

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392451** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.25

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

(22) Дата подачи заявки  
2022.03.04

---

(54) **БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ  
АНТАГОНИСТОВ MDM2**

---

(31) 2103080.4

(32) 2021.03.04

(33) GB

(86) PCT/IB2022/051906

(87) WO 2022/185260 2022.09.09

(71) Заявитель:

**ОЦУКА ФАРМАСЬЮТИКЛ КО.,  
ЛТД. (JP)**

(72) Изобретатель:

**Феррари Никола, Саини Харприт  
Каур, Ан Чонсук, Бротвуд Джессика  
Лора (GB)**

(74) Представитель:

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

---

(57) В изобретении предложены гены пути ответа на повреждение ДНК (DDR) и их продукты генов в качестве биомаркеров для прогнозирования эффективного лечения рака с применением антагониста MDM2. Идентификация одного или более биомаркеров пути DDR у пациента с раком 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. В частности, путь DDR содержит один или более генов из: пути репарации путем гомологичной рекомбинации (HRR); пути нехомологичного соединения концов (NHEJ); пути репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR); пути анемии Фанкони (FA); и/или пути эксцизионной репарации оснований (BER).

---

**A1**

**202392451**

**202392451**

**A1**

## БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ АНТАГОНИСТОВ MDM2

### 5 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 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.

### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Точная медицина или персонализированная медицина представляет собой 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 средства в правильное время.

Особое внимание в точной медицине уделяется необходимости спрогнозировать, будет ли конкретный пациент реагировать на определенное лекарственное средство. Тест, который способен спрогнозировать, будет ли конкретное лекарственное средство 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 для нового терапевтического агента также может увеличить шансы на то, что данная терапия будет испытана на правильной популяции и в конечном итоге будет одобрена.

Точные лекарственные средства и варианты сопутствующей диагностики часто полагаются на биомаркеры, которые позволяют надежно прогнозировать, будет ли пациент отвечать на определенное лечение. Идентификация надежных биомаркеров для каждой терапии и заболевания является очень важной задачей.

5 В WO-A-2016/056673 описаны сложные сигнатуры генов, которые, как утверждается, обеспечивают прогностические молекулярные инструменты для клинического применения. Данное описание также относится к способам прогнозирования чувствительности рака или опухолей к противораковым лекарственным средствам, которые могут влиять на лечение рака или опухолей, в частности к ингибиторам  
10 активности MDM2 и антагонистам взаимодействия MDM2 и белков p53.

В US-A-2015/0211073 также описана панель генов, как правило, содержащая по меньшей мере четыре гена, в качестве биомаркера для прогнозирования ответа рака на антагонист MDM2

Iorio *et al* (Cell. 2016 Jul 28;166(3):740-75) в работе «A Landscape of Pharmacogenomic  
15 Interactions in Cancer» сообщают, как вызванные раком изменения, идентифицированные в 11 289 опухолях из 29 тканей (интегрирующие соматические мутации, изменения числа копий, метилирование ДНК и экспрессию генов), могут быть картированы на 1001 молекулярно аннотированную линию раковых клеток человека и коррелировать с чувствительностью к 265 лекарственным средствам. Хотя такие  
20 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  
25 точной медицине.

## **ИЗЛОЖЕНИЕ 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  
30 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.

Биомаркеры, определенные в настоящем изобретении, представляют собой гены пути  
5 ответа на повреждение ДНК (DDR) и их генные продукты. Все эти белки и кодирующие их гены известны в данной области. В контексте настоящего документа эти биомаркеры называются «биомаркерами по изобретению» и/или биомаркерами DDR. Пониженная функция DDR в раковой клетке указывает на чувствительность к антагонизму к MDM2. Таким образом, истощение, потеря или сниженная функция одного или более генов или  
10 продуктов генов DDR указывает на чувствительность к антагонизму к MDM2.

В частности, в одном аспекте в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более генов, продуктов генов или активностей DDR. Истошение может относиться к  
15 самому гену, продукту гена (т. е. снижению экспрессии) или мутации, вызывающей снижение активности (т. е. мутации с потерей функции). Истошение может быть связано с абберацией, вызывающей пониженную активность, например потерю числа копий или эпигенетический сайленсинг.

Существует широкая группа аббераций, которая индуцирует потерю/снижение активности, например потерю активности посредством потери числа копий или мутации  
20 с потерей функции. Мутация с потерей функции может рассматриваться как истощение продукта гена дикого типа. Соответственно, когда описывается истощение биомаркера, это включает в себя мутацию в этом биомаркере таким образом, что дикий тип сокращается или больше не обнаруживается.

В одном аспекте в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в способе  
25 лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более генов, продуктов генов или активностей в пути гомологичной рекомбинации (HR) (который также называется путем репарации путем гомологичной рекомбинации (HRR)). Эти раковые клетки имеют пониженную функцию HR и, следовательно, могут быть охарактеризованы как имеющие дефицит HR. В одном варианте осуществления рак  
30 характеризуется истощением BRCA1. BRCA1 человека имеет идентификатор гена в базе данных Entrez 672. В одном варианте осуществления рак характеризуется истощением

BRCA2. BRCA2 человека имеет идентификатор гена в базе данных Entrez 675. В одном варианте осуществления рак характеризуется истощением ATM. ATM представляет собой мутантный при атаксии-телеангектазии белок. ATM человека дикого типа имеет идентификатор гена в базе данных Entrez 472. Один вариант осуществления изобретения относится к истощению любых двух из BRCA1, BRCA2 и ATM. Один вариант осуществления изобретения относится к истощению всех трех из BRCA1, BRCA2 и ATM. Один вариант осуществления изобретения относится к мутации с потерей функции в BRCA1, BRCA2 или ATM по сравнению с WT. Один вариант осуществления изобретения относится к мутации с потерей функции в любых двух из BRCA1, BRCA2 и ATM по сравнению с WT. Один вариант осуществления изобретения относится к мутации с потерей функции всех трех из BRCA1, BRCA2 и ATM по сравнению с WT. Один вариант осуществления изобретения относится к потере числа копий или эпигенетическому сайленсингу в 1, 2 или 3 из BRCA1, BRCA2 или ATM по сравнению с WT. Один вариант осуществления изобретения относится к мутации с потерей функции в BRCA1 и/или BRCA2. Один вариант осуществления изобретения относится к потере числа копий или эпигенетическому сайленсингу в BRCA1 и/или BRCA2. В одном варианте осуществления дефект в репарации путем гомологичной рекомбинации дает эффект, идентичный потере BRCA1 или BRCA2.

В одном варианте осуществления ген (-ы) пути HR выбирают из одного или более из следующих генов: LIG1, MRE11A, NBN, PARG, PARP1, PARPBP, RAD50, TP53BP1, XRCC2, XRCC3, EXO1, PCNA, POLD1, POLD2, POLD3, POLD4, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, BARD1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, DMC1, DNA2, EID3, EME1, EME2, ERCC1, H2AFX, HELQ, HFM1, INO80, KAT5, MUS81, NFATC2IP, NSMCE1, NSMCE2, NSMCE3, NSMCE4A, PALB2, PARP2, PAXIP1, POLH, POLQ, PPP4C, PPP4R1, PPP4R2, PPP4R4, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD52, RAD54B, RAD54L, RBBP8, RDM1, RECQL, RECQL4, RECQL5, RMI1, RMI2, RTEL1, SHFM1, SLX1A, SLX1B, SLX4, SMARCAD1, SMC5, SMC6, SPO11, SWSAP1, TOP3A, TOP3B, UIMC1, WRN и/или ZSWIM7. Все эти гены пути HR известны в данной области, например, как описано в Knijnenburg *et al* Cell Rep. 2018 Apr 3;23(1):239-254.e6.

В некоторых вариантах осуществления раковые клетки с дефицитом HR не являются ATM-дефицитными, т. е. ATM дикого типа экспрессируется в раковых клетках на

нормальном (или высоком) уровне. В этих клетках дефицит HR обеспечивается потерей функции в другом гене или генах HR, например BRCA1 и/или BRCA2. Эти раковые клетки могут в некоторых вариантах осуществления включать истощение HR, которое включает гены, продукты генов или активности в пути HR, которые не являются ATM.

- 5 В некоторых вариантах осуществления раковые клетки с дефицитом HR не являются ATR-дефицитными, т. е. ATR дикого типа экспрессируется в раковых клетках на нормальном (или высоком) уровне. В этих клетках дефицит HR обеспечивается потерей функции в другом гене или генах HR, например BRCA1 и/или BRCA2. Эти раковые клетки могут в некоторых вариантах осуществления включать истощение HR, которое
- 10 включает гены, продукты генов или активности в пути HR, которые не являются ATR. ATR представляет собой «атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок». Пример последовательности ATR человека доступен в базе данных UniProtKB под номером доступа Q13535 (ATR-HUMAN), в базе данных GenBank под номером доступа NCBI AAK26749.1 и также опубликован в литературных источниках, таких как Bentley et al.,
- 15 EMBO J., 15: 6641–6651 (1996) и Cimprich et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 18575-18480 (1996).

В некоторых вариантах осуществления раковые клетки включают истощение HR, которое включает гены, продукты генов или активности в пути HR, которые не являются ATM.

- 20 В некоторых вариантах осуществления раковые клетки с дефицитом HR не являются ATM-дефицитными и не являются ATR-дефицитными, т. е. ATM дикого типа и ATR дикого типа экспрессируются в раковых клетках на нормальных (или высоких) уровнях. В этих клетках дефицит HR обеспечивается потерей функции в другом гене или генах HR, например BRCA1 и/или BRCA2.

- 25 В некоторых вариантах осуществления раковые клетки включают истощение HR, которое включает гены, продукты генов или активности в пути HR, которые не являются ATM и не являются ATR.

- В некоторых вариантах осуществления рак определяется как характеризующийся истощением одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях
- 30 репарации повреждения ДНК (DDR) или рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в по меньшей мере одном гене пути DDR, причем один или более генов

- или продуктов генов DDR не состоит из ATM и/или ATR. Это означает, что гены или продукты генов могут содержать ATM и/или ATR и один или более других биомаркеров пути DDR или если имеется единственный биомаркер, то он не является ATM или ATR, и если имеется пара биомаркеров, то они не являются ATM и ATR, но могут содержать ATM или ATR и другой биомаркер пути DDR. В некоторых вариантах осуществления рак может характеризоваться истощением одного гена или продукта генов в одном пути репарации повреждения ДНК (DDR) или рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в одном гене пути DDR и ген или продукт гена пути DDR не является ATM или ATR.
- 5
- Соответственно, в некоторых вариантах осуществления при наличии одного биомаркера в соответствии с изобретением он не является ATM или ATR. В некоторых вариантах осуществления при наличии одного биомаркера в соответствии с изобретением он не является ATM. В некоторых вариантах осуществления при наличии одного биомаркера в соответствии с изобретением он не является ATR.
- 10
- В некоторых вариантах осуществления рак может характеризоваться истощением двух генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR) или рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в по меньшей мере двух генах пути DDR и гены или продукты генов пути DDR не являются ATM и ATR.
- 15
- В некоторых вариантах осуществления рак может характеризоваться истощением двух генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR) или рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в по меньшей мере двух генах пути DDR и гены или продукты генов пути DDR включают в себя один или более из ATM и/или ATR и один или более генов или продуктов генов пути DDR, которые не являются ATM и ATR. В другом аспекте рак характеризуется истощением
- 20
- одного или более генов, продуктов генов или активностей в пути анемии Фанкони (FA). Этот путь включает в себя по меньшей мере гены FANCA (идентификатор гена в базе данных Entrez 2175), FANCB (идентификатор гена 2187), FANCC (идентификатор гена 2176), FANCD1 (также известный как BRCA2, идентификатор гена 675), FANCD2 (идентификатор гена 2177), FANCE (идентификатор гена 2178), FANCF (идентификатор гена 2188), FANCG (идентификатор гена 2189), FANCI (идентификатор гена 55215), FANCL (идентификатор гена 83990), FANCL (идентификатор гена 55120), FANCM
- 25
- 30

(идентификатор гена 57697), FANCN (идентификатор гена 79728), FANCO (идентификатор гена 889), FANCP (идентификатор гена 84464), FANCO (идентификатор гена 2072), FANCR (идентификатор гена 5888), FANCS (также известный как BRCA1, идентификатор гена 672), FANCT (идентификатор гена 29089), FANCU (идентификатор гена 7516), FANCV (идентификатор гена 10459) и FANCW (идентификатор гена 55159).  
5 Один вариант осуществления изобретения относится к мутации с потерей функции в одном или более генах пути FA по сравнению с WT.

В другом аспекте в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более генов, продуктов генов или активностей в пути негомологичного соединения концов (NHEJ).  
10 Следовательно, эти раковые клетки могут быть охарактеризованы как имеющие дефицит NHEJ. В одном варианте осуществления рак характеризуется истощением ATRX. ATRX представляет собой синдром X-сцепленной альфа-талассемии с умственной отсталостью. ATRX человека дикого типа имеет идентификатор гена в базе данных Entrez 546. Один вариант осуществления изобретения относится к мутации с потерей функции в ATRX по сравнению с WT.  
15

В дополнительном аспекте в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более генов, продуктов генов или активностей в пути репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR). Следовательно, эти раковые клетки могут быть охарактеризованы как имеющие дефицит MMR. В одном варианте осуществления рак характеризуется истощением одного или более из MSH2 (идентификатор гена в базе данных Entrez 4436), MSH3 (идентификатор гена 4437), MSH6 (идентификатор гена 2956), MLH1 (идентификатор гена 4292), PMS2 (идентификатор гена 5395) и/или MLH3  
25 (идентификатор гена 27030). В дополнительном варианте осуществления рак характеризуется истощением POLD1 (идентификатор гена в базе данных Entrez 5424) или POLE (идентификатор гена 5426), например, имеет одну или более мутаций POLD1 и/или POLE. Один вариант осуществления изобретения относится к мутации с потерей функции в одном или более генах пути MMR по сравнению с WT.

30 В некоторых вариантах осуществления рак включает мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, ассоциированную с дефектами в репарации ошибочно спаренных

нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Эти сигнатуры одноосновного замещения (SBS) известны из каталога соматических мутаций в раке (COSMIC), GRCh37 v91. Сигнатуры COSMIC SBS доступны по адресу [cancer.sanger.ac.uk/cosmic](http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic) и были подготовлены, как описано в Alexandrov *et al* Nature volume 578, pages 94-101 (2020).

В дополнительном аспекте в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более генов, продуктов генов или активностей в пути эксцизионной репарации оснований (BER). Следовательно, эти раковые клетки могут быть охарактеризованы как имеющие дефицит BER. Один вариант осуществления изобретения относится к мутации с потерей функции в одном или более генах пути BER по сравнению с WT.

В одном варианте осуществления всех аспектов на потерю или истощение гена или продукта функционального гена DDR при раке указывает микросателлитная нестабильность (MSI) и/или опухолевая мутационная нагрузка рака, как правило, «MSI-High» и/или «высокая мутационная нагрузка опухоли».

Для некоторых биомаркеров, как правило, проводят измерения для белка. Это можно обеспечить, используя, например, иммуногистохимию (ИГХ). В некоторых вариантах осуществления для определения статуса биомаркера можно использовать мутационный анализ (например, секвенирование ДНК).

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более биомаркеров DDR и необязательно имеет повышенную экспрессию одного или более генов сигнатуры интерферона (сигнатуры IFN). Гены сигнатуры IFN содержат CXCL10, CXCL11, RSAD2, MX1, BATF2, IFI44L, IFITM1, ISG15, CMPK2, IFI27, CD74, IFIH1, CCRL2, IFI44, HERC6, ISG20, IFIT3, HLA-C, OAS1, IFI35, IRF9, EPSTI1, USP18, BST2, CSF1, C1S, DHX58, TRIM14, OASL, IRF7, LGALS3BP, DDX60, LAP3, LAMP3, PARP12, PARP9, SP110, PLSCR1, WARS, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1 и FLI1. Эти биомаркеры в совокупности называют в настоящем документе «сигнатурой интерферона». Как правило, биомаркеры сигнатуры IFN можно выявить в виде мРНК.

Методы измерения одного или более биомаркеров нуклеиновой кислоты, например, биомаркеров сигнатуры IFN, могут включать в себя количественные методы, такие как ОТ-ПЦР или анализ Nanostring, которые известны в данной области. Также можно проводить измерения для ДНК. В некоторых вариантах осуществления для определения генного статуса биомаркера можно использовать анализ вариации числа копий (CNV) и/или мутационный анализ (например, секвенирование ДНК).

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более биомаркеров DDR и необязательно также имеет сниженную экспрессию одного, двух или трех из CDKN2A, BAP1 и SKP2. Необязательно рак характеризуется истощением одного или более биомаркеров DDR и характеризуется истощением одного, двух или трех из CDKN2A, BAP1 и SKP2. Такой рак может дополнительно иметь повышенную экспрессию одного или более генов сигнатуры интерферона (IFN), описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления антагонист MDM2 предложен для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более биомаркеров DDR и необязательно также может характеризоваться истощением CDKN2A; Истощением BAP1; и/или демонстрирует повышенную экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти или более генов сигнатуры интерферона.

Истощение SKP2 может означать утрату или полную утрату гена SKP2, мутацию гена SKP2 и утрату функции либо оно может означать низкую экспрессию гена и низкую экспрессию и функцию белка, что является результатом утраты или мутации гена или иного события. В одном варианте осуществления антагонист MDM2 предложен для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более биомаркеров DDR и необязательно также может характеризоваться снижением, уменьшением, низким уровнем или отсутствием экспрессии SKP2.

Ген CDKN2A кодирует белки p16(INK4A) и p14(ARF), а ссылки на ген CDKN2A включают белки, кодируемые CDKN2A. Утрату CDKN2A можно измерять по низким уровням белкового экспрессионного продукта, т. е. уровню экспрессии, который ниже контрольного уровня экспрессии p16(INK4A) и/или p14(ARF), т. е. следствием утраты гена CDKN2A является утрата p16 и/или P14.

В случае CDKN2A обычно проводят измерения для белка. Это можно обеспечить, используя, например, иммуногистохимию (ИГХ). В некоторых вариантах осуществления для определения статуса CDKN2A можно использовать мутационный анализ (например, секвенирование ДНК).

5 В случае VAP1, как правило, можно проводить измерения для белка. Это можно обеспечить, используя, например, иммуногистохимию (ИГХ). В некоторых вариантах осуществления также можно измерять клеточное расположение. В некоторых вариантах осуществления для определения статуса VAP1 можно использовать мутационный анализ (например, секвенирование ДНК). Биомаркеры, идентифицированные в  
10 настоящем документе как имеющие повышенную экспрессию, иногда называют биомаркерами сигнатуры интерферона или сигнатуры IFN. Их также называют термином «гены пути интерферона типа 1». Как правило, эти биомаркеры можно выявить в виде мРНК. Таким образом, методы измерения одного или более биомаркеров сигнатуры IFN могут включать количественные методы, такие как ОТ-ПЦР или анализ  
15 Nanostring, которые известны в данной области. Также можно проводить измерения для ДНК. В некоторых вариантах осуществления для определения генного статуса биомаркера можно использовать анализ вариации числа копий (CNV) и/или мутационный анализ (например, секвенирование ДНК).

Измерения для биомаркеров по изобретению можно проводить прямо или непрямо.  
20 Непрямое измерение, как правило, включает в себя обнаружение молекулы, которая функционально выше или ниже биомаркера и уровень которой коррелирует с уровнем биомаркера. Например, субстрат, на который действует биомаркер, можно использовать в качестве непрямого измерения биомаркера. В одном варианте осуществления уровни VAP1 можно измерить посредством обнаружения уровня убиквитинирования гистона  
25 H2A, причем повышенное убиквитинирование H2A, как правило, отражает сниженный уровень VAP1. В другом варианте осуществления истощение VAP1 можно оценить посредством определения повышения экспрессии или активности EZH2. В одном варианте осуществления SKP2 может быть обнаружен косвенно посредством обнаружения одного или более субстратов SKP2. Типичный субстрат SKP2  
30 представляет собой p27. В одном варианте осуществления изобретения уровень SKP2 оценивают посредством измерения уровней одного или более из p27, p21, p57, E2F-1,

MEF, P130, Tobi, циклина D, циклина E, Smad4, Myc, Mcb, RASSF1A, Foxol, Orclp, Cdt1, Rag2, Brca2, CDK9, MPK1 и/или UBP43.

Другое косвенное измерение биомаркера DDR представляет собой считывание показателей дефектов DDR по ходу транскрипции. Одним из таких показателей является мутационная нагрузка опухоли (ТМВ). Другим показателем по ходу транскрипции является микросателлитная нестабильность (MSI). Клинические анализы уже используются в клинических условиях для стратификации пациентов на основании этих признаков. Например, MSI-high (или MSI-H) представляет собой хорошо известное клиническое определение рака, которое может быть определено с использованием методик, включающих секвенирование нового поколения, флуоресцентные мультиплексные ПЦР и капиллярные электрофорезы, иммуногистохимию или одномолекулярные инвертируемые зонды. Кроме того, ТМВ можно измерить с помощью способов NGS. В качестве маркера геномной нестабильности и MSI можно использовать мутационную нагрузку опухоли (ТМВ). Способы тестирования MSI (MSK-Impact и F1CDx) включают измерения как микросателлитной нестабильности (MSI), так и мутационной нагрузки опухоли (ТМВ).

Данные в приведенных ниже примерах показывают, что истощение, например утрата (также известная как тотальная или полная утрата) одной или более активностей биомаркера DDR, являются прогностическим в отношении чувствительности раковых клеток к антагонисту MDM2. Соответственно, низкие уровни одного или более из биомаркеров DDR можно использовать для идентификации рака, подходящего для лечения антагонистом MDM2. В определенных вариантах осуществления биомаркер (-ы) DDR может (могут) быть выбран (-ы) из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER. Все множество измеренных биомаркеров DDR может находиться в одном и том же пути или может происходить из различных путей. В одном варианте осуществления измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR содержат ATM, BRCA1 и/или BRCA2, как правило, мутацию ATM, BRCA1 и/или BRCA2 с потерей функции. В другом варианте осуществления измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR содержат ATRX, как правило, мутацию ATRX с потерей функции. В другом варианте осуществления один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. В дополнительном варианте осуществления истощение

биомаркеров MMR идентифицируется посредством MSI (например, MSI-High) и/или повышенной мутационной нагрузки опухоли по сравнению с нечувствительной клеткой. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В  
5 дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1.

10 В некоторых вариантах осуществления сниженные уровни биомаркера или биомаркеров по изобретению определяют относительно нераковой клетки. Это сравнение раковых и нераковых клеток может быть особенно полезным. 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  
15 представлять собой значение, известное для нераковой клетки этого типа. Таким образом, уровень биомаркера, например, экспрессию или активность, можно сравнить с контрольными уровнями, определенными для здоровых индивидов, или с контрольными уровнями, определенными в нормальной непролиферативной ткани.

В некоторых других вариантах осуществления сниженный уровень, например,  
20 экспрессии биомаркера или биомаркеров 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. Невосприимчивые раковые клетки, как правило, представляют собой клетки того же типа рака, что и исследуемая раковая клетка. Невосприимчивые раковые клетки, как  
25 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 в качестве кандидата для лечения антагонистом MDM2, когда уровень экспрессии или  
30 активности одного или более биомаркеров DDR снижен относительно верхнего предела нормы (ULN). В одном варианте осуществления один или более биомаркеров DDR

могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей.

5 В другом варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В некоторых вариантах осуществления наличие ATM с мутацией с потерей функции по сравнению с диким типом прогнозирует чувствительность к антагонизму к MDM2. В другом варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В некоторых вариантах осуществления наличие BRCA1 с мутацией с потерей функции по сравнению с диким типом прогнозирует чувствительность к антагонизму к MDM2. В другом варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. В некоторых вариантах осуществления наличие BRCA2 с мутацией с потерей функции по сравнению с диким типом прогнозирует чувствительность к антагонизму к MDM2.

15 В другом варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В некоторых вариантах осуществления наличие ATRX с мутацией с потерей функции по сравнению с диким типом прогнозирует чувствительность к антагонизму к MDM2. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1.

В другом варианте осуществления один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA.

