингибиторами HER2.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами CDK2.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами пути Notch1.

5 В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами пути фосфоинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt, в частности, ингибиторами активности PI3K с помощью PI3Ki или AKTi.

10 В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности, SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами пути IKK-NF-kB, например, через связывание p52/RelA или p52/RelB с промотором Skp2 и снижение передачи сигналов факторам транскрипции NFkB.

15 В одном варианте осуществления ингибитор пути IKK-NF-kB представляет собой ингибитор IRAK.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами BCR-ABL и/или ингибиторами HER2.

20 Термин «ингибитор пути PI3K/AKT» используется в настоящем документе для определения соединения, которое ингибирует активацию AKT, активность самой киназы или модулирует нижестоящие мишени, блокируя пролиферативные эффекты и эффекты выживания клеток пути (включая один или несколько из целевых ферментов в пути, как описано в настоящем документе, включая фосфатидилинозитол-3 киназу (PI3K), AKT, мишень рапамицина млекопитающих (mTOR), PDK-1, p70 S6 киназу и *forkhead* транслокацию).

30 Ингибиторы пути PI3K/AKT включают ингибиторы PKA/B и/или PKB (akt), ингибиторы PI3K, ингибиторы mTOR и/или ингибиторы кальмодулина (ингибиторы *forkhead* транслокации).

Примеры ингибиторов пути PI3K/AKT включают ингибиторы PI3K.

Примеры ингибиторов пути PI3K/AKT также включают mTOR.

Примеры ингибиторов пути PI3K/AKT включают ингибиторы *forkhead* транслокации.

Примеры ингибиторов пути PI3K/AKT включают ингибиторы AKT.

В одном варианте осуществления ингибитор пути PI3K/AKT представляет собой ингибитор PI3K, выбранный из одного или нескольких конкретных соединений, описанных выше. В одном варианте осуществления ингибитор пути PI3K/AKT представляет собой PI-103 или LY294002.

В одном варианте осуществления предлагается комбинация антагониста MDM2, как описано в настоящем документе, и ингибитора пути PI3K/AKT.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения рака у пациента, при этом указанный способ включает этапы отбора пациента:

(a) наличие высоких уровней SKP2 (или низких уровней субстратов SKP2) в биологическом образце, полученном от указанного пациента; и

(b) введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и агента для снижения уровня SKP2 указанному пациенту, выбранному на этапе (a).

В одном варианте осуществления средство или лечение для снижения уровней SKP2 представляет собой противораковое средство или лечение. В одном варианте осуществления средство или лечение для снижения уровней SKP2 представляет собой ингибитор пути PI3K/AKT.

В другом варианте осуществления предложен антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, имеющего нормальную или высокую экспрессию SKP2, в сочетании с агентом, индуцирующим чувствительность к антагонисту MDM2, например, агентом, снижающим уровень SKP2.

В другом варианте осуществления предлагается способ лечения рака у пациента, при этом указанный способ включает этапы выбора пациента:

(a) наличие нормальных или высоких уровней SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента; и

(b) введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и агента для индуцирования чувствительности к антагонисту MDM2, например, агента для снижения уровней SKP2, указанному пациенту, выбранному на этапе (a).

Агент, индуцирующий чувствительность к антагонисту MDM2, в некоторых вариантах осуществления может представлять собой ASTX660, также известный как толинапант.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

5 Фигура 1: Дифференциальные уровни экспрессии генов в апоптотических и неапоптотических линиях раковых клеток после обработки Соединением 1.

 Фигура 2: Клеточные линии ОМЛ классифицируются как апоптотические или неапоптотические в ответ на обработку Соединением 1 (А). Базальная экспрессия SKP2 ниже в апоптотических клеточных линиях ОМЛ, чем в
10 неапоптотических клеточных линиях ОМЛ (В).

 Фигура 3: Сверхэкспрессия SKP2 снижает цитотоксичность, индуцированную Соединением 1 (А). Экспрессия SKP2 не модулирует чувствительность к АВТ-199 (ингибитор BCL-2) (В). Сверхэкспрессия SKP2 снижает зависимость от Соединения 1 гибель клеток в апоптотической клеточной
15 линии ОМЛ (С).

 Фигура 4: Нокдаун SKP2 увеличивает цитотоксичность, индуцированную Соединением 1, в неапоптотической клеточной линии ОМЛ (А). Сверхэкспрессия SKP2 снижает зависимость от Соединения 1 активацию пути p53
20 (В).

 Фигура 5: Сверхэкспрессия SKP2 снижает чувствительность к Соединению 1 *in vivo*. Уровни циркулирующей опухолевой ДНК выше после лечения Соединением 1, когда SKP2 сверхэкспрессирован, по сравнению с исходной экспрессией SKP2.

 Фигура 6: Сверхэкспрессия SKP2 превращает чувствительную клеточную
25 линию ОМЛ в резистентную *in vivo*. Соединение 1 уменьшает количество лейкозных клеток, когда экспрессия SKP2 низкая (С по сравнению с В). Соединение 1 не снижает количество лейкоэмических клеток при сверхэкспрессии SKP2 (Е по сравнению с D).

 Фигура 7: Бласты ОМЛ SKP2^{низк.}, выделенные от пациентов, более
30 чувствительны к Соединению 1, чем бласты ОМЛ с более высокой экспрессией SKP2. Повышенная экспрессия SKP2 коррелирует со сниженной чувствительностью к Соединению 1.

Фигура 8: Измерение индукции апоптоза в клеточной линии OCI-AML3 после 72-часовой обработки путем измерения расщепленной каспазы-3 с помощью цитометрии.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

5 Термины «ингибитор MDM2» и «антагонист MDM2» используются как синонимы и определяют соединения MDM2 или аналоги соединений MDM2, описанные в данном документе, включая их ионы, соли, сольваты, изомеры, таутомеры, N-оксиды, сложные эфиры, пролекарства, изотопы и защищенные
10 формы (предпочтительно их соли, или таутомеры, или изомеры, или N-оксиды, или сольваты, и более предпочтительно их соли, или таутомеры, или N-оксиды, или сольваты), как описано в данном документе.

«Антагонист MDM2» означает антагонист одного или более членов семейства MDM2, в частности MDM2 и MDM4 (также называемых MDMx). Термин «антагонист» относится к типу лиганда рецептора или лекарственному
15 препарату, который блокирует или ослабляет опосредованные агонистом биологические реакции. Антагонисты обладают аффинностью, но не агонистической эффективностью в отношении их когнатных рецепторов, а связывание будет нарушать взаимодействие и ингибировать функцию любого лиганда (например, эндогенных лигандов или субстратов, агониста или
20 обратного агониста) на рецепторах. Антагонизм может происходить прямо или косвенно, и может быть опосредован любым механизмом и на любом физиологическом уровне. В результате антагонизм лигандов может при разных обстоятельствах проявляться функционально разными способами. Антагонисты опосредуют свои эффекты, связываясь с активным сайтом или аллостерическими
25 сайтами на рецепторах, или они могут взаимодействовать с уникальными сайтами связывания, обычно не участвующими в биологической регуляции активности рецептора. Антагонистическая активность может быть обратимой или необратимой в зависимости от долговечности комплекса антагонист-рецептор, которая, в свою очередь, зависит от природы связывания антагонист-рецептор.
30 рецептор.

«Активность» представляет собой выраженную в количественных единицах меру лекарственной активности, необходимой для получения эффекта заданной интенсивности. Высокоактивное лекарственное средство вызывает большую реакцию при низких концентрациях. Активность пропорциональна средству и

эффективности. Средство представляет собой способность лекарственного средства связываться с рецептором. Эффективность представляет собой соотношение между занятостью рецептора и способностью инициировать ответ на молекулярном, клеточном, тканевом или системном уровне.

5 В контексте данного документа подразумевается, что термин «опосредованный», используемый, например, в сочетании с MDM2/p53, как описано в данном документе (и применяемый, например, к различным физиологическим процессам, заболеваниям, состояниям, патологическим состояниям, терапиям, способам лечения или вмешательствам), функционирует
10 ограничительно в том смысле, что указанный белок должен играть биологическую роль в различных процессах, заболеваниях, состояниях, патологических состояниях, способах лечения и вмешательствах, по отношению к которым применяется данный термин. В случаях, когда термин относится к заболеванию, состоянию или патологическому состоянию, биологическая роль,
15 которую играет данный белок, может быть прямой или косвенной и может быть необходимой и/или достаточной для проявления симптомов заболевания, состояния или патологического состояния (или его этиологии или прогрессирования). Таким образом, функция белка (и, в частности, аберрантные уровни функции, например, избыточная или недостаточная экспрессия) не
20 обязательно должна быть проксимальной причиной заболевания, состояния или патологического состояния: скорее, предполагается, что опосредованные заболевания, состояния или патологические состояния включают те, которые имеют многофакторную этиологию и комплексное прогрессирование, в которых рассматриваемый белок участвует только частично. В тех случаях, когда термин
25 применяется по отношению к лечению, профилактике или вмешательству, роль, которую играет белок, может быть прямой или косвенной, и может быть необходимой и/или достаточной для проведения лечения, профилактики или исхода вмешательства. Таким образом, болезненное состояние или патологическое состояние, опосредованное белком, включает развитие
30 устойчивости к любому конкретному лекарственному средству или методу лечения рака.

В контексте данного документа термин «лечение» в контексте лечения патологического состояния, т. е. состояния, расстройства или заболевания, обычно относится к лечению и терапии человека либо животного (например, в

ветеринарии), в ходе которых которых достигается некоторый необходимый терапевтический эффект, например, подавление прогрессирования патологического состояния, и включает уменьшение скорости прогрессирования, остановку прогрессирования, облегчение патологического состояния,

5 уменьшение или ослабление по меньшей мере одного симптома, связанного с или вызванного патологическим состоянием, лечение которого проводится, и излечение патологического состояния. Например, лечение может заключаться в ослаблении одного или более симптомов расстройства или полном устранении расстройства.

10 В контексте данного документа термин «профилактика» (т. е. применение соединения в качестве профилактической меры) в контексте лечения патологического состояния, то есть состояния, расстройства или заболевания, обычно относится к профилактике или предотвращению, будь то у человека или животного (например, в ветеринарии), в ходе которых которых достигается
15 некоторый необходимый превентивный эффект, например, предотвращение возникновения заболевания или защита от заболевания. Профилактика включает полное и тотальное блокирование всех симптомов расстройства на неопределенный период времени, простое замедление появления одного или нескольких симптомов заболевания или снижение вероятности возникновения
20 заболевания.

Ссылки на профилактику или лечение болезненного или патологического состояния, такого как рак, включают облегчение или уменьшение заболеваемости, например, раком.

Комбинации по изобретению могут оказывать терапевтически эффективное
25 действие по сравнению с терапевтическим действием отдельных соединений/агентов при их раздельном введении.

Термин «эффективный» включает благоприятные эффекты, такие как аддитивность, синергизм, уменьшение побочных эффектов, уменьшение токсичности, увеличение времени до прогрессирования заболевания, увеличение
30 времени выживаемости, сенсбилизация или повторная сенсбилизация одного агента к другому или повышение уровня ответа. Предпочтительно, эффективное действие может позволить вводить пациенту более низкие дозы каждого или любого из компонентов, тем самым уменьшая токсичность химиотерапии, и в то же время оказывая и/или поддерживая тот же терапевтический эффект.

«Синергетический» эффект в контексте настоящего изобретения относится к создаваемому комбинацией терапевтическому эффекту, который превышает сумму терапевтических эффектов агентов комбинации при их отдельном введении. «Аддитивный» эффект в контексте настоящего изобретения относится к создаваемому комбинацией терапевтическому эффекту, который больше терапевтического эффекта любого из агентов комбинации при их отдельном введении. В контексте данного документа термин «показатель положительного клинического ответа» относится, в случае солидной опухоли, к степени уменьшения размера опухоли в данный момент времени, например, 12 недель. Таким образом, например, показатель положительного клинического ответа, равный 50%, означает уменьшение размера опухоли на 50%. Ссылки в данном документе на «клинический ответ» относятся к показателю положительного клинического ответа 50% или более. «Частичный ответ» определяется в данном документе как показатель положительного клинического ответа менее 50%.

В контексте данного документа термин «комбинация» применительно к двум или более соединениям и/или агентам предназначен для определения материала, в котором объединены два или более агентов. Термины «комбинированный» и «комбинирование» в данном контексте должны толковаться соответствующим образом.

Объединение двух или более соединений/агентов в комбинации может быть физическим или нефизическим. Примеры физически ассоциированных комбинированных соединений/агентов включают:

- композиции (например, единичные составы), содержащие два или более соединений/агентов в смеси (например, в одной и той же стандартной дозе);
- композиции, содержащие материал, в котором два или более соединений/агентов связаны химически/физико-химически (например, путем сшивания, молекулярной агломерации или связывания с фрагментом общего носителя);
- композиции, содержащие материал, в котором два или более соединений/агентов химически/физико-химически совместно упакованы (например, расположены на липидных везикулах, частицах (например, микро- или наночастицах) или каплях эмульсии или внутри них);

- фармацевтические наборы, фармацевтические упаковки или упаковки для пациентов, в которых два или более соединений/агентов совместно упакованы или совместно представлены (например, как часть набора стандартных доз);

5 Примеры нефизически ассоциированных комбинированных соединений/агентов включают:

- материал (например, не-единый состав), содержащий по меньшей мере одно из двух или более соединений/агентов вместе с инструкциями по объединению для немедленного введения с по меньшей мере одним соединением для получения физически ассоциированных двух или более соединений/агентов;
- материал (например, не-единый состав), содержащий по меньшей мере одно из двух или более соединений/агентов вместе с инструкциями по проведению комбинированной терапии двумя или более соединениями/агентами;
- материал, содержащий по меньшей мере одно из двух или более соединений/агентов вместе с инструкциями по введению в популяции пациентов, которым уже ввели (или вводят) другой (другие) из двух или более соединений/агентов;
- материал, содержащий по меньшей мере одно из двух или более соединений/агентов в количестве или в форме, специально адаптированной для применения в сочетании с другим (другими) из двух или более соединений/агентов.

В контексте данного документа термин «комбинированная терапия» предназначен для определения методов лечения, которые включают применение комбинации двух или более соединений/агентов (по определению выше выше).

25 Таким образом, ссылки на «комбинированную терапию», «комбинации» и применение соединений/агентов «в комбинации» в данной заявке могут относиться к соединениям/агентам, которые вводятся как часть одной и той же общей схемы лечения. Как таковая, позология каждого из двух или более соединений/агентов может отличаться: каждое может быть введено в одно и то же время или в разное время. Поэтому следует понимать, что соединения/агенты комбинации можно вводить последовательно (например, до или после) или

30 одновременно, либо в одном и том же фармацевтическом составе (т. е. вместе), либо в разных фармацевтических составах (т. е. отдельно). Одновременно в

одном и том же составе относится к единому составу, тогда как одновременно в разных фармацевтических составах относится к не-единым составам. Позология каждого из двух или более соединений/агентов в комбинированной терапии также может различаться по пути введения.

5 В контексте данного документа термин «фармацевтический набор» определен как набор из одной или более единичных доз фармацевтической композиции вместе со средствами дозирования (например, мерным устройством) и/или средствами доставки (например, ингалятором или шприцем), которые все, 10 обязательно, находятся в общей внешней упаковке. В фармацевтических наборах, содержащих комбинацию двух или более соединений/агентов, отдельные соединения/агенты могут представлять собой единые или не-единые составы. Единичная доза (дозы) может находиться в блистерной упаковке. Фармацевтический набор может необязательно содержать дополнительно инструкции по применению.

15 В контексте данного документа термин «фармацевтическая упаковка» определен как набор из одной или более единичных доз фармацевтической композиции, необязательно, находящихся в общей внешней упаковке. В фармацевтических упаковках, содержащих комбинацию двух или более 20 соединений/агентов, отдельные соединения/агенты могут представлять собой единые или не-единые составы. Единичная доза (дозы) может находиться в блистерной упаковке. Фармацевтическая упаковка может необязательно содержать дополнительно инструкции по применению.

В контексте данного документа термин «необязательно замещенный» 25 относится к группе, которая может быть незамещенной или замещенной заместителем, по определению в данном документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение основано на идентификации биомаркера, который 30 позволяет определять вероятный ответ больного раком пациента на терапию антагонистом MDM2. Это обеспечивает возможность точной рака с использованием антагониста MDM2.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к сопутствующей диагностике для лечения рака с использованием антагониста MDM2. В контексте данного документа термин «сопутствующая диагностика» 35 используется для обозначения как теста, необходимого для определения того,

будет ли пациент демонстрировать ответ на лекарственный препарат (т. е. необходимая сопутствующая диагностика), так и теста, предназначенного для определения, будет ли пациент реагировать благоприятно или оптимально (что иногда называют дополнительной диагностикой). В некоторых вариантах осуществления биомаркер идентифицирует пациента, который будет демонстрировать ответ, и таким образом позволяет различать демонстрирующих и не демонстрирующих ответ. В другом варианте осуществления биомаркер идентифицирует пациентов, которые будут демонстрировать оптимальный ответ, благодаря чему врач впоследствии может выбрать оптимальное лечение для этого пациента.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены анализы для определения уровня экспрессии SKP2. Он может быть определен прямо или косвенно, как обсуждалось выше. Этот анализ может включать или не включать этап определения прогностического результата. Анализ обычно представляет собой анализ *in vitro*, проводимый для образца от пациента, такого как биопсия рака или образец крови (независимо от того, является ли рак раком крови).

Биомаркеры для эффективного лечения рака

В настоящем изобретении предложен биомаркер, который свидетельствует о повышенной чувствительности раковых клеток к лечению антагонистом MDM2. Следовательно, идентификация SKP2 позволяет отобрать больного раком пациента для лечения антагонистом MDM2.

Биомаркером по изобретению является белок 2, ассоциированный с киназой S-фазы, обычно называемый «SKP2». Этот белок и ген известны в данной области. SKP2 человека имеет ген Entrez ID 6502 (расположенный в 5p13.2) и номер доступа Uniprot Q13309.

Низкая экспрессия SKP2 указывает на чувствительность раковых клеток к лечению антагонистом MDM2. Нормальная или высокая экспрессия SKP2 свидетельствует об устойчивости раковых клеток к лечению антагонистом MDM2. В Примере 2 исходная экспрессия SKP2 была ниже в апоптотических клеточных линиях ОМЛ, чем в неапоптотических клеточных линиях ОМЛ (Фигура 2). Было показано, что экспрессия SKP2 коррелирует с чувствительностью к лечению антагонистом MDM2 *in vitro* (Фигуры 3А-С, 4А-В), но не модулирует активность других проапоптотических молекул (Фигура

3В). Экспрессия SKP2 также модулировала чувствительность к лечению антагонистом MDM2 *in vivo* и в бластах пациентов с ОМЛ (Фигуры 5-6-7).

Соответственно, низкие уровни SKP2 указывают на повышенную чувствительность раковых клеток к лечению антагонистами MDM2.

5 В некоторых вариантах осуществления истощение SKP2 может быть результатом одной или нескольких мутаций в гене SKP2. Мутация может включать одну или несколько нуклеотидных замен, добавлений, делеций, инверсий или других перестроек ДНК или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько мутаций в гене SKP2 являются
10 инактивирующими.

Когда определяют несколько биомаркеров, комбинация биомаркеров может называться панелью биомаркеров. Панель биомаркеров может включать идентифицированные биомаркеры или состоять из них.

В дополнение к SKP2 другие биомаркеры и/или данные, такие как
15 демографические данные (например, возраст, пол), могут быть включены в набор данных, применяемых для определения пригодности для ингибирования MDM2. Когда необязательно включены другие биомаркеры, общее количество биомаркеров (т. е. биомаркер по изобретению плюс другие биомаркеры) может составлять 2, 3, 4, 5, 6 или более. В некоторых вариантах осуществления панель
20 прогностических биомаркеров с меньшим количеством компонентов может упростить необходимое тестирование.

В контексте данного документа термины «утрата» и «снижение» имеют свое обычное значение. В контексте данного документа термины «увеличенный» и «усиленный» имеют свое обычное значение.

25 Биомаркеры можно определить с помощью соответствующих методик, которые известны специалисту в данной области техники. Биомаркеры можно определять с помощью прямых или косвенных методик. Экспрессию генов можно выявлять путем выявления мРНК-транскриптов. Белковые биомаркеры можно выявлять с помощью иммуногистохимии.

30 В некоторых вариантах осуществления истощение одного или более биомаркеров по изобретению можно определять путем оценки функции одного или более биомаркеров. Уровень экспрессии биомаркера может быть прямо пропорциональным уровню функции. Функцию одного или более биомаркеров можно определять прямо или косвенно.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии можно сравнивать с пороговым значением, отражающим таким же образом уровень экспрессии, ассоциируемый с восприимчивостью к лечению, чтобы оценить, свидетельствует ли исследуемое значение о чувствительности пациента к лечению на основе ингибирования MDM2.

Пациент, которого оценивают в соответствии с настоящим изобретением, имеет или предположительно имеет рак. Известно или предположительно, что исследуемый образец содержит раковые клетки. В типичных вариантах осуществления исследуемым образцом является биопсия раковой ткани. Биопсия может представлять собой жидкую биопсию или биопсию солидной ткани (например, солидной опухоли).

Уровни биомаркеров

В изобретении предложен SKP2 в качестве биомаркера. Было замечено, что сниженные уровни SKP2 указывают на повышенную чувствительность к терапии ингибитором MDM2 для лечения рака.

Сравнение может быть проведено относительно нормальных здоровых людей, как правило, с нераковыми клетками того же типа, что и раковая клетка.

В некоторых вариантах осуществления сниженный уровень биомаркера определяют относительно нераковых клеток одного и того же индивидуума, как правило, нераковых клеток того же типа от того же индивидуума.

В дополнительных вариантах осуществления уровень биомаркера определяют относительно лабораторных стандартов и значений на основе известного нормального значения для популяции. Как правило, известный уровень берется от нераковой клетки.

В других вариантах осуществления уровень биомаркера соотносится с известными значениями у нормальных (не раковых) индивидуумов. Например, BloodSpot (www.bloodspot.eu) представляет собой ресурс данных об экспрессии генов нормальных и злокачественных клеток крови и включает данные об экспрессии генов OML, как обсуждалось в других местах настоящего документа.

В некоторых других вариантах осуществления уровень биомаркера оценивают относительно уровня, определенного в образцах рака у субъектов, не реагирующих на ингибитор MDM2, или в образце рака у субъектов, не реагирующих на ингибитор MDM2.

В одном варианте осуществления уровень РНК SKP2 снижен по сравнению с количеством указанной РНК в контрольном образце, полученном от здорового субъекта, не страдающего раком.

5 В альтернативном варианте осуществления уровень РНК SKP2 снижен по сравнению с количеством указанной РНК в более раннем образце, полученном от того же пациента, когда у этого пациента не было рака.

В одном варианте осуществления он снижен относительно нормальных уровней (например, «верхнего предела нормы» или ВПН).

10 В одном варианте осуществления уровень по меньшей мере одного из биомаркеров имеет площадь под кривой (ППК) при раке по сравнению с контрольным образцом, большую (в случае повышенных биомаркеров) или меньшую (в случае истощенных биомаркеров) в 0,5 раза относительно (а) уровня по меньшей мере одного из биомаркеров в образце из ткани или от человека, не имеющего рак, или (b) уровня одного или более контрольных белков в образце
15 от субъекта. Необязательно ППК больше или меньше 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 0,95, 0,975 или 0,99.

В некоторых вариантах осуществления уровень по меньшей мере одного из биомаркеров представляет собой по меньшей мере одно стандартное отклонение от контроля относительно (а) уровня одного или более биомаркеров в образце из
20 ткани или от человека, не имеющего рак, или (b) уровня одного или более контрольных белков в образце от больного раком субъекта.

В некоторых вариантах осуществления контроль для сравнения представляет собой образец, полученный от здорового пациента, или образец
25 нераковой ткани, полученный от пациента с диагнозом рака, такой как образец нераковой ткани из того же органа, в котором находится опухоль (например, нераковые лейкоциты могут служить в качестве контроля лейкемии). В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой исторический контроль или стандартное значение (т. е. ранее исследованный контрольный образец или группу образцов, которые представляют исходные или нормальные
30 значения).

Контроли или стандарты для сравнения с образцом для определения дифференциальной экспрессии включают образцы, считающиеся нормальными (в том смысле, что они не изменены в отношении необходимой характеристики, например образец от субъекта, у которого нет рака толстой кишки), а также

лабораторные значения, даже если они, возможно, установлены произвольно. Лабораторные стандарты и значения могут быть установлены на основании известного или определенного популяционного значения и могут быть представлены в формате графика или таблицы, что позволяет сравнивать измеренные, экспериментально определенные значения.

В таких вариантах осуществления эталонная оценка для биомаркера или биомаркеров основана на нормальных здоровых индивидах.

Виды рака

Рак, презентирующий идентифицированный SKP2 биомаркер, имеет повышенную вероятность успешного лечения антагонистом MDM2. Рак, подлежащий лечению, не является конкретным образом ограниченным при условии, что он презентирует этот биомаркер.

Рак обычно представляет собой p53 дикого типа. Как известно в данной области техники, раковые клетки p53 дикого типа экспрессируют опухолевый супрессор p53 на уровнях дикого типа и с функцией дикого типа. Клетки p53 дикого типа не содержат мутацию в гене p53, которая приводит к снижению функции опухолевого супрессора p53.

Исходные данные биомаркеров, представленные в Примере 2, были получены из ряда раковых тканей, включая толстую кишку, кровь, молочную железу, легкие, кожу, яичник и поджелудочную железу.

Таким образом, рак может представлять собой гемобластозы или солидную опухоль.

Подробный анализ биомаркеров в Примерах 3 и далее сосредоточен на раке крови, особенно на остром миелоидном лейкозе (ОМЛ). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластозы, обычно рак крови. Типичные виды рака крови включают лейкозы, лимфомы (ходжкинские и неходжкинские) и миеломы.

В одном варианте осуществления рак представляет собой лимфому. Это может быть неходжкинская лимфома (НХЛ) или лимфома Ходжкина.

В одном варианте осуществления рак представляет собой миелому. Это может быть множественная миелома (ММ).

Обычно рак представляет собой лейкемию. Лейкемии включают острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хронический

лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ) и острый моноцитарный лейкоз (АМоЛ).

5 Более типично рак представляет собой миелоидный лейкоз. Миелоидные лейкозы включают хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

Обычно рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

В одном варианте осуществления ОМЛ представляет собой ОМЛ с транслокацией t(15;17).

10 В другом варианте осуществления рак представляет собой солидную опухоль. Сплошная опухоль может быть раком толстой кишки. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак легкого. В еще одном варианте осуществления рак представляет собой рак кожи, например, меланому или карциному. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак 15 яичника. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы.

Конкретные виды рака, которые могут быть оценены для лечения в соответствии с изобретением, включают, но не ограничиваются ими, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Было замечено, что ОМЛ является наиболее 20 чувствительным раком в некоторых примерах анализов.

В некоторых вариантах осуществления пролиферация раковых клеток ингибируется антагонистом MDM2 со значением IC₅₀ в наномолярном диапазоне. В некоторых вариантах осуществления значение IC₅₀ составляет менее 500 нМ, менее 400 нМ, менее 300 нМ или менее 200 нМ. В некоторых вариантах 25 осуществления значение IC₅₀ составляет менее 100 нМ. Значения IC₅₀ можно рассчитывать, например, используя программное обеспечение GraphPad Prism, приведенное в данном документе в качестве примера, или способы, известные в данной области техники.

30 В некоторых вариантах осуществления антагонист MDM2 индуцирует апоптоз раковой клетки. Апоптоз обычно может быть опосредован активированной каспазой-3. Индукцию апоптоза можно определить путем выявления клеток, положительных в отношении активированной каспазы-3, после 72-часовой обработки 1 мкМ антагониста MDM2. Можно использовать другие аналитические концентрации и/или продолжительность лечения, как

будет очевидно для специалиста в данной области техники, например, 48 часов с 1 мкМ или 48 часов с 5 мкМ антагониста MDM2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20% или по меньшей мере 30% клеток, окрашивающихся положительно в отношении активированной каспазы-3, являются индикатором индуцированного апоптоза. В некоторых вариантах осуществления 40% является надежным уровнем для идентификации сильной индукции апоптоза, при этом > 40% клеток в популяции, окрашивающихся положительно в отношении активированной каспазы-3, можно считать апоптотическими. Можно использовать другие уровни в зависимости от клеток и анализа, как будет очевидно для специалиста в данной области техники, например, 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 75% или более. Наборы для окрашивания в отношении активной каспазы-3 являются коммерчески доступными, например «Набор для окрашивания в отношении расщепленной каспазы-3 (красный)», доступный от Abcam (Cambridge, UK) под номером в каталоге ab65617. Также можно использовать краситель Invitrogen Cell Event (C10423).

Краситель аннексин V также можно использовать для выявления апоптоза. Он был использован в Примерах и хорошо известен в данной области техники как применимый краситель для выявления апоптоза.

АНТАГОНИСТЫ MDM2

Ген связанного с трансформацией белка 53 (TP53) кодирует 53 кДа белок – p53. Белок-супрессор опухоли p53 реагирует на клеточные стрессы, такие как гипоксия, повреждение ДНК и онкогенная активация, посредством ряда посттрансляционных модификаций, включая фосфорилирование, ацетилирование и метилирование, и действует как сигнальный узел в различных путях, которые активируются. p53 играет дополнительную роль в других физиологических процессах, включая аутофагию, клеточную адгезию, клеточный метаболизм, фертильность, старение и развитие стволовых клеток. Фосфорилирование p53 в результате активации киназ, включая ATM, CHK1 и 2 и ДНК-ПК, приводит к стабилизированной и транскрипционно активной форме белка, что приводит к образованию ряда генных продуктов. Ответы на активацию p53 включают апоптоз, выживаемость, остановку клеточного цикла, репарацию ДНК, ангиогенез, инвазию и ауторегуляцию. Конкретная комбинация которых в сочетании с генетическим фоном клетки приводит к наблюдаемому

клеточному эффекту, т. е. апоптозу, остановке клеточного цикла или старению. Для опухолевых клеток путь апоптоза может быть предпочтительным из-за утраты белков-супрессоров опухоли и связанных с ними контрольных точек клеточного цикла в сочетании с онкогенным стрессом.

5 Известно, что в условиях стресса, таких как гипоксия и повреждение ДНК, клеточный уровень белка p53 повышается. Известно, что p53 инициирует транскрипцию ряда генов, которые регулируют продвижение по клеточному циклу, инициацию репарации ДНК и запрограммированную гибель клеток. Это обеспечивает механизм для роли p53 в качестве опухолевого супрессора,
10 подтвержденный генетическими исследованиями.

Активность p53 отрицательно и жестко регулируется связывающим взаимодействием с белком MDM2, транскрипция которого непосредственно регулируется p53. p53 инактивируется, когда его трансактивирующий домен связывается белком MDM2. После инактивации функции p53 подавляются, а
15 комплекс p53-MDM2 становится мишенью для убиквитинилирования.

В нормальных клетках баланс между активным p53 и неактивным p53, связанным с MDM2, поддерживается в ауторегуляторной петле отрицательной обратной связи. Это означает, что p53 может активировать экспрессию MDM2, что, в свою очередь, приводит к подавлению p53.

20 Было обнаружено, что инактивация p53 в результате мутации характерна примерно для половины всех обычных спорадических видов рака у взрослых. Кроме того, примерно в 10% опухолей амплификация гена и сверхэкспрессия MDM2 приводит к утрате функционального p53, что приводит к злокачественной трансформации и неконтролируемому росту опухоли.

25 Инактивация p53 посредством ряда механизмов является частым причинным событием в развитии и прогрессировании рака. К ним относятся инактивация путем мутации, нацеливание онкогенными вирусами и, в значительной части случаев, амплификация и/или повышенная скорость транскрипции гена MDM2, что приводит к сверхэкспрессии или повышенной
30 активации белка MDM2. Амплификацию гена MDM2, приводящую к сверхэкспрессии белка MDM2, наблюдали в образцах опухолей, взятых из обычных спорадических раков. В целом около 10% опухолей имели амплификацию MDM2, при этом наибольшая частота была обнаружена при гепатоцеллюлярной карциноме (44%), раке легкого (15%), саркомах и

остеосаркомах (28%) и болезни Ходжкина (67%) (Danovi et al., Mol. Cell. Biol. 2004, 24, 5835-5843, Toledo et al., Nat Rev Cancer 2006, 6, 909-923, Gembarska et al., Nat Med 2012, 18, 1239-1247). Обычно активация транскрипции MDM2 активированным p53 приводит к повышению уровня белка MDM2 с образованием петли отрицательной обратной связи. Сущность регуляции p53 посредством MDM2 и MDMX продемонстрирована на мышинных моделях с генным нокаутом. Мыши с нокаутом MDM2^{-/-} характеризуются эмбриональной летальностью примерно во время имплантации. Летальность восстановлена двойным нокаутом MDM2 и TP53. MDM2 ингибирует активность p53 напрямую, связываясь с доменом трансактивации p53 и блокируя его, а также способствуя протеосомному разрушению комплекса за счет своей активности E3-убиквитинлигазы. Кроме того, MDM2 является транскрипционной мишенью p53, и, таким образом, два белка связаны в ауторегуляторной петле обратной связи, что гарантирует временную активацию p53.

SKP2 представляет собой белок F-box, необходимый для распознавания субстрата убиквитин-лигазного комплекса SCF^{Skp2}. Он нацелен на разложение нескольких белков, включая p21, p27 и p300. p300 способен ацетилировать и активировать p53. Повышающая регуляция SKP2 была идентифицирована в ряде линий клеток солидного рака, включая рак толстой кишки (HCT116), остеосаркому (U2OS) и хориокарциному (Kitagawa et al. 2008. Cell, 29, pp. 216-231). Сверхэкспрессия SKP2 при раке связана с разложением p300 и утратой активации p53. Также было показано, что изоформа SKP2, Skp2B, предотвращает активацию p53, нацеливая прохибитин на разложение при раке молочной железы (Chander et al. 2009. EMBO reports, 11(3), pp. 220-225). Таким образом, эти исследования выявили высокую экспрессию SKP2 в солидных опухолях.

Хотя MDMX демонстрирует высокую гомологию аминокислотной последовательности и структуры с MDM2, ни один белок не может заменить утрату другого белка; MDMX-нулевые мыши умирают внутриутробно, тогда как нокаут MDM2 является летальным в течение раннего эмбриогенеза, однако оба варианта можно исправить путем нокаута p53, демонстрируя p53-зависимость летальности. MDMX также связывает p53 и ингибирует p53-зависимую транскрипцию, но в отличие от MDM2 он не активируется транскрипцией p53 и поэтому не образует такую же ауторегуляторную петлю. Кроме того, MDMX не

обладает ни активностью убиквитинлигазы E3, ни сигналом ядерной локализации, однако считается, что он способствует деградации p53, образуя гетеродимеры с MDM2 и способствуя стабилизации MDM2.

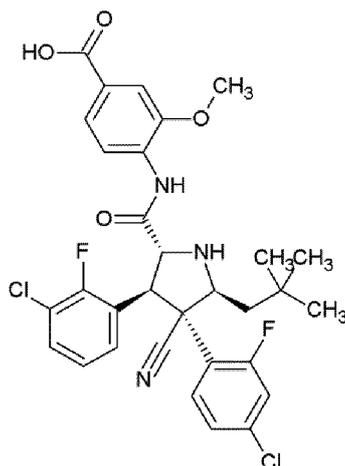
5 Терапевтическое обоснование ингибирования MDM2-p53 заключается в том, что мощный антагонист белок-белкового взаимодействия освобождает p53 от репрессивного контроля MDM2 и активирует опосредованную p53 гибель клеток в опухоли. Предполагается, что в опухолях селективность возникает в результате восприятия p53 предрасполагающих сигналов повреждения ДНК или онкогенной активации, которые ранее были заблокированы действием MDM2 на
10 нормальных или сверхэкспрессируемых уровнях. Ожидается, что в нормальных клетках активация p53 приведет к активации неапоптотических путей и, во всяком случае, к защитной реакции ингибирования роста. Кроме того, благодаря негенотоксичному механизму действия антагонистов MDM2-p53, они подходят для лечения рака, в частности, у детей. MDM4 также является важным
15 негативным регулятором p53.

 Около 50% раковых заболеваний содержат клетки, в которых *TP53*, ген, кодирующий p53, мутирован, что приводит к утрате функции белка-супрессора опухолей, а иногда даже к версиям белка p53, которые приобретают новые онкогенные функции.

20 Опухоли с высоким уровнем амплификации MDM2 включают липосаркому (88%), саркому мягких тканей (20%), остеосаркому (16%), рак пищевода (13%) и некоторые злокачественные новообразования у детей, включая В-клеточные злокачественные новообразования.

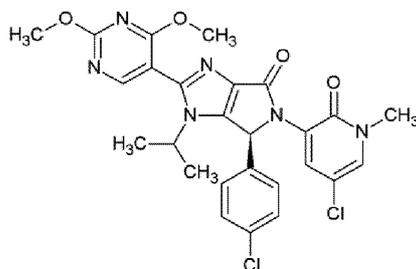
Примеры антагонистов MDM2

25 Сообщалось, что идасанутлин (RG-7388), низкомолекулярный антагонист MDM2 от Roche, проходит клинические испытания фазы I-III в отношении лечения солидных и гематологических опухолей, ОМЛ, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, эссенциальной тромбоцитемии, истинной полицитемии и фолликулярной лимфомы. Идасанутлин (RG-7388)
30 имеет следующую структуру:



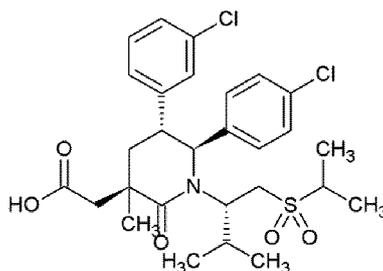
Идасанутлин (RG-7388) является коммерчески доступным или может быть получен, например, описанными в заявке на патент PCT WO 2014/128094, или аналогичными способами.

- 5 HDM-201 (NVP-HDM201, Сиремадлин) разрабатывается компанией Novartis в рамках клинических испытаний фазы I/II характеризующихся TP53 дикого типа прогрессирующих/метастатических солидных опухолей, гематологических опухолей, включая ОЛЛ, ОМЛ, РС, метастатическую увеальную меланому, дедифференцированную липосаркому и
- 10 высокодифференцированную липосаркому. Антагонист HDM-201 (NVP-HDM201) имеет следующую химическую структуру:



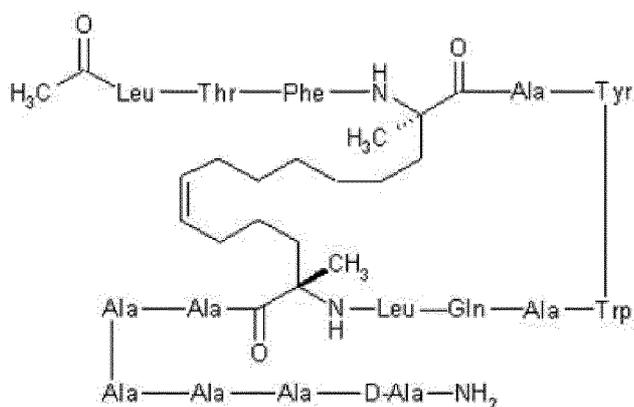
- HDM-201 (NVP-HDM201) является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2013/111105,
- 15 или аналогичными способами.

- KRT-232 (AMG-232, навтемадлин), низкомолекулярный антагонист MDM2, разрабатывается NCI/Amgen/GSK в клинических испытаниях фазы II/II солидных опухолей, сарком мягких тканей, таких как липосаркома, рецидивирующая или впервые диагностированная глиобластома,
- 20 метастатический рак молочной железы, рефрактерная ММ, метастатическая кожная меланома и рецидивирующий/рефрактерный ОМЛ. KRT-232 (AMG-232) имеет следующую химическую структуру:



KRT-232 (AMG-232, навтемадлин) является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2011/153509, или аналогичными способами.

- 5 ALRN-6924 (SP-315), двойной пептидный антагонист MDM2 и MDM4, разрабатывается компаниями Aileron Therapeutics и Roche в рамках клинических испытаний фазы II в отношении внутривенного лечения солидных опухолей, мелкоклеточного рака легкого и опухолей у детей, включая лимфомы, острый миелоидный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, ретинобластому,
- 10 гепатобластому, опухоль головного мозга, липосаркому и метастатический рак молочной железы. ALRN-6924 (SP-315) представляет собой синтетический пептид, разработанный на основе технологии сшивания пептидов, которая фиксирует пептиды в определенной складчатой форме (биологически активной форме), устойчивой к протеазам. ALRN-6924 (SP-315) имеет следующую
- 15 структуру:

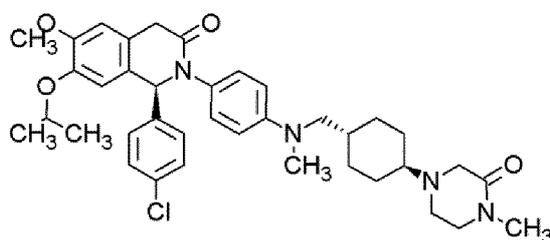


ALRN-6924

ALRN-6924 (SP-315) является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2017205786, или аналогичными способами.

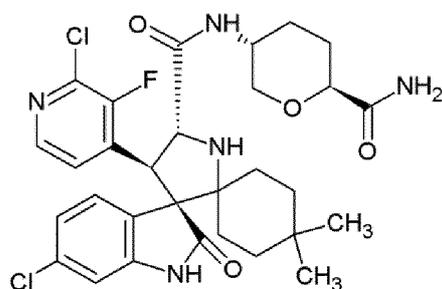
- 20 CGM-097 (NVP-CGM-097), низкомолекулярный антагонист MDM2, разрабатывается компанией Novartis в рамках клинических испытаний фазы I в

отношении лечения солидных опухолей на поздних стадиях и острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ). CGM-097 (NVP-CGM-097) имеет следующую химическую структуру:



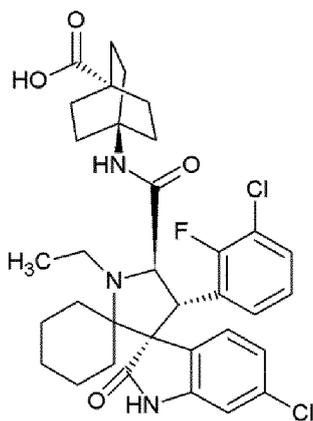
- 5 CGM-097 (NVP-CGM-097) является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2011076786, или аналогичными способами.

- Миладеметана тозилат (DS-3032 или DS-3032b), лицензированный Rain Therapeutics и переименованный под исследовательским кодом RAIN-32, низкомолекулярный антагонист MDM2, разрабатывается компанией Daiichi Sankyo в рамках клинических испытаний фазы I в отношении лечения солидных опухолей на поздних стадиях, лимфом, меланомы, рефрактерного или рецидивирующего ОМЛ, ОЛЛ, множественной миеломы, ХМЛ в бластной фазе или МДС высокого риска и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы.
- 15 Миладеметана тозилат (DS-3032) имеет следующую химическую структуру:



Миладеметана тозилат (DS-3032) является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2015/033974, или аналогичными способами.

- 20 APG-115 (AAA-115; NCT-02935907, альризомадлин), низкомолекулярный антагонист MDM2, разрабатывается компанией Ascentage Pharma в рамках клинических испытаний фазы I в отношении лечения солидных опухолей и лимфом, ОМЛ, аденоидно-кистозной карциномы (АКК). APG-115 (AAA-115; NCT-02935907) имеет следующую химическую структуру:

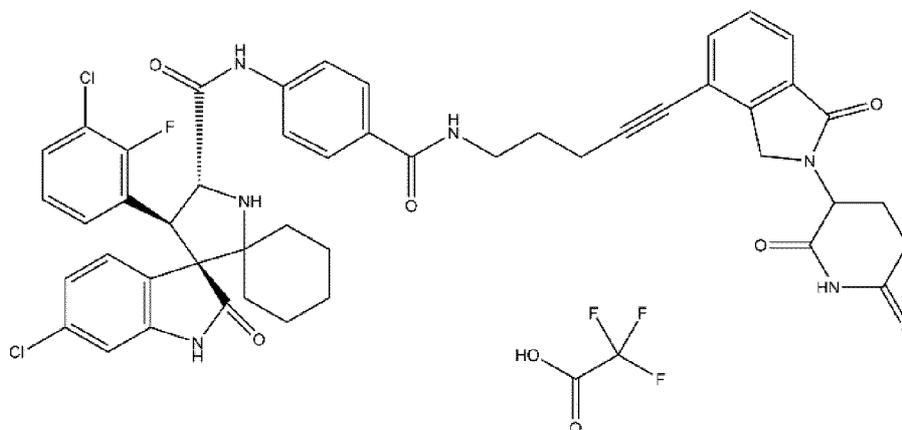


APG-115 (AAA-115; NCT-02935907) является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2015/161032, или аналогичными способами.

- 5 VI-907828, антагонист MDM2, разрабатывается VI в рамках клинических испытаний фазы I для лечения ГБМ, метастатической опухоли головного мозга, НМРЛ, саркомы мягких тканей и переходно-клеточной карциномы (уротелиально-клеточной карциномы).

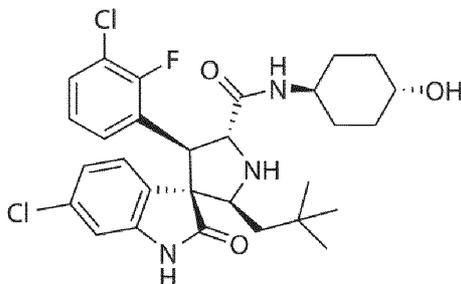
VI-907828 является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2015/161032, или аналогичными способами.

Мичиганский университет разрабатывает LE-004, PROTAC MI-1061 и конъюгат талидомида, который показал, что он эффективно ингибирует рост в моделях человеческого лейкоза у мышей, вызывая деградацию MDM2. Его структура представлена ниже и может быть получена, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2017/176957 или WO 2017/176958, или аналогичными способами. LE-004 имеет следующую химическую структуру:



MI-773 (SAR405838) является высокоэффективным и селективным ингибитором MDM2, связывается с MDM2 с высокой специфичностью по

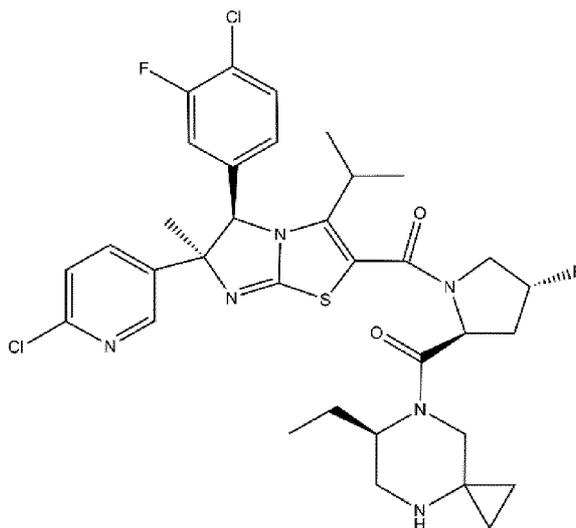
сравнению с другими белками и эффективно ингибирует рост клеток в линиях раковых клеток. SAR405838 эффективно индуцирует апоптоз и эффективно ингибирует рост клеток, а также индуцирует дозозависимый апоптоз и изучается в клинических испытаниях. Структура представляет собой:



5

SAR405838 может быть получен, например, как описано в WO-A-2011/060049.

DS-5272 является антагонистом MDM2 и разрабатывается Daiichi Sankyo для перорального введения. Структура представляет собой:



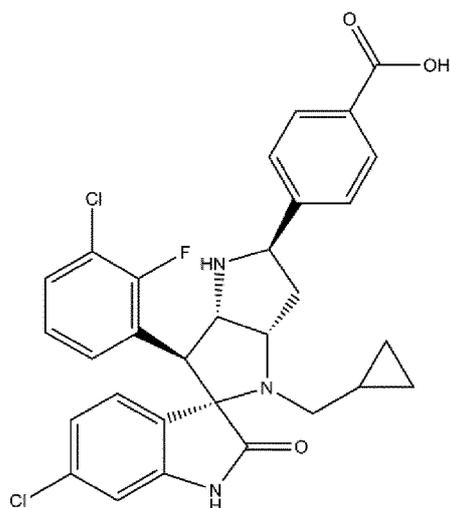
10

DS-5272 может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2015/033974, или аналогичными способами.

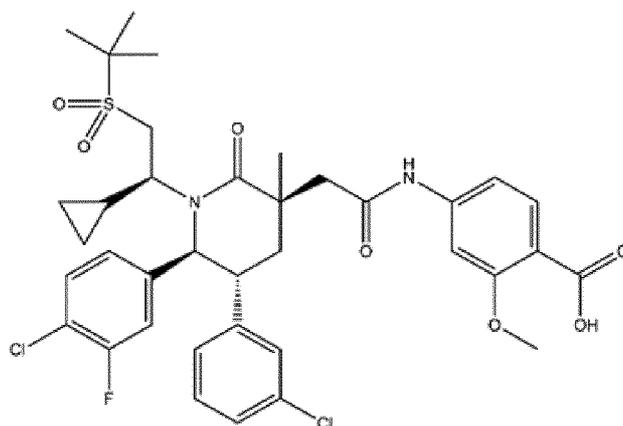
SJ-0211 является антагонистом MDM2 и разрабатывается Университетом Теннесси, Университетом Кентукки и Детской исследовательской больницей Сент-Джуд для ретинотерапии. Его структура аналогична нутлину-3.

15

BI-0252 представляет собой антагонист MDM2, разрабатываемый BI для перорального введения. BI-0252 ингибирует взаимодействия MDM2 и p53. Структура представляет собой:

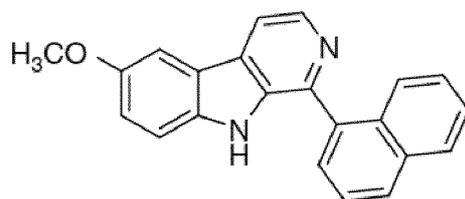


AM-7209 является антагонистом MDM2 и разрабатывается Amgen в качестве резервного препарата для AMG-232. Структура представляет собой:



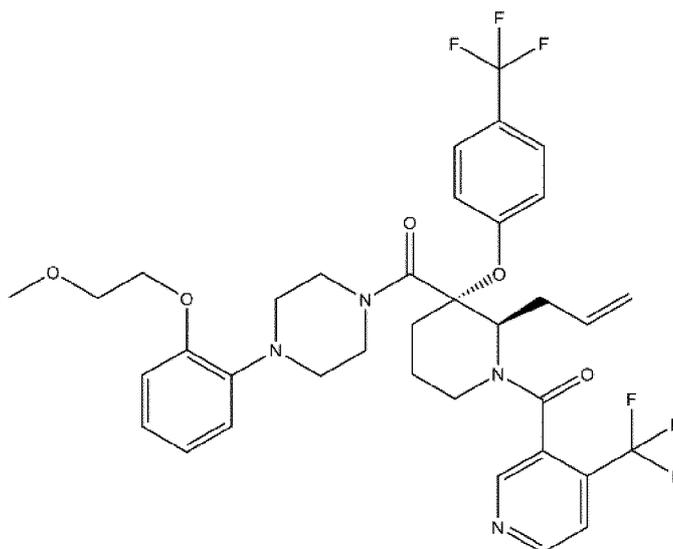
- 5 AM-7209 может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2014/200937, или аналогичными способами.

SP-141 (JарА) является прямым антагонистом MDM2 и разрабатывается Техасским техническим университетом. Структура представляет собой:



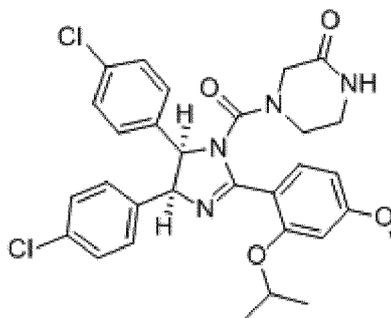
SP-141

- 10 SCH-1450206 представляет собой антагонист MDM2, разрабатываемый Schering-Plough & Merck для перорального введения. Одна типовая структура представляет собой:

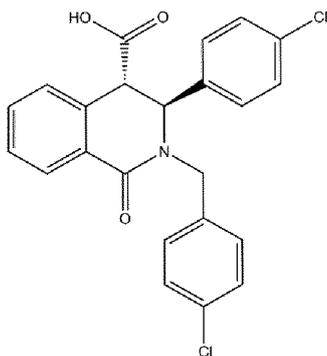


Цитарабин, также известный как МК-8242 и SCH-900242, представляет собой антиметаболитный аналог цитидина с модифицированным сахарным фрагментом (арабиноза вместо рибозы). Перорально биодоступный ингибитор гомолога double minute 2 человека (HDM2) с потенциальной противоопухолевой активностью, при пероральном введении ингибитор HDM2 МК-8242 ингибирует связывание белка HDM2 с доменом активации транскрипции белка-супрессора опухоли p53. Путем предотвращения этого взаимодействия HDM2-p53, можно ингибировать деградацию p53, что может привести к восстановлению сигнализации p53. Это индуцирует p53-опосредованный апоптоз опухолевых клеток.

Нутлин-3а является антагонистом или ингибитором MDM2 (человеческий гомолог double minute 2 мыши), который нарушает его взаимодействие с p53, приводя к стабилизации и активации p53. Структура представляет собой:



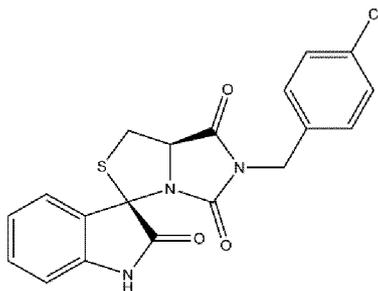
NXN-6 (NXN-7; NXN-552; NXN-561; NXN-11) представляет собой антагонист MDM2, разрабатываемый Nexus, Pricheon и VI для перорального введения. Типовая структура представляет собой:



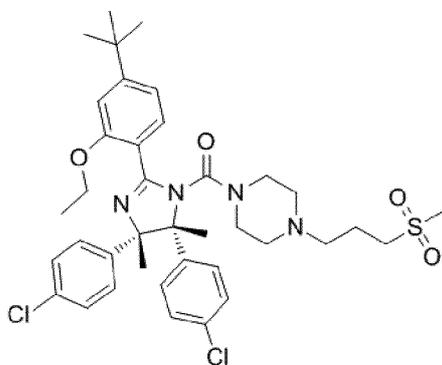
ADO-21 представляет собой антагонист MDM2, разрабатываемый Adamed Group.

5 CTX-50 - CTX-1 представляет собой низкомолекулярный антагонист MDM2, разрабатываемый MiRx Pharmaceuticals, CRC.

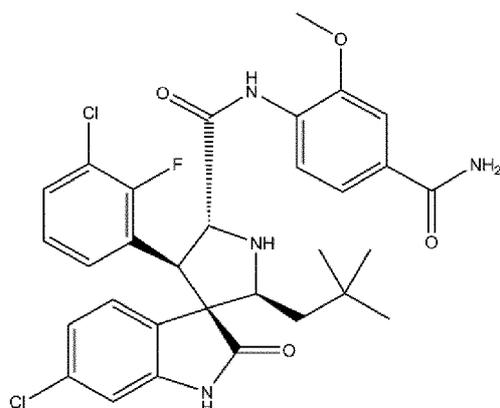
ISA-27 представляет собой низкомолекулярный антагонист MDM2, разрабатываемый Университетом Неаполя и Университетом Салерно. Структура представляет собой:



10 RG-7112 (RO5045337) представляет собой мощный, селективный, первый клинический, перорально активный и проникающий через гематоэнцефалический барьер ингибитор MDM2-p53. Структура представляет собой:

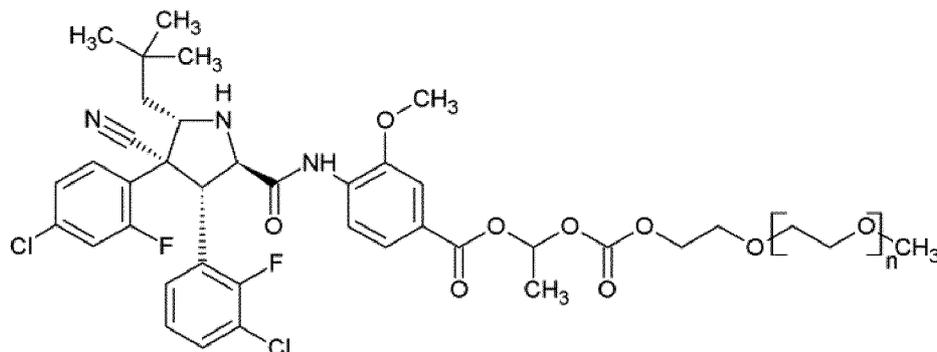


RO-8994 представляет собой низкомолекулярный антагонист MDM2, разрабатываемый Roche. Было показано, что RO-8994 ингибирует рост опухоли, вызывая митохондриальные эффекты p53. Структура представляет собой:



5 RO-8994 является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2011/067185, или аналогичными способами.

RO-6839921 (PG-7775) представляет собой низкомолекулярный антагонист MDM2, разрабатываемый Roche для в/в введения. Структура представляет собой:

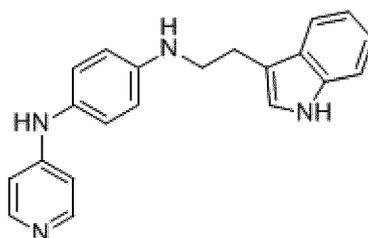


10

RO-6839921 (RG-7775) может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2014/206866, или аналогичными способами.

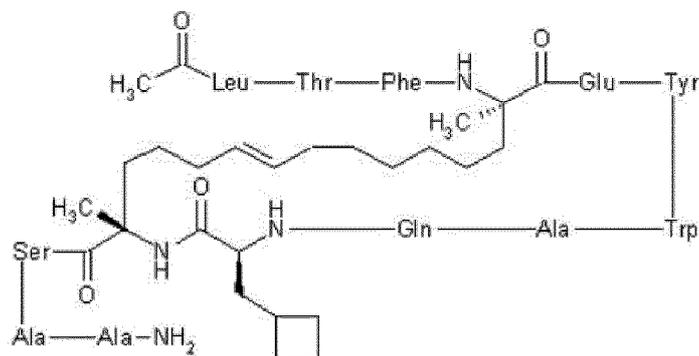
JNJ 26854165 (сердеметан) имеет структуру, приведенную ниже, как и пероральный ингибитор (или антагонист) HDM2, который показал сильную активность против клеток множественной миеломы (MM) *in vitro* и *ex vivo*; потенциалный агент для восстановления функции p53 и потенциалного влияния на другие HDM2-зависимые пути.