В дополнительном варианте осуществления истощение биомаркера DDR, например, биомаркера MMR, идентифицируется посредством MSI (например, MSI-High) и/или повышенной мутационной нагрузки опухоли (например, высокой TMB или повышенной по сравнению с нечувствительной раковой клеткой).

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

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

- 5 В одном варианте осуществления в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в лечении рака, в частности рака p53 дикого типа, причем рак характеризуется наличием одного или более биомаркеров по изобретению в биологическом образце, полученном от пациента.

10 В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения предложен способ лечения рака у пациента, включающий этапы выбора пациента на основании профиля экспрессии еще одного или более биомаркеров по изобретению. В некоторых вариантах осуществления пациента выбирают на основании:

пониженной экспрессии или активности одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента;

- 15 и необязательно впоследствии вводят терапевтически эффективное количество антагониста MDM2 упомянутому пациенту. В одном варианте осуществления один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из
- 20 различных путей. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. В другом варианте осуществления
- 25 измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) одну или более мутаций POLD1 и/или POLE. В некоторых
- 30 вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в

репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. В другом варианте осуществления один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. В дополнительном варианте осуществления истощение биомаркеров идентифицируется посредством повышенной MSI и/или повышенной мутационной нагрузки опухоли.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления изобретения предложен антагонист MDM2 для применения в лечении рака у пациента, характеризующийся тем, что упомянутый пациент был выбран из-за наличия пониженной или низкой экспрессии одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента; В одном варианте осуществления один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. В другом варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) измерение мутационной сигнатуры SBS6 и/или SBS26, связанной с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационной сигнатуры SBS20 POLD1. В другом варианте осуществления один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. В дополнительном варианте осуществления истощение биомаркеров идентифицируется посредством повышенной MSI (например, MSI-High) и/или высокой мутационной нагрузки опухоли (TMB).

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 представлять собой образец крови.

5 Образец может представлять собой образец опухоли, например биопсию опухоли. Исследование может включать анализ для обнаружения белка, мРНК, ДНК и/или цоДНК.

В другом аспекте в изобретении предложено использование уровней экспрессии одного или более биомаркеров по изобретению в образце раковых клеток пациента-человека в качестве биомаркеров для оценки того, является ли рак чувствительным к лечению антагонистом MDM2.

10

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

15

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

20

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

25 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

30

оценки того, свидетельствует ли исследуемый уровень экспрессии о том, что рак можно лечить антагонистом MDM2.

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.

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

10 обнаружение в образце раковых клеток от пациента экспрессии или активности одного или более биомаркеров по изобретению; и

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

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в лечении рака у пациента в комбинации с противораковым соединением, отличающийся тем, что упомянутый рак у упомянутого пациента представляет собой рак p53 дикого типа, который был выбран из-за наличия одного или более биомаркеров по изобретению.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения рака у пациента, причем упомянутый рак у упомянутого пациента необязательно представляет собой рак p53 дикого типа и при этом пациент был выбран как имеющий один или более биомаркеров по изобретению на уровне, который указывает, что лечение антагонистом MDM2 будет эффективным; и введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и необязательно другого противоракового агента выбранному пациенту.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ идентификации пациента, страдающего раком, подходящего для лечения антагонистом

MDM2, включающий обнаружение и необязательно количественное определение экспрессии одного или более биомаркеров по изобретению.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ выбора пациента (например, страдающего раком), включающий этапы выбора пациента посредством обнаружения и необязательно количественного определения экспрессии одного или более биомаркеров по изобретению.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ определения вероятности того, что пациент с раком будет отвечать на терапию антагонистом MDM2, при этом способ включает в себя этапы, на которых:

получают результат измерения сниженной экспрессии одного или более биомаркеров DDR в образце раковых клеток от пациента по сравнению с соответствующей нераковой клеткой;

и определяют вероятность того, что пациент будет отвечать на терапию антагонистом MDM2, на основании этого измерения. Один или более биомаркеров DDR могут необязательно происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, MMR, FA и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) одну или более мутаций POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Необязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. Необязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути

MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ введения лекарственного средства, включающий:

- 5           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 обнаружения экспрессии одного или более биомаркеров по изобретению у пациента-человека, страдающего раком. Этот способ, как правило, включает:

(a) получение образца раковых клеток от пациента-человека; и

(b) обнаружение экспрессии упомянутых биомаркеров в отобранных раковых клетках посредством приведения образца в контакт с одним или более реагентами для обнаружения экспрессии биомаркеров.

15       В дополнительном аспекте в изобретении предложены набор или устройство для обнаружения уровня экспрессии по меньшей мере одного биомаркера чувствительности к антагонизму MDM2 в образце от пациента-человека, содержащие реагент для обнаружения или реагенты для обнаружения для обнаружения одного или более биомаркеров по изобретению.

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

              средства обнаружения, выполненные с возможностью обнаружения в образце от пациента-человека одного или более биомаркеров по изобретению

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

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, причем упомянутый интерфейс является либо частью системы, либо удаленным интерфейсом.

- 5 Необязательно один или более из вышеперечисленных элементов, в частности процессор, могут функционировать «в облаке», то есть не на стационарной машине, а посредством интернет-приложения.

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

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

пониженной экспрессии одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента. В одном варианте осуществления один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, MMR, FA и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. В другом варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. В другом варианте осуществления один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. В

дополнительном варианте осуществления истощение биомаркеров MMR идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.

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

5 пониженной экспрессии одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента. В одном варианте осуществления один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, MMR, FA и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. В другом варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) одну или более мутаций POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. В другом варианте осуществления один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. В дополнительном варианте осуществления истощение биомаркеров MMR идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.

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

30 (а) идентификацию пациента, нуждающегося в лечении рака, необязательно рака p53 дикого типа, такого как мезотелиома;

- (b) определение того, что у пациента имеет место пониженная экспрессия одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента; и лечение пациента терапевтически эффективным количеством антагониста MDM2.

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

- (a) идентификацию пациента, нуждающегося в лечении рака, необязательно рака молочной железы, яичника, предстательной железы или поджелудочной железы;

10 (b) определение того, что у пациента имеет место пониженная экспрессия одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента; и лечение пациента терапевтически эффективным количеством антагониста MDM2.

Необязательно один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или  
 15 более из следующих путей: HR, NHEJ, MMR, FA и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. Необязательно измеренный (-ые)  
 20 биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В  
 25 дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) одну или более мутаций POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Необязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах  
 30 пути FA. Необязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути

MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.

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

- 5           (a)     идентификацию пациента, нуждающегося в лечении рака, необязательно мезотелиомы;
- (b)     определение одного или более биомаркеров по настоящему изобретению у пациента, необязательно одного или более биомаркеров DDR из одного или более из путей HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER;
- 10           a.     необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) 1, 2, 3 или 4 из BRCA1, BRCA2, ATM и ATRX; и/или
- b.     необязательно один или более из биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA; и/или
- c.     необязательно один или более из биомаркеров DDR находятся в пути
- 15           MMR, например, один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2, MLH3, POLE и/или POLD1 и/или мутационная сигнатура SBS6, SBS26 и/или SBS20, причем необязательно истощение упомянутых одного или более биомаркеров DDR пути MMR идентифицируют посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли;
- 20           (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 антагониста MDM2.
- 25           В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения, включающий:
- (a)     идентификацию пациента, нуждающегося в лечении рака, необязательно рака молочной железы, яичника, предстательной железы или поджелудочной железы;

(b) определение одного или более биомаркеров по настоящему изобретению у пациента, необязательно одного или более биомаркеров DDR из одного или более из путей HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER;

5 а. необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) или состоит (-ят) из 1, 2, 3 или 4 из BRCA1, BRCA2, ATM и ATRX; и/или

b. необязательно один или более из биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA; и/или

10 с. необязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пути MMR, например, один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2, MLH3, POLE и/или POLD1 и/или мутационная сигнатура SBS6, SBS26 и/или SBS20, причем необязательно истощение одного или более из упомянутых биомаркеров DDR пути MMR идентифицируют посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли;

15 (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 антагониста MDM2.

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

(a) анализ одного или более биологических образцов с определением, таким образом, одного или более биомаркеров по изобретению у пациента;

25 (b) на основании этого определения выбор этого пациента для лечения терапевтически эффективным количеством антагониста MDM2.

В одном варианте осуществления биомаркер DDR происходит из пути HR и представляет собой один или более генов HR, выбранных из: LIG1, MRE11A, NBN, PARG, PARP1, PARPB, RAD50, TP53BP1, XRCC2, XRCC3, EXO1, PCNA, POLD1, POLD2, POLD3, POLD4, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, 30 BARD1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, DMC1, DNA2, EID3, EME1, EME2, ERCC1,

H2AFX, HELQ, HFM1, INO80, KAT5, MUS81, NFATC2IP, NSMCE1, NSMCE2, NSMCE3, NSMCE4A, PALB2, PARP2, PAXIP1, POLH, POLQ, PPP4C, PPP4R1, PPP4R2, PPP4R4, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD52, RAD54B, RAD54L, RBBP8, RDM1, RECQL, RECQL4, RECQL5, RMI1, RMI2, RTEL1, SHFM1, SLX1A, SLX1B, 5 SLX4, SMARCAD1, SMC5, SMC6, SPO11, SWSAP1, TOP3A, TOP3B, UIMC1, WRN и/или ZSWIM7.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ выбора пациента (например, имеющего рак) для лечения антагонистом MDM2, характеризующийся тем, что упомянутый пациент был выбран по причине:

10 пониженной или низкой экспрессии одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента. Необязательно один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из 15 различных путей. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR 20 содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR 25 содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Необязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. Необязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется 30 посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.

- В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен антагонист MDM2 для применения в лечении рака у пациента, отличающийся тем, что упомянутый пациент, как известно, имеет пониженную экспрессию или активность одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента.
- 5 Не обязательно один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. Не обязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления
- 10 измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Не обязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из
- 15 MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) одну или более мутаций POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных
- 20 нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Не обязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. Не обязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.
- 25 В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен набор для лечения рака у пациента, содержащий биосенсор для обнаружения и/или количественного определения одного или более биомаркеров по изобретению и/или реагенты для обнаружения одного или более биомаркеров по изобретению, не обязательно вместе с инструкциями по применению набора в соответствии со способами, определенными в
- 30 настоящем документе.

- В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ определения чувствительности субъекта с раком к лечению антагонистом MDM2, включающий определение пониженной экспрессии или активности одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента.
- 5 Не обязательно один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. Не обязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления
- 10 измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Не обязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из
- 15 MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) одну или более мутаций POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных
- 20 нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Не обязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. Не обязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.
- 25 В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ определения восприимчивости имеющего рак индивида к лечению антагонистом MDM2, включающий идентификацию пациента с наличием:
- пониженной экспрессии или активности одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента; и впоследствии
- 30 введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 упомянутому пациенту.

Один или более из упомянутых биомаркеров DDR могут необязательно происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, MMR, FA и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Необязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. Необязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения рака у пациента, включающий этапы выбора пациента с пониженной экспрессией или активностью одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента. Необязательно один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, MMR и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат)

ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) или более мутаций POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Необязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. Необязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ введения лекарственного средства, включающий:

(i) назначение определения экспрессии или активности одного или более биомаркеров DDR;

а. необязательно один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER;

и

(ii) введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 пациенту с пониженными уровнями одного или более биомаркеров DDR.

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

(i) антагонист MDM2;

(ii) вкладыш для пациентов с подробными инструкциями по применению антагониста MDM2 в лечении пациентов, идентифицированных с помощью профиля биомаркера, описанного в настоящем 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 или активности одного или более биомаркеров DDR;
- 5 a. необязательно один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, FA, NHEJ, MMR и/или BER;
- b. необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM, BRCA1, BRCA2 и/или ATRX;
- 10 c. необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутации MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS2, POLE и/или POLD1, причем необязательно рак включает мутационную сигнатуру SBS6, SBS26 и/или SBS20;
- d. необязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA; и/или
- 15 e. необязательно истощение одного или более упомянутых биомаркеров может быть определено посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.
- (ii) выбор пациента с пониженными уровнями одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента;
- 20 (iii) с последующим введением терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 упомянутому пациенту, выбранному на этапе (ii).

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

- 25 (a) приведение образца от пациента в контакт с множеством олигонуклеотидных праймеров, причем упомянутое множество праймеров содержит по меньшей мере одну пару олигонуклеотидных праймеров для любого из одного или более биомаркеров DDR;
- (b) проведение ПЦР на упомянутом образце для амплификации генных экспрессионных продуктов/транскриптов в образце;

(с) определение уровня продукта экспрессии по меньшей мере одного из упомянутых генов; и

(d) определение пациента в качестве кандидата для лечения антагонистом MDM2, когда уровень экспрессии по меньшей мере одного упомянутого гена является низким относительно верхнего предела нормы (ULN).

5

Пациент может быть необязательно определен в качестве кандидата для лечения антагонистом MDM2, когда уровень экспрессии одного или более биомаркеров DDR низкий относительно (например, ниже) верхнего предела нормы (ULN). Необязательно один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, FA, MMR и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) одну или более мутаций POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Необязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. Необязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.

10

15

20

25

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

30

(а) приведение образца от пациента в контакт с антителом к одному или более биомаркерам по изобретению;

- (b) проведение анализа упомянутого образца;
- (c) определение уровня одного или более биомаркеров по изобретению; и
- (d) определение пациента в качестве кандидата для лечения антагонистом MDM2, когда уровень одного или более биомаркеров по настоящему изобретению повышен или снижен относительно верхнего предела нормы (ULN).

5

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 одному или более биомаркерам DDR, как правило, проводят иммуногистохимический анализ упомянутого образца и идентифицируют пациента как кандидата для лечения антагонистом MDM2, когда уровень одного или более биомаркеров DDR является низким (или отсутствует) относительно верхнего предела нормы (ULN).

10

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

15

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ выбора пациента с раком для получения терапии антагонистом MDM2 в связи с раком, включающий:

- (a) определение уровня одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце от пациента;

20

один или более биомаркеров DDR могут необязательно происходить из одного или более из путей HR, FA, NHEJ, MMR и/или BER; и/или

измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR необязательно содержит (-ат) ATM, BRCA1, BRCA2 и/или ATRX; и/или

25

измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR необязательно содержит (-ат) MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2, MLH3, POLE и/или POLD1, причем необязательно рак включает мутационную сигнатуру SBS6, SBS26 и/или SBS20; и/или

один или более биомаркеров DDR необязательно находятся в пределах пути FA; и/или

если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров необязательно идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли;

и

(b) выбор пациента, у которого уровень одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце от пациента ниже предварительно заданного значения в биологическом образце от пациента, которое равно или больше предварительно заданного значения.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ для прогнозирования эффективности антагониста MDM2 в отношении рака у пациента или для прогнозирования ответа пациента с раком на антагонист MDM2 в связи с раком, включающий определение уровня одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце от пациента, где уровень одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, который равен или, как правило, меньше предварительно заданного значения, является прогнозирующим эффективность у пациента. Необязательно один или более биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, MMR и/или BER. Измеренный (-е) биомаркер или биомаркеры DDR может (могут) находиться в одном и том же пути или может (могут) происходить из различных путей. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. В одном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 и/или MLH3. В дополнительном варианте осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) POLD1 и/или POLE. В некоторых вариантах осуществления измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат)

мутационную сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1. Не обязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. Не обязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли.

В одном варианте осуществления пациента выбирают для лечения антагонистом MDM2 на основании измерения одного или более генов биомаркеров пути HR, выбранных из: LIG1, MRE11A, NBN, PARG, PARP1, PARPBP, RAD50, TP53BP1, XRCC2, XRCC3, EXO1, PCNA, POLD1, POLD2, POLD3, POLD4, RFC1, RFC2, RFC3, RFC4, RFC5, RPA1, RPA2, RPA3, RPA4, BARD1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, DMC1, DNA2, EID3, EME1, EME2, ERCC1, H2AFX, HELQ, HFM1, INO80, KAT5, MUS81, NFATC2IP, NSMCE1, NSMCE2, NSMCE3, NSMCE4A, PALB2, PARP2, PAXIP1, POLH, POLO, PPP4C, PPP4R1, PPP4R2, PPP4R4, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD52, RAD54B, RAD54L, RBBP8, RDM1, RECQL, RECQL4, RECQL5, RMI1, RMI2, RTEL1, SHFM1, SLX1A, SLX1B, SLX4, SMARCAD1, SMC5, SMC6, SPO11, SWSAP1, TOP3A, TOP3B, UIMC1, WRN и/или ZSWIM7.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ выбора пациента с раком, нуждающегося в лечении антагонистом MDM2, который включает тестирование образца опухоли, полученного от пациента, на низкий уровень одного или более биомаркеров DDR.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения рака, включающий (i) исследование образца опухоли, полученного от пациента, имеющего или вероятно имеющего рак, на предмет утраты одного или более биомаркеров DDR и (ii) введение антагониста MDM2 пациенту, от которого был получен образец. Не обязательно один или более биомаркеров DDR в (i) могут происходить из одного или более из путей HR, NHEJ, MMR и/или BER. Не обязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM, BRCA1, BRCA2 и/или ATRX. Не обязательно один или более биомаркеров DDR находятся в пределах пути FA. Не обязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется

посредством MSI и/или высокой мутационной нагрузки опухоли. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) один или более из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 MLH3, POLD1 и/или POLE. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) мутационную  
5 сигнатуру SBS6 и/или SBS26, связанную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ идентификации пациента, имеющего рак, для которого с наибольшей вероятностью  
10 будет полезно лечение антагонистом MDM2, включающий измерение уровня одного или более биомаркеров по изобретению в образце опухоли, полученном от пациента, и определение вероятности того, что для пациента будет полезно лечение антагонистом MDM2, в соответствии с присутствующими уровнями.

Некоторые варианты осуществления изобретения включают обнаружение наличия мутации одного или более биомаркеров DDR, указывающей на потерю упомянутого  
15 одного или более биомаркеров DDR. Эти мутации можно сравнивать с контрольными уровнями, определенными в нормальной непролиферативной ткани или в отсутствие мутации.

В изобретении различным образом предлагаются: способ определения того, является ли пациент с раком подходящим для лечения антагонистом MDM2; способ  
20 прогнозирования чувствительности роста опухолевых клеток к ингибированию антагонистом MDM2; способ прогнозирования чувствительности рака у пациента к противораковой терапии, включающей антагонист MDM2; способ разработки плана лечения для пациента с раком; *in vitro* способ идентификации пациента, реагирующего на лечение или чувствительного к лечению со схемой приема антагониста MDM2.

Способы, как правило, включают сравнение уровней одного или более биомаркеров по изобретению в образце, как правило, образце опухоли, с эталонным уровнем и  
25 прогнозирование восприимчивости рака к лечению противораковой терапией, включающей антагонист MDM2. В одном варианте осуществления способы включают анализ одного или более, например, двух или более, или трех или более, или четырех или  
30 более, или пяти или более, или шести или более, или семи или более, или восьми или более, или девяти или более, или десяти или более, или пятнадцати или более

- биомаркеров, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления один или более биомаркеров включают ATM. В одном варианте осуществления один или более биомаркеров не включают ATM. В одном варианте осуществления один или более биомаркеров не включают ATR. В одном варианте осуществления один или более биомаркеров включают BRCA1 или BRAC2. В одном варианте осуществления два или более биомаркеров включают BRCA1 и BRAC2. В одном варианте осуществления два или более биомаркеров включают BAP1 и CDKN2A. В одном варианте осуществления два или более биомаркеров включают ATM. В одном варианте осуществления два или более биомаркеров включают ATR.
- 5
- 10 В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен *in vitro* способ прогнозирования вероятности того, что пациент, страдающий от опухоли, который является кандидатом на лечение антагонистом MDM2, будет отвечать на лечение соединением, включающий этап: (a) определения уровней одного или более биомаркеров DDR в одном или более образцах тканей, взятых у пациента, причем (i)
- 15 потеря одного или более биомаркеров DDR (например, по сравнению с эталонным значением по меньшей мере одной нормальной непролиферативной ткани) указывает на то, что пациент, вероятно, реагирует на лечение, и/или (ii) нормальные или высокие уровни одного или более биомаркеров DDR указывают на то, что пациент с меньшей вероятностью реагирует на лечение.
- 20 В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен анализ, включающий: (a) измерение или количественное определение уровня одного или более биомаркеров DDR; (b) сравнение уровня упомянутого одного или более биомаркеров DDR (например, относительно контрольных уровней, определенных у здоровых людей)
- 25 (например, относительно контрольных уровней, определенных в нормальной непролиферативной ткани), и при потере одного или более биомаркеров DDR (например, относительно контрольных уровней, определенных в нормальной непролиферативной ткани) идентификация пациента как подходящего для лечения антагонистом MDM2.
- В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен анализ,
- 30 включающий:

- (i) приведение биологического образца, полученного от пациента, в контакт с антителом (например, антителом, специфичным к одному или более биомаркерам DDR);
- (ii) промывку образца для удаления несвязанного антитела;
- 5 (iii) измерение интенсивности сигнала от связанного антитела;
- (iv) сравнение измеренной интенсивности сигнала с эталонным значением и определение, повышена ли измеренная интенсивность относительно эталонного значения;
- (v) приведение биологического образца, полученного от пациента, в контакт
- 10 с
- a. праймером (например, по меньшей мере одной парой олигонуклеотидных праймеров для любого одного или более биомаркеров DDR),
- b. антителом (например, антителом, специфичным к одному или более
- 15 биомаркерам DDR) и/или
- c. праймером для гена или мутанта, указывающим на потерю одного или более биомаркеров DDR,
- (vi) проведение ПЦР, ОТ-ПЦР или секвенирования нового поколения для упомянутого образца для амплификации продуктов
- 20 экспрессии / транскриптов генов в образце;
- (vii) определение уровня продукта экспрессии по меньшей мере одного из упомянутых генов; и
- (viii) идентификацию субъекта как имеющего повышенную вероятность пригодности для лечения антагонистом MDM2.
- 25 В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение антагониста MDM2 субъекту с потерей одного или более биомаркеров DDR в образце опухоли, как определено посредством секвенирования или иммуноанализа.

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

(1) определение уровней одного или более биомаркеров DDR у пациента;

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

(3) введение пациенту с фенотипом Ч антагониста MDM2.

10 В одном варианте осуществления балльная оценка дефицита гомологичной рекомбинации (HRD) с помощью CDx Myrehidle MyChoice (одобренного FDA теста на опухоль производства Myriad Genetics Inc., Salt Lake City, Utah, США) применяется для определения статуса дефицита гомологичной рекомбинации посредством исследования вариантов BRCA1 и BRCA2 и оценки геномной нестабильности с использованием трех биомаркеров: потери гетерозиготности, теломерного аллельного дисбаланса и крупных перестроек. Положительный HRD определяется как показатель  $HRD \geq 42$ , а отрицательный — как  $HRD < 42$ .

15 Диагностический тест *in vitro* Myriad myChoice® CDx на основе секвенирования нового поколения оценивает качественное обнаружение и классификацию однонуклеотидных вариантов, вставок и делеций, и вариантов крупных перестроек в белок-кодирующих областях и интрон/экзонных стыках BRCA1 и BRCA2, и определение оценки геномной нестабильности (GIS), которая представляет собой алгоритмическое измерение потери гетерозиготности (LOH), теломерного аллельного дисбаланса (TAI) и крупных перестроек (LST) с использованием ДНК, выделенной из образцов фиксированных в формалине и заключенных в парафин (FFPE) опухолевых тканей.

25 Результаты теста можно использовать в качестве помощи при определении пациентов с раком с положительным статусом дефицита гомологичной рекомбинации (HRD), которые являются подходящими, в связи с положительным результатом теста на вредные или предполагаемые вредные мутации в генах BRCA1 или BRCA2, или могут стать подходящими, в связи с положительным результатом теста на вредные или  
30 предполагаемые вредные мутации в генах BRCA1 или BRCA2 или положительной

оценкой геномной нестабильности, для лечения антагонистом MDM2 (после одобрения в соответствии с одобренной маркировкой терапевтического продукта).

В одном варианте осуществления выполняют тестирование на MSI. Тестирование на MSI можно проводить на свежей, замороженной или заключенной в парафин  
5 опухолевой ткани с использованием ПЦР-анализа для обнаружения нестабильности.

На симпозиуме Национального института онкологии (NCI) США было согласовано пять микросателлитных маркеров, необходимых для определения MSI, которые включают два мононуклеотидных — BAT2526 и три динуклеотидных маркера — D2S123, D5S346 и D17S250. Интерпретация профилей требует сравнения с нормальной ДНК от каждого  
10 пациента. Альтернативный молекулярный способ, основанный исключительно на квази-мономорфных мононуклеотидных метках, был разработан, чтобы избежать анализа соответствующей нормальной ДНК. Было доказано, что этот способ является более специфичным и чувствительным, чем исходная панель NCI (J Clin Oncol. 2006 Jan 10; 24(2):241-51).

15 На основании статуса MSI рак, например колоректальный рак, можно разделить на три группы: MSI-H, если два или более из пяти микросателлитных маркеров демонстрируют нестабильность; MSI-L (низкочастотная MSI), если только один из пяти маркеров демонстрирует нестабильность; и рак с микросателлитной стабильностью (MSS), если ни один из маркеров не проявляет нестабильности (Cancer Res. 1998 Nov 15;  
20 58(22):5248-57).

ИГХ является альтернативным тестом, который широко доступен, обладает преимуществом отсутствия необходимости в молекулярной лаборатории и способностью определять пораженный ген посредством обнаружения потери его продуцируемого белка. Другое преимущество ИГХ-тестирования заключается в том, что  
25 потеря конкретного продукта гена репарации несоответствия (MLH1, mSH2, mSH6 и PMS2) может направлять тестирование зародышевой линии на этот конкретный ген и способствовать определению пациентов. Дефицит репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (dMMR) связан с высокочастотной микросателлитной нестабильностью (H-MSI); Тестирование на dMMR также можно выполнять с помощью ИГХ.

30 В *Cancer Cell Int* 20,16 (2020) содержится обзор способов обнаружения микросателлитной нестабильности, включая NGS (секвенирование нового поколения),

ПЦР (полимеразную цепную реакцию), СЕ (капиллярный электрофорез), ИГХ (иммуногистохимию), smMIP (одномолекулярные инверсионные зонды).

| Способ обнаружения                     | Испытуемые элементы                                 | Точность                      | Спр.                   |
|--|---|-------------------------------|------------------------|
| NGS                                    | Почти 100 локусов МС                                | ИМПАСТ™: 92%,<br>F1CDx: 94,6% | Hempelman et al. [6]   |
| Флуоресцентная мультиплексная ПЦР и СЕ | 5 сайтов МС: ВАТ-26, NR-21, ВАТ-25, MONO-27 и NR-24 | Золотой стандарт, 100%        | Arulananda et al. [11] |
| ИГХ                                    | Белок ММР: hMLH1, hPMS2, hMSH2, hMSH6               | 89–95%                        | Cheah et al. [12]      |
| smMIP                                  | ДНК из опухолевой ткани                             | 95,80%                        | Waalkes et al. [17]    |

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложено применение антагониста MDM2 в получении лекарственного средства для лечения рака у пациента, причем в раковой опухоли имеет место потеря одного или более биомаркеров DDR.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложено применение антагониста MDM2 в получении 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 настоящем документе.

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 против рака (например, мезотелиомы, рака почки или глиобластомы) предназначено для лечения пациента с раком на основании уровней биомаркера или биомаркеров, идентифицированных в настоящем документе, определенных методом анализа, используемым для измерения уровней.

В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложен способ рекламирования лекарственного средства антагониста MDM2, включающий продвижение для целевой аудитории применения лекарственного средства антагониста MDM2 для лечения пациента с раком с потерей одного или более биомаркеров DDR.

5 В дополнительном варианте осуществления в изобретении предложено устройство, выполненное с возможностью идентификации опухоли (например, мезотелиомы) пациента с раком как такой, при которой с вероятностью будет полезно лечение терапевтическим агентом или комбинацией терапевтических агентов, нацеленных на MDM2, либо с вероятностью не будет полезно лечение терапевтическим агентом или  
10 комбинацией терапевтических агентов. Аппарат может содержать устройство хранения данных, хранящее данные секвенирования или данные иммуноанализа из образцов опухоли или проб, полученных из крови, на предмет уровней одного или более генов биомаркеров DDR и/или потери одного или более биомаркеров DDR для определения пациента как способного с вероятностью получить или не получить пользу от  
15 терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов, нацеленных на MDM2.

В одном варианте осуществления способа, описанного в настоящем документе, если один или более биомаркеров DDR имеют низкие уровни или отсутствуют (например, потеря), пациенту вводят антагонист MDM2.

20 В другом варианте осуществления способа, описанного в настоящем документе, если один или более биомаркеров DDR имеют высокие уровни (например, присутствуют), пациенту не вводят антагонист MDM2.

В определенных вариантах осуществления антагонист MDM2 можно вводить пациенту в сочетании с дополнительным противораковым средством, которое не является  
25 антагонистом MDM2. В одном варианте осуществления по меньшей мере один биомаркер по изобретению можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с агентом, описанным в пунктах (i) – (xlix) ниже.

В определенных вариантах осуществления антагонист MDM2 может вводиться пациенту в комбинации с агентом для индукции чувствительности к антагонисту  
30 MDM2, например для снижения уровней одного или более генов или продуктов генов в пути репарации повреждения ДНК (DDR).

В определенных вариантах осуществления способ лечения рака у пациента включает этапы выбора пациента:

- (a) наличие нормальных или высоких уровней генов или продуктов генов пути DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента; и
- 5 (b) введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и агента для индукции чувствительности к антагонисту MDM2, например, посредством снижения уровней одного или более генов или продуктов генов в пути репарации повреждения ДНК (DDR), у упомянутого пациента, выбранного на этапе (a).

10 В одном варианте осуществления агент для снижения уровней одного или более продуктов генов пути DDR представляет собой ингибитор гена или продукта гена пути DDR.

В одном варианте осуществления агент для снижения уровней одного или более продуктов генов пути DDR представляет собой ингибитор BRCA1, BRCA2, ATM и/или  
15 ATRX.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

Фиг. 1. Двойной скрининг на потерю функции с использованием CRISPR определил DDR как приоритетный путь сенсбилизации к соединению 1. (A) данные Horizon CRISPR: Сетевой анализ совпадений CRISPR показал обогащение пути анемии Фанкони  
20 (биоинформатический анализ Horizon). (B) Анализы обогащения набора генов (GSEA) показали обогащение других путей DDR (биоинформатический анализ собственными силами). (C) Сигнатура экспрессии гена стресса репликации в линиях апоптотических клеток мезотелиомы.

Фиг. 2. Мутации ATM связаны с повышенной чувствительностью к соединению 1. (A)  
25 Линии клеток с мутантным ATM в значительной степени зависят от MDM2 по сравнению с линиями клеток с ATM дикого типа на основе общедоступных данных DerMAP RNAi (версия 20Q4). (B) Статус мутации ATM в линиях апоптотических и неапоптотических клеток мезотелиомы. (C) Снижение пролиферации в клеточных линиях с мутантным ATM. (D) Индукция апоптоза в клеточных линиях с мутантным  
30 ATM. (E) Модуляция передачи сигналов DDR в клеточных линиях с мутантным ATM.

(F) Таблица, обобщающая снижение пролиферации в отношении полученных от пациента органоидов с мутантным BRCA1, BRCA2 и ATM. (G) Снижение пролиферации в мутантном BRCA2, полученном из рака молочной железы, по сравнению с органоидом BRCA2 дикого типа, полученным от пациента.

5 Фиг. 3. ATRX представляет собой дополнительное совпадение из анализа панели клеток. Биоинформатический анализ данных панели клеток с учетом только линий клеток P53 дикого типа с использованием всех показаний вместе. Метод дисперсионного анализа использовали для выявления ассоциации геномных характеристик с чувствительностью к соединению 1. Потерю ATRX прогнозировали как в значительной степени связанную с чувствительностью. (A) Диаграмма рассеяния (результаты дисперсионного анализа предиктивных биомаркеров чувствительности/резистентности). (B) Коробчатая диаграмма областей активности линий клеток с потерей ATRX и с ATRX дикого типа.

15 Фиг. 4. Статус и чувствительность микросателлитной нестабильности (MSI). (A) Таблица с перечислением областей активности и мутационной нагрузки опухоли линий раковых клеток MSI-H в панели клеток. (B) Снижение пролиферации в линии раковых клеток MSI-H от различных показаний. (C) Снижение пролиферации в шести органоидах, полученных от пациента с колоректальным раком MSI-H. (D) Эксперимент по эффективности *in vivo*, демонстрирующий снижение роста опухоли в модели ксенотрансплантата колоректального рака MSI-H.

20 Фиг. 5. Краткий обзор основных путей DDR, подготовленный на основе Razqallah Nakem, EMBO J (2008) 27:589-605. Рамками выделены пути репарации ДНК, в которых конкретные биомаркеры были определены авторами изобретения как маркеры чувствительности к антагонизму к MDM2.

25 Фиг. 6. Порошковая рентгеновская дифрактограмма (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.

30 Фиг. 7. ДСК-снимок (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.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термины «ингибитор MDM2» и «антагонист MDM2» используются как синонимы и определяют соединения MDM2 или аналоги соединений MDM2, описанные в настоящем документе, включая их ионы, соли, сольваты, изомеры, таутомеры, N-оксиды, сложные эфиры, пролекарства, изотопы и защищенные 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 настоящем документе и выше.

«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 средству, которое блокирует или ослабляет опосредованные агонистом биологические ответы. 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 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 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.

«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.

В контексте настоящего документа подразумевается, что термин «опосредованный», используемый, например, в сочетании с MDM2/p53, как описано в настоящем документе (и применяемый, например, к различным физиологическим процессам, заболеваниям, состояниям, патологическим состояниям, вариантам терапии, способам лечения или вмешательствам), функционирует ограничительно в том смысле, что упомянутый 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, которую играет 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, aberrantные уровни функции, например, избыточная или недостаточная экспрессия) не 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 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 устойчивости к любому конкретному лекарственному средству или методу лечения рака.

Термин «лечение», используемый в настоящем документе 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 достигается некоторый необходимый терапевтический эффект, например, ингибирование прогрессирования патологического состояния, и включает в себя

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

В контексте настоящего 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  
10 профилактике или предотвращению, будь то у человека или животного (например, в ветеринарии), в ходе которых достигается 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  
15 одного или нескольких симптомов заболевания или снижение вероятности возникновения заболевания.

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

20 Комбинации по изобретению могут оказывать терапевтически эффективное 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  
25 времени до прогрессирования заболевания, увеличение 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  
30 терапевтический эффект. «Синергетический» эффект в контексте настоящего изобретения относится к создаваемому комбинацией терапевтическому эффекту,

который превышает сумму терапевтических эффектов агентов комбинации при их раздельном введении. «Аддитивный» эффект в контексте настоящего изобретения относится к создаваемому комбинацией терапевтическому эффекту, который больше терапевтического эффекта любого из агентов комбинации при их раздельном введении.

- 5 В контексте настоящего 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 настоящем документе на «клинический ответ» относятся к
- 10 показателю положительного клинического ответа 50% или более. «Частичный ответ» определяется в настоящем документе как показатель положительного клинического ответа менее 50%.

В контексте настоящего документа термин «комбинация» применительно к двум или более соединениям и/или агентам предназначен для определения материала, в котором

15 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:

- 20
- 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, посредством сшивания, молекулярной агрегации или связывания с фрагментом общего носителя);
- 25
- 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);

Примеры нефизически ассоциированных комбинированных соединений/агентов  
5 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;
- 10 • 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,  
15 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  
20 соединений/агентов.

В контексте настоящего документа термин «комбинированная терапия» предназначен для определения методов лечения, которые включают применение комбинации двух или более соединений/агентов (по определению выше выше). Таким образом, ссылки на «комбинированную терапию», «комбинации» и применение соединений/агентов «в  
25 комбинации» в данной заявке могут относиться к соединениям/агентам, которые вводятся как часть одной и той же общей схемы лечения. По существу, фармакология каждого из двух или более соединений/агентов может различаться: каждое из них может быть введено в один и тот же момент времени или в разное время. Поэтому следует понимать, что соединения/агенты комбинации можно вводить последовательно  
30 (например, до или после) или 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.

В контексте настоящего 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), все из которых необязательно 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.

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

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Данное изобретение основано на идентификации биомаркеров, которые позволяют 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

настоящего документа термин «сопутствующая диагностика» 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 биомаркеры идентифицируют пациента, который будет демонстрировать ответ, и таким образом позволяют различать демонстрирующих и не демонстрирующих ответ. В другом варианте осуществления биомаркеры идентифицируют 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 или активности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25 или более биомаркеров, идентифицированных в настоящем документе. Это может быть определено прямо или косвенно, как описано 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 описании предложены биомаркеры, которые указывают на повышенную чувствительность раковых клеток к лечению антагонистом MDM2. Следовательно, идентификация одного или более идентифицированных биомаркеров позволяет отобрать больного раком пациента для лечения антагонистом MDM2.

Биомаркеры представляют собой гены пути ответа на повреждение ДНК (DDR). Не обязательно один или более генов-биомаркеров DDR могут происходить из одного или более из следующих путей: HR, NHEJ, MMR, FA и/или BER. Не обязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA1. Не обязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) BRCA2. Не обязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATM. Не обязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR содержит (-ат) ATRX. Не обязательно один или более биомаркеров DDR находятся в

пределах пути FA. Необязательно если один или более из биомаркеров DDR находятся в пути MMR, истощение упомянутого одного или более биомаркеров идентифицируется посредством MSI (как правило, MSI-High) и/или высокой мутационной нагрузки опухоли. Необязательно измеренный (-ые) биомаркер или биомаркеры DDR  
 5 содержит (-ат) MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 MLH3, POLE и/или POLD1. Необязательно рак включает мутационную сигнатуру SBS6 или SBS26, ассоциированную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1.

### **Ответ на повреждение ДНК (DDR)**

10 Клетки непрерывно подвергаются воздействию различных генотоксических воздействий и могут отвечать большим разнообразием поражений ДНК посредством нескольких механизмов репарации ДНК, многие из которых вовлекают p53. Ошибочная репарация ДНК может приводить к мутациям и хромосомным aberrациям, которые могут изменять функции генов-супрессоров опухоли или онкогенов, таким образом  
 15 приводя к развитию рака.

В качестве центрального супрессора опухоли p53 защищает геном посредством управления различными механизмами ответа на повреждение ДНК (DDR) (как описано в Williams and Schumacher, p53. DNA-Damage- Repair Process, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2016, 1-15). Важно отметить, что ответ p53 является ключевым  
 20 фактором при определении того, будет ли клетка подвергаться апоптозу или остановке клеточного цикла после повреждения ДНК.

Экцизионная репарация нуклеотидов (NER) удаляет множество искажающих спираль поражений, обычно индуцируемых УФ-излучением, тогда как эксцизионная репарация оснований (BER) нацелена на окислительные модификации оснований. Репарация  
 25 ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR) исправляет нуклеотиды, которые были ошибочно вставлены во время репликации. Двухцепочечные разрывы ДНК, которые, как правило, индуцируются облучением, вместо этого устраняются либо посредством негомологичного соединения концов (NHEJ), либо посредством гомологичной рекомбинации (HR).

30 В публикации Brown *et al.* Targeting DNA repair in cancer: beyond PARP inhibitors, Cancer Discovery, 2017, 20-37 рассматриваются пути DDR. Путь NER удаляет поражения,

деформирующие спираль, из ДНК, в частности, УФ-индуцированные фотопоражения (Brown *et al.* 2017). Он включает удаление короткого олигонуклеотида, включая поврежденный очаг поражения, с использованием специфичных для структуры эндонуклеаз и последующее восстановление последовательности ДНК посредством ДНК-полимераз. Гены, участвующие в пути NER, включают XPC, DDB2, CSA, XPA, RPA, XPG, ERCC1, POLE, POLD1, LIG1 и LIG3.

ДНК-гликозилазы в пути BER распознают и удаляют поврежденные основания, приводящие к основным сайтам, которые обрабатываются APE1. Путь BER ведет к одноцепочечному разрыву (SSB), который восстанавливается с использованием пути репарации SSB. PARP1 представляет собой сенсорный белок, сигнализирующий о повреждениях ДНК при разрывах цепи ДНК в пути репарации SSB. PARP1 локализуется в сайтах повреждения ДНК, образуя протяженные цепи поли-АДФ-рибозы. Рибозилированный PARP1 способствует рекрутингу белков репарации SSB в сайты повреждения ДНК. Гены, участвующие в путях репарации BER и SSB, включают ДНК-гликозилазы, APE1, PARP, XRCC1, PNKP, POL $\beta$ , FEN1, TDP1, апратаксин, LIG1 и LIG3A.

MSH2, MSH3 и MSH6 распознают несоответствия между основаниями и петли вставок/делений (Brown *et al.* 2017). MSH2, MSH3 и MSH6 осуществляют рекрутинг MLH1 и PMS2 в поврежденные сайты. Посредством скоординированных действий белки MMR взаимодействуют с EXO1 для удаления несоответствия, а затем с POLD и LIG1 для заполнения зазора и уплотнения упомянутого слоя соответственно. Гены, участвующие в MMR, включают MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2, EXO1, POLD и LIG1. Дефицит репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (dMMR) связан с высокочастотной микросателлитной нестабильностью (H-MSI); Тестирование на dMMR можно выполнять с помощью ИГХ.

Классический NHEJ (c-NHEJ) представляет собой преобладающий путь репарации DSB ДНК в клетках человека, функционирующий на протяжении всего клеточного цикла (Brown *et al.* 2017). Он включает относительно быстрое лигирование разорванных концов ДНК, опосредованное ключевым комплексом NHEJ, включающим ДНК-ПК, XRCC4, LIG4, XLF и PAXX. Перед тем, как сможет произойти лигирование, может потребоваться обработка концов ДНК и воздействие ДНК-полимеразы, что делает NHEJ

по своей природе подверженной ошибкам. NHEJ поддерживает стабильность генома посредством быстрой репарации DSB в условиях, когда вызывающие рекомбинацию явления, вероятно, могут привести к крупным хромосомным перестройкам, например, в клетках в фазе покоя или в фазе G1. Гены, участвующие в NHEJ, включают Ku70/Ku80, DNA-ПК, XRCC4, XLF, LIG4, APLF, Artemis, PAXX, WRN и ATRX.

Альтернативный NHEJ (Alt-NHEJ или MMEJ) представляет собой путь лигирования для DSB при генетическом нарушении с-NHEJ (Brown *et al.* 2017). Он возникает после ограниченной резекции концов ДНК и вносит вклад в чрезмерные геномные делеции и хромосомные перемещения, наблюдаемые в опухолях. Он также может обеспечить резервный путь репарации в HR-дефицитных клетках. Гены, участвующие в Alt-NHEJ, включают PARP, XRCC1, LIG3, LIG1, CtIP и POLQ.

HR является относительно медленным и ограниченным поздней фазой S / фазой G2, поскольку он обычно основан на цепи ДНК гомологичной сестринской хроматиды для репарации (Brown *et al.* 2017). Обширная резекция концов ДНК посредством геликаз и экзонуклеаз, таких как DNA2, BLM, WRN и EXO1, приводит к образованию выступов 3'-ssDNA, что приводит к репарации разрыва посредством HR. Белок репликации А (RPA), с помощью BRCA1 и PALB2, загружает RAD51 на ssDNA, покрытый RPA, что приводит к встраиванию в цепь, с рядом факторов, отрицательно регулирующих этот процесс для предотвращения гиперрекомбинации, таких как POLQ, PARI, RECQL5, FANCI и BLM. Гены, участвующие в HR, включают MRN, ATM, ATR, MK2, CtIP, BRCA1, BARD1, BRCA2, PALB2, RPA, RAD51, MUS81/EME1, SLX1/SLX4, RTEL1, BLM, TOPBP1, POLQ, PARI, RECQL5, FANCI, BLM.

Путь анемии Фанкони (FA) участвует в репарации межцепочечных поперечных сшивков. Молекулярные данные пути FA описаны в публикации Niraj *et al.* The Fanconi anemia pathway in cancer, *Annu. Rev. Cancer Biol.* 2019. 3:457-78). Ядерный комплекс FA включает FANCA, FANCG, FANCB, FANCL, UBE2T (FANCT) FANCF, FANCC, FANCE, FANCM, REV1, REV7 и REV3. Он также включает ряд белков, ассоциированных с анемией Фанкони (FAAP). Мутации или делеции в генах ядерного комплекса или в FAAP входят в объем настоящего изобретения.

Дефицит DDR обнаруживается в ~13% всех видов рака, причем более высокие частоты возникновения в определенных типах опухолей включают рак поджелудочной железы

(> 35%), мочевого пузыря (35%), предстательной железы (33%), яичника (24%) и трижды негативный рак молочной железы (16%).

### **Скрининг на потерю функции с использованием CRISPR определил DDR как приоритетный путь сенсibilизации к антагонисту MDM2**

5 В приведенных ниже примерах описан двойной CRISPR-скрининг в панели из трех линий клеток рака легкого P53 дикого типа в присутствии или в отсутствие соединения 1 для идентификации новых предиктивных биомаркеров чувствительности к антагонисту MDM2.

Несколько генов, связанных с ответом на повреждение ДНК (DDR), были  
10 идентифицированы как приоритетные результаты (Фиг. 1A-B). Интересно, что эти гены участвуют в нескольких путях DDR, таких как пути гомологичной рекомбинации, анемии Фанкони (FA), эксцизионной репарации оснований и стресса репликации. Следует отметить, что путь стресса репликации представляет собой считывание геномной нестабильности и вызывается множеством дефектов в пути DDR, что  
15 приводит к высоким уровням повреждения ДНК (что, в свою очередь, влияет на процесс репликации ДНК). Эти данные свидетельствуют о том, что опухоли с дефектами в их механизме DDR могут быть по существу более чувствительными к лечению антагонистом MDM2.

Чтобы подтвердить этот результат, клетки мезотелиомы человека ранних пассажей, ранее  
20 охарактеризованные их чувствительностью к соединению 1, были использованы для идентификации транскриптомных сигнатур, дифференциально экспрессируемых между апоптотическими и неапоптотическими образцами. Сигнатура «стресса репликации» сильно обогащалась в линиях апоптотических клеток мезотелиомы, подтверждая связь между чувствительностью к соединению 1 и активированными путями DDR (Фиг. 1C).

25 Связь между антагонистом MDM2 и дефектами в множественных путях DDR была определена с помощью двойного CRISPR-скрининга. После CRISPR-скрининга биоинформатический анализ и анализ «мокрым путем» в нескольких системах облегчали определение конкретных биомаркеров в пределах DDR. Эта дополнительная валидация результатов подтверждает дефициты DDR, которые указывают на  
30 чувствительность к лечению антагонистом MDM2.

В качестве наглядного обобщения на Фиг. 5 перечислены основные пути DDR. Рамками выделены пути репарации ДНК, в которых конкретные биомаркеры были определены авторами изобретения как маркеры чувствительности к лечению антагонистом MDM2.

### **Путь HR. Изменения BRCA1, BRCA2 и ATM**

5 Гены, участвующие в пути гомологичной рекомбинации, были определены при CRISPR-скрининге. Гомологичная рекомбинация (HR) представляет собой безошибочный путь репарации DSB, который в значительной степени ограничен S- и G2-фазами клеточного цикла. Огромное значение пути HR для поддержания генома продемонстрировано посредством идентификации нескольких подавляющих рак  
10 мутаций в BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, RAD50, RAD51C при многочисленных видах рака.

Одним из центральных компонентов HR является серин-треонин-киназа, мутантный при атаксии-телеангектазии белок (ATM), который фосфорилирует множество ключевых участников в различных ветвях DDR. Соматические мутации или делеции ATM обычно  
15 встречаются в лимфоидных злокачественных новообразованиях, а также в некоторых солидных опухолях, что приводит к потере экспрессии белка и нарушению репарации двухцепочечных разрывов ДНК в геноме.

Биоинформатический анализ общедоступных данных DepMAP RNAi (версия 20Q4) для MDM2 предсказывал, что линии клеток с мутантным ATM значительно больше зависят  
20 от MDM2 по сравнению с линиями клеток с ATM дикого типа (Фиг. 2A). Дополнительно сильное обогащение мутацией ATM было обнаружено в полученных от пациентов линиях апоптотических клеток мезотелиомы (6/9) по сравнению с неапоптотическими линиями, все из которых представляют собой ATM дикого типа (6/6) (Фиг. 2B).