15



ATSP-7041 (SP-154), сшитый синтетический пептидный двойной антагонист MDM2 и MDM4, разрабатывается Aileron Therapeutics и Roche и находится на стадии доклинической разработки. ATSP-7041 (SP-154) имеет

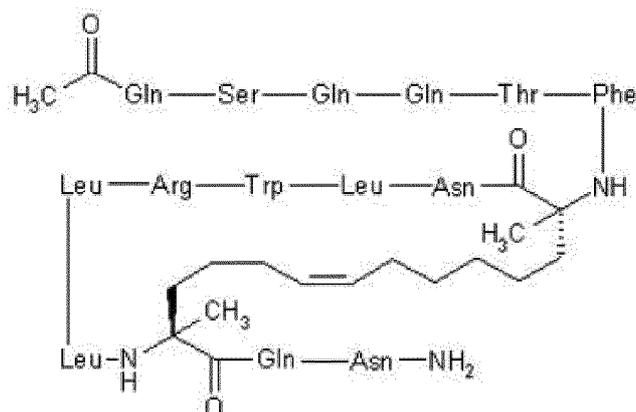
5 следующую структуру:



ATSP-7041

SAH-p53-8 представляет собой сшитый синтетический пептидный антагонист MDM4, Hdm2 и каспазы 3, который разрабатывается Гарвардским колледжем и Dana-Faber и находится на стадии доклинической разработки. SAH-

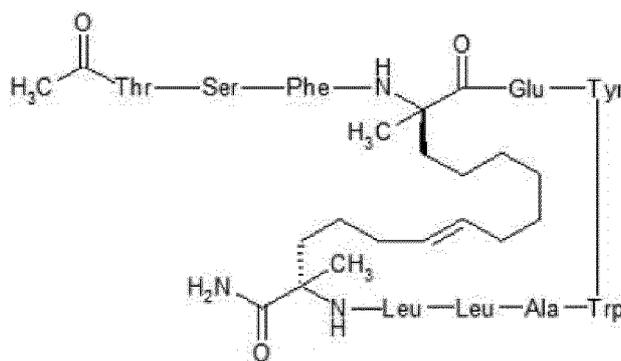
10 p53-8 имеет следующую структуру:



SAH-p53-8

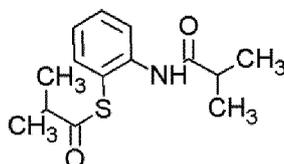
PM-2 (sMTide-02) представляет собой связанный синтетический пептидный антагонист MDM4, Hdm2 и каспазы 3, который разрабатывается Гарвардским колледжем и Dana-Faber и находится на стадии доклинической разработки. PM-2

15 (sMTide-02) имеет следующую структуру:



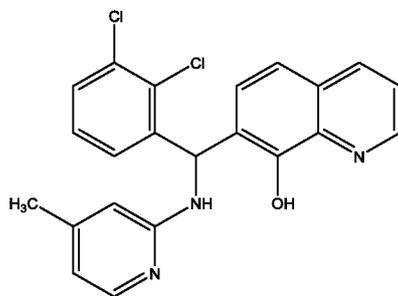
PM-2

К-178 представляет собой низкомолекулярный антагонист MDM4, который разрабатывается Медицинским университетом Кансай и находится на стадии доклинической разработки. К-178 имеет следующую химическую структуру:

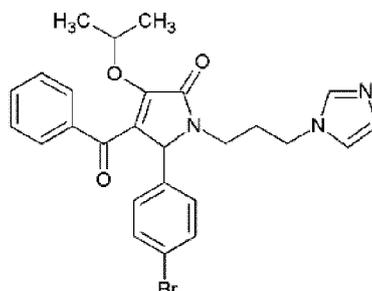


5

MMRi-64 представляет собой низкомолекулярный антагонист MDM2 и MDM4, который разрабатывается Институтом рака Розуэлл-Парк и находится в фазе открытия. MMRi-64 имеет следующую химическую структуру:



10 Низкомолекулярные антагонисты MDM2 и MDM4 также разрабатываются Ягеллонским университетом и Вторым военно-медицинским университетом. Один из примеров имеет следующую химическую структуру:

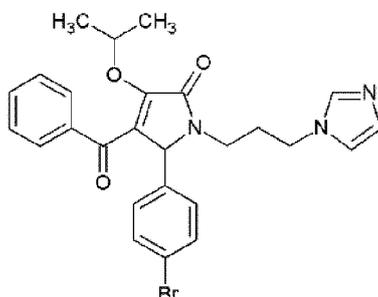


15 Низкомолекулярные антагонисты MDM2 и MDM4 разрабатываются Emory и Государственным университетом Джорджии и находятся на стадии

доклинических исследований в отношении лечения острого лимфобластного лейкоза.

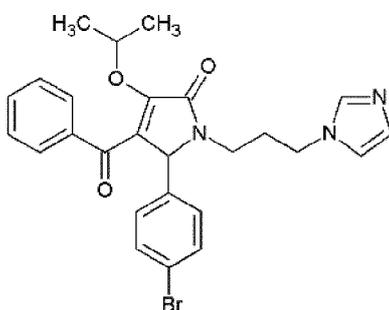
Низкомолекулярные антагонисты MDM2 и MDM4 разрабатываются Adamed и находятся в фазе открытия.

5 В одном варианте осуществления изобретения антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из идасанутлина, HDM-201, KRT-232 (AMG-232), ALRN-6924, CGM-097, миладеметана тозилата (DS-3032b), APG-115, BI-907828, LE-004, DS-5272, SJ-0211, APG-155, RG-7112, RG7388, SAR405939, цитарабина (также известного как МК-8242 и SCH-900242), BI-0252, AM-7209, SP-141, SCH-10
10 1450206, NXN-6, ADO-21, CTX-50 - CTX-1, ISA-27, RO-8994, RO-6839921, ATSP-7041, SAH-p53-8, PM-2, K-178, MMRi-64 и



или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

15 В одном варианте осуществления изобретения антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из идасанутлина, HDM-201, KRT-232 (AMG-232), ALRN-6924, CGM-097, миладеметана тозилата (DS-3032b), APG-115, BI-907828, LE-004, DS-5272, SJ-0211, BI-0252, AM-7209, SP-141, SCH-1450206, NXN-6, ADO-21, CTX-50 - CTX-1, ISA-27, RO-8994, RO-6839921, ATSP-7041, SAH-p53-8, PM-2, K-178, MMRi-64 и



20

или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из идасанутлина (RG-7388), HDM-201, KRT-232 (AMG-232),

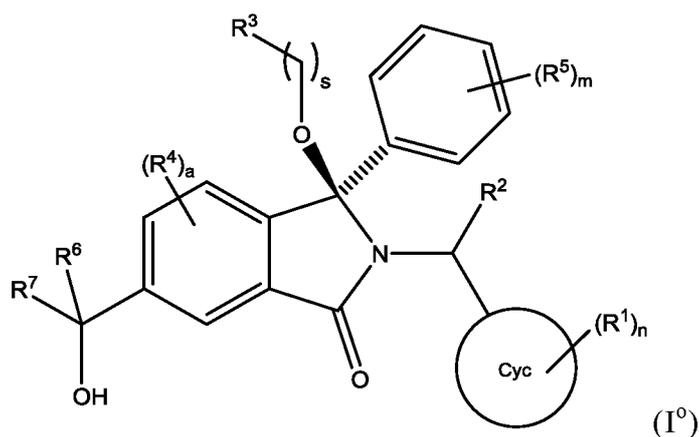
ALRN-6924, MI-773 (SAR405838), миладеметана (DS-3032b), APG-115, BI-907828 или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

В одном варианте осуществления изобретения антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из идасанутлина (RG-7388), HDM-201, KRT-232 (AMG-232),
 5 ALRN-6924, MI-773 (SAR405838), миладеметана (DS-3032b), APG-115, BI-907828 или соединения формулы I⁰, или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

Соединения формулы I⁰

Конкретными антагонистами MDM2 являются изоиндолиновые соединения,
 10 которые описаны в наших более ранних заявках на международный патент PCT/GB2016/053042 и PCT/GB2016/053041, поданных 29 сентября 2016 г., испрашивающих приоритет по патентным заявкам Великобритании 1517216.6 и 1517217.4, поданным 29 сентября 2015 г., содержание всех из которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В частности,
 15 соединение (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановая кислота («соединение 1») описано в нашей более ранней заявке на международный патент PCT/GB2016/053042.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой
 20 соединение формулы I⁰:



или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, где:

Cyc представляет собой фенил или гетероциклическую группу Het, которая представляет собой пиридинил, пиримидинил, пиазинил или пиридазинил, или
 25 их N-оксид;

R^1 независимо выбран из гидрокси, галогена, нитро, нитрила, C_{1-4} алкила, галоген C_{1-4} алкила, гидроксиг C_{1-4} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{1-4} алкокси, галоген C_{1-4} алкокси, C_{2-4} алкинила,

5 $-O_{0,1}-(CR^xR^y)_v-CO_2H$, $-(CR^xR^y)_v-CO_2C_{1-4}$ алкил, $-(CR^xR^y)_v-CON(C_{1-4}$ алкил) $_2$, $-P(=O)(R^x)_2$, $-S(O)_d-R^x$, $-S(O)_d$ -гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами и $-S(O)_d-N(R^8)_2$, при этом, когда су s представляет собой Het, R^1 присоединен к атому углерода;

R^2 выбран из водорода, C_{1-4} алкила, C_{2-6} алкенила, гидроксиг C_{1-4} алкила, $-(CR^xR^y)_u-CO_2H$, $-(CR^xR^y)_u-CO_2C_{1-4}$ алкила и $-(CR^xR^y)_u-CONR^xR^y$;

10 s выбрано из 0 и 1;

R^3 представляет собой водород или $-(A)_t-(CR^xR^y)_q-X$;

t выбрано из 0 и 1;

q выбрано из 0, 1 и 2;

15 при этом, когда R^3 представляет собой $-(A)_t-(CR^xR^y)_q-X$, (i) по меньшей мере одно из s , t и q отлично от 0, и (ii) когда t равно 0, s равно 1, а q отлично от 0;

A представляет собой C_{3-6} циклоалкильную группу или гетероциклическую группу с 3–6 кольцевыми членами, причем гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S, и их окисленных форм;

X выбран из водорода, галогена, $-CN$, $-OR^9$, $-(CH_2)_v-CO_2H$, $-(CH_2)_v-CO_2C_{1-4}$ алкила, $-S(O)_d-R^x$, $-C(=O)-C_{1-4}$ алкила, $-S(O)_d-N(H)_e(C_{1-4}$ алкил) $_{2-e}$, $-NR^xR^y$, $-NHSO_2R^x$, $-NR^xCOR^y$ и $-C(=O)NR^xR^y$;

25 R^4 и R^5 независимо выбраны из галогена, нитрила, C_{1-4} алкила, галоген C_{1-4} алкила, C_{1-4} алкокси и галоген C_{1-4} алкокси;

R^6 и R^7 независимо выбраны из водорода, C_{1-6} алкила, галоген C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, C_{2-6} алкинила, гидрокси, гидроксиг C_{1-6} алкила, $-COOC_{1-6}$ алкила, $-(CH_2)_j-O-C_{1-6}$ алкила, $-(CH_2)_j-O-(гидроксигC_{1-6}$ алкила), $-C_{1-6}$ алкила- NR^xR^y , $-(CR^xR^y)_p-CONR^xR^y$, $-(CR^xR^y)_p-NR^xCOR^y$, $-(CR^xR^y)_p-O-CH_2-CONR^xR^y$, гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, $-CH_2$ -гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, $-CH_2-O$ -гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, $-CH_2-NH$ -гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, $-CH_2-N(C_{1-6}$ алкил)-гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, $-C(=O)NH$ -гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, C_{3-8} циклоалкила, $-CH_2-$

С₃₋₈циклоалкила, -СН₂-О-С₃₋₈циклоалкила и С₃₋₈циклоалкенила, причем указанные циклоалкил, циклоалкенил или гетероциклическая группа могут быть необязательно замещены группами R^z и при этом в каждом случае гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S и их окисленных форм;

или группы R⁶ и R⁷ вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, могут соединяться с образованием С₃₋₆циклоалкильной или гетероциклической группы с 3--6 кольцевыми членами, причем гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S и их окисленных форм, при этом указанные С₃₋₆циклоалкильные и гетероциклические группы могут быть необязательно замещены одной или более группами R^z;

R⁸ и R⁹ независимо выбраны из водорода, С₁₋₆алкила, галогенС₁₋₆алкила, гидроксиС₁₋₆алкила,

-(СН₂)_k-О-С₁₋₆алкила, -(СН₂)_k-О-(гидроксиС₁₋₆алкил), гидроксиС₁₋₆алкокси, -(СН₂)_k-СО₂С₁₋₆алкила, -(СН₂)_k-СО₂Н, -С₁₋₆ алкила-N(Н)_e(С₁₋₄алкил)_{2-e}, -(СН₂)_j-С₃₋₈циклоалкила и -(СН₂)_j-С₃₋₈циклоалкенила;

R^x и R^y независимо выбраны из водорода, галогена, нитро, нитрила, С₁₋₆алкила, галогенС₁₋₆алкила, С₂₋₆алкенила, С₂₋₆алкинила, гидрокси, гидроксиС₁₋₆алкила, С₁₋₆алкокси, -(СН₂)_k-О-С₁₋₆алкила, гидроксиС₁₋₆алкокси, -СООС₁₋₆алкила, -N(Н)_e(С₁₋₄алкила)_{2-e}, -С₁₋₆алкила-N(Н)_e(С₁₋₄алкил)_{2-e}, -(СН₂)_k-C(=O)N(Н)_e(С₁₋₄алкил)_{2-e}, С₃₋₈циклоалкила и С₃₋₈циклоалкенила;

или группы R^x и R^y вместе с атомом углерода или азота, к которому они присоединены, могут соединяться с образованием С₃₋₆циклоалкильной или насыщенной гетероциклической группы с 3--6 кольцевыми членами, которая может быть необязательно конденсирована с ароматической гетероциклической группой с 3--5 кольцевыми членами;

или когда на атоме углерода группы R^x и R^y могут соединяться вместе с образованием группы =СН₂;

R^z независимо выбран из галогена, нитро, нитрила, С₁₋₆алкила, галогенС₁₋₆алкила, С₂₋₆алкенила, С₂₋₆алкинила, =О, гидрокси, гидроксиС₁₋₆алкила, С₁₋₆алкокси, -(СН₂)_k-О-С₁₋₆алкила, гидроксиС₁₋₆алкокси, -C(=O)С₁₋₆алкила, -C(=O)С₁₋₆алкил-ОН, -C(=O)С₁₋₆алкил-N(Н)_e(С₁₋₄алкил)_{2-e}, -C(=O)N(Н)_e(С₁₋₄алкил)_{2-e}, -(СН₂)_r-СО₂С₁₋₆алкила, -(СН₂)_r-СО₂Н, -N(Н)_e(С₁₋₄алкил)_{2-e}, -С₁₋₆алкил-

$N(H)_e(C_{1-4}\text{алкил})_{2-e}$, гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, замещенной $-C(=O)C_{1-4}\text{алкилом}$, гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, замещенной $-C(=O)OC_{1-4}\text{алкилом}$, гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, замещенной $-C(=O)N(H)_e(C_{1-4}\text{алкил})_{2-e}$, $-C(=O)$ гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, C_{3-8} циклоалкила и C_{3-8} циклоалкенила, причем, если R^7 представляет собой пиридин, R^z отличается от $-NH_2$;

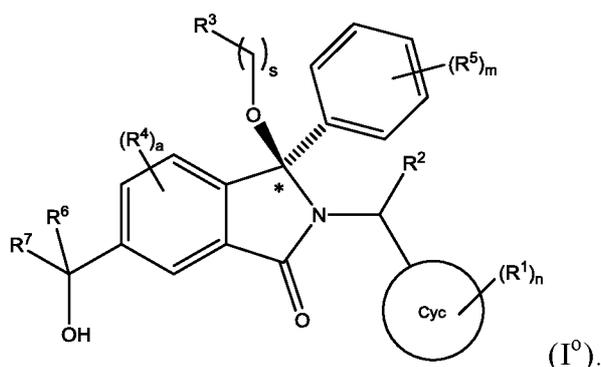
a, j, d, e, n, г и р независимо выбраны из 0, 1 и 2;

k и m независимо выбраны из 1 и 2;

10 u выбрано из 0, 1, 2 и 3; и

v выбрано из 0 и 1

Соединения формулы (I⁰) имеют хиральный центр, отмеченный ниже знаком «*»:



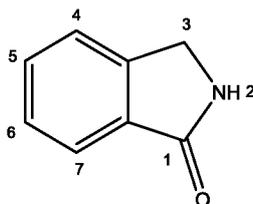
15 Соединения формулы (I⁰) содержат стереоцентр в указанной позиции (обозначаемой в данном документе как (3)) и являются хиральными нерацемическими. Соединения формулы (I⁰) имеют стереохимию, проиллюстрированную заштрихованными и сплошными клиновидными связями, и этот стереоизомер преобладает.

20 Как правило, по меньшей мере 55% (например, по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%) соединения формулы (I⁰) присутствует в виде проиллюстрированного стереоизомера. В одном общем варианте осуществления 97% (например, 99%) или более (например, практически все) от общего количества соединения формулы (I⁰) может присутствовать в виде
25 одного стереоизомера.

Соединения могут также содержать один или более дополнительных хиральных центров (например, в группе $-CR^6R^7OH$, и/или в группе R^3 , и/или в группе $-CHR^2$).

Обычно соединение формулы (I⁰) характеризуется энантиомерным избытком по меньшей мере 10% (например, по меньшей мере 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90% или 95%). В одном общем варианте осуществления соединение формулы (I⁰) характеризуется энантиомерным избытком 97% (например, 99%) или более.

В целях этого раздела изоиндолин-1-оновое кольцо пронумеровано следующим образом:



Соединения названы в соответствии с протоколами, используемыми программными пакетами химического наименования.

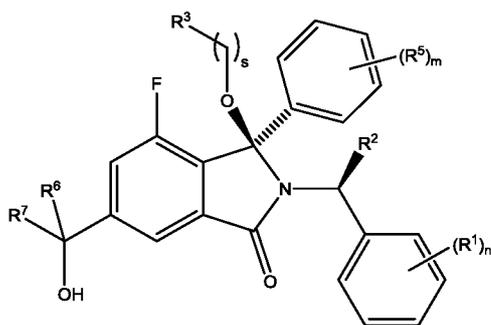
Соединения формулы (I⁰), где Суs представляет собой фенил

Соединения формулы (I⁰), где Суs представляет собой фенил, описаны в нашей более ранней заявке на международный патент PCT/GB2016/053042, которая была опубликована как WO 2017/055860 06 апреля 2017 г. Приведена перекрестная ссылка на соединения, подформулы и заместители, описанные в WO 2017/055860 (например, формулы (I), I(e), I(f), I(g), I(g'), I(h), I(i), I(j), I(k), I(L), I(m), I(m'), I(n), I(o), I(o'), I(o''), I(p), I(p'), I(q), I(q'), I(q''), I(q'''), I(q'''), I(r), I(s), I(t), I(u), I(v), I(v'), I(w), I(x), I(x'), I(y), (II), (IIa), (IIb), (IIIa), (IIIb), (IVa), (IVb), (V), (VI), (Via), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIId'), (VIIe), (VIIe'), (a), (b), (ba), (bb), (bc) или (c)). Соответственно, благодаря этой перекрестной ссылке соединения, подформулы и заместители WO 2017/055860 прямым и однозначным образом раскрыты в настоящей заявке.

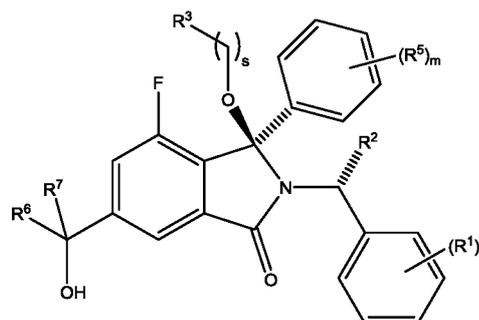
Конкретные подформулы, варианты осуществления и соединения формулы (I⁰), где Суs представляет собой фенил, включают следующие:

В одном варианте осуществления R¹ представляет собой хлор или нитрил, в частности хлор.

Когда R² отличен от водорода, соединение формулы (I⁰) может существовать как минимум в виде двух диастереоизомеров:



Диастереоизомер 1А

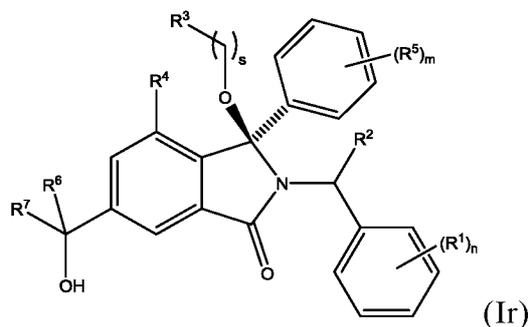


Диастереоизомер 1В

Во избежание сомнений, общая формула (I^0) и все подформулы охватывают как отдельные диастереоизомеры, так и смеси диастереоизомеров, которые соотносятся как эпимеры в группе $-CHR^2$. В одном варианте осуществления соединение формулы (I^0) представляет собой диастереоизомер 1А или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления соединение формулы (I^0) представляет собой диастереоизомер 1В или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль.

одном варианте осуществления R^2 выбран из водорода и $-(CR^xR^y)_n-CO_2H$ (например, $-COOH$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2-CO_2H$, $-(CH(CH_3))-CO_2H$ and $-(C(CH_3)_2)-CO_2H$),

В одном варианте осуществления a равно 1, заместитель R^4 находится в позиции 4 изоиндолин-1-она, а соединение формулы (I^0) представляет собой соединение формулы (Ir) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



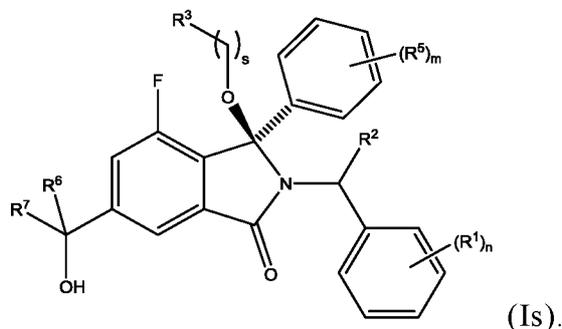
(Ir)

R^4 независимо выбран из галогена, нитрила, C_{1-4} алкила, галоген C_{1-4} алкила, C_{1-4} алкокси и галоген C_{1-4} алкокси.

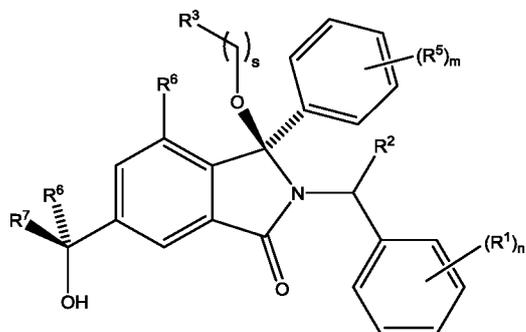
В одном варианте осуществления R^4 представляет собой галоген. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой фтор или хлор. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой фтор.

В одном варианте осуществления а равно 1, заместитель R^4 находится в позиции 4 изоиндолин-1-она, R^4 представляет собой F, а соединение формулы (I^0) представляет собой соединение формулы (Is) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

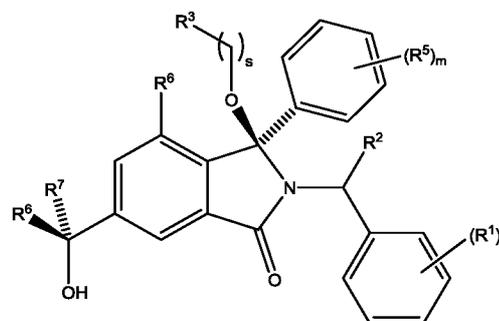
5



Когда R^6 и R^7 являются разными, соединение формулы (I^0) может существовать как минимум в виде двух диастереоизомеров:



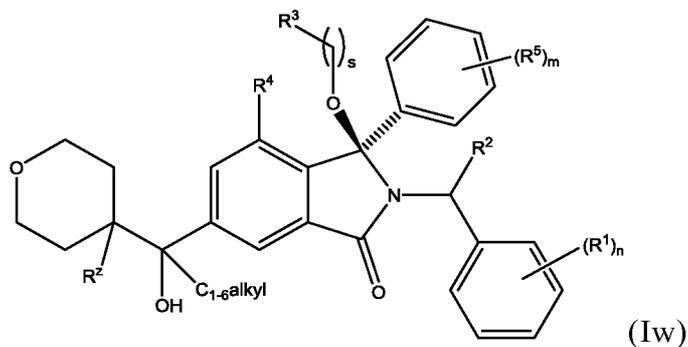
Диастереоизомер 2А



Диастереоизомер 2В

10 Во избежание сомнений, общая формула (I^0) и все подформулы охватывают как отдельные диастереоизомеры, так и смеси диастереоизомеров, которые соотносятся как эпимеры в группе $-CR^6R^7OH$.

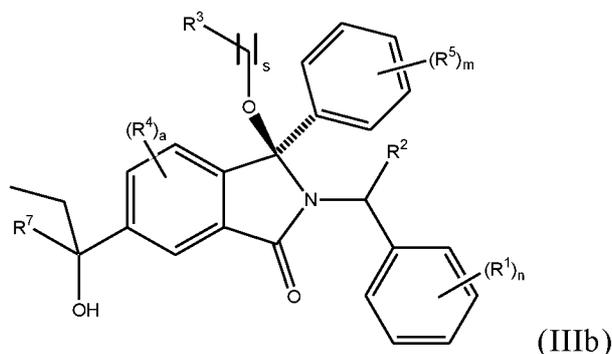
15 В одном варианте осуществления R^6 представляет собой C_{1-6} алкил (такой как метил или этил, например, метил), R^7 представляет собой оксанил, а соединение формулы (I^0) представляет собой соединение формулы (Iw):



В одном варианте осуществления формулы (Iw) R_z представляет собой водород или фтор.

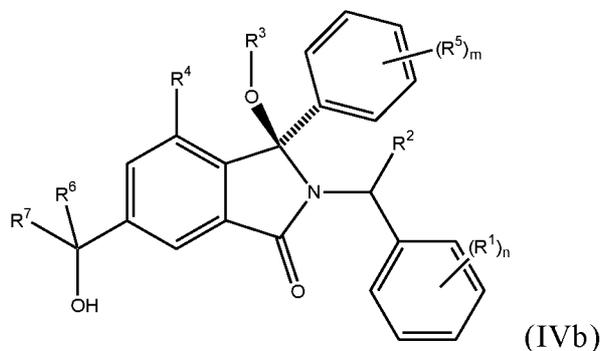
Подформулы

В одном варианте осуществления R^6 представляет собой метил или этил, а соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (IIIb) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



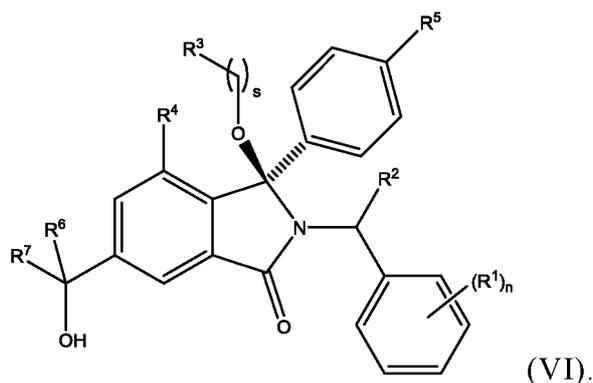
где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^7 , а, m и s имеют значения, определенные в данном документе.

10 В одном варианте осуществления s равно 0, а соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (IVb) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

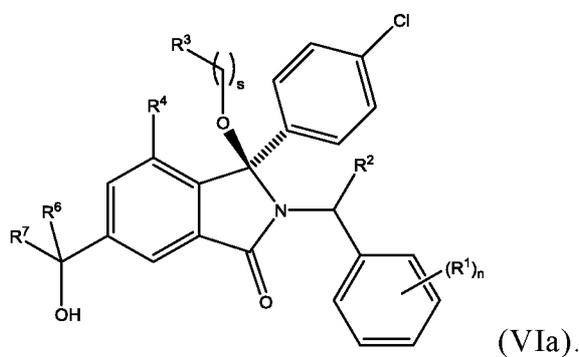


15 где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^7 , а, m и s имеют значения, определенные в данном документе.

В одном варианте осуществления m равно 1, заместитель R^4 находится в позиции 4 фенильной группы, а соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (VI) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

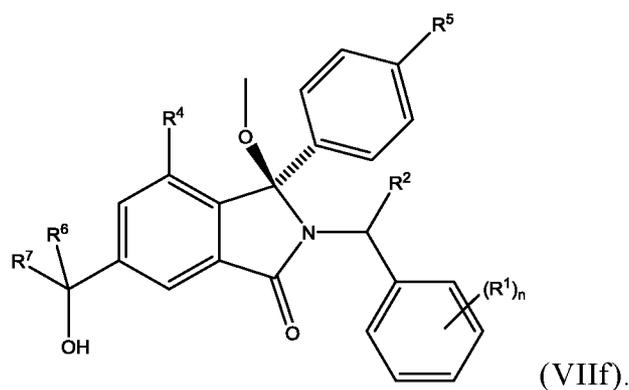


В одном варианте осуществления R^5 представляет собой хлор, а соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (VIa) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



5

В одном варианте осуществления R^3 представляет собой метил, а соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (VIIf) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



10 В одном варианте осуществления формулы (VIIf) R^6 представляет собой этил.

В одном варианте осуществления формулы (VIIf) R^7 выбран из метила, оксанила, пиразолила, имидазолила, пиперидинила и циклогексила, причем указанные циклоалкильные и гетероциклические группы необязательно

замещены одной или более группами R^z (например, метилом, фтором или гидроксигруппой).

В одном варианте осуществления соединения формулы (VIIf) R^7 выбран из оксанила и метила.

5 В одном варианте осуществления соединения формулы (VIIf) R^7 выбран из пиперидинила, необязательно замещенного одной или более группами R^z (например, метилом, фтором или гидроксигруппой).

В другом варианте осуществления подформулы, описанных выше, R^2 выбран из $-(CH(CH_3))-CO_2H$ и $-(C(CH_3)_2)-CO_2H$.

10 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, где:

R^1 представляет собой галоген (например, Cl), нитрил, $O_{0,1}(CR^xR^y)_vCOOH$ (например, $-COOH$, $-CH_2COOH$, $-OCH_2COOH$ или $-C(CH_3)_2COOH$;

15 n равно 1 или 2;

R^2 выбран из водорода и $-(CR^xR^y)_u-CO_2H$ (например, $-COOH$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2-CO_2H$, $-(CH(CH_3))-CO_2H$ и $-(C(CH_3)_2)-CO_2H$).

R^3 представляет собой водород, а s равно 1;

R^4 представляет собой галоген (например, F);

20 R^5 представляет собой галоген (например, Cl);

m равно 1;

R^6 представляет собой водород или C_{1-6} алкил (например, $-CH_3$ или $-CH_2CH_3$);

25 R^7 представляет собой C_{1-4} алкил (например, метил), гидроксигруппированный C_{1-4} алкил (например, гидроксиметил), метоксигруппированный C_{1-4} алкил (например, метоксиметил), гетероциклическую группу с 5 или 6 кольцевыми членами (например, пиперидинил, оксанил, имидазолил или пиразолил));

30 причем указанная гетероциклическая группа с 5 или 6 кольцевыми членами может быть необязательно замещена одной или двумя группами R^z , независимо выбранными из C_{1-4} алкила (например, метила).

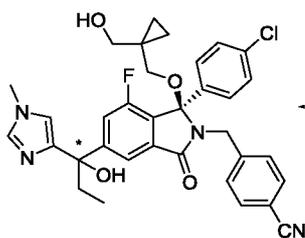
В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰), которое представляет собой один из примеров 1–137 или выбрано из примеров 1–137, или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, описанные в первой группе примеров,

определенных в данном документе, т. е. соединений, в которых сус представляет собой фенил, как также описано в WO 2017/055860).

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰), которое представляет собой один из примеров 1–97 (примеры, где сус представляет собой фенил) или выбрано из примеров 1–97 (примеры, где сус представляет собой фенил), или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, описанные в первой группе примеров, определенных в данном документе, т. е. соединений, в которых сус представляет собой фенил, как также описано в WO 2017/055860).

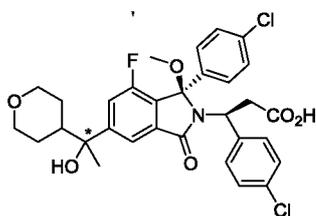
В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰), которое выбрано из следующих соединений, или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

4-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}бензонитрил



например, ; и

(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота



например,

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰), которое выбрано из следующих соединений, или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

4-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}бензонитрил; и

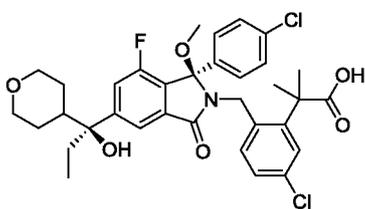
(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой диастереоизомер 2B и выбрано из следующих соединений, или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

4-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}бензонитрил; и

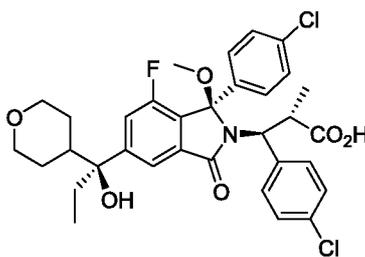
(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота.

В одном варианте осуществления соединение формулы (I^o) представляет собой 2-(5-хлор-2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}фенил)-2-метилпропановую кислоту или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват,



например,

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту («соединение 1») или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват,



например,

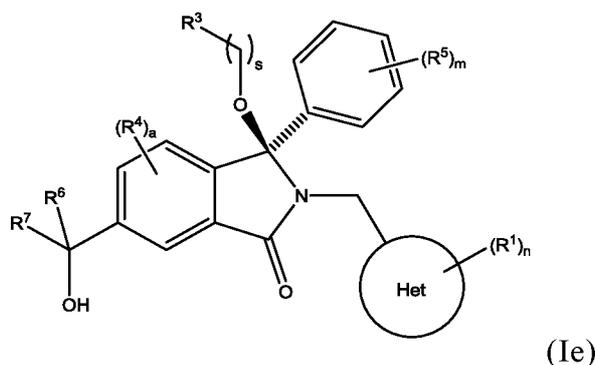
Во избежание сомнений следует понимать, что каждый общий и конкретный вариант осуществления и пример для одного заместителя можно комбинировать с каждым общим и конкретным вариантом осуществления и примером для одного или более, в частности всех, других заместителей, определенных в данном документе, и что все такие варианты охвачены этой заявкой.

Соединения формулы (I⁰), где суs представляет собой гетероциклическую группу

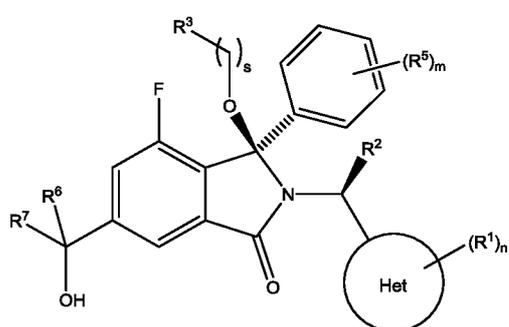
Соединения формулы (I⁰), где суs представляет собой гетероциклическую группу, описаны в нашей более ранней заявке на международный патент PCT/GB2016/053041, которая была опубликована как WO 2017/055859 06 апреля 2017 г. Приведена перекрестная ссылка на соединения, подформулы и заместители, описанные в WO 2017/055859 (например, формулы (I), I(a), I(a'), I(b), I(c), I(d), I(e), I(f), I(g), I(g'), I(h), I(i), I(j), I(k), I(L), I(m), I(m'), I(n), I(o), I(o'), I(o''), I(p), I(p'), I(q), I(q'), I(q''), I(q'''), I(q''''), I(r), I(s), I(t), I(u), I(v), I(v'), I(w), I(x), I(x'), I(y), (II), (IIa), (IIb), (IIIa), (IIIb), (Iva), (IVb), (V), (VI), (VIa), (VII), (VIIa), (VIIb), (VIIc), (VIId), (VIId'), (VIIe), (VIIe'), (a), (b), (ba), (bb), (bc) или (c)), и их примеры, определенные в данном документе. Соответственно, на основании этой перекрестной ссылки соединения, подформулы, и заместители WO 2017/055859 прямым и однозначным образом раскрыты в настоящей заявке.

Конкретные подформулы, варианты осуществления и соединения формулы (I⁰), где суs представляет собой гетероциклическую группу, включают следующие:

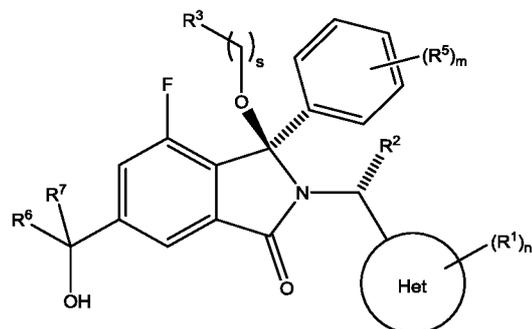
В другом варианте осуществления R² представляет собой водород, а соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (Ie) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



Когда R^2 отличен от водорода, соединение формулы (I⁰) может существовать как минимум в виде двух диастереоизомеров:



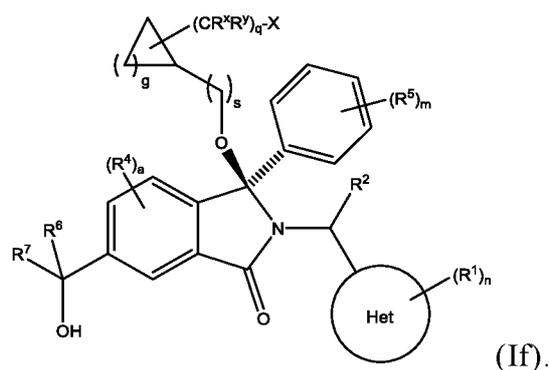
Диастереоизомер 1А



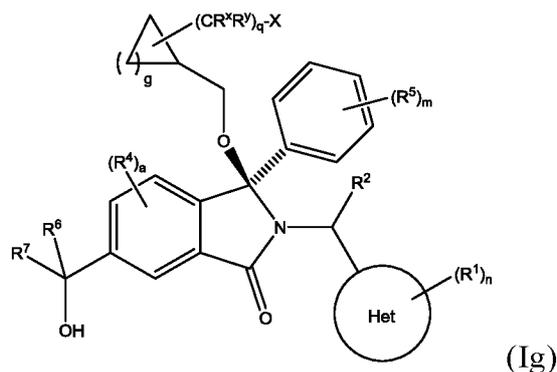
Диастереоизомер 1В

5 Во избежание сомнений, общая формула (I⁰) и все подформулы охватывают как отдельные диастереоизомеры, так и смеси диастереоизомеров, которые соотносятся как эписмеры в группе $-CHR^2-$. В одном варианте осуществления соединение формулы (I⁰) представляет собой диастереоизомер 1А или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль. В одном
10 варианте осуществления соединение формулы (I⁰) представляет собой диастереоизомер 1В или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления А представляет собой C_3 -циклоалкильную группу (т. е. g равно 1, 2 или 3), t равно 1 и s равно 0 или 1, а
15 соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (If) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



В одном варианте осуществления А представляет собой C_3 -циклоалкильную группу (т. е. g равно 1, 2 или 3), t равно 1 и s равно 1, а
20 соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (Ig) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



В одном варианте осуществления А представляет собой С₃-

циклоалкильную группу (т. е. g равно 1, 2 или 3), t равно 1 и s равно 1,

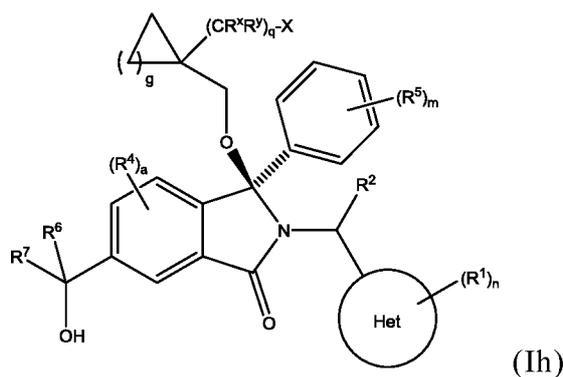
циклоалкильная группа является геминально двузамещенной (т. е. как группа -

5 (CR^xR^y)_q-X, так и -CH₂-О-изоиндолиноновая группа присоединены к одному и

тому же атому циклоалкильной группы), а соединение формулы (I^o)

представляет собой соединение формулы (Ih) или его таутомер, или сольват, или

фармацевтически приемлемую соль:



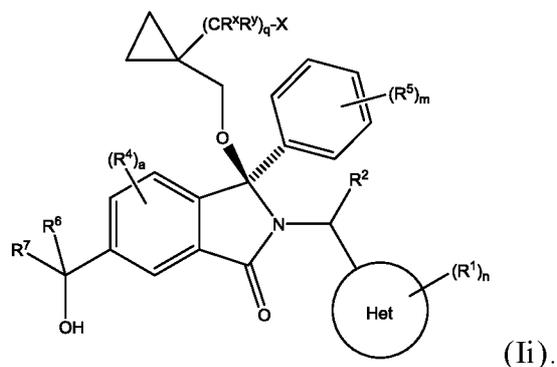
10 В одном варианте осуществления А представляет собой циклопропильную

группу (т. е. g равно 1), t равно 1 и s равно 1. Следовательно, циклоалкильная

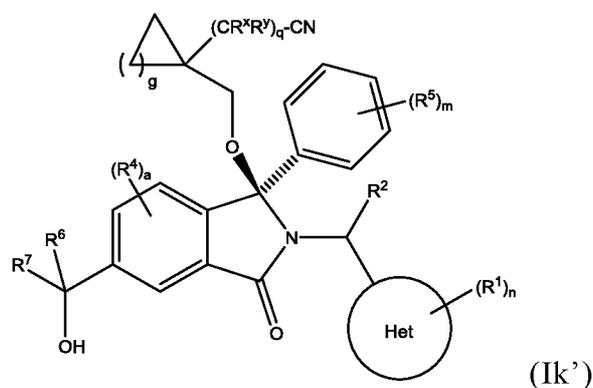
группа представляет собой циклопропильную группу, а соединение формулы (I^o)

представляет собой соединение формулы (Ii) или его таутомер, или сольват, или

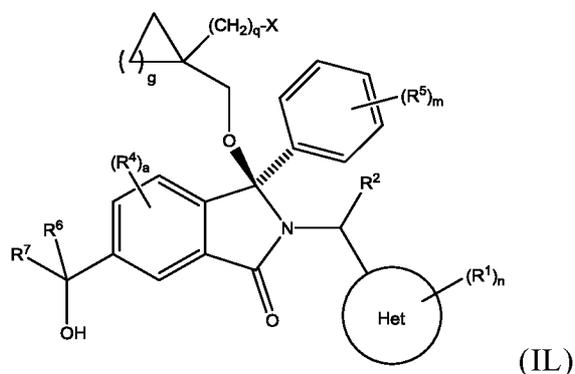
фармацевтически приемлемую соль:



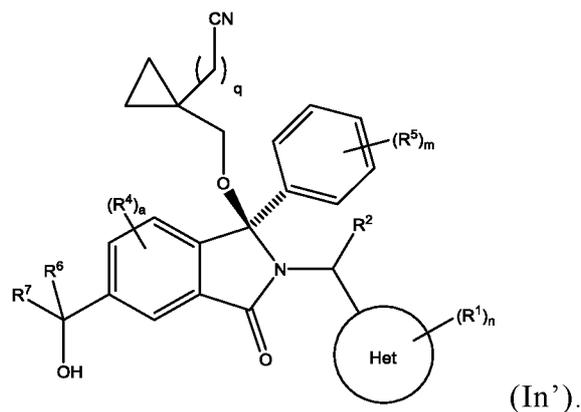
В одном варианте осуществления А представляет собой C_3 -
 6циклоалкильную группу (т. е. g равно 1, 2 или 3), t равно 1, s равно 1 и X
 представляет собой -CN, а соединение формулы (I⁰) представляет собой
 соединение формулы (Ik') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически
 5 приемлемую соль:



В другом варианте осуществления А представляет собой C_3 -
 6циклоалкильную группу (т. е. g равно 1, 2 или 3), t равно 1, s равно 1 и R^x и R^y
 представляют собой водород (включая 1H и 2H), а соединение формулы (I⁰)
 10 представляет собой соединение формулы (IL) или его таутомер, или сольват, или
 фармацевтически приемлемую соль:

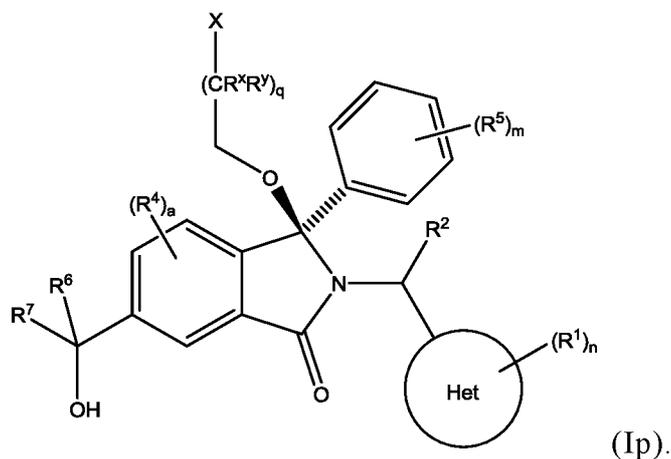


В одном варианте осуществления А представляет собой C_3 -
 циклоалкильную группу (т. е. g равно 1), t равно 1, s равно 1 и X представляет
 15 собой -CN, а соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы
 (In') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



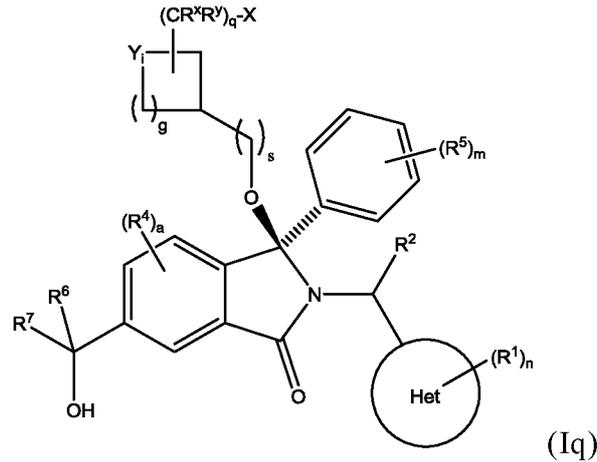
где q равно 0 или 1. В одном варианте осуществления соединения (In) q равно 0.

В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-(CR^xR^y)_q-X$, s равно 1, t равно 0 и q равно 1 или 2, а соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (Ip):



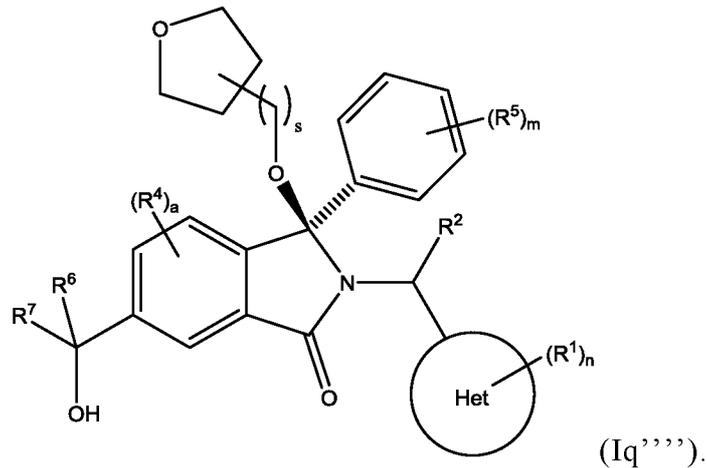
В одном варианте осуществления A представляет собой C_3 -

6-циклоалкильную группу или насыщенную гетероциклическую группу с 3–6
 10 кольцевыми членами, где t равно 1 и s равно 1, Y независимо выбран из $-CH_2-$, O
 или SO_2 , i равно 0 или 1, g равно 1, 2, 3 или 4 и $i + g$ равно 1, 2, 3 или 4, а
 соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (Iq) или его
 таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



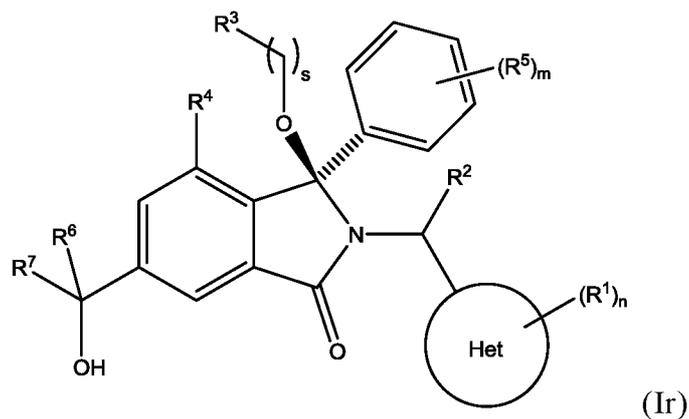
В одном варианте i равно 1, а Y представляет собой O или SO_2 , в частности O . В одном варианте соединение формулы (Iq) представляет собой соединение формулы (Iq''') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически

5 приемлемую соль:



В одном варианте осуществления s равно 0, t равно 1, A представляет собой тетрагидрофуранил, q равно 0 и X представляет собой водород. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой тетрагидрофуранил, а s равно 0.

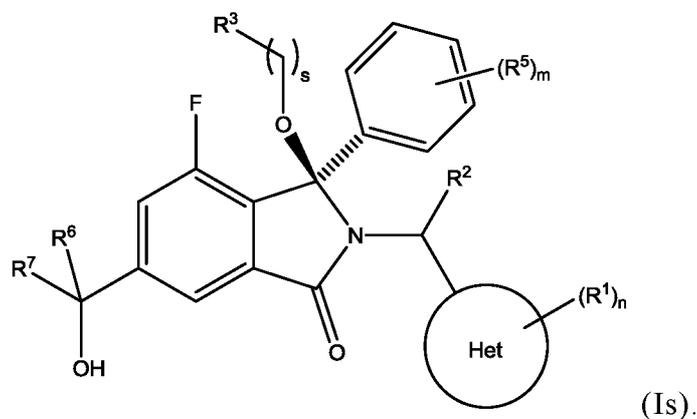
10 В одном варианте осуществления a равно 1, заместитель R^4 находится в позиции 4 изоиндолин-1-она, а соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (Ir) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



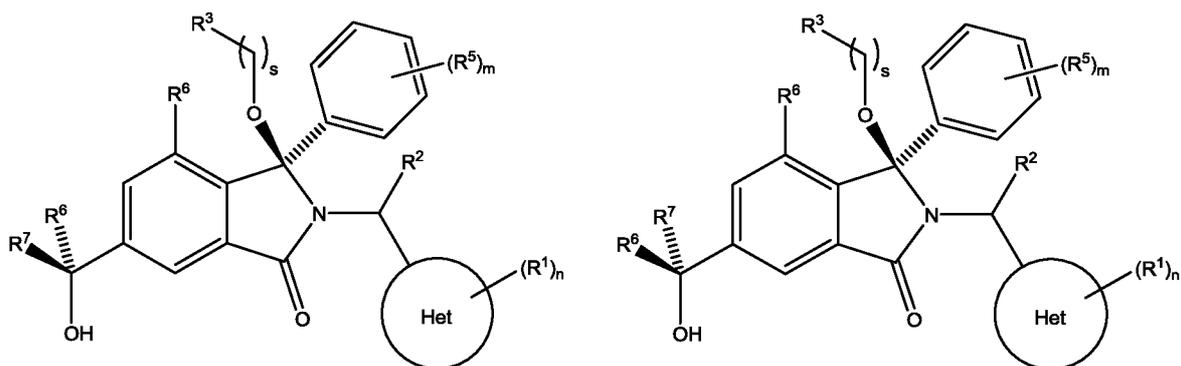
R^4 независимо выбран из галогена, нитрила, C_{1-4} алкила, галоген C_{1-4} алкила, C_{1-4} алкокси и галоген C_{1-4} алкокси.

В одном варианте осуществления R^4 представляет собой галоген. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой фтор или хлор. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой фтор.

В одном варианте осуществления a равно 1, заместитель R^4 находится в позиции 4 изоиндолин-1-она, R^4 представляет собой F, а соединение формулы (I^0) представляет собой соединение формулы (Is) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



Когда R^6 и R^7 являются разными, соединение формулы (I^0) может существовать как минимум в виде двух диастереоизомеров:

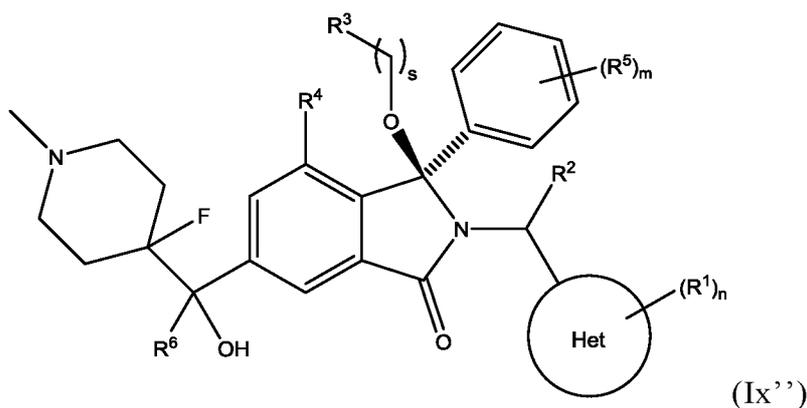


Диастереоизомер 2A

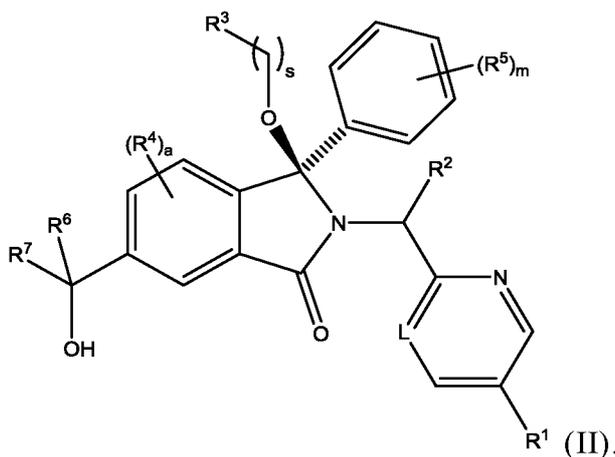
Диастереоизомер 2B

Во избежание сомнений, общая формула (I⁰) и все подформулы охватывают как отдельные диастереоизомеры, так и смеси диастереоизомеров, которые соотносятся как эпимеры в группе -CR⁶R⁷OH.

- 5 В одном варианте осуществления R⁷ представляет собой 4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил, а соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (Ix'') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

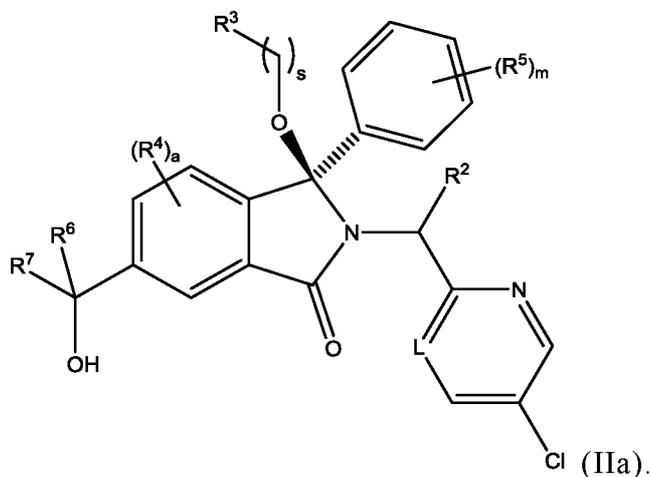
10 Подформулы

В одном варианте осуществления соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (II) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



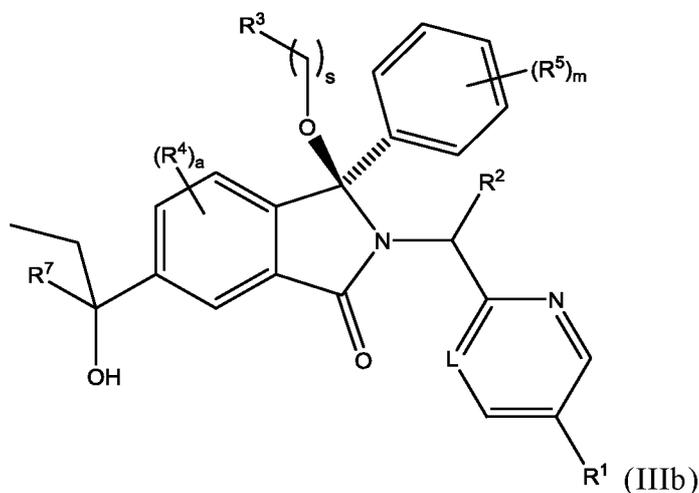
- 15 где L представляет собой CR¹, CH или N, а R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, a, m и s имеют значения, определенные в данном документе. В одном варианте осуществления L представляет собой CH. В одном варианте осуществления L представляет собой N. В одном варианте осуществления L представляет собой CR¹, например C-OH или C-гидроксиC₁₋₄алкил (например, C-OH или C-CH₂OH).

В другом варианте осуществления R^1 представляет собой хлор или нитрил, а соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIa) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



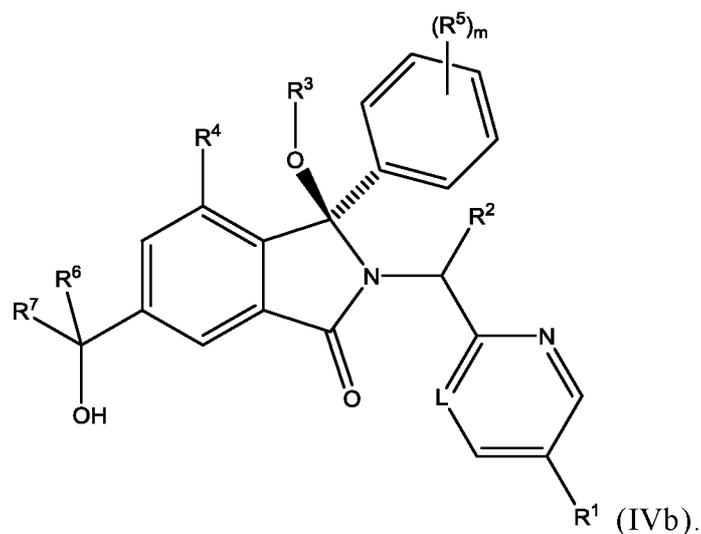
5 где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^7 , m и s имеют значения, определенные в данном документе.

В одном варианте осуществления R^6 представляет собой этил, а соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIIb) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



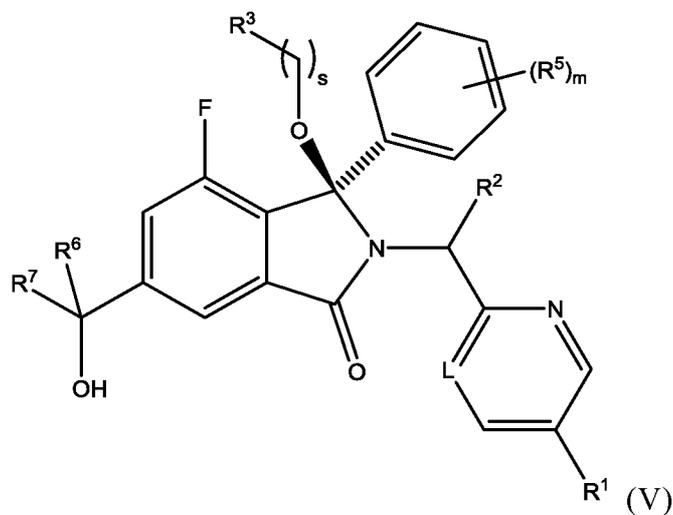
10 где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^7 , a , m и s имеют значения, определенные в данном документе.

В одном варианте осуществления s равно 0, а соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IVb) или его таутомер, или сольват,
15 или фармацевтически приемлемую соль:



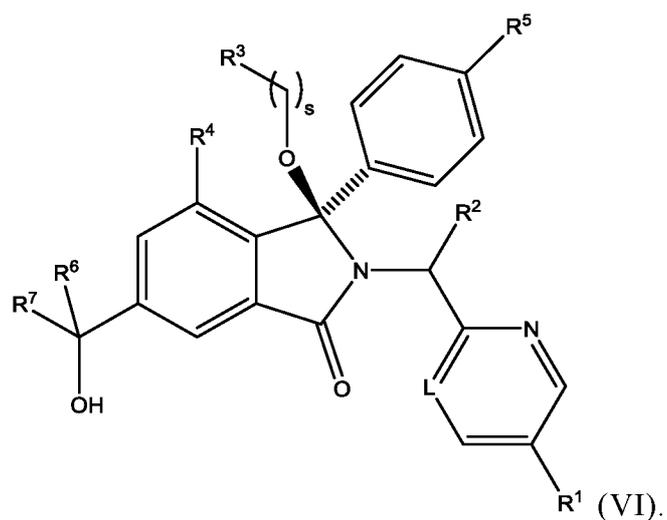
где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^7 , m и s имеют значения, определенные в данном документе.