Кроме того, *in vitro* валидация на четырех линиях клеток с мутантным ATM из разных  
25 показаний (HCC1500 — молочная железа, LNCap — предстательная железа, HT-144 — меланома, HepG2 — печень) показали чувствительность к соединению 1, определенную по снижению пролиферации клеток (Фиг. 2C), в то время как данные по LNCap (предстательная железа) и HepG2 (печень) показали чувствительность к соединению 1, определенную по повышенному апоптозу (Фиг. 2D). Кроме того, анализ методом  
30 вестерн-блоттинга показал четкое модулирование сигнального пути DDR при лечении соединением 1 (Фиг. 2E).

Вместе с идентификацией мутаций ATM в качестве биомаркера для чувствительности к антагонисту MDM2 дополнительный биоинформатический анализ указывает на то, что потеря или мутация других генов пути HR может действовать в качестве биомаркеров для чувствительности к антагонисту MDM2. Гены пути HR, которые могут действовать в качестве биомаркеров терапии антагонистами MDM2, включают, без ограничений, BRCA1 и/или BRCA2.

В одном варианте осуществления дефект в репарации путем гомологичной рекомбинации включает потерю BRCA1 или BRCA2. В одном варианте осуществления рак демонстрирует BRCA-подобность. Опухоли с потерей канонической HRR, отличной от потери BRCA1/2, демонстрируют BRCA-подобность (Trends in Cell Biology, September 2019, Vol. 29, No. 9, pg 740).

Для подтверждения того, что мутации ATM, BRCA1 и/или BRCA2 (или потеря экспрессии) могут быть связаны с чувствительностью к антагонисту MDM2, дополнительно проводили валидацию *in vitro* на органоидах, полученных от пациента (PDO). 4 PDO из различных показаний с изменениями ATM, BRCA1 и/или BRCA2 демонстрировали чувствительность к соединению 1, что было измерено по снижению пролиферации клеток (Фиг. 2F-G). Следует отметить, что 4 дополнительные PDO из тех же показаний, но без изменений ATM, BRCA1 и/или BRCA2, были устойчивыми к соединению 1.

## 20 Путь FA

Гены пути FA также представлены в качестве биомаркеров терапии антагонистами MDM2.

Двойной CRISPR-скрининг (CRISPR-нокаут и CRISPRi) идентифицировал гены, вовлеченные в путь анемии Фанкони (FA). На Фиг. 1A показано обогащение пути анемии Фанкони в результатах CRISPR.

Данные скрининга CRISPR показывают, что опухоли с дефектами в пути FA по существу чувствительны к лечению соединением 1.

Таким образом, эти данные демонстрируют связь между чувствительностью к антагонисту MDM2 и дефектами в пути анемии Фанкони. Таким образом, потеря функции в пути FA является биомаркером чувствительности к антагонисту MDM2.

### **Путь NHEJ. Потеря ATRX**

Кроме того, биоинформатический анализ данных панели клеток предсказывал потерю ATRX в качестве значимого биомаркера чувствительности к соединению 1 MDM2 (Фиг. 3). ATRX также участвует в регуляции DDR как посредством негомологичного соединения концов (NHEJ), так и посредством репарации путем гомологичной рекомбинации (HRR).

Идентификация мутаций ATRX в качестве биомаркера для терапии антагонистом MDM2 и дополнительный биоинформатический анализ указывают на то, что потеря или мутация других генов пути NHEJ или HRR может действовать в качестве биомаркеров для чувствительности к антагонисту MDM2.

### **Путь MMR. Микросателлитная нестабильность (MSI)**

Микросателлиты представляют собой области, которые содержат множественные повторы от 1 до 5 пар оснований, которые широко диспергированы по всему человеческому геному. В нормальных клетках количество повторов микросателлитов подтверждается и поддерживается во время деления клеток посредством репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR). Нарушение системы MMR может сделать клетки неспособными регулировать длину их микросателлитов во время деления клеток, что называется MSI (микросателлитной нестабильностью). MSI часто наблюдается при нескольких типах рака (аденокарциномах толстой кишки, эндометрия и желудка), и было показано, что MSI-High колоректальные опухоли являются более восприимчивыми к иммуностимулирующей терапии.

Информация о микросателлитной стабильности и мутационной нагрузке опухоли для линий клеток была получена из базы данных паспортов клеточных моделей по Сэнгеру. Мы обнаружили, что линии клеток MSI-H демонстрировали высокую мутационную нагрузку опухоли (мутации/Mb) и были обогащены мутациями, связанными с путем репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК (например, MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS2). Кроме того, линии клеток MSI-H продемонстрировали сильное обогащение мутационных сигнатур, связанных с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК и мутациями POLD1 и/или POLE (Фиг. 4A). Вместе эти результаты были согласованными и указывали, что опухоли MSI, такие как опухоли толстой кишки, эндометрия и желудка, будут чувствительны к антагонистам MDM2.

Кроме того, валидация *in vitro* восьми линий клеток MSI-H из разных показаний продемонстрировала чувствительность к соединению 1, измеренную по снижению пролиферации клеток (Фиг. 4B). Для подтверждения того, что статус MSI-H может быть связан с чувствительностью к антагонисту MDM2, дополнительно проводили валидацию *in vitro* на органоидах, полученных от пациента (PDO). 6 PDO колоректального рака MSI-H продемонстрировали чувствительность к соединению 1, измеренную по снижению эффективности пролиферации клеток (Фиг. 4C). Данные эффективности *in vivo* подтвердили, что соединение 1 существенно ингибирует рост опухоли в модели ксенотрансплантата колоректального рака MSI-H (HCT-116) (Фиг. 4D).

### **Путь эксцизионной репарации оснований (BER)**

Анализ CRISPR-скрининга выявляет сильную корреляцию между путем BER и чувствительностью антагониста к MDM2 (Фиг. 1). Биомаркер DDR может содержать один или более генов пути BER.

### **Биомаркеры и комбинации**

Для удобства пользования биомаркеры согласно настоящему описанию могут быть охарактеризованы в пяти группах:

- a. Путь HR, например, истощение BRCA1, BRCA2 и/или ATM.
- b. Путь NHEJ, например, потеря ATRX.
- c. Путь MMR, например, MSI-H (опухоли с микросателлитной нестабильностью и характеризующиеся высокой мутационной нагрузкой опухоли).
- d. Путь FA.
- e. Путь BER.

В некоторых вариантах осуществления определяют один биомаркер. Он может относиться к любой из групп a), b), c), d) или e).

В некоторых вариантах осуществления определяют несколько биомаркеров, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более биомаркеров. Они могут содержать или состоять из нескольких биомаркеров из одной группы (т. е. группы b) или группы c)) или могут содержать или состоять из одного или более биомаркера из разных групп, например:

- 0, 1, 2 или более из группы а; и 0, 1, 2 или более из группы b); и 0, 1, 2 или более из группы с); и с группой d) или группой e); или
- 0, 1, 2 или более из группы b); и 0, 1, 2 или более из группы с) и с группой d); или
- 5 - 2 или более из группы b); 2 или более из группы с); с группой d) или без нее; или
- 0, 1, 2 или более из группы а); 0, 1, 2 или более из группы b); 0, 1, 2 или более из группы с), 0, 1, 2 или более из группы d); и 0, 1, 2 или более из группы e).

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

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

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

Биомаркеры можно определить с помощью соответствующих методик, которые  
 25 известны специалисту в данной области. Биомаркеры можно определять с помощью прямых или непрямых методик. Экспрессию генов можно обнаружить посредством обнаружения мРНК-транскриптов. Белковые биомаркеры можно выявлять с помощью иммуногистохимии.

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

уровню функции. Функцию одного или более биомаркеров можно определять прямо или непрямо.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии или активности можно сравнивать с пороговым значением, отражающим таким же образом уровень экспрессии или активности, 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 описанием, 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 предложены один или более биомаркеров на пониженном уровне. Как правило, сравнение проводят с нормальными здоровыми людьми, чаще с нераковыми клетками того же типа, что и раковая клетка.

Снижение уровня биомаркера может представлять собой истощение самого гена, например, посредством крупной хромосомной перестройки или другой генетической аномалии, что приводит к потере гена пути DDR в геноме раковой клетки. Это, безусловно, также приведет к истощению продукта и активности гена.

Снижение уровня биомаркера может представлять собой снижение экспрессии продукта гена.

Снижение уровня биомаркера может также представлять собой уменьшение активности, например, вызванной мутацией с потерей функции. Мутация с потерей функции может рассматриваться как истощение продукта гена дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления повышенные или пониженные уровни биомаркеров определяют относительно нераковых клеток от одного и того же индивида, обычно нераковых клеток того же типа от одного и того же индивида.

В дополнительных вариантах осуществления повышенные или пониженные уровни биомаркеров определяют относительно лабораторных стандартов и значений на основании известного нормального значения для популяции. Как правило, известные уровни берут из нераковой клетки.

- 5 В других вариантах осуществления повышенные или пониженные уровни биомаркеров приведены относительно известных значений у нормальных (не больных раком) индивидов. Например, GTE<sub>x</sub> представляет собой ресурс данных по генной экспрессии нормальных здоровых людей из 44 различных тканей, как обсуждается в другом месте данного документа.
- 10 В некоторых других вариантах осуществления повышенные или пониженные уровни биомаркеров оценивают относительно уровня, определенного в раковых образцах от субъектов, не восприимчивых к ингибитору MDM2, или в раковом образце от субъекта, не восприимчивого к ингибитору MDM2. Это может быть в особенности применимо для одного или более биомаркеров сигнатуры IFN.
- 15 В одном варианте осуществления уровень РНК одного или более биомаркеров DDR снижен по сравнению с количеством упомянутой РНК в контрольном образце, полученном от здорового субъекта без рака.  
В альтернативном варианте осуществления уровень РНК одного или более из биомаркеров DDR снижен по сравнению с количеством упомянутой РНК в более раннем  
20 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 ULN).
- 25 В одном варианте осуществления уровень по меньшей мере одного из биомаркеров имеет площадь под кривой (AUC) при раке по сравнению с контрольным образцом, большую (в случае повышенных биомаркеров) или меньшую (в случае истощенных биомаркеров) в 0,5 раза относительно (a) уровня по меньшей мере одного из биомаркеров в образце из ткани или от человека без рака, или (b) уровня одного или более контрольных белков в образце от субъекта. Необязательно AUC меньше или больше 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 (a) уровня одного или более биомаркеров в образце из ткани или от человека без рака, или (b) уровня одного или более контрольных белков в образце от субъекта с раком.

В некоторых вариантах осуществления контроль для сравнения представляет собой образец, полученный от здорового пациента, или образец нераковой ткани, полученный от пациента с диагнозом рака, такой как образец нераковой ткани из того же органа, в котором находится опухоль (например, нераковая ткань толстой кишки может служить контролем для рака толстой кишки). 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 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.

### **Раковые заболевания**

Рак, презентующий один или более идентифицированных биомаркеров, имеет повышенную вероятность успешного лечения антагонистом MDM2. Рак, подлежащий лечению, не является конкретным образом ограниченным при условии, что он презентует один или более биомаркеров.

Рак обычно представляет собой p53 дикого типа. Как известно в данной области, 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.

Данные, представленные в примерах, были получены из ряда раковых тканей, включая толстую кишку, кровь, молочную железу, легкие, предстательную железу, печень, кожу, яичники и поджелудочную железу. В одном варианте осуществления рак представляет собой рак легких. В одном варианте осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В другом варианте осуществления рак представляет собой гемобластоз. В дополнительном варианте осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак легкого. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак кожи, например меланому или карциному. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак яичника. В другом варианте осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рак головного мозга, светлоклеточную карциному почки (ccRCC), рак пищевода или меланому.

Конкретные виды рака, которые можно оценивать для лечения в соответствии с изобретением, включают, без ограничений, мезотелиому, немелкоклеточную карциному легкого (НМРЛ), глиобластому (например, GBM) и рак почки (например, светлоклеточную карциному почки (KIRC)).

Конкретные виды рака, которые можно оценивать для лечения в соответствии с изобретением, включают, без ограничений, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), плоскоклеточную карциному или опухоли головы, шеи, кожи, желудочно-кишечной системы или половой системы.

Конкретные виды рака, которые можно оценивать для лечения в соответствии с изобретением, включают, без ограничений, рак предстательной железы, яичника, молочной железы и гинекологический рак.

Конкретные виды рака, которые можно оценивать для лечения в соответствии с изобретением, включают, без ограничений, рак толстой кишки, рак желудка и гинекологический рак.

Конкретные виды рака, которые можно оценивать для лечения в соответствии с изобретением, включают рак молочной железы, яичника, предстательной железы и

поджелудочной железы, в частности, дефектный по DDR рак молочной железы, яичника, предстательной железы и поджелудочной железы.

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 осуществления значение IC50 составляет менее 100 нМ. Значения IC50 можно рассчитывать, например, используя программное обеспечение Graphpad Prism, как показано в примерах.

В некоторых вариантах осуществления антагонист MDM2 индуцирует апоптоз раковой клетки. Апоптоз обычно может быть опосредован активированной каспазой-3. Индукцию апоптоза можно определить посредством обнаружения клеток, которые положительны 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, 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 определенных вариантах осуществления 40% является надежным уровнем для идентификации сильной индукции апоптоза, причем > 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, например, 10%, 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 75% или более. Наборы для окрашивания в отношении активной каспазы-3 являются коммерчески доступными, например Cleaved Caspase-3 Staining Kit (Red) от Abcam (Cambridge, Великобритания) под номером в каталоге ab65617. Также можно использовать краситель Invitrogen Cell Event (C10423).

Краситель аннексин V также можно использовать для обнаружения апоптоза. Он был использован в примерах и хорошо известен в данной области как используемый краситель для обнаружения 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. Их определенная комбинация 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.

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, 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 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.

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.

Инактивация p53 посредством ряда механизмов является частым причинным событием в развитии и прогрессировании рака. К ним относятся инактивация посредством мутации, нацеливание онкогенными вирусами и, в значительной части случаев, амплификация и/или повышенная скорость транскрипции гена MDM2, что приводит к сверхэкспрессии или повышенной активации белка MDM2. Амплификацию гена MDM2, приводящая к сверхэкспрессии белка MDM2, наблюдали в образцах опухолей, взятых из обычных спорадических раков. В целом около 10% опухолей имели амплификацию MDM2, причем 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<sup>-/-</sup> 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 протеасомному 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.

Хотя MDMX демонстрирует сильную гомологию аминокислотной последовательности и структурную гомологию по отношению к MDM2, ни один из белков не может заменить потерю другого; Нулевые по MDMX мыши погибают во время внутриутробного развития, тогда как нокаут MDM2 является летальным во время

раннего эмбриогенеза, однако оба могут быть восстановлены посредством нокаута p53, что демонстрирует зависимость летальности от p53. 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.

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 предсуществующих сигналов повреждения ДНК или онкогенной активации, которые ранее были заблокированы действием MDM2 на 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 отрицательным 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.

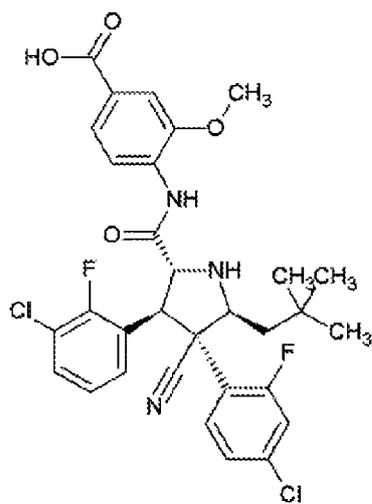
Опухоли с высоким уровнем амплификации MDM2 включают липосаркому (88%), саркому мягких тканей (20%), остеосаркому (16%), рак пищевода (13%) и некоторые злокачественные новообразования у детей, включая В-клеточные злокачественные новообразования.

### **Примеры антагонистов MDM2**

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой агент, который модулирует MDM2, например, малую молекулу, антисмысловую нуклеиновую кислоту, антитело или нуклеиновую кислоту, которая ингибирует экспрессию MDM2. В одном варианте осуществления агент MDM2 представляет собой малую молекулу. В одном

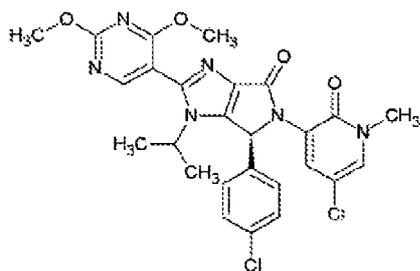
варианте осуществления агент MDM2 представляет собой малую молекулу, как подробно описано в настоящем документе.

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) имеет следующую структуру:



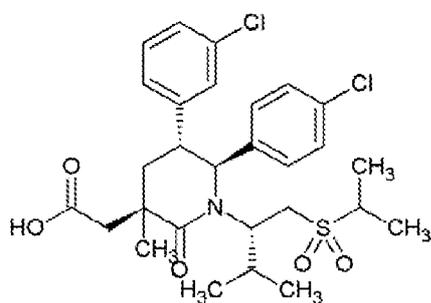
Идасанутлин (RG-7388) является коммерчески доступным или может быть получен, например, описанными в заявке на патент PCT WO 2014/128094, или аналогичными способами.

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 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, или аналогичными способами.

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

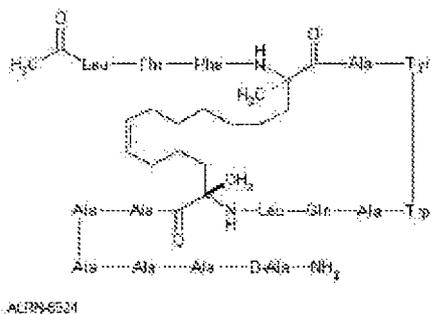


10

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

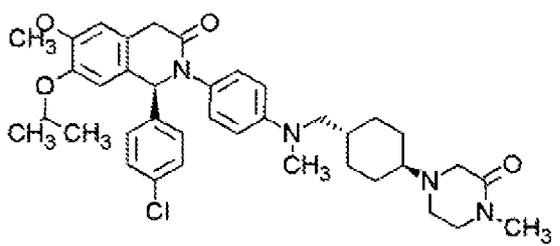
15 ALRN-6924 (SP-315), двойной пептидный антагонист MDM2 и MDM4, разрабатывается компаниями Aileron Therapeutics и Roche в рамках клинических испытаний фазы II в отношении внутривенного лечения солидных опухолей, мелкоклеточного рака легкого и опухолей у детей, включая лимфомы, острый миелоидный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, ретинобластому, 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 структуру:

20



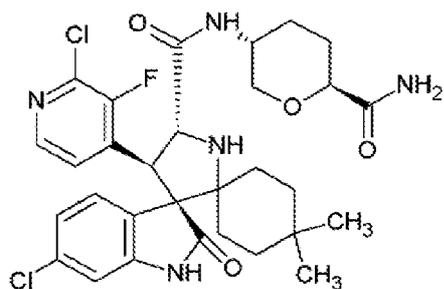
ALRN-6924 (SP-315) является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2017205786, или аналогичными способами.

- 5 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:



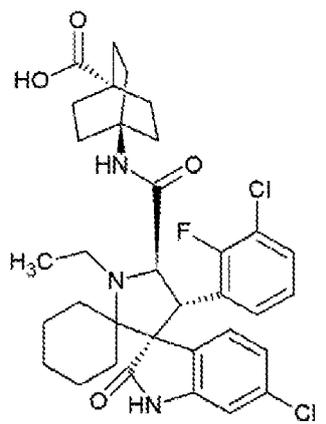
- 10 CGM-097 (NVP-CGM-097) является коммерчески доступным или может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2011076786, или аналогичными способами.

- 15 Миладеметана тозилат (DS-3032), низкомолекулярный антагонист MDM2, используемый по лицензии Rain Therapeutics и переименованный по коду исследования RAIN-32, разрабатывается компанией Daiichi Sankyo в рамках клинических испытаний фазы I для 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 В-крупноклеточной лимфомы. 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.

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



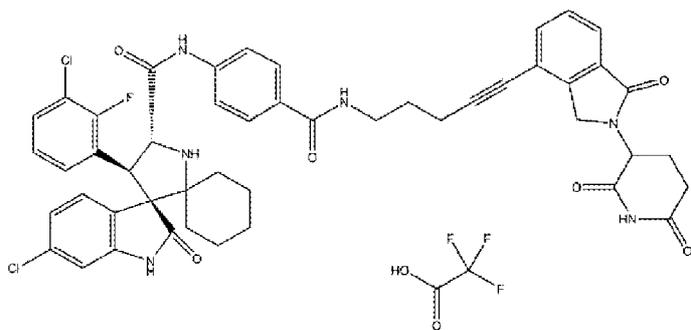
10

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.

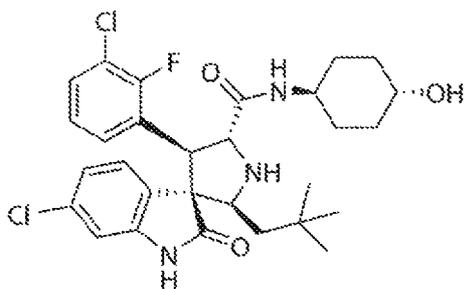
- 15 VI-907828, антагонист MDM2, разрабатывается VI в рамках клинических испытаний фазы I для лечения GBM, метастатической опухоли головного мозга, НМРЛ, саркомы мягких тканей и переходно-клеточной карциномы (уротелиально-клеточной карциномы).

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, индуцируя деградацию MDM2. Его структура представлена ниже и может быть получена, например, как описано в заявке на патент  
 5 PCT WO 2017/176957 или WO 2017/176958, или аналогичными способами. LE-004 имеет следующую химическую структуру

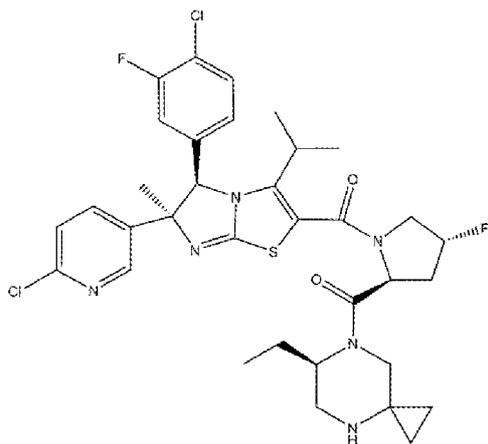


MI-773 (SAR405838) является высокоэффективным и селективным ингибитором MDM2, связывается с MDM2 с высокой специфичностью по сравнению с другими  
 10 белками и эффективно ингибирует рост клеток в линиях раковых клеток. SAR405838 эффективно индуцирует апоптоз и эффективно ингибирует рост клеток, а также индуцирует дозозависимый апоптоз и изучается в клинических испытаниях. Структура:



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

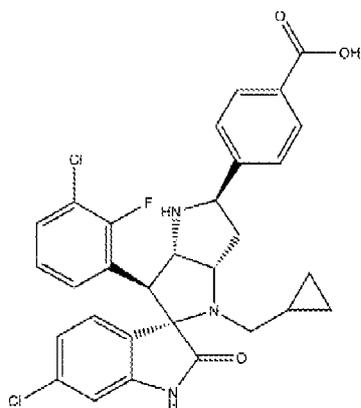
15 DS-5272 является антагонистом MDM2 и разрабатывается Daiichi Sankyo для перорального введения. Структура:



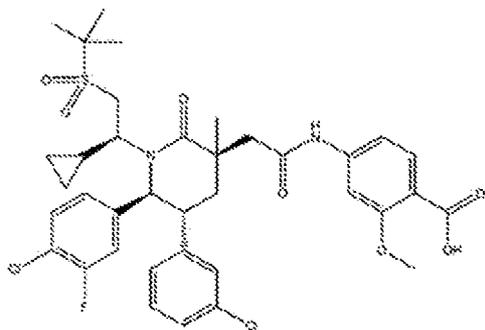
DS-5272 может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2015/033974, или аналогичными способами.

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

VI-0252 является антагонистом MDM2 и разрабатывается VI для перорального введения. VI-0252 ингибирует взаимодействия MDM2 и p53. Структура:

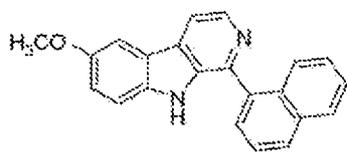


10 AM-7209 представляет собой антагонист MDM2 и разрабатывается Amgen в качестве резервного препарата для AMG-232. Структура:



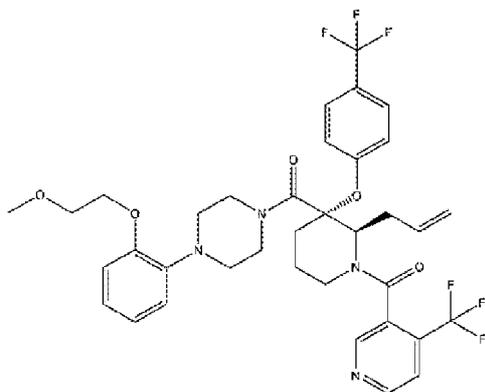
AM-7209 может быть получен, например, как описано в заявке на патент PCT WO 2014/200937, или аналогичными способами.

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



SP-141

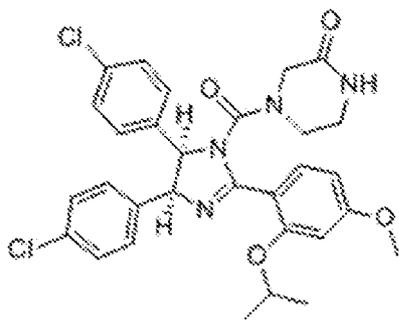
SCH-1450206 является антагонистом MDM2, который разрабатывается Schering-Plough & Merck для перорального введения. Одна типовая структура:



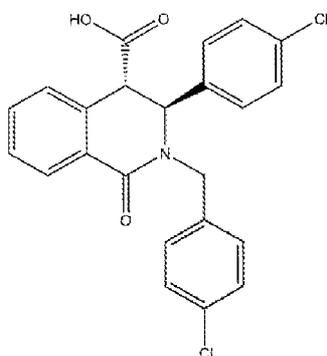
10 Цитарабин, также известный как МК-8242 и SCH-900242, представляет собой антиметаболитный аналог цитидина с модифицированным сахарным фрагментом (арабиноза вместо рибозы). Перорально биодоступный ингибитор гомолога double minute 2 человека (HDM2) с потенциальной противоопухолевой активностью, при пероральном введении ингибитор HDM2 МК-8242 ингибирует связывание белка HDM2  
15 с доменом активации транскрипции белка-супрессора опухоли p53. Посредством предотвращения этого взаимодействия HDM2-p53 можно ингибировать деградацию

p53, что может привести к восстановлению сигнализации p53. Это индуцирует p53-опосредованный апоптоз опухолевых клеток.

5 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:



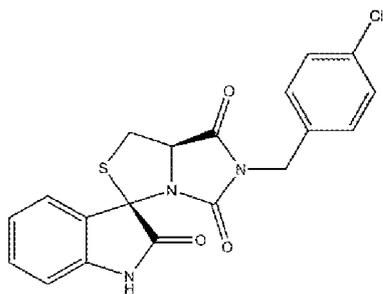
NXN-6 (NXN-7; NXN-552; NXN-561; NXN-11 является антагонистом MDM2, разрабатываемым Nexus, Priaхон и ВI для перорального введения. Типовая структура:



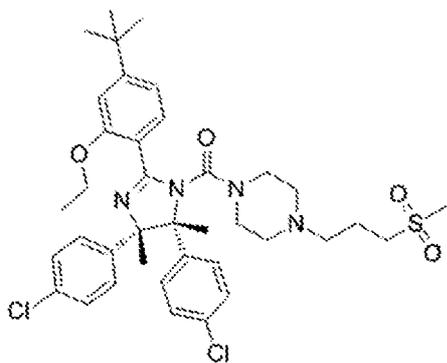
10 ADO-21 является антагонистом MDM2, разрабатываемым Adamed Group.

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:

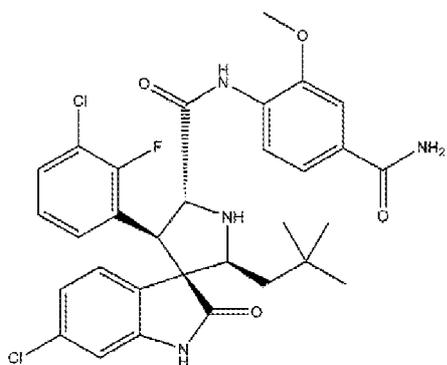


RG-7112 (RO5045337) представляет собой мощный, селективный, первый клинический, перорально активный и проникающий через гематоэнцефалический барьер ингибитор MDM2-p53. Структура:



5

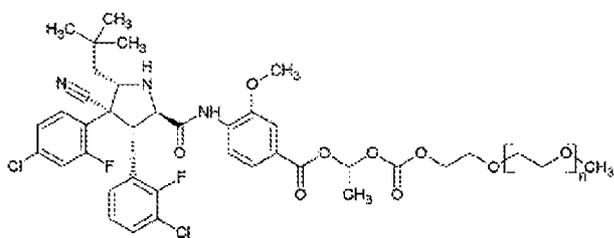
RO-8994 представляет собой низкомолекулярный антагонист MDM2, разрабатываемый Roche. Было показано, что RO-8994 ингибирует рост опухоли, вызывая митохондриальные эффекты p53. Структура:



10

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:

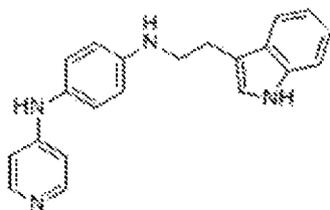


5

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

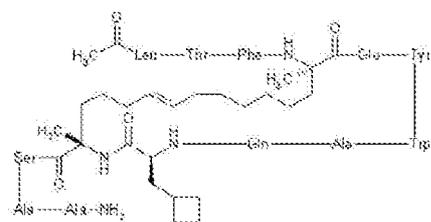
JNJ 26854165 (сердеметан) имеет структуру, приведенную ниже, как и пероральный ингибитор (или антагонист) HDM2, который показал сильную активность против клеток множественной миеломы (MM) *in vitro* и *ex vivo*; потенциальный агент для восстановления функции p53 и потенциального влияния на другие HDM2-зависимые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

10



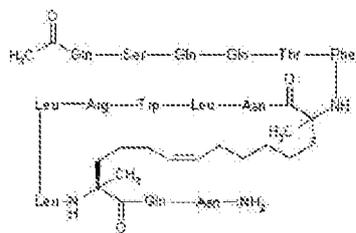
ATSP-7041 (SP-154), сшитый синтетический пептидный двойной антагонист MDM2 и MDM4, разрабатывается Aileron Therapeutics и Roche и находится на стадии доклинической разработки. ATSP-7041 (SP-154) имеет следующую структуру:

15



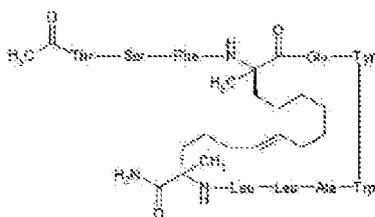
ATSP-7041

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-p53-8 имеет следующую структуру:



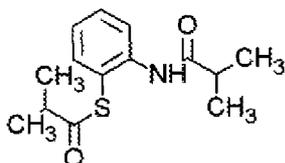
5 SAH-p53-8

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

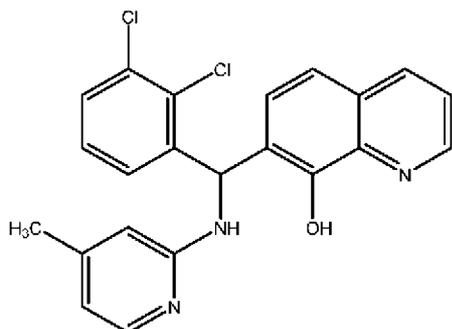


10 PM-2

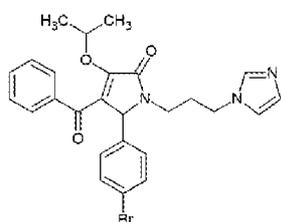
K-178 представляет собой низкомолекулярный антагонист MDM4, который разрабатывается Медицинским университетом Кансай и находится на стадии доклинической разработки. K-178 имеет следующую химическую структуру:



15 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:



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



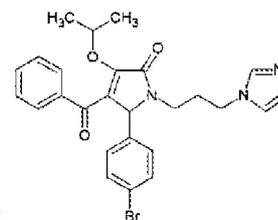
5

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.

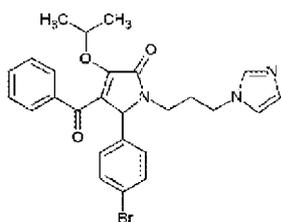
10

В одном варианте осуществления изобретения антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из идасанутлина, HDM-201, KRT-232, ALRN-6924, ALRN-6924, CGM-097, миладеметана тозилата, 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,



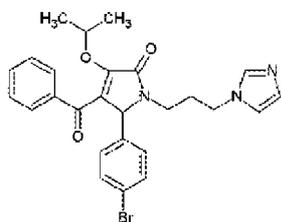
15 RO-6839921, ATSP-7041, SAH-p53-8, PM-2, K-178, MMRi-64 и , или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

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-1450206, NXN-6, ADO-21, CTX-50 - CTX-1, ISA-27, RO-8994, RO-6839921, ATSP-7041, SAH<sub>p</sub>53-8, PM-2, K-178, MMRi-64 и



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

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



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

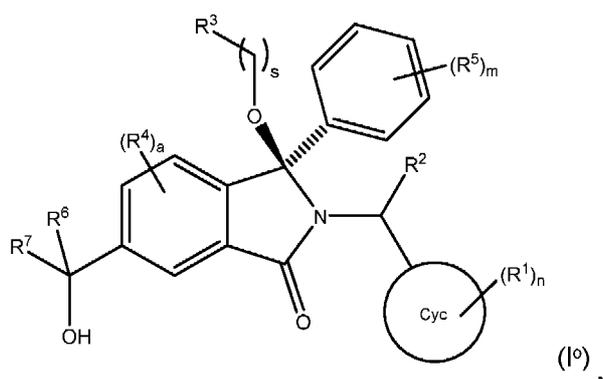
В одном варианте осуществления изобретения антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из идасанутлина (RG-7388), HDM-201, KRT-232 (AMG-232), ALRN-6924, MI-773 (SAR405838), миладеметана (DS-3032b), APG-115, BI-907828, или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

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

### Соединения формулы I<sup>o</sup>

Конкретными антагонистами MDM2 являются изоиндолиновые соединения, 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 настоящий документ посредством ссылки. В частности, 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 соединение формулы I<sup>o</sup>:



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

сус представляет собой фенил или гетероциклическую группу Het, которая представляет собой пиридинил, пиримидинил, пиразинил или пиридазинил, или их N-оксид;

$R^1$  независимо выбран из гидрокси, галогена, нитро, нитрила,  $C_{1-4}$  алкила, галоген  $C_{1-4}$  алкила, гидрокси  $C_{1-4}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{1-4}$  алкокси, галоген  $C_{1-4}$  алкокси,  $C_{2-4}$  алкинила,  $-O_{0,1}-(CR^xR^y)_v-CO_2H$ ,  $-(CR^xR^y)_v-CO_2C_{1-4}$  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  $-S(O)_d-N(R^8)_2$ , причем когда сус представляет собой Het,  $R^1$  присоединен к атому углерода;

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

s выбран из 0 и 1;

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

t выбран из 0 и 1;

q выбран из 0, 1 и 2;

- 5 при этом если  $R^3$  представляет собой  $-(A)t-(CR^xR^y)_q-X$ , то (i) по меньшей мере один из s, t и q отличен от 0, и (ii) если t представляет собой 0, то s представляет собой 1, а q отличен 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,  $-CN$ ,  $-OR^g$ ,  $-(CH_2)_v-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_v-CO_2C_{1-4}$  алкил,  $-S(O)_d-R^x$ ,  $-C(=O)-C_{1-4}$  алкил,  $-S(O)_d-N(H)_e(C_{1-4}$  алкил) $_2-e$ ,  $-NR^xR^y$ ,  $-NHSO_2R^x$ ,  $-NR^xCOR^y$  и  $-C(=O)NR^xR^y$ ;

15  $R^4$  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, гидроксид, гидроксид  $C_{1-6}$  алкила,  $-COOC_{1-6}$  алкила,  $-(CH_2)_j-O-C_{1-6}$  алкила,  $-(CH_2)_j-O$ -(гидроксид  $C_{1-6}$  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,  $-CH_2-C_{3-8}$  циклоалкила,  $-CH_2-O-C_{3-8}$  циклоалкила и  $C_{3-8}$  циклоалкенила, причем упомянутые 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  $R^6$  и  $R^7$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, могут соединяться с образованием  $C_{3-6}$  циклоалкильной 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  $C_{3-6}$  циклоалкильные и гетероциклические группы могут быть обязательно замещены одной или более группами  $R^Z$ ;

$R^8$  и  $R^9$  независимо выбраны из водорода,  $C_{1-6}$  алкила, галоген  $C_{1-6}$  алкила, гидрокси  $C_{1-6}$  алкила,  $-(CH_2)_k-O-C_{1-6}$  алкила,  $-(CH_2)_k-O-$ (гидрокси  $C_{1-6}$  алкил), гидрокси  $C_{1-6}$  алкокси,  $-(CH_2)_k-CO_2C_{1-6}$  алкила,  $-(CH_2)_k-CO_2H$ ,  $-C_{1-6}$  алкила- $N(H)_e(C_{1-4}$  алкил) $_{2-e}$ ,  $-(CH_2)_j-C_{3-8}$  циклоалкила и  $-(CH_2)_j-C_{3-8}$  циклоалкенила;

$R^X$  и  $R^Y$  независимо выбраны из водорода, галогена, нитро, нитрила,  $C_{1-6}$  алкила, галоген  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила, гидрокси, гидрокси  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкокси,  $-(CH_2)_k-O-C_{1-6}$  алкила, гидрокси  $C_{1-6}$  алкокси,  $-COOC_{1-6}$  алкила,  $-N(H)_e(C_{1-4}$  алкила) $_{2-e}$ ,  $-C_{1-6}$  алкила- $N(H)_e(C_{1-4}$  алкил) $_{2-e}$ ,  $-(CH_2)_k-C(=O)N(H)_e(C_{1-4}$  алкил) $_{2-e}$ ,  $C_{3-8}$  циклоалкила и  $C_{3-8}$  циклоалкенила;

или группы  $R^X$  и  $R^Y$  вместе с атомом углерода или азота, к которому они присоединены, могут соединяться с образованием  $C_{3-6}$  циклоалкильной или насыщенной гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, которая может быть обязательно 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  $=CH_2$ ;

$R^Z$  независимо выбран из галогена, нитро, нитрила,  $C_{1-6}$  алкила, галоген  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $=O$ , гидрокси, гидрокси  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкокси,  $-(CH_2)_k-O-C_{1-6}$  алкила, гидрокси  $C_{1-6}$  алкокси,  $-C(=O)C_{1-6}$  алкила,  $-C(=O)C_{1-6}$  алкил-ОН,  $-C(=O)C_{1-6}$  алкил- $N(H)_e(C_{1-4}$  алкил) $_{2-e}$ ,  $-C(=O)N(H)_e(C_{1-4}$  алкил) $_{2-e}$ ,  $-(CH_2)_r-CO_2C_{1-6}$  алкила,  $-(CH_2)_r-CO_2H$ ,  $-N(H)_e(C_{1-4}$  алкил) $_{2-e}$ ,  $-C_{1-6}$  алкил- $N(H)_e(C_{1-4}$  алкил) $_{2-e}$ , гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, замещенной  $-C(=O)C_{1-4}$  алкилом, гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, замещенной  $-C(=O)OC_{1-4}$  алкилом, гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, замещенной  $-C(=O)N(H)_e(C_{1-4}$  алкил) $_{2-e}$ , –

C(=O)гетероциклической группы с 3–6 кольцевыми членами, C<sub>3–8</sub> циклоалкила и C<sub>3–8</sub> циклоалкенила, причем если R<sup>7</sup> представляет собой пиридин, то R<sup>z</sup> отличается от –NH<sub>2</sub>;

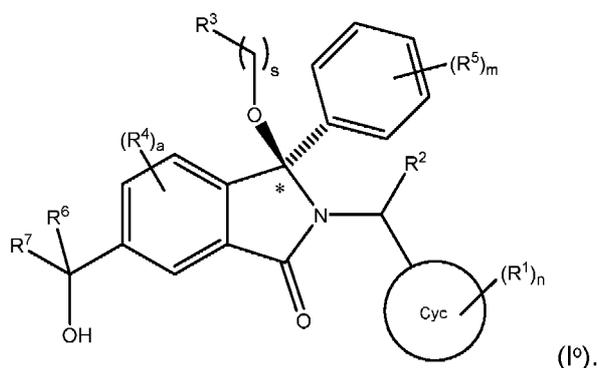
a, j, d, e, n, r и p независимо выбраны из 0, 1 и 2;

k и m независимо выбраны из 1 и 2;

5 u выбран из 0, 1, 2 и 3; и

v независимо выбрано из 0 и 1

Соединения формулы (I<sup>o</sup>) имеют хиральный центр, отмеченный ниже знаком «\*»:



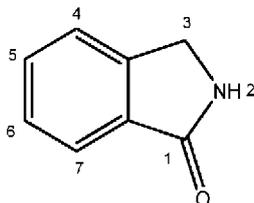
Соединения формулы (I<sup>o</sup>) содержат стереоцентр в указанной позиции (обозначаемой в  
 10 настоящем документе как (3)) и являются хиральными нерацемическими. Соединения  
 формулы (I<sup>o</sup>) имеют стереохимию, проиллюстрированную заштрихованными и  
 сплошными клиновидными связями, и этот стереоизомер преобладает.

Как правило, по меньшей мере 55% (например, по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%,  
 80%, 85%, 90% или 95%) соединения формулы (I<sup>o</sup>) присутствует в виде показанного  
 15 стереоизомера. В одном общем варианте осуществления 97% (например, 99%) или более  
 (например, практически все) от общего количества соединения формулы (I<sup>o</sup>) может  
 присутствовать в виде одного стереоизомера.

Соединения могут также содержать один или более дополнительных хиральных центров  
 (например, в группе –CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>OH, и/или в группе R<sup>3</sup>, и/или в группе –CHR<sup>2</sup>).

20 Обычно соединение формулы (I<sup>o</sup>) 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 (I<sup>o</sup>)  
 характеризуется энантиомерным избытком 97% (например, 99%) или более.

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



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

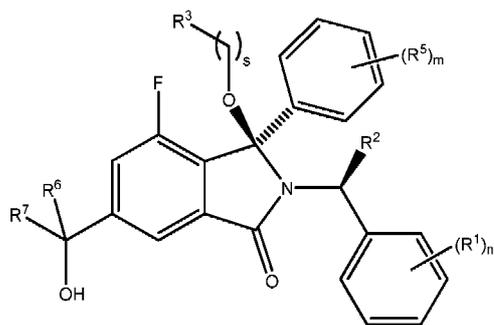
### Соединения формулы (I°), где суs представляет собой фенил

- Соединения формулы (I°), 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), l(e), l(f), l(g), l(g'), l(h), l(i), l(j), l(k), l(L), l(m), l(m'), l(n), l(o), l(o'), l(o''), l(p), l(p'), l(q), l(q'), l(q''), l(q'''), l(q'''), l(r), l(s), l(t), l(u), l(v), l(v'), l(w), l(x), l(x), l(y), (II), (IIa), (IIb), (IIIa), (IIIb), (IVa), (IVb), (V), (VI), (Via), (VII), (Vila), (VIIb), (Vile), (VIIId), (VIIId'), (Vile), (Vile'), (a), (b), (ba), (bb), (be) или (c)). Соответственно, посредством этой перекрестной ссылки соединения, подформулы и заместители WO 2017/055860 прямым и однозначным образом раскрыты в настоящей заявке.

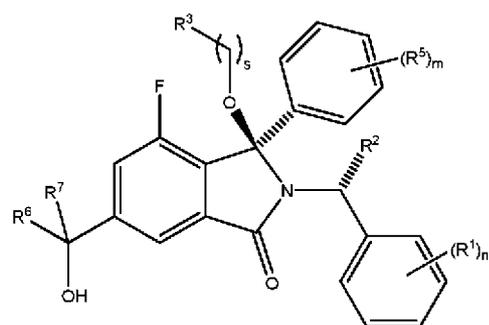
Конкретные подформулы, варианты осуществления и соединения формулы (I°), в которой суs представляет собой фенил, включают следующее:

- 20 В одном варианте осуществления R<sup>1</sup> представляет собой хлор или нитрил, в частности хлор.

Когда R<sup>2</sup> отличается от водорода, соединение формулы (I°) может существовать в виде по меньшей мере двух диастереоизомеров:



Диастереоизомер 1А

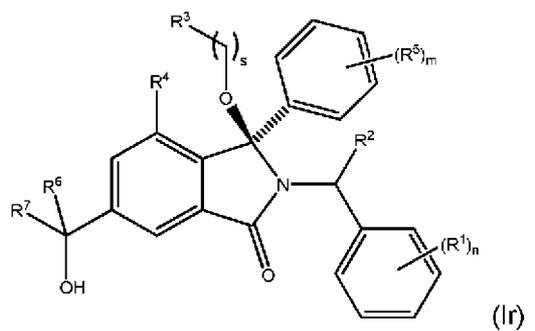


Диастереоизомер 1В

Во избежание сомнений, общая формула (I<sup>o</sup>) и все подформулы охватывают как отдельные диастереоизомеры, так и смеси диастереоизомеров, которые соотносятся как эписмеры в группе  $-\text{CHR}^2-$ . В одном варианте осуществления соединение формулы (I<sup>o</sup>) представляет собой диастереоизомер 1А или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления соединение формулы (I<sup>o</sup>) представляет собой диастереоизомер 1В или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль.

В одном варианте осуществления  $\text{R}^2$  выбран из водорода и  $-(\text{CR}^x\text{R}^y)_u-\text{CO}_2\text{H}$  (например,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-(\text{CH}(\text{CH}_3))-\text{CO}_2\text{H}$  и  $-(\text{C}(\text{CH}_3)_2)-\text{CO}_2\text{H}$ ).

В одном варианте осуществления а представляет собой 1, заместитель  $\text{R}^4$  находится в позиции 4 изоиндолин-1-она, а соединение формулы (I<sup>o</sup>) представляет собой соединение формулы (Ir) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

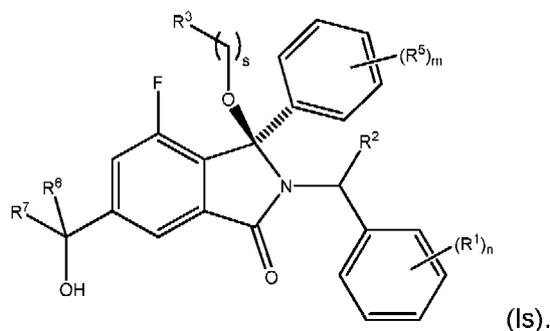


(Ir)

$\text{R}^4$  независимо выбран из галогена, нитрила,  $\text{C}_{1-4}$  алкила, галоген  $\text{C}_{1-4}$  алкила,  $\text{C}_{1-4}$  алкокси и галоген  $\text{C}_{1-4}$  алкокси.

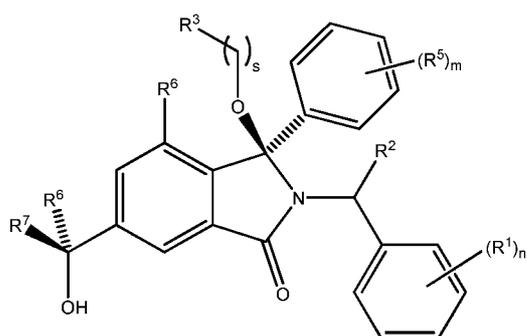
В одном варианте осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой галоген. В одном варианте осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой фтор или хлор. В другом варианте осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой фтор.