В одном варианте осуществления R^4 представляет собой F, а соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (V) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

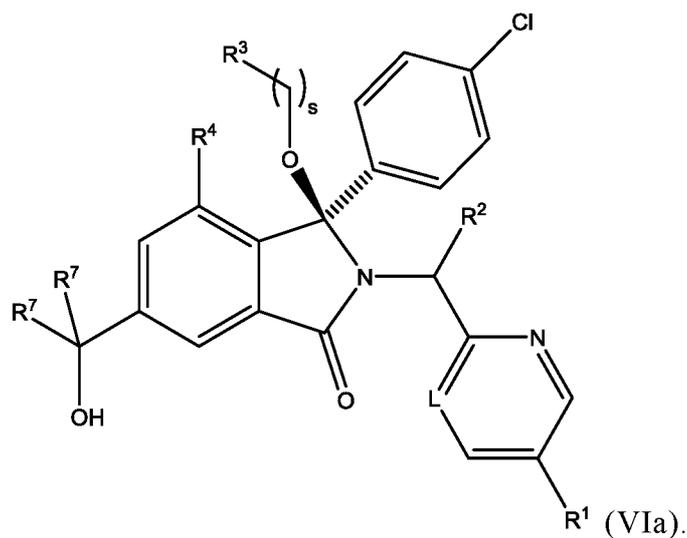


где R^1 , R^2 , R^3 , R^5 , R^7 , m и s имеют значения, определенные в данном документе.

10 В одном варианте осуществления m равно 1, заместитель R^4 находится в позиции 4 фенильной группы, а соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (VI) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

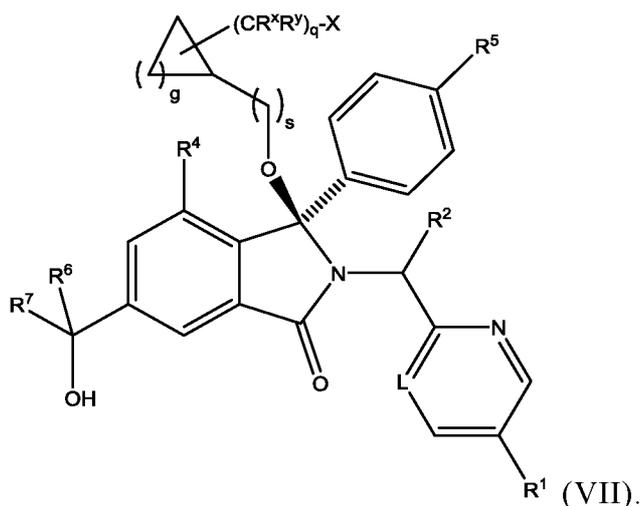


В одном варианте осуществления R^5 представляет собой хлор, а соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (VIa) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



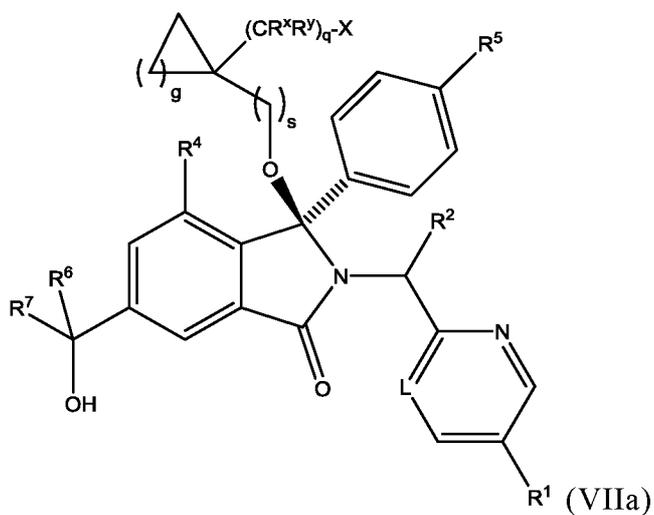
5

В одном варианте осуществления А представляет собой C_3 -циклоалкильную группу (g равно 1, 2 или 3), t равно 1, а соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (VII) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

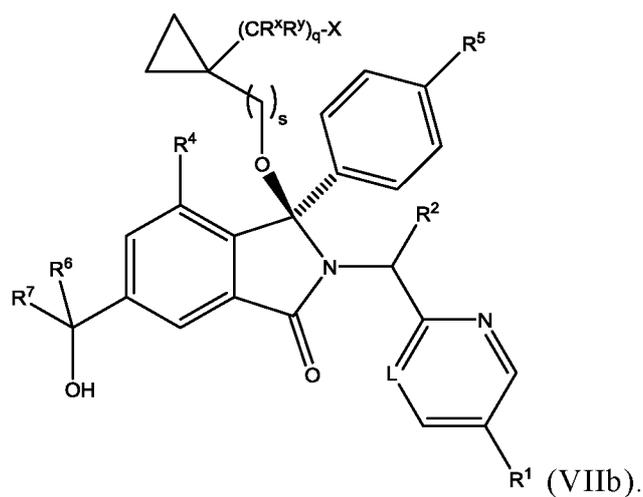


В одном варианте осуществления А представляет собой С₃.

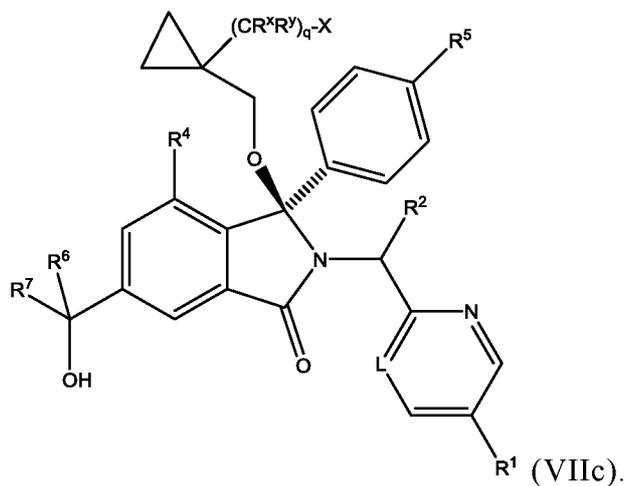
циклоалкильную группу (g равно 1, 2 или 3), t равно 1 и циклоалкильная группа является геминально двузамещенной (т. е. как группа $-(CR^xR^y)-X$, так и группа CH_2 (где s равно 1) или атом кислорода (где s равно 0) присоединены к одному и тому же атому циклоалкильной группы, а соединение формулы (VII) представляет собой соединение формулы (VIIa) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



10 В одном варианте осуществления g равно 1 и, таким образом, циклоалкильная группа представляет собой циклопропильную группу, а соединение формулы (VIIa) представляет собой соединение формулы (VIIb) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

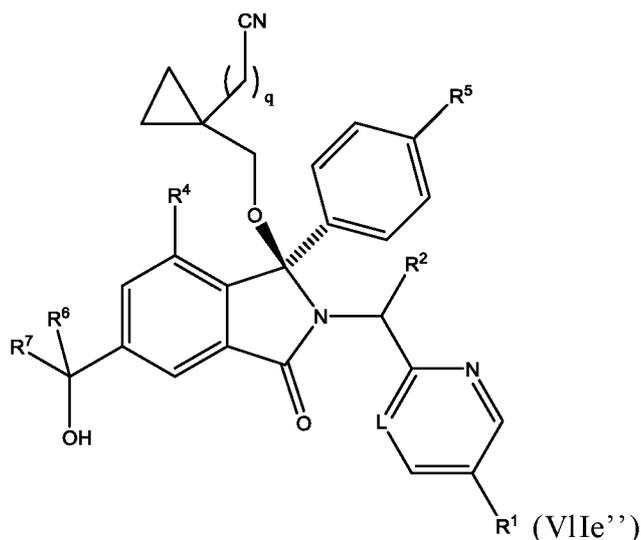


В одном варианте осуществления s равно 1, а соединение формулы (VIIb) представляет собой соединение формулы (VIIc) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



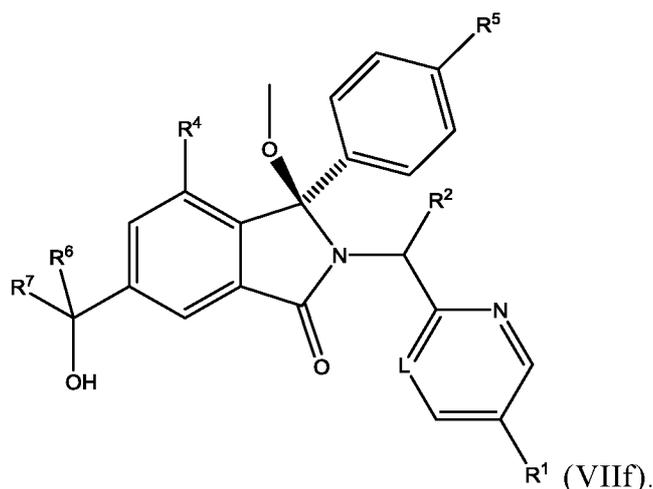
5

В одном варианте осуществления X представляет собой -CN, а соединение формулы (VIId) представляет собой соединение формулы (VIIe'') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



где q равно 0 или 1 и, в частности q равно 0.

В одном варианте осуществления R^3 представляет собой метил, а соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (VIIf) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



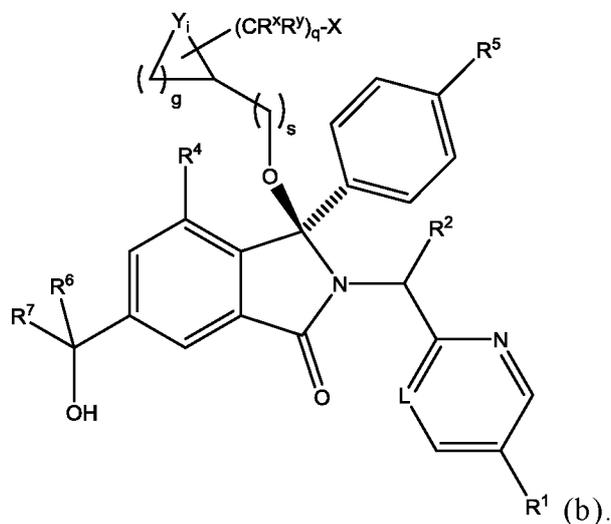
В одном варианте осуществления соединения формулы (a) R^7 представляет собой пиперидинил или пиперазинил, необязательно замещенный C_{1-6} алкилом (например, метилом) и/или галогеном (например, фтором).

10 В одном варианте осуществления соединения формулы (a') R^7 представляет собой пиперидинил, необязательно замещенный C_{1-6} алкилом (например, метилом) и/или галогеном (например, фтором).

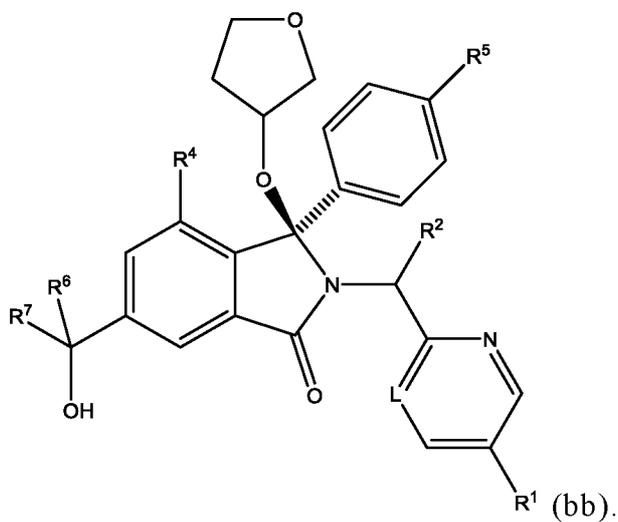
В одном варианте осуществления A представляет собой гетероциклическую группу с 3–6 кольцевыми членами, причем гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S и их окисленных форм (t равно 1; g равно 1, 2, 3 или 4; Z представляет собой N, O, S

15

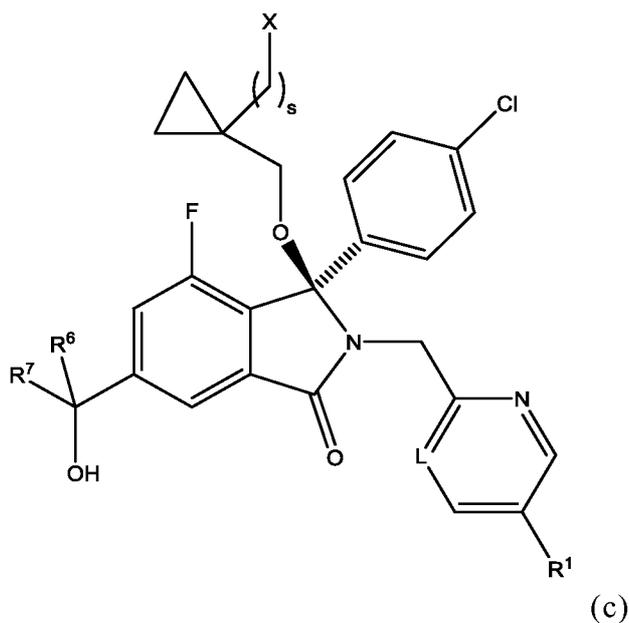
и их окисленные формы; i равно 1, 2 или 3; и $i + g = 2, 3, 4$ или 5), а соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (b) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



- 5 В одном варианте осуществления s равно 0, g равно 2, q равно 0 и X представляет собой водород, а соединение формулы (b) представляет собой соединение формулы (bb) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

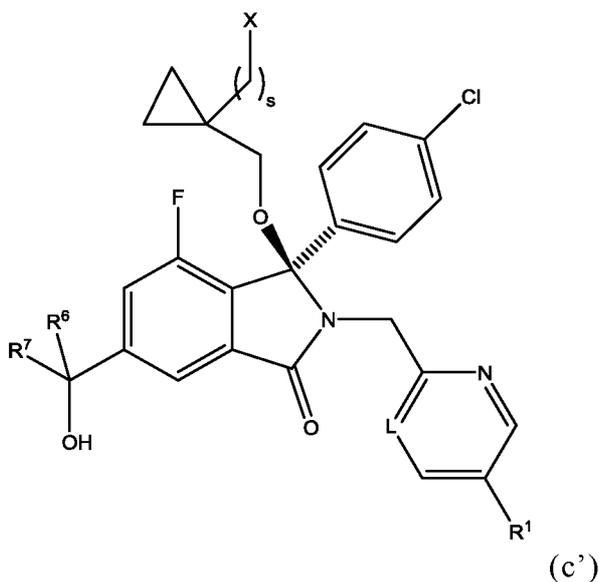


- 10 В одном варианте осуществления соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (c) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



где R^1 представляет собой хлор или нитрил, s равно 1 и X представляет собой гидроксил или s равно 0 и X представляет собой $-C(=O)NH_2$.

В одном варианте осуществления соединение формулы (I⁰) представляет собой соединение формулы (c') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



где R^1 представляет собой хлор или нитрил, s равно 1 и X представляет собой гидроксил или s равно 0 и X представляет собой $-CN$.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, где:

Нет представляет собой пиридинил или пиримидинил

R^1 присоединен к атому углерода и независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, нитро, нитрила и C_{1-4} алкила;

R^2 выбран из водорода, C_{1-4} алкила, C_{2-6} алкенила, гидроксигруппы C_{1-4} алкила и $-CH_2CO_2H$;

5 R^3 представляет собой водород или $-(A)_t-(CR^xR^y)_q-X$;

s и t независимо выбраны из 0 и 1;

q выбрано из 0, 1 и 2;

при этом, когда R^3 представляет собой $-(A)_t-(CR^xR^y)_q-X$, (i) по меньшей мере одно из s , t и q отлично от 0, и (ii) когда t равно 0, s равно 1, а q отлично от
10 0;

A представляет собой гетероциклическую группу с 3–6 кольцевыми членами, причем гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S и их окисленных форм;

X выбран из водорода, галогена, $-CN$ и $-OR^9$;

15 R^4 и R^5 независимо выбраны из галогена, нитрила и C_{1-4} алкила;

R^6 выбран из водорода и C_{1-6} алкила;

R^7 выбран из гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, $-CH_2$ -гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, C_{3-8} циклоалкила и $-CH_2$ - C_{3-8} циклоалкила, где указанные циклоалкильные или гетероциклические группы
20 могут быть необязательно замещены одной или более группами R^z , и где в каждом случае гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S и их окисленных форм;

R^9 выбран из водорода и C_{1-6} алкила;

R^x и R^y независимо выбраны из водорода и C_{1-6} алкила;

25 R^z независимо выбран из галогена, нитро, нитрила, C_{1-6} алкила, галоген- C_{1-6} алкила, C_{2-6} алкенила, гидроксигруппы, гидроксигруппы C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси, $-C(=O)C_{1-6}$ алкила и $-N(H)_e(C_{1-4}алкил)_2-e$;

n и e независимо выбраны из 0, 1 и 2;

m выбрано из 1 и 2; и

30 a выбрано из 0 и 1.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, где:

Het представляет собой пиридинил или пиримидинил

R^1 присоединен к атому углерода и независимо выбран из галогена, гидрокси и нитрила;

R^2 выбран из водорода, C_{1-4} алкила и $-CH_2CO_2H$;

R^3 представляет собой водород или $-(A)_t-(CR^xR^y)_q-X$;

5 A представляет собой гетероциклическую группу с 3–6 кольцевыми членами, причем гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S и их окисленных форм;

s и t независимо выбраны из 0 и 1;

q выбрано из 0, 1 и 2;

10 при этом, когда R^3 представляет собой $-(A)_t-(CR^xR^y)_q-X$, (i) по меньшей мере одно из s , t и q отлично от 0, и (ii) когда t равно 0, s равно 1, а q отлично от 0;

X выбран из водорода, галогена или $-OR^9$;

R^4 и R^5 независимо выбраны из галогена;

15 R^6 выбран из водорода и C_{1-6} алкила;

R^7 выбран из гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, $-CH_2$ -гетероциклической группы с 3–7 кольцевыми членами, C_{3-8} циклоалкила и $-CH_2$ - C_{3-8} циклоалкила, где указанные циклоалкильные, циклоалкенильные или гетероциклические группы могут быть необязательно замещены одной или более группами R^z , и где в каждом случае гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S и их окисленных форм;

R^9 выбран из водорода и C_{1-6} алкила;

R^x и R^y независимо выбраны из водорода и C_{1-6} алкила;

25 R^z независимо выбран из галогена, нитро, нитрила и C_{1-6} алкила;

n равно 1 и m равно 1; и

a выбрано из 0 и 1.

30 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, где:

Нет представляет собой пиридинил или пиримидинил

R^1 присоединен к атому углерода и независимо выбран из галогена, гидрокси и нитрила;

R^2 выбран из водорода, C_{1-4} алкила и $-CH_2CO_2H$;

R^3 представляет собой $-(A)_t-(CR^xR^y)_q-X$;

A представляет собой гетероциклическую группу с 3–6 кольцевыми членами, причем гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S и их окисленных форм;

5 s и t независимо выбраны из 0 и 1;

q выбрано из 0, 1 и 2;

при этом (i) по меньшей мере одно из s, t и q отлично от 0, и (ii) когда t равно 0, s равно 1, а q отлично от 0;

X выбран из водорода, галогена и $-OR^9$;

10 R^4 и R^5 независимо выбраны из галогена;

R^6 выбран из водорода и C_{1-6} алкила;

R^7 представляет собой гетероциклическую группу с 3–7 кольцевыми членами, необязательно замещенную одной или более группами R^z ;

R^9 выбран из водорода и C_{1-6} алкила;

15 R^x и R^y независимо выбраны из водорода и C_{1-6} алкила;

R^z независимо выбран из галогена и C_{1-6} алкила;

n равно 1, m равно 1 и

a равно 1.

20 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой один из примеров 1–580 (примеры, в которых сус представляет собой гетероциклическую группу) или выбрано из примеров 1–580, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват (соединения формулы I^o, описанные во второй группе примеров, определенных в данном документе, т. е. соединения, в

25 которых сус представляет собой Нет, как также описано в WO 2017/055859).

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой один из примеров 1–460 или выбрано из примеров 1–460, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват (соединения формулы I^o, описанные во второй

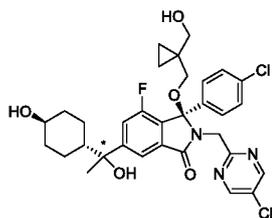
30 группе примеров, определенных в данном документе, т. е. соединения, в которых сус представляет собой Нет, как также описано в WO 2017/055859).

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой один из примеров 1–459 или выбрано из примеров 1–459, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически

приемлемую соль или сольват (соединения формулы I^o, описанные во второй группе примеров, определенных в данном документе, т. е. соединения, в которых сус представляет собой Het, как также описано в WO 2017/055859).

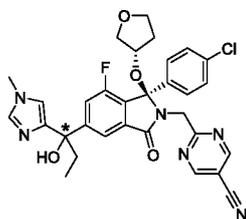
В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое выбрано из следующих соединений, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[*транс*-4-гидроксициклогексил]этил}-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;



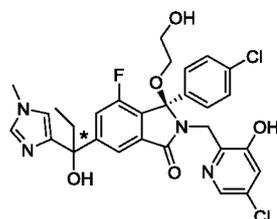
10 например,

2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-5-карбонитрил;



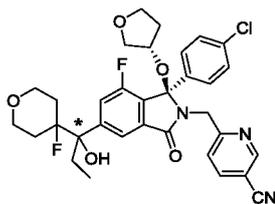
например,

15 (3R)-2-[(5-хлор-3-гидроксипиримидин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;



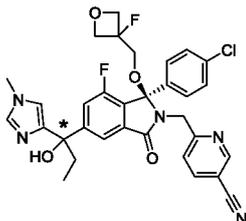
например,

20 6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-3-карбонитрил;



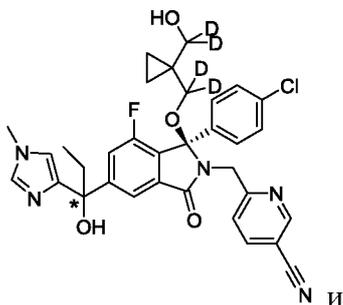
например,

6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил;



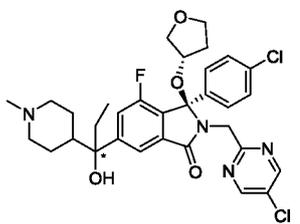
5 например,

6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-гидрокси(²H₂)метил}циклопропил){(²H₂)метокси}-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил;



10 например,

(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он



например,

15 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰), которое представляет собой диастереоизомер 2A и выбрано из следующих соединений, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[*транс*-4-гидроксициклогексил]этил}-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;

2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил;

(3R)-2-[(5-хлор-3-гидроксипиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;

6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил;

6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил;

6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-гидрокси(²H₂)метил}циклопропил){(²H₂)метокси}-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил; и

(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰), которое представляет собой диастереоизомер 2B и выбрано из следующих соединений, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[*транс*-4-гидроксициклогексил]этил}-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;

2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил;

(3R)-2-[(5-хлор-3-гидроксипиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;

5 6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил;

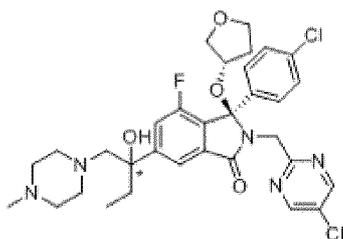
6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил;

10 6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси(²H₂)метил]циклопропил}{²H₂)метокси)-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил; и

15 (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он.

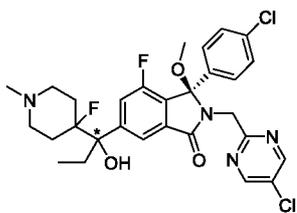
В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰), которое выбрано из следующих соединений, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

20 (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;



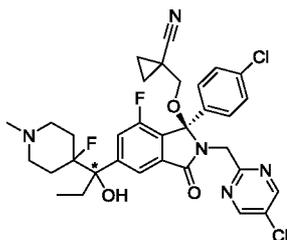
например,

25 (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;



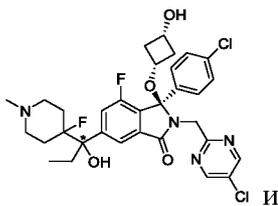
например,

1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил;



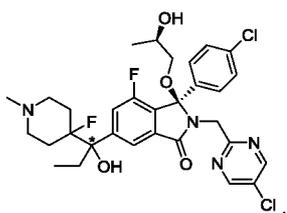
5 например,

(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;



например,

10 (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[(2R)-2-гидроксипропокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он



например,

15 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰), которое представляет собой 1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)]-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой диастереоизомер 2A и представляет собой 1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой диастереоизомер 2A и представляет собой (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин)-4-ил]-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой диастереоизомер 2B и представляет собой 1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o), которое представляет собой диастереоизомер 2B и представляет собой (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин)-4-ил]-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1R)-1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой 1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[(1S)-1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой 1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

Во избежание сомнений следует понимать, что каждый общий и конкретный вариант осуществления и пример для одного заместителя можно комбинировать с каждым общим и конкретным вариантом осуществления и примером для одного или более, в частности всех, других заместителей, определенных в данном документе, и что все такие варианты охвачены этой заявкой.

Конкретные соединения

Применение и способы по изобретению применимы ко всем описанным в данном документе соединениям формулы I^o, т. е. антагонист MDM2 может представлять собой соединение формулы I^o, любой ее подформулы или любое конкретное соединение, описанное в данном документе, или их таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

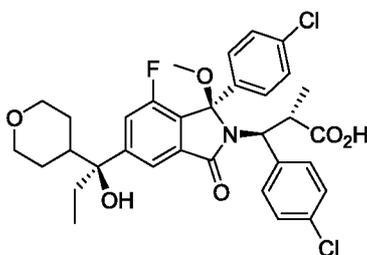
В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы I^o, выбранное из примеров 1–134, описанных в первой группе примеров, определенных в данном документе (т. е. соединения, в которых су_с представляет собой фенил, как также описано в WO 2017/055860).

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы I^o, выбранное из примеров 1–580, описанных во второй

группе примеров, определенных в данном документе (т. е. соединения, в которых сус представляет собой Нет, как также описано в WO 2017/055859).

В одном конкретном варианте осуществления изобретения антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват по определению в данном документе, которое представляет собой (2*S*,3*S*)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1*R*)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1*S*)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту.

(2*S*,3*S*)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1*R*)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1*S*)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановая кислота называется в данном документе «соединением 1».



например,

(2*S*,3*S*)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1*R*)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1*S*)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановая кислота описана в качестве примера 124 в заявке на международный патент № PCT/GB2016/053042, которая была опубликована как WO 2017/055860 6 апреля 2017 г.

Способы получения соединения 1 можно найти в заявке на международный патент № PCT/GB2018/050845, которая была опубликована как WO 2018/178691 4 октября 2018 г.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение 1 в форме свободной кислоты. В другом варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой фармацевтически приемлемую соль соединения 1.

Общие положения

Другие антагонисты MDM2 можно получать обычным образом, например, способами, аналогичными описанным.

Позология антагонистов MDM2 известна специалисту в данной области техники. Следует понимать, что предпочтительные способы введения, дозировки

и схемы введения для каждого антагониста MDM2 будут зависеть от конкретной опухоли, лечение которой проводят, и конкретного хозяина, лечение которого проводят. Специалисты в данной области техники могут легко определить оптимальные способ, график введения, дозировку и схему введения, используя традиционные способы и учитывая информацию, изложенную в данном документе.

СОЛИ, СОЛЬВАТЫ, ТАУТОМЕРЫ, ИЗОМЕРЫ, N-ОКСИДЫ, СЛОЖНЫЕ ЭФИРЫ, ПРОЛЕКАРСТВА И ИЗОТОПЫ

Ссылка на любое соединение в данном документе также включает ионные формы, соли, сольваты, изомеры (включая геометрические и стереохимические изомеры, если не указано иное), таутомеры, N-оксиды, сложные эфиры, пролекарства, изотопы и их защищенные формы, например, обсуждаемые ниже; в частности их соли, или таутомеры, или изомеры, или N-оксиды, или сольваты; и более конкретно их соли, или таутомеры, или N-оксиды, или сольваты. В одном варианте осуществления ссылка на соединение также включает его соли, или таутомеры, или сольваты.

Соли

Соединения могут существовать в форме солей, например, кислотно-аддитивных солей или, в некоторых случаях, солей органических и неорганических оснований, таких как карбоксилатные, сульфатные и фосфатные соли. Все такие соли входят в объем этого изобретения, а ссылки на соединения формулы (I^o) включают солевые формы этих соединений.

N-оксиды

Соединения, содержащие функциональную аминогруппу, могут также образовывать N-оксиды. В данном документе ссылка на соединение, которое содержит функциональную аминогруппу, также включает N-оксид.

Геометрические изомеры и таутомеры

Соединения могут существовать в ряде различных геометрических изомерных и таутомерных форм, а ссылки на соединения формулы (I^o) включают все такие формы. Во избежание сомнений, в случаях, когда соединение может существовать в одной из нескольких геометрических изомерных или таутомерных форм, и конкретно описана или проиллюстрирована только одна из них, все другие, тем не менее, охвачены для применения в соответствии с данным изобретением.

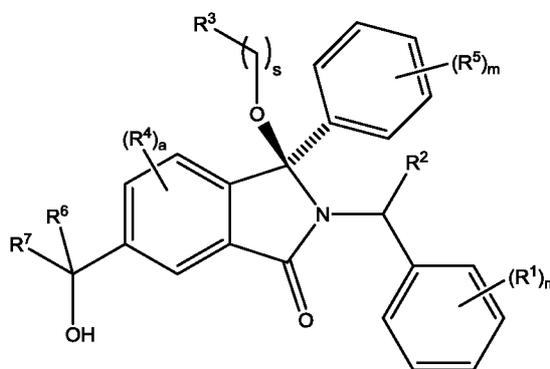
Например, некоторые гетероарильные кольца могут существовать в двух таутомерных формах, таких как А и В, проиллюстрированных ниже. В целях простоты формула может иллюстрировать одну форму, но данную формулу следует рассматривать как охватывающую обе таутомерные формы.

5 Стереоизомеры

Если не описано или указано иное, химическое название соединений обозначает смесь всех возможных стереохимически изомерных форм.

Соединения формулы (I^o)

10 Стереосцентры проиллюстрированы обычным образом с использованием «штриховых» или «сплошных» клиновидных линий, например,



Когда соединение описано как смесь двух диастереоизомеров/эпимеров, конфигурация стереосцентра не указана и представлена прямыми линиями.

15 Когда соединения содержат один или более хиральных центров и могут существовать в форме двух или более оптических изомеров, ссылки на соединения включают все их оптические изомерные формы (например, энантиомеры, эпимеры и диастереоизомеры) в виде отдельных оптических изомеров или смесей (например, рацемических или скалемических смесей), или двух или более оптических изомеров, если из контекста не следует иное.

20 Особый интерес представляют те соединения, которые являются стереохимически чистыми. Когда соединение обозначено, например, как R, это означает, что соединение по существу не содержит S-изомер. Если соединение обозначено, например, как E, это означает, что соединение по существу не содержит Z-изомер. Термины цис, транс, R, S, E и Z хорошо известны 25 специалисту в данной области техники.

Изотопные варианты

Настоящее изобретение включает применение всех фармацевтически приемлемых изотопно-меченых соединений, т. е. соединений, в которых один

или более атомов заменены атомами, имеющими такой же атомный номер, но атомную массу или массовое число, отличные от атомной массы или массового числа, обычно встречающихся в природе.

Сольваты и кристаллические формы

5 Также соединения включают любые полиморфные формы соединений и сольваты, такие как гидраты, алкоголяты и т. п.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой кристаллическую форму свободной кислоты (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-
10 оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой кристаллическую форму (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты, имеющую:

15 (a) порошковую рентгенограмму, характеризующаяся пиками при углах дифракции 15,1, 15,5, 15,8 и 22,3 градусов 2θ ($\pm 0,2$ градуса 2θ); или

(b) межплоскостные расстояния 3,99, 5,62, 5,71 и 5,87 Å.

В частности, кристаллическая форма (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-
20 2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты имеет:

(a) порошковую рентгенограмму, характеризующаяся пиками при углах дифракции 11,3, 15,1, 15,5, 15,8, 17,2, 20,8, 22,3 и 28,6 градусов 2θ ($\pm 0,2$ градуса 2θ); или

25 (b) межплоскостные расстояния 3,12, 3,99, 4,27, 5,17, 5,62, 5,71, 5,87 и 7,85 Å.

В частности, кристаллическая форма (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты имеет порошковую рентгенограмму, характеризующуюся наличием основных пиков при углах
30 дифракции (2θ), межплоскостными расстояниями (d) и интенсивностями, указанными в таблице 6 данного документа.

В частности, кристаллическая форма (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты имеет порошковую

рентгенограмму, которая имеет пики при тех же углах дифракции, что и на порошковой рентгенограмме, приведенной на Фиг. 12 WO-A-2021/130682 (включен в данное описание путем ссылки) и предпочтительно пики имеют такую же относительную интенсивность, что и пики на Фиг. 12 WO-A-
5 2021/130682.

В частности, кристаллическая форма (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты имеет порошковую рентгенограмму, практически такую же, как проиллюстрирована на Фиг. 12 WO-
10 A-2021/130682.

В одном варианте кристаллическая форма (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты демонстрирует экзотермический пик при 266–267 °C (например, 266,61 °C) при
15 проведении ДСК.

Кристаллические формы могут быть по существу кристаллическими, что означает, что может преобладать одна единственная кристаллическая форма, хотя другие кристаллические формы могут присутствовать в незначительных и предпочтительно пренебрежимо малых количествах.

20 Например, кристаллическая форма может содержать не более 5% по массе любой другой кристаллической формы.

Комплексы

Соединения также включают в свой объем комплексы (например, комплексы включения или клатраты с такими соединениями, как
25 циклодекстрины, или комплексы с металлами) соединений. Комплексы включения, клатраты и комплексы металлов можно получать способами, хорошо известными специалисту в данной области техники.

Пролекарства

Соединения также охватывают любые пролекарства соединений. Под «пролекарствами» подразумевается, например, любое соединение, которое *in vivo*
30 превращается в биологически активные соединения.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ИЗОБРЕТЕНИИ

Соединения формулы (I⁰)

В этом разделе, как и во всех других разделах данной заявки, если из контекста не следует иное, ссылки на формулу I^o также включают все другие подформулы и их примеры, определенные в данном документе.

5 Соединения формулы (I^o) можно получать в соответствии со способами синтеза, хорошо известными специалисту в данной области техники.

Необходимые промежуточные соединения являются коммерчески доступными, известными в литературе или полученными способами, аналогичными описанным в литературе, или полученными способами, аналогичными описанным в приведенных ниже примерах экспериментальных 10 процедур. Другие соединения можно получать посредством взаимопревращения функциональных групп с использованием способов, хорошо известных в данной области техники.

Общие способы получения, выделения и очистки соединений, в которых 15 сус представляет собой фенил, можно найти в заявке на международный патент № PCT/GB2016/053042, которая была опубликована как WO 2017/055860 06.04.2017:

Общие способы получения, выделения и очистки соединений, в которых 20 сус представляет собой Нет, можно найти в заявке на международный патент № PCT/GB2016/053041, которая была опубликована как WO 2017/055859 06.04.2017.

Выявление биомаркеров

В некоторых вариантах осуществления исследуют образец ткани пациента. Ткань может содержать одну или более раковых клеток или может содержать нуклеиновую кислоту, как правило ДНК, из раковых клеток, такую как 25 циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК), получаемая из крови.

В некоторых вариантах осуществления образец вводят в диагностическое устройство *in vitro*, которое измеряет соответствующую экспрессию представляющего интерес биомаркера или биомаркеров.

30 Как правило, известно или предположительно, что пациент имеет рак, когда изобретение осуществляют для подтверждения того, что лечение с большой вероятностью будет эффективным. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ предназначен для оценки того, можно ли лечить пациента-человека с известным или подозреваемым раком с помощью антагониста MDM2.

Способ по изобретению обычно включает выявление SKP2 и, необязательно, дополнительных биомаркеров посредством применения одного или более реагентов для выявления и/или методов выявления. Выявление, как правило, проводят *ex vivo* на образце от пациента, например *in vitro*. В одном варианте осуществления SKP2 измеряют напрямую. В другом варианте осуществления можно измерять субстрат SKP2, как правило p27, для косвенного измерения уровней SKP2.

Под «выявлением» подразумевается измерение, количественная оценка, оценка или анализ уровня экспрессии биомаркеров. Способы оценки биологических соединений, включая биомаркерные белки, гены или мРНК-транскрипты, известны в данной области техники. Известно, что методы выявления биомаркера включают прямые измерения и косвенные измерения. Специалист в данной области техники сможет выбрать подходящий метод анализа конкретного биомаркера.

«Реагент для выявления» представляет собой агент или соединение, которые специфически (или селективно) связываются, взаимодействуют с представляющим интерес биомаркером или выявляют его. Такие реагенты для выявления могут включать, но не ограничиваются этим, антитело, поликлональное антитело или моноклональное антитело, которое преимущественно связывается с белковым биомаркером, или олигонуклеотид, комплементарный и селективно связывающийся с биомаркером мРНК или ДНК, как правило, в жестких условиях гибридизации.

Выражение «специфически (или селективно) связывается» или «специфически (или селективно) иммунореактивен с» применительно к реагенту для выявления относится к реакции связывания, которая определяет присутствие биомаркера в гетерогенной популяции биологических молекул. Например, в определенных условиях иммунологического анализа указанный реагент для выявления (например, антитело) связывается с конкретным белком по меньшей мере в два раза сильнее фонового связывания и практически не связывается в значительном количестве с другими белками, присутствующими в образце. Для специфического связывания в таких условиях может потребоваться антитело, выбранное по его специфичности к конкретному белку. Для выбора антител, специфически иммунореактивных с конкретным белком, можно использовать различные форматы иммуноанализов. Например, твердофазный иммуноанализ

ИФА (иммуноферментный анализ) обычно используются для выбора антител, специфически иммунореактивных с белком (смотрите, например, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) в отношении описания форматов иммуноанализа и условий, которые можно использовать для определения специфической иммунореактивности). Как правило, специфическая или селективная реакция будет по меньшей мере в два раза превышать фоновый сигнал или шум, а чаще более чем в 10–100 раз превышать фон.

Такие технологии, как гибридизация *in situ* (ISH), количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (кРВ ПЦР) и иммуногистохимия (ИГХ), традиционно использовали для диагностики или выявления биомаркеров заболеваний. Однако появление высокопроизводительных, чувствительных подходов, таких как секвенирование нового поколения, секвенирование отдельных молекул в реальном времени, цифровая патология и количественная гистопатология, привело к изменению технологической платформы для сопутствующей диагностики или CDx. Количественная гистопатология и цифровая патология являются подходами к диагностике на основании медицинских изображений; они обеспечивают локализацию и измерение белковых биомаркеров в образце ткани. Тканевые маркеры идентифицируют и количественно определяют с помощью автоматизированной платформы визуализации на основе флуоресценции.

Когда биомаркер, который необходимо выявить, представляет собой белок, методы выявления включают анализы на основе антител, анализы белковых матриц, анализы на основе масс-спектрометрии (МС) и анализы на основе (ближней) инфракрасной спектроскопии. Например, иммуноанализы включают, помимо прочего, системы конкурентного и неконкурентного анализа с использованием таких методов, как вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализы, ИФА, «сэндвич»-иммуноанализы, анализы иммунопреципитации, реакции преципитации, реакции преципитации с диффузией в геле, иммунодиффузионные анализы, флуоресцентные иммуноанализы и т. п. Такие анализы являются рутинными и хорошо известны в данной области техники.

Термин «анализировать» включает определение набора значений, связанных с образцом, путем измерения маркера (например, наличия или отсутствия маркера или уровней экспрессии компонентов) в образце и сравнение измерения с измерением в образце или наборе образцов от того же субъекта или

другого контрольного субъекта (субъектов). Маркеры по настоящему изобретению можно анализировать любым из различных традиционных методов, известных в данной области техники. «Анализ» может включать проведение статистического анализа, например, для определения того, отвечает ли субъект или нет на терапию (например, лечение антагонистом MDM2, описанное в

5 данным документе).

«Образец» в контексте настоящего описания относится к любому биологическому образцу, выделенному из организма субъекта, например, образцу крови или биопсии. Образец может включать, без ограничения, одну или более клеток, фрагменты клеток, аликвоту жидкости организма, цельную

10 кровь, тромбоциты, сыворотку, плазму, эритроциты, лейкоциты или лейкоциты, эндотелиальные клетки, тканевую биопсию, синовиальную жидкость, лимфатическую жидкость, асцитическую жидкость и интерстициальную или

внеклеточную жидкость. Термин «образец» также охватывает жидкость в

15 пространстве между клетками, включая жидкость десневой борозды, костный мозг, цереброспинальную жидкость (ЦСЖ), слюну, слизь, мокроту, сперму, пот, мочу или любые другие жидкости организма. «Образец крови» может относиться к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, эритроциты, лейкоциты или лейкоциты, тромбоциты, сыворотку и плазму.

20 Образцы можно получать от субъекта способами, включая, но не ограничиваясь этим, венепункцию, экскрецию, эякуляцию, массаж, биопсию, игольную аспирацию, лаваж, соскоб, хирургический надрез или вмешательство или другие способы, известные в данной области техники.

Методы анализа

25 Перед введением антагониста MDM2 пациента можно подвергать скринингу для определения того, является ли заболевание или патологическое состояние, которым пациент страдает или может страдать, таким заболеванием, которое будет восприимчивым к лечению соединением, ингибирующим MDM2/p53. Термин «пациент» включает людей и субъектов ветеринарии, таких

30 как приматы, в частности, пациентов-людей.

Например, биологический образец, взятый у пациента, можно анализировать, чтобы определить, является ли патологическое состояние или заболевание, такое как рак, которым пациент страдает или может страдать, таким, которое характеризуется генетической аномалией или аномальной

белковой экспрессией, приводящей к повышению уровней MDM2 или к активизации биохимического пути ниже MDM2/p53. Кроме того, биологический образец, взятый у пациента, можно анализировать, чтобы определить, является ли патологическое состояние или заболевание, такое как рак, которым пациент страдает или может страдать, тем, которое характеризуется биомаркерами по изобретению.

Примеры таких аномалий, которые приводят к активации или сенсбилизации MDM2, включают утрату или ингибирование регуляторных путей, влияющих на экспрессию MDM2, повышающую регуляцию рецепторов или их лигандов, цитогенетические aberrации или присутствие мутантных вариантов рецепторов или лигандов. Опухоли с повышенной регуляцией MDM2/p53, в частности со сверхэкспрессией MDM2 или с экспрессией p53 дикого типа, могут быть особенно чувствительными к ингибиторам MDM2/p53. Кроме того, может быть низкая или пониженная экспрессия SKP2.

Термины «повышенный» или «увеличенный» включают повышенную экспрессию или сверхэкспрессию, включая амплификацию генов (т. е. множество копий генов), цитогенетическую aberrацию и повышенную экспрессию посредством транскрипционного эффекта или посттрансляционного эффекта. Таким образом, пациента можно подвергать диагностическому тесту для выявления подходящего белка или маркера, характерного для повышенной регуляции биомаркера по изобретению. Термин диагноз включает скрининг.

Термин «маркер» или «биомаркер» включает генетические маркеры, включая, например, измерение состава ДНК для идентификации наличия мутаций в p53, или амплификации MDM2, или, как правило, биомаркеры по изобретению, широко обсуждаемые в данном документе. Термин маркер также включает маркеры, характерные для повышенной регуляции MDM2/p53 или повышенной регуляции или пониженной регуляции биомаркеров, описанных в данном документе, включая уровни белка, состояние белка и уровни мРНК вышеупомянутых белков. Амплификация гена включает более 7 копий, а также увеличение на 2–7 копий.

Термины «сниженный», «истощенный» или «уменьшенный» включают пониженную экспрессию или уменьшенную экспрессию, включая понижающую регуляцию (т. е. уменьшение числа копий гена), цитогенетическую aberrацию, пониженную экспрессию за счет транскрипционного эффекта и утрату гена.

Таким образом, пациента можно подвергать диагностическому тесту для выявления более низких уровней биомаркера по изобретению.

5 Диагностические тесты и скрининг обычно проводят на биологическом образце (т. е. тканях организма или жидкостях организма), выбранном из образцов опухолевой биопсии, образцов крови (выделение и обогащение распространяющихся опухолевых клеток или выделение циркулирующей опухолевой ДНК), цереброспинальной жидкости, плазмы, сыворотки, слюны, биопсии стула, мокроты, хромосомного анализа, плевральной жидкости, брюшной жидкости, буккальных мазков, биопсии кожи или мочи.

10 Кроме того, также можно использовать жидкую биопсию, например исследование (систематической) циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) в крови или исследование жидкой биопсии на основе СНП, в частности для выявления рака или идентификации мутаций. Жидкостная биопсия с использованием секвенирования нового поколения (СНП) дополняет
15 традиционные методы выявления, такие как ПЦР и опухолевая биопсия, например, путем полногеномного секвенирования циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) или массивно-параллельного секвенирования циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК).

20 В одном варианте осуществления полученный образец представляет собой образец крови, например образец плазмы или сыворотки, в частности образец сыворотки. В одном варианте осуществления полученный образец представляет собой образец опухолевой биопсии.

25 В одном варианте осуществления кровь, обычно собранную в пробирку для отделения сыворотки, анализируют в медицинской лаборатории или в месте оказания медицинской помощи. Во втором варианте осуществления опухоль анализируют с помощью биопсии и анализируют в медицинской лаборатории.

30 Методы скрининга могут включать, но не ограничиваются этим, стандартные методы, такие как полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), анализ белка или гибридизация *in situ*, например флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH).

Методы идентификации и анализа цитогенетической аберрации, генетической амплификации, делеций, понижающей регуляции, мутаций и повышающей регуляции белков известны специалисту в данной области техники. Методы скрининга могут включать, но не ограничиваются этим, стандартные

методы, такие как анализ последовательности ДНК с помощью традиционных методов секвенирования по Сэнгеру или нового поколения, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), секвенирование РНК (РНК-сек.), анализ Nanostring близости гибридизации РНК nCounter или гибридизация *in situ*,
5 такая как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) или аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР). Кроме того, методы оценки уровня белка включают иммуногистохимию или другие иммуноанализы. Следовательно, в одном варианте осуществления экспрессию белка анализируют в образце от
10 пациента. В другом варианте экспрессию генов анализируют в образце от пациента, например в отношении аберрации гена, используя такие методы, как FISH. Методы оценки изменений числа копий генов включают методики, обычно используемые в цитогенетических лабораториях, такие как MLPA (мультиплексная амплификация лигированных зондов), выявление аномального
15 числа копий методом мультиплексной ПЦР или другие методы ПЦР, которые могут выявлять амплификацию, добавление и делецию генов.

При скрининге с помощью ОТ-ПЦР уровень мРНК в опухоли оценивают путем создания кДНК-копии мРНК с последующей амплификацией кДНК методом ПЦР. Способы амплификации ПЦР, выбор праймеров и условия амплификации известны специалисту в данной области техники. Манипуляции с
20 нуклеиновыми кислотами и ПЦР проводят стандартными методами, как описано, например, в Ausubel, F.M. et al., eds. (2004) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., или Innis, M.A. et al., eds. (1990) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, Academic Press, San Diego. Реакции и манипуляции с использованием методик работы с нуклеиновыми кислотами также описаны в
25 Sambrook et al., (2001), 3rd Ed, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. В альтернативном варианте можно использовать коммерчески доступный набор для ОТ-ПЦР (например, от Roche Molecular Biochemicals) или методологию, изложенную в патентах США №№ 4666828; 4683202; 4801531; 5192659, 5272057, 5882864 и 6218529, и включенную в
30 данный документ посредством ссылки. Мутации, например, в генах, описанных в данном документе, можно определять с помощью ПЦР. В одном варианте осуществления специфические пары праймеров являются коммерчески доступными или описаны в литературе.

Примером методики гибридизации *in-situ* для оценки экспрессии мРНК может быть флуоресцентная гибридизация *in-situ* (FISH) (смотрите Angerer (1987) *Meth. Enzymol.*, 152: 649).

5 Можно проводить секвенирование нового поколения (СНП), ДНК-секвенирование или анализ Nanostring.

Как правило, гибридизация *in situ* включает следующие основные этапы: (1) фиксация ткани, подлежащей анализу; (2) предгибридизационная обработка образца для повышения доступности целевой нуклеиновой кислоты и для снижения неспецифического связывания; (3) гибридизация смеси нуклеиновых кислот с нуклеиновой кислотой в биологической структуре или ткани; (4) промывка после гибридизации для удаления фрагментов нуклеиновой кислоты, не связанных при гибридизации, и (5) обнаружение гибридизованных фрагментов нуклеиновой кислоты. Зонды, используемые в таких применениях, обычно метят, например, радиоизотопами или флуоресцентными репортерами.

15 Некоторые зонды имеют достаточную длину, например, от около 50, 100 или 200 нуклеотидов до около 1000 или более нуклеотидов, чтобы обеспечить специфическую гибридизацию с целевой нуклеиновой кислотой в жестких условиях. Стандартные методы проведения FISH описаны в Ausubel, F.M. et al., eds. (2004) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc and

20 *Fluorescence In Situ Hybridization: Technical Overview* by John M. S. Bartlett in *Molecular Diagnosis of Cancer, Methods and Protocols*, 2nd ed.; ISBN: 1-59259-760-2; March 2004, pps. 077-088; Series: *Methods in Molecular Medicine*.

Методы профилирования экспрессии генов описаны в (DePrimo et al. (2003), *BMC Cancer*, 3:3). Вкратце, протокол выглядит следующим образом:

25 синтезируют двухцепочечную кДНК из общей РНК, используя олигомер (dT)₂₄ для праймирования синтеза первой цепи кДНК с последующим синтезом второй цепи кДНК со случайными гексамерными праймерами. Двухцепочечную кДНК используют в качестве матрицы для *in vitro* транскрипции кРНК с использованием биотинилированных рибонуклеотидов. кРНК химически

30 фрагментируют в соответствии с протоколами, описанными Affymetrix (Santa Clara, CA, USA), а затем гибридизуют в течение ночи на матрицах генома человека. В альтернативном варианте для обнаружения полиморфизмов в популяции можно использовать матрицы однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), представляющие собой тип микроматрицы ДНК.

Кроме того, в тестовых наборах может использоваться технология Nanostring или цкПЦР.

В альтернативном варианте белковые продукты, экспрессированные из мРНК, можно анализировать с помощью иммуногистохимии опухолевых образцов (или других иммуноанализов), твердофазного иммуноанализа с микротитровальными планшетами, вестерн-блоттинга, электрофореза в 2-мерном ДСН-полиакриламидном геле, ИФА, проточной цитометрии и других методов, известных в данной области техники для выявления специфических белков, например, капиллярного электрофореза. Методы выявления будут включать использование сайт-специфических антител. Специалисту понятно, что все такие хорошо известные методики для выявления повышения регуляции MDM2 и p53, выявления вариантов или мутантов MDM2 или p53, или утраты негативных регуляторов MDM2 (например, p14ARF), или генов, описанных в данном документе, применимы в настоящем случае. В частности, уровни описанных в данном документе генов можно измерять с помощью иммуногистохимии. Экспрессию в цитоплазме можно оценивать путем окрашивания опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления SKP2 анализируют, используя эти методики. В некоторых вариантах осуществления один или более SKP2 субстратов анализируют, используя эти методики.

Уровни белков, в частности повышенные, пониженные или аномальные уровни белков, можно измерять с помощью стандартных белковых анализов. Повышенные или пониженные уровни или недостаточную или чрезмерную экспрессию также можно выявлять в образце ткани, например, опухолевой ткани, путем измерения белковых уровней с помощью анализа, такого как анализ от Chemicon International. Представляющий интерес белок иммунопреципитируют из лизата образца и измеряют его уровень.

В варианте осуществления, в котором ген представляет собой SKP2, следует понимать, что для определения доступны различные аналитические методы, такие как ИФА, иммунотурбидиметрия, быстрая иммунодиффузия и визуальная агглютинация.

В варианте осуществления, в котором исследуют экспрессию гена, следует понимать, что существуют различные аналитические методы, доступные для определения.

В одном варианте осуществления, который включает выявление утраты SKP2, такое выявление обычно можно проводить на уровне ДНК (т. е. секвенирование ДНК), РНК (т. е. количественная ПЦР, генная матрица, секвенирование экзома и т. п.) или белка (т. е. иммуногистохимия) с использованием клинически валидированных анализов на биопсии. В альтернативном варианте осуществления выявление утраты SKP2 включает одно или более из: белковой матрицы с обращенной фазой, вестерн-блоттинга, полуколичественной или количественной ИГХ.

Иммуногистохимия (ИГХ) является важным методом выявления биомаркеров. Во-первых, он позволяет напрямую визуализировать экспрессию биомаркеров в гистологически релевантных областях исследуемой раковой ткани. Во-вторых, ИГХ проводят на 3ФЗП срезах ткани, обработанных стандартными методами, что обеспечивает возможность проведения анализа биомаркеров на клинически доступных образцах. В-третьих, валидированные ИГХ анализы можно легко внедрять в клиническую практику. Например, в клинической практике используется несколько валидированных ИГХ анализов, таких как анализы для выявления PD-L1, HER2 и ALK (<https://www.fda.gov/medical-devices/vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-vitro-and-imaging-tools>). Традиционно патологи оценивали данные ИГХ визуально. Например, при расчете HSCORE проводят суммирование процентного значения площади, окрашенной при каждом уровне интенсивности, умноженного на взвешенную интенсивность (например, 1, 2 или 3, где 0 означает отсутствие окрашивания, 1 означает слабое окрашивание, 2 означает умеренное окрашивание и 3 означает сильное окрашивание) окрашивания [McCarty et al: Cancer Res 1986, 46:4244s–4248s]. В целях валидации анализа эти анализы часто проводят на образцах, расположенных на окрашенных срезах ТМА, что позволяет представить достаточно большое количество образцов для статистически строгого тестирования. Образцы тканей должным образом представлены центральными частями тканей на очень небольшом количестве предметных стекол, что сводит к минимуму затраты на ИГХ и использование тканей, а также облегчает исследования среди наблюдателей и между наблюдателями, а также между лабораториями. Компьютерные методы классификации представляющих интерес участков изображения (например, карциноматозные участки образцов ткани) и

количественную оценку интенсивности ИГХ окрашивания в этих участках также можно использовать для получения данных.

Такие методы одинаково применимы при выявлении других описанных в данном документе генов. В некоторых вариантах осуществления выявление
5 повышенных уровней генов, описанных в данном документе, включает анализ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), или прямое секвенирование нуклеиновой кислоты или гибридизацию с зондом нуклеиновой кислоты, специфичным в отношении генов.

Таким образом, все эти методы также можно использовать для
10 идентификации опухолей, являющихся особенно подходящими для лечения этими антагонистами MDM2.

Ex-vivo функциональные анализы также можно использовать в соответствующих случаях, например, для измерения циркулирующих лейкозных
15 клеток у больного раком пациента, чтобы оценить ответ на стимуляцию ингибитором MDM2/p53.

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение включает применение антагониста MDM2 в производстве лекарственного
20 средства для лечения или профилактики болезненного состояния или патологического состояния у пациента, который был обследован и определен как имеющий или подверженный риску развития заболевания или патологического состояния, которое может быть восприимчивым к лечению ингибитором MDM2/p53.

Другой аспект данного изобретения включает антагонист MDM2 для
25 применения в профилактике или лечении рака у пациентов, выбранных из субпопуляции с утратой SKP2.

Другой аспект данного изобретения включает антагонист MDM2 для применения в профилактике или лечении рака у пациентов, выбранных из субпопуляции с p53 дикого типа и утратой SKP2.

Другой аспект данного изобретения включает антагонист MDM2 для
30 применения в профилактике или лечении рака у пациента с утратой SKP2.

МРТ-определение нормализации сосудов (например, с использованием градиентного эхо-сигнала МРТ, спинного эхо-сигнала и контрастного усиления для измерения объема крови, относительного размера сосуда и проницаемости
сосудов) в сочетании с циркулирующими биомаркерами можно также

использовать для идентификации пациентов, подходящих для лечения соединением, применяемым в изобретении.

Таким образом, дополнительным аспектом изобретения является способ диагностики и лечения болезненного состояния или патологического состояния, опосредованного MDM2/p53, который включает (i) скрининг пациента для 5 определения того, является ли заболевание или патологическое состояние, которым пациент страдает или может страдать, таким, которое может быть восприимчивым к лечению ингибитором MDM2/p53; и (ii) когда показано, что заболевание или патологическое состояние, которым страдает пациент, обладает 10 такой восприимчивостью, введение пациенту антагонистов MDM2 и их подгрупп или примеров, определенных в данном документе.

В одном варианте осуществления способ по изобретению дополнительно включает этап скрининга пациента со сверхэкспрессией одного или более членов семейства MDM (например, MDM2 и/или MDMx).

15 В одном варианте осуществления способ по изобретению дополнительно включает этап скрининга пациента с цитогенетической абберацией, которая приводит к сверхэкспрессии MDM2.

В одном варианте осуществления образцы, полученные от пациента, приводят в контакт с праймером, антителом, субстратом или зондом для 20 определения уровней описанных в данном документе генов.

В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с праймером, антителом, субстратом или зондом и (ii) определение уровней описанных в данном документе генов.

25 Базовые уровни можно анализировать путем проведения внутриклеточного окрашивания необработанных клеток антителом, например, антителом, конъюгированным с флуоресцентным зондом. Антитела против описанных в данном документе биомаркеров коммерчески доступны от ряда поставщиков. В частности, используемое антитело может быть частью одобренного FDA набора для диагностики *in vitro* (IVD).

30 В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с антителом и (ii) определение уровней одного или более биомаркеров, описанных в данном документе. В альтернативном варианте осуществления этап (i) способа включает приведение образца пациента в

контакт с одним или несколькими праймерами для ПЦР для одного или нескольких субстратов биомаркеров.

В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с антителом и (ii) определение уровня ядерной локализации для оценки уровня одного или более биомаркеров, описанных в данном документе. В альтернативном варианте осуществления этап (i) способа включает приведение образца пациента в контакт с антителом к субстрату биомаркера.

При необходимости уровень ядерной локализации можно определять с помощью иммуногистохимии или иммунофлуоресценции с использованием антитела.

Мутации, которые приводят к утрате SKP2, можно выявлять, используя белковую матрицу с обращенной фазой, вестерн-блоттинг, полуколичественную или количественную ИГХ или секвенирование ДНК. В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с антителом к мутанту и (ii) определение того, что опухоль пациента характеризуется утратой SKP2. В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с антителом к мутанту и (ii) определение уровней SKP2 (или их утраты).

Выявление делеций и мутаций SKP2 можно проводить путем выделения ДНК из образца от пациента, например, биопсии опухоли, амплификации с помощью ПЦР и секвенирования ДНК с использованием соответствующего праймера. Праймеры для ПЦР могут быть разработаны или коммерчески доступны. Наборы матриц мутаций также коммерчески доступны.

В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с одним или более ПЦР-праймерами SKP2 и (ii) определение наличия или отсутствия мутации или делеции SKP2. В альтернативном варианте осуществления этап (i) способа включает приведение образца от пациента в контакт с одним или более ПЦР-праймерами для одного или более субстратов SKP2.

В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с антителом к SKP2 и (ii) определение наличия или отсутствия мутации или делеции SKP2. В альтернативном варианте

осуществления этап (i) способа включает приведение образца от пациента в контакт с антителом к субстрату SKP2.