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

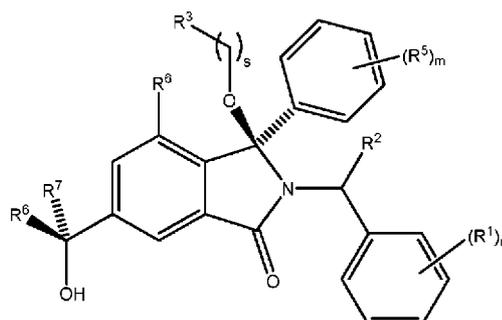


5

Когда  $R^6$  и  $R^7$  являются разными, соединение формулы (1°) может существовать в виде по меньшей мере двух диастереоизомеров:



Диастереоизомер 2А

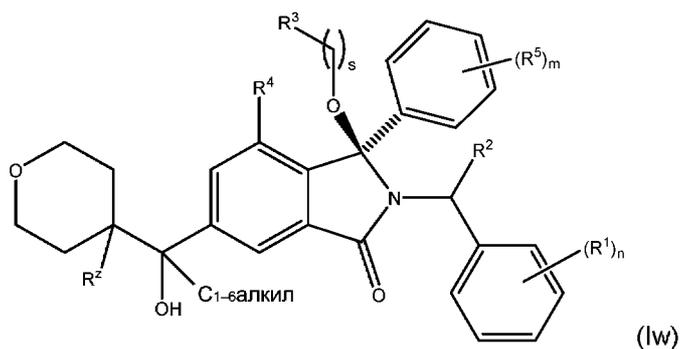


Диастереоизомер 2В

Во избежание сомнений, общая формула (1°) и все подформулы охватывают как отдельные диастереоизомеры, так и смеси диастереоизомеров, которые соотносятся как эписмеры в группе  $-CR^6R^7OH$ .

10

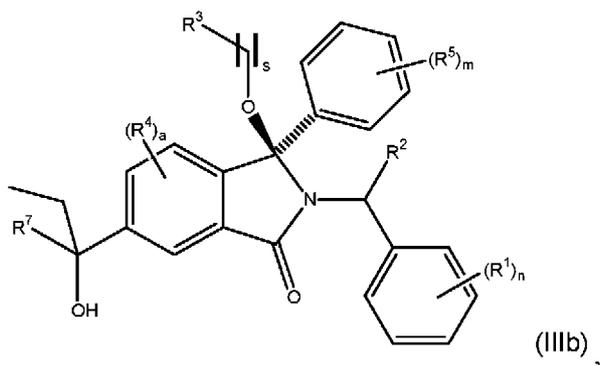
В одном варианте осуществления  $R^6$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил (такой как метил или этил, например, метил),  $R^7$  представляет собой оксанил, а соединение формулы (1°) представляет собой соединение формулы (Iw):



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

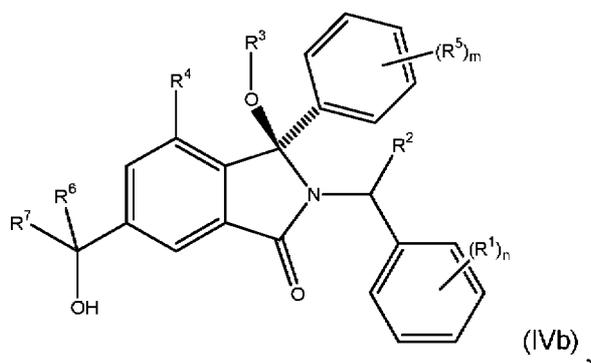
### 5 Подформулы

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



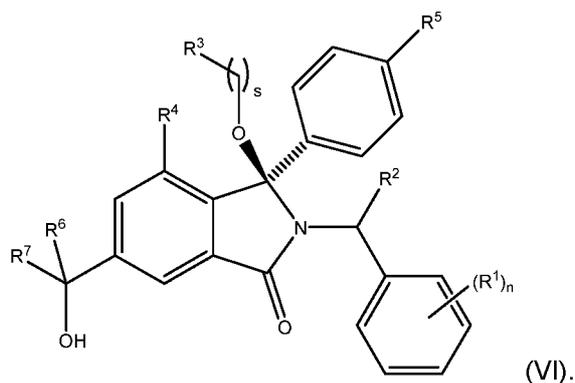
10 где  $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^7, a, m$  и  $s$  имеют значения, определенные в настоящем документе.

В одном варианте осуществления  $s$  представляет собой 0, а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (IVb) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

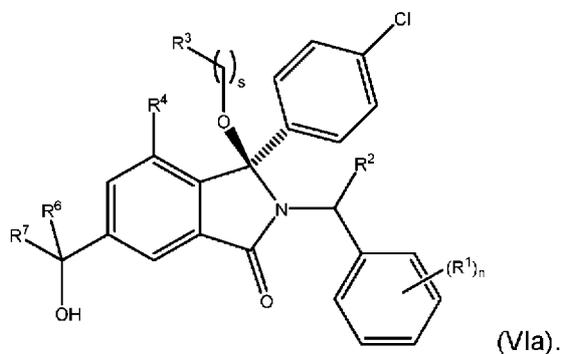


где  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^7$ , а, m и s имеют значения, определенные в настоящем документе.

В одном варианте осуществления m представляет собой 1, заместитель  $R^4$  находится в позиции 4 фенильной группы, а соединение формулы (I<sup>o</sup>) представляет собой соединение формулы (VI) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

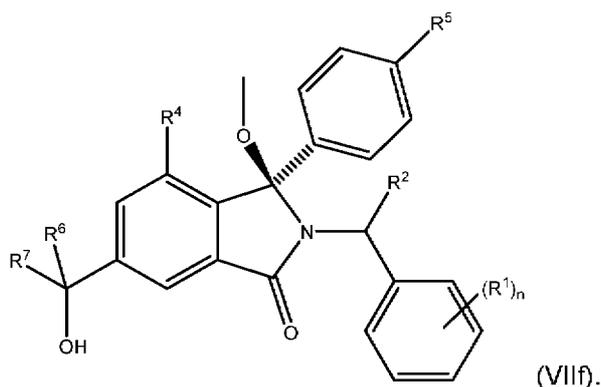


В одном варианте осуществления  $R^5$  представляет собой хлор, а соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (VIa) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



10

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 формулы (VIIIf)  $R^6$  представляет собой этил.

В одном варианте осуществления соединения формулы (VIIIf)  $R^7$  выбран из метила, оксанила, пиразолила, имидазолила, пиперидинила и циклогексила, причем упомянутые  
5 циклоалкильные и гетероциклические группы необязательно замещены одной или более группами  $R^z$  (например, метилом, фтором или гидроксидом).

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

В одном варианте осуществления соединения формулы (VIIIf)  $R^7$  выбран из пиперидинила, необязательно замещенного одной или более группами  $R^z$  (например,  
10 метилом, фтором или гидроксидом).

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

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение  
15 формулы (I°) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, причем:

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

$n$  равно 1 или 2;

20  $R^2$  выбран из водорода и  $-(CR^xR^y)_uCO_2H$  (например,  $-COOH$ ,  $-CH_2COOH$ ,  $-CH_2CH_2CO_2H$ ,  $-(CH(CH_3))CO_2H$  и  $-(C(CH_3)_2)CO_2H$ ).

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

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

R<sup>5</sup> представляет собой галоген (например, Cl);

m равно 1;

R<sup>6</sup> представляет собой водород или C<sub>1-6</sub> алкил (например, -CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

R<sup>7</sup> представляет собой C<sub>1-4</sub> алкил (например, метил), гидроксид C<sub>1-4</sub> алкил (например, гидроксиметил), метокси C<sub>1-4</sub> алкил (например, метоксиметил), гетероциклическую группу с 5 или 6 кольцевыми членами (например, пиперидинил, оксанил, имидазолил или пиразолил));

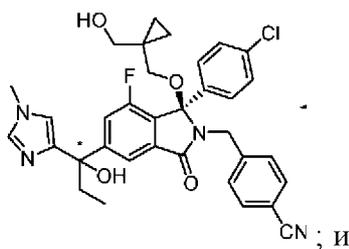
причем упомянутая гетероциклическая группа с 5 или 6 кольцевыми членами может быть необязательно замещена одной или двумя группами R<sup>z</sup>, независимо выбранными из C<sub>1-4</sub> алкила (например, метила).

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>), 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 настоящем 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 (I<sup>o</sup>), 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 настоящем документе, т. е. соединений, в которых сус представляет собой фенил, как также описано в WO 2017/055860).

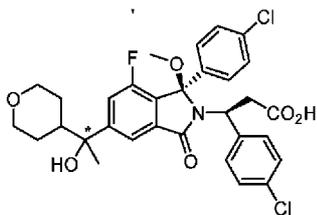
В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>), которое выбрано из следующих соединений, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

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

(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

- 5 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>), 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

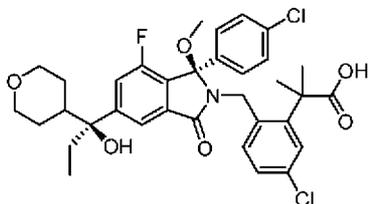
(3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)этил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]пропановая кислота.

- 15 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>), 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

- 20 (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.

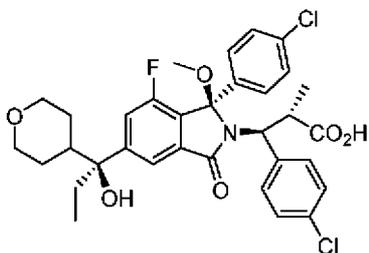
В одном варианте осуществления соединение формулы (I°) представляет собой 2-(5-хлор-2-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}фенил)-2-метилпропановую кислоту или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль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



5 например

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I°), 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-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту («соединение 1») или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват,

10



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 настоящем документе, и что все такие варианты охвачены этой заявкой.

15

### **Соединения формулы (I°), где сус представляет собой гетероциклическую группу**

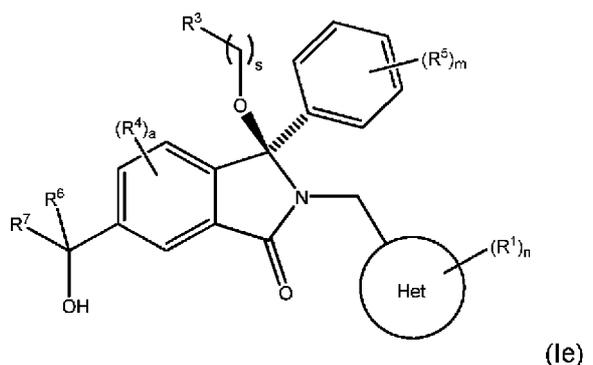
Соединения формулы (I°), где сус представляет собой гетероциклическую группу, описаны в нашей более ранней заявке на международный патент PCT/GB2016/053041, которая была опубликована как WO 2017/055859 06 апреля 2017 г. Приведена перекрестная ссылка на соединения, подформулы и заместители, описанные в WO 2017/055859 (например, формулы (I), 1(a), 1(a'), 1(b), 1(c), 1(d), 1(e), 1(f), 1(g), 1(g'), 1(h), 1(i),

20

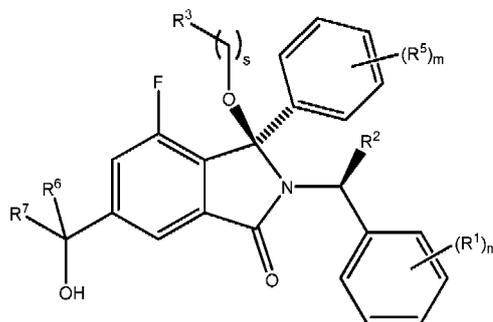
l(j), l(k), l(L), l(m), l(m'), l(n), l(o), l(o'), l(o''), l(p), l(p'), l(q), l(q'), l(q''), l(q'''), l(q''''), l(r), l(s), l(t), l(u), l(v), l(v'), l(w), l(x), l(x), l(y), (II), (IIa), (lib), (IIIa), (IIIb), (Iva), (IVb), (V), (VI), (Via), (VII), (Vila), (VIIb), (Vile), (VII'd), (Vile'), (a), (b), (ba), (bb), (be) или (c)), и их примеры, определенные в настоящем документе. Соответственно, на  
 5 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 (I°), в которой суs представляет собой гетероциклическую группу, включают следующее:

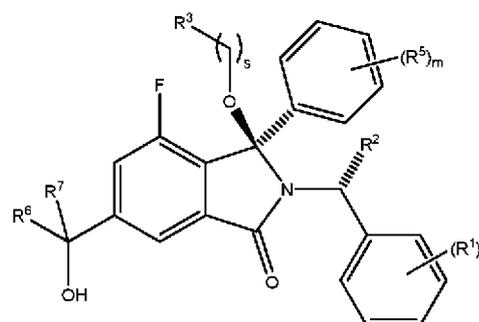
В другом варианте осуществления R2 представляет собой водород, а соединение  
 10 формулы (I°) представляет собой соединение формулы (Ie) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



Когда R<sup>2</sup> отличается от водорода, соединение формулы (I°) может существовать в виде по меньшей мере двух диастереоизомеров:



Диастереоизомер 1A



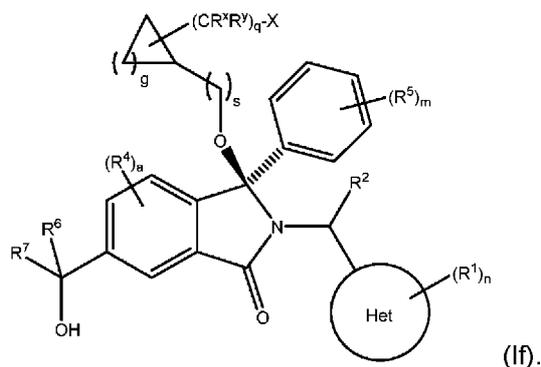
Диастереоизомер 1B

15

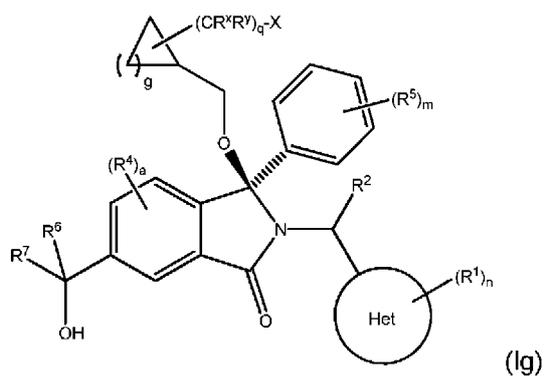
Во избежание сомнений, общая формула (I°) и все подформулы охватывают как отдельные диастереоизомеры, так и смеси диастереоизомеров, которые соотносятся как эпимеры в группе  $-CHR^2-$ . В одном варианте осуществления соединение формулы (I°)

представляет собой диастереоизомер 1A или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления соединение формулы (I°) представляет собой диастереоизомер 1B или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль.

- 5 В одном варианте осуществления A представляет собой C<sub>3-6</sub> циклоалкильную группу (т. е. g представляет собой 1, 2 или 3), t представляет собой 1 и s представляет собой 0 или 1, а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (If) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

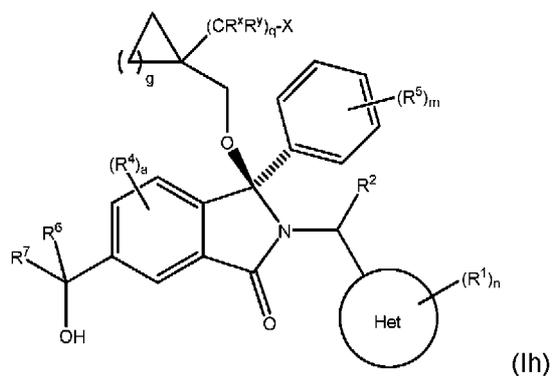


- 10 В одном варианте осуществления A представляет собой C<sub>3-6</sub> циклоалкильную группу (т. е. g представляет собой 1, 2 или 3), t представляет собой 1 и s представляет собой 1, а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (Ig) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

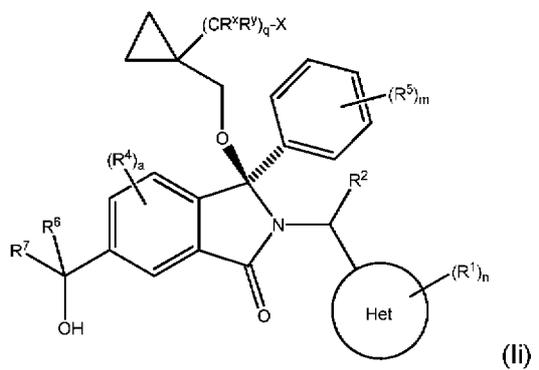


- 15 В одном варианте осуществления A представляет собой Cs-е-циклоалкильную группу (т. е., g представляет собой 1, 2 или 3), t представляет собой 1 и s представляет собой 1, а циклоалкильная группа является геминально двузамещенной (т. е. как группа – (CR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>)<sub>q</sub>–X, так и –CH<sub>2</sub>–O-изоиндолиноновая группа присоединены к одному и тому же
- 20 атому циклоалкильной группы, а соединение формулы (I°) представляет собой

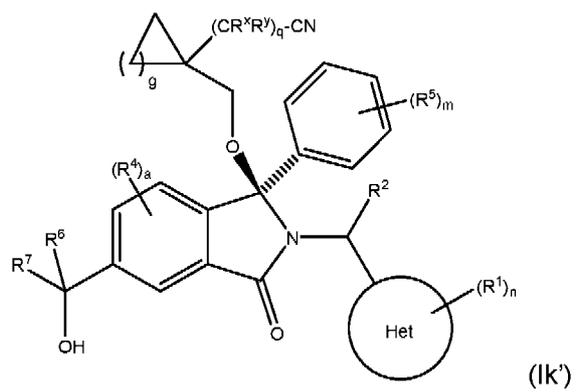
соединение формулы (Ih) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



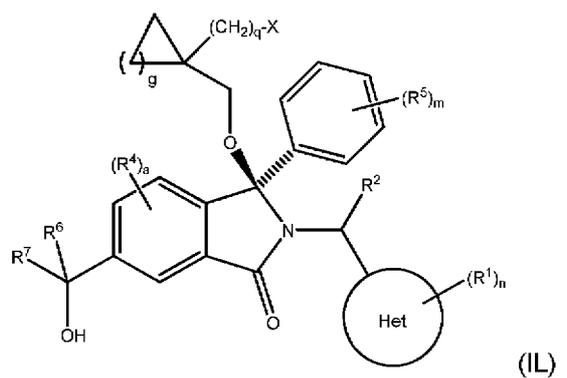
- 5 В одном варианте осуществления А представляет собой циклопропильную группу (т. е. g представляет собой 1), t представляет собой 1 и s представляет собой 1. Следовательно, циклоалкильная группа представляет собой циклопропильную группу, а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (Ii) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



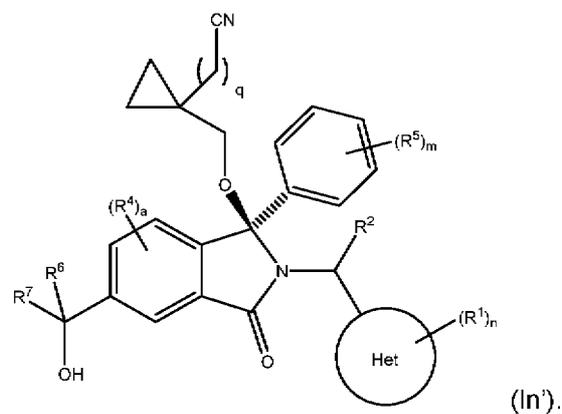
- 10 В одном варианте осуществления А представляет собой C<sub>3-6</sub> циклоалкильную группу (т. е. G представляет собой 1, 2 или 3), t представляет собой 1, s представляет собой 1 и X представляет собой -CN, а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (Ik') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



В другом варианте осуществления А представляет собой  $C_{3-6}$  циклоалкильную группу (т. е. G представляет собой 1, 2 или 3), t представляет собой 1, s представляет собой 1 и  $R^x$  и  $R^y$  представляют собой водород (включая  $^1H$  и  $^2H$ ), а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (II) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



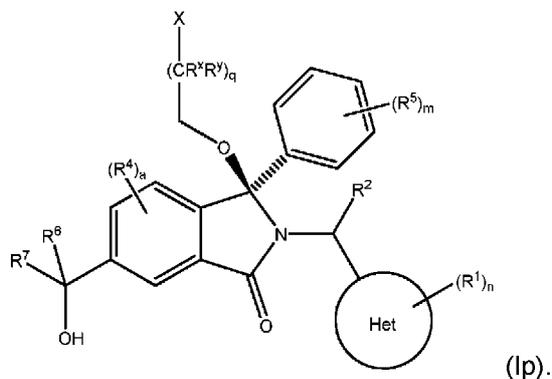
В одном варианте осуществления А представляет собой  $C_{3-6}$  циклоалкильную группу (т. е. g представляет собой 1), t представляет собой 1, s представляет собой 1 и X представляет собой  $-CN$ , а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (In') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



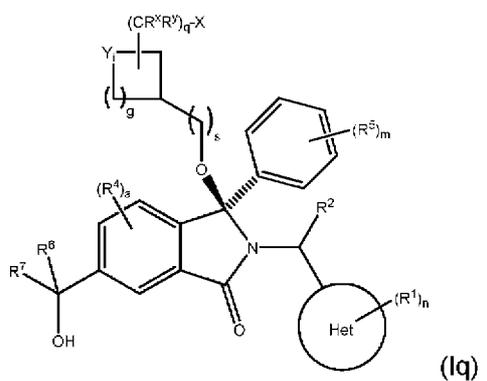
где  $q$  представляет собой 0 или 1. В одном варианте осуществления соединения (In)  $q$  равно 0.

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

5 (I°) представляет собой соединение формулы (Ip):

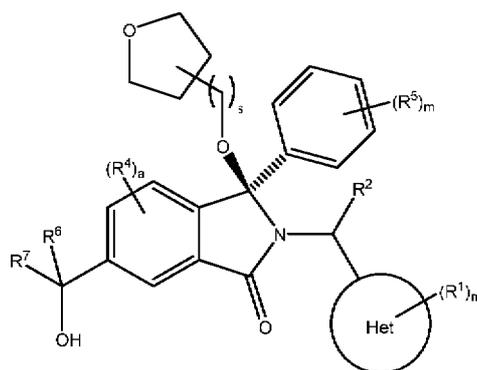


В одном варианте осуществления А представляет собой  $C_{3-6}$  циклоалкильную группу или насыщенную гетероциклическую группу с 3–6 кольцевыми членами, где  $t$  представляет собой 1 и  $s$  представляет собой 1,  $Y$  независимо выбран из  $-CH_2-$ ,  $O$  или  $SO_2$ ,  $i$  представляет собой 0 или 1,  $g$  представляет собой 1, 2, 3 или 4 и  $i + g$  представляет собой 1, 2, 3 или 4, а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (Iq) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



15 В одном варианте  $i$  представляет собой 1, а  $Y$  представляет собой  $O$  или  $SO_2$ , в частности  $O$ . В одном варианте осуществления соединение формулы (Iq) представляет собой

соединение формулы (Iq''''') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически

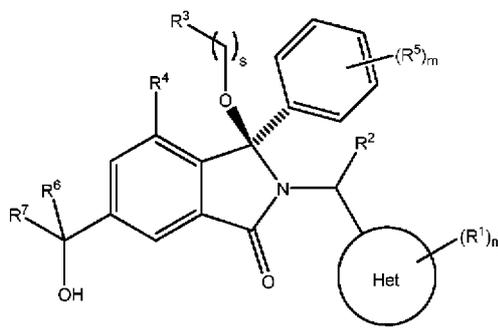


приемлемую соль:

(Iq''''').

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.

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

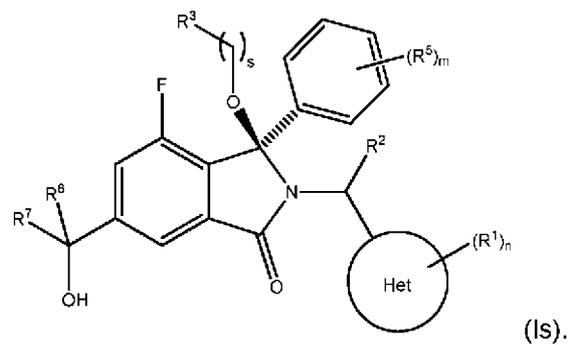


(Ir)

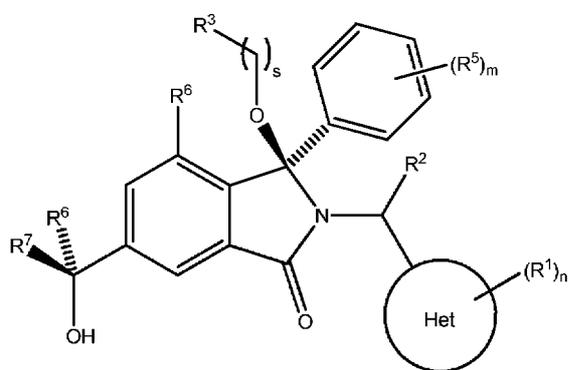
10  $R^4$  независимо выбран из галогена, нитрила,  $C_{1-4}$  алкила, галоген  $C_{1-4}$  алкила,  $C_{1-4}$  алкокси и галоген  $C_{1-4}$  алкокси.

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.

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

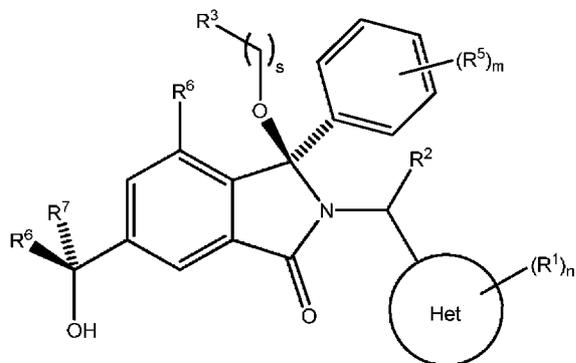


Когда  $R^6$  и  $R^7$  являются разными, соединение формулы (1°) может существовать в виде по меньшей мере двух диастереоизомеров:



Диастереоизомер 2А

5

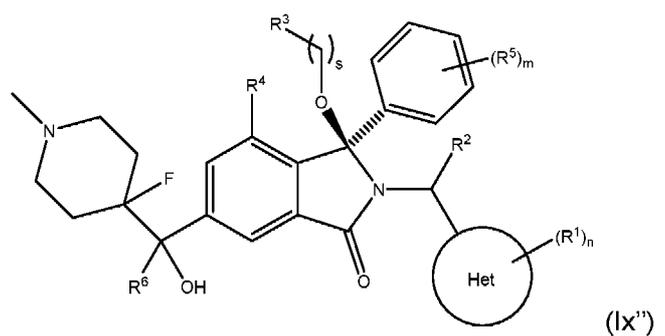


Диастереоизомер 2В

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

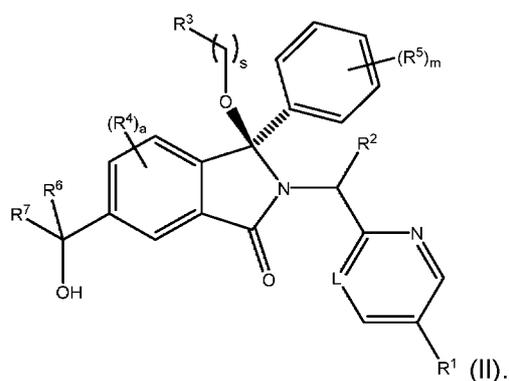
В одном варианте осуществления  $R^7$  представляет собой

- 5 4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил, а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (IX'') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



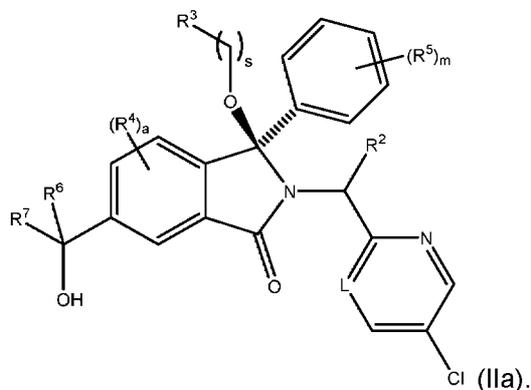
### Подформулы

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



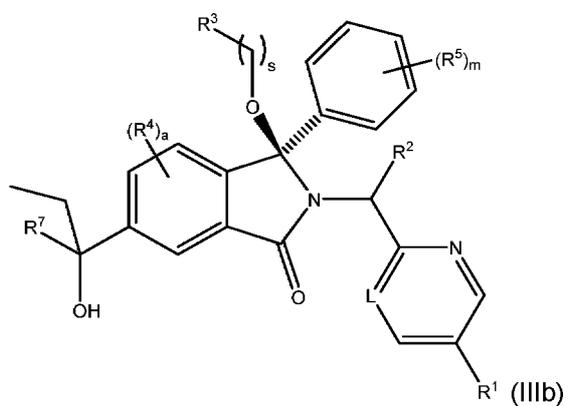
- 15 где L представляет собой  $CR^1$ , CH или N, а  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ , a, m и s имеют значения, определенные в настоящем документе. В одном варианте осуществления L представляет собой CH. В одном варианте осуществления L представляет собой N. В одном варианте осуществления L представляет собой  $CR^1$ , например C-OH или C-гидрокси  $C_{1-4}$  алкил (например, C-OH или C- $CH_2OH$ ).

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:



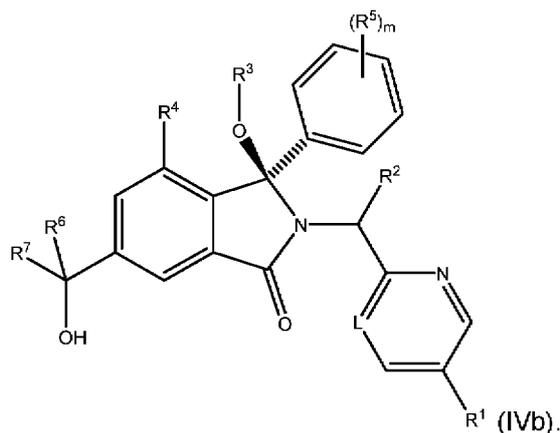
5 где  $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^7, m$  и  $s$  имеют значения, определенные в настоящем документе.

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 настоящем документе.

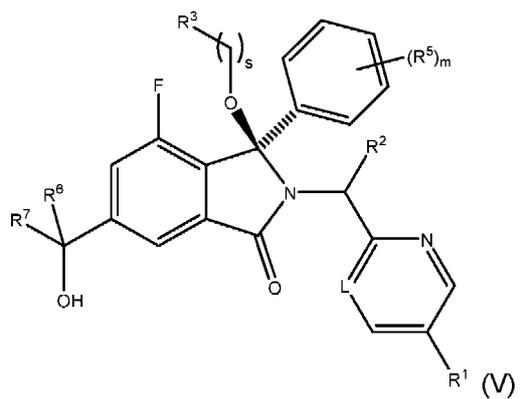
В одном варианте осуществления  $s$  представляет собой 0, а соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IVb) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



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

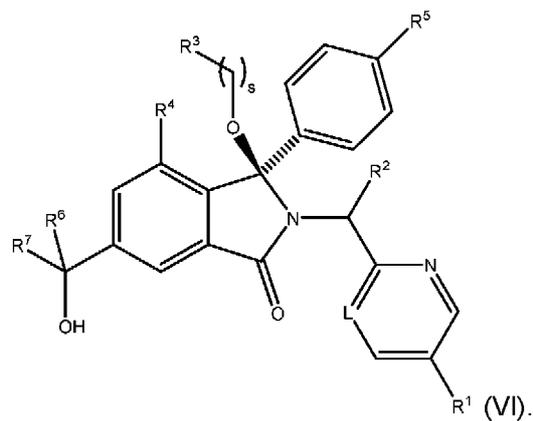
В одном варианте осуществления  $R^4$  представляет собой F, а соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (V) или его таутомер, или сольват, или

5 фармацевтически приемлемую соль:

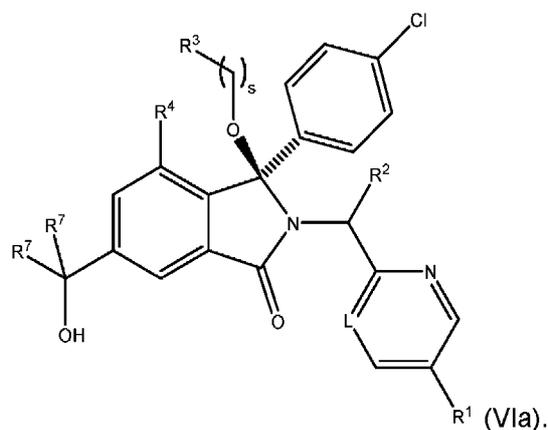


где  $R^1, R^2, R^3, R^5, R^7$ ,  $m$  и  $s$  имеют значения, определенные в настоящем документе.

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

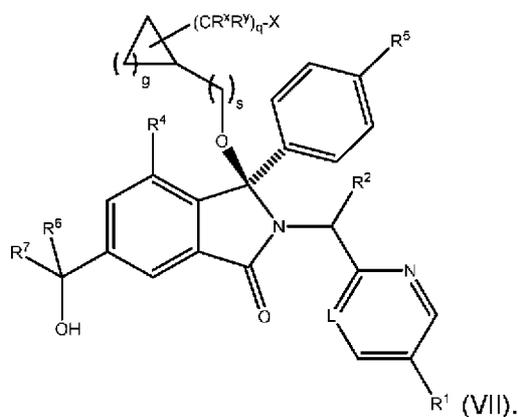


В одном варианте осуществления R<sup>5</sup> представляет собой хлор, а соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (VIa) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



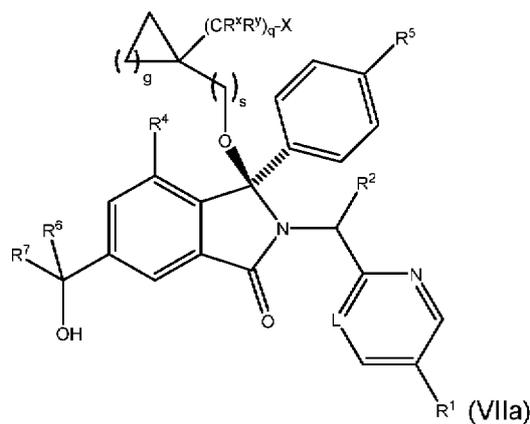
5

В одном варианте осуществления A представляет собой C<sub>3-6</sub> циклоалкильную группу (g представляет собой 1, 2 или 3), t представляет собой 1, а соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (VII) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

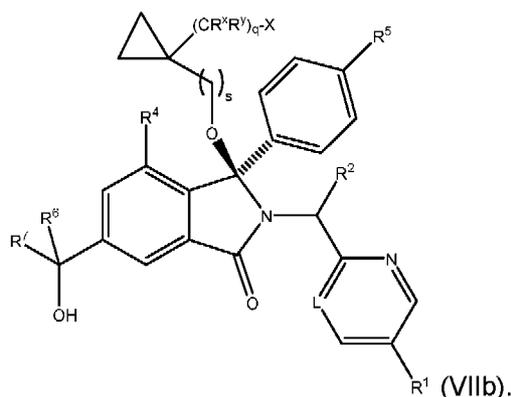


10

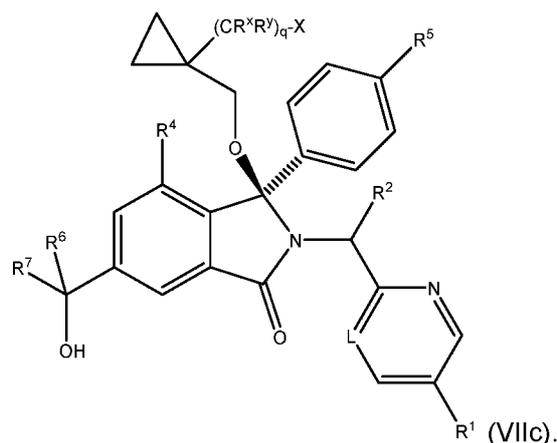
В одном варианте осуществления А представляет собой  $C_{3-6}$  циклоалкильную группу (g представляет собой 1, 2 или 3), t представляет собой 1 и циклоалкильная группа является геминально двузамещенной (т. е. как группа  $-(CR^xR^y)-X$ , так и группа  $CH_2$  (где s представляет собой 1) или атом кислорода (где s представляет собой 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:



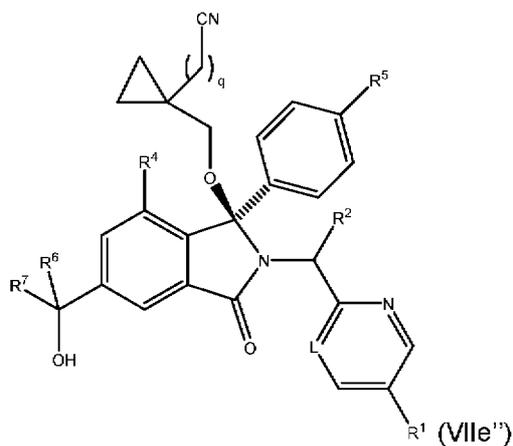
В одном варианте осуществления g представляет собой 1 и, таким образом, циклоалкильная группа представляет собой циклопропильную группу, а соединение формулы (VIIa) представляет собой соединение формулы (VIIb) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



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



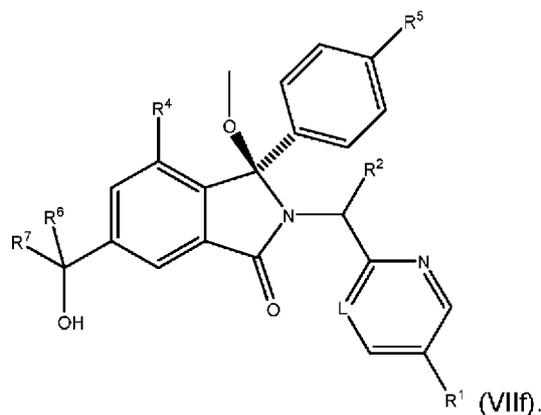
В одном варианте осуществления X представляет собой –CN, а соединение формулы (VIId) представляет собой соединение формулы (VIIe'') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



5

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

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

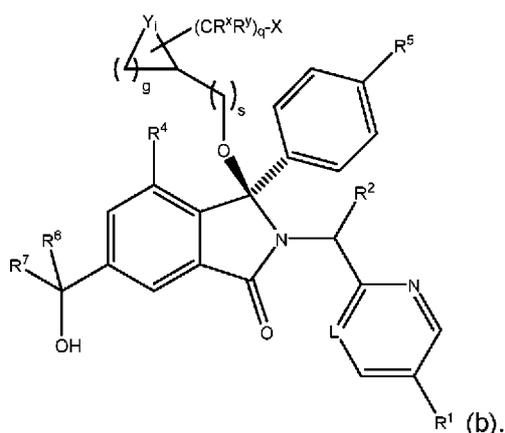


10

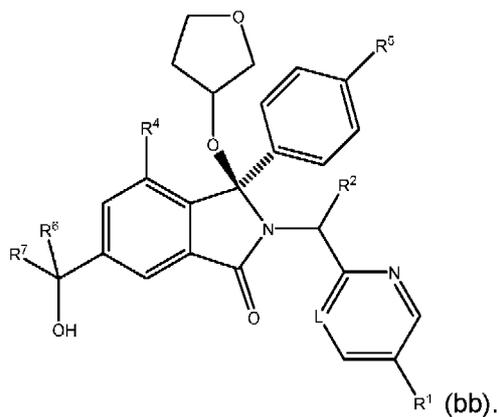
В одном варианте осуществления соединения формулы (a)  $R^7$  представляет собой пиперидинил или пиперазинил, необязательно замещенный  $C_{1-6}$  алкилом (например, метилом) и/или галогеном (например, фтором).

5 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).

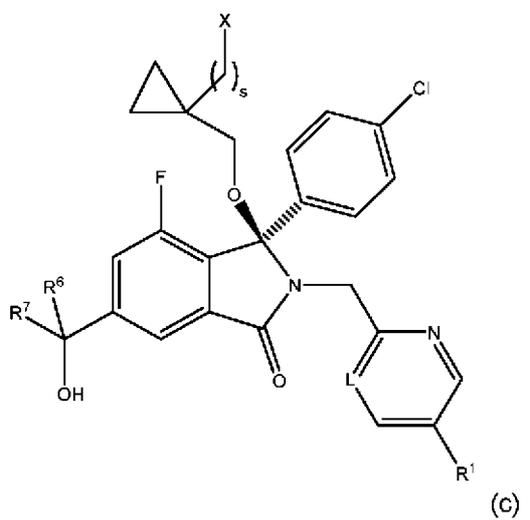
10 В одном варианте осуществления A представляет собой гетероциклическую группу с 3–6 кольцевыми членами, причем гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов, выбранных из N, O, S и их окисленных форм (t представляет собой 1; g представляет собой 1, 2, 3 или 4; Z представляет собой N, O, S и их окисленные формы; i представляет собой 1, 2 или 3; и  $i + g = 2, 3, 4$  или 5), и соединение формулы (VI) представляет собой соединение формулы (b) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:



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



В одном варианте осуществления соединение формулы (I°) представляет собой соединение формулы (с) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

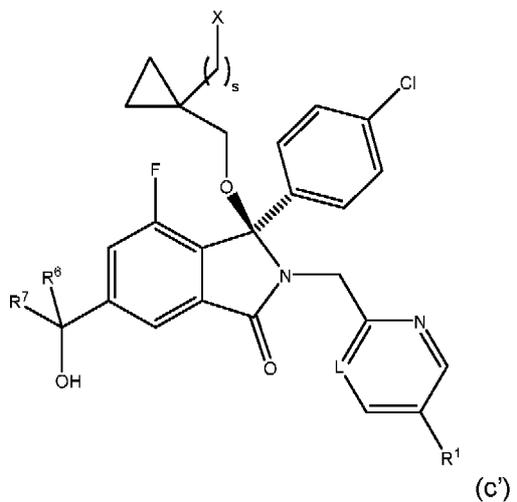


5

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 (I°) представляет собой соединение формулы (с') или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль:

10



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 (I<sup>o</sup>) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, причем:

Нет представляет собой пиридинил или пиримидинил

$R^1$  присоединен к атому углерода и независимо выбран из гидроксигруппы, галогена, нитрогруппы, нитрильной группы и  $C_{1-4}$  алкила;

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

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

$s$  и  $t$  независимо выбраны из 0 и 1;

$q$  выбран из 0, 1 и 2;

при этом если  $R^3$  представляет собой  $-(A)_t-(CR^xR^y)_q-X$ , то (i) по меньшей мере один из  $s$ ,  $t$  и  $q$  отличен от 0, и (ii) если  $t$  представляет собой 0, то  $s$  представляет собой 1, а  $q$  отличен от 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  $-OR^9$ ;

$R^4$  и  $R^5$  независимо выбраны из  $C_{1-4}$  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, причем упомянутые циклоалкильные или гетероциклические группы

5 могут быть необязательно замещены одной или более 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;

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

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

10  $R^Z$  независимо выбран из галогена, нитро, нитрила,  $C_{1-6}$  алкила, галоген  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила, гидроксид, гидроксид  $C_{1-6}$  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 выбран из 1 и 2; и

15 a выбран из 0 и 1.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, причем:

Het представляет собой пиридинил или пиримидинил

20  $R^1$  присоединен к атому углерода и независимо выбран из галогена, гидроксид и нитрила;

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

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

A представляет собой гетероциклическую группу с 3–6 кольцевыми членами, причем гетероциклическая группа содержит один или более (например, 1, 2 или 3) гетероатомов,

25 выбранных из N, O, S и их окисленных форм;

s и t независимо выбраны из 0 и 1;

q выбран из 0, 1 и 2;

при этом если  $R^3$  представляет собой  $-(A)t-(CR^xR^y)_q-X$ , то (i) по меньшей мере один из  $s$ ,  $t$  и  $q$  отличен от 0, и (ii) если  $t$  представляет собой 0, то  $s$  представляет собой 1, а  $q$  отличен от 0;

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

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

$R^6$  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,  $C_{3-6}$  циклоалкила и  $-CH_2-$

10  $C_{3-6}$  циклоалкила, причем упомянутые циклоалкильные, циклоалкенильные или гетероциклические группы могут быть необязательно замещены одной или более 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;

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

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

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

$n$  представляет собой 1 и  $m$  представляет собой 1; и

$a$  выбран из 0 и 1.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (1°) или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, 20 причем:

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  $-(A)t-(CR^xR^y)_q-X$ ;

25  $A$  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 выбран 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;

5 X выбран из водорода, галогена и -OR<sup>9</sup>;

R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> независимо выбраны из галогена;

R<sup>6</sup> выбран из водорода или C<sub>1-6</sub> алкила;

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

10 R<sup>9</sup> выбран из водорода и C<sub>1-6</sub> алкила;

R<sup>x</sup> и R<sup>y</sup> независимо выбраны из водорода и C<sub>1-6</sub> алкила;

R<sup>z</sup> независимо выбран из галогена и C<sub>1-6</sub> алкила;

n равно 1, m равно 1 и

a равно 1.

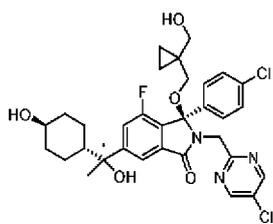
15 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>), которое представляет собой один из примеров 1–580 (примеры, в которых сус представляет собой гетероциклическую группу) или выбрано из примеров 1–580, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват (соединения формулы I<sup>o</sup>, описанные во второй группе примеров, определенных в настоящем документе, т. е. соединения, в которых сус представляет собой Нет, как также описано в WO 2017/055859).

25 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>), 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<sup>o</sup>, описанные во второй группе примеров, определенных в настоящем 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°), которое представляет собой один из примеров 1–459 и выбрано из примеров 1–459, или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или их сольват (соединения формулы I°, описанные во второй группе примеров, определенных в настоящем документе, т. е. соединения, в которых сус представляет собой Het, как также описано в WO 2017/055859).

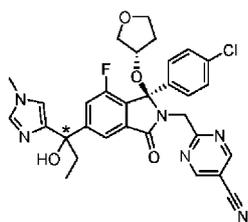
В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I°), которое выбрано из следующих соединений, или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

10 (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[*тран*-с-4-гидроксициклогексил]этил}-3-{[1-(гидроксиметил)циклопропил]метокси}-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он;



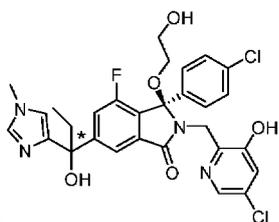
например

15 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;



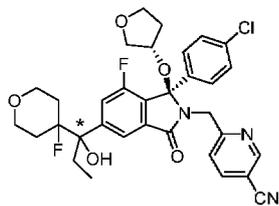
например

20 (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;



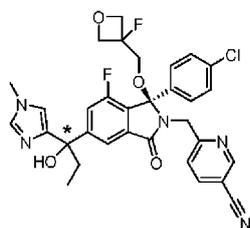
например

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;



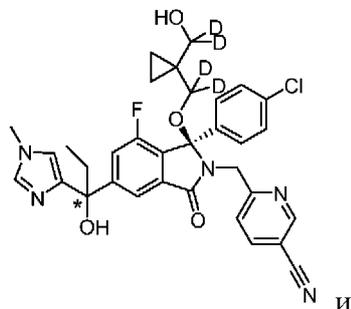
например

- 5 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;



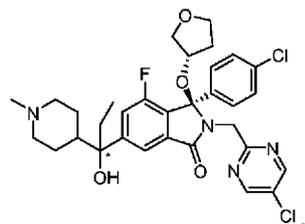
например

- 10 6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси(<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)метил]циклопропил}(<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)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;



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



- 15 например

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>), 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(<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)метил]циклопропил})(<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)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 (I<sup>o</sup>), которое представляет собой диастереоизомер 2В 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;

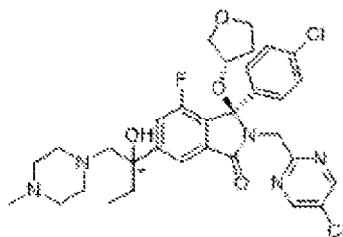
6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтороксан-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил;  
 6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-фтороксетан-3-ил)метокси]-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил;

6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси(<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)метил]циклопропил})(<sup>2</sup>H<sub>2</sub>)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.