Уровни белка можно определять с помощью набора для ИФА. Наборы для ИФА для применения с образцами от пациентов можно использовать в 5 клинических условиях для оценки биохимического состава крови. В них используется антитело, специфическое к белку, например антитело против биомаркера, такое как анти-SKP2, или конъюгированное антитело. В частности, используемое антитело является частью одобренного FDA набора для 10 диагностики *in vitro*. В одном варианте осуществления уровень определяют с помощью теста, который соответствует стандарту, определенному Ассоциацией клинической биохимии (ACB).

В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с антителом и (ii) определение уровней белков из генов, описанных в данном документе.

15 В частности, образец приводят в контакт в условиях для количественного определения уровней.

Например, на этапе приведения в контакт, описанном выше, образец приводят в контакт с праймером, зондом, субстратом или антителом, как правило, в присутствии буфера. Субстрат может представлять собой, например, 20 флуоресцентный зонд.

Отбор пациентов

Следует понимать, что для пациента, отобранного для лечения антагонистом MDM2 в соответствии с изобретением, будут проводить исследование или измерение в отношении SKP2 в соответствии с методологией, 25 описанной в предыдущем разделе.

Например, такой отобранный пациент будет иметь:

сниженную или низкую экспрессию SKP2.

В одном варианте осуществления отобранный пациент проявляет или демонстрирует по меньшей мере один симптом рака, в частности опухоль TP53 30 дикого типа.

В одном варианте осуществления отобранный больной раком пациент ранее не проходил лечение антагонистом MDM2. В одном варианте осуществления отобранный пациент ранее не демонстрировал ответ на терапию антагонистом MDM2.

В некоторых вариантах осуществления профиль экспрессии нуклеиновой кислоты определяют с помощью ПЦР, HTG EdgeSeq или количественного анализа экспрессии генов, такого как NanoString nCounter. В некоторых вариантах осуществления профиль экспрессии белка (например, SKP2) определяют с помощью иммуноанализа.

Анализ экспрессии генов

В одном варианте осуществления уровень РНК SKP2 снижен по сравнению с количеством указанной РНК в контрольном образце, полученном от здорового субъекта, не страдающего раком.

В альтернативном варианте осуществления уровень РНК SKP2 снижен в опухоли по сравнению с количеством указанной РНК в неопухолевом образце, полученном от того же пациента.

В некоторых вариантах осуществления уровень снижен относительно количества РНК, определенного в образцах субъектов, не восприимчивых к ингибитору MDM2.

В одном варианте осуществления он снижен относительно нормальных уровней.

Верхний предел нормы (ВПН) относится к тем уровням, которые составляют 95% всего диапазона. Это набор значений, в которые попадает 95 процентов нормальной популяции (то есть 95% интервал предсказания).

В одном варианте осуществления сниженный уровень представляет собой > 1-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом, верхним пределом нормы (ВПН) или образцом, полученным от указанного пациента, например, разницу, кратную 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или любому диапазону между ними. В одном варианте осуществления сниженный уровень представляет 1–50-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом или ВПН. В одном варианте осуществления сниженный уровень является очень высоким, например, > 10-кратной разницей по сравнению с контрольным образцом, ВПН или образцом, полученным от указанного пациента, например, разницей, кратной 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 1000 или любому диапазону между ними. В одном варианте осуществления сниженный уровень представляет 10–1000-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом

или ВПН. В одном варианте осуществления сниженный уровень представляет 2–10-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом или ВПН (например, 5-кратную).

Кратность разницы можно определять между больным индивидом и нормальным индивидом (эталонное значение или контрольный образец). Это эталонное значение можно рассчитать для нормальных индивидов или на основании пула образцов за исключением исследуемого типа образца (например, TP53 дикого типа и сниженный SKP2). В одном варианте осуществления разница в экспрессии гена SKP2 в образцах пациентов с миелоидным лейкозом и в нормальных тканях (ресурс BloodSpot, Nucleic Acids Res. 2016 Jan 4; 44) составляет от 0,66 до -3,55 (шкала log2) со средним снижением на -1,35. в экспрессии гена SKP2 в образцах ОМЛ.

В одном варианте осуществления концентрацию РНК определяют с помощью ОТ-ПЦР, и/или микроматрицы, и/или nanostring. Для каждого анализа типично иметь значение «верхнего предела нормы» (ВПН), связанное с конкретным методом анализа. Такой ВПН обычно определяют из по имеющей достаточный размер выборке нормальных здоровых субъектов с использованием конкретного метода анализа для измерения концентрации РНК. Затем ВПН обычно определяют как самую высокую концентрацию РНК, которая все еще считается находящейся в пределах нормального диапазона (например, в пределах двух стандартных отклонений от среднего значения). Поскольку такие значения ВПН будут варьироваться в зависимости от конкретного метода анализа, используемого для измерения концентрации, каждый конкретный анализ будет иметь уникальное значение ВПН, связанное с этим методом анализа.

Как показано в данном документе, концентрации можно использовать для прогнозирования того, существует ли для больного раком пациента вероятность пользы от лечения антагонистом MDM2.

Белковые анализы

В одном варианте осуществления уровень белка SKP2 снижен по сравнению с количеством указанного белка в контрольном образце, полученном от здорового субъекта, не имеющего рак.

В альтернативном варианте уровень белка SKP2 снижен по сравнению с количеством указанного белка в более раннем образце, полученном от того же пациента.

5 В одном варианте осуществления он уменьшен или снижен относительно нормального уровня.

Верхний предел нормы (ВПН) относится к тем уровням, которые составляют 95% всего диапазона. Это набор значений, в которые попадает 95 процентов нормальной популяции (то есть 95% интервал предсказания).

10 В одном варианте осуществления сниженный уровень представляет собой > 1-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом, верхним пределом нормы (ВПН) или образцом, полученным от указанного пациента, например, разницу, кратную 0,75, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,15, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 или 0,01 или любому диапазону между ними. В одном варианте осуществления сниженный уровень представляет 1–0,01-кратную разницу по
15 сравнению с контрольным образцом или ВПН. В одном варианте осуществления сниженный уровень является очень низким, например представляет собой > 0,01-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом, ВПН или образцом, полученным от указанного пациента, например, разницу, кратную 0,001 или любому диапазону между ними. В одном варианте сниженный уровень
20 равен 0, т. е. полностью отсутствует.

В другом варианте осуществления уровень SKP2 определяют с помощью иммуногистохимии.

Белки, белковые комплексы или протеомные маркеры можно специфически идентифицировать и/или количественно определять различными способами,
25 известными в данной области техники, и можно использовать по отдельности или в комбинации. Иммунологические методы или методы на основе антител включают твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА), вестерн-блоттинг, иммунофлуоресценцию, микроматрицы, некоторые хроматографические методы (например, иммуноаффинную хроматографию),
30 проточную цитометрию, иммунопреципитацию и т. п. Такие способы основаны на специфичности антитела или антител к конкретному эпитопу или комбинации эпитопов, связанных с представляющим интерес белком или белковым комплексом. К неиммунологическим методам относятся методы, основанные на физических характеристиках самого белка или белкового комплекса. Примеры

таких методов включают электрофорез, некоторые хроматографические методики (например, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), быструю белковую жидкостную хроматографию (ББЖХ), аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию и т. п.), масс-спектрометрию, секвенирование, расщепление протеазами и т. п. Такие методы основаны на массе, заряде, гидрофобности или гидрофильности, которые определяются аминокислотным составом белка или белкового комплекса, и конкретной последовательностью аминокислот.

5 хроматографию и т. п.), масс-спектрометрию, секвенирование, расщепление протеазами и т. п. Такие методы основаны на массе, заряде, гидрофобности или гидрофильности, которые определяются аминокислотным составом белка или белкового комплекса, и конкретной последовательностью аминокислот.

10 В одном варианте осуществления экспрессия SKP2 отсутствует. Образцы с низким уровнем SKP2 можно идентифицировать как SKP2-отрицательные, например, с утратой SKP2.

В одном варианте осуществления утрату SKP2 оценивают с помощью мутационного анализа, например, секвенирования ДНК.

15 Также можно определять уровни цитоплазматической, а также ядерной экспрессии SKP2. Ядерная локализация белка SKP2 является маркером в клетках. Уровни ядерной экспрессии можно оценить с помощью гистологии по шкале (диапазон 0–100), выражающей процент положительных клеток, полученных после обработки антителом (например, моноклональным антителом против человеческого биомаркера). Можно делать оценки экспрессии по

20 иммуноокрашиванию.

Уровни SKP2 в цитоплазме также можно измерять с помощью иммуногистохимии или иммунофлуоресценции.

В одном варианте осуществления уровень SKP2 снижен по сравнению с количеством указанного белка в контрольном образце, полученном от здорового субъекта, не имеющего рак.

25

В одном варианте осуществления уровень SKP2 снижен в опухоли по сравнению с количеством указанного белка в неопухолевым образце, полученном от того же пациента.

30 В одном варианте осуществления уровень экспрессии SKP2 снижен на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% или 100%. 100% снижение экспрессии означает полное снижение, т. е. полную утрату. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается снижение по меньшей мере на 50%. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается снижение по меньшей мере на 75%.

В некоторых вариантах осуществления обеспечивается снижение по меньшей мере на 80%.

В некоторых вариантах осуществления обеспечивается снижение по меньшей мере на 95%, например по меньшей мере на 99%.

5

Методы количественного определения

Данное изобретение относится к идентификации пациента для лечения антагонистом MDM2. В некоторых вариантах осуществления способы включают по меньшей мере такие этапы:

- 10 (a) приведение образца от пациента в контакт с антителом к SKP2 и/или одному или более субстратам SKP2;
- (b) проведение ИФА или иммуногистохимического анализа указанного образца;
- (c) определение уровня SKP2; и
- 15 (d) идентификация пациента как кандидата на лечение антагонистом MDM2, когда (i) уровень SKP2 снижен относительно верхнего предела нормы (ВПН); или (ii) SKP2 отсутствуют; или (iii) уровень SKP2 является низким относительно верхнего предела нормы (ВПН).

В других вариантах осуществления способ идентификации пациента для лечения антагонистом MDM2 включает:

- 20 (a) приведение образца от пациента в контакт с антителом к SKP2 и/или одному или более субстратам SKP2 для определения уровня экспрессии белка SKP2;
- (c) лечение пациента антагонистом MDM2, когда уровень SKP2 снижен
- 25 относительно верхнего предела нормы (ВПН).

Также описан способ идентификации или отбора пациента для лечения антагонистом MDM2, включающий:

- (a) приведение образца от пациента в контакт с антителом к SKP2 и/или
- 30 одному или более субстратам SKP2 для определения уровня экспрессии белка SKP2;
- (b) лечение пациента антагонистом MDM2, когда уровень SKP2 снижен относительно верхнего предела нормы (ВПН).

Как правило, отобранный пациент болен раком. Как правило, пациента отбирают, когда пациент имеет уровень SKP2 в биологическом образце от пациента ниже predetermined значения (или отсутствующий).

5 Рак может быть гемобластом или солидной опухолью. В одном варианте осуществления рак представляет собой гемобластом, такой как рак крови. В другом варианте осуществления рак может представлять собой лейкемию, лимфому или миелому.

 Как правило, рак представляет собой лейкоз, необязательно миелоидный лейкоз.

10 В другом варианте осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

 Рак может быть солидной опухолью. В одном варианте осуществления солидная опухоль представляет собой рак толстой кишки. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак легкого. В еще одном варианте осуществления рак представляет собой рак кожи, например, меланому или карциному. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы.

20 Конкретные виды рака, которые могут быть оценены для лечения в соответствии с изобретением, включают, но не ограничиваются им, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). В первоначальных анализах было замечено, что ОМЛ является наиболее чувствительным раком.

25 Способ прогнозирования эффективности антагониста MDM2 в отношении рака у пациента включает определение уровня SKP2 в биологическом образце от пациента, где уровень SKP2 в биологическом образце ниже заданного значения является прогностическим фактором эффективности у пациента.

30 В одном варианте осуществления разница в экспрессии гена SKP2 в образцах пациентов с миелоидным лейкозом по сравнению с нормальными тканями составляет от 0,66 до -3,55 (шкала log2) со средним снижением экспрессии гена SKP2 в образцах ОМЛ на -1,35. Низкая экспрессия SKP2 также, по-видимому, больше связана со специфическими подтипами ОМЛ (например, ОМЛ с транслокацией t(15;17)) [Источник: BloodSpot (www.bloodspot.eu, Nucleic Acids Res. 2016 Jan 4; 44)]. Точно так же разница в экспрессии CDKN1B (p27) в образцах ОМЛ с нормальными тканями варьируется от -3,76 до 2,37 (шкала log2)

и более чем в 1 раз увеличивается в образцах ОМЛ с низкими уровнями экспрессии SKP2.

В одном варианте осуществления предложен антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, где рак представляет собой ОМЛ с транслокацией t(15;17).

Системы для осуществления способов

В описанных в данном документе способах можно использовать систему для облегчения оценки или прогнозирования для пациента. Система может быть единым устройством, в которое интегрированы различные компоненты устройства (блоки). Система также может иметь свои различные компоненты или некоторые из этих компонентов в виде отдельных устройств. Компоненты могут включать измерительное устройство, графический пользовательский интерфейс и блок компьютерной обработки.

Система обычно содержит соединение для передачи данных на интерфейс, при этом сам интерфейс может представлять собой часть системы или может представлять собой удаленный интерфейс. Последнее относится к возможности использования другого устройства, предпочтительно портативного устройства, такого как смартфон или планшетный компьютер, для обеспечения фактического интерфейса. Соединение для передачи данных в таких случаях предпочтительно будет включать беспроводную передачу данных, такую как Wi-Fi или Bluetooth, или другие методики или стандарты.

В некоторых вариантах осуществления измерительное устройство выполнено с возможностью получения образца ткани, например, путем помещения одной или нескольких раковых клеток или капли крови на картридж, который можно вставлять в устройство. Устройство может представлять собой существующее устройство, способное определять из того же образца уровни биомаркера или биомаркеров. Блок обработки может получать числовые значения концентраций белка от измерительного устройства. Блок обработки обычно снабжен программным обеспечением (обычно встроенным программным обеспечением), позволяющим ему рассчитывать оценку на основании входных данных.

В другом варианте осуществления система для оценки того, подходит ли больной раком пациент для лечения антагонистом MDM2, содержит:

(a) средства выявления, способные и выполненные с возможностью выявления в образце, полученном от пациента-человека, биомаркера или биомаркеров по изобретению. Такие средства известны и легко доступны для специалиста в данной области техники. Как правило, предусмотрен контейнер для приема в него образца от субъекта, причем контейнер снабжен средствами выявления;

(b) процессор, способный и выполненный с возможностью определения из определенных концентраций указанных белков вероятности лечения пациента антагонистом MDM2.

10 Не обязательно, система содержит пользовательский интерфейс (или соединение для передачи данных с удаленным интерфейсом), в частности, графический пользовательский интерфейс (GUI), способный отображать информацию; GUI представляет собой тип пользовательского интерфейса, который позволяет пользователям взаимодействовать с электронными
15 устройствами с помощью графических иконок и визуальных индикаторов, таких как вторичная нотация, вместо текстовых пользовательских интерфейсов, печатаемых командных меток или текстовой навигации (ни один из таких типов интерфейса не исключен из настоящего изобретения); GUI широко известны и, как правило, используются в портативных мобильных устройствах, таких как
20 MP3-плееры, портативные медиаплееры, игровые устройства, смартфоны и небольшие бытовые, офисные и промышленные элементы управления; как было сказано, интерфейс не обязательно также может быть выбран таким образом, чтобы можно было вводить информацию, такую как информация о пациенте.

В одном варианте осуществления система для определения пригодности
25 больного раком пациента-человека для лечения антагонистом MDM2 содержит запоминающее устройство для хранения данных, связанных с образцом от пациента, включающих данные, связанные с панелью биомаркеров, указывающие уровни экспрессии биомаркеров в образце от субъекта, при этом панель биомаркеров содержит SKP2; и

30 процессор, соединенный с возможностью связи с запоминающим устройством для классификации пациента.

Наборы

В изобретении также предложен, отдельно или в качестве части вышеупомянутой системы, набор для выявления SKP2 и/или одного или более

субстратов SKP2 для оценки вероятности ответа пациента на ингибирование MDM2 для терапии рака. Набор обычно содержит один или более реагентов для выявления одного или более биомаркеров по изобретению. Эти реагенты могут быть предназначены для прямого выявления или косвенного выявления

5 биомаркера, например выявления соответствующего субстрата.

Как правило, набор содержит два или более или три или более реагентов для выявления, каждый из которых направлен на другой биомаркер изобретения.

Как обсуждалось выше со ссылкой на способы по изобретению, набор может содержать больше реагентов для выявления, например, для других белков.

10 В предпочтительном варианте реагенты для выявления, доступные в наборе, состоят из реагентов для выявления одного, двух, трех или четырех белков, составляющих панель биомаркеров по изобретению, как указано выше.

Набор может содержать твердую подложку, такую как чип, микротитровальный планшет или гранулы или смолу, содержащие указанные
15 реагенты для выявления. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат зонды для масс-спектрометрии.

Набор также может содержать промывочные растворы и/или реагенты для выявления, специфичные к несвязанному реагенту для выявления или к указанному биомаркеру и/или биомаркерам (анализ сандвич-типа).

20 Такие наборы должны содержать биосенсор для выявления и/или количественного определения SKP2, необязательно вместе с инструкциями по применению набора в соответствии с описанной в данном документе методологией.

Существуют хорошо зарекомендовавшие себя генетические и
25 биохимические способы характеристики состояния биомаркера по изобретению. Существуют также хорошо зарекомендовавшие себя биохимические способы характеристики количества белков в крови, например образцах сыворотки.

В одном варианте осуществления изобретение включает упакованное средство для лечения рака. Упакованное средство для лечения содержит
30 композицию, упакованную с инструкциями по применению эффективного количества композиции по изобретению для предполагаемого применения у пациента, отобранного с использованием настоящего изобретения. В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предложено применение

любой из композиций по изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака у субъекта.

В одном варианте осуществления в изобретении предложен набор, или панель, или матрица для определения уровня SKP2 в одном образце от пациента.

5 БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Было показано, что описанные в данном документе соединения, их подгруппы и примеры ингибируют взаимодействие p53 с MDM2. Такое ингибирование приводит к остановке клеточной пролиферации и гибели клеток (как правило, апоптозу), что может быть полезно для предотвращения или
10 лечения болезненных состояний или патологических состояний, описанных в данном документе, например, заболеваний и патологических состояний, обсуждаемых ниже, и заболеваний и патологических состояний, описанных выше, в которых p53 и MDM2 играют роль. Так, например, предполагается, что соединения, раскрытые в данном описании, могут быть полезны для уменьшения
15 или снижения заболеваемости раком.

Соединения, описанные в данном документе, могут быть полезны для лечения взрослой популяции. Соединения, используемые в настоящем изобретении, могут быть полезны для лечения детской популяции.

Было показано, что описанные в данном документе соединения являются
20 хорошими антагонистами образования комплекса MDM2-p53. Соединения, описанные в данном документе, способны связываться с MDM2 и проявлять активность в отношении MDM2. Эффективность соединений по настоящему изобретению в отношении MDM2/p53 определяли, используя протокол анализа, описанный в данном документе, и другие методы, известные в данной области
25 техники. Более конкретно, соединения формулы (I^o) и их подгруппы обладают аффинностью к MDM2/p53.

Определенные соединения, используемые в настоящем изобретении, представляют собой соединения, имеющие значения IC₅₀ менее 0,1 мкМ, в частности менее 0,01 или 0,001 мкМ.

30 Функция MDM2/p53 вовлечена во многие заболевания из-за его роли в различных процессах, например ремоделировании сосудов и антиангиогенных процессах и регуляции метаболических путей, а также в онкогенезе. Предполагается, что вследствие их аффинности к MDM2 соединения могут оказаться полезными для лечения или предотвращения ряда заболеваний или

патологических состояний, включая аутоиммунные состояния; сахарный диабет; хронические воспалительные заболевания, например, волчаночный нефрит, системную красную волчанку (СКВ), аутоиммунный опосредованный гломерулонефрит, ревматоидный артрит, псориаз, воспалительное заболевание кишечника, аутоиммунный сахарный диабет, экзему, реакции гиперчувствительности, бронхиальную астму, ХОБЛ, ринит и заболевание верхних дыхательных путей; гиперкератотические заболевания, такие как аутосомно-рецессивный врожденный ихтиоз (АУВИ); заболевания почек, включая гломерулярные расстройства, хроническое заболевание почек (ХБП), воспаление почек, утрату подоцитов, гломерулосклероз, протеинурию и прогрессирующее заболевание почек; сердечно-сосудистые заболевания, например гипертрофию сердца, рестеноз, аритмию, атеросклероз; ишемическое повреждение, связанное с инфарктом миокарда, повреждением сосудов, инсультом и реперфузионным повреждением; сосудистые пролиферативные заболевания; заболевания глаз, такие как возрастная макулярная дегенерация, в частности влажная форма возрастной макулярной дегенерации, ишемические пролиферативные ретинопатии, такие как ретинопатия недоношенных (РН) и диабетическая ретинопатия, и гемангиома.

Предполагается, что вследствие их аффинности к MDM2 соединения могут оказаться полезными для лечения или предотвращения пролиферативных расстройств, таких как рак.

Примеры раковых заболеваний (и их доброкачественных аналогов), которые можно лечить (или подавлять), включают, без ограничений, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточные карциномы, переходно-клеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевыводящих путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (в том числе пищевода, желудка (гастральная), тонкой кишки, толстой кишки, кишечника, ободочной и прямой кишки, прямой кишки и ануса), печени (гепатоцеллюлярная карцинома), желчного пузыря и желчевыводящей системы, экзокринной поджелудочной железы, почки (например, почечно-клеточная карцинома), легкого (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легкого, немелкоклеточные карциномы легкого, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), головы и шеи (например, рак языка, щечной полости, гортани,

глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, полости носа и околоносовых пазух), яичника, фаллопиевых труб, брюшины, влагалища, вульвы, полового члена, яичек, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярная карцинома щитовидной железы), головного мозга, надпочечника, предстательной железы, кожи и придатков (например, меланома, базальноклеточный рак, плоскоклеточный рак, кератоакантома, диспластический невус); гематологические злокачественные новообразования (т. е. лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические расстройства и расстройства пограничной злокачественности, включая гематологические злокачественные новообразования и связанные состояния лимфоидного происхождения (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ОЛЛ], хронический лимфоцитарный лейкоз [ХЛЛ], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома [ДВКЛ], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, мантийноклеточная лимфома, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы из естественных клеток-киллеров [NK], лимфомы Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональная гаммапатия неопределенной значимости, плазмоцитомы, множественная миелома и посттрансплантационные лимфопролиферативные расстройства) и гематологические злокачественные новообразования и родственные состояния миелоидного происхождения (например, острый миелогенный лейкоз [ОМЛ], хронический миелогенный лейкоз [ХМЛ], хронический миеломоноцитарный лейкоз [ХММЛ], гиперэозинофильный синдром, миелолиферативные расстройства, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелолиферативный синдром, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например, саркомы мягких тканей, костей или хрящей, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркома Капоши, саркома Юинга, синовиальные саркомы, эпителиоидные саркомы, желудочно-кишечные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистиоцитомы и взрывающаяся дерматофибросаркома; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы (например, глиомы), невриномы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли шишковидной железы и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников,

опухоли из островковых клеток, опухоли парашитовидной железы, карциноидные опухоли и медуллярный рак щитовидной железы); опухоли глаза и придатков (например, ретинобластома); герминогенные и трофобластные опухоли (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, пузырьный занос и хориокарциномы); и детские и эмбриональные опухоли (например, медуллобластома, нейробластома, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, делающие пациента восприимчивым к злокачественному новообразованию (например, пигментная ксеродерма).

10 Рост клеток является строго контролируемой функцией. Рак, представляющий собой состояние аномального клеточного роста, возникает, когда клетки неконтролируемым образом реплицируются (увеличиваются в количестве), неконтролируемо растут (становятся крупнее) и/или в меньшей степени гибнут вследствие апоптоза (запрограммированная гибель клеток),

15 некроза или апоптоза. В одном варианте осуществления аномальный рост клеток выбран из неконтролируемой пролиферации клеток, чрезмерного роста клеток или уменьшенной запрограммированной гибели клеток. В частности, патологическое состояние или заболевание аномального клеточного роста представляет собой рак.

20 Таким образом, в фармацевтических композициях, применениях или способах по настоящему изобретению для лечения заболевания или патологического состояния, включающего аномальный рост клеток (т. е. неконтролируемый и/или быстрый рост клеток), заболевание или патологическое состояние, включающее аномальный рост клеток, в одном варианте

25 осуществления, представляет собой рак.

Многие заболевания характеризуются стойким и нерегулируемым ангиогенезом. Хронические пролиферативные заболевания часто сопровождаются выраженным ангиогенезом, который может способствовать или поддерживать воспалительное и/или пролиферативное состояние или ведет к

30 разрушению тканей посредством инвазивной пролиферации кровеносных сосудов. Было обнаружено, что рост и метастазирование опухолей зависят от ангиогенеза. Таким образом, соединения, применяемые в настоящем изобретении, могут быть полезны для предотвращения и нарушения инициации опухолевого ангиогенеза.

Термин ангиогенез обычно используется для описания развития новых или замены кровеносных сосудов или неоваскуляризации. Это необходимый и физиологически нормальный процесс, посредством которого у эмбриона развивается сосудистая сеть. В общем случае ангиогенез не происходит в большинстве нормальных тканей взрослого организма, за исключением участков овуляции, менструации и заживления ран. Однако многие заболевания характеризуются стойким и нерегулируемым ангиогенезом. Например, при артрите новые капилляры проникают в сустав и разрушают хрящ. При диабете (и при многих разных заболеваниях глаз) новые сосуды проникают в макулу, сетчатку или другие структуры глаза и могут вызвать слепоту. Процесс атеросклероза был связан с ангиогенезом. Было обнаружено, что рост и метастазирование опухолей зависят от ангиогенеза. Соединения могут быть полезными при лечении таких заболеваний, как рак и метастазы, заболевания глаз, артрит и гемангиома.

Следовательно, соединения, применяемые в настоящем изобретении, могут быть полезны при лечении метастазирования и метастатических раковых заболеваний. Метастазирование или метастатическое заболевание представляет собой распространение заболевания от одного органа или части к другим несмежным органу или части. Раковые заболевания, которые можно лечить с помощью соединений, применяемых в настоящем изобретении, включают первичные опухоли (т. е. раковые клетки в месте возникновения), локальную инвазию (раковые клетки, которые проникают и инфильтрируют окружающие нормальные ткани в локализованном участке) и метастатические (или вторичные) опухоли, т. е. опухоли, которые образовались из злокачественных клеток, которые циркулировали через кровоток (гематогенное распространение), или через лимфатическую систему, или через полости тела (трансцеломическое) в другие участки и ткани организма. В частности, соединения, применяемые в настоящем изобретении, могут быть полезны при лечении метастазирования и метастатических раковых заболеваний.

В одном варианте осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лейкоз. В другом варианте осуществления гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лимфому. В одном варианте осуществления рак представляет собой ОМЛ. В другом варианте осуществления рак представляет собой ХЛЛ.

В одном варианте осуществления соединение для применения в изобретении предназначено для применения в профилактике или лечении лейкоза, такого как острый или хронический лейкоз, в частности острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) или хронический миелолейкоз (ХМЛ). В одном варианте осуществления соединение для применения в изобретении предназначено для применения в профилактике или лечении лимфомы, такой как острая или хроническая лимфома, в частности лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома или диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома.

В одном варианте осуществления соединение для применения в изобретении предназначено для применения в профилактике или лечении острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) или острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ).

В одном варианте осуществления соединение для применения в изобретении предназначено для применения в профилактике или лечении гематологических злокачественных новообразований (т.е. лейкозов, лимфом) и предраковых гематологических расстройств и расстройств пограничной злокачественности, включая гематологические злокачественные новообразования и связанные состояния лимфоидного происхождения (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ОЛЛ], хронический лимфоцитарный лейкоз [ХЛЛ], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома [ДВККЛ], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, мантийноклеточная лимфома, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы из естественных клеток-киллеров [NK], лимфомы Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональная гаммопатия неопределенной значимости, плазмоцитомы, множественная миелома и посттрансплантационные лимфопролиферативные расстройства), и гематологических злокачественных новообразований и родственных состояний миелоидного происхождения (таких как острый миелогенный лейкоз [ОМЛ], хронический миелогенный лейкоз [ХМЛ], хронический миеломоноцитарный лейкоз [ХММЛ], гиперэозинофильный синдром, миелопролиферативные расстройства, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз,

миелопролиферативный синдром, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз).

Один вариант осуществления включает соединение, применяемое в изобретении, для применения в профилактике или лечении рака у пациента, отобранного из субпопуляции, имеющей рак p53 дикого типа или имеющей амплификацию MDM2.

Раковые заболевания могут представлять собой заболевания, чувствительные к лечению антагонистами MDM2. Раковые заболевания могут представлять собой заболевания, которые сверхэкспрессируют MDM2. Раковые заболевания могут представлять собой заболевания, связанные с p53 дикого типа.

Конкретные виды рака включают виды с амплификацией MDM2 и/или сверхэкспрессией MDM2, например, гепатоцеллюлярную карциному, рак легкого, саркомы, остеосаркомы и болезнь Ходжкина.

Конкретные виды рака включают рак с p53 дикого типа. Конкретные виды рака включают раковые клетки с p53 дикого типа, в частности, но не исключительно, если MDM2 экспрессируется на высоком уровне.

В одном варианте осуществления рак представляет собой p53-функциональную опухоль. В одном варианте осуществления это заболевание, подлежащее лечению, представляет собой p53-функциональную солидную опухоль и гематологические злокачественные новообразования. В другом варианте осуществления пациент, подлежащий лечению, имеет опухоль с мутацией p53, например, пациенты с ОМЛ с опухолью с мутацией p53.

В одном варианте осуществления рак представляет собой опухоль головного мозга, например, глиому или нейробластому.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак кожи, например, меланому.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак легкого, например НМРЛ или мезотелиому. В одном варианте осуществления рак представляет собой рак легкого, например мезотелиому. В одном варианте осуществления мезотелиома представляет собой злокачественную мезотелиому брюшины или злокачественную мезотелиому плевры.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта, например ЖКСО, рак желудка, колоректальный рак или рак кишечника.

В одном варианте осуществления рак представляет собой остеосаркому.

В одном варианте осуществления рак представляет собой липосаркому.

В одном варианте осуществления рак представляет собой саркому Юинга.

5 В одном варианте осуществления рак представляет собой липосаркому, саркому мягких тканей, остеосаркому, рак пищевода и некоторые детские злокачественные новообразования, включая В-клеточные злокачественные новообразования.

В одном варианте осуществления рак представляет собой колоректальный рак, рак молочной железы, легкого и головного мозга.

10 В одном варианте осуществления рак представляет собой детский рак.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак с p53 дикого типа.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак легкого, например, НМРЛ или мезотелиому, рак почки, например, СККП, или рак
15 головного мозга, такой как глиобластома.

В одном варианте осуществления рак представляет собой рак, который, как известно, демонстрирует утрату SKP2. В одном варианте осуществления рак представляет собой рак головного мозга, рак почки, например, светлоклеточную карциному почки (СККП) или СКПК, рак пищевода или меланому.

20 В одном варианте осуществления рак представляет собой опухоль эпителиального происхождения; опухоль мезенхимального происхождения; опухоль центральной или периферической нервной системы; эндокринную опухоль; опухоль глаза и придатков; герминогенную и трофобластическую опухоль; детскую и эмбриональную опухоль; или синдромы, врожденные или
25 иные, которые делают пациента восприимчивым к злокачественным новообразованиям. В одном варианте осуществления рак представляет собой опухоль эпителиального происхождения; опухоль мезенхимального происхождения; опухоль центральной или периферической нервной системы; эндокринную опухоль; опухоль глаза и придатков; герминогенную или
30 трофобластическую опухоль.

Является ли конкретный рак чувствительным к антагонистам MDM2, можно определить методом, изложенным в разделе «Методы диагностики».

В дополнительном аспекте предложено применение соединения для производства лекарственного средства для лечения заболевания или патологического состояния, описанного в данном документе, в частности, рака.

Некоторые виды рака резистентны к лечению конкретными лекарственными препаратами. Это может быть связано с типом опухоли (наиболее распространенные эпителиальные злокачественные новообразования по своей природе являются хеморезистентными, а рак предстательной железы является относительно устойчивым к доступным в настоящее время схемам химиотерапии или лучевой терапии), или резистентность может возникать спонтанно по мере прогрессирования заболевания или в результате лечения. В связи с этим, ссылки на рак предстательной железы включают рак предстательной железы с резистентностью к антиандрогенной терапии, в частности, к абиратерону или энзалутамиду, или кастрационно-резистентный рак предстательной железы. Аналогично, ссылки на множественную миелому включают нечувствительную к бортезомибу множественную миелому или рефрактерную множественную миелому, а ссылки на хронический миелогенный лейкоз включают нечувствительный к имитанибу хронический миелогенный лейкоз и рефрактерный хронический миелогенный лейкоз. В этом отношении, ссылки на мезотелиому включают мезотелиому с резистентностью к топоизомеразным ядам, алкилирующим агентам, антитубулинам, антифолатам, соединениям платины и лучевой терапии, в частности, мезотелиому, резистентную к цисплатину.

Соединения также могут быть полезны при лечении роста, патогенеза, резистентности к химио- и лучевой терапии опухолей путем сенсibilизации клеток к химиотерапии и в качестве антиметастатического агента.

Терапевтические противоопухолевые вмешательства всех типов обязательно увеличивают стрессы, налагаемые на опухолевые клетки-мишени. Антагонисты MDM2/p53 представляют собой класс химиотерапевтических средств, потенциально способных: (i) сенсibilизировать злокачественные клетки к противоопухолевым лекарственным средствам и/или методам лечения; (ii) облегчать или снижать частоту возникновения резистентности к противоопухолевым лекарственным средствам и/или методам лечения; (iii) обращать резистентность к противоопухолевым лекарственным средствам и/или методам лечения; (iv) усиливать активность противоопухолевых лекарственных

средств и/или методов лечения; (v) задерживать или предотвращать появление резистентности к противоопухолевым лекарственным средствам и/или методам лечения.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено
5 соединение для применения в лечении заболевания или патологического
состояния, которое опосредовано MDM2. В дополнительном варианте
осуществления заболевание или патологическое состояние, которое
опосредовано MDM2, представляет собой рак, который характеризуется
сверхэкспрессией и/или повышенной активностью MDM2 или высоким числом
10 копий MDM2 и/или p53 дикого типа.

В дополнительном аспекте предложено применение соединения для
производства лекарственного средства для лечения заболевания или
патологического состояния, описанного в данном документе, в частности, рака.

В одном варианте осуществления предложено соединение для применения
15 в профилактике или лечении заболевания или патологического состояния,
опосредованного MDM2/p53. В одном варианте осуществления предложено
соединение для ингибирования взаимодействия между белком MDM2 и p53.

В одном варианте осуществления предложена фармацевтическая
композиция, содержащая эффективное количество по меньшей мере одного
20 определенного соединения.

В одном варианте осуществления предложен способ профилактики или
лечения рака, включающий этапы введения млекопитающему лекарственного
средства, содержащего по меньшей мере одно определенное соединение.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ

25 Хотя активное соединение можно вводить отдельно, оно обычно
представлено в виде фармацевтической композиции (например, состава).

Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно предложены
фармацевтические композиции по определению выше и способы получения
фармацевтической композиции, содержащей (например, посредством
30 смешивания) по меньшей мере один антагонист MDM2, включая одно
соединение формулы (I^o) (и его подгруппы по определению в данном документе),
вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами и,
необязательно, другие терапевтические или профилактические агенты,
описанные в данном документе.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты могут быть выбраны, например, из носителей (например, твердого, жидкого или полутвердого носителя), адьювантов, разбавителей, наполнителей или объемообразующих агентов, гранулирующих агентов, агентов для нанесения покрытий, агентов, контролирующих высвобождение, связующих агентов, разрыхлителей, смазывающих агентов, консервантов, антиоксидантов, буферных агентов, суспендирующих агентов, загустителей, вкусовых агентов, подсластителей, агентов, маскирующих вкус, стабилизаторов или любых других эксципиентов, обычно используемых в фармацевтических композициях. Примеры эксципиентов для различных типов фармацевтических композиций более подробно описаны ниже.

В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый» относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках медицинского суждения являются подходящими для применения в контакте с тканями субъекта (например, человека) без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, в соответствии с разумным отношением польза/риск. Каждый эксципиент также должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами состава.

Фармацевтические композиции, содержащие антигонист MDM2, включая соединения формулы (I^o), можно составлять в соответствии с известными методиками, смотрите, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA.

Фармацевтические композиции могут находиться в любой форме, подходящей для перорального, парентерального, местного, интраназального, внутрибронхиального, сублингвального, офтальмологического, ушного, ректального, интравагинального или трансдермального введения. Когда композиции предназначены для парентерального введения, они могут быть составлены для внутривенного, внутримышечного, внутрибрюшинного, подкожного введения или для прямой доставки в орган или ткань-мишень путем инъекции, инфузии или с использованием других способов доставки. Доставка может быть болюсной инъекцией, кратковременной инфузией или более длительной инфузией и может быть пассивной доставкой или с использованием подходящего инфузионного насоса или шприцевой помпы.

Фармацевтические составы, пригодные для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты, соразтворители, поверхностно-активные вещества, смеси органических растворителей, комплексообразующие агенты на основе циклодекстрина, 5 эмульгаторы (для формирования и стабилизации эмульсионных составов), липосомные компоненты для образования липосом, гелеобразующие полимеры для формирования полимерных гелей, защитные средства для проведения лиофилизации и комбинации агентов для, помимо всего прочего, стабилизации 10 активного ингредиента в растворимой форме и придания препарату изотоничности с кровью предполагаемого реципиента. Фармацевтические составы для парентерального введения могут также иметь форму водных и неводных стерильных суспензий, которые могут содержать суспендирующие агенты и загустители (R. G. Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable 15 formulations, Pharmaceutical Research, Vol 21(2) 2004, p 201-230).

Композиции могут быть представлены в контейнерах с однократной дозой или с многократными дозами, например, в герметичных ампулах, флаконах и предварительно заполненных шприцах, и могут храниться в высушенном замораживанием (лиофилизированном) состоянии, требующем только 20 добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. В одном варианте осуществления состав предложен в виде активного фармацевтического ингредиента во флаконе для последующего восстановления с использованием подходящего разбавителя.

Фармацевтический состав можно получать путем лиофилизации антагонист 25 MDM2, включая соединение формулы (I^o), или его подгрупп. Лиофилизация относится к процедуре сушки композиции замораживанием. Таким образом, сушка вымораживанием и лиофилизация используются в данном документе как синонимы.

Инъекционные растворы и суспензии для немедленного введения могут 30 быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению для парентеральной инъекции могут также содержать фармацевтически приемлемые стерильные водные или неводные растворы, дисперсии, суспензии или эмульсии, а также стерильные порошки для восстановления до стерильных инъекционных

растворов или дисперсий непосредственно перед применением. Примеры подходящих водных и неводных носителей, разбавителей, растворителей или несущих сред включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), карбоксиметилцеллюлозу и ее 5 подходящие смеси, растительные масла (такие как подсолнечное масло, сафлоровое масло, кукурузное масло или оливковое масло) и пригодные для инъекций органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования загущающих материалов, таких как лецитин, посредством поддержания требуемого размера 10 частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Композиции по настоящему изобретению могут также содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов 15 может быть обеспечено путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение агентов для регулирования тоничности, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Длительная абсорбция инъекцируемой фармацевтической формы может быть 20 достигнута включением агентов, замедляющих абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В одном типичном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для внутривенного введения, например, путем инъекции или инфузии. Для 25 внутривенного введения перед введением раствор может дозироваться как есть, или может быть введен в инфузионный мешок (содержащий фармацевтически приемлемый эксципиент, такой как 0,9% физиологический раствор или 5% декстроза).

В другом типичном варианте осуществления фармацевтическая композиция 30 находится в форме, подходящей для подкожного (s.c.) введения.

Фармацевтические лекарственные формы, пригодные для перорального введения, включают таблетки (с покрытием или без покрытия), капсулы (с твердой или мягкой оболочкой), капли, пилюли, пастилки, сиропы, растворы,

порошки, гранулы, эликсиры и суспензии, сублингвальные таблетки, облатки или пластыри, такие как буккальные пластыри.

Таким образом, композиции таблеток могут содержать стандартную дозировку активного соединения вместе с инертным разбавителем или носителем, таким как сахар или сахароспирт, например; лактоза, сахароза, сорбит или маннит; и/или разбавителем, не полученным из сахара, таким как карбонат натрия, фосфат кальция, карбонат кальция или целлюлоза или ее производное, такое как микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и крахмалы, такие как кукурузный крахмал. Таблетки могут также содержать такие стандартные ингредиенты, как связующие и гранулирующие агенты, такие как поливинилпирролидон, разрыхлители (например, набухающие сшитые полимеры, такие как сшитая карбоксиметилцеллюлоза), смазывающие агенты (например, стеараты), консерванты (например, парабены), антиоксиданты (например, бутилированный гидрокситолуол (БГТ)), буферные агенты (например, фосфатный или цитратный буферы) и шипучие агенты, такие как смеси цитрат/бикарбонат. Такие эксципиенты хорошо известны и не требуют подробного описания в данном документе.

Таблетки могут быть предназначены для высвобождения лекарственного средства либо при контакте с желудочными жидкостями (таблетки с немедленным высвобождением), либо в контролируемых условиях (таблетки с контролируемым высвобождением) на протяжении длительного периода времени, либо в определенной области желудочно-кишечного тракта.

Капсульные составы могут находиться в капсулах из твердого желатина или мягкого желатина и могут содержать активный компонент в твердой, полутвердой или жидкой форме. Желатиновые капсулы могут быть изготовлены из животного желатина или его синтетических или растительных эквивалентов.

Твердые лекарственные формы (например, таблетки, капсулы и т.д.) могут иметь покрытия или быть без покрытий. Покрытия могут действовать либо как защитная пленка (например, полимер, воск или лак) или как механизм контроля высвобождения лекарственного средства, либо предназначены для эстетических целей или идентификации. Покрытие (например, полимер типа Eudragit™) может быть предназначено для высвобождения активного компонента в желаемом месте желудочно-кишечного тракта. Таким образом, покрытие может

быть выбрано так, чтобы оно разлагалось при определенных условиях рН в желудочно-кишечном тракте, тем самым избирательно высвобождая соединение в желудке или в подвздошной кишке, двенадцатиперстной кишке, тощей кишке или толстой кишке.

- 5 Вместо покрытия или в дополнение к покрытию лекарственный препарат может быть представлен в твердой матрице, содержащей агент, контролирующей высвобождение, например, агент, задерживающий высвобождение, который может быть предназначен для высвобождения соединения контролируемым образом в желудочно-кишечном тракте. В
- 10 альтернативном варианте, лекарственный препарат может быть представлен в полимерном покрытии, например, в полиметакрилатном полимерном покрытии, которое может быть предназначено для селективного высвобождения соединения в условиях различной кислотности или щелочности в желудочно-
- 15 кишечном тракте. В альтернативном варианте материал матрицы или покрытие, замедляющее высвобождение, может иметь форму разлагаемого полимера (например, полимера на основе малеинового ангидрида), который по существу непрерывно разлагается при прохождении лекарственной формы через
- 20 желудочно-кишечный тракт. В другом в альтернативном варианте покрытие может быть разработано для разложения под действием микробов в кишечнике.
- 25 В качестве дополнительной альтернативы активное соединение может быть включено в систему доставки, которая обеспечивает осмотический контроль высвобождения соединения. Осмотическое высвобождение и другие составы с отсроченным высвобождением или с замедленным высвобождением (например, составы на основе ионообменных смол) можно получать в соответствии со
- 30 способами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Антагонист MDM2, включая соединение формулы (I), можно составлять с носителем и вводить в форме наночастиц, причем увеличенная площадь поверхности наночастиц способствует их всасыванию. Кроме того, наночастицы дают возможность прямого проникновения в клетку. Системы доставки

30 лекарственных средств на основе наночастиц описаны в «Nanoparticle Technology for Drug Delivery», под редакцией Ram B. Gupta и Uday B. Kompella, Informa Healthcare, ISBN 9781574448573, опубликованной 13 марта 2006 г. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны в J. Control.

Release, 2003, 91 (1-2), 167-172, и в Sinha *et al.*, Mol. Cancer Ther. August 1, (2006) 5, 1909.

5 Фармацевтические композиции обычно содержат от около 1% (масс./масс.) до около 95% активного ингредиента и от 99% (масс./масс.) до 5% (масс./масс.) фармацевтически приемлемого эксципиента или комбинации эксципиентов.

Обычно композиции содержат от около 20% (масс./масс.) до около 90% (масс./масс.) активного ингредиента и от 80% (масс./масс.) до 10%

фармацевтически приемлемого эксципиента или комбинации эксципиентов.

10 Фармацевтические композиции содержат от около 1% до около 95%, обычно от около 20% до около 90% активного ингредиента. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут находиться, например, в форме стандартной дозы, такой как в ампулах, флаконах, суппозиториях, предварительно заполненных шприцах, драже, таблетках или капсулах.

15 Фармацевтически приемлемый эксципиент(ы) могут быть выбраны в соответствии с желаемой физической формой состава и могут, например, быть выбраны из разбавителей (например, твердых разбавителей, таких как наполнители или объемообразующие агенты, и жидких разбавителей, таких как растворители и соразтворители), разрыхлителей, буферных агентов, смазывающих веществ, средств, улучшающие текучесть, агентов, 20 контролирующих высвобождение (например, замедляющих или задерживающих высвобождение полимеров или восков), связующих, гранулирующих агентов, пигментов, пластификаторов, антиоксидантов, консервантов, вкусовых веществ, агентов, маскирующих вкус, агентов, регулирующих тоничность, и покровных агентов.

25 Квалифицированный специалист будет иметь опыт, позволяющий выбрать подходящее количество ингредиентов для применения в указанных составах. Например, таблетки и капсулы обычно содержат 0–20% разрыхлителей, 0–5% смазывающих веществ, 0–5% средств, улучшающих текучесть, и/или 0–99% (масс./масс.) наполнителей или объемообразующих средств (в зависимости от 30 дозы лекарства). Они также могут содержать 0–10% (масс./масс.) полимерных связующих, 0–5% (масс./масс.) антиоксидантов, 0–5% (масс./масс.) пигментов. Таблетки с замедленным высвобождением дополнительно содержат 0–99% (масс./масс.) полимеров (в зависимости от дозы). Пленочные покрытия таблетки или капсулы обычно содержат 0–10% (масс./масс.) контролирующих (например,

задерживающих) высвобождение полимеров, 0–3% (масс./масс.) пигментов и/или 0–2% (масс./масс.) пластификаторов.

5 Составы для парентерального введения обычно содержат 0–20% (масс./масс.) буферов, 0–50% (масс./масс.) соразтворителей и/или 0–99% (масс./масс.) воды для инъекций (WFI) (в зависимости от дозы и в случае лиофилизации). Составы для внутримышечных депо могут также содержать 0–99% (масс./масс.) масел.

10 Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть получены путем объединения активного ингредиента с твердыми носителями, при желании, гранулирования полученной смеси, и переработки смеси, если это желательно или необходимо, после добавления соответствующих наполнителей, в таблетки, ядра драже или капсулы. Они также могут быть включены в полимерную или восковую матрицу, которая позволяет активным ингредиентам диффундировать или высвободиться в отмеренных количествах.

15 Композиции соединений, применяемых в изобретении, также можно составлять в виде твердых дисперсий. Твердые дисперсии представляют собой однородные чрезвычайно тонкодисперсные фазы двух или более твердых веществ. Твердые растворы (молекулярно-дисперсные системы), один тип твердой дисперсии, хорошо известны для использования в фармацевтической 20 технологии (смотрите (Chiou and Riegelman, J. Pharm. Sci., 60, 1281-1300 (1971))) и пригодны для увеличения скорости растворения и увеличения биодоступности плохо растворимых в воде лекарственных средств.

В настоящем изобретении также предложены твердые лекарственные формы, содержащие твердый раствор, описанный в данном документе. Твердые 25 лекарственные формы включают таблетки, капсулы, жевательные таблетки и диспергируемые или шипучие таблетки. Известные эксципиенты могут быть смешаны с твердым раствором для получения желаемой лекарственной формы. Например, капсула может содержать твердый раствор, смешанный с (a) разрыхлителем и смазывающим веществом, или (b) разрыхлителем, 30 смазывающим веществом и поверхностно-активным веществом. Кроме того, капсула может содержать объемобразующий агент, такой как лактоза или микрористаллическая целлюлоза. Таблетка может содержать твердый раствор, смешанный с по меньшей мере одним разрыхлителем, смазывающим веществом, поверхностно-активным веществом, объемобразующим агентом и скользящим

веществом. Жевательная таблетка может содержать твердый раствор, смешанный с объемобразующим агентом, смазывающим веществом и, при желании, с дополнительным подсластителем (таким как искусственный подсластитель) и подходящими вкусовыми веществами. Твердые растворы также могут быть получены путем распыления растворов лекарственного средства и подходящего полимера на поверхность инертных носителей, таких как сахарные шарики (сахарная крупка нонпарель). Эти шарики впоследствии могут быть заполнены в капсулы или спрессованы в таблетки.

Фармацевтические препараты могут быть представлены пациенту в виде «упаковок для пациентов», содержащих полный курс лечения в одной упаковке, обычно в блистерной упаковке. Упаковки для пациентов имеют преимущество перед традиционными лекарственными прописями, когда фармацевт отделяет лекарство для пациента от нефасованного материала, заключающееся в том, что у пациента всегда есть доступ к вкладышу в упаковку, содержащемуся в упаковке для пациента, который обычно отсутствует в лекарственных прописях для пациентов. Было показано, что включение вкладыша в упаковку улучшает соблюдение пациентом указаний врача.

Композиции для местного применения и назальной доставки включают мази, кремы, спреи, пластыри, гели, жидкие капли и вкладыши (например, внутриглазные вкладыши). Такие композиции могут быть составлены в соответствии с известными способами.

Примеры составов для ректального или интравагинального введения включают pessaries и suppositories, которые могут быть, например, сформированы из формуемого или воскообразного материала, содержащего активное соединение. Для ректального введения могут также применяться растворы активного соединения.

Композиции для введения путем ингаляции могут принимать форму вдыхаемых порошковых композиций или жидких или порошковых спреев, и могут быть введены в стандартной форме с использованием устройств для порошковой ингаляции или устройств для распыления аэрозоля. Такие устройства хорошо известны. Для введения путем ингаляции порошкообразные составы обычно содержат активное соединение вместе с инертным твердым порошкообразным разбавителем, таким как лактоза.

Антагонист MDM2, включая соединения формулы (I^o), в общем случае будет представлен в единичной лекарственной форме и, следовательно, как правило, будет содержать достаточное количество соединения для обеспечения необходимого уровня биологической активности. Например, состав может
5 содержать от 1 нанограмма до 2 граммов активного ингредиента, например, от 1 нанограмма до 2 миллиграммов активного ингредиента. В пределах этих диапазонов, конкретные поддиапазоны содержания соединения составляют от 0,1 миллиграмма до 2 граммов активного ингредиента (чаще от 10 миллиграммов до 1 грамма, например, от 50 миллиграммов до 500
10 миллиграммов) или от 1 микрограмма до 20 миллиграммов (например, от 1 микрограмма до 10 миллиграммов, например, от 0,1 миллиграмма до 2 миллиграммов активного ингредиента).

Для пероральных композиций стандартная лекарственная форма может содержать от 1 миллиграмма до 2 граммов, чаще от 10 миллиграммов до 1
15 грамма, например, от 50 миллиграммов до 1 грамма, например, от 100 миллиграммов до 1 грамма, активного соединения.

Активное соединение будут вводить нуждающемуся в этом пациенту (например, человеку или животному) в количестве, достаточном для достижения
20 необходимого терапевтического эффекта.

Комбинации с другими противораковыми агентами

Антагонист MDM2 по определению в данном документе можно применять для профилактики или лечения ряда болезненных состояний или патологических состояний, опосредованных MDM2/p53. Примеры таких болезненных состояний и патологических состояний описаны выше.

25 Соединения обычно вводят субъекту, нуждающемуся в таком введении, например, человеку или животному, обычно человеку.

Соединения обычно вводят в количествах, которые являются терапевтически или профилактически полезными, и которые обычно нетоксичны. Однако в определенных ситуациях (например, в случае заболеваний,
30 угрожающих жизни) преимущества введения соединения формулы (I^o), могут перевешивать недостатки любых токсических эффектов или побочных эффектов, и в этом случае может считаться необходимым введение соединения в количествах, которые связаны с определенной степенью токсичности.

Соединения можно вводить в течение длительного периода времени для поддержания благоприятных терапевтических эффектов или можно вводить только в течение короткого периода времени. В альтернативном варианте их можно вводить непрерывно или способом, обеспечивающим интервальное
5 введение препарата (например, пульсирующим способом).

Типичная суточная доза антагонистов MDM2 может находиться в диапазоне от 100 пикограммов до 100 миллиграммов на килограмм массы тела, более типично от 5 нанограммов до 25 миллиграммов на килограмм массы тела и чаще всего от 10 нанограммов до 15 миллиграммов на килограмм (например, от
10 10 нанограммов до 10 миллиграммов и более типично от 1 микрограмма на килограмм до 20 миллиграммов на килограмм, например от 1 микрограмма до 10 миллиграммов на килограмм) на килограмм массы тела, хотя при необходимости можно вводить более высокие или более низкие дозы. Соединение формулы (I^o) можно вводить ежедневно или повторно, например, каждые 2, или 3, или 4, или
15 5, или 6, или 7, или 10, или 14, или 21, или 28 дней.

Дозировки также можно выразить как количество вводимого лекарственного препарата относительно площади поверхности тела пациента ($\text{мг}/\text{м}^2$). Типичная суточная доза антагонистов MDM2 может находиться в диапазоне от 3700 $\text{нг}/\text{м}^2$ до 3700 $\text{мг}/\text{м}^2$, более типично от 185 $\text{нг}/\text{м}^2$ до 925 $\text{мг}/\text{м}^2$ и
20 чаще от 370 $\text{нг}/\text{м}^2$ до 555 $\text{мг}/\text{м}^2$ (например, от 370 $\text{нг}/\text{м}^2$ до 370 $\text{мг}/\text{м}^2$ и более типично от 37 $\text{мг}/\text{м}^2$ до 740 $\text{мг}/\text{м}^2$, например от 37 $\text{мг}/\text{м}^2$ до 370 $\text{мг}/\text{м}^2$), хотя при необходимости можно вводить более высокие или более низкие дозы. Соединение, используемое в формуле (I^o), можно вводить ежедневно или повторно, например, каждые 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 10, или 14,
25 или 21, или 28 дней.

Соединения, применяемые в изобретении, можно вводить перорально в диапазоне доз, например от 0,1 до 5000 мг, или от 1 до 1500 мг, от 2 до 800 мг, или от 5 до 500 мг, например от 2 до 200 мг или от 10 до 1000 мг, конкретные
30 примеры доз включают 10, 20, 50 и 80 мг. Соединение можно вводить один или более раз в день. Соединение можно вводить непрерывно (т. е. принимать каждый день без перерыва в течение всей схемы лечения). В альтернативном варианте соединения можно вводить интервально (т. е. принимать непрерывно в течение определенного периода времени, такого как неделя, затем прекращать прием в течение периода времени, такого как неделя, и затем принимать

непрерывно в течение другого периода времени, такого как неделя, и так далее в течение всей схемы лечения). Примеры схем лечения, включающих интервальное введение, включают схемы, в которых введение осуществляется циклами: одна неделя приема с перерывом на одну неделю; или две недели приема, одна неделя перерыва; или три недели приема, одна неделя перерыва; или две недели приема, две недели перерыва; или четыре недели приема с двумя неделями перерыва; или одна неделя приема с трехнедельным перерывом в течение одного или более циклов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более циклов. Это прерывистое лечение также может быть основано на количестве дней, а не на полной неделе. Например, лечение может включать ежедневное введение дозы в течение от 1 до 6 дней, отсутствие введения дозы в течение от 1 до 6 дней, при этом эту схему повторяют в течение протокола лечения. Количество дней (или недель), в течение которых соединения, применяемые в изобретении, не вводят, не обязательно должно быть равным количеству дней (или недель), в течение которых соединения, применяемые в изобретении, вводят.

В одном варианте соединения, применяемые в изобретении, можно вводить в количествах от 3 мг/м^2 до 125 мг/м^2 ежедневно. Лечение может представлять собой непрерывное ежедневное введение или чаще состоять из нескольких циклов лечения, разделенных перерывами в лечении. Одним из примеров единичного цикла лечения является 5 последовательных ежедневных доз, за которыми следуют 3 недели без лечения.

Одна конкретная схема введения доз представляет собой один раз в день (например, перорально) в течение недели (например, 5 дней лечения) с последующим перерывом в лечении в течение 1, 2 или 3 недель. Альтернативная схема введения доз соответствует одному разу в неделю (например, перорально) в течение 1, 2, 3 или 4 недель.

В одном конкретном графике введения доз пациенту будут проводить инфузию соединения формулы (I^o) в течение одного часа ежедневно на протяжении до десяти дней, в частности до пяти дней в течение одной недели, при этом лечение будут повторять через необходимый интервал времени, такой как от двух до четырех недель, в частности каждые три недели.

Более конкретно, пациенту могут проводить инфузию соединения формулы (I⁰) в течение одного часа ежедневно в течение 5 дней и повторять лечение каждые три недели.

5 В другом конкретном графике введения доз пациенту проводят инфузию в течение от 30 минут до 1 часа с последующими поддерживающими инфузиями различной продолжительности, например от 1 до 5 часов, например 3 часа.

Соединения, применяемые в изобретении, также можно вводить в виде болюса или непрерывной инфузии. Соединение, применяемое в изобретении, можно вводить от одного раза в день до одного раза в неделю, или одного раза в 10 две недели, или одного раза в три недели, или одного раза в четыре недели в течение цикла лечения. При ежедневном введении в течение цикла лечения эта суточная доза может быть прерывистой в течение нескольких недель цикла лечения: например, введение дозы в течение недели (или нескольких дней), отсутствие введения дозы в течение недели (или нескольких дней), при этом 15 схему повторяют в течение цикла лечения.

В дополнительном конкретном графике введения доз пациенту проводят непрерывную инфузию в течение периода от 12 часов до 5 дней и, в частности, непрерывную инфузию в течение от 24 часов до 72 часов.

20 В конечном итоге количество вводимого соединения и тип применяемой композиции будут соответствовать природе заболевания или физиологического состояния, лечение которого проводят, и будут определены по усмотрению врача.

25 Может быть благоприятным применение соединения, применяемого в изобретении, в качестве единственного агента, или комбинирование соединения, применяемого в изобретении, с другим агентом, действующим посредством другого механизма регуляции роста клеток, воздействуя таким образом на два характерных признака развития рака. Эксперименты с комбинированным лечением можно проводить, например, как описано в Chou TC, Talalay P. 30 Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regulat* 1984; 22: 27–55.

Соединения, определенные в данном документе, можно вводить в качестве единственного терапевтического агента или их можно вводить в рамках комбинированной терапии с одним или более другими соединениями (или терапевтическими средствами) для лечения конкретного болезненного состояния,

например, неопластического заболевания, такого как рак, определенный выше. Для лечения вышеуказанных состояний соединения, применяемые в изобретении, можно предпочтительно применять в комбинации с одним или более другими лекарственными агентами, более конкретно, с другими противораковыми агентами или адъювантами (поддерживающими агентами в терапии) в терапии рака. Примеры других терапевтических агентов или вариантов лечения, которые можно применять вместе (одновременно или через разные интервалы времени) с антагонистами MDM2, включают, но не ограничиваются этим:

- Ингибиторы топоизомеразы I
- 10 • Антиметаболиты
- Агенты, нацеленные на тубулин
- ДНК-связывающие агенты и ингибиторы топоизомеразы II
- Алкилирующие агенты
- Моноклональные антитела
- 15 • Антигормональные агенты
- Ингибиторы передачи сигналов
- Ингибиторы протеасом
- Ингибиторы ДНК-метилтрансферазы
- Цитокины и ретиноиды
- 20 • Нацеленные на хроматин терапевтические средства;
- Лучевую терапию и
- Другие терапевтические или профилактические агенты.

Конкретные примеры противоопухолевых агентов или адъювантов (или их солей) включают, но не ограничиваются этим, любые из агентов, выбранных из групп (i)-(xlviii) и, необязательно, группы (xlix) ниже:

- (i) Соединения платины, например цисплатин (необязательно в сочетании с амифостином), карбоплатин или оксалиплатин;
- (ii) Соединения таксана, например паклитаксел, частицы паклитаксела, связанные с белком (АбраксанTM), доцетаксел, кабазитаксел или ларотаксел;
- 30 (iii) Ингибиторы топоизомеразы I, например соединения камптотецина, например, камптотецин, иринотекан (CPT11), SN-38 или топотекан;

(iv) Ингибиторы топоизомеразы II, например, противоопухолевые эпиподофиллотоксины или производные подофиллотоксина, например, этопозид или тенипозид;

(v) Алкалоиды барвинка, например винбластин, винкрестин, липосомальный винкрестин (Onco-TCS), винорелбин, виндезин, винфлунин или винвезир;

(vi) Производные нуклеозидов, например, 5-фторурацил (5-FU, необязательно в комбинации с лейковорином), гемцитабин, капецитабин, тегафур, UFT, S1, кладрибин, цитарабин (Ara-C, цитозинарабинозид), флударабин, клофарабин или неларабин;

(vii) Антиметаболиты, например, клофарабин, аминоптерин или метотрексат, азацитидин, цитарабин, флоксуридин, пентостатин, тиогуанин, тиопурин, 6-меркаптопурин или гидроксимочевина (гидроксикарбамид);

(viii) Алкилирующие агенты, такие как азотистый иприт или нитромочевина, например, циклофосфамид, хлорамбуцил, кармустин (BCNU), бендамустин, тиотепа, мелфалан, тресульфам, ломустин (CCNU), альтретамин, бусульфам, дакарбазин, эстрамустин, фотемустин, ифосфамид (необязательно в сочетании с месной), пипоброман, прокарбазин, стрептозоцин, темозоломид, урацил, мехлорэтамин, метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевина или нимустин (ACNU);

(ix) Антрациклины, антрацендионы и родственные препараты, например, даунорубицин, доксорубицин (необязательно, в комбинации с дексразоксаном), липосомальные препараты доксорубицина (например, каеликс™, миоцет™, доксил™), идарубицин, митоксантрон, эпирубицин, амсакрин или валрубицин;

(x) Эпотилоны, например, иксабепилон, патупилон, BMS-310705, KOS-862 и ZK-EPO, эпотилон А, эпотилон В, дезоксиэпотилон В (также известный как эпотилон D или KOS-862), аза-эпотилон В (также известный как BMS-247550), аулималид, изолаулималид или луэтеробин;

(xi) Ингибиторы ДНК-метилтрансферазы, например темозоломид, азацитидин или децитабин;

(xii) Антифолаты, например метотрексат, динатрий пеметрексед или ралтитрексед;

(xiii) Цитотоксические антибиотики, например антиномицин D, блеомицин, митомицин C, дактиномицин, карминомицин, дауномицин, левамизол, пликамицин или митрамицин;

5 (xiv) Тубулинсвязывающие агенты, например, комбрестатин, колхицины или нокодазол;

(xv) Ингибиторы передачи сигнала, такие как ингибиторы киназ, например, ингибиторы рецепторной тирозинкиназы (например, ингибиторы EGFR (рецептора эпителиального фактора роста), ингибиторы VEGFR (рецептора фактора роста эндотелия сосудов), ингибиторы PDGFR (рецептора
10 тромбоцитарного фактора роста), ингибиторы Ax1, МТК1 (мультитаргетные ингибиторы киназ), ингибиторы Raf, ингибиторы ROCK, ингибиторы mTOR, ингибиторы MEK или ингибиторы PI3K) например, иматиниба мезилат, эрлотиниб, gefitinib, дазатиниб, лапатиниб, довотиниб, акситиниб, нилотиниб, вандетаниб, ваталиниб, пазопаниб, сорафениб, сунитиниб, темсиролимус,
15 эверолимус (RAD 001), вемурафениб (PLX4032 или RG7204), дабрафениб, энкорафениб, селуметиниб (AZD6244), траметиниб (GSK121120212), дактолисиб (BEZ235), бупарлисиб (BKM-120; NVP-BKM-120), BYL719, копанлисиб (BAY-80-6946), ZSTK-474, CUDC-907, апитолисиб (GDC-0980; RG-7422), пиктилисиб (пиктрелисиб, GDC-0941, RG-7321), GDC-0032, GDC-0068, GSK-2636771,
20 иделалисиб (ранее CAL-101, GS 1101, GS-1101), MLN1117 (INK1117), MLN0128 (INK128), IPI-145 (INK1197), LY-3023414, ипатасертиб, афуресертиб, МК-2206, МК- 8156, LY-3023414, LY294002, SF1126 или PI-103, сонолисиб (PX-866) или AT13148.

(xvi) Ингибиторы аврора-киназы, например AT9283, барасертиб (AZD1152),
25 TAK-901, МК0457 (VX680), ценисертиб (R-763), данусертиб (PHA-739358), алисертиб (MLN-8237) или MP-470;

(xvii) Ингибиторы CDK, например, AT7519, росковитин, селициклиб, альвоцидиб (флавопиридол), динациклиб (SCH-727965), 7-гидрокси-стауроспорин (UCN-01), JNJ-7706621, BMS-387032 (или SNS-032), PHA533533,
30 ZK-304709 или AZD-5438, и включая ингибиторы CDK4, такие как палбоциклиб (PD332991) и рибоциклиб (LEE-011);

(xviii) Ингибиторы PKA/B и ингибиторы пути PKB (akt), например AT13148, AZ-5363, Semaphore, SF1126, и ингибиторы mTOR, такие как аналоги рапамицина, AP23841 и AP23573, ингибиторы кальмодулина (ингибиторы

транслокации forkhead), API-2/TCN (трицирибин), RX-0201, энзастаурин HCl (LY317615), NL-71-101, SR-13668, PX-316 или KRX-0401 (перифозин/NSC 639966);

(xix) Ингибиторы Hsp90, например, оналеспиб (AT13387), гербимицин, гелданамицин (GA), 17-аллиламино-17-десметоксигелданамицин (17-AAG), например, NSC-330507, Kos-953 и CNF-1010, 17-диметиламиноэтиламино-17-десметоксигелданамицина гидрохлорид (17-DMAG), например, NSC-707545 и Kos-1022, NVP-AUY922 (VER-52296), NVP-БЕР800, CNF-2024 (ВИБ-021, пероральный пурин), ганетеспиб (STA-9090), SNX-5422 (SC-102112) или IPI-504;

(xx) Моноклональные антитела (неконъюгированные или конъюгированные с радиоизотопами, токсинами или другими агентами), производные антител и родственные агенты, такие как анти-CD, анти-VEGFR, анти-HER2 или анти-EGFR антитела, например ритуксимаб (CD20), офатумумаб (CD20), ибритумомаб тиуксетан (CD20), GA101 (CD20), тозитумомаб (CD20), эпратузумаб (CD22), линтузумаб (CD33), гемтузумаб озогамидин (CD33), алемтузумаб (CD52), галиксимаб (CD80), трастузумаб (антитело к HER2), пертузумаб (HER2), трастузумаб-DM1 (HER2), эртумаксумаб (HER2 и CD3), цетуксимаб (EGFR), панитумумаб (EGFR), нецитумумаб (EGFR), нимотузумаб (EGFR), бевацизумаб (VEGF), катумаксумаб (ЕрСАМ и CD3), абаговомаб (CA125), фарлетузумаб (фолатный рецептор), элотузумаб (CS1), деносумаб (лиганд RANK), фигитумумаб (IGF1R), CP751,871 (IGF1R), мапатумумаб (рецептор TRAIL), метМАВ (met), митумомаб (ганглиозид GD3), наптумомаб эстафенатокс (5T4) или силтуксимаб (IL6), или иммуномодулирующие агенты, такие как блокирующие антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-1 и PD-L1 и/или PD-L2, например, ипилимумаб (CTLA4), МК-3475 (пембролизумаб, ранее ламбролизумаб, анти-PD-1), ниволумаб (анти-PD-1), BMS-936559 (анти-PD-L1), MPDL320A, AMP-514 или MEDI4736 (анти-PD-L1) или тремелимумаб (ранее тицилимумаб, CP-675,206, анти-CTLA-4);

(xxi) Антагонисты рецепторов эстрогена или селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM) или ингибиторы синтеза эстрогена, например, тамоксифен, фулвестрант, торемифен, дролоксифен, фаслодекс или ралоксифен;

(xxii) Ингибиторы ароматазы и родственные лекарственные препараты, такие как экземестан, анастрозол, летразол, тестолактон, аминоглутетимид, митоган или ворозол;

- (xxiii) Антиандрогены (т. е. антагонисты андрогеновых рецепторов) и родственные агенты, например, бикалутамид, нилутамид, флутамид, ципротерон или кетоконазол;
- (xxiv) Гормоны и их аналоги, такие как медроксипрогестерон,
5 диэтилстилбестрол (также известный как диэтилстилбоэстрол) или октреотид;
- (xxv) Стероиды, например, дромостанолон пропионат, мегестрола ацетат, нандролон (деканоат, фенпропионат), флуоксиместрон или госсипол;
- (xxvi) Ингибитор стероидного цитохрома P450 17-альфа-гидроксилазы-17,20-лиазы (CYP17), например, абиратерон;
- 10 (xxvii) Агонисты или антагонисты гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRAs), например, абареликс, гозерелина ацетат, гистрелина ацетат, лейпролида ацетат, трипторелин, бусерелин или деслорелин;
- (xxviii) Глюкокортикоиды, например, преднизон, преднизолон, дексаметазон;
- 15 (xxix) Дифференцирующие агенты, такие как ретиноиды, рексиноиды, витамин D или ретиновая кислота, и агенты, блокирующие метаболизм ретиновой кислоты (RAMBA), например, аккутан, алитретиноин, бексаротен или третиноин;
- (xxx) Ингибиторы фарнезилтрансферазы, например, типифарниб;
- 20 (xxxi) Терапии, нацеленные на хроматин, такие как ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), например, бутират натрия, субероиланилидгидроксамидная кислота (SANA), депсипептид (FR 901228), дацинонат (NVP-LAQ824), R306465/JNJ-16241199, JNJ-26481585, трихостатин А, воринонат, хламидоцин, А-173, JNJ-MGCD-0103, PXD-101 или апицидин;
- 25 (xxxii) Препараты, нацеленные на убиквитин-протеасомный путь, включая ингибиторы протеасом, например, бортезомиб, карфилзомиб, CEP-18770, MLN-9708 или ONX-0912; ингибиторы NEDD8; антагонист HDM2 и деубиквитиназы (DUB);
- (xxxiii) Фотодинамические препараты, например, порфирин натрия или
30 темопорфин;
- (xxxiv) Противораковые агенты, полученные из морских организмов, такие как трабектидин;
- (xxxv) Меченые радиоактивными изотопами препараты для радиоиммунотерапии, например, изотопами, испускающими бета-частицы

(например, йод-131, иттрий -90) или изотопами, испускающими альфа-частицы (например, висмут-213 или актиний-225), например, ибритумомаб, или йод-тозитумомаб, или альфа-радий 223;

(xxxvi) Ингибиторы теломеразы, например, теломестатин;

5 (xxxvii) Ингибиторы матриксных металлопротеиназ, например, батимастат, маримастат, приностат или метастат;

(xxxviii) Рекомбинантные интерфероны (такие как интерферон- γ и интерферон α) и интерлейкины (например, интерлейкин 2), например, альдеслейкин, денилейкин дифтитокс, интерферон-альфа 2a, интерферон-альфа 2b или пэгинтерферон-альфа 2b;

10 (xxxix) Селективные модуляторы иммунной реакции, например, талидомид или леналидомид;

(xl) Терапевтические вакцины, такие как sipuleucel-T (Provenge) или OncoVex;

15 (xli) Цитокин-активирующие агенты, включая пицибанил, ромуртид, сизофиран, вирулизин или тимозин;

(xlii) Триоксид мышьяка;

(xliii) Ингибиторы рецепторов, связанных с G-протеином (GPCR), например, атрасентан;

20 (xliv) Ферменты, такие как L-аспарагиназа, пэгаспаргаза, расбуриказа или пэгадемаза;

(xlv) Ингибиторы репарации ДНК, такие как ингибиторы PARP, например, олапариб, велапариб, инипариб, INO-1001, AG-014699 или ONO-2231;

25 (xlvi) Агонисты рецептора смерти (например, рецептор TNF-связанного лиганда, индуцирующего апоптоз (TRAIL)), такие как мапатумумаб (ранее HGS-ETR1), конатумумаб (ранее AMG 655), PRO95780, лексатумумаб, дуланермин, CS-1008, апомаб или рекомбинантные лиганды TRAIL, такие как рекомбинантный лиганд TRAIL/Аpo2 человека;

30 (xlvii) Варианты иммунотерапии, такие как ингибиторы иммунных контрольных точек; противораковые вакцины и терапия CAR-T-клетками;

(xlviii) Регуляторы клеточной гибели (апоптоза), включая антагонисты Bcl-2 (B-клеточной лимфомы 2), такие как венетоклакс (ABT-199 или GDC-0199), ABT-737, ABT-263, TW-37, сабутоклакс, обатоклакс и MIM1 и антагонисты IAP, включая LCL-161 (Novartis), Debio-1143 (Debiopharma/Ascenta), AZD5582,

биринапант/TL-32711 (TetraLogic), CUDC-427/GDC-0917/RG-7459 (Genentech), JP1201 (Joyant), T-3256336 (Takeda), GDC-0152 (Genentech) или HGS-1029/AEG-40826 (HGS/Aegera);

- (xlix) Профилактические агенты (добавки); т. е. агенты, которые
- 5 уменьшают или облегчают некоторые из побочных эффектов, связанных с химиотерапевтическими агентами, например,
- противорвотные средства,
 - агенты, которые предотвращают или сокращают продолжительность нейтропении, связанной с химиотерапией, и предотвращают осложнения,
- 10 возникающие из-за снижения уровня тромбоцитов, эритроцитов или лейкоцитов, например, интерлейкин-11 (например, опрелвекин), эритропоэтин (EPO) и его аналоги (например, дарбэпоэтин альфа), аналоги колониестимулирующего фактора, такие как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (например, сарграмостим) и гранулоцитарный
- 15 колониестимулирующий фактор (G-CSF) и их аналоги (например, филграстим, пэгфилграстим),
- агенты, которые ингибируют резорбцию костей, такие как деносумаб или бисфосфонаты, например, золедронат, золедроновая кислота, памидронат и ибандронат,
- 20 – агенты, которые подавляют воспалительные реакции, такие как дексаметазон, преднизон и преднизолон,
- агенты, используемые для снижения уровней гормона роста и IGF-I (и других гормонов) в крови у пациентов с акромегалией или другими редкими гормоновырабатывающими опухолями, такие как синтетические формы гормона
- 25 соматостатина, например, октреотида ацетат,
- антитоты к препаратам, снижающим уровни фолиевой кислоты, такие как лейковорин или фолиновая кислота,
 - обезболивающие средства, например, опиаты, такие как морфин, диаморфин и фентанил,
- 30 – нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), такие как ингибиторы СОХ-2, например, целекоксиб, эторикоксиб и лумиракоксиб,
- агенты против мукозита, например, палифермин,
 - агенты для лечения побочных эффектов, включая анорексию, кахексию, отек или тромбэмболические эпизоды, такие как мегестрола ацетат.

В одном варианте осуществления SKP2 биомаркер по изобретению можно использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с одним или более агентами, перечисленными в (i)–(xlix) выше. В одном варианте осуществления SKP2 биомаркер по изобретению можно использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с рекомбинантными интерферонами, ингибиторами репарации ДНК, такими как ингибиторы PARP; антагонистами IAP; соединениями платины; алкилирующими агентами и/или лучевой терапией.

В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента не подходит для лечения одним ингибитором MDM2 из-за наличия нормальных или высоких уровней SKP2, и, следовательно, пациента можно лечить ингибитором MDM2 в сочетании с дополнительным агентом, который можно использовать для повышения чувствительности опухоли к антагонисту MDM2. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальный или высокий уровень SKP2, и лечат её антагонистом MDM2 в сочетании с дополнительным противораковым агентом. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента характеризуется наличием SKP2, и/или нормальным уровнем или высокими уровнями экспрессии гена SKP2, и лечат её антагонистом MDM2 в сочетании с одним или более из перечисленных выше в (i)–(xlix) агентов.

В одном варианте осуществления SKP2 можно использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с одним или более из перечисленных выше в (i)–(xlix) агентов.

В одном варианте осуществления SKP2 можно использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с рекомбинантными интерферонами (такими как интерферон- γ и интерферон- α) и интерлейкинами (например, интерлейкином-2), например альдеслейкином, денилейкин-дифтитоксом, интерфероном-альфа 2a, интерфероном-альфа 2b или пэгинтерфероном-альфа 2b. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальный или высокий уровень SKP2, и лечат её антагонистом MDM2 в комбинации с одним или более рекомбинантными интерферонами.

В одном варианте осуществления SKP2 можно использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с ингибиторами

репарации ДНК, такими как ингибиторы PARP, например, олапарибом, велопарибом, инипарибом, INO-1001, AG-014699 или ONO-2231. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальный или высокий уровень SKP2, и лечат её антагонистом MDM2 в комбинации с ингибитором PARP. В одном варианте осуществления ингибитор PARP, например, выбран из олапариба, рукапариба, велипариба, инипариба, INO-1001, AG-014699, ONO-2231 и талазопариба.

В одном варианте осуществления SKP2 можно использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с антагонистами IAP, включая LCL-161 (Novartis), Debio-1143 (Debiopharma/Ascenta) (ксевинапант), AZD5582, Birinapant/TL-32711 (TetraLogic), CUDC-427/GDC-0917/RG-7459 (Genentech), JP1201 (Joyant), T-3256336 (Takeda), GDC-0152 (Genentech) или HGS-1029/AEG-40826 (HGS/Aegera). В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальный или высокий уровень SKP2, и лечат её антагонистом MDM2 в комбинации с антагонистом IAP. В одном варианте осуществления антагонист IAP, например, выбран из LCL-161 (Novartis), Debio-1143 (Debiopharma/Ascenta), AZD5582, Birinapant/TL-32711 (TetraLogic), CUDC-427/GDC-0917/RG-7459 (Genentech), JP1201 (Joyant), T-3256336 (Takeda), GDC-0152 (Genentech), ASTX660 (толинапант) и HGS-1029/AEG-40826 (HGS/Aegera). В одном варианте осуществления антагонисты IAP включают Debio-4028 или ингибитор Ascentage IAP, APG-1387. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальный или высокий уровень SKP2, и лечат её антагонистом MDM2 в комбинации с антагонистом IAP.

В одном варианте осуществления SKP2 можно использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с соединениями платины, например, цисплатином (необязательно в комбинации с амифостином), карбоплатином или оксалиплатином; алкилирующими агентами, такими как азотистый иприт или нитромочевина, например циклофосфамид, хлорамбуцил, кармустин (BCNU), бендамустин, тиотепа, мелфалан, треосульфат, ломустин (CCNU), альтретамин, бусульфат, дакарбазин, эстрамустин, фотемустин, ифосфамид (необязательно в комбинации с месной), пипоброман, прокарбазин, стрептозоцин, темозоломид, урацил, мехлорэтамин, метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевина или нимустин (ACNU), и/или

лучевой терапией. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальный или высокий уровень SKP2, и лечат её антагонистом MDM2 в сочетании с соединением платины, например, цисплатином (необязательно в сочетании с амифостином), карбоплатином или оксалиплатин; алкилирующими агентами, такими как азотистый иприт или нитромочевина, например циклофосфамид, хлорамбуцил, кармустин (BCNU), бендамустин, тиотепа, мелфалан, треосульфат, ломустин (CCNU), альтретамин, бусульфат, дакарбазин, эстрамустин, фотемустин, ифосфамид (необязательно в комбинации с месной), пипоброман, прокарбазин, стрептозоцин, темозоломид, урацил, мехлорэтамин, метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевина или нимустин (ACNU), и/или лучевой терапией. В одном варианте осуществления соединение платины выбрано, например, из цисплатина (необязательно, в сочетании с амифостином), карбоплатина, оксалиплатина, дициклоплатина, гептаплатина, лобаплатина, недаплатина, сатраплатина или тетранитрата триплатина, в частности цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина. В одном варианте осуществления алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты или нитрозомочевина, выбраны, например, из циклофосфамида, хлорамбуцила, кармустина (BCNU), амбамустина, бендамустина, тиотепа, мелфалана, треосульфата, ломустина (CCNU), бусульфата, дакарбазина, эстрамустина, фотемустина, ифосфамида (необязательно, в комбинации с месной), пипобромана, прокарбазина, стрептозоцина, темозоломида, урацила, мехлорэтамина, мехлорэтаминоксида гидрохлорида, метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевины, нимустина (ACNU), преднимустина, мехлорэтамина, этоглуцида; стрептозоцина, ирофульвена, митолактола, глюфосфамида, эвофосфамида, этилениминов или метилмеламинов, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триметилломеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилтиофосфорамид или триметилломеламин. В одном варианте осуществления биомаркер SKP2 по изобретению можно использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с лучевой терапией. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальный или высокий уровень SKP2, и лечат её антагонистом MDM2 в сочетании с лучевой терапией.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения рака у пациента, включающий этапы отбора пациента:

(a) имеющего нормальные или высокие уровни SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента; и

(b) введение указанному пациенту, отобранному на этапе (a), терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и агента для
5 индукции чувствительности к антагонисту MDM2, например, путем снижения уровней SKP2.

В одном варианте осуществления агент или лечение для индукции чувствительности, например, снижения уровней SKP2, представляет собой противораковый агент или вариант лечения. В одном варианте осуществления
10 агент или вариант лечения для индукции чувствительности, например, снижения уровней SKP2, представляет собой рекомбинантные интерфероны (такие как интерферон- γ и интерферон- α) и интерлейкины (например, интерлейкин-2), например альдеслейкин, денилейкин дифтитокс, интерферон альфа 2a, интерферон альфа 2b или пэгинтерферон альфа 2b, или ингибиторы репарации
15 ДНК, такие как ингибиторы PARP, или антагонисты IAP, или соединения платины, например, цисплатин (необязательно в сочетании с амифостином), карбоплатин или оксалиплатин; алкилирующие агенты, такие как азотистый иприт или нитромочевина, например, циклофосфамид, хлорамбуцил, кармустин (BCNU), бендамустин, тиотепа, мелфалан, треосульфат, ломустин (CCNU),
20 альтретамин, бусульфат, дакарбазин, эстрамустин, фотемустин, ифосфамид (необязательно в сочетании с месной), пипоброман, прокарбазин, стрептозоцин, темозоломид, урацил, мехлорэтамин, метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевину или нимустин (ACNU) и/или лучевую терапию.

В одном варианте осуществления агент или вариант лечения для индукции чувствительности, например, снижения уровней SKP2, выбирают из рекомбинантных интерферонов и интерлейкинов, ингибиторов репарации ДНК, антагонистов IAP или соединений платины. В одном варианте осуществления агент или вариант лечения для индукции чувствительности, например, снижения
30 уровней SKP2, представляет собой антагонист IAP.

В одном варианте осуществления агент или вариант лечения для инициации апоптоза представляет собой антагонист IAP. В одном варианте осуществления антагонист IAP представляет собой LCL-161 (Novartis), Debio-1143 (Debiopharma/Ascenta), AZD5582, Birinapant/TL-32711 (TetraLogic), CUDC-

427/GDC-0917/RG-7459 (Genentech), JP1201 (Joyant), T-3256336 (Takeda), GDC-0152 (Genentech) или HGS-1029/AEG-40826 (HGS/Aegera).

В одном варианте осуществления антагонист IAP представляет собой ASTX660, LCL-161 (Novartis), Debio-1143 (Debiopharma/Ascenta), AZD5582,
 5 Birinapant/TL-32711 (TetraLogic), CUDC-427/GDC-0917/RG-7459 (Genentech), JP1201 (Joyant), T-3256336 (Takeda), GDC-0152 (Genentech) или HGS-1029/AEG-40826 (HGS/Aegera). В одном варианте осуществления антагонисты IAP включают Debio-4028 или ингибитор Ascentage IAP, APG-1387. В одном варианте осуществления антагонист IAP представляет собой ASTX660
 10 (толинапант). В одном варианте осуществления изобретение относится к комбинации антагониста MDM2, например, (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты и ASTX660.

В одном аспекте в изобретении предложена комбинация
 15 (i) (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты («соединения изоиндолин-1-он») или его таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли; и
 (ii) 1-{6-[(4-фторфенил)метил]-5-(гидроксиметил)-3,3-диметил-1H,2H,3H-
 20 пирроло[3,2-b]пиридин-1-ил}-2-[(2R,5R)-5-метил-2-[(3R)-3-метилморфолин-4-ил]метил}пиперазин-1-ил]этан-1-она («ASTX660») или его таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

В частности, в этом аспекте изобретения предложена:

Комбинация, содержащая комбинацию, описанную в данном документе
 25 (например, комбинацию соединения изоиндолин-1-она или его таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли и ASTX660 или его таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли), и необязательно один или более (например, 1 или 2) других терапевтических агентов (например, противораковых агентов).

30 Комбинация, описанная в данном документе, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, причем соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или

фармацевтически приемлемая соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660, или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемая соль находятся в физической ассоциации.

5 Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе, причем соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемая соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемая соль: (a) находятся в примеси; (b) являются химически/физико-химически связанными; (c) являются химически/физико-химически упакованными; или (d) являются несмешанными, но совместно упакованными или совместно представленными.

15 Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе, причем соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемая соль и терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемая соль, не находятся в физической ассоциации.

25 Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе, при этом комбинация содержит: (a) по меньшей мере одно из двух или более соединений вместе с инструкциями по немедленному объединению по меньшей мере одного соединения с образованием физической ассоциации двух или более соединений; или (b) по меньшей мере одно из двух или более соединений вместе с инструкциями по комбинированной терапии двумя или более соединениями; или (c) по меньшей мере одно из двух или более соединений вместе с инструкциями по введению популяции пациентов, которым вводили (или вводят) другое(ие) из двух или более соединений; или (d) по меньшей мере одно из двух или более

соединений в количестве или в форме, которые специально адаптированы для применения в комбинации с другим(и) из двух или более соединений.

Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный
5 терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе, в форме фармацевтического набора или упаковки для пациентов.

Фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, содержащую
10 соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе.

Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный
15 терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическая композиция, содержащая описанную в данном документе комбинацию, для применения в терапии.

Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер,
20 или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, описанную в данном документе, для применения в профилактике или лечении болезненного состояния или патологического
25 состояния, описанного в данном документе.

Применение комбинации, содержащей соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и
дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер,
или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтической
30 композиции, содержащей комбинацию, описанную в данном документе, для производства лекарственного средства для применения в профилактике или лечении болезненного состояния или патологического состояния, описанного в данном документе.

Способ профилактики или лечения заболевания или патологического состояния, описанного в данном документе, включающий введение пациенту комбинации, содержащей соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию, описанную в данном документе.

Способ профилактики или лечения заболевания или патологического состояния, описанного в данном документе, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту (i) дополнительного терапевтического агента, например ASTX660 или его таутомера, *N*-оксида, фармацевтически приемлемой соли или сольвата и (ii) соединения изоиндолин-1-она, определенного в данном документе, или его таутомера, *N*-оксида, фармацевтически приемлемой соли или сольвата.

Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, для применения, описанную в данном документе, в частности, для применения в способе профилактики или лечения, описанном в данном документе, причем болезненное состояние или патологическое состояние опосредовано MDM2-p53.

Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию для применения, описанную в данном документе, или способ профилактики или лечения с использованием комбинации, описанной в данном документе, причем пациент отобран в соответствии с биомаркером SKP2, описанными в данном документе.

Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическая композиция,

содержащая комбинацию для применения, описанную в данном документе, или способ профилактики или лечения с использованием комбинации, описанной в данном документе, причем пациент отобран как имеющий опухоль, которая характеризуется нормальными или высокими уровнями SKP2.

5 Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию для применения, описанную в данном документе, или
10 способ профилактики или лечения с использованием комбинации, описанной в данном документе, причем болезненное состояние или патологическое состояние представляет собой рак.

Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный
15 терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию для применения, описанную в данном документе, или способ профилактики или лечения с использованием комбинации, описанной в
данном документе, причем болезненное состояние или патологическое
20 состояние представляет собой рак, который представляет собой острый миелоидный лейкоз.

Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный
терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или
25 фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе, для применения, описанного в данном документе, для профилактики или лечения острого миелоидного лейкоза.

Соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в профилактике или лечении
30 болезненного состояния или патологического состояния, описанного в данном документе, причем соединение изоиндолин-1-она используют в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, например ASTX660 или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

Соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в профилактике или лечении рака, описанного в данном документе, причем соединение изоиндолин-1-она используют в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, например ASTX660 или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

ASTX660 или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в профилактике или лечении болезненного состояния или патологического состояния, описанного в данном документе, причем терапевтический агент используют в комбинации с соединением изоиндолин-1-она или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

Соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в профилактике, лечении или контроле рака у нуждающегося в этом пациента в комбинированной терапии с дополнительным терапевтическим агентом, например ASTX660, или его таутомером, или сольватом, или фармацевтически приемлемой солью, и необязательно с одним или более другими терапевтическими агентами.

Применение соединения изоиндолин-1-она или его таутомера, *N*-оксида, фармацевтически приемлемой соли или сольвата для производства лекарственного средства для лечения рака, причем пациент проходит лечение другим терапевтическим агентом, например ASTX660, или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

Применение терапевтического агента, например ASTX660 или его таутомера, *N*-оксида, фармацевтически приемлемой соли или сольвата, для производства лекарственного средства для лечения рака, при этом пациент проходит лечение соединением изоиндолин-1-она или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом, описанным в данном документе.

Применение соединения изоиндолин-1-она или его таутомера, *N*-оксида, фармацевтически приемлемой соли или сольвата для производства лекарственного средства для применения для увеличения или потенцирования скорости ответа у пациента, имеющего рак, при этом пациент проходит лечение

другим терапевтическим агентом, например ASTX660 или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

Соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в лечении заболевания или патологического состояния, включающего или возникающего в результате аномального роста клеток у млекопитающего, при этом млекопитающее подвергают лечению другим терапевтическим агентом, например ASTX660 или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

Соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения для облегчения или снижения частоты возникновения заболевания или патологического состояния, включающего или возникающего в результате аномального роста клеток у млекопитающего, при этом млекопитающее подвергают лечению другим терапевтическим агентом, например ASTX660 или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

Применение комбинации, описанной в данном документе (например, комбинации, содержащей соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль) в производстве фармацевтической композиции для ингибирования роста опухолевых клеток.

Продукт, содержащий в качестве первого активного ингредиента соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, а также в качестве дополнительного активного ингредиента дополнительный терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, в виде комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении рака.

В одном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент, используемый в комбинации, представляет собой агент или вариант лечения для снижения уровней SKP2. В одном варианте осуществления агент или вариант лечения для снижения уровней SKP2 представляет собой рекомбинантные интерфероны (такие как интерферон- γ и интерферон- α) и интерлейкины (например, интерлейкин-2), например альдеслейкин, денилейкин дифтитокс,

интерферон альфа 2а, интерферон альфа 2b или пэгинтерферон альфа 2b, или ингибиторы репарации ДНК, такие как ингибиторы PARP, или антагонисты IAP, или соединения платины, например цисплатин (необязательно в сочетании с амифостоином), карбоплатин или оксалиплатин; алкилирующие агенты, такие как азотистый иприт или нитромочевина, например, циклофосфамид, хлорамбуцил, кармустин (BCNU), бендамустин, тиотепа, мелфалан, треосульфат, ломустин (CCNU), альтретамин, бусульфат, дакарбазин, эстрамустин, фотемустин, ифосфамид (необязательно в сочетании с месной), пипоброман, прокарбазин, стрептозоцин, темозоломид, урацил, мехлорэтамин, метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевину или нимустин (ACNU) и/или лучевую терапию.

Конкретный способ получения, выделения и очистки 1-{6-[(4-фторфенил)метил]-5-(гидроксиметил)-3,3-диметил-1H,2H,3H-пирроло[3,2-b]пиридин-1-ил}-2-[(2R,5R)-5-метил-2-[(3R)-3-метилморфолин-4-ил]метил}пиперазин-1-ил]этан-1-она (ASTX660) и его фармацевтически приемлемых солей, включая лактатную соль, можно найти в примере 2 в заявке на международный патент № PCT/GB2014/053778, которая была опубликована как WO 2015/092420 25.06.2015. В одном варианте осуществления это лактатная соль 1-{6-[(4-фторфенил)метил]-5-(гидроксиметил)-3,3-диметил-1H,2H,3H-пирроло[3,2-b]пиридин-1-ил}-2-[(2R,5R)-5-метил-2-[(3R)-3-метилморфолин-4-ил]метил}пиперазин-1-ил]этан-1-она.

Каждое из соединений, присутствующих в комбинациях по изобретению, можно вводить по индивидуально варьирующимся графикам введения доз и разными путями. Фактически, позология каждого из двух или более агентов может различаться: каждый из них можно вводить в одно и то же время или в разные моменты времени. Специалист в данной области техники на основе своих общих знаний должен знать, какие схемы введения доз и варианты комбинированной терапии следует использовать. Например, соединение, применяемое в изобретении, можно применять в комбинации с одним или более другими агентами, которые вводят в соответствии с их существующей комбинированной схемой. Примеры стандартных комбинированных схем приведены ниже.

Соединение таксана предпочтительно вводить в дозе от 50 до 400 мг на квадратный метр ($\text{мг}/\text{м}^2$) площади поверхности тела, например, от 75 до 250

мг/м², в частности, в случае паклитаксела – в дозе от около 175 до 250 мг/м², а в случае доцетаксела – от около 75 до 150 мг/м² на курс лечения.

Соединение камптотецин предпочтительно вводить в дозе от 0,1 до 400 мг на квадратный метр (мг/м²) площади поверхности тела, например, от 1 до 300 мг/м², в частности, в случае иринотекана – в дозе от около 100 до 350 мг/м², а в случае топотекана – от около 1 до 2 мг/м² на курс лечения.

Производное противоопухолевого подофиллотоксина предпочтительно вводить в дозе от 30 до 300 мг на квадратный метр (мг/м²) площади поверхности тела, например, от 50 до 250 мг/м², в частности, в случае этопозиды – в дозе от около 35 до 100 мг/м², а в случае тенипозиды – от около 50 до 250 мг/м² на курс лечения.

Противоопухолевый алкалоид барвинка предпочтительно вводить в дозе от 2 до 30 мг на квадратный метр (мг/м²) площади поверхности тела, в частности, в случае винбластина – в дозе от около 3 до 12 мг/м², в случае винкристина – в дозе от 1 до 2 мг/м², а в случае винорелбина – в дозе от около 10 до 30 мг/м² на курс лечения.

Производное противоопухолевого нуклеозида предпочтительно вводить в дозе от 200 до 2500 мг на квадратный метр (мг/м²) площади поверхности тела, например, от 700 до 1500 мг/м², в частности, в случае 5-FU – в дозе от 200 до 500 мг/м², в случае гемцитабина – в дозе от около 800 до 1200 мг/м², а в случае капецитабина – в дозе от около 1000 до 2500 мг/м² на курс лечения.

Алкилирующие агенты, такие как азотистый иприт или нитромочевина, предпочтительно вводить в дозе от 100 до 500 мг на квадратный метр (мг/м²) площади поверхности тела, например, от 120 до 200 мг/м², в частности, в случае циклофосфана – в дозе от около 100 до 500 мг/м², в случае хлорамбуцила – в дозе от около 0,1 до 0,2 мг/кг, в случае кармустина – в дозе от около 150 до 200 мг/м², а в случае ломустина – в дозе от около 100 до 150 мг/м² на курс лечения.

Противоопухолевое производное антрациклина предпочтительно вводить в дозе от 10 до 75 мг на квадратный метр (мг/м²) площади поверхности тела, например от 15 до 60 мг/м², в частности, в случае доксорубицина – в дозе от около 40 до 75 мг/м², в случае даунорубицина – в дозе от около 25 до 45 мг/м², а в случае идарубицина – в дозе от около 10 до 15 мг/м² на курс лечения.

Антиэстрогенный агент предпочтительно вводить в дозе от около 1 до 100 мг в день в зависимости от конкретного агента и состояния, которое лечат.

Тамоксифен предпочтительно вводить перорально в дозе от 5 до 50 мг, как правило, от 10 до 20 мг два раза в день, продолжая терапию в течение времени, достаточного для достижения и поддержания терапевтического эффекта.

Торемифен предпочтительно вводить перорально в дозе около 60 мг один раз в день, продолжая терапию в течение времени, достаточного для достижения и поддержания терапевтического эффекта. Анастрозол предпочтительно вводить перорально в дозе около 1 мг один раз в день. Дролоксифен предпочтительно вводить перорально в дозе около 20–100 мг один раз в день. Ралоксифен предпочтительно вводить перорально в дозе около 60 мг один раз в день. Экземестан предпочтительно вводить перорально в дозе около 25 мг один раз в день.

Антитела предпочтительно вводить в дозе от около 1 до 5 мг на квадратный метр ($\text{мг}/\text{м}^2$) площади поверхности тела или в дозе, известной в данной области техники, если она отличается. Трастузумаб предпочтительно вводить в дозе от 1 до 5 мг на квадратный метр ($\text{мг}/\text{м}^2$) площади поверхности тела, в частности от 2 до 4 $\text{мг}/\text{м}^2$ на курс лечения.

Когда соединение формулы (I^o) вводят в комбинированной терапии с одним, двумя, тремя, четырьмя или более другими терапевтическими агентами (обычно, одним или двумя, чаще одним), соединения можно вводить одновременно или последовательно. В последнем случае два или более соединений будут вводить в течение периода времени и в количестве и способом, которые достаточны для обеспечения достижения благоприятного или синергетического эффекта. При последовательном введении их можно вводить с небольшими интервалами (например, в течение 5–10 минут) или с более длительными интервалами (например, с интервалом 1, 2, 3, 4 или более часов или даже с более длительными интервалами, если это необходимо), причем точная схема введения доз должна быть совместимой со свойствами терапевтического(их) агента(ов). Эти дозировки можно вводить, например, один, два или более раз за курс лечения, который можно повторять, например, каждые 7, 14, 21 или 28 дней.

Понятно, что типичный способ и порядок введения, а также соответствующие дозы и схемы введения доз для каждого компонента комбинации будут зависеть от конкретного другого лекарственного средства и

соединения, применяемого в изобретении, которые вводят, от способа их введения, конкретной опухоли, лечение которой проводят, и конкретного хозяина, лечение которого проводят. Специалисты в данной области техники легко могут определить оптимальный способ и порядок введения, а также дозы и
5 схемы введения доз с использованием традиционных способов и с учетом изложенной в данном документе информации.

Специалисты в данной области техники могут определить массовое соотношение соединения в соответствии с настоящим изобретением и одного или более других противораковых агентов, при их применении в виде
10 комбинации. Указанное соотношение, точная дозировка и частота введения зависят от конкретного соединения в соответствии с изобретением и другого(их) используемого(ых) противоракового(ых) агента(ов), конкретного состояния, лечение которого проводят, тяжести состояния, лечение которого проводят, возраста, массы, пола, рациона, времени введения и общего физического
15 состояния конкретного пациента, способа введения, а также других лекарственных средств, которые может принимать индивид, как хорошо известно специалистам в данной области техники. Кроме того, очевидно, что эффективное суточное количество можно уменьшать или увеличивать в зависимости от ответа субъекта, проходящего лечение, и/или в зависимости от
20 оценки врача, назначающего соединение, используемые в настоящем изобретении. Конкретное массовое соотношение для представленных антагонистов MDM2 и другого противоракового агента может находиться в диапазоне от 1/10 до 10/1, более конкретно от 1/5 до 5/1, еще более конкретно от 1/3 до 3/1.

На уровне Skp2 может влиять снижение экспрессии генов, например, передача сигналов Notch1 индуцирует экспрессию гена Skp2, а ингибирование пути Notch1 снижает уровни Skp2. Путь IKK-NF-kB также регулирует экспрессию гена Skp2 посредством связывания p52/RelA или p52/RelB с промотором Skp2, а снижение передачи сигналов факторам транскрипции NFkB
30 будет снижать экспрессию Skp2. Другим путем, регулирующим экспрессию гена Skp2, является путь фосфоинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt, таким образом, ингибирование активности PI3K с помощью PI3Ki или AKTi снижает уровни мРНК Skp2. Регуляторы в обратном направлении пути PI3K/AKT, такие как BCR-ABL и HER2, также регулируют экспрессию Skp2.

Помимо регуляции на уровне экспрессии, skp2 может регулироваться стабильностью белка. Фосфорилирование SKP2, например, с помощью АКТ или CDK2, ослабляет убиквитинирование и разложение SKP2. Следовательно, ингибирование фосфорилирования SKP2 является еще одним способом

5 снижения уровней белка SKP2.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP2, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для отбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с агентом, описанным в пунктах (i)-(xlix) ниже.

10 В одном варианте осуществления определено, что опухоль пациента не подходит для лечения одним агентом, ингибитором MDM2, из-за присутствия высоких или повышенных уровней SKP2 и, следовательно, лечение дополнительным агентом может быть использовано для запуска низкого или

15 сниженного уровня SKP2 в сочетании с ингибитором MDM2. В одном варианте осуществления определяется, что опухоль пациента имеет высокий уровень SKP2, и ее лечат антагонистом MDM2 в сочетании с дополнительным противораковым средством. В одном варианте осуществления опухоль пациента определяется как имеющая высокий уровень SKP2, и ее лечат антагонистом MDM2 в сочетании с одним или несколькими агентами, перечисленными в

20 пунктах (i) – (xlix) ниже.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами АКТ, ингибиторами CDK2, ингибиторами пути

25 Notch1, ингибиторами пути фосфоинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt, ингибиторами пути IKK-NF-kB, ингибиторами BCR-ABL и/или ингибиторами HER2.

В одном варианте осуществления опухоль пациента определяется как имеющая высокий уровень SKP2, и ее лечат антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами АКТ, ингибиторами CDK2, ингибиторами пути Notch1,

30 ингибиторами пути фосфоинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt, ингибиторами пути IKK-NF-kB, ингибиторами BCR-ABL и/или ингибиторами HER2.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в

- сочетании с ингибиторами CDK2. В одном варианте осуществления ингибиторы CDK2 выбирают из таких как: АТ7519, росковитин, селициклиб, альвоцидид (флавопиридол), абемациклиб, динациклиб (SCH-727965), 7-гидрокситауроспорин (UCN-01), JNJ-7706621, BMS-387032 (также известный как SNS-032), PNA533533, ZK-304709, зотирациклиб и AZD-5438. Дополнительные ингибиторы CDK2 включают PNA-793887, PNA-690509, PF-07104091, ронициклиб (BAY-1000394), милциклиб (PNA-848125), NUV-422, ебвациклиб (PF-06873600), FN-1501, фадрациклиб (CYS-065), AGM-130, R-547, AG-24322 и ПММ-290.
- 10 В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами пути Notch1. Одним таким ингибитором Notch является пиктилисиб.
- 15 В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами пути фосфоинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt, в частности, ингибиторами активности PI3K с помощью PI3Ki или AKTi.
- 20 В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами пути IKK-NF-kB, например, через связывание p52/RelA или p52/RelB с промотором Skp2 и снижение передачи сигналов факторам транскрипции NFkB. В одном варианте осуществления ингибитор пути IKK-NF-kB представляет собой ингибитор IкВ киназы (IKK). В одном варианте осуществления ингибитор пути IKK-NF-kB представляет собой ингибитор киназы, индуцирующей ядерный фактор каппа В (NIK или MAP3K14). Одним конкретным соединением является ингибитор Nik TRC694 от Janssen.
- 25 факторам транскрипции NFkB. В одном варианте осуществления ингибитор пути IKK-NF-kB представляет собой ингибитор IRAK. В одном варианте осуществления ингибитор пути IKK-NF-kB представляет собой такой как PF-06650833, R-835, пакритиниб, CA-4948, BAY-1830839.
- 30

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению, в частности SKP2 и/или субстраты SKP, перечисленные в настоящем документе, можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в сочетании с ингибиторами BCR-ABL и/или ингибиторами HER2. Один такой ингибитор BCR-ABL представляет собой асциминиб, а также иматиниб, асциминиб (Vcr-Abl), флуматиниб (Abl), босутиниб, дазатиниб, олверембатиниб, акситиниб, нилотиниб, саракатиниб (AZD-0530), понатиниб. Дополнительные ингибиторы BCR-ABL включают радотиниб (Supect, IY-5511), бафетиниб (INNO-406, NS-187), водобатиниб (K-0706), ребастиниб (DCC-2036), NPB-001056, NRC-AN-019, PF-114, AEG-41174 или AZD-0424. В одном варианте осуществления ингибитор BCR-ABL представляет собой иматиниб, дазатиниб, понатиниб.

Ингибиторы HER2 включают афатиниб (двойной EGFR/HER2) или антитела к HER2, такие как трастузумаб, пертузумаб, трастузумаб-DM1, эртумаксамаб. Другие ингибиторы HER2 включают тукатиниб (Tukysa, ARRY-380, MK-7119, ONT-380, ирбинитиниб), пиротиниб (Aiguini, SHR-1258), дакомитиниб (Vizimpro, PF-00299804), мобоцертиниб (AP-32788, TAK-788), варлитиниб (ARRY-334543, ASLAN-001; LINO-1608, SPS-4370, QBT-01), тарлоксотиниб (Tarlox, PR-610, SN-33999, TH-4000), позиотиниб (HM-781-36, NOV-120101), эпертиниб (S-222611), сапитиниб (AZD-8931), мубритиниб (TAK-165), канертиниб (CI-1033, PD-183805) или селатиниб, CP-724714 (HY-14674). Дополнительные антитела к HER2 включают маргетуксимаб (Margenza, MGAH-22) или копрелотамаб (GB-221), B-002. В одном варианте осуществления ингибитор HER представляет собой лапатиниб, нератиниб, трастузумаб.

Термин «ингибитор пути PI3K/AKT» используется в настоящем документе для определения соединения, которое ингибирует активацию AKT, активность самой киназы или модулирует нижестоящие мишени, блокируя пролиферативные эффекты и эффекты выживания клеток пути (включая один или несколько из целевых ферментов в пути, как описано в настоящем документе, включая фосфатидилинозитол-3 киназу (PI3K), AKT, мишень рапамицина млекопитающих (mTOR), PDK-1, p70 S6 киназу и *forkhead* транслокацию).

Ингибиторы пути PI3K/AKT включают ингибиторы PKA/B и/или PKB (akt), ингибиторы PI3K, ингибиторы mTOR и/или ингибиторы кальмодулина (ингибиторы forkhead транслокации).

Примеры ингибиторов пути PI3K/AKT включают ингибиторы PI3K, такие как апитолисиб, бупарлисиб, копанлисиб, пиктилисиб, дактолисиб, иделалисиб, серабелисиб, дювелисиб, ипатасертиб, алпелисиб, афуресертиб, паксалисиб, сонолисиб, пиларалисиб, фимепинонат (CUDC-907), SKLB-1028, GSK1059615 (PI3K), ZSTK-474, GSK-2636771, самотолисиб (LY-3023414), LY294002, SF1126 и PI-103. Другие примеры включают умбралисиб (Ukoniq, RP-5264, TGR-1202), инаволисиб (GDC-0077, RG-6114, RO-7113755), парсаклисиб (IBI-376, INCB-050465), занделисиб (ACC-524, ME-401, PW-143), лениолисиб (CDZ-173), линперлисиб (YY-20394), эганелисиб (IPI-549), теналисиб (RP-6530), селеталисиб (UCB-5857), дезапелисиб (INCB-040093), немиралисиб (GSK-2269557), бимиралисиб (NCB-5, PQR-309), воксталисиб (SAR-245409, XL-765), панулисиб (P-7170), гедатолисиб (PF-05212384), таселисиб (GDC-0032, RG-7604), пуквитиниб (XC-302), акалисиб (CAL-120, GS-9820) или омипалисиб (GSK-2126458).

Конкретные ингибиторы PI3K включают апитолисиб, бупарлисиб, копанлисиб, пиктилисиб, ZSTK-474, фимепинонат (CUDC-907), GSK-2636771 и LY-3023414.

Альтернативные конкретные ингибиторы PI3K включают апитолисиб, бупарлисиб, копанлисиб, пиктилисиб, дактолисиб, иделалисиб, серабелисиб, дювелисиб, ипатасертиб, алпелисиб, афуресертиб, паксалисиб, сонолисиб, пиларалисиб, фимепинонат или самотолисиб.

Примеры ингибиторов пути PI3K/AKT также включают ингибиторы mTOR, такие как сиролимус (первоначально известный как рапамицин) и аналоги рапамицина, такие как RAD 001 (эверолимус), CCI 779 (темсиролемус) и рифафоролимус (AP23573) или сапанисертиб (MLN0128 (INK128), двойной ингибитор комплекса mTOR I (mTORC1) и mTORC2. Другие примеры включают зотаролимус (ABT-578), эверолимус (Afinitor, RAD-001), сиролимус (рапамун, рапамицин), фосциклопирокс (CPX-POM), CC-115, BI-860585 (XP-105), онатасертиб (ATG-008, CC-223) или вистусертиб (AZD-2014).

Ингибиторы пути PI3K/AKT также включают ингибиторы mTOR, такие как аналоги рапамицина, AP23841 и AP23573, ингибиторы кальмодулина

(ингибиторы *forkhead* транслокации), API-2/TCN (трицирибин), RX-0201, энзастаурин HCl (LY317615), NL-71-101, SR-13668, PX-316 или KRX-0401 (перифозин/NSC 639966);

5 Примеры ингибиторов пути PI3K/AKT включают ингибиторы *forkhead* транслокации, такие как ингибитор кальмодулина, т.е. СВР-501. Ингибиторы кальмодулина из Гарварда представляют собой ингибиторы *forkhead* транслокации.

10 Примеры ингибиторов пути PI3K/AKT включают АКТ ингибиторы, такие как перифозин, ипатасертиб, упрасертиб, афуресертиб, МК-2206, МК-8156, АТ13148, капивасертиб (AZD5363), трицирибин, энзастаурин, XL-418, GSK-690693 и RX-0201.

Конкретные ингибиторы АКТ включают перифозин, ипатасертиб, афуресертиб, МК-2206, МК-8156, АТ13148 и AZD-5363.

15 Конкретные ингибиторы АКТ включают ипатасертиб, упрасертиб, афуресертиб, капивасертиб.

В одном варианте осуществления ингибитор пути PI3K/AKT представляет собой ингибитор PI3K, выбранный из одного или нескольких конкретных соединений, описанных выше. В одном варианте осуществления ингибитор пути PI3K/AKT представляет собой PI-103 или LY294002.

20 В одном варианте осуществления предлагается комбинация антагониста MDM2, как описано в настоящем документе, и ингибитора пути PI3K/AKT, выбранного из: апитолисиба, бупарлисиба, копанлисиба, пиктилисиба, ZSTK-474, CUDC-907, GSK-2636771, LY-3023414, ипатасертиба, афуресертиб, МК-2206, МК-8156, идедалисиба, BEZ235 (дактолисиб), BYL719, GDC-0980, GDC-25 0941, GDC-0032 и GDC-0068.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения рака у пациента, при этом указанный способ включает этапы отбора пациента:

- (а) наличие высоких уровней SKP2 (или низких уровней субстратов SKP2) в биологическом образце, полученном от указанного пациента; и
- 30 (б) введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и агента для снижения уровня SKP2 указанному пациенту, выбранному на этапе (а).

Соединения, применяемые в настоящем изобретении, также можно вводить в сочетании с нехимиотерапевтическими вариантами лечения, такими как

лучевая терапия, фотодинамическая терапия, генная терапия; хирургия и контролируемый рацион. Лучевую терапию можно применять в радикальных, паллиативных, адъювантных, неоадъювантных или профилактических целях.

Соединения, применяемые в настоящем изобретении, также имеют
5 терапевтическое применение для сенсбилизации опухолевых клеток к лучевой терапии и химиотерапии. Таким образом, соединения, применяемые в настоящем изобретении, можно использовать в качестве «радиосенсбилизатора» и/или «хемосенсбилизатора», или их можно вводить в комбинации с другим «радиосенсбилизатором» и/или «хемосенсбилизатором». В одном варианте
10 осуществления соединения, применяемое в настоящем изобретении, предназначено для использования в качестве хемосенсбилизатора.

Термин «радиосенсбилизатор» определяется как молекула, которую вводят пациентам в терапевтически эффективных количествах для повышения чувствительности клеток к ионизирующему излучению и/или для содействия
15 лечению заболеваний, которые поддаются лечению ионизирующим излучением.

Термин «хемосенсбилизатор» определяется как молекула, которую вводят пациентам в терапевтически эффективных количествах для повышения чувствительности клеток к химиотерапии и/или содействия лечению
20 заболеваний, которые поддаются лечению химиотерапевтическими средствами.

Во многих протоколах лечения рака в настоящее время используют радиосенсбилизаторы в сочетании с облучением рентгеновскими лучами. Примеры активируемых рентгеновскими лучами радиосенсбилизаторов
включают, но не ограничиваются этим, следующие: метронидазол, мизонидазол, десметилмизонидазол, пимонидазол, этанидазол, ниморазол, митомицин С, RSU
25 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, никотинамид, 5-бромдезоксисуридин (BUdR), 5-йоддезоксисуридин (IUdR), бромдезоксцитидин, фтордезоксисуридин (FudR), гидроксимочевина, цисплатин, и их терапевтически эффективные аналоги и производные.

В фотодинамической терапии (ФДТ) раковых заболеваний используется
30 видимый свет в качестве активатора излучения сенсбилизующего агента. Примеры фотодинамических радиосенсбилизаторов включают, но не ограничиваются этим, следующие: производные гематопорфирина, фотофрин, производные бензопорфирина, этиопорфирин олова, феофорбид-а,

бактериохлорофилл-а, нафталоцианины, фталоцианины, фталоцианин цинка, и их терапевтически эффективные аналоги и производные.

Радиосенсибилизаторы можно вводить в сочетании с терапевтически эффективным количеством одного или более других соединений, включая, но не ограничиваясь этим: соединения, которые способствуют включению радиосенсибилизаторов в клетки-мишени; соединения, которые контролируют поток терапевтических средств, питательных веществ и/или кислорода к клеткам-мишеням; химиотерапевтические агенты, которые воздействуют на опухоль с дополнительным облучением или без него; или другие терапевтически эффективные соединения для лечения рака или других заболеваний.

Хемосенсибилизаторы можно вводить в сочетании с терапевтически эффективным количеством одного или более других соединений, включая, но не ограничиваясь этим: соединения, которые способствуют включению хемосенсибилизаторов в клетки-мишени; соединения, которые контролируют поток терапевтических средств, питательных веществ и/или кислорода к клеткам-мишеням; химиотерапевтические агенты, которые воздействуют на опухоль, или другие терапевтически эффективные соединения для лечения рака или другого заболевания. Антагонисты кальция, например, верапамил, можно использовать в комбинации с противоопухолевыми агентами для обеспечения химиочувствительности опухолевых клеток, устойчивых к принятым химиотерапевтическим агентам, и для усиления эффективности таких соединений в чувствительных к препаратам злокачественных новообразованиях.

Для применения в комбинированной терапии с другим химиотерапевтическим агентом соединение формулы (I) и один, два, три, четыре или более других терапевтических агентов можно, например, объединять вместе в лекарственной форме, содержащей два, три, четыре или более терапевтических агентов, т. е. в единой фармацевтической композиции, содержащей все компоненты. В альтернативном варианте композиции отдельных терапевтических агентов композиции отдельных терапевтических агентов могут быть составлены по отдельности и представлены вместе в форме набора, необязательно, с инструкциями по их применению.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит соединение формулы (I⁰) вместе с фармацевтически приемлемым носителем и, необязательно, одним или более терапевтическими агентами.

В другом варианте осуществления изобретение относится к применению комбинации по изобретению в производстве фармацевтической композиции для ингибирования роста опухолевых клеток.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к продукту, содержащему соединение формулы (I^o) и один или более противораковых агентов, в виде комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении пациентов, имеющих рак.

Далее изобретение описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

ПРИМЕРЫ

Далее изобретение будет проиллюстрировано, без ограничений, со ссылками на конкретные варианты осуществления, описанные в следующих примерах. Названия соединений определены с помощью программного пакета для автоматического наименования, такого как AutoNom (MDL) или ChemAxon Structure, или соответствуют названиям, данным поставщиком химических веществ.

Следующую первую группу примеров антагонистов MDM2, в которой суф представляет собой фенил, можно получить, как описано в заявке на международный патент № PCT/GB2016/053042, которая была опубликована как WO 2017/055860 06.04.2017:

Пр.	Название
1	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
2	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-4-фтор-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
3	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-(2-гидроксиэтокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
4	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-{{3-(гидроксиметил)оксетан-3-ил}метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
5	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоновая кислота
6	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(4-хлорфенил)этил]-3-(2,3-дигидрокси-2-метилпропокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
7	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(4-хлорфенил)этил]-3-{{1-

Пр.	Название
	(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
8 и 9	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-(1,2-дигидроксипропан-2-ил)-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
10 и 11	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(4-хлорфенил)этил]-6-(2-гидрокси-1-метоксипропан-2-ил)-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
12 и 13	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-[1-(диметиламино)-2-гидроксипропан-2-ил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
14	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
15	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(4-хлорфенил)этил]-6-(1,2-дигидроксипропан-2-ил)-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
16	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-(3-гидрокси-3-метилбутокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
17	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(1Н-пиразол-4-ил)метокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
18	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил
19	N-{[1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропил]метил}метансульфонамид
20	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-этинилфенил)метил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
21	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-этинилфенил)метил]-4-фтор-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
22 и 23	(3R)-3-(4-хлорфенил)-6-(1,2-дигидроксипропан-2-ил)-2-[(4-этинилфенил)метил]-4-фтор-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
24	4-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({[1-гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил}бензонитрил
25	4-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-({[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил}бензонитрил
26	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(3-метилоксетан-3-ил)метокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
27 и 28	4-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-5-(1,2-дигидроксипропан-2-ил)-1-({[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил}бензонитрил
29	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он

Пр.	Название
30	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}-N,N-диметилацетамид
31	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-{[1-(метоксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
32	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклобутил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
33	5-хлор-2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}бензойная кислота
34	(3R)-2-{[4-хлор-2-(морфолин-4-сульфонил)фенил]метил}-3-(4-хлорфенил)-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
35	1-({[(1R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
36	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-3-({[1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил]}(² H ₂)метокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
37 и 38	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-(оксолан-3-илокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
39 и 40	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(оксолан-3-ил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
41 и 42	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
43 и 44	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
45	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(4-хлорфенил)этил]-3-{[(3S,4R)-4-гидроксиоксолан-3-ил]окси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
46	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(4-хлорфенил)этил]-3-{[(3R,4S)-4-гидроксиоксолан-3-ил]окси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
47	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
48	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-({[1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил]}(2H ₂)метокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
49	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-(3-гидроксипропоксид)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
50	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
51	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-(2,2-дифтор-3-

Пр.	Название
	гидроксипропокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
52 и 53	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-{[2-(гидроксиметил)циклобутил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
54 и 55	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-[2-гидрокси-1-оксо-1-(пирролидин-1-ил)пропан-2-ил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
56 и 57	2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N,N-диметилпропанамид
58 и 59	2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N-метилпропанамид
60	(3R)-2-{[4-хлор-2-(метилсульфанил)фенил]метил}-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
61 и 62	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфинилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
63 и 64	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-(2-гидрокси-1-метоксипропан-2-ил)-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
65 и 66	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-6-(1,2-дигидроксипропан-2-ил)-4-фтор-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
67 и 68	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-[(3R)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
69 и 70	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
71	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
72	1-({[(1R)-2-{[4-хлор-2-(гидроксиметил)фенил]метил}-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил
73 и 74	1-({[(1R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
75 и 76	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
77 и 78	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он

Пр.	Название
79	5-хлор-2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}бензойная кислота
80 и 81	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
82	(3R)-2-{{4-хлор-2-(диметилфосфорил)фенил}метил}-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
83 и 84	(3R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[гидрокси(оксан-4-ил)метил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
85 и 86	1-{{(1R)-2-[(4-хлор-2-метансульфонилфенил)метил]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил}окси}метил}циклопропан-1-карбоксамид
87	5-хлор-2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}бензойная кислота
88 и 89	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
90 и 91	4-[(1R)-1-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-гидроксиэтил]бензонитрил
92 и 93	4-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}-3-(гидроксиметил)бензонитрил
94 и 95	4-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}бензонитрил
96 и 97	4-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}бензонитрил
98 и 99	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
100	(4S)-4-(4-хлорфенил)-4-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-3-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]бутановая кислота
101 и 102	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
103 и 104	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-5-(1-циклобутил-1-гидроксиэтил)-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
105	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-

Пр.	Название
	ил]пропановая кислота
106	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
107	(4S)-4-(4-хлорфенил)-4-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]бутановая кислота
108	(4S)-4-(4-хлорфенил)-4-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]бутановая кислота
109	(4S)-4-(4-хлорфенил)-4-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]бутановая кислота (трис(гидроксиметил)аминометановая соль)
110	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-тридейтерометокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
111	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-этокси-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
113	4S)-4-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-4-(4-метоксифенил)бутановая кислота
114	(4S)-4-(4-хлорфенил)-4-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]бутановая кислота
115	2-(5-хлор-2-{[1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}фенокси)уксусная кислота (трис(гидроксиметил)аминометановая соль)
116	5-хлор-2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}бензойная кислота
117	5-хлор-2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}бензойная кислота
118	5-хлор-2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-этокси-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}бензойная кислота (трис(гидроксиметил)аминометановая соль)
119	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}-5-метилбензойная кислота
120	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}-5-метоксибензойная кислота (трис(гидроксиметил)аминометановая соль)
121	2-(5-хлор-2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}фенил)-2-метилпропановая кислота (трис(гидроксиметил)аминометановая соль)

Пр.	Название
122	2-(5-хлор-2-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}фенил)уксусная кислота (трис(гидроксиметил)аминометановая соль)
123	2-(5-хлор-2-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}фенил)уксусная кислота
124	(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановая кислота («соединение 1»)
124а	(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановая кислота («соединение 1») (трис(гидроксиметил)аминометановая соль)
125	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-(2-гидроксибутан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
126	
127	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(пиридин-2-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
128	
129	(3R)-2-[[4-хлор-2-метансульфонилфенил]метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
130	4-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}бензонитрил
131	(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота
132	<i>трет</i> -бутил 2-{4-[(1S)-1-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксипропил]пиперидин-1-ил}ацетат и <i>трет</i> -бутил 2-{4-[(1R)-1-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксипропил]пиперидин-1-ил}ацетат
133	
134	2-{4-[(1S)-1-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксипропил]пиперидин-1-ил}уксусная кислота
135	2-{4-[(1R)-1-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксипропил]пиперидин-1-ил}уксусная кислота
136	Метил 3-{4-[(1S)-1-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксипропил]пиперидин-1-ил}пропаноат
137	3-{4-[(1S)-1-[[1R]-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксипропил]пиперидин-1-ил}пропановая кислота

Следующую вторую группу примеров антагонистов MDM2, в которой сус представляет собой Нет, можно получить, как описано в заявке на международный патент № PCT/GB2016/053041, которая была опубликована как WO 2017/055859 06.04.2017:

Пр.	Название
1	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
2	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
3	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
4	1-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил}циклопропан-1-карбоксамид
5	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
6	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-(2-гидроксиэтокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
7	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
8	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
9	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-(3-гидроксипропокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
10	(3R)-2-[(5-хлор-1-оксо-1λ ⁵ -пиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
11	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
12	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[(6-метилпиридазин-3-ил)метил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
13	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(1-метоксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
14 и 15	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(1,2-дигидроксипропан-2-ил)-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
16 и 17	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(1,2-дигидроксипропан-2-ил)-4-фтор-3-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-2,3-

Пр.	Название
	дигидро-1H-изоиндол-1-он
18 и 19	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2,4-дигидроксибутан-2-ил)-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
20 и 21	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-5-(2,4-дигидроксибутан-2-ил)-7-фтор-1-({1-гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил)}(² H ₂)метокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
22 и 23	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-(диметиламино)-2-гидроксипропан-2-ил]-4-фтор-3-({1-гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил)}(² H ₂)метокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
24 и 25	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-({1-гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил)}(² H ₂)метокси)-6-(2-гидрокси-1-метоксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
26	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-[3-гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метилпропокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
27	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил
28	(3p)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-({[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[(5-метилпиридин-2-ил)метил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
29	(3p)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-({[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[(5-метоксипиридин-2-ил)метил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
30	3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-3-({[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
31	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
32	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-({1-гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил)}(² H ₂)метокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
33	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(1-метансульфонилциклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
34	N-[1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропил]ацетамид
35	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-({1-гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил)}(² H ₂)метокси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
36	6-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил

Пр.	Название
37	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[(6-метоксипиридин-3-ил)метил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
38 и 39	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{(1S,3R)-3-гидроксициклопентил}окси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он и (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{(1R,3S)-3-гидроксициклопентил}окси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
40 и 41	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{(1S,3R)-3-гидроксициклопентил}окси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил и 6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{(1R,3S)-3-гидроксициклопентил}окси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
42 и 43	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-гидроксициклопентил)окси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
44 и 45	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{(1R,3R)-3-гидроксициклопентил}окси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он и (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{(1S,3S)-3-гидроксициклопентил}окси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
46	(3S)-3-(4-хлор-2-фторфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
47	((3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-(4-этилфенил)-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
48	4-[(1R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]бензонитрил
49	(3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-(4-фторфенил)-3-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
50	(3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[4-(трифторметил)фенил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
51	(3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-[4-(1,1-дифторэтил)фенил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
52	(3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-(3,4-дифторфенил)-3-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
53	(3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[4-(трифторметокси)фенил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
54	(3R)-4-хлор-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-

Пр.	Название
	гидроксипропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
55 и 56	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
57 и 58	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
59	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-[(2S)-3-гидрокси- ² -метил(3,3- ² H ₂)пропокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
60	(3R)-3-(4-Хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-[(2R)-3-гидрокси- ² -метил(3,3- ² H ₂)пропокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
61	3-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил}окси}-1λ ⁶ -тиолан-1,1-дион – изомер 1
62	3-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил}окси}-1λ ⁶ -тиолан-1,1-дион – изомер 2
63	2-[1-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил}окси}метил)циклопропил]ацетонитрил
64	(3R)-3-[(1-ацетилазетидин-3-ил)метокси]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
65	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-[3-(гидроксиметил)циклобутокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
66	(3R)-3-[(1-аминоциклопропил)метокси]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
67	1-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил}окси}метил)-N-метилциклопропан-1-карбоксамид
68 и 69	1-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил}окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
70 и 71	1-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(5-хлорпиридин-2-ил)этил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил}окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид и 1-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(1R)-1-(5-хлорпиридин-2-ил)этил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил}окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
72	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(5-хлорпиридин-2-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
73	6-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{2-(гидроксиметил)циклопентил}окси}}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
74	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(3-метилоксетан-3-ил)метокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он

Пр.	Название
75	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
76	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(3R)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
77 и 78	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(пиридин-3-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
79 и 80	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
81	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(<i>цис</i> -3-гидроксициклобутил)метокси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
82 и 83	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
84	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-(3-гидроксициклобутокси)-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
85 и 86	(3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
87	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-(циклопропилметокси)-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
88	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1-оксо-1λ ⁵ -пиридин-3-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
89 и 90	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-1-{1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
91 и 92	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
93	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-(3-гидрокси-3-метилбутокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
94	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-(2-метансульфонилэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
95	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-(циклобутилметокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
96	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-(2-гидрокси-2-метилпропокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
97 и 98	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-(2-гидроксибутокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
99 и 100	2-{2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидроксипропокси}-N,N-диметилацетамид
101	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-{[1-(2-гидроксиэтокси)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
102 и 103	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(2-гидроксиэтокси)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он

Пр.	Название
104 и 105	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
106 и 107	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(морфолин-4-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
108 и 109	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(метиламино)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
110 и 111	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-(циклопропиламино)-2-гидроксипропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
112 и 113	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(4-метил-3-оксопиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
114 и 115	N-{2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидроксипропил}ацетамид
116 и 117	(3R)-6-[1-(4-ацетилпиперазин-1-ил)-2-гидроксипропан-2-ил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
118 и 119	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(2-гидроксициклопентил)окси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
120 и 121	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(пиримидин-5-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
122 и 123	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(пиридин-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
124	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(2-гидроксициклопентил)окси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
125 и 126	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(2-метоксипиридин-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
127	1-({[(1R)-5-[1-(4-ацетилпиперазин-1-ил)-2-гидроксипропан-2-ил]-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
128 и 129	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
130 и 131	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидрокси-1-метоксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
132	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-

Пр.	Название
и 133	1Н-имидазол-5-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
134 и 135	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1Н-пиразол-5-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
136 и 137	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
138 и 139	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-(диметиламино)-2-гидроксипропан-2-ил]-4-фтор-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
140 и 141	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(1-этокси-2-гидроксипропан-2-ил)-4-фтор-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
142 и 143	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)(² H ₂)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(² H ₃)метоксипропан-2-ил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
144	2-{{1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропил]метокси}уксусная кислота
145 и 146	2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N-метилпропанамид
147 и 148	2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-5-ил]-N-этил-2-гидроксипропанамид
149 и 150	2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-5-ил]-N-[2-(диметиламино)этил]-2-гидроксипропанамид
151 и 152	2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N-(пропан-2-ил)пропанамид
153 и 154	6-{{1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{1-(1-гидроксиэтил)циклопропил]метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
155	2-({1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропил]метил}амино)-N-метилацетамид
156	N-{{1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропил]метил}ацетамид
157 и 158	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(2-оксоимидазолидин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
159	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(1Н-имидазол-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он

Пр.	Название
160	
161 и 162	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-(1,2-диметил-1H-имидазол-4-ил)-1-гидроксиэтил]-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
163 и 164	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1H-имидазол-2-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
165 и 166	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1,3-тиазол-2-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
167	(2S)-3-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}-2-метилпропанамид
168	(2R)-3-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}-2-метилпропанамид
169	6-[(1S)-1-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]этил]пиридин-3-карбонитрил
170	6-[(1R)-1-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]этил]пиридин-3-карбонитрил
171 и 172	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(1-метансульфинилциклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
173	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил.
174	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(5-хлорпиридин-2-ил)проп-2-ен-1-ил]-4-фтор-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
175 и 176	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[гидрокси(1-метил-1H-пиразол-4-ил)метил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
177 и 178	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
179 и 180	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-5-[1-(1-этил-1H-пиразол-4-ил)-1-гидроксиэтил]-7-фтор-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
181 и 182	(3R)-6-{1-[1-(1-ацетилазетидин-3-ил)-1H-пиразол-4-ил]-1-гидроксиэтил}-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
183 и 184	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-(1-этил-1H-пиразол-4-ил)-1-гидроксиэтил]-4-фтор-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
185	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(5-

Пр.	Название
и 186	метил-1,3,4-оксадиазол-2-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
187 и 188	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
189 и 190	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-3-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
191 и 192	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(1-{1-[2-(диметиламино)этил]-1H-пиразол-4-ил}-1-гидроксиэтил)-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
193 и 194	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1,3-тиазол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
195 и 196	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
197 и 198	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-5-[1-(1,2-диметил-1H-имидазол-4-ил)-1-гидроксиэтил]-7-фтор-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
199 и 200	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
201 и 202	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил
203 и 204	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
205	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[<i>цис</i> -3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
206	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[<i>транс</i> -3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
207	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[<i>транс</i> -3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
208	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[<i>цис</i> -3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
209	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-2-[(5-фторпиридин-2-ил)метил]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
210	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-2-[(5-фторпиридин-2-ил)метил]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид

Пр.	Название
	ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
211	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
212	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
213	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
214	1-({(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
215	1-({(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
216	1-({(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-2-[(6-метоксипиридин-3-ил)метил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
217	1-({(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-2-[(6-метоксипиридин-3-ил)метил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
218	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
219	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-2-[(6-метоксипиридин-3-ил)метил]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
220	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-2-[(6-метоксипиридин-3-ил)метил]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
221	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-[(2R)-2-гидроксипропокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
222	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
223	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
224	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-2-[(5-метоксипиридин-2-ил)метил]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
225	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2-[(5-метилпиридин-2-ил)метил]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он

Пр.	Название
226	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3- {[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2-[(5-метоксипиридин-2-ил)метил]- 2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
227	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3- [(1-гидроксициклопропил)метокси]-2-[(5-метилпиридин-2-ил)метил]-2,3- дигидро-1H-изоиндол-1-он
228	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3- [(1-гидроксициклопропил)метокси]-2-[(5-метоксипиридин-2-ил)метил]-2,3- дигидро-1H-изоиндол-1-он
229	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3- [(1-гидроксициклопропил)метокси]-2-[(6-метоксипиридин-3-ил)метил]-2,3- дигидро-1H-изоиндол-1-он
230	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3- [(1-гидроксициклопропил)метокси]-2-[(6-метоксипиридин-3-ил)метил]-2,3- дигидро-1H-изоиндол-1-он
231	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-2-[(5-фторпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1- метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3- дигидро-1H-изоиндол-1-он
232	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-2-[(5-фторпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1- метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3- дигидро-1H-изоиндол-1-он
233 и 234	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(пиридин- 3-илокси)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
235	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(1-этокси-2- гидроксипропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
236	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(1-этокси-2- гидроксипропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
237	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[4-(2- гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H- изоиндол-1-он
238	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(4- гидроксипиперидин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
239	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[метил(1- метилпиперидин-4-ил)амино]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол- 1-он
240	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(оксан-4- ил)амино]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
241	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(3- оксопиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
242	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-(1,4-дiazепан-1-ил)-2- гидроксипропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
243	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-(1,4-дiazепан-1-ил)-2- гидроксипропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
244	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(оксан-4- ил)амино]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он

Пр.	Название
245	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(3-оксопиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
246	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
247	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(4-гидроксипиперидин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
248	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[метил(1-метилпиперидин-4-ил)амино]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
249	4-{2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидроксипропил}-1λ6-тиоморфолин-1,1-дион
250	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(2S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
251	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(2S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
252	4-{2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидроксипропил}-1λ6-тиоморфолин-1,1-дион
253	(3R)-6-{1-[(1-ацетилпиперидин-4-ил)(метил)амино]-2-гидроксипропан-2-ил}-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
253a	(3R)-6-{1-[(1-ацетилпиперидин-4-ил)(метил)амино]-2-гидроксипропан-2-ил}-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
254	(3R)-6-[1-(4-аминопиперидин-1-ил)-2-гидроксипропан-2-ил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
255	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
256	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
257	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(2-оксопирролидин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
258	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(2-оксопирролидин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
259	(3R)-6-[1-(4-аминопиперидин-1-ил)-2-гидроксипропан-2-ил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
260	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(5-оксо-1,4-дiazепан-1-ил))пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
261	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(5-оксо-1,4-дiazепан-1-ил))пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
262	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-гидрокси-1-{4H,5H,6H,7H-[1,2,3]триазоло[1,5-a]пиазин-5-ил}пропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
263	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(1S,4S)-

Пр.	Название
	5-метил-2,5-диазабицикло[2.2.1]гептан-2-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
264	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(1S,4S)-5-метил-2,5-диазабицикло[2.2.1]гептан-2-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
265	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(2R)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
266	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(4-метил-1,4-дiazепан-1-ил)]пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
267	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(2R)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
268	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(4-метил-1,4-дiazепан-1-ил)]пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
269	(3R)-6-[1-(азетидин-1-ил)-2-гидроксипропан-2-ил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
270	(3R)-6-[1-(азетидин-1-ил)-2-гидроксипропан-2-ил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
271	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{1-[(3S)-3,4-диметилпиперазин-1-ил]-2-гидроксипропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
272	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{1-[(3R)-3,4-диметилпиперазин-1-ил]-2-гидроксипропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
273	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{1-[(3R)-3,4-диметилпиперазин-1-ил]-2-гидроксипропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
274	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{1-[(2S)-2,4-диметилпиперазин-1-ил]-2-гидроксипропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
275	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-гидрокси-1-{4H,5H,6H,7H-[1,2,3]триазоло[1,5-a]пиразин-5-ил}пропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
276 и 277	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-[2-гидрокси-1-(пирролидин-1-ил)пропан-2-ил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
278 и 279	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)пропан-2-ил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
280	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-цианопиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
281	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-цианопиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид

Пр.	Название
282 и 283	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
284 и 285	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
286	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[1-(пиримидин-2-ил)пиперидин-4-ил]этил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
287	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
288	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
289 и 290	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(пиперидин-4-ил)этил]-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
291 и 292	6-{{(1R)-5-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
293	(3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
294	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метансульфонилпиперидин-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
295	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[1-(1,3-оксазол-2-карбонил)пиперидин-4-ил]этил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
296	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[1-(2-гидроксиацетил)пиперидин-4-ил]этил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
297	6-{{(1R)-5-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
298 и 299	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-6-(1-{1-[2-(диметиламино)ацетил]пиперидин-4-ил}-1-гидроксиэтил)-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
300	(3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
301	1-({[(1R)-5-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил
302 и 303	1-({[(1R)-5-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид

Пр.	Название
304	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
305	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
306	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
307 и 308	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилазетидин-3-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
309 и 310	6-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(пиридин-2-ил)этил]-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
311 и 312	4-{{1-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксиэтил}-1λ6-тиан-1,1-дион
313 и 314	4-{{1-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-1-(2-гидроксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксиэтил}-1λ6-тиан-1,1-дион
315	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-метокси-2-[(2-метокси-6-метилпиридин-3-ил)метил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
316 и 317	6-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пирозол-4-ил)этил]-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
318 и 319	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
320 и 321	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(пиридин-2-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
322 и 323	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(пиридин-4-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
324 и 325	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-(1,2-диметил-1H-имидазол-4-ил)-1-гидроксиэтил]-4-фтор-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
326	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-[(1-{{(2-гидроксиэтил)амино}метил}циклопропил)метокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
327 и 328	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(3-оксоморфолин-4-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
329 и 330	1-{{2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидроксипропил}имидазолидин-2,4-дион

Пр.	Название
331	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1R)-1-(5-хлорпиридин-2-ил)-2,3-дигидроксипропил]-4-фтор-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
332	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(4-метил-1H-имидазол-2)-ил]этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
333	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1,3-тиазол-4-ил)пропил]-1-(2-гидроксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-
334	карбонитрил
335	6-{[1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-3-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-
336	ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
337	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-
338	1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
339	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[<i>цис</i> -3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
340	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-1-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
341	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-1-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
342	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[<i>цис</i> -3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
343	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4)-ил]этил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
344	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
345	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4)-ил]этил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
346	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4)-ил]этил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
347	(3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2-[(5-метоксипиридин-2-ил)метил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
348	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4)-ил]этил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
349	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-

Пр.	Название
	(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
350	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(3,5-дифторпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
351	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(3,5-дифторпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
352	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил)}(² H ₂)метокси)-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
353	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил)}(² H ₂)метокси)-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
354	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-[(2R)-2-гидроксипропокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
355	6-{{1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-1-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
356	6-{{1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-1-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
357	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[гидрокси(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)метил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
358	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
359	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
360	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[гидрокси(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)метил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
361	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)проп-2-ен-1-ил]-3-оксо-1-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
362	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)проп-2-ен-1-ил]-3-оксо-1-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
363	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-1-(2-гидроксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил

Пр.	Название
364	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-(2-гидроксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
365	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
366	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
367	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
368	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(6-хлорпиридин-3-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
369	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
370	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
371	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-5-[2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
372	(3R)-2-[(5-хлор-3-метансульфонилпиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
373	(3R)-2-[(5-хлор-3-метансульфонилпиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
374 и 375	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
376	6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-гидрокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
377 и 378	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(пиперидин-4-илокси)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
379	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{1-[(3S)-3,4-диметилпиперазин-1-ил]-2-гидроксипропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
380	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{1-[(2S)-2,4-диметилпиперазин-1-ил]-2-гидроксипропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
381	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(3S)-3-гидроксипирролидин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-

Пр.	Название
	он
382	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(3S)-3-гидроксипирролидин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
383	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(3R)-3-гидроксипирролидин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
384	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-{2-гидрокси-1-[(3R)-3-гидроксипирролидин-1-ил]пропан-2-ил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
385	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
386	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
387	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
388	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
389 и 390	(3R)-6-[1-(1-ацетилазетидин-3-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
391 и 392	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[1-(2-гидроксиацетил)азетидин-3-ил]этил}-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
393 и 394	3-{1-[1-(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-цианопиридин-2-ил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксиэтил}-N,N-диметилазетидин-1-карбоксамид
395 и 396	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(пиримидин-2-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
397 и 398	4-{1-[1-(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-1-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксиэтил}-1λ6-тиан-1,1-дион
399 и 400	4-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-1-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил](гидрокси)метил}-1λ6-тиан-1,1-дион
401 и 402	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[<i>транс</i> -4-гидроксициклогексил]этил}-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
403 и 404	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-5-(1-циклобутил-1-гидроксиэтил)-7-фтор-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид

Пр.	Название
405 и 406	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-5-(1-циклобутил-1-гидроксиэтил)-7-фтор-1-(2-гидроксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
407	(3R)-2-[(5-хлор-1-оксо-1λ ⁵ -пиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
408	1-{{[(1R)-2-[(5-хлор-1-оксо-1λ ⁵ -пиридин-2-ил)метил]-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил}циклопропан-1-карбонитрил
409	(3R)-2-[(5-хлор-1-оксо-1λ ⁵ -пиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-[(1-гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
410	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-(2-гидроксибутан-2-ил)-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
411	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-(2-гидроксибутан-2-ил)-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
412	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-(2-гидроксибут-3-ен-2-ил)-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
413	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-(2-гидроксибут-3-ен-2-ил)-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
414	6-{{(1R)-1-(4-Хлорфенил)-5-(1-циклопропил-1-гидроксиэтил)-7-фтор-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
415	6-{{(1R)-1-(4-Хлорфенил)-5-(1-циклопропил-1-гидроксиэтил)-7-фтор-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
416	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-5-(1,1,1-трифтор-2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
417	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-5-(1,1,1-трифтор-2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
418	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1R)-1-(5-хлорпиридин-2-ил)-2-гидроксиэтил]-4-фтор-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
419	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-1-{{(транс-3-гидроксициклобутил)метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил
420	1-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-5-{{1-гидрокси-1-[1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил]этил}-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил}циклопропан-1-карбонитрил
421	(3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-

Пр.	Название
	хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
422	(3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
423	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
424	(3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-2-{[5-хлор-3-(гидроксиметил)пиридин-2-ил]метил}-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
425	(3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
426	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3R)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
427	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3R)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
428	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-5-[2,2,2-трифтор-1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-4-ил)этил]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
429	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-1-(2-метоксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
430	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-1-(2-метоксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
431	5-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-2-карбонитрил
432	5-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-2-карбонитрил
433	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-5-[циклопропил(гидрокси)(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)метил]-7-фтор-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
434	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-5-[циклопропил(гидрокси)(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)метил]-7-фтор-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
435	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
436	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-

Пр.	Название
	изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
437	6- {[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-[(2R)-2-гидроксипропокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
438	6- {[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-[(2R)-2-гидроксипропокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
439	6- {[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси)-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
440	6- {[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси)-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
441	6- {[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[2-фтор-1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-и
442	ил]этил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
443	(3R)-2-[(5-хлор-3-гидроксипиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-
444	дигидро-1H-изоиндол-1-он
445	6- {[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
446	6- {[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
447	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-({1-[гидрокси(² H ₂)метил]циклопропил}{ ² H ₂)метокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
448	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(пиперидин-4-ил)пропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
449	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
450	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(пиперидин-4-ил)пропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
451	2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-
452	дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N-(1-метилпиперидин-4-ил)пропанамид
453	2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-
454	дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)пропанамид
455	2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N-(1-метилазетидин-3-ил)пропанамид

Пр.	Название
456	
457 и 458	трет-бутил 3-(4-{1-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксиэтил}-1H-пиразол-1-ил)азетидин-1-карбоксилат
459	2-(4-{1-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-5-ил]-1-гидроксиэтил} пиперидин-1-ил)уксусная кислота
460	(3R)-3-(4-хлорфенил)-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[(5-метилпиразин-2-ил)метил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
461	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-[(<i>транс</i> -3-гидроксициклопентил)окси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
462	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
463	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
464	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
465	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
466	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-(3-гидрокси-2-метилиденпропокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
467	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-(3-гидрокси-2-метилиденпропокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
468	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
469	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
470	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
471	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
472	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)бутил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил

Пр.	Название
473	6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)бутил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиридин-3-карбонитрил
474	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
475	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
476	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
477	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
478	2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-[(транс-3-гидроксициклопентил)окси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-5-карбонитрил
479	2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-[(транс-3-гидроксициклопентил)окси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-5-карбонитрил
480	2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-[(транс-3-гидроксициклопентил)окси]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-5-карбонитрил
481	2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[транс-3-(гидроксиметил)циклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-5-карбонитрил
482	2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[транс-3-(гидроксиметил)циклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-5-карбонитрил
483	2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-{{транс-3-гидроксициклобутил}метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-5-карбонитрил
484	2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-{{транс-3-гидроксициклобутил}метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-5-карбонитрил
485	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
486	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид
487	(3R)-2-[(5-хлор-3-гидрокси-2-пиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
488	(3R)-2-[(5-хлор-3-гидрокси-2-пиридин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-

Пр.	Название
	гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
489	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-3-ил)пропил]-3-оксо-1-(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-5-карбонитрил
490	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пиразол-3-ил)пропил]-3-оксо-1-(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-5-карбонитрил
491	(3R)-2-[(5-хлор-3-метоксипиримидин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
492	(3R)-2-[(5-хлор-3-метоксипиримидин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-имидазол-4-ил)пропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
493	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
494	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
495	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
496	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он: *быстро элюирующийся изомер
497	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-[(2R)-2-гидроксипропокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-3-карбонитрил
498	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-[(2R)-2-гидроксипропокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-3-карбонитрил
499	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-(2-гидроксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-3-карбонитрил
500	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-(2-гидроксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил}метил} пиримидин-3-карбонитрил
501	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
502	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
503	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-3-оксо-1-(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-

Пр.	Название
	1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
504	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
505	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
506	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
507	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
508	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
509	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-(2-гидроксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
510	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-1-(2-гидроксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
511	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
512	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-1-[(2R)-2-гидроксипропокси]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
513	2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси-1-дидейтерометил]циклопропил}дидейтерометокси)-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
514	5-хлор-2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбоновая кислота (трис(гидроксиметил)аминометановая соль)
515	3-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1R)-1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил}-6-метилпиридин-2-карбоновая кислота
516	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)дидейтерометил]-4-фтор-6-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
517	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
518	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-{1-гидрокси-1-[транс-4-

Пр.	Название
	гидроксициклогексил]пропил}-3-оксо-1-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
519	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
520	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-3-оксо-1-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
521	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-{1-гидрокси-1-[транс-4-гидроксициклогексил]пропил}-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
522	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
523	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
524	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
525	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
526	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{2-гидрокси-1-[(3R)-3-гидроксипирролидин-1-ил]бутан-2-ил}-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
527	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{2-гидрокси-1-[(3R)-3-гидроксипирролидин-1-ил]бутан-2-ил}-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
528	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-6-[1-(диметиламино)-2-гидроксибутан-2-ил]-4-фтор-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
529	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-6-[1-(диметиламино)-2-гидроксибутан-2-ил]-4-фтор-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
530	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
531	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
532	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
533	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он
534	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин)-1-ил]бутан-2-ил]-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-

Пр.	Название
	изоиндол-1-ил]окси} метил)циклопропан-1-карбонитрил
535	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[2-гидрокси-1-(4-метилпиперазин)-1-ил]бутан-2-ил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси} метил)циклопропан-1-карбонитрил
536	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси} метил)циклопропан-1-карбонитрил
537	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси} метил)циклопропан-1-карбонитрил
538	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-3-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-6-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
539	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-3-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-6-[2-гидрокси-1-(пиперазин-1-ил)бутан-2-ил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
540	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
541	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
541a	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он – соль L-(+)-молочной кислоты
542	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
543	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[(2R)-2-гидроксипропокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
544	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
545	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси} метил)циклопропан-1-карбонитрил
546	6-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиридин-3-карбонитрил
547	2-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил} пиримидин-5-карбонитрил
548	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он

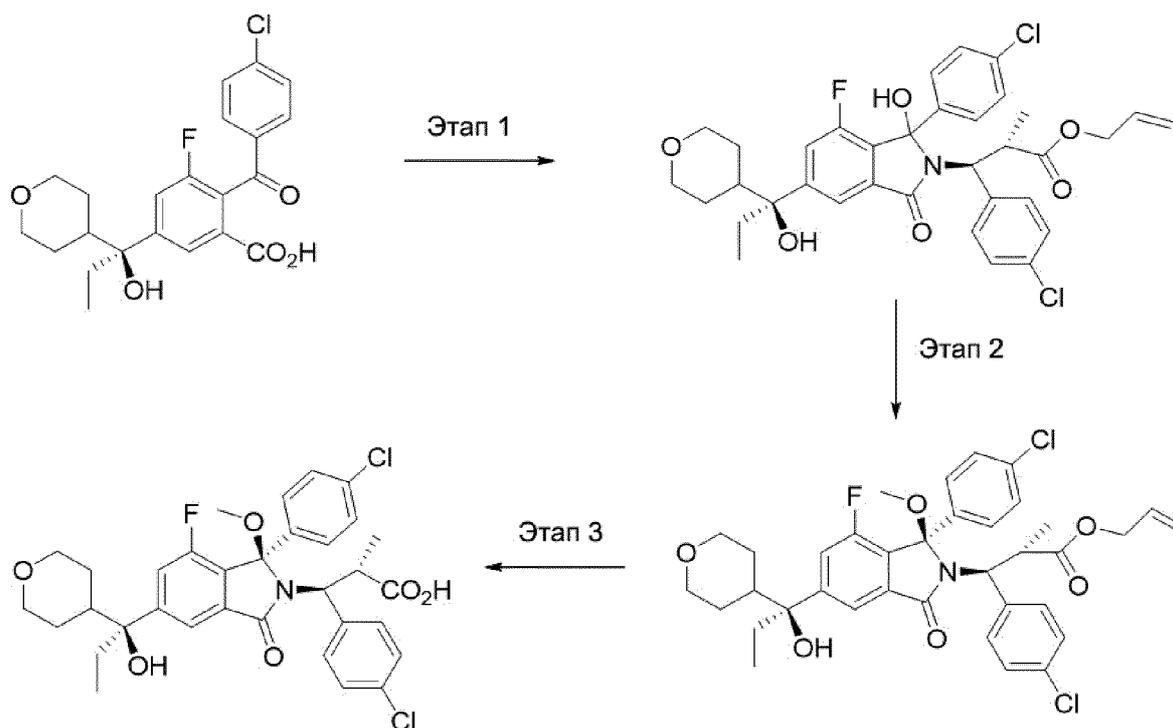
Пр.	Название
549	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фторпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[(2R)-2-гидроксипропоксидигидро-1H-изоиндол-1-он]
550	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-гидрокси-1-[1-(2-гидроксиэтил)пиперидин-4-ил]пропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
551	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-гидрокси-1-[1-(оксетан-3-ил)пиперидин-4-ил]пропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
552	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-[4-фтор-1-(оксетан-3-ил)пиперидин-4-ил]-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
553	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин)-4-ил]пропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
554	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
555	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
556	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин)-4-ил]пропил]-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
557	2-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиримидин-5-карбонитрил
558	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-3-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-6-[1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)этил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
559	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
560	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
561	2-{{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиримидин-5-карбонитрил
562	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин)-4-ил]пропил]-3-[(2R)-2-гидроксипропоксидигидро-1H-изоиндол-1-он]
563	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
563a	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-

Пр.	Название
	метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он – соль L-(+)-молочной кислоты
563b	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он – гидрохлоридная соль
564	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин)-4-ил]-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил
564a	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил – соль L-(+)-молочной кислоты
564b	1-({[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбонитрил – гидрохлоридная соль
565	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
566	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1R)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин)-4-ил]пропил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
567	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1R)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
568	2-[(5-хлор-3-гидроксипиримидин-2-ил)метил]-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-6-[(1S)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
570	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
571	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
572	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[(2R)-2-гидроксипропокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
574	2-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-5-карбонитрил
575	2-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-5-карбонитрил
576	2-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-гидрокси-1-дегидрометил}циклопропил)дидейтерометокси]-5-(2-гидроксибутан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-5-карбонитрил
577	2-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-

Пр.	Название
	[гидроксидейтерометил]циклопропил}дидейтерометокси)-5-(2-гидроксибутан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-5-карбонитрил
578	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(2-гидроксиэтокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он
579	6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(2S)-3-фтор-2-гидроксипропокси]-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил
580	(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-[2-гидрокси(1,1,2,2-тетрадейтеро)этокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он

Получение соединения 1 (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты

5 («соединение 1»)



Этап 1: Проп-2-ен-1-ил (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-гидрокси-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропаноат

10 В раствор (S)-2-(4-хлорбензоил)-3-фтор-5-(1-гидрокси-1-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)пропил)бензойной кислоты (**препарат 52**) (0,686 г, 1,6 ммоль), проп-2-ен-1-ил (2S,3S)-3-амино-3-(4-хлорфенил)-2-метилпропаноата (**препарат 62**)

(0,54 г, 2,12 ммоль) и диизопропилэтиламина (0,83 мл, 4,8 ммоль) в ДМФ (15 мл) добавляли НАТУ (0,91 г, 2,4 ммоль) и перемешивали реакционную смесь в течение 2 часов. Добавляли воду и экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу промывали насыщенным раствором NaHCO_3 , соевым раствором, сушили и
 5 выпаривали растворитель. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии с получением указанного в заголовке соединения (0,75 г, 72%).
 МС: $[\text{M}-\text{H}]^- = 654$.

Этап 2: Проп-2-ен-1-ил (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропаноат
 10

Указанное в заголовке соединение получали из этил(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-гидрокси-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропаноата и метанола способом, аналогичным описанному для **препарата 10**, но используя
 15 MeOH вместо 1,1-бис(гидроксиметил)циклопропана. Диастереоизомеры разделяли посредством хиральной СЖХ, указанное в заголовке соединение представляло собой более быстро элюирующийся изомер. МС: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 670$.

Этап 3: (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановая кислота
 20

Указанное в заголовке соединение получали из проп-2-ен-1-ил(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропаноата аналогично **примеру 90, этап 4**. 1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$):
 25 12,56-12,00 (1H, м), 7,71 (1H, с), 7,42 (1H, д), 7,02 (4H, д), 6,88 (3H, д), 4,91 (1H, с), 4,23 (1H, д), 3,99-3,85 (2H, м), 3,75 (1H, дд), 3,25-3,10 (5H, м), 2,02-1,90 (1H, м), 1,90-1,78 (2H, м), 1,67 (1H, д), 1,43-1,17 (6H, м), 0,95 (1H, д), 0,58 (3H, т). МС: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 630$.

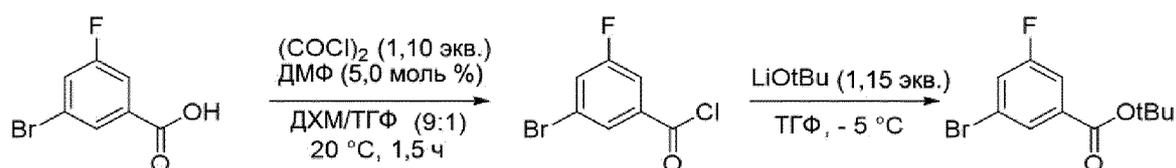
(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановая кислота, (трис(гидроксиметил)аминометановая соль)
 30

Вышеуказанное соединение растворяли в EtOH и добавляли 1 мол. экв. трис(гидроксиметил)аминометана. Растворитель удаляли в вакууме с

получением бесцветного твердого вещества. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) δ 7,69 (с, 1H), 7,39 (д, $J = 10,7$ Гц, 1H), 7,01 (шир. с, 4H), 6,96-6,88 (м, 4H), 4,92 (шир. с, 1H), 4,34-4,22 (м, 1H), 3,88 (дд, $J = 10,9, 4,2$ Гц, 1H), 3,74 (дд, $J = 11,1, 4,2$ Гц, 1H), 3,71-3,61 (м, 1H), 3,29 (с, 6H), 3,33-3,22 (м, 1H), 3,21-3,14 (м, 1H), 3,13 (с, 3H), 1,94 (тт, $J = 12,2, 3,6$ Гц, 1H), 1,89-1,78 (м, 2H), 1,66 (д, $J = 12,8$ Гц, 1H), 1,41-1,24 (м, 2H), 1,19 (д, $J = 6,8$ Гц, 3H), 0,93 (д, $J = 13,2$ Гц, 1H), 0,57 (т, $J = 7,3$ Гц, 3H). МС: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 630$.

Получение 2 (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты («соединение 1»)

Этап 1: трет-бутил 3-бром-5-фторбензоат

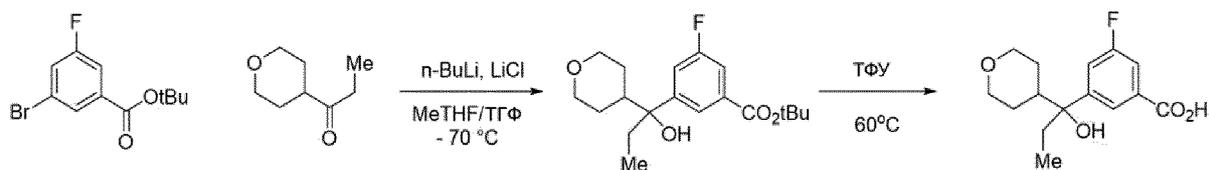


3-бром-5-фторбензойную кислоту (32,0 г, 1,0 экв.) перемешивали в смеси ДХМ (288 мл, 9 об.) и ТГФ (32 мл, 1 объем) до растворения большей части твердого вещества. Добавляли ДМФ (0,57 мл, 5 мол. %) и помещали колбу на водяную баню при температуре окружающей среды. Оксалилхлорид (13,7 мл, 1,10 экв.) добавляли в течение 1 ч с помощью шприцевого насоса; через 30 минут после окончания добавления реакция была завершена по данным ВЭЖХ (перед анализом образец гасили в MeOH с образованием метилового эфира).

Полученную жидкую суспензию выдерживали в течение ночи, концентрировали до объема 100 мл, разводили ТГФ (160 мл, 5 об.) и снова концентрировали до 100 мл. Полученную жидкую взвесь хлорангидрида разводили до общего объема 160 мл ТГФ. Раствор LiOtBu в ТГФ (20 масс. %, 67,3 г, 77 мл, 1,15 экв.) разводили ТГФ (243 мл), затем этот раствор охлаждали до внутренней температуры -9 °С на бане со льдом и солью. В него добавляли суспензию, содержащую хлорангидрид, в течение 55 мин, при этом внутренняя температура оставалась ниже -3 °С. Реакция была завершена через 15 мин после окончания добавления. Раствор выдерживали в течение ночи, когда он нагревался до температуры окружающей среды, разводили гептаном (320 мл, 10 об.) и промывали водой (160 мл, 5 об.). Водный слой удаляли на нерастворимый

листок на поверхности раздела, затем органический слой фильтровали через слой solka-floc. Этот слой промывали гептаном (10 мл), затем объединенный органический слой дважды промывали водой (2 x 80 мл, 2,5 об.). Полученный органический слой дистиллировали при пониженном давлении до конечного объема 100 мл, разводили гептаном (160 мл, 5 об.) и снова концентрировали до общего объема 100 мл. Раствор трет-бутил-3-бром-5-фторбензоата использовали непосредственно на следующем этапе.. ЯМР ^1H (400 МГц; CDCl_3): 7,89-7,88 (1H, м), 7,60-7,57 (1H, м), 7,40-7,37 (1H, м), 1,57 (9H, с).

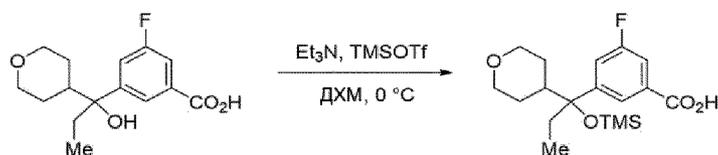
Этап 2: 3-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойная кислота



Раствор трет-бутил-3-бром-5-фторбензоата (20,0 г, 1,0 экв.) и 1-(оксан-4-ил)пропан-1-она (10,85 г, 1,05 экв.) в 2-МеТНФ (200 мл, 10 об.) обрабатывали 0,5 М раствором LiCl в ТГФ (72,7 мл, 0,5 экв.) и охлаждали до $-70\text{ }^\circ\text{C}$. В течение 1 ч по каплям добавляли раствор н-бутиллития в гексанах (2,2 М, 39,0 мл, 1,1 экв.); реакция была завершена по окончании добавления. Смесь нагревали до $-20\text{ }^\circ\text{C}$, гасили полунасыщенным водн. раствором NH_4Cl (200 мл) и перемешивали в течение 10 минут. Смеси давали отстояться и разделяли слои. Органическую фазу промывали водой (50 мл, 2,5 об.). Раствор анализировали методом ВЭЖХ для 20,6 г трет-бутил-3-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензоата (аналитический выход 84%). ЖХМС (М-Н) $^+$; $m/z = 337,2$. Органический раствор концентрировали до общего объема приблизительно 40 мл (~2 об.) путем дистилляции при пониженном давлении. Концентрированный раствор трет-бутил-3-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензоата обрабатывали ТФУ (28,0 мл, 6,0 экв.) при $20\text{ }^\circ\text{C}$ и нагревали раствор до $60\text{ }^\circ\text{C}$ и выдерживали в течение 2 часов, когда анализ ВЭЖХ показал, что реакция завершена на 98%; смесь охлаждали до $20\text{ }^\circ\text{C}$, затем разводили МТБЭ (40 мл, 2 об.) и гептаном (80 мл, 4 об.). В раствор вносили затравку аутентичного трет-бутил-3-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензоата и выдерживали в течение 30 мин, пока рос затравочный слой. Суспензию разводили в течение 1 ч путем добавления гептана (120 мл), фильтровали, а осадок промывали гептаном (40 мл) с получением указанного в заголовке соединения в виде грязно-белого твердого

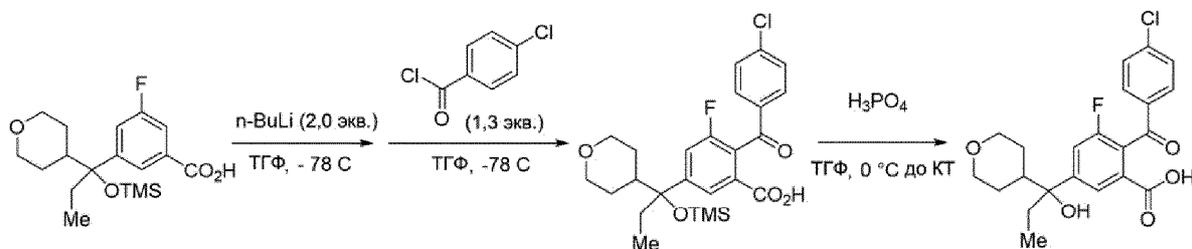
вещества (14,89 г, выход 87%).. ЯМР ^1H (400МГц; ДМСО): 13,23 (1H, с), 7,79 (1H, т), 7,50-7,47 (1H, м), 7,43-7,39 (1H, м), 4,79 (1H, шир. с), 3,79 (2H, ддд), 3,18 (2H, дт), 1,86-1,79 (3H, м), 1,64 (1H, д), 1,36-1,09 (2H, м), 0,93 (1H, д), 0,58 (3H, т); ЖХМС (M+H) $^+$: m/z = 283,1

5 **Этап 3: 3-фтор-5-[1-(оксан-4-ил)-1-[(триметилсилил)окси]пропил]бензойная кислота**



В суспензию 3-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойной кислоты (7,06 г, 1,0 экв.) в ДХМ (40 мл) при 0 °С добавляли Et₃N (7,08 г, 2,6 экв.) в течение 30 мин (поддерживая температуру ниже 5 °С). Полученный прозрачный раствор обрабатывали раствором TMSOTf (13,34 г, 2,4 экв.) в ДХМ (40 мл) в течение 60 мин (поддерживая температуру ниже 5 °С). Реакционную смесь перемешивали в течение еще 1 ч при 0 °С. В холодную реакционную смесь добавляли воду (88 мл) в течение 15 мин и разделяли фазы. Органическую фазу промывали 0,2 М раствором KHSO₄ (53 мл) и водой (2 x 88 мл). Раствор сушили над Na₂SO₄ и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт (масло) кристаллизовали из смеси ДХМ/гептан с получением указанного в заголовке соединения (8,24 г, 93%) в виде грязно-белого твердого вещества. ЯМР ^1H (400МГц; ДМСО): 7,79 (1H, т), 7,65-8,62 (1H, м), 7,35-7,31 (1H, м), 3,98 (2H, ддд), 3,33 (2H, дтд), 2,04-1,84 (3H, м), 1,75 (1H, д), 1,37 (1H, кд), 1,26-1,20 (2H, м), 0,72 (3H, т), 0,25 (9H, с); ЖХМС (M+H) $^+$: m/z = 355,2

15 **Этап 4: 2-(4-хлорбензоил)-3-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойная кислота**

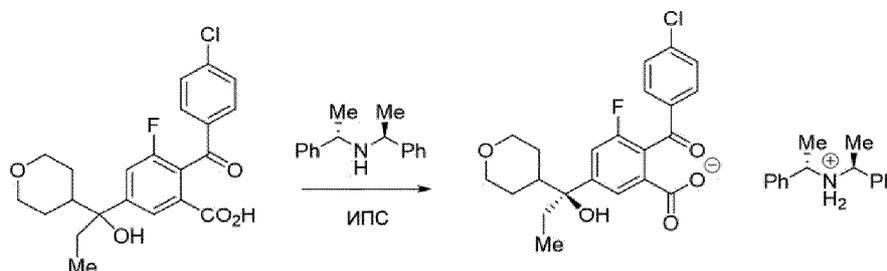


25 В ТГФ (60 мл, 15 объемов) при внутренней температуре -70 °С добавляли n-BuLi (9,8 мл, 2,0 экв., 2,3 М раствор в гексане). По каплям добавляли раствор 3-фтор-5-[1-(оксан-4-ил)-1-[(триметилсилил)окси]пропил]бензойной кислоты

(4,0 г, 1,0 экв.) в ТГФ (20,0 мл, 5 объемов) в течение 60 мин, при этом внутреннюю температуру поддерживали ниже $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Полученный бледно-красный раствор перемешивали в течение 30 мин после окончания добавления и добавляли 4-хлорбензоилхлорид (1,6 мл, 1,15 экв.) в ТГФ (2 об., 8,0 мл) в течение 10 мин, поддерживая внутреннюю температуру ниже $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ – по окончании добавления реакция завершается; этот раствор нагревали до $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ с получением 2-(4-хлорбензоил)-3-фтор-5-[1-(оксан-4-ил)-1-[[триметилсилил]окси]пропил]бензойной кислоты в виде раствора в ТГФ. ЖХМС (M+N)⁺: m/z = 493,2

10 В раствор добавляли конц. H_3PO_4 (3,8 мл, 5,0 экв.) и перемешивали смесь при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 18 ч. Смесь разводили толуолом (40 мл, 10 об.) и 4% водн. NaCl (20 мл, 5 об.). Фазы разделяли, а верхний органический слой промывали 4% водн. NaCl (20 мл) и водой (10 мл). Органический слой концентрировали до ~1/3 объема, затем разводили толуолом (60 мл, 15 об.). Раствор концентрировали до общего объема ~35 мл (~9 об., температура бани $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, давление 80 мбар), и за это время осаждалось твердое вещество. Суспензию выдерживали при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч, затем охлаждали до температуры окружающей среды и выдерживали в течение 3 ч. Суспензию фильтровали и промывали осадок 2 x 8 мл (2 x 2 об.) толуола перед сушкой в вакуумной печи (температура печи $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) до постоянной массы. Указанное в заголовке соединение получали в виде белого твердого вещества с 81% корр. выход (4,04 г, 95 масс.%). ЖХМС (M+N)⁺: m/z = 421,1

Этап 5: 2-(4-хлорбензоил)-3-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойная кислота – соль бис[(1S)-1-фенилэтил]амин



25 2-(4-хлорбензоил)-3-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойную кислоту (рацемат, 300 г, 85 масс. %, 255 г б, 1,0 экв.) растворяли в изопропанол (4000 мл) путем перемешивания при $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин с получением гомогенного раствора перед охлаждением до $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. К раствору добавляли

бис[(1S)-1-фенилэтил]амин (136,52 г; 1,0 экв.) в ИПС (300 мл) в течение 2 минут с последующим промыванием ИПС (200 мл). Раствор перемешивали при температуре окружающей среды (22–23 °С) в течение 15 минут и затем вносили заправку с аутентичным образцом указанного в заголовке соединения (0,50 г);

5 твердое вещество легко кристаллизовалось, и наблюдали слабый эндотермический эффект (около -0,4 °). Суспензию перемешивали при внутренней температуре 19 °С в течение 20 ч, фильтровали и промывали осадок ИПС (450 мл). Твердое вещество сушили при вакуумной аспирации в течение 2 ч, затем в вакуумной печи при 50 °С в течение 20 ч с получением твердого

10 вещества бежевого цвета; 175,5 г (выход 41% в виде сольвата ИПС) по данным ВЭЖХ, смесь представляет собой 95:5 с. э.

Условия хиральной ВЭЖХ:

Колонка: 3 мкм колонка ChiralPak IC-3, 4,6 x 150 мм

Температура колонки: 27 °

15 Элюент: Гептан/ИПС 80:20 с 0,1% ТФУ

Скорость потока: 1,0 мл/мин на 254 нм

Удержание Необходимый (S) энантиомер; RT = 4,60 мин.

Нежелательный (R) энантиомер, RT = 5,83 мин.

Материал (250 г, 1,0 экв., 95:5 с. э.) растворяли в ИПС (4000 мл, 16 об.)

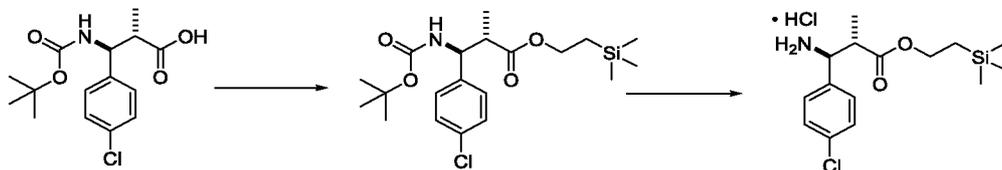
20 путем нагревания до 80 ° и перемешивания при этой температуре в течение 15 мин до образования гомогенного раствора. Раствор охлаждали в течение ~1 ч до 52 °С, вносили в него аутентичный образец указанного в заголовке соединения (0,50 г), суспензию охлаждали до 20 °С в течение 4 ч и затем перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи (всего 24 ч). Твердое вещество

25 отделяли путем фильтрации в вакууме, фильтровальный осадок промывали изопропиловым спиртом (2 x 450 мл) и высушивали фильтровальный осадок в течение 5 мин перед дополнительной сушкой в вакуумной печи при 50 °С. 2-(4-хлорбензоил)-3-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойную

30 кислоту, соль бис[(1S)-1-фенилэтил]амин, получили в виде твердого бежевого вещества (219,2 г, выход 88%); по данным ВЭЖХ с. э. составляло 99,6:0,4. ЯМР ¹H (400МГц; ДМСО): 7,84 (1H, д), 7,67 (1H, т), 7,65 (1H, т), 7,58 (1H, т), 7,56 (1H, т), 7,47 (1H, дд), 7,34-7,30 (4H, м), 7,28-7,20 (6H, м), 4,90 (1H, с), 3,90 (1H, дд), 3,80-3,72 (1H, м), 3,51-3,46 (1H, м), 3,30-3,15 (1H, м), 1,93-1,83 (3H, м), 1,68 (1H,

д), 1,41-1,28 (1H, м), 1,26 (3H, с), 1,24 (3H, с), 1,04 (3H, с), 1,03 (3H, с), 0,65 (3H, т)

Этап 6: 2-(триметилсилил)этил(2S,3S)-3-амино-3-(4-хлорфенил)-2-метилпропаноат – гидрохлоридная соль



5

В суспензию (2S,3S)-3-[[трет-бутоксикарбонил]амино]-3-(4-хлорфенил)-2-метилпропановой кислоты (109,82 г, 1,0 экв.), 2-триметилсилилэтанола (49,66 г, 1,2 экв.) и ДМАП (4,28 г, 0,05 мол. %) в ДХМ (1100 мл, 10 об.) при -10 °С добавляли EDC·HCl (100,65 г, 1,5 экв.) пятью равными порциями в течение 75 мин (поддерживая температуру ниже 0 °С). Полученному прозрачному раствору давали медленно нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 часов. 1 н. раствор HCl (1000 мл) медленно добавляли в реакционную смесь в течение 15 минут и разделяли фазы. Органическую фазу промывали 5% раствором NaHCO₃ (500 мл) и водой (2 x 500 мл). Органическую фазу концентрировали в вакууме с получением 2-(триметилсилил)этил(2S,3S)-3-[[трет-бутоксикарбонил]амино]-3-(4-хлорфенил)-2-метилпропаноата, который использовали непосредственно на следующем этапе. ЖХМС (M+H)⁺: m/z = 414,2

10

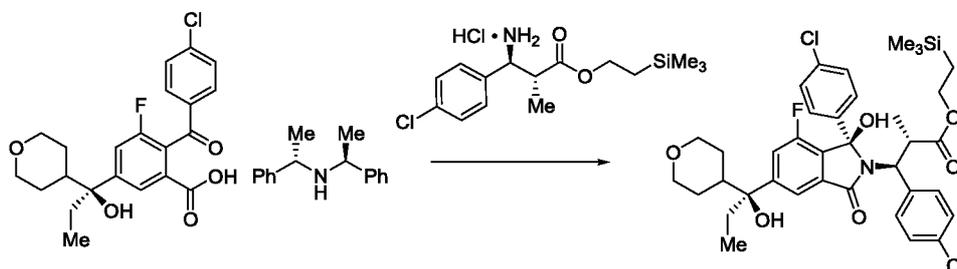
15

20

25

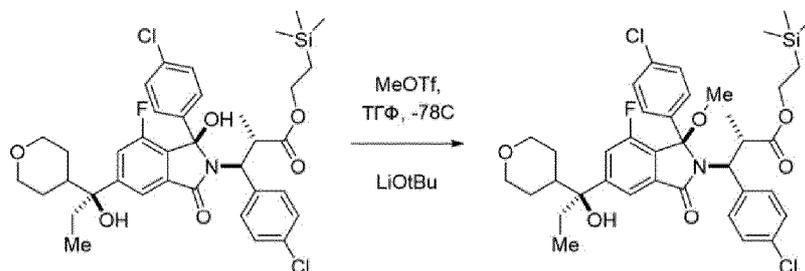
Неочищенный материал (воскообразное белое твердое вещество) повторно растворяли в смеси ДХМ (200 мл)/гептан (1500 мл) и в раствор в гептане по каплям добавляли 4 н. раствор HCl в диоксане (350 мл, 4,0 экв.) в течение 2 ч. Во время этого добавления соль HCl начинает осаждаться, а суспензия постепенно густеет по мере того, как реакционная смесь выдерживается при температуре окружающей среды в течение 24 часов. Суспензию разводили МТБЭ (800 мл), фильтровали, а фильтровальный осадок промывали МТБЭ (2×200 мл) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого хлопьевидного твердого вещества (108,22 г, 88%) после сушки в вакуумной печи при 50 °С до постоянной массы. ЯМР ¹H (400МГц; CDCl₃): 8,93 (3H, шир. с), 7,39-7,29 (4H, м), 4,3 (1H, шир. д), 4,06-3,92 (2H, м), 3,17-3,08 (1H, м), 1,32 (3H, д), 0,80-0,71 (2H, м), -0,02 (9H, с); ЖХМС (M+H)⁺: m/z = 314,1

Этап 7: 2-(триметилсилил)этил(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-гидрокси-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропаноат



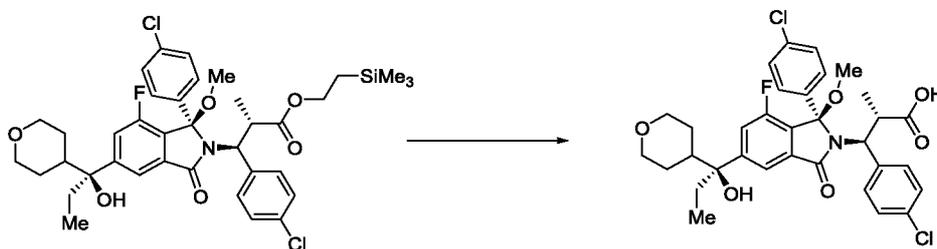
- 5 Дихлорметан (150 мл, 10 объемов) добавляли в смесь 2-(4-хлорбензоил)-3-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойной кислоты, соли бис[(1S)-1-фенилэтил]амин (15,0 г, 1,0 экв.), 2-(триметилсилил)этил(2S,3S)-3-амино-3-(4-хлорфенил)-2-метилпропаноата, гидрохлоридной соли (8,2 г, 1,1 экв.), гидрохлорида EDC (4,7 г, 1,15 экв.), ДМАП (260 мг, 0,1 экв.) и 2-
- 10 гидроксипиридин-N-оксида (230 мг, 0,1 экв.). Смесь перемешивали в течение 18 ч, затем гасили добавлением водн. NaHCO_3 (4,5 г, 2,5 экв. в 60 мл H_2O). Слои разделяли, а фазу ДХМ концентрировали до 30 мл (2 об.). Добавляли МТБЭ (150 мл, 10 об.) и последовательно промывали органический слой 2 х водн. H_3PO_4 (3,5 мл, 2,5 экв. в 60 мл воды), водн. NaHCO_3 (4,5 г, 2,5 экв. в 60 мл H_2O) и
- 15 водой (60 мл). Органический слой концентрировали до 60 мл (2 об.), разводили MeOH (300 мл, 20 об.) и концентрировали до 150 мл (10 об.). Раствор MeOH разводили водой (15 мл), засекали аутентичным образцом (15 мг, 0,1 масс. %) и выдерживали при температуре окружающей среды в течение 30 мин, пока рос затравочный слой. Суспензию разводили водой (45 мл), добавляли в течение 2
- 20 часов, выдерживали в течение 1 ч, затем фильтровали. Осадок промывали смесью 2,5/1 $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (45 мл) и водой (45 мл) и сушили в вакуумной печи при 50°C в течение 18 ч с получением указанного в заголовке соединения в виде белого твердого вещества (13,5 г, выход 89%, с. д. > 99:1 по ^{19}F ЯМР). ЯМР ^1H (400 МГц; CDCl_3): 7,80 (1H, с), 7,15 (1H, д), 7,01-6,99 (4H, м), 6,97-6,92 (4H, м), 4,77 (1H, с), 4,36 (1H, д), 4,16-4,08 (1H, м), 3,94-3,90 (1H, м), 3,89-3,79 (2H, м), 3,47 (1H, д), 3,31 (1H, т), 3,08 (1H, т), 2,55 (1H, с), 1,91 (1H, сеп), 1,86-1,77 (2H, м), 1,74-1,71 (1H, м), 1,41-1,22 (5H, м), 0,94 (1H, д), 0,68-0,54 (5H, м), 0,10 (9H, с), ЯМР ^{19}F (376 МГц, CDCl_3) δ : -119,1 и ЖХМС ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: m/z = 716,2

Этап 8: 2-(триметилсилил)этил(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропаноат



- 5 Твердый 2-(триметилсилил)этил(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-гидрокси-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропаноат (2,5 г, 1,0 экв.) растворяли в безводном ТГФ (12,5 мл, 5 объемов) в 100 мл трехгорлой колбе при комнатной температуре. Раствор охлаждали до внутренней температуры $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 10 и добавляли MeOTf (метилтрифторметансульфонат) (0,46 мл, 1,2 экв.). Полученный прозрачный раствор выдерживали при внутренней температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. LiOtBu (20 масс. % в ТГФ, 1,9 мл, 1,2 экв.) добавляли по каплям в течение 1 ч с помощью шприцевого насоса. Смесь выдерживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 18 ч, затем нагревали до $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2 ч, при этом конверсия составляла $> 98\%$.
- 15 Реакционную смесь разводили ИПС (12,5 мл), а затем водой (12,5 мл). В раствор вносили затравку продукта 10 и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 30 минут, пока не образовался затравочный слой. Дополнительную воду (25 мл) медленно добавляли с помощью шприцевого насоса в течение 1,5 ч, и выдерживали суспензию в течение 1 ч при температуре
- 20 окружающей среды перед фильтрацией. Осадок промывали 1:1 смесью изопропиловый спирт/вода (20 мл) и сушили в вакуумной печи при $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ с получением указанного в заголовке соединения (2,4 г) (нескорректированный выход 94%, с. д. 100:0,5 по ^{19}F ЯМР). ЯМР ^1H (400МГц; CDCl_3): 7,67 (1H, д), 7,28 (1H, дд), 6,93-6,88 (8H, м), 4,30-4,19 (м, 2H), 4,01 (дд, 1H), 3,92-3,77 (м, 3H), 3,40-3,26 (м, 2H), 3,22 (с, 3H), 1,97-1,84 (м, 4H), 1,72 (шир. с, 3H), 1,49-1,38 (м, 2H), 1,36 (д, 3H), 1,07 (шир. д, 1H), 0,69 (т, 3H), 0,61-0,52 (м, 2H), -0,08 (с, 9H); ЯМР ^{19}F (376 МГц, CDCl_3) δ : -118,8 и ЖХМС (M+H) $^+$: m/z = 730,3
- 25

Этап 9: (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановая кислота



5 2-(триметилсилил)этил(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропаноат (170,0 г, 1,0 экв.) и CsF (70,7 г, 2,0 экв.) загружали в 5 л стационарный сосуд и добавляли ДМФ (510 мл, 3 об.) при температуре окружающей среды. Смесь нагревали до 60 °С и выдерживали в течение 7 ч при этой температуре, после чего реакция завершалась. Смесь охлаждали до 20 °С и перемешивали в течение ночи. ДМФ разводили EtOAc (1700 мл, 10 мл) и 1 М HCl (510 мл, 3 об.). Слои разделяли и последовательно промывали органический слой 5% водн. LiCl (4 x 680 мл, 4 об.) и водой (2 x 680 мл, 4 об.) перед концентрацией. Полученное масло дважды концентрировали из EtOAc (каждый раз по 250 мл) с получением указанного в заголовке соединения в виде бледно-желтой пены (141 г корр., 92 масс. %, выход 96%). Твердое вещество суспендировали в EtOAc (684 мл, 4 об.) и нагревали до 70 °С, выдерживали при этой температуре в течение 1 ч, затем охлаждали до 20 °С в течение 2 ч. Добавляли гептан (1370 мл, 8 об.) в течение 70 минут и выдерживали суспензию в течение ночи. Твердое вещество фильтровали, промывали 1:2 смесью EtOAc/гептан (2 x 300 мл) и сушили до постоянной массы в вакуумной печи при 50 °С с получением 133 г (выход 86%).

Продукт был выделен в стабильной безводной кристаллической форме. Он был обозначен как свободная кислота «форма F» и представляет собой стабильный кристаллический полиморф.

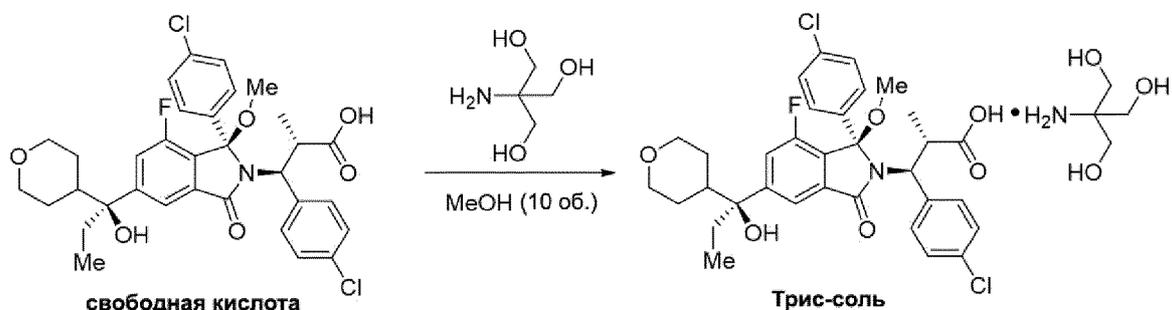
ПРД имеет пики при следующих резонансах (таблица 6):

Таблица 6

Пол. [°2-тета]	Высота [имп.]	ПШПМ [°2-тета]	d-расстояние [Å]	Отн. Меж. [%]
5,5324	119,60	0,4093	15,97459	3,19
8,0939	363,89	0,0768	10,92389	9,72

Пол. [°2-тета]	Высота [имп.]	ПШПМ [°2-тета]	d-расстояние [Å]	Отн. Меж. [%]
8,7670	654,55	0,0768	10,08658	17,48
10,0983	1123,93	0,0768	8,75963	30,02
11,0597	867,75	0,0768	8,00021	23,18
11,2706	1141,77	0,1023	7,85102	30,50
11,7674	80,69	0,1535	7,52066	2,16
13,5705	1039,22	0,1023	6,52514	27,76
14,2250	333,44	0,0768	6,22639	8,91
15,1034	2704,30	0,1279	5,86616	72,24
15,5082	3743,65	0,1279	5,71395	100,00
15,7699	2649,88	0,1023	5,61973	70,78
16,1290	684,97	0,1023	5,49539	18,30
16,5503	413,16	0,1023	5,35644	11,04
17,1682	1577,31	0,1279	5,16504	42,13
17,6278	246,51	0,1023	5,03138	6,58
18,1385	279,01	0,1023	4,89085	7,45
18,8833	723,33	0,1279	4,69961	19,32
19,1793	179,94	0,0768	4,62773	4,81
19,6727	256,37	0,1279	4,51276	6,85
20,3698	132,83	0,1023	4,35988	3,55
20,8132	2330,35	0,1279	4,26799	62,25
21,4724	496,23	0,1279	4,13844	13,26
22,2644	2823,66	0,2303	3,99297	75,43
23,2042	254,87	0,1023	3,83333	6,81
23,9443	465,26	0,1279	3,71650	12,43
24,5109	196,57	0,1023	3,63186	5,25
24,9654	105,69	0,1279	3,56676	2,82
25,4394	438,68	0,1023	3,50137	11,72
25,8370	351,04	0,1023	3,44839	9,38
26,5691	327,59	0,1535	3,35500	8,75
26,9367	637,86	0,1791	3,31004	17,04
27,3570	1012,15	0,1279	3,26015	27,04
28,2316	985,61	0,1535	3,16110	26,33
28,6372	1599,45	0,1535	3,11725	42,72
29,2407	315,65	0,1535	3,05427	8,43
29,9430	289,99	0,1791	2,98422	7,75
30,6433	463,31	0,1535	2,91759	12,38
31,2365	165,53	0,1279	2,86353	4,42
31,5627	201,49	0,1279	2,83467	5,38
32,1380	66,90	0,1535	2,78523	1,79
33,5238	129,51	0,2047	2,67320	3,46
33,7620	120,56	0,1535	2,65488	3,22
34,4905	171,78	0,1279	2,60045	4,59

Этап 10а: (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановая кислота, трис(гидроксиметил)аминометан соль



(2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту (113,0 г, 1,0 экв.) и трис(гидроксиметил)аминометан (21,95 г, 1,01 экв.) загружали в виде твердых веществ в 2 л сосуд. Добавляли метанол (1130 мл) при перемешивании в атмосфере азота с получением подвижной суспензии. Твердые вещества растворяли путем нагревания до 38–40 ° в течение 30 мин с получением прозрачного раствора. Его охлаждали до 20–22 ° и затем концентрировали при пониженном давлении на ротационном испарителе Buchi с получением белой пены. Пену переносили в чашку для кристаллизации и сушили в вакууме (около 20 мм рт. ст.) при 60 °С в течение выходных (60 ч) с получением указанного в заголовке соединения в виде хрустящей белой пены (134,1 г; 99,5 г).

10

15

Другие способы получения соединения 1 можно найти в международной заявке на патент № PCT/GB2018/050845, которая была опубликована как WO 2018/178691 04.10.2018.

20

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ

Пример 1 – Соединения формулы (I^o)

Взаимодействие MDM2-p53 с использованием анализа связывания на 96-луночном планшете (ИФА)

25 Анализ ИФА проводили в планшетах, покрытых стрептавидином, которые предварительно инкубировали с 200 мкл на лунку 1 мкг мл⁻¹ биотинилированного пептида IP3. Планшеты были готовы к использованию для связывания MDM2 после промывания планшета ФСБ.

Аликвоты соединений и контрольных растворов в ДМСО в 96-луночных планшетах предварительно инкубировали в конечной концентрации ДМСО 2,5–5% (об./об.) при комнатной температуре (например, 20 °С) в течение 20 мин с аликвотами по 190 мкл оптимизированных концентраций *in vitro* транслированного MDM2 перед переносом смеси MDM2-соединение на планшеты со стрептавидином b-IP3 и инкубацией при 4 °С в течение 90 мин. После трехкратной промывки ФСБ для удаления несвязанного MDM2 каждую лунку инкубировали при 20 °С в течение 1 часа с забуференным TBS-Твин (50 mM Трис, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% неионогенный детергент Твин 20) раствором первичного мышинового моноклонального антитела к MDM2 (Ab-5, Calbiochem, используемого при 1/10000 или 1/200 в зависимости от используемого маточного раствора антитела), затем три раза промывают TBS-Твин перед инкубацией в течение 45 минут при 20 °С с забуференным TBS-Твин раствором козьего вторичного антитела к мышиному белку, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (используемого при 1/20000 или 1/2000 в зависимости от маточного раствора антитела). Несвязанное вторичное антитело удаляли путем трехкратной промывки TBS-Твин. Активность связанной HRP измеряли с помощью усиленной хемилюминесценции (ECLTM, Amersham Biosciences) с использованием окисления диацетилгидразидного субстрата, люминола, для получения поддающегося количественному определению светового сигнала. Процент ингибирования MDM2 при данной концентрации рассчитывают как $[1 - (\text{ОЕЛ, выявленная в обработанном соединением образце} - \text{ОЕЛ отрицательного контроля ДМСО}) \div (\text{ОЕЛ положительного и отрицательного контроля ДМСО})] \times 100$ или как $(\text{ОЕЛ, выявленная в обработанном соединением образце} \div \text{ОЕЛ контролей ДМСО}) \times 100$. Рассчитывали значение IC₅₀, используя график зависимости % ингибирования MDM2 от концентрации, которое представляло собой среднее значение по двум или трем независимым экспериментам.

Вестерн-блот анализ

Клетки SJSA обрабатывали в течение 6 часов 5, 10 и 20 мкМ соединений в 0,5% ДМСО. Клетки вместе с 0,5% ДМСО (только контрольные образцы) промывали ледяным фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) и белковыми экстрактами, приготовленными путем лизирования клеток в ДСН-буфере (62,5 mM Трис, pH 6,8; 2% додецилсульфата натрия (ДСН); 10% глицерина) с обработкой ультразвуком в течение 2x5 секунд (Soniprep 150ME)

для разрушения высокомолекулярной ДНК и снижения вязкости образцов. Концентрацию белка в образцах оценивали, используя систему для анализа Pierce BCA (Pierce, Rockford, IL), и анализировали аликвоты белка по 50 мкг, используя процедуры стандартного электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) и вестерн-иммуноблоттинга. Добавляли β-меркаптоэтанол (5%) и бромфеноловый синий (0,05%), а затем образцы кипятили в течение 5 минут с последующим кратким центрифугированием перед загрузкой в предварительно подготовленный 4–20% градиент ДСН-полиакриламидного геля, забуференного Трис-глицином (Invitrogen). Стандарты молекулярной массы (SeeBlue™, Invitrogen) включали в каждый гель и проводили электрофорез в резервуаре Novex XL (Invitrogen) при 180 вольтах в течение 90 минут.

Разделенные белки электрофоретически переносили из геля в течение ночи на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C (Amersham), используя резервуар для электрофореза BioRad и 25 мМ Трис, 190 мМ глицина и 20% буфера для переноса на основе метанола, при 30 вольтах или в течение двух часов при 70 вольтах. Первичными антителами, используемыми для иммуновыявления переносимых белков, были: мышинные моноклональные NCL-p53DO-7 (Novocastra) при 1:1000; MDM2(Ab-1, клон IF2) (Oncogene) при 1:500; WAF1 (Ab-1, клон 4D10) (Oncogene) при 1:100; актин (AC40) (Sigma) при 1:1000. В качестве вторичного антитела использовали конъюгированное с пероксидазой аффинно очищенное козье антитело к мышинному белку (Dako) при 1:1000.

Выявление и визуализацию белков проводили с помощью усиленной хемилюминесценции (ECL™, Amersham) с регистрацией света путем воздействия на чувствительную к синему ауторадиографическую пленку (Super RX, Fuji).

Протокол А: анализы SJSA-1 и SN40R2

Исследуемые линии клеток с амплификацией MDM2 представляли собой изогенно совместимую пару р53 дикого типа и мутантной остеосаркомы (SJSA-1 и SN40R2, соответственно). Все клеточные культуры выращивали в среде RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой, и проводили обычное исследование с подтверждением отрицательного результата на микоплазменную инфекцию. Рост клеток и его ингибирование измеряли, используя метод с сульфородамином В (SRB), как было описано ранее. 100 мкл 3×10^4 /мл и 2×10^4 /мл клеток SJSA-1 и SN40R2, соответственно, высевали в 96-

луночные планшеты для тканевых культур и инкубировали при 37 °С в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ в течение 24 ч, после чего среду заменяли на 100 мкл среды для исследования, содержащей ряд концентраций антагониста MDM2-p53, и инкубировали еще 72 часа, чтобы обеспечить рост клеток, перед
 5 добавлением 25 мкл 50% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) для фиксации клеток в течение 1 часа при 4 °С. ТХУ смывали дистиллированной водой, а в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл красителя SRB (0,4% масс./об. в 1% уксусной кислоте) (Sigma-Aldrich, Poole, Dorset). После инкубации с красителем SRB при комнатной температуре в течение 30 мин планшеты промывали 1%
 10 уксусной кислотой и оставляли сушиться. Окрашенный SRB белок, который является показателем количества клеток в лунке, затем ресуспендировали в 100 мкл 10 мМ Трис-НСl (рН 10,5) и измеряли оптическую плотность на $\lambda = 570$ нм в каждой лунке, используя планшет-ридер FluoStar Omega. GI₅₀ рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа данных, используя
 15 статистическое программное обеспечение Prism v4.0.

Протокол В: анализы SJSA-1 и SN40R2

Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® представляет собой гомогенный метод определения количества жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего
 20 АТФ, который сигнализирует о наличии метаболически активных клеток. Как SJSA-1, так и SN40R2 выращивали в среде RPMI 1640 (Life Technologies № 61870), дополненной 10% ФБС (РАА № А15-204) и 10 Е/мл пенициллина/стрептомицина. 2000 клеток в 75 мкл высевали в каждую лунку 96-луночного планшета и оставляли при 37 °С в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂
 25 на 24 часа. Затем к клеткам добавляли ряд концентраций антагониста MDM2-p53 в ДМСО до конечной концентрации ДМСО 0,3% и инкубировали в течение дополнительных 72 ч, чтобы обеспечить рост клеток. Во все лунки добавляли по 100 мкл реагента CTG (Promega, № G7573) и измеряли люминесценцию по верхнему счету. Значения ЕС₅₀ определяли по сигмоидальной аппроксимации 4-
 30 параметрической кривой с использованием XLfit в сочетании с Activity Base (IDBS; Guildford, Surrey, UK).

Антипролиферативная активность

Ингибирование клеточного роста измеряют, используя анализ с аламаровым синим (Nociari, M. M, Shalev, A., Benias, P., Russo, C. *Journal of*

Immunological Methods 1998, 213, 157-167). Этот метод основан на способности жизнеспособных клеток восстанавливать резазурин до его флуоресцентного продукта резорурфина. Для каждого анализа пролиферации клетки высевали в 96-луночные планшеты и оставляли для восстановления на 16 часов перед добавлением соединений-ингибиторов (в 0,1% ДМСО об./об.) еще в течение 72 часов. В конце периода инкубации добавляют 10% (об./об.) аламарового синего и инкубируют еще в течение 6 часов перед определением флуоресцентного продукта на 535 нм (возб.)/590 нм (исп.). Антипролиферативную активность соединений по изобретению можно определить путем измерения способности соединений ингибировать рост линий раковых клеток, например, доступных от DSMZ, ECACC или ATCC.

Результаты: первая группа примеров, где сус представляет собой фенил.

Таблица 7 – Биологические данные, полученные в анализах, описанных в данном документе

Патентный пример	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
1	0,012	0,49	0,55	18	10% при 10
2	0,0046	0,33	0,46	17	22% при 10
3	0,093				
4	0,043				
5	0,14				
6	0,12				
7	0,0066				
8	0,0047	0,33		18	
9	0,011				
10	0,0037	0,14		7,5	
11	0,033				
12	0,0058	0,51	0,69	5,9	
13	0,12	4,6		5,9	
14	0,0050	0,83	0,49	10% при 30	9% при 10
15	0,019				
16	0,14	2,1		13	
17	0,063	0,95		8,1	
18	0,045	0,80		18	
19	0,022	0,62	2,0	13	13
20	0,011	0,33		11	
21	0,0078	0,23	0,39	15	51% при 10
22	0,0052	0,21		18	
24	0,0075	0,37	0,63	21	19% при 10
25	0,0072	0,71	1,1	25	14% при 10

Патентный пример	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
26	0,032	1,7		17	
27	0,065	2,1		29% при 30	
28	0,026	0,93		26% при 30	
29	0,11	1,4		17	
30	0,086	2,4		27	
31	0,038	1,2		18	
32		0,87		15	
33	0,0019	9,1		7% при 30	
34	0,0046	0,093		9,9	
35	0,0018	0,16	0,69	23	13
36	0,0019	0,078		17	
37	0,041	1,2		13	
38	0,026	0,67		17	
39	0,068	2,0		18	
40	0,063	1,5		17	
41	0,0016	0,14		13	
42	34% при 0,00030	0,011	0,03	12	10
43	47% при 0,0010	0,57		12	
44	0,0058	0,83		6,8	
45	0,23				
46	10,78				
47	0,43				
48	0,0073	0,46	0,97	17	24% при 10
49	0,082	1,6		18	
50	0,00080	0,079	0,032	17	22% при 10
51	0,13				
52	0,15	1,8			
53	0,12	1,9			
54	0,15				
55		1,7		11	
56	0,12				
57	0,061	1,4		16	
58	0,018	0,59		15	
59	0,0041	0,25		19	
60	0,014				
61	0,016	0,69		44% при 30	
62	0,0023	0,055		55% при 30	
63	71% при 0,0010		0,096		19% при 10
64	0,0021				
65	0,0018		0,26		
66	0,0030				
67	60% при 0,0010		0,53		9,4
68	0,0070		1,8		13
69	0,00070	0,081	0,16	15	6,6
70	0,0057		0,68		4,9
71	0,0020	0,66	0,7	44	3% при 10

Патентный пример	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
72	0,0015	0,14	0,17	16	45% при 10
73	0,012		3,6		39% при 30
74	0,00050	0,28	1,0	28	13
75	73% при 0,0010	0,12	0,35	22	12
76	0,0095		1,0		13
77	61% при 0,00030		0,46		3,7
78	0,0046	0,41	1,4	5,9	4,2
79	0,0022		8,1		10% при 30
80	73% при 0,0010		0,83		13
81	0,0026				
82	0,0025	0,21		51% при 30	
83	0,0010		0,53		11
84	39% при 0,00030	0,065		18	
85	0,00049		0,049		13
86	56% при 0,10				
87	82% при 0,0030		37% при 10		1% при 10
88	0,00079	0,15	0,23	39	11% при 10
89	0,012		3,6		3% при 10
90	39% при 0,030		97% при 10		6% при 10
91	78% при 0,0010	0,080	0,059	26	13% при 10
92	76% при 0,0010	0,080	0,084	36	12% при 10
93	49% при 0,030		3,3		12% при 10
94	64% при 0,10				
95	87% при 0,0010	0,036	0,022	16	21% при 10
96	0,00064	0,071	0,075	19	17% при 10
97	45% при 0,10				
98	0,0008	0,081	0,13	33	11% при 10
99	0,012		3,2		4% при 10
100	0,0063		1,7		7% при 10
101	55% при 0,00030	0,026	0,026	18	11% при 3
102	0,017		1,4		26% при 10
103	55% при 0,030		0,8		18% при 10
104	70% при 0,10		42% при 10		5% при 10
105	92% при 0,0010	0,022	0,05	33	20% при 10
106	57% при 0,030		3,2		8% при 10
107	78% при 0,0010	0,021	0,038	24	18% при 10
108	0,0061		27% при 10		29% при 10
109	92% при 0,0010	0,012	0,02	26	75% при 10
110	76% при 0,0010	0,026	0,013	17	30% при 10
111	61% при 0,0010	0,024	0,037	9	51% при 10
113	57% при 0,0010		0,02		10% при 10
114	81% при 0,0010	0,029	0,063	20	15% при 10
115	73% при 0,0010		0,22		2% при 10
116	88% при 0,0010	0,08	0,14	44	12% при 10
117	45% при 0,03		30% при 10		19% при 10
118	87% при 0,0010		0,36		8% при 10

Патентный пример	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
119	54% при 0,0010	0,06	0,2	39	7% при 10
120	76% при 0,0010	0,063	0,095	40% при 50	4% при 10
121	93% при 0,0010	0,015	0,015	26	18% при 10
122	88% при 0,0010		0,024		20% при 10
123	42% при 0,030		107% при 10		16% при 10
124	80% при 0,0010	0,023	0,027	23	55% при 10
125	18% при 0,10				
126	0,0019	0,6	0,61	30	7% при 10
127	0,0045		1,4		14% при 10
128	39% при 0,10				
129	90% при 0,0010	0,047	0,048	6	112% при 10
130	98% при 0,0010		0,23		87% при 10
131	89% при 0,0010	0,044	0,093	22	-3% при 10
132	43% при 0,030		0,75		34% при 10
133	6% при 0,10		37% при 10		89% при 10
134	0,0011		0,78		2% при 10
135	40% при 0,10		20% при 10		7% при 10
136	0,0013		0,056		86% при 10
137	0,00057		0,15		12% при 10

В тех случаях, когда было получено более одного набора данных, в таблице выше представлено среднее значение (например, геометрическое или арифметическое среднее) этих по этим данным.

- 5 Конечно, следует понимать, что настоящее изобретение ограничивается деталями вышеприведенных вариантов осуществления, которые описаны только в качестве примера.

Результаты: вторая группа примеров, где сус представляет собой Нет.

Результаты

- 10 *Таблица 8 – Биологические данные, полученные в анализах, описанных в данном документе*

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
7	0,0036	0,11	0,34	26	8% при 10
8	0,053	2,0	3,8	34% при 30	11% при 10
6	0,023	1,7	2,5	13% при 30	4% при 10
9	0,015	0,82		32% при 30	
93	0,030	1,0		40% при 30	
31	0,017	0,55	0,76	20% при 30	0% при 10
1	0,0020	0,088	0,2	24	14% при 10

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
94	0,10	2,4		15% при 30	
2	0,026	1,7	3,4	38% при 30	10% при 10
47	0,12	1,6		24	
46	0,016	0,59	0,76	42% при 30	13% при 10
10	0,016	0,32		6% при 30	
44	0,015	0,28		24	
61	0,11	0,86		26% при 30	
62	0,041	0,75		29% при 30	
5	0,0038	0,20	0,28	20% при 30	7% при 10
38	0,0094	0,64		15% при 30	
39	0,0044	0,17		3% при 30	
45	0,0084	0,23		27	
63	0,032	0,57		27	
11	0,0087	0,23	0,46	15% при 30	
32	0,0012	0,089	0,14	27	9% при 10
12	0,046	1,5		0% при 30	
33	0,010	0,61		31% при 30	
13	0,0077	0,52	0,73	24	21% при 10
48	0,018	0,60	0,56	4% при 30	-3% при 10
64	0,040	0,75		3% при 30	
95	0,060	2,0		19	
34	0,085	0,97	2,2	14% при 30	20% при 30
16	0,030	0,27		24% при 30	
17	0,0038	0,10	0,21	29% при 30	
3	0,12	0,96		7% при 30	9% при 30
14	0,029	0,55		13% при 30	
15	0,0068	0,21		22% при 30	
54	0,10	2,2		25	
59	0,034	0,70		34% при 30	
4	0,010	0,23	0,24	24% при 30	9% при 10
49	0,040	0,38		18% при 30	
60	0,020	0,55		27	
18	0,020	0,51		20% при 30	
19	0,0027	0,069		20% при 30	
65	0,021	0,41		24	
35	0,010	0,45	0,8	8% при 30	6% при 10
42	0,010	0,45	0,60	29% при 30	14% при 10
43	0,026	0,49	0,48	16% при 30	13% при 10
40	0,046	0,81	1,0	2% при 30	9% при 10
41	0,013	0,32	0,47	15% при 30	8% при 10
37	0,035	0,26		25	12
50	0,0088	0,23		24	
96	0,14				
51	0,69				
22	0,0018	0,16	0,059	19	13
23	0,0074	0,55		17	
36	0,0051	0,21	0,18	13% при 30	
74	0,015	0,31		24	

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
28	0,014	0,19		44% при 30	
55	0,49				
56	0,021	0,33		24	
30	0,017	0,30		0% при 30	
24	0,0077	0,24		42% при 30	
25	0,0018	0,054	0,090	26	13% при 10
26	0,027	0,58		28	
27	42% при 0,0030	0,24	0,71	23	11% при 10
52	0,031	0,25		15% при 30	
87	0,031	0,71		19	
77	0,076	2,2		48% при 30	
78	0,026	0,77		26	
53	0,12				
29	0,012	0,39	0,52	16% при 30	25% при 30
20	0,026	1,6		4% при 30	
21	0,0052	0,27		10% при 30	
119	0,018	0,53		47% при 30	
118	0,034	0,67		39% при 30	
79	0,0046	0,12	0,38	25	2% при 10
97	0,013	0,37		24	
98	0,018	0,43		23	
73	0,082	1,8		0% при 30	
75	0,0045	0,14	0,47	29	15% при 10
70	0,0032	0,21		48% при 30	
76	0,0065	0,54		20	
71	0,082	5,3		33% при 30	
124	0,093	1,9		2% при 30	
122	0,033	0,68		9,9	
123	0,0098	0,23		21	
120	0,085	1,9		39% при 30	
121	0,023	0,55		28% при 30	
104	52% при 1,0				
105	0,015	0,40		9,8	
67	0,029	0,71		36% при 30	
85	0,0017	0,10		34% при 30	
86	0,15				
110	55% при 1,0				
111	0,059	2,0		29	
106	0,52	5,2		24	
107	0,016	0,38		29	
108	0,79	8,2		16	
109	0,11	1,7	3,5	18	24% при 10
114	0,12	2,0		10% при 30	
115	81% при 0,10	5,2		13% при 30	
82	0,027	0,62		32% при 30	
83	41% при 0,0010	0,038		36% при 30	

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
66	0,0099	0,51	0,73	18	13
89	0,011	0,45		23% при 30	
90	0,00064	0,046		24% при 30	
112	0,18	5,4		15% при 30	
113	0,0069	0,50		13% при 30	
84	0,022	1,3		23% при 30	
99	35% при 1,0				
100	0,016	0,47		38% при 20	
101	0,013	0,28		25% при 30	
72	0,0086	0,36		35% при 30	
81	0,11				
91	41% при 0,15				
92	0,0059	0,24		21	
102	37% при 0,30				
103	0,022	0,43		9,5	
68	0,0016	3,2		19% при 30	
69	0,0081	7,6		32% при 30	
57	44% при 0,30				
58	0,0053	0,23		24	
88	0,028	1,5		12% при 30	
125	0,10				
126	0,015				
116	48% при 0,10				
117	0,0078	0,26		26	
419	0,018	0,70		21% при 30	
318	11% при 0,025				
319	0,0076	0,16		14	
327	42% при 0,30	9,3		9% при 30	
328	42% при 0,10	2,3		25	
329	61% при 0,30	3,0		8% при 30	
330	36% при 0,30	7,1		18% при 30	
381	33% при 0,30	46% при 10		17	
382	0,036	0,82		18	
383	31% при 0,30	6,6		18	
384	39% при 0,030	0,36		16	
157	39% при 0,30	6,4		30% при 30	
158	57% при 0,10	1,2		30% при 30	
242	35% при 0,30	6,3		6,2	
243	0,018	0,63		5,8	
245	51% при 0,30	7,4		16	
241	0,012	0,58		8,9	
239	0,015				
248	37% при 0,30				
247	0,022	0,76		18	
238	41% при 0,30	52% при 10		19	
246	37% при 0,30	7,6		18	
237	0,013	0,55		16	
244	36% при 0,30	40% при 10		18	

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
240	0,032	0,91		17	
159	0,031	1,2		24	
160	43% при 0,30				
167	0,011	0,64		19% при 30	
253	53% при 1,0				
253а	0,035	0,85		29	
252	41% при 0,30				
249	0,013	0,51		34% при 30	
251	61% при 1,0				
250	0,0072	1,6		18	
320	0,0060	2,7		24	
321	0,0027	1,4		22	
258	50% при 1,0				
257	0,12	1,9		29% при 30	
256	59% при 1,0				
255	0,0032	0,51		16	7,1
254	45% при 0,30				
259	0,0097	0,96		5,5	
127	45% при 0,0033	0,38		20% при 30	
134	47% при 0,30				
135	0,049	1,6		38% при 30	
323	46% при 0,64				
324	0,028	0,57		23	
260	39% при 1,0				
261	0,048	0,65		19	
169	0,0046	0,26		43	
170	4% при 0,10				
275	43% при 0,30				
262	0,033	0,47		22	
233	37% при 1,0				
234	0,015	0,38		21	
128	0,11	2,4		23	
129	0,0047	0,24		21	
263	45% при 1,0				
264	0,043	0,67		8,0	
235	40% при 1,0				
236	0,041	0,72		28	
316	0,0072	0,86		17% при 30	
317	0,0016	0,19		36% при 50	
377	0,11				
378	52% при 0,30				
376	0,0040		0,32		18% при 10
302	63% при 0,10	5,3		9% при 30	
303	0,0016	0,55		13% при 30	
268	45% при 1,0				
266	0,015				
267	42% при 1,0				

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
265	0,044				
289	0,012				
291	45% при 0,0010				
292	0,021				
172	0,13				
171	0,14				
270	33% при 1,0				
269	0,16				
290	0,0025				
168	0,039				
175	0,0061				
176	0,0010				
379	52% при 1,0				
271	0,014				
380	59% при 1,0				
274	0,0097				
309	0,0023				
273	47% при 1,0				
272	0,0088				
177	47% при 0,030				
178	0,00079	0,16	0,10	43% при 50	18% при 30
145	0,21				
147	44% при 0,10				
310	53% при 0,0010				
173	0,025				
146	0,081				
148	0,035				
153	0,015				
154	0,014				
287	0,0031				
151	32% при 0,30				
152	0,30				
149	53% при 1,0				
150	49% при 0,10				
345	0,0037				
346	46% при 0,00030	0,031	0,012	20	12
288	0,046				
281	58% при 0,10				
280	0,0063				
131	0,092				
130	0,0057		0,17		8% при 10
285	41% при 0,10				
284	0,0025		0,017		12% при 30
132	51% при 0,30				
133	33% при 1,0				

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
305	0,0015		1,9		32% при 30
282	0,0021		0,061		5% при 30
283	57% при 0,10				
304	0,0022		0,36		9,0
161	0,016		4,3		28% при 30
162	0,0022		0,22		13
308	0,044				
136	0,037		1,4		13
137	0,0016	0,20	0,27	21	11
306	55% при 0,030		6,6		13
199	49% при 0,030		0,83		16% при 30
200	0,00071	0,066	0,099	40	21% при 30
189	0,013		1,0		47% при 30
190	0,037		5,0		19% при 30
205	0,0012	0,18	0,22	34	12
206	0,0015		0,45		13
207	56% при 0,10		2,2		13
307	62% при 0,030		1,9		11
315	0,46		12		13
163	0,042		3,1		13
164	0,034		2,2		28% при 30
165	0,017		1,4		13
166	48% при 0,010		3,8		33% при 30
208	0,027		2,3		24% при 30
298	0,00066	0,22	0,55	7,6	8,9
299	0,0096		2,0		8,0
191	0,048		2,5		11
192	0,0021		1,4		11
420	68% при 0,0010	0,49	0,87	17	4,4
301	75% при 0,0010	0,070	0,036	28	12
286	0,0041		0,68		12
293	0,0011	0,11	0,37	35	45% при 30
209	0,0041	0,59	0,45	22% при 50	17% при 30
210	46% при 0,030				17% при 30
187	0,0055		0,89		5% при 10
188	49% при 0,10				
294	0,00093		0,077		23% при 10
197	0,00062		0,21		2% при 10
198	0,0050				
211	0,0010	0,28	0,36	41% при 50	5% при 10
212	54% при 0,030				
202	72% при 0,0010	0,064	0,11	24	13% при 10
201	0,0029		0,76		9% при 10
194	0,0033				
193	0,00077	0,13	0,14	34	11% при 10

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
144	0,0021		2,9		3% при 10
300	60% при 0,0010				
179	48% при 0,030				
180	0,00095		0,16		14% при 10
295	0,00093				
138	0,0044		0,56		18% при 10
139	42% при 0,030				
156	0,0011		0,25		9% при 10
213	0,0021	0,26	0,25	42% при 50	3% при 10
343	49% при 0,10				
203	0,0012	0,10	0,080	19% при 50	7% при 10
204	0,012		0,94		-1% при 10
214	0,0014	0,26	0,22	12% при 50	0% при 10
215	51% при 0,030				
311	0,0026		0,25		11% при 10
312	57% при 0,030				
216	0,0032		0,28		1% при 10
217	52% при 0,10				
181	42% при 0,010				
182	0,0013		0,88		6% при 10
140	0,00070		0,23		
141	0,017		1,8		
142	0,00073		0,23		
143	0,0043		0,86		
277	0,0012		1,2		5% при 10
276	0,0036		2,5		33% при 10
279	0,00097		0,57		17% при 10
278	0,0034		2,6		18% при 10
196	0,0013	0,11	0,15	27% при 50	7% при 10
218	0,00086	0,22	0,43	31% при 50	4% при 10
219	0,00095	0,087	0,11	33	8% при 10
220	0,0081		0,60		14% при 10
296	62% при 0,0010	0,11	0,16	32	12% при 10
195	0,0055		0,61		4% при 10
221	0,033		2,2		3% при 10
222	80% при 0,0010	0,064	0,099	36	14% при 10
223	0,0026		0,52		8% при 10
324	0,0048		2,2		2% при 10
224	0,00070	0,078	0,12	47	6% при 10
226	0,0095		0,57		3% при 10
225	48% при 0,030		1,8		9% при 10
347	63% при 0,10		1,7		
325	0,0013		0,24		
227	0,0048		0,29		8% при 10
228	61% при 0,010		0,21		

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
174	0,0038				
183	0,0042		0,43		4% при 10
184	0,00092		0,14		8% при 10
372	52% при 0,10		2,6		
373	0,0023		0,26		12% при 10
297	0,0026		0,76		5% при 10
229	51% при 0,10		1,4		
230	0,0055		0,22		0% при 10
344	0,010		1,9		0% при 10
231	0,0028		0,33		5% при 10
232	50% при 0,10		2,3		5% при 10
185	47% при 0,010		2,2		8% при 10
186	0,0089		0,42		2% при 10
313	0,0028		0,95		2% при 10
314	52% при 0,010		66% при 10		9% при 10
155	0,0094		0,31		
353	69% при 0,0010	0,19	0,27	44% при 50	6% при 10
352	0,0055		1,1		13% при 10
385	0,0061		0,45		5% при 10
354	0,0013	0,16	0,34	36	8% при 10
421	0,00084		0,59		5% при 10
357	0,0015		0,30		10% при 10
360	0,0032		0,74		9% при 10
358	74% при 0,0010		0,039		9% при 10
359	50% при 0,10		3,9		6% при 10
389	41% при 0,10		4,2		9% при 10
390	0,0035		0,63		11% при 10
391	0,0066		0,66		2% при 10
350	54% при 0,030		0,51		2% при 10
351	25% при 0,10		4,3		5% при 10
405	0,010		0,63		6% при 10
406	54% при 0,10		3,9		11% при 10
418	0,00081	0,12	0,28	25	8% при 10
326	50% при 0,030		2,0		16% при 10
407	62% при 0,0010		0,58		-9% при 10
408	0,0011		0,75		5% при 10
409	0,0019	0,28	0,41	12% при 50	5% при 10
395	44% при 0,030				
396	0,0044		0,28		9% при 10
392	45% при 0,10				
340	56% при 0,10		2,0		
348	0,0026		0,27		5% при 10
349	79% при 0,0010	0,042	0,028	44	6% при 10
341	0,0023	0,53	0,50	15% при 30	-0% при 10

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
386	0,00065	0,034	0,019	45	6% при 10
331	49% при 0,030				
403	52% при 0,030		1,2		2% при 10
397	49% при 0,030		2,5		7% при 10
422	0,0032		1,1		
404	0,0018	0,16	0,095	25	12% при 10
355	16% при 0,10		4,7		
356	0,0059	1,1	0,96	17% при 50	5% при 10
410	0,0022		0,19		4% при 10
411	0,00093	0,11	0,077	40	6% при 10
412	0,0023		0,27		8% при 10
413	0,0020	0,22	0,24	41	12% при 10
398	0,0023	0,58	0,58	16% при 50	4% при 10
423	0,0020	0,24	0,25	34	
416	0,0011	0,17	0,15	19	25% при 10
417	0,0052		0,41		16% при 10
332	60% при 0,030		2,6		5% при 10
414	60% при 0,0030		0,11		
415	0,00084		0,24		
393	0,0065		0,79		
394	18% при 0,10				
424	45% при 0,0030		0,69		
338	50% при 0,030		1,5		6% при 10
337	48% при 0,00010	0,051	0,058	46	7% при 10
361	0,0039		0,78		8% при 10
362	52% при 0,10				
425	0,0019		0,74		7% при 10
399	50% при 0,00030		11% при 10		2% при 10
400	0,0031		1,1		4% при 10
363	48% при 0,10				
364	0,0055		0,47		9% при 10
333	0,0044		0,22		5% при 10
334	42% при 0,10		73% при 10		4% при 10
365	0,0011	0,067	0,10	33% при 50	-0% при 10
366	0,19		2,7		2% при 10
335	51% при 0,10		2,8		7% при 10
336	56% при 0,0010	0,10	0,16	42	4% при 10
401	37% при 0,00030	0,0089	0,0098	36	6% при 10
402	0,0043		0,21		5% при 10
367	0,0026	0,22	0,11	46	1% при 10
368	27% при 0,10		52% при 10		6% при 10
371	43% при 0,030		2,3		3% при 10

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
374	0,00090	0,64	0,85	26% при 50	2% при 10
375	37% при 0,10				
387	42% при 0,10				
388	0,0021	0,066	0,23	39	4% при 10
369	0,00061	0,058	0,062	18% при 50	5% при 10
370	51% при 0,10		3,5		0% при 10
339	0,00051		0,21		3% при 10
342	25% при 0,10		21% при 10		4% при 10
428	65% при 0,0010	0,11	0,19	22	12% при 10
429	65% при 0,10				
430	59% при 0,0010	0,11	0,18	33% при 50	4% при 10
431	48% при 0,0010	0,11	0,16	39% при 50	5% при 10
432	45% при 0,030		6,2		8% при 10
443	58% при 0,0010	0,11	0,093	38	3% при 10
444	63% при 0,10				
433	0,011		1,5		20% при 30
434	0,0013		0,47		7% при 10
448	84% при 0,0010		0,86		48% при 30
445	43% при 0,0010 56% при 0,10		3,3		16% при 10
446	76% при 0,0010	0,018	0,023	29	13% при 10
447	74% при 0,0010		0,011		10% при 10
435	66% при 0,0010		0,015		0% при 10
436	53% при 0,10				
426	0,00072	0,22	0,32	29% при 50	4% при 10
427	41% при 0,10				
437	51% при 0,030		2,5		-4% при 10
438	0,0016		0,34		2% при 10
439	85% при 0,0010	0,045	0,030	46% при 50	3% при 10
440	0,012		1,9		7% при 10
449	78% при 0,0010	0,041	0,012	18	19% при 10
450	76% при 0,0010		0,38		15% при 10
441	0,012		1,5		1% при 10
442	0,0034	0,42	0,50	26% при 50	6% при 10
451	0,078				
452	0,15				

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
453	0,094				
454	0,035				
455	58% при 1,0				
456	0,21				
457	53% при 0,30				
458	44% при 0,010				12
459	0,0020		6,4		7% при 10
460	0,48				
461	0,00053	0,075	0,091	19% при 50	6% при 10
462	80% при 0,0010	0,073	0,047	37% при 50	4% при 10
463	73% при 0,10				
464	0,0019		0,18		46% при 10
465	29% при 0,10				
466	0,00086	0,21	0,14	41% при 50	4% при 10
467	36% при 0,10				
468	0,0035		0,48		2% при 10
469	52% при 0,030				
470	0,001		0,1		3% при 10
471	38% при 0,10		3,5		2% при 10
472	48% при 0,0030		0,39		10% при 10
473	44% при 0,10		104% при 10		11% при 10
474	38% при 0,030		1,3		12% при 10
475	71% при 0,0010	0,028	0,022	46% при 50	7% при 10
476	51% при 0,030		0,6		4% при 10
477	86% при 0,0010	0,013	0,0091		5% при 10
478	58% при 0,10		81% при 10		-0% при 10
479	0,0006		0,079		2% при 10
480	67% при 0,10		3,7		2% при 10
481	0,0014		0,33		8% при 10
483	58% при 0,0010		0,2		9% при 10
485	58% при 0,10		4,2		3% при 10
486	59% при 0,0010	0,075	0,051	10% при 50	7% при 10
493	0,00054	0,038	0,02	25	11% при 10
494	0,013				
495	0,0011	0,068	0,054	34% при 50	7% при 10
496	56% при 0,10		1,8		-0% при 10
500	21% при 0,10		16% при 10		6% при 10
501	0,0031	0,015	0,022	6,4	8% при 3,0
502	18% при 0,10		4,9		11% при 10
503	87% при 0,0010		0,011		13% при 10

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
505	60% при 0,0010		0,027		5% при 10
506	36% при 0,030		3,4		2% при 10
507	65% при 0,0030		0,02		5% при 3
508	17% при 0,10		11% при 10		9% при 10
509	0,00094		0,042		6% при 10
510	79% при 0,0010	0,084	0,073	5% при 50	9% при 10
511	72% при 0,0010		0,018		10% при 10
512	0,00048	0,053	0,025	27% при 50	5% при 10
514			0,64		3% при 10
516	0,0012		0,038		4% при 10
517	82% при 0,0010	0,019	0,01	26% при 50	5% при 10
518	79% при 0,0010	0,058	0,065	46% при 50	10% при 10
519	35% при 0,030		1,9		12% при 10
520	32% при 0,030		3,9		5% при 10
521	77% при 0,0010	0,035	0,033	37	11% при 10
524	0,021		1,1		35% при 10
525	50% при 0,0010	0,17	0,078	17	40% при 10
526	0,0013	0,11	0,11		9% при 10
527	0,017		1,4		14% при 10
528	0,0029		0,32		10% при 10
530	0,0031		0,39		2% при 10
531	42% при 0,10		4,3		8% при 10
532	0,0031		0,14		7% при 10
533	44% при 0,10		4		20% при 10
534	0,0088		0,7		44% при 10
535	65% при 0,0010	0,05	0,058	18	45% при 10
536	64% при 0,0010		0,13		46% при 10
522	0,0007	0,053	0,048	19	24% при 10
523	50% при 0,030		1,5		29% при 10
537			0,76		45% при 10
538	44% при 0,030		2,2		43% при 10
539	41% при 0,0010		0,092		38% при 10
540	33% при 0,030		1,8		62% при 10
541	64% при 0,00030	0,19	0,014	13	10
542	57% при 0,010		3,1		-1% при 10

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
543	68% при 0,0010		0,69		-6% при 10
544	86% при 0,0010	0,032	0,041	7,4	109% при 10
545	94% при 0,0010		0,094		4% при 3
546	86% при 0,0010		0,7		17% при 10
547	82% при 0,0010		0,96		4% при 10
548	82% при 0,0010	0,14	0,17	6,3	111% при 10
549	85% при 0,0010		0,27		33% при 10
553	0,0006		0,065		24% при 10
554	74% при 0,0010	0,21	0,07	46% при 50	11% при 10
555	55% при 0,0010		0,079		58% при 10
556	91% при 0,0010	0,056	0,0064	27	14% при 10
557	81% при 0,0010	0,25	0,037	37% при 10	6% при 10
558	53% при 0,0030	0,22	0,082	35	6% при 10
559	0,00062	0,46	0,052	22% при 50	1% при 10
560	30% при 0,0010		0,13		3% при 10
561	47% при 0,0010	0,021	0,065	26	12% при 10
562	0,0013		0,25		1% при 10
563	76% при 0,0010	0,025	0,027	15	72% при 10
564	86% при 0,0010	0,018	0,00038	16	10% при 3
565	65% при 0,0010	0,045	0,035	33	11% при 10
566	47% при 0,030		1,9		46% при 10
567	57% при 0,10				
568	76% при 0,0010		0,094		36% при 10
570	83% при 0,0010	0,034	0,046		26% при 10
571	77% при 0,0010	0,023	0,0085	17	38% при 10
572	53% при 0,00075	0,019	0,022	18	23% при 10
550	0,00098	0,077	0,056	17	33% при 10

Напри- мер	IC50 MDM2 (мкМ)	IC50 SJSA-1 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SJSA1 (мкМ) (Протокол В)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол А)	IC50 SN40R2 (мкМ) (Протокол В)
551	70% при 0,0010	0,031	0,026	36	13% при 10
552	79% при 0,0010	0,028	0,02	21	7% при 10
513	0,0031	0,26	0,38	19% при 50	4% при 10
576	42% при 0,0030		0,14		5% при 10
577	0,00093		0,079		7% при 10
491	0,0089		0,81		5% при 10
578	0,002		0,12		4% при 10
499	68% при 0,0010		0,053		2% при 10
498	32% при 0,10		96% при 10		4% при 10
497	83% при 0,0010	0,039	0,046	45	10% при 10
487	59% при 0,0010	0,12	0,025	27	12% при 10
488	56% при 0,10				
529	0,028		2,2		17% при 10
482	58% при 0,10		5		3% при 10
484			4,9		2% при 10
574	45% при 0,0010	0,021	0,016	17	27% при 10
575	38% при 0,0010	0,028	0,066	21	14% при 10
504	71% при 0,0010	0,039	0,034	48	0% при 10
492	31% при 0,10		25% при 10		19% при 10
579	41% при 0,030		19% при 10		4% при 10
515	0,0014		1,0		8% при 10
489			3,3		-9% при 10
490	0,0023		0,27		-0% при 10
580			0,014		13% при 10

В тех случаях, когда было получено более одного набора данных, в таблице выше представлено среднее значение (например, геометрическое или арифметическое среднее) этих по этим данным.

- 5 Конечно, следует понимать, что настоящее изобретение ограничивается деталями вышеприведенных вариантов осуществления, которые описаны только в качестве примера.

Пример 2. Исследование биомаркеров, прогностических в отношении повышенной чувствительности к антипролиферативным эффектам соединения 1 при скрининге панели из 210 линий раковых клеток р53 дикого типа

5 Соединение 1 подвергали скринингу на панели из 210 линий раковых клеток р53 дикого типа, полученных из ряда опухолевых тканей, включая толстую кишку, кровь, молочную железу, легкие, кожу, яичники и поджелудочную железу. Значения IC₅₀ и площади активности рассчитывали по исходным кривым доза – ответ. Клеточные линии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) оказались наиболее чувствительными. Дифференциальный анализ экспрессии генов на апоптотических и неапоптотических клеточных линиях ОМЛ неожиданно выявил низкую экспрессию SKP2 в качестве нового биомаркера ОМЛ (Фигура 1).

Методы:

15 Раковые клетки культивировали в соответствующей среде. Клетки собирали и подсчитывали, используя счетчик для клеток Vi-cell XR. Клетки доводили до соответствующей плотности и высевали в объем 100 мкл в 96-луночные планшеты с непрозрачными стенками и прозрачным дном и инкубировали в течение ночи при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. В колонку 1 клетки не добавляли, так как она служила в качестве пустого контроля.

20 Готовили 10 мМ маточный раствор соединения 1 в ДМСО. Маточный раствор дополнительно разводили в ДМСО перед добавлением в двух повторах в лунки 96-луночных планшетов, содержащих клетки, до получения конечной концентрации ДМСО 0,1%. Затем планшеты инкубировали при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂ в течение 3 дней. Каждую линию клеток исследовали в трех повторах.

В каждую лунку аналитического планшета добавляли по 100 мкл реагента CellTiter-Glo. Планшеты перемешивали на орбитальном шейкере в течение 10 минут, после чего подвергали 10-минутной инкубации при комнатной температуре. Затем планшет считывали (в отношении люминесценции) на планшет-ридере EnSpire.

30 Каждую лунку рассчитывали, за исключением контрольной среды (без клеток), в виде процента от среднего контроля ДМСО минус только контрольная среда. Сигмоидальные кривые доза – ответ (переменный наклон) и значения IC₅₀

рассчитывали, используя GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA).

Дифференциальная экспрессия генов

Профилирование экспрессии генов в линиях клеток человеческого ОМЛ проводили с помощью секвенирования спаренных концов (2x150bp) цепочно-специфической РНК, используя платформу Illumina HiSeq и 3 биологических повтора для каждого образца. Секвенирование было выполнено GATC Biotech (теперь *Eurofins Genomics*), а биоинформатический анализ данных секвенирования РНК был проведен собственными силами. В среднем на один образец получали приблизительно по 89 миллионов прочтений. Необработанные прочтения выравнивали с геномом человека hg19/GRC37, используя Bowtie v2.2.9 [Langmead et al 2019 Genome Biology]. В среднем 94% прочтений были однозначно выровнены относительно генома. Выровненные файлы BAM использовали для количественной оценки транскриптов и генов, используя инструмент htseq-count из пакета программного обеспечения HTSeq (версия 0.11.1) на основе аннотаций GENCODE v19. Функцию преобразования стабилизации дисперсии из пакета DESeq2 R (v1.14.1, Love et al Genome Biology 550, 2014) использовали для нормализации необработанных данных подсчета и проводили неконтролируемую иерархическую кластеризацию. Биологические повторы отличались высоким уровнем корреляции ($R^2 = 0,99$).

Дифференциальную экспрессию генов проводили, используя пакет DESeq2 R. Гены со скорректированными p-значениями $< 0,05$ считали в значительной степени дифференциально экспрессируемыми между апоптотическими и неапоптотическими образцами. Среди генов с пониженной регуляцией SKP2 был идентифицирован как значительно сниженный в апоптотических клеточных линиях (Фигура 1).

Пример 3: Базальная экспрессия SKP2 ниже в апоптотических клеточных линиях ОМЛ

Поскольку ОМЛ является одним из показаний, при которых часто обнаруживается низкий уровень SKP2, антипролиферативную активность Соединения 1 дополнительно исследовали на панели из 12 клеточных линий ОМЛ. Уровни апоптоза, индуцированного Соединением 1, измеряли как процент клеток с активированной каспазой-3. Зависимое от Соединения 1 увеличение активированной каспазы-3 наблюдали во всех клеточных линиях, кроме

отрицательного контроля (KG-1, мутант TP53). В частности, 5 клеточных линий (MV4-11, EOL-1, Molm-13, OCI-AML-2 и BDCM) продемонстрировали сильную индукцию апоптоза с более чем 30% клеток, окрашивающихся положительно в отношении активированной каспазы-3 после 48 часовой обработки 100 нМ

5 Соединения 1. С целью последующего анализа эти 5 клеточных линий были сгруппированы как «апоптотические» по сравнению с другими 4 «неапоптотическими» клеточными линиями (HNT-34, OCI-AML3, ML-2, GDM-1), которые показали <30% апоптоза после идентичной обработки Соединением 1 (Фигура 2А). Степень апоптоза, индуцированного Соединением 1, не

10 прогнозируется по значениям IC50, полученным из анализов пролиферации с аламаровым синим, что подчеркивает влияние группировки клеточных линий, конкретно основанных на их апоптотическом потенциале, для последующих анализов, описанных в следующем разделе.

Иммуноблоттинг для SKP2 показал, что все 5 апоптотических клеточных

15 линий (MV4-11, EOL-1, Molm-13, OCI-AML-2 и BDCM) демонстрируют низкие уровни экспрессии белка SKP2 по сравнению с высокими уровнями экспрессии SKP2 в 4 неапоптотических клеточных линиях (HNT-34, OCI-AML3, ML-2, GDM-1) (Фигура 2В). TP53 мутантная клеточная линия KG-1 включена в качестве отрицательного контроля. Интересно, что все 5 апоптотических

20 клеточных линий (MV4-11, EOL-1, Molm-13, OCI-AML-2 и BDCM) демонстрируют высокие уровни экспрессии белка p27 по сравнению с низкими уровнями экспрессии p27 в 4 неапоптотических клеточных линиях (HNT-34, OCI-AML3, ML-2, GDM-1) (Фигура 2В). Таким образом, SKP2 является потенциальным биомаркером чувствительности к антагонистам MDM2 для

25 лечения рака. Кроме того, наблюдалась обратная корреляция между экспрессией SKP2 и экспрессией p27 (Фигура 2В).

Способы:

Цитометрия с использованием активированной каспазы-3

Клеточные линии ОМЛ помещали в 6-луночные планшеты для обработки

30 Соединением 1. Клеточные линии высевали в 6-луночные планшеты при $0,5 \times 10^6$ клеток/мл (2 мл/лунку) за день до обработки и оставляли для восстановления в течение ночи во влажном инкубаторе 5% CO₂/воздух при 37 °С. После инкубации клеток с 0,1 мкМ Соединения 1 в течение 48 часов во влажном инкубаторе 5% CO₂/воздух при 37 °С клетки центрифугировали и

ресуспендировали в 500 мкл ФСБ. 200 мкл каждого образца добавляли в дублируемые лунки 96-луночного планшета. В одну из двух лунок добавляли 50 мкл бессывороточной среды в качестве неокрашенного контроля. Субстрат каспазы-3 (CellPlayer™ Kinetic Caspase-3/7 Apoptosis Assay (Essen Bioscience Ltd., Welwyn Garden City, Hertfordshire, UK), № 4440 по каталогу)) добавляли в 5 другую лунку, чтобы получить конечную концентрацию 2 мкМ, добавив 50 мкл 5 X CellPlayer каспазы-3/7 (10 мкМ в бессывороточной среде RPMI), чтобы начать окрашивание клеток. Планшет инкубировали в темноте в течение 30 минут перед измерением флуоресцентно окрашенных клеток в цитометре Guava 10 EasyCyte HT (Merck Millipore, Kenilworth, NJ, USA). Окрашивание активированной каспазой-3 регистрировали в канале GRN-B (зеленый), при этом неокрашенные лунки и контрольные лунки с ДМСО использовались для установки популяций окрашенных и неокрашенных клеток, имеющих сигнал выше порогового значения, что позволяло рассчитать процент апоптотических 15 клеток.

Вестерн-блоттинг

Клеточные лизаты готовили, беря клеточный осадок и добавляя ледяной 1 x полный Трис-буфер для лизиса (1% Тритон X-100, 150 мМ NaCl, 20 мМ Трис.HCl, pH 7,5, плюс ингибиторы протеазы (полный мини, 1 таблетка/10 мл, 20 Roche, Welwyn Garden City, Herts, UK), 50 мМ NaF и 1 мМ Na₃VO₄). Образцы встряхивали на вортексе и оставляли на льду на 30 мин. Лизаты очищали центрифугированием в течение 15 минут при 14 000 об/мин в охлаждаемой микроцентрифуге, а образец супернатанта удаляли для определения белка (анализ BCA – Pierce, Paisley, UK).

25 Затем клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блоттинга. Эквивалентные количества белкового лизата смешивали с ДСН-буфером для образцов (Novex, Paisley, UK) и ДТТ перед кипячением в течение 10 минут. Образцы разделяли с помощью ДСН-ПААГ (4–12%гель Nu-PAGE – Novex, Paisley, Scotland), наносили на нитроцеллюлозные фильтры, блокировали 30 блокирующим буфером Odyssey (LI-COR Bioscience, Lincoln, USA) и инкубировали в течение ночи при 4 °С со специфическими первичными антителами, разведенными в блокирующем буфере Odyssey. После промывки блоты инкубировали в течение 1 часа с мечеными инфракрасным красителем вторичными антителами к кроличьему белку IR800 или к козьему белку IR800 в

разведении 1:10000 в блокирующем буфере Odyssey (LiCor Biosciences, Lincoln, USA). Затем блоты сканировали для выявления инфракрасной флуоресценции на системе инфракрасной визуализации Odyssey (LiCOR Biosciences, Lincoln, USA).

Антитело	Поставщик	Кат. No.	Вид/тип антитела
SKP2	Cell Signaling Technology	#4358	Кроличье моноклональное
p27	Cell Signaling Technology	#3686S	Кроличье моноклональное
β-актин	Cell Signaling Technology	#3700	Мышиное моноклональное

Пример 4: Антипролиферативные эффекты Соединения 1

5 модулируются нокдаун и сверхэкспрессией SKP2.

Иммуноблоттинг для SKP2 демонстрирует, что все 5 апоптотических клеточных линий (MV4-11, EOL-1, Molm-13, OCI-AML-2 и BDCM) экспрессируют низкие уровни белка SKP2. Чтобы проверить, может ли избыточная экспрессия SKP2 привести к повышенной устойчивости к обработке Соединением 1, была сконструирована высокоапоптотическая клеточная линия MV4-11 для сверхэкспрессии SKP2. Анализы пролиферации с аламаровым синим показывают, что сверхэкспрессия SKP2 (СЭ SKP2) делает клетки MV4-11 устойчивыми к обработке Соединением 1 по сравнению с контролем (Фигура 3А). Интересно, что эффект является специфичным для Соединения 1, поскольку после обработки с помощью АВТ-199 не наблюдалось никакой разницы (Фигура 3В). Влияние сверхэкспрессии SKP2 на устойчивость к обработке Соединением 1 также было подтверждено цитометрией. Сильное снижение апоптоза наблюдалось в клетках со сверхэкспрессией SKP2 (СЭ SKP2) после 48-часовой обработки двумя различными концентрациями Соединения 1 (Фигура 3С). И наоборот, нокдаун SKP2 в неапоптотической клеточной линии ОМЛ (высокая базовая экспрессия SKP2) увеличивал апоптоз примерно на 30% по сравнению с контролем (без нокдауна SKP2) после обработки с помощью 0,1 мкМ Соединения 1 (Фигура 4А). Анализ пути p53 с помощью вестерн-блоттинга после 8-часовой обработки Соединением 1 показал снижение активации ключевых нижестоящих мишеней p53 (MDM2 и p21) в клетках со сверхэкспрессией SKP2 (СЭ SKP2) (Фигура 4В). Эти исследования *in vitro* демонстрируют, что низкая экспрессия SKP2 является важным биомаркером чувствительности рака, в частности ОМЛ, к антагонистам MDM2.

Показано, что SKP2 индуцирует устойчивость к антагонисту MDM2, но не модулирует активность других ключевых регуляторов апоптоза (Фигура 3). Это

исследование механизма действия показало, что SKP2 является специфическим биомаркером для MDM2.

Способы:

Генерация клеточных линий

5 **кшРНК лентивирусная трансдукция:**

кшРНК лентивирусные трансдукционные частицы MISSION[®] (Sigma Aldrich, Pool, UK) использовали для нокдауна SKP2 в клеточной линии ОМЛ - OCI-AML3. Стабильный нокдаун гена был установлен по клеточной устойчивости к пуромицину (1 мкг/мл) и подтвержден на белковом уровне вестерн-блоттингом. В качестве отрицательного контроля использовали нецелевой кшРНК контрольный вектор (Sigma Aldrich, Pool, UK), содержащий вставную последовательность, которая не нацелена ни на один человеческий ген.

Прецизионная трансдукция LentiORF:

15 Частицы прецизионной лентивирусной трансдукции LentiORF (кат. OHS5900-224629438, Dharmacon, UK) использовали для сверхэкспрессии SKP2 в клеточной линии ОМЛ MV4-11. Стабильная сверхэкспрессия гена была установлена по устойчивости клеток к бластицидину (5 мкг/мл) и подтверждена на белковом уровне вестерн-блоттингом. В качестве отрицательного контроля использовали контрольный пустой вектор прецизионной LentiORF (Dharmacon, 20 UK).

Анализ с аламаровым синим

Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью анализа с аламаровым синим (Bio-Rad, Irvine, CA, USA). Все клеточные линии выращивали и анализировали в среде RPMI-1640 + 10% ФБС. В черный 96-луночный плоскодонный (прозрачный) планшет, обработанный тканевой культурой, засеивали 200 мкл клеток при 5×10^4 клеток/мл и инкубировали в течение ночи при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂ в воздухе.

30 Соединения разбавляли сначала в ДМСО, а затем в бессывороточной среде перед добавлением в лунки с культивируемыми клетками в трех повторах, чтобы получить конечную концентрацию ДМСО 0,1%. Затем планшеты инкубировали при 37°С во влажной атмосфере с 5% CO₂ в воздухе в течение 24 часов. В каждую лунку добавляли 20 мкл аламарового синего Alamar Blue™ (AbD Serotec/Bio-Rad), после чего планшеты инкубировали в течение 4–6 часов при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ и воздуха. Затем планшеты считывали при 535 нм

(возбуждение) и 590 нм (испускание) на ридере SpectraMax Gemini (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Каждую лунку рассчитывали, минусуя только контрольную среду (без клеток), в процентах от среднего контроля ДМСО, минусуя только контрольную среду. Сигмоидальные кривые доза - ответ (переменный наклон) и значения IC50 рассчитывали с использованием программного обеспечения Prism GraphPad (версия 7, La Jolla, CA, USA).

Анализ апоптоза с помощью цитометрии

Клеточные линии ОМЛ помещали в 6-луночные планшеты для обработки Соединением 1. Клеточные линии высевали в 6-луночные планшеты при $0,5 \times 10^6$ клеток/мл (2 мл/лунку) за день до обработки и оставляли для восстановления в течение ночи во влажном инкубаторе 5% CO₂/воздух при 37 °С. После инкубации клеток с Соединением 1 клетки центрифугировали и окрашивали в соответствии с протоколом производителя (Аннексин V, конъюгат Alexa Fluor™ 647, каталожный номер: A23204, Thermo Scientific, UK). Вкратце, клетки ресуспендировали в буфере, связывающем аннексин V, и окрашивали конъюгатом аннексина V. Образцы инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте. После промывки буфером для связывания аннексина V клетки анализировали с помощью проточного цитометра.

Для окрашивания каспазой 3/7 использовали реагент Каспазы 3/7, обеспечивающий зеленую флуоресценцию, CellEvent™ (Life Technologies), флуорогенный субстрат для активированных каспаз-3 и -7 в соответствии с протоколом производителя. Клетки инкубировали с 5 мкМ субстрата в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем анализировали с помощью проточного цитометра.

Вестерн-блоттинг

Клеточные лизаты готовили, беря клеточный осадок и добавляя ледяной 1 x полный Трис-буфер для лизиса (1% Тритон X-100, 150 мМ NaCl, 20 мМ Трис.HCl, pH 7,5, плюс ингибиторы протеазы (полный мини, 1 таблетка/10 мл, Roche, Welwyn Garden City, Herts, UK), 50 мМ NaF и 1 мМ Na₃VO₄). Образцы встряхивали на вортексе и оставляли на льду на 30 мин. Лизаты очищали центрифугированием в течение 15 минут при 14 000 об/мин в охлаждаемой микроцентрифуге, а образец супернатанта удаляли для определения белка (анализ BCA – Pierce, Paisley, UK). Затем клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блоттинга. Эквивалентные количества белкового лизата

смешивали с ДСН-буфером для образцов (Novex, Paisley, UK) и ДТТ перед кипячением в течение 10 минут. Образцы разделяли с помощью ДСН-ПААГ (4–12%гель Nu-PAGE – Novex, Paisley, Scotland), наносили на нитроцеллюлозные фильтры, блокировали блокирующим буфером Odyssey (LI-COR Bioscience, Lincoln, USA) и инкубировали в течение ночи при 4 °С со специфическими первичными антителами, разведенными в блокирующем буфере Odyssey. После промывки блоты инкубировали в течение 1 часа с мечеными инфракрасным красителем вторичными антителами к кроличьему белку IR800 или к козьему белку IR800 в разведении 1:10000 в блокирующем буфере Odyssey (LiCor Biosciences, Lincoln, USA). Затем блоты сканировали для выявления инфракрасной флуоресценции на системе инфракрасной визуализации Odyssey (LiCOR Biosciences, Lincoln, USA).

Антитело	Поставщик	Кат. No.	Вид/тип антитела
SKP2	Cell Signaling Technology	#4358	Кроличье моноклональное
MDM2	R&D Systems	AF1244	Кроличье моноклональное
p53	R&D Systems	AF1355	Козье поликлональное
p21	Cell Signaling Technology	#2947	Кроличье моноклональное
β-Актин	Cell Signaling Technology	#3700	Мышиное моноклональное

Пример 5: Экспрессия SKP2 модулирует чувствительность к

Соединению 1 *in vivo*

Помимо оценки эффекта сверхэкспрессии и нокдауна SKP2 *in vitro*, влияние SKP2 на пролиферацию рака оценивали *in vivo* с использованием модели диссеминированного ОМЛ на основе клеточной линии MV4-11. Для создания системной модели ОМЛ *in vivo* мышам NSG вводили в хвостовую вену клетки MV4-11, сконструированные для сверхэкспрессии SKP2 или пустого вектора. Системную опухолевую нагрузку оценивали с помощью ПЦР на циркулирующую ДНК человека. Через 2 недели мышей рандомизировали и начинали лечение Соединением 1. В отсутствие сверхэкспрессии SKP2 после обработки Соединением 1 присутствовали только низкие уровни циркулирующей ДНК человека, что подтверждает сильное противоопухолевое действие Соединения 1 на модели MV4-11 (Фигура 5). Интересно, что при сверхэкспрессии SKP2 лечение Соединением 1 не влияло на системную опухолевую нагрузку (Фигура 5). В целом эти данные показывают, что сверхэкспрессия SKP2 вызывает устойчивость к Соединению 1 *in vivo*.

Чтобы подтвердить влияние лечения Соединением 1 на приживание лейкемического костного мозга через 14 дней после лечения процент опухолевых клеток MV4-11 в костном мозге (КМ) анализировали с использованием FACS. В отсутствие сверхэкспрессии SKP2 Соединение 1 вызывало значительное снижение количества лейкемических опухолевых клеток (Фигуры 6А-С). Однако при сверхэкспрессии SKP2 Соединение 1 не оказывало влияния на опухоль костного мозга (Фигуры 6А и D, E). Таким образом, сверхэкспрессия SKP2 способна превратить чувствительную клеточную линию ОМЛ в резистентную клеточную линию *in vivo*, что свидетельствует о том, что низкий уровень SKP2 является важным биомаркером чувствительности к антагонизму MDM2.

Способы:

Системная мышинная модель ОМЛ *in vivo*

Самок мышей NSG (возраст 6-8 недель) покупали в Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Животным внутривенно вводили 5×10^6 клеток MV4-11, и приживание опухоли оценивали с помощью ПЦР на циркулирующую ДНК человека. Мышей рандомизировали в группы лечения на основе системной опухолевой нагрузки, обнаруженной с помощью ПЦР. Затем еженедельно контролировали лейкемическую нагрузку путем серийных кровопусканий с последующей ПЦР. Мышей наблюдали ежедневно и гуманно умерщвляли при появлении признаков неизлечимой болезни (паралич задних конечностей, неспособность есть/пить, агония).

Проточная цитометрия костного мозга

На 14-й день лечения Соединением 1 у мышей с опухолями собирали костный мозг. Клетки костного мозга окрашивали PE-CF594 анти-человеческим CD45 (BD 562312), BV515 анти-мышинным CD45 (BD 564590) и DAPI. Количество клеток человека, вживленных в костный мозг, выражают в % жизнеспособных клеток CD45+ мыши.

ПЦР для циркулирующей ДНК человека

Образцы крови собирали в гепаринизированные капиллярные пробирки и образцы хранили при -80°C до проведения анализа. ДНК экстрагировали с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, номер по каталогу: 69504), а ПЦР для ДНК человека проводили с помощью TaqMan™ Genotyping

Master Mix (каталожный номер ThermoFisherScientific: 4371355) с использованием следующих праймеров:

Прямой праймер (101 F), 5'-GGTGAAACCCCGTCTCTACT-3';

Отратный праймер (206 R), 5'-GGTTCAAGCGATTCTCCTGC-3'.

5 Гидролизуемый зонд (144RH) представлял собой 5'-CGCCCGGСТААТТТТТГТАТ-3'.

Мышиный TFRC использовали в качестве эталонного анализа для нормализации данных (каталожный номер ThermoFisherScientific: 4458366).

10 **Пример 6: Экспрессия SKP2 коррелирует с чувствительностью к Соединению 1 в бластах острого миелоидного лейкоза, выделенных от пациентов**

Бласты острого миелоидного лейкоза SKP2^{низк.}, выделенные от пациентов, более чувствительны к Соединению 1, чем бласты SKP2^{высок.} (Фигура 7). Низкая экспрессия SKP2 является биомаркером чувствительности ОМЛ к антагонистам MDM2 в образцах, полученных от пациентов.

Способы:

Оценка чувствительности первичных бластов ОМЛ к Соединению 1

Первично замороженные образцы ОМЛ были приобретены в Биобанке НБС (Moscow, Russia). 13 первичных образцов ОМЛ с высоким содержанием бластов (>80%) культивировали в выбранных средах для размножения, состоящих из среды StemSpan SFEM II (Stemcell, #09605), 1x добавки для размножения StemSpan CD34+ (Stemcell, #02691), 2% ФБС и 1% пенициллина/стрептомицина. Для оценки способности Соединения 1 индуцировать апоптоз этих первичных бластов проводили 24-часовой анализ апоптоза с двумя концентрациями Соединения 1 и измеряли гибель клеток с помощью проточной цитометрии с использованием окрашивания аннексином V / PI.

Оценка экспрессии белка SKP2 на первичных бластах ОМЛ

Капиллярный вестерн-анализ проводили с использованием системы ProteinSimple Wes (San Jose, CA, USA). Используемые антитела были специфичны для SKP2 (#4358) и TXN1 (#2429) в качестве контроля загрузки. Образцы разбавляли 0,1 × буфером для образцов. Затем 4 части разбавленного образца объединяли с 1 частью 5 × Fluorescent Master Mix (содержащей 5 × буфер для образцов, 5 × флуоресцентный стандарт и 200 мМ ДТТ) и нагревали при 95 °C в течение 5 минут. После этой стадии денатурации подготовленные

образцы, блокирующий реагент, первичные антитела (разведение 1:10 для SKP2, 1:100 для TXN1), вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), и хемилюминесцентный субстрат распределяли в назначенные лунки планшета для анализа. Бiotинилированная лестница обеспечивала стандарты молекулярной массы для каждого анализа. После загрузки планшета в полностью автоматизированной системе ProteinSimple Wes выполняли этапы разделительного электрофореза и иммунодетекции.

Обширные исследования подтвердили низкую экспрессию SKP2 в качестве биомаркера чувствительности рака, в частности ОМЛ, к лечению антагонистом MDM2. Утвержденные исследования включают: базальные уровни в сравнении с чувствительностью; Генетический нокдаун и сверхэкспрессия; Специфичность для антагонистов MDM2; исследования механизма действия; Соответствующая модель *in vivo*; и образцы пациентов с первичным ОМЛ.

Пример 7 – Характеристика индукции апоптоза комбинацией антагониста MDM2 (Соединение 1) с антагонистом IAP (ASTX660) в линиях клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ)

Панель линий клеток ОМЛ, которые имеют *TP53* дикого типа (ДТ), анализировали в отношении индукции апоптоза с помощью цитометрии расщепленной каспазы-3 после обработки антагонистом MDM2 Соединением 1 в течение 24 часов, 48 часов или 72 часов. Диапазон уровней индуцированного апоптоза наблюдался после обработки 0,1 мкМ Соединения 1, а OCI-AML3 был выбран (поскольку он имел более низкий уровень индукции апоптоза через 72 ч) для анализа потенциального комбинированного эффекта соединения 1 с антагонистом IAP ASTX660 в присутствии добавленного TNF-альфа. Как показано на Фигуре 8 (ниже), обработка только 0,1 мкМ Соединения 1 не вызывала высокого уровня апоптоза в клетках OCI-AML3 даже после 72 ч обработки. Однако при комбинации 0,1 мкМ Соединения 1 с 1 мкМ ASTX660 и 1 нг/мл TNF-альфа наблюдали синергетическое повышение уровня апоптоза в клетках OCI-AML3, измеренное через 72 ч, что свидетельствует о потенциальной пользе от комбинирования антагониста MDM2 с антагонистом IAP для индукции гибели клеток в линиях клеток ОМЛ.

Способ:

Клетки OCI-AML3 высевали в 6-луночные планшеты при $0,25 \times 10^6$ клеток/мл в среде RPMI-1640, содержащую 10% ФБС, и оставляли во влажном

инкубаторе с 5% CO₂/воздух при 37 °С на ночь. На следующий день клетки обрабатывали 0,1 мкМ Соединения 1 или 1 мкМ ASTX660 + 1 нг/мл TNF-α или комбинацией вариантов обработки и инкубировали при 37 °С в течение 72 ч (для сравнения был взят контроль 0,1% об./об. ДМСО). Через 72 ч клетки собирали

5 путем центрифугирования и ресуспендировали в 0,5 мл ФСБ + 1% ФБС. Анализ уровней расщепленной каспазы-3 проводили путем добавления 2 мкМ реагента для обнаружения каспазы-3/7 зеленого CellEvent (Thermo Fisher, Paisley, UK) в течение 30 минут при 37 °С перед измерением флуоресцентно окрашенных

10 клеток в цитометре Guava easyCyte HT (Merck Millipore, Kenilworth, NJ, USA). Окрашивание расщепленной каспазы-3 регистрировали в канале FL1 (зеленый), при этом неокрашенные лунки и контрольные лунки с ДМСО использовали для гейтинга популяций окрашенных и неокрашенных клеток, что позволяло

рассчитать процент апоптотических клеток.

Обсуждение: Комбинация Соединения 1 и ASTX660

15 Описанные эксперименты демонстрируют, что опухоли р53 дт с низкой экспрессией SKP2 чувствительны к Соединению 1, а другие с высокой экспрессией SKP2 менее чувствительны. Например, линия OCI-AML3 имеет высокие уровни SKP2 (Фигура 2А), а Соединение 1 не индуцирует значительных уровней гибели клеток в результате апоптоза (Фигура 2В и Фигура 8).

20 Комбинации более чем одного агента, способного индуцировать апоптоз, могут повысить чувствительность опухоли, резистентной к одному агенту. Добавление антагониста IAP ASTX660 повышает чувствительность линии OCI-AML3 к индукции апоптоза Соединением 1 (Фигура 8); несмотря на то, что согласно описанной здесь работе OCI-AML3 характеризуется как линия,

25 нечувствительная к Соединению 1.

ПРИМЕРЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВОВ

(i) Состав для таблеток

Композицию таблетки, содержащую соединение Формулы (I^o), получают путем смешивания подходящего количества соединения (например, 50–250 мг) с

30 подходящими разбавителем, разрыхлителем, агентом для прессования и/или глидантом. Одна предполагаемая таблетка содержит 50 мг соединения с 197 мг лактозы (ВР) в качестве разбавителя и 3 мг стеарата магния в качестве смазывающего вещества, которые спрессовывают с образованием таблетки

известным способом. Прессованную таблетку, необязательно, можно покрывать пленкой.

(ii) Состав для капсул

5 Состав для капсул получают путем смешивания 100–250 мг соединения Формулы (I^o) с эквивалентным количеством лактозы и наполнением полученной смесью стандартных твердых желатиновых капсул. Подходящий разрыхлитель и/или глидант можно при необходимости включать в соответствующих количествах.

(iii) Инъекционный состав I

10 Парентеральную композицию для введения путем инъекции можно получить путем растворения соединения Формулы (I^o) (например, в форме соли) в воде, содержащей 10% пропиленгликоля, с получением концентрации активного соединения 1,5% масс. Затем раствор делают изотоническим, стерилизуют путем фильтрации или окончательной стерилизации, наполняют им
15 ампулу, флакон или предварительно наполняемый шприц и герметизируют.

(iv) Инъекционный состав II

Парентеральную композицию для инъекций получают путем растворения в воде соединения Формулы (I^o) (например, в форме соли) (2 мг/мл) и маннита (50 мг/мл), стерильной фильтрации раствора или окончательной стерилизации, и
20 наполнения 1 мл герметичных флаконов, ампул или предварительно наполняемого шприца.

(v) Инъекционный состав III

Композицию для внутривенной доставки путем инъекции или инфузии можно получить путем растворения соединения Формулы (I^o) (например, в
25 форме соли) в воде в концентрации 20 мг/мл, а затем регуляции изотоничности. Флакон затем запечатывают и стерилизуют в автоклаве, или наполняют ампулу, флакон или предварительно заполняемый шприц, стерилизуют фильтрацией и запечатывают.

(vi) Инъекционный состав IV

30 Композицию для внутривенной доставки путем инъекции или инфузии можно получить путем растворения соединения Формулы (I^o) (например, в форме соли) в воде, содержащей буфер (например, 0,2 М ацетат, pH 4,6) при 20 мг/мл. Флакон, ампулу или предварительно заполняемый шприц затем

запечатывают и стерилизуют в автоклаве, или стерилизуют фильтрацией и запечатывают.

(vii) Состав для подкожных или внутримышечных инъекций

5 Композицию для подкожного или внутримышечного введения получают путем смешивания соединения Формулы (I^o) с кукурузным маслом для применения в фармацевтике до концентрации 5–50 мг/мл. Композицию стерилизуют и помещают в подходящий контейнер.

(viii) Лиофилизированный состав I

10 Аликвоты состава, содержащего соединение Формулы (I^o), помещают в 50 мл флаконы и лиофилизируют. Во время лиофилизации композиции замораживают, используя протокол одноэтапного замораживания при (-45 °C). Температуру повышают до -10 °C для отжига, затем снижают до замерзания при -45 °C, затем проводят первичную сушку при +25 °C в течение приблизительно 3400 минут, а затем вторичную сушку с увеличением этапов, если температура 15 достигает 50 °C. Давление при первичной и вторичной сушке устанавливают на уровне 80 миллитор.

(ix) Лиофилизированный состав II

Аликвоты составленного соединения Формулы (I^o) или его соли по определению в данном документе помещают во флаконы на 50 мл и 20 лиофилизируют. Во время лиофилизации композиции замораживают, используя протокол одноэтапного замораживания при (-45 °C). Температуру повышают до -10 °C для отжига, затем снижают до замерзания при -45 °C, затем проводят первичную сушку при +25 °C в течение приблизительно 3400 минут, а затем вторичную сушку с увеличением этапов, если температура достигает 50 °C. 25 Давление при первичной и вторичной сушке устанавливают на уровне 80 миллитор.

(x) Лиофилизированный состав для применения при внутривенном введении III

30 Водный забуференный раствор получают путем растворения соединения Формулы (I^o) в буфере. Забуференным раствором наполняют контейнер (такой как стеклянный флакон типа 1), проводя при этом фильтрацию для удаления твердых частиц, затем контейнер частично герметизируют (например, с помощью пробки Fluorotec). Если соединение и состав достаточно стабильны, то состав стерилизуют в автоклаве при 121 °C в течение подходящего периода

времени. Если состав не устойчив к автоклавированию, его можно стерилизовать, используя подходящий фильтр, и разливать в стерильных условиях по стерильным флаконам. Раствор лиофилизуют, используя подходящий цикл. По завершении цикла сублимационной сушки флаконы снова наполняют азотом до атмосферного давления, закрывают пробками и укупоривают (например, с помощью алюминиевой обжимной крышечки). Для внутривенного введения лиофилизованное твердое вещество можно восстанавливать в фармацевтически приемлемом разбавителе, таком как 0,9% физиологический раствор или 5% декстроза. Раствор можно дозировать в исходном виде или можно дополнительно разбавлять перед введением в инфузионном пакете (содержащем фармацевтически приемлемый разбавитель, такой как 0,9% физиологический раствор или 5% декстроза).

(xii) Порошок в бутылке

Композицию для перорального введения получают путем наполнения бутылки или флакона соединением, используемым в изобретении. Затем композицию восстанавливают подходящим разбавителем, например, водой, фруктовым соком или коммерчески доступным носителем, таким как OraSweet или Syrspend. Восстановленный раствор можно дозировать по мерным чашкам или пероральным шприцам для введения.

Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, приведены лишь в иллюстративных целях, и что в их свете специалистам в данной области техники станут очевидны различные модификации или изменения, которые должны быть включены в сущность и объем настоящей заявки, а также объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, номера доступа последовательностей, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном документе, в полном объеме и во всех целях включены в данный документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется:

5 истощением SKP2.

2. Антагонист MDM2 для применения по п. 1, отличающийся тем, что истощение SKP2 определяют путем:

прямого определения уровней SKP2; или

10 определения повышенного или высокого уровней одного, двух, трех, четырех или больше из p27, p21, p57, E2F-1, MEF, P130, Tob1, циклина D, циклина E, Smad4, Muc, Mcb, RASSF1A, Foxo1, Orc1p, Cdt1, Rag2, Brca2, CDK9, MPK1 и/или UBP43; или

15 определения повышенного или высокого уровней p27 и необязательно одного или больше из p21, p57, E2F-1, MEF, P130, Tob1, циклина D, циклина E, Smad4, Muc, Mcb, RASSF1A, Foxo1, Orc1p, Cdt1, Rag2, Brca2, CDK9, MPK1 и/или UBP43.

3. Антагонист MDM2 для применения по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что образец ткани пациента исследуют для определения профиля экспрессии рака перед лечением.

4. Антагонист MDM2 для применения по п. 3, отличающийся тем, что образец включает ДНК рака, цоДНК или раковые клетки.

25 5. Антагонист MDM2 для применения по п. 3 или п. 4, отличающийся тем, что исследование включает анализ для определения белка, мРНК и/или цоДНК.

30 6. Антагонист MDM2 для применения по п. 5, отличающийся тем, что (i) выявление белка проводят с помощью иммуноанализа, анализа в отношении связывания с белком, анализа на основе антител, анализа на основе антигенсвязывающего белка, матрицы на основе белка, иммуноферментного анализа (ИФА), проточной цитометрии, белковой матрицы, блоттинга, вестерн-

блоттинга, нефелометрии, турбидиметрии, хроматографии, масс-спектрометрии, ферментативной активности, радиоиммуноанализа, иммунофлуоресценции, иммунохемилюминесценции, иммуноэлектрохемилюминесценции, иммуноэлектрофореза, конкурентного иммуноанализа или иммунопреципитации;

5 и/или (ii) выявление мРНК проводят с помощью ОТ-ПЦР или количественного анализа генной экспрессии.

7. Антагонист MDM2 для применения по любому из п.п. 3 – 6, отличающийся тем, что пациента отбирают для лечения на основании

10 определенного профиля экспрессии.

8. Антагонист MDM2 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что рак представляет собой рак крови, лейкоз, лимфому, миелоидный лейкоз или острый миелоидный лейкоз.

15

9. Антагонист MDM2 для применения по п. 8, отличающийся тем, что рак представляет собой острый миелоидный лейкоз с транслокацией t(15;17).

10. Антагонист MDM2 для применения по любому из предшествующих

20 пунктов, отличающийся тем, что рак представляет собой P53 дикого типа.

11. Антагонист MDM2 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что раковые клетки подвергаются апоптозу после этапа лечения.

25

12. Антагонист MDM2 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что происходит индукция активированной каспазы-3 антагонистом MDM2 по меньшей мере в части раковых клеток.

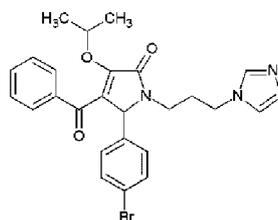
30 13. Антагонист MDM2 для применения по п. 11, отличающийся тем, что индукция активированной каспазы-3 антагонистом MDM2 происходит по меньшей мере в 40% раковых клеток или по меньшей мере в 60% раковых клеток.

14. Антагонист MDM2 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват по определению в данном документе, например

5 (2*S*,3*S*)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1*R*)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1*S*)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту или ее таутомер, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

10 15. Антагонист MDM2 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что антагонист MDM2 выбирают из группы, состоящей из Соединения 1, идасанутлина (RG-7388), HDM-201, KRT-232 (AMG-232), ALRN-6924, MI-773 (SAR405838), миладеметана (DS-3032b), APG-115, BI-907828, LE-004, DS-5272, SJ-0211, BI-0252, AM-7209, SP-141, SCH-15

1450206, NXN-6, ADO-21, CTX-50 - CTX-1, ISA-27, RO-8994, RO-6839921, ATSP-7041, SAH-p53-8, PM-2, K-178, MMRi-64 и



или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

20 16. Применение уровня экспрессии SKP2 в образце раковых клеток пациента-человека в качестве биомаркера или биомаркеров для оценки восприимчивости рака к лечению антагонистом MDM2, например, когда антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват по

25 определению в данном документе, например, (2*S*,3*S*)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1*R*)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1*S*)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

17. Способ прогнозирования или оценки восприимчивости больного раком человека к лечению антагонистом MDM2, включающий оценку уровня экспрессии SKP2 в образце от больного раком пациента;

и определение того, указывает ли исследованный уровень экспрессии на то, что рак следует лечить антагонистом MDM2.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что этап оценки включает сравнение уровня экспрессии с уровнем экспрессии (i), связанным с восприимчивостью или невосприимчивостью к лечению антагонистом MDM2, или (ii) в здоровой нераковой клетке того же типа.

19. Способ по п. 17 или п. 18, отличающийся тем, что пациента классифицируют в группу на основании профиля биомаркера, необязательно при этом группы включают или состоят из:

- (i) демонстрирующих ответ и не демонстрирующих ответ; или
- (ii) демонстрирующих сильный ответ.

20. Способ по любому из пп. 17–19, отличающийся тем, что пациента идентифицируют как особенно подходящего для лечения, когда SKP2 экспрессируется на более низком уровне, чем у пациента, признанного неподходящим для лечения.

21. Способ по любому из пп. 17–20, отличающийся тем, что пациента идентифицируют для лечения антагонистом MDM2 при выявлении сниженной экспрессии SKP2 по сравнению с уровнем экспрессии (i), связанным с нечувствительностью к лечению антагонистом MDM2 или (ii) в здоровой нераковой клетке того же типа.

22. Способ по любому из пп. 17–21, включающий этап определения уровня экспрессии биомаркеров в образце раковых клеток от указанного пациента-человека.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что выявление проводят с использованием анализа выявления *in vitro*.

24. Способ определения восприимчивости больного раком человека к лечению антагонистом MDM2, включающий выявление в образце раковых клеток от пациента экспрессии SKP2;

5 и оценку вероятности ответа рака у пациента на лечение антагонистом MDM2 на основании уровня экспрессии биомаркеров в образце.

25. Способ выявления экспрессии SKP2 у пациента-человека, имеющего рак.

10

26. Способ по п. 25, включающий этапы:

(а) получения образца раковых клеток от пациента-человека; и

(b) выявления экспрессии указанных биомаркеров в отобранных раковых клетках путем приведения образца в контакт с одним или более реагентами для

15 выявления экспрессии биомаркеров.

27. Способ по любому из п.п. 17 - 26, отличающийся тем, что антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват по определению в данном

20 документе, например, (2*S*,3*S*)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1*R*)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1*S*)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

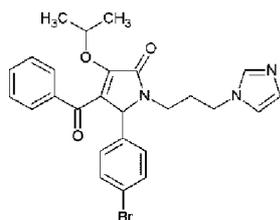
25 28. Способ по любому из п.п. 16 - 26, отличающийся тем, что антагонист MDM2 выбирают из группы, состоящей из Соединения 1, идасанутлина (RG-7388), HDM-201, KRT-232 (AMG-232), ALRN-6924, MI-773 (SAR405838), миладеметана (DS-3032b), APG-115 и BI-907828, или их таутомера или сольвата или фармацевтически приемлемой соли.

30

29. Способ по любому из п.п. 17 - 28, который дополнительно включает этап лечения рака у пациента путем введения антагониста MDM2.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I⁰) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват по определению в данном документе, например, (2*S*,3*S*)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1*R*)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1*S*)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

31. Способ по п. 29, отличающийся тем, что антагонист MDM2 выбирают из группы, состоящей из Соединения 1, идасанутлина (RG-7388), HDM-201, KRT-232 (AMG-232), ALRN-6924, MI-773 (SAR405838), миладеметана (DS-3032b), APG-115, BI-907828, LE-004, DS-5272, SJ-0211, BI-0252, AM-7209, SP-141, SCH-1450206, NXN-6, ADO-21, CTX-50 - CTX-1, ISA-27, RO-8994, RO-6839921, ATSP-7041, SAH-p53-8, PM-2, K-178, MMRi-64 и



15 или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

32. Способ по любому из пп. 29–31, отличающийся тем, что лечение пациента проводят на основании результата способа.

20

33. Набор или устройство для выявления уровня экспрессии по меньшей мере одного биомаркера чувствительности к ингибированию MDM2 в образце от пациента-человека, содержащие реагент или реагенты для выявления SKP2.

25 34. Система для определения пригодности больного раком пациента для лечения антагонистом MDM2, содержащая запоминающее устройство для хранения данных, связанных с образцом от пациента, включающих данные, связанные с панелью биомаркеров, указывающие уровни экспрессии биомаркеров в образце от субъекта, при этом панель биомаркеров содержит SKP2; и

30

процессор, соединенный с возможностью связи с запоминающим устройством для классификации пациента.

35. Антагонист MDM2 для применения, применение, способ, набор или система по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что рак демонстрирует утрату SKP2.

36. Антагонист MDM2 для применения, применение или способ по любому из пп. 1–32, отличающиеся тем, что антагонист MDM2 является частью комбинированной терапии со вторым терапевтическим средством.

37. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, имеющего нормальную или высокую экспрессию SKP2, в комбинации с агентом для индукции чувствительности к антагонисту MDM2, например, агентом для снижения уровня SKP2.

38. Способ лечения рака у пациента, отличающийся тем, что указанный способ включает этапы отбора пациента:

(а) имеющего нормальные или высокие уровни SKP2 в биологическом образце, полученном от указанного пациента; и

(b) введение указанному пациенту, отобранному на этапе (а), терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и агента для индукции чувствительности к антагонисту MDM2, например, агента для снижения уровней SKP2.

39. Антагонист MDM2 для применения, применение или способ по любому из п.п. 36 - 38, отличающийся тем, что второй терапевтический агент или агент для индукции чувствительности к антагонисту MDM2 представляет собой ASTX660.

40. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор MDM2, отличающаяся тем, что ингибитор MDM2 представляет собой соединение формулы (I^o) или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, например, (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-

[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту или ее таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, для применения в лечении рака у пациента, при этом рак характеризуется истощением SKP2.

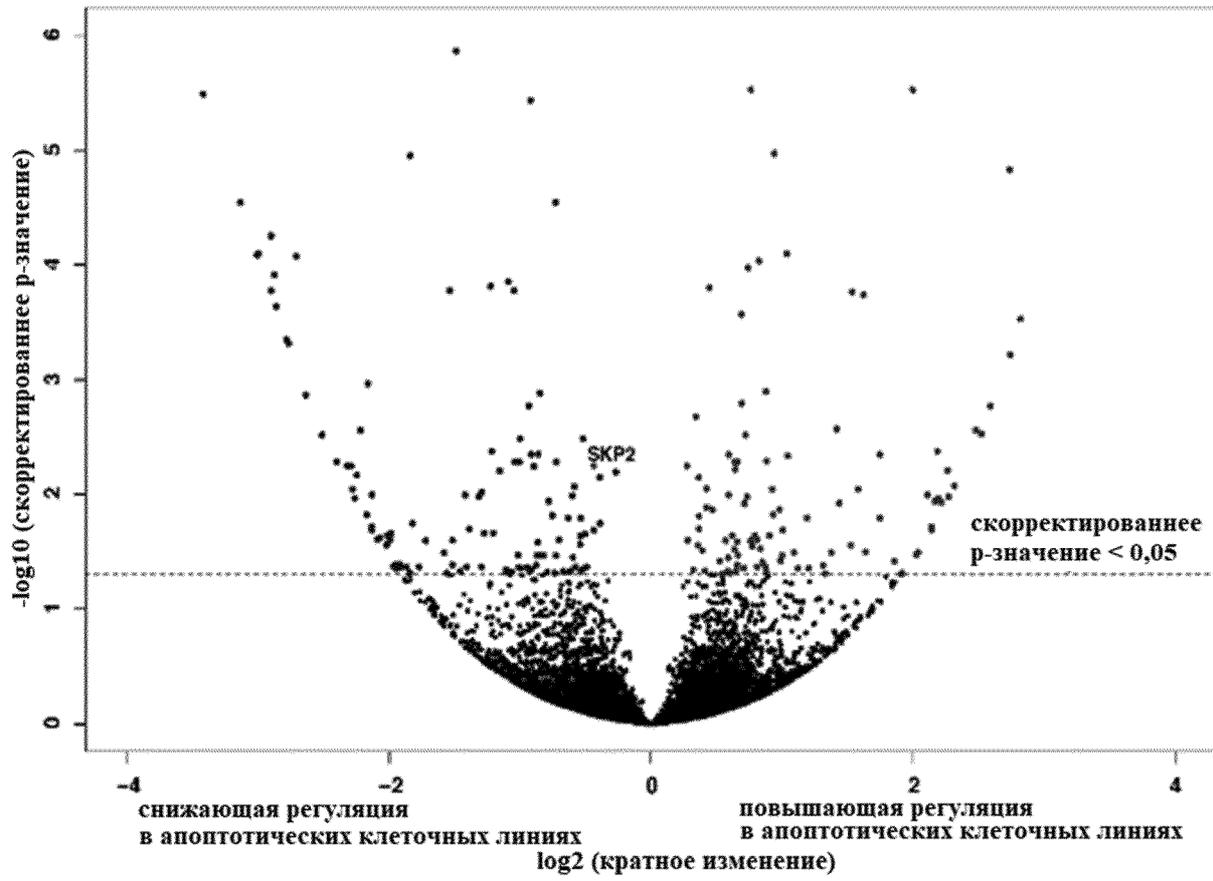
5

41. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения пациента с раком, отличающийся тем, что способ включает:

(i) определение того, что образец от пациента характеризуется истощением SKP2; и

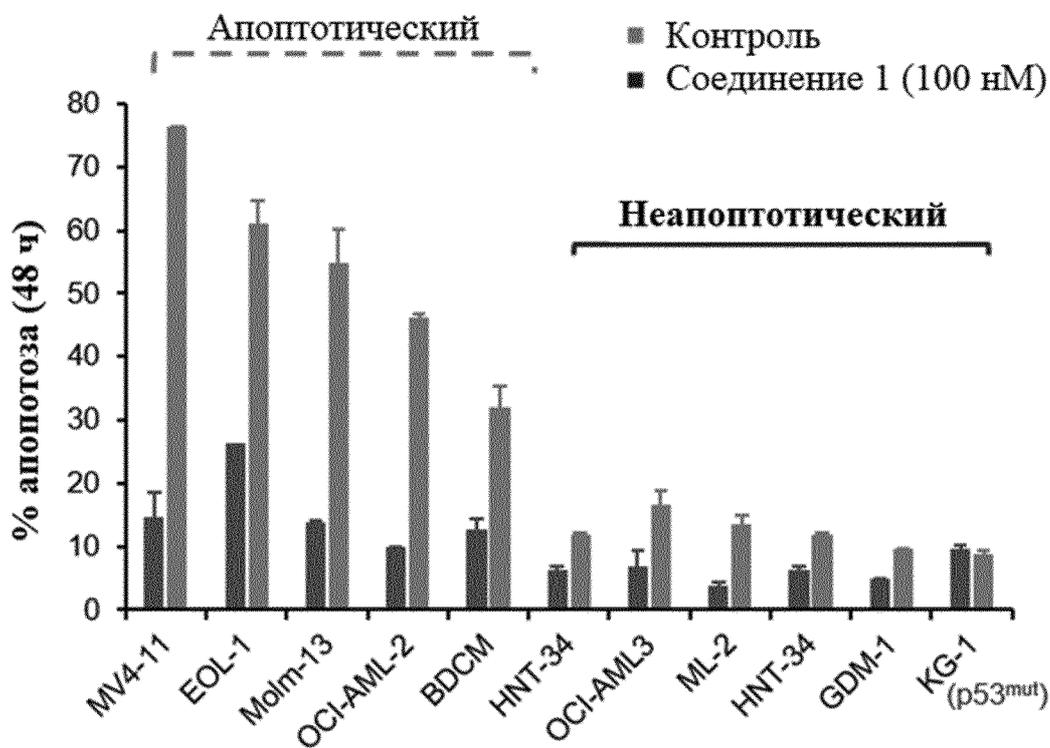
10

(ii) введение пациенту эффективного количества антагониста MDM2.

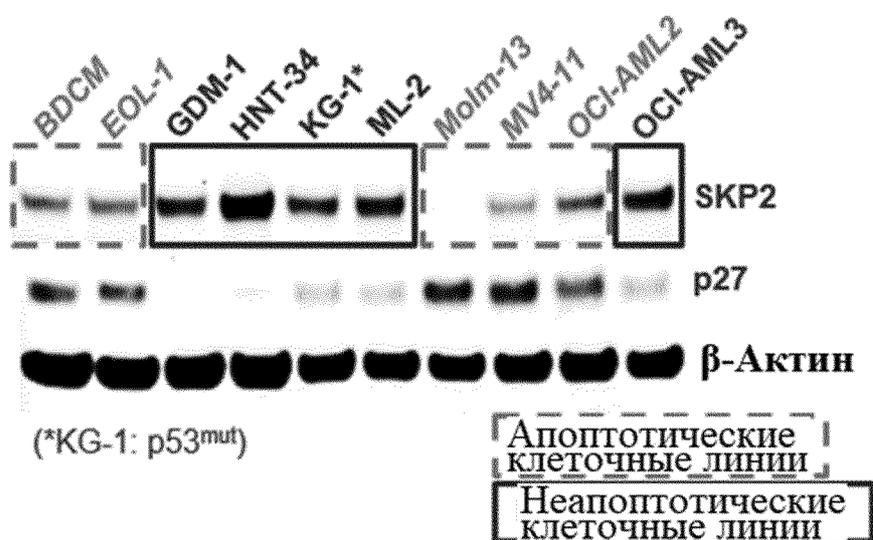


Фигура 1

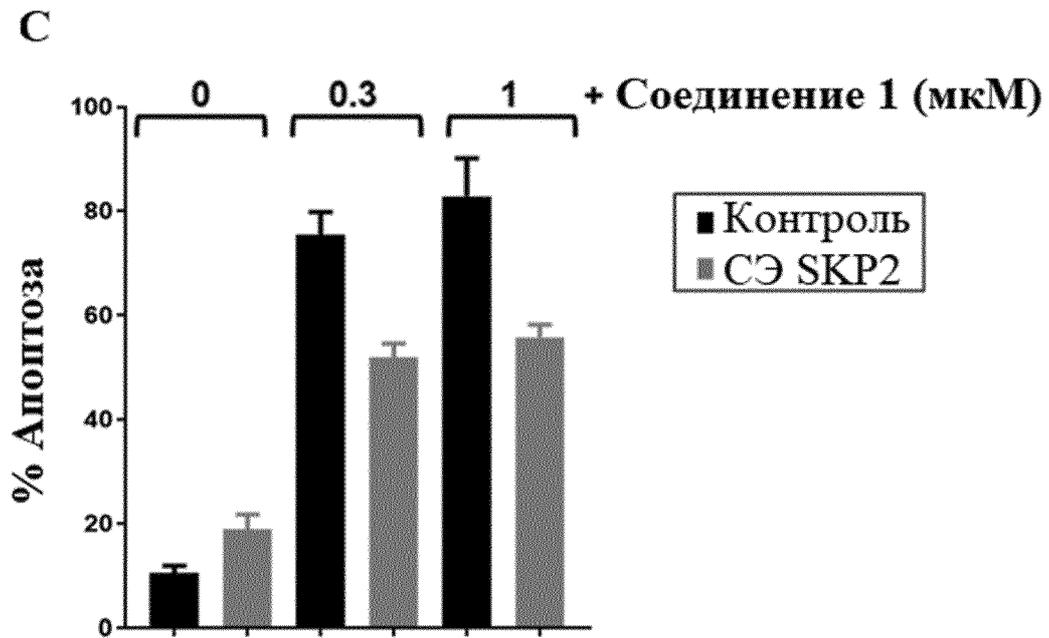
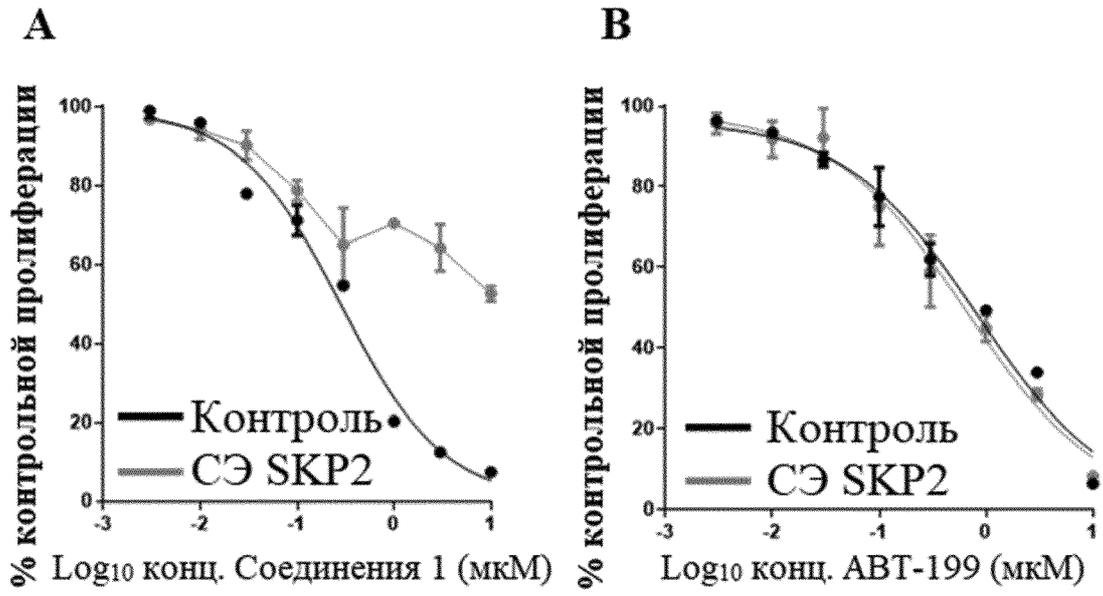
A.
Вызванный соединением 1 апоптоз в клеточных линиях ОМЛ



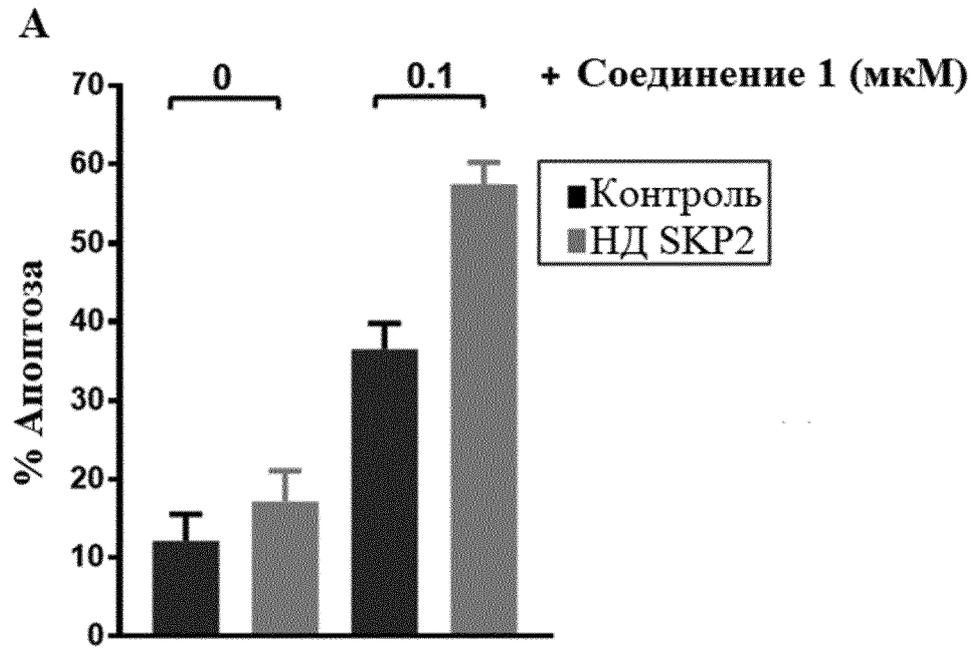
B.
Базальные уровни SKP2 в апоптотических ОМЛ относительно неапоптотических



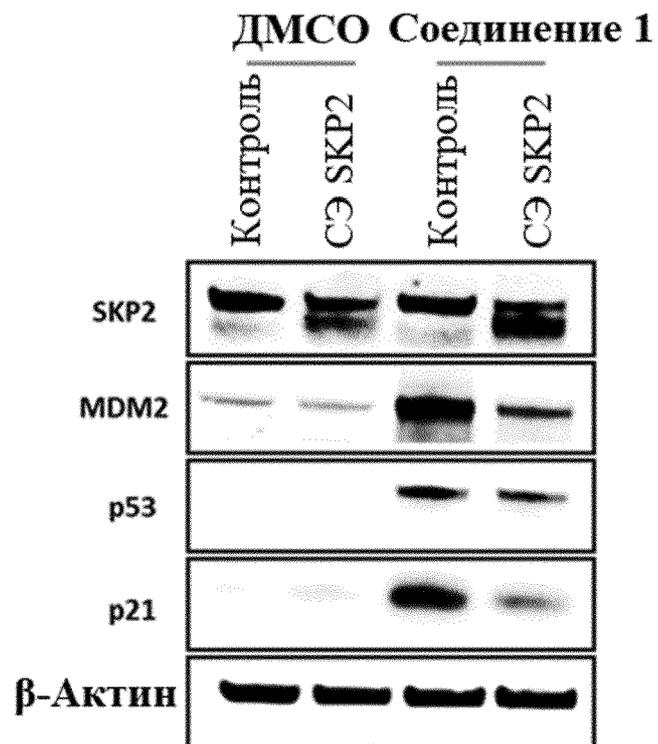
Фигура 2



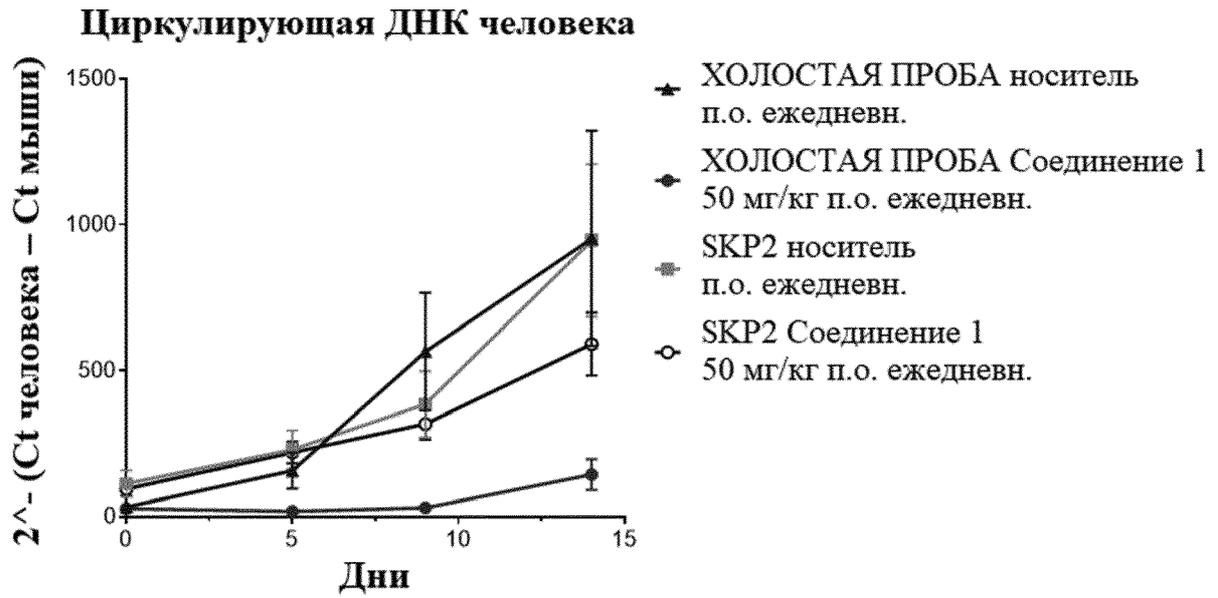
Фигура 3



В

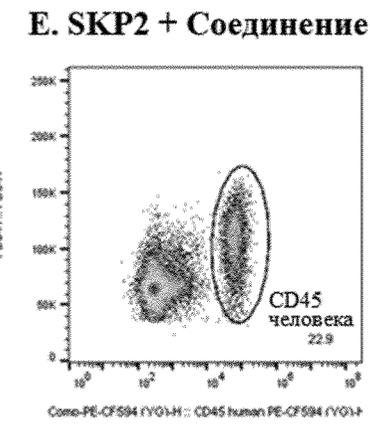
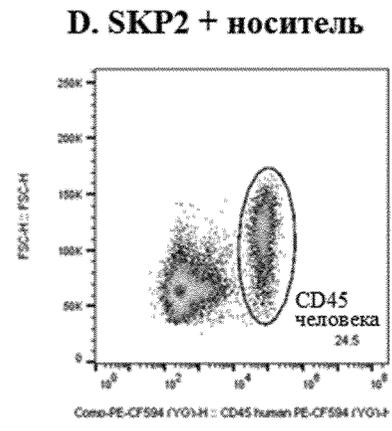
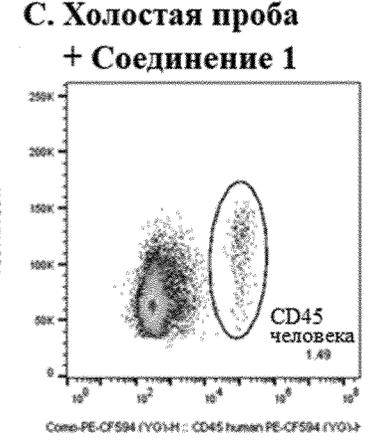
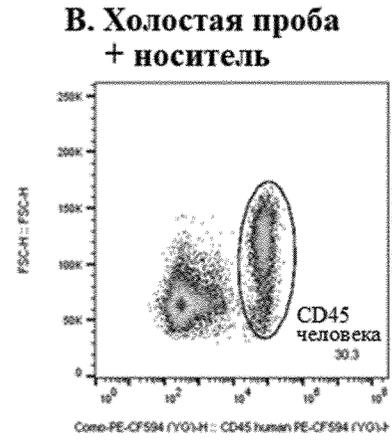
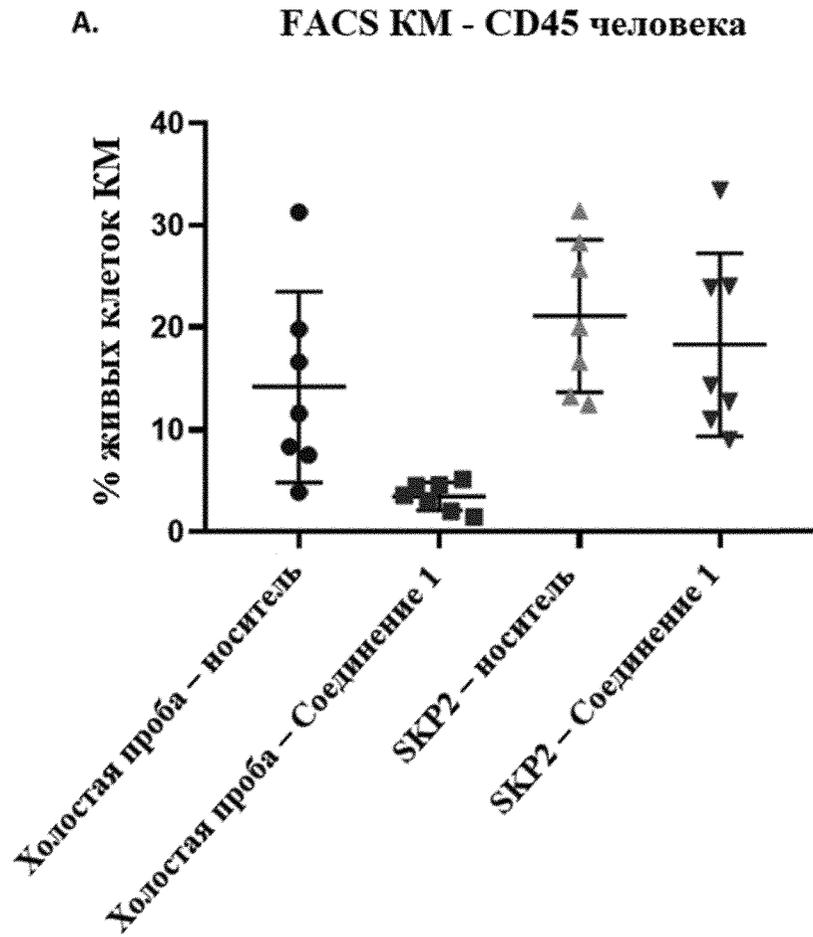


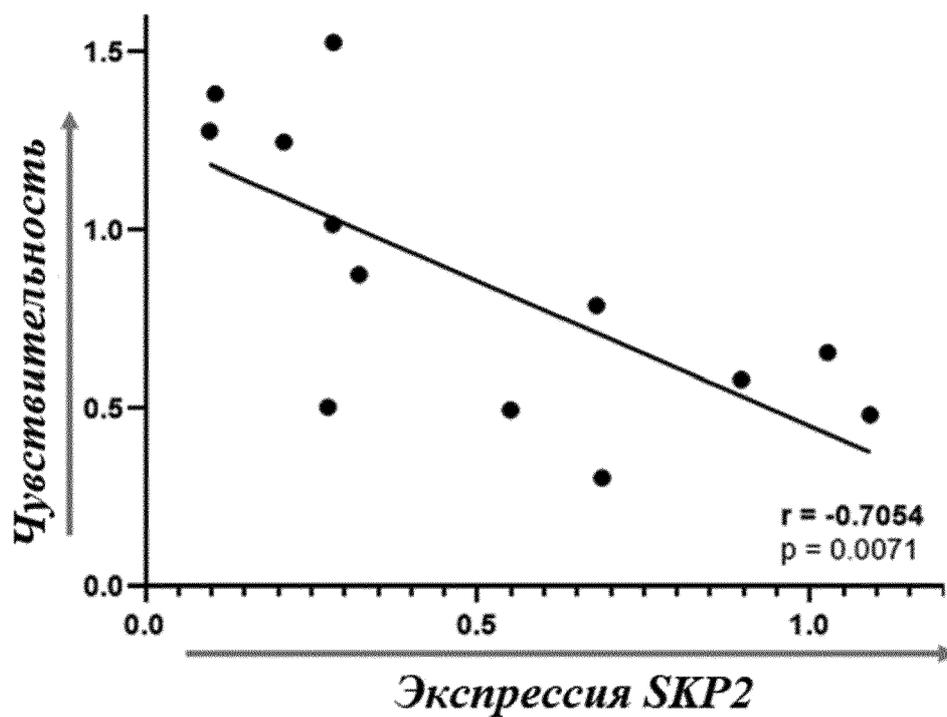
Фигура 4



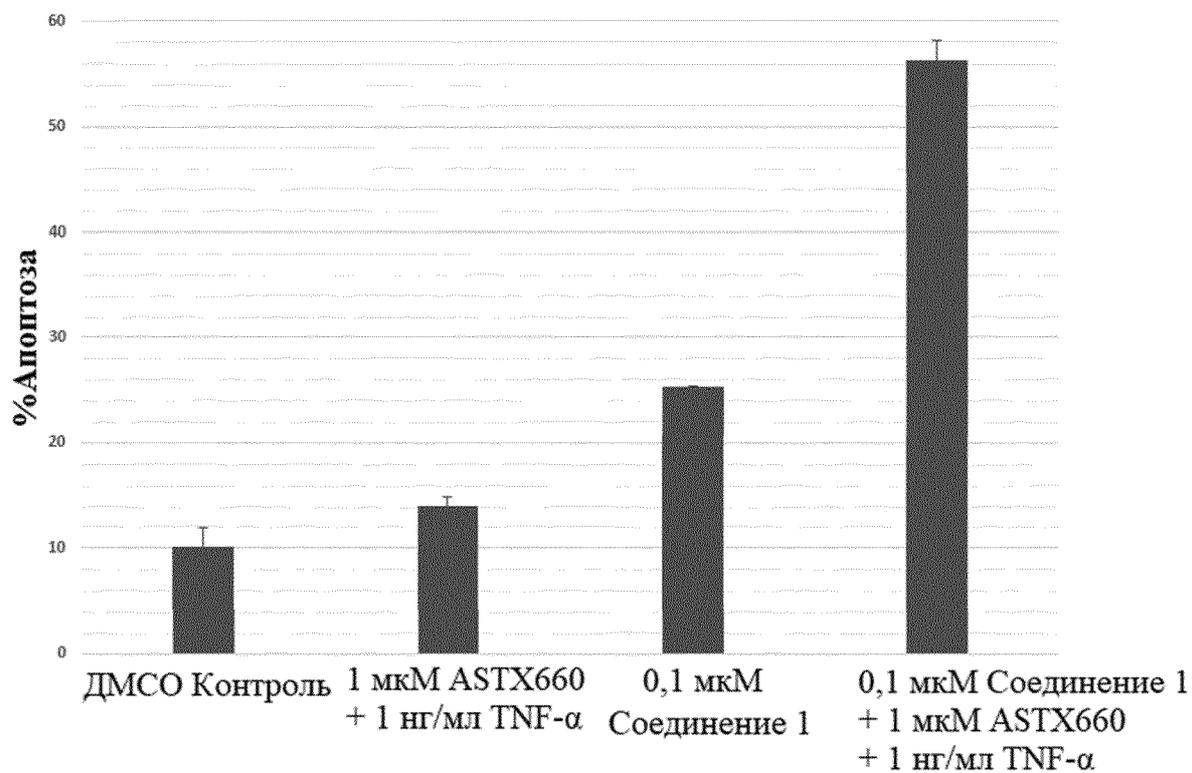
Фигура 5

Фигура 6





Фигура 7



Фигура 8