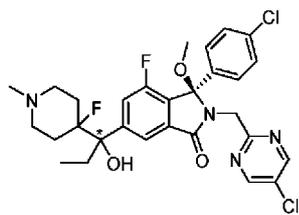
В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>), которое выбрано из следующих соединений, или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват:

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



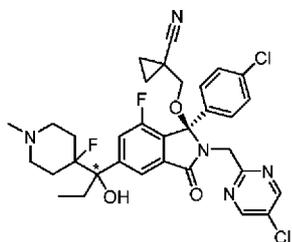
20 например

(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;



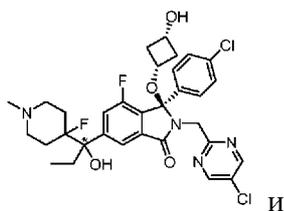
например

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;



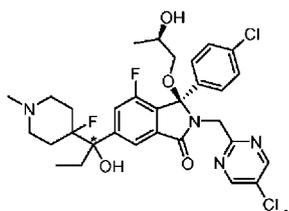
например

- 5 (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

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>), которое представляет собой

- 15 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°), 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°), 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°), 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°), 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°), 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-мет

илпиперидин-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 настоящем документе, и что все такие варианты охвачены этой заявкой.

### **Конкретные соединения**

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

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы I<sup>o</sup>, выбранное из примеров 1–134, описанных в первой группе примеров,

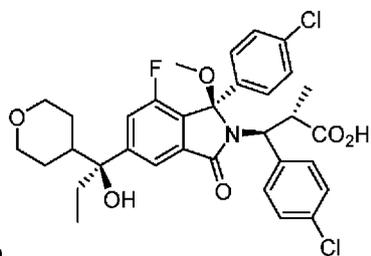
определенных в настоящем документе (т. е. соединения, в которых суф представляет собой фенил, как также описано в WO 2017/055860).

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы I<sup>o</sup>, выбранное из примеров 1–580, описанных во второй группе примеров, определенных в настоящем документе (т. е. соединения, в которых суф представляет собой Het, как также описано в WO 2017/055859).

В одном конкретном варианте осуществления изобретения антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, как определено в настоящем документе, 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.

(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 называется в настоящем документе «соединением 1».



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-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.

## **Общий вариант**

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

5 Позология антагонистов MDM2 известна специалисту в данной области. Следует понимать, что предпочтительные способы введения, дозировки и схемы введения для каждого антагониста MDM2 будут зависеть от конкретной опухоли, лечение которой проводят, и конкретного организма-хозяина, лечение которого проводят. Специалисты в данной области могут легко определить оптимальные способ, график введения, дозировку и схему введения, используя традиционные способы и учитывая  
10 информацию, изложенную в настоящем документе.

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

Ссылка на любое соединение в настоящем документе также включает в себя их ионные формы, соли, сольваты, изомеры (включая геометрические и стереохимические  
15 изомеры, если не указано), таутомеры, N-оксиды, сложные эфиры, пролекарства, изотопы и защищенные формы, как описано 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, сульфонатные и фосфатные соли. Все такие соли входят в объем  
25 настоящего изобретения, и ссылки на соединения формулы (I<sup>o</sup>) включают солевые формы упомянутых соединений.

### N-оксиды

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

### Геометрические изомеры и таутомеры

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

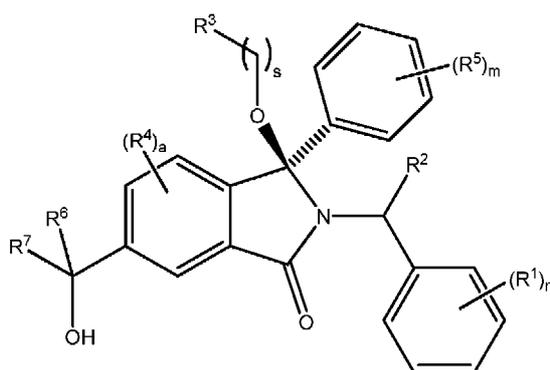
Например, некоторые гетероарильные кольца могут существовать в двух таутомерных формах, таких как А и В, проиллюстрированных ниже. В целях простоты формула  
10 может иллюстрировать одну форму, но данную формулу следует рассматривать как охватывающую обе таутомерные формы.

### Стереоизомеры

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

15 *Соединения формулы (I°)*

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



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

Если соединения формулы содержат один или более хиральных центров и могут существовать в форме двух или более оптических изомеров, ссылки на такие соединения включают все их оптические изомерные формы (например, энантиомеры, эпимеры и диастереомеры), как в форме отдельных оптических изомеров, так и смесей (например, рацемических смесей), или двух или более оптических изомеров, если контекст не требует иного.

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 специалисту в данной области.

#### Изотопные варианты

Настоящее изобретение включает применения всех фармацевтически приемлемых меченных изотопами 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

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-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:

- (a) порошковую рентгеновскую дифрактограмму, характеризующуюся пиками при углах дифракции 15,1, 15,5, 15,8 и 22,3 градуса  $2\theta$  ( $\pm 0,2$  градуса  $2\theta$ ); или
- 5 (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-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановой кислоты имеет:

- 10 (a) порошковую рентгеновскую дифрактограмму, характеризующуюся пиками при углах дифракции 11,3, 15,1, 15,5, 15,8, 17,2, 20,8, 22,3 и 28,6 градуса  $2\theta$  ( $\pm 0,2$  градуса  $2\theta$ ); или
- (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 рентгеновскую дифрактограмму, характеризующуюся наличием основных пиков при углах дифракции (2 $\theta$ ), межплоскостными расстояниями (d) и интенсивностями, указанными в таблице 6 настоящего документа.

- 20 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 рентгеновскую дифрактограмму, которая имеет пики при тех же углах дифракции, что и на порошковой рентгеновской дифрактограмме, 25 приведенной на Фиг. 6, и предпочтительно пики имеют такую же относительную интенсивность, что и пики на Фиг. 6.

- 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 30 кислоты имеет порошковую рентгеновскую дифрактограмму, по существу идентичную показанной на Фиг. 6.

В одном варианте осуществления 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 °С (например, 266,61 °С) при проведении ДСК (Фиг. 7).

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.

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 циклодекстрины, или комплексы с металлами) соединений. Комплексы включения, клатраты и комплексы металлов можно получать способами, хорошо известными специалисту в данной области.

#### Пролекарства

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

### **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ИЗОБРЕТЕНИИ**

#### **Соединения формулы (I°)**

В данном разделе, как и во всех других разделах данной заявки, если в контексте не указано иное, ссылки на формулу I° также включают в себя все другие подформулы и их примеры, как определено в настоящем документе, если в контексте не указано иное.

Соединения формулы (I°) могут быть получены в соответствии со способами синтеза, хорошо известными специалистам в данной области и описанными в настоящем документе.

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 процедур. Другие соединения можно получать посредством взаимопревращения функциональных групп с использованием способов, хорошо известных в данной области.

10 Общие способы получения, выделения и очистки соединений, в которых 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 сус представляет собой Нет, можно найти в заявке на международный патент № 15 PCT/GB2016/053041, которая была опубликована как WO 2017/055859 06.04.2017.

### **Обнаружение 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 циркулирующая опухолевая ДНК (цОДНК), получаемая из крови.

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

25 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, как правило, включает обнаружение одного или более 30 идентифицированных биомаркеров и необязательно дополнительных биомаркеров

5 посредством применения одного или более реагентов для обнаружения и/или методов обнаружения. Обнаружение, как правило, проводят *ex vivo* на образце от пациента, например, *in vitro*. В одном варианте осуществления биомаркер измеряют напрямую. В другом варианте осуществления можно измерять субстрат биомаркера для непрямого измерения уровней биомаркера.

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

15 «Реагент для обнаружения» представляет собой агент или соединение, которые специфически (или селективно) связываются с представляющим интерес биомаркером, взаимодействуют с ним или обнаруживают его. Такие реагенты для обнаружения могут включать в себя, без ограничений, антитело, поликлональное антитело или моноклональное антитело, которое предпочтительно связывается с белковым биомаркером, или олигонуклеотид, который комплементарен и селективно связывается с биомаркером мРНК или ДНК, как правило, в жестких условиях гибридизации.

20 Выражение «специфически (или селективно) связывается» или «специфически (или селективно) иммунореактивен с» применительно к реагенту для обнаружения относится к реакции связывания, которая определяет присутствие биомаркера в гетерогенной популяции биологических молекул. Например, в обозначенных условиях иммуноанализа упомянутый реагент для обнаружения (например, антитело) связывается с конкретным белком в по меньшей мере два раза сильнее фонового связывания и по существу не связывается в значимом 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 (иммуоферментный анализ) обычно используются для выбора антител, специфически иммунореактивных с белком (смотрите, например, Harlow & Lane, *Antibodies*, A

30

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.

5 Такие технологии, как гибридизация *in situ* (ISH), количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (кРВ ПЦР) и иммуногистохимия (ИГХ), традиционно использовали для диагностики или обнаружения биомаркеров заболеваний. Однако появление высокопроизводительных, чувствительных подходов, таких как секвенирование нового поколения, секвенирование отдельных молекул в  
10 реальном времени, цифровая патология и количественная гистопатология, привело к изменению технологической платформы для сопутствующей диагностики или CDx. Как количественная гистопатология, так и цифровая патология представляют собой диагностические подходы на основе медицинской визуализации; они обеспечивают локализацию и измерение белковых биомаркеров в образце ткани. Тканевые маркеры  
15 идентифицируют и количественно определяют с помощью автоматизированной платформы визуализации на основе флуоресценции.

Когда биомаркер, который необходимо обнаружить, представляет собой белок, методы обнаружения включают в себя анализы на основе антител, анализы белковых матриц, анализы на основе масс-спектрометрии (МС) и анализы на основе (ближней)  
20 инфракрасной спектроскопии. Например, иммуноанализы включают, без ограничений, 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  
25 анализы являются рутинными и хорошо известны в данной области.

Термин «анализировать» включает определение набора значений, связанных с образцом, посредством измерения маркера (например, наличия или отсутствия маркера или уровней экспрессии или активности компонентов) в образце и сравнения измерения с измерением в образце или наборе образцов от одного и того же субъекта или другого  
30 контрольного субъекта (субъектов). Маркеры по настоящему изобретению можно анализировать любым из различных традиционных методов, известных в данной

области. «Анализ» может включать проведение статистического анализа, например, для определения того, отвечает ли субъект или нет на терапию (например, лечение антагонистом MDM2, описанное в настоящем документе).

5 «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 кровь, тромбоциты, сыворотку, плазму, эритроциты, лейкоциты или лейкоциты, эндотелиальные клетки, тканевую биопсию, синовиальную жидкость, лимфатическую жидкость, асцитическую жидкость и  
10 интерстициальную или внеклеточную жидкость. Термин «образец» также охватывает жидкость в 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  
15 или лейкоциты, тромбоциты, сыворотку и плазму. Образцы можно получать от субъекта способами, включающими, без ограничений, венепункцию, экскрецию, эякуляцию, массаж, биопсию, игольную аспирацию, лаваж, соскоб, хирургический надрез или вмешательство или другие способы, известные в данной области.

### Методы анализа

20 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 как приматы, в частности,  
25 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  
30 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. Например, амплификация MDM2 и/или делеция его отрицательного регулятора, такого как p14ARF, была идентифицирована при ряде раковых заболеваний, как обсуждается в настоящем документе.

Термины «повышенный» или «увеличенный» включают в себя 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 исследованию для обнаружения приемлемого белка или маркера, характерного для повышенной регуляции биомаркеров 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 делеции (утраты) p14ARF, или, как правило, биомаркеры по изобретению, широко обсуждаемые в настоящем документе. Термин маркер также включает маркеры, характерные для повышенной регуляции MDM2/p53 или повышенной регуляции или пониженной регуляции биомаркеров, описанных в настоящем документе, включая уровни белка, состояние белка и уровни мРНК вышеупомянутых белков. Амплификация гена включает в себя более 7 копий, а также увеличение на 2–7 копий.

Термины «сниженный», «истощенный» или «уменьшенный» включают в себя пониженную экспрессию или уменьшенную экспрессию, включая понижающую регуляцию (т. е. уменьшение числа копий гена), цитогенетическую aberrацию и

пониженную экспрессию за счет транскрипционного эффекта. Таким образом, пациента можно подвергать диагностическому исследованию для обнаружения 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  
10 мочи.

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

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

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

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

30 Методы идентификации и анализа цитогенетической аберрации, генетической амплификации, делеций, понижающей регуляции, мутаций и повышающей регуляции

белков известны специалисту в данной области. Методы скрининга могут включать, без ограничений, стандартные методы, такие как анализ последовательности ДНК с помощью традиционных методов Сэнгера или секвенирования следующего поколения, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР), секвенирование РНК (RNAseq), анализы nCounter близости РНК по гибридизации нанострун или гибридизация *in situ*, например 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 пациента. В другом варианте экспрессию генов анализируют в образце от пациента, например в отношении аберрации гена, используя такие методы, как FISH. Методы оценки изменений в копиях генов включают в себя методики, обычно применяемые в цитогенетических лабораториях, такие как МЛРА (мультиплексная амплификация лигированных зондов), обнаружение аномального количества копий методом мультиплексной ПЦР или другие методы ПЦР, которые могут обнаруживать амплификацию, усиление и удаление генов.

При скрининге с помощью ОТ-ПЦР уровень мРНК в опухоли оценивают посредством создания кДНК-копии мРНК с последующей амплификацией кДНК методом ПЦР. Способы амплификации ПЦР, выбор праймеров и условия амплификации известны специалисту в данной области. Манипуляции с 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 Sambrook et al., (2001), 3rd Ed, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Альтернативно можно использовать коммерчески доступный набор для ОТ-ПЦР (например, Roche Molecular Biochemicals) или методологию, изложенную в патентах США №№ 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659, 5,272,057, 5,882,864 и 6,218,529 и включенную в настоящий документ посредством ссылки. Мутации, например, в генах, описанных в настоящем 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) (см. 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 подлежащей анализу ткани; (2) обработка образца перед гибридизацией для увеличения доступности целевой нуклеиновой кислоты и уменьшения неспецифического связывания; (3) гибридизация смеси нуклеиновых кислот с нуклеиновой кислотой в биологической структуре или ткани; (4) промывки после гибридизации для удаления фрагментов нуклеиновых кислот, не связанных в гибридизации, и (5) обнаружение гибридизированных фрагментов нуклеиновой кислоты. Зонды, используемые в таких применениях, обычно метят, например, радиоизотопами или флуоресцентными репортерами. 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 (-ами) 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 *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*.

25 Методы профилирования экспрессии генов описаны в (DePrimo et al. (2003), *BMC Cancer*, 3:3). Вкратце, протокол выглядит следующим образом: синтезируют двухцепочечную кДНК из общей РНК, используя олигомер (dT)<sub>24</sub> для примирования 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 фрагментируют в соответствии с протоколами, описанными Affymetrix (Santa Clara, CA, США), а затем гибридизуют в течение ночи на матрицах генома человека. Альтернативно для обнаружения полиморфизмов в популяции могут

30

использоваться массивы однонуклеотидного полиморфизма (SNP), представляющие собой тип микроматрицы ДНК.

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

5 Альтернативно белковые продукты, экспрессированные из мРНК, можно анализировать посредством 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 известных в данной области методов для обнаружения специфических белков, например, капиллярного электрофореза. Методы обнаружения будут включать использование сайт-специфических антител. Специалисту в данной области будет  
10 понятно, что все такие хорошо известные методики для обнаружения повышения регуляции MDM2 и p53, обнаружения вариантов или мутантов MDM2 или p53, или утраты отрицательных регуляторов MDM2 (например, p14ARF), или генов, описанных в настоящем документе, применимы в настоящем случае. В частности, уровни описанных в настоящем документе генов можно измерять с помощью иммуногистохимии. Экспрессию в цитоплазме можно оценивать посредством окрашивания опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления один или оба белковых биомаркера по изобретению анализируют, используя эти методики. В некоторых вариантах  
20 осуществления один или более субстратов биомаркеров 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  
25 выявлять в образце ткани, например, опухолевой ткани, посредством 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 биомаркер DDR, следует  
30 понимать, что существуют различные аналитические методы, доступные для

определения, такие как ИФА, иммунотурбидиметрия, быстрая иммунодиффузия и визуальная агглютинация.

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

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

Иммуногистохимия (ИГХ) является важным методом обнаружения биомаркеров.  
15 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  
20 клиническую практику. Например, в клинической практике используется несколько валидированных ИГХ анализов, таких как анализы для обнаружения 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 вычислении оценки по  
25 шкале HSCORE выполняют суммирование процента площади, окрашенной на каждом уровне интенсивности, с умножением на взвешенную интенсивность (например, 1, 2 или 3; где 0 означает отсутствие окрашивания, 1 — слабое окрашивание, 2 — умеренное окрашивание, а 3 — сильное окрашивание) окрашивания [McCarty et al: Cancer Res 1986, 46:4244s-4248s]. В целях валидации анализа эти анализы часто проводят на образцах,  
30 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 будут одинаково применимы при обнаружении других описанных в настоящем документе генов. В некоторых вариантах осуществления обнаружение повышенных уровней генов, описанных в настоящем документе, включает анализ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), или прямое секвенирование нуклеиновых кислот, или гибридизацию с зондом на основе нуклеиновой кислоты, специфичным для генов.

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

*Ex-vivo* функциональные анализы также можно использовать в соответствующих случаях, например, для измерения циркулирующих лейкозных 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 получении лекарственного 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 настоящего изобретения включает антагонист MDM2 для применения в профилактике или лечении рака у пациента, выбранного из субпопуляции, характеризующейся потерей одного или более биомаркеров DDR.

Другой аспект настоящего изобретения включает антагонист MDM2 для применения в профилактике или лечении рака у пациента, выбранного из субпопуляции, характеризующейся p53 дикого типа и потерей одного или более биомаркеров DDR.

Другой аспект настоящего изобретения включает антагонист MDM2 для применения в профилактике или лечении рака у пациента, характеризующегося потерей отрицательного регулятора MDM2, такого как p14ARF, и потерей одного или более биомаркеров DDR.

5 МРТ-определение нормализации сосуда (например, с использованием градиентного эхо-сигнала МРТ, спинного эхо-сигнала и усиления контраста для измерения объема крови, относительного размера сосуда и проницаемости сосудов) в сочетании с циркулирующими биомаркерами могут также использоваться для идентификации пациентов, подходящих для лечения соединением формулы (I°).

10 Таким образом, дополнительным аспектом изобретения является способ диагностики и лечения болезненного состояния или патологического состояния, опосредованного MDM2/p53, который включает (i) скрининг пациента для 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 такой восприимчивостью, последующее введение пациенту антагонистов MDM2 и их подгрупп или примеров, определенных в настоящем 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).

В одном варианте осуществления способ по изобретению дополнительно включает этап скрининга пациента с цитогенетической аберрацией, которая приводит к сверхэкспрессии MDM2, например, пациента, выбранного как отличающегося утратой отрицательного регулятора p14ARF.

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

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

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 настоящем документе. В альтернативном варианте осуществления этап (i) способа включает приведение образца от пациента в контакт с одним или более ПЦР-праймерами для субстратов одного или более 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 настоящем документе. В альтернативном варианте осуществления этап (i) способа включает приведение образца от 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 биомаркеров DDR, можно обнаружить, 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 биомаркера DDR.

В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с антителом к мутанту и (ii) определение уровней одного или более биомаркеров DDR (или их утраты).

Обнаружение делеций и мутаций биомаркеров DDR можно проводить посредством выделения ДНК из образца пациента, например, биопсии опухоли, амплификации посредством ПЦР и секвенирования ДНК с применением 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 биомаркера DDR и (ii) определение наличия или отсутствия мутации или делеции биомаркера DDR. В альтернативном варианте осуществления этап (i) способа включает приведение образца от пациента в  
5 контакт с одним или более ПЦР-праймерами для субстратов одного или более биомаркеров.

В одном варианте осуществления способ включает: (i) приведение образца от пациента в контакт с антителом к биомаркеру DDR и (ii) определение наличия или отсутствия мутации или делеции биомаркера DDR. В альтернативном варианте осуществления этап  
10 (i) способа включает приведение образца от пациента в контакт с антителом к субстрату биомаркера.

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

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

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

25 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, флуоресцентный зонд.

### Выбор пациентов

30 Следует понимать, что для пациента, выбранного для лечения антагонистом MDM2 в соответствии с изобретением, будут проведены тестирования или будут проведены

измерения на один или более биомаркеров DDR в соответствии с методикой, описанной в предыдущем разделе.

Например, такой отобранный пациент будет иметь:

5 сниженную или низкую экспрессию или активность одного или более биомаркеров DDR.

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

В одном варианте осуществления отобранный больной раком пациент ранее не проходил лечение антагонистом MDM2. В одном варианте осуществления отобранный 10 пациент ранее не демонстрировал ответ на терапию антагонистом MDM2.

В некоторых вариантах осуществления профиль экспрессии нуклеиновой кислоты (например, сигнатура гена IFN) определяют с помощью ПЦР, HTG EdgeSeq или количественного анализа экспрессии генов, такого как NanoString nCounter. В некоторых вариантах осуществления профиль экспрессии белка (например, продукта 15 гена пути DDR или, например, BAP1 и/или CDKN2A) определяют с помощью иммуноанализа.

#### *Необязательная генная сигнатура интерферона (IFN)*

Повышенное повреждение ДНК может индуцировать ответ интерферона. Это можно определить с помощью «сигнатуры интерферона». Экспрессию этих белков обычно 20 определяют посредством измерения мРНК-транскриптов.

В одном варианте осуществления пациент или образец будут иметь:

сниженную или низкую экспрессию или активность одного или более биомаркеров DDR; и

25 повышенную экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти или более генов сигнатуры интерферона.

В одном варианте осуществления повышенная экспрессия одного, двух, трех, четырех, пяти или более генов сигнатуры интерферона представляет собой повышенную или высокую экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти или более из CXCL10, CXCL11, RSAD2, MX1, BATF2, IFI44L, IFITM1, ISG15, CMPK2, IFI27, CD74, IFIH1, CCRL2, 30 IFI44, HERC6, ISG20, IFIT3, HLA-C, OAS1, IFI35, IRF9, EPSTI1, USP18, BST2, CSF1,

C1S, DHX58, TRIM14, OASL, IRF7, LGALS3BP, DDX60, LAP3, LAMP3, PARP12, PARP9, SP110, PLSCR1, WARS, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1 и/или FLI1.

5 В одном варианте осуществления уровень РНК одного или более из CXCL10, CXCL11, RSAD2, MX1, BATF2, IFI44L, IFITM1, ISG15, CMPK2, IFI27, CD74, IFIH1, CCRL2, IFI44, HERC6, ISG20, IFIT3, HLA-C, OAS1, IFI35, IRF9, EPSTI1, USP18, BST2, CSF1, C1S, DHX58, TRIM14, OASL, IRF7, LGALS3BP, DDX60, LAP3, LAMP3, PARP12, PARP9, SP110, PLSCR1, WARS, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1 и/или FLI1 повышен по сравнению с  
10 количеством упомянутой РНК в контрольном образце, полученном от здорового субъекта без рака.

В альтернативном варианте осуществления уровень РНК CXCL10, CXCL11, RSAD2, MX1, BATF2, IFI44L, IFITM1, ISG15, CMPK2, IFI27, CD74, IFIH1, CCRL2, IFI44, HERC6, ISG20, IFIT3, HLA-C, OAS1, IFI35, IRF9, EPSTI1, USP18, BST2, CSF1, C1S,  
15 DHX58, TRIM14, OASL, IRF7, LGALS3BP, DDX60, LAP3, LAMP3, PARP12, PARP9, SP110, PLSCR1, WARS, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1 и/или FLI1 повышен в опухоли по сравнению с количеством упомянутой РНК в неопухоловом образце, полученном от того же пациента.

В одном варианте осуществления рак демонстрирует повышенную экспрессию CXCL10  
20 или CXCL11.

В другом варианте осуществления рак демонстрирует повышенную экспрессию IRF7, IFITM1, IRF9, MX1 или IFI35. В другом варианте осуществления рак демонстрирует повышенную экспрессию одного или более, например двух или более, из IRF7, IFITM1, IRF9, MX1, IFI35, CXCL10 или CXCL11.

25 В одном варианте осуществления рак демонстрирует повышенную экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти или более из: CXCL10, CXCL11, RSAD2, MX1, BATF2, IFI44L, IFITM1, ISG15, CMPK2, IFI27, CD74, IFIH1, CCRL2, IFI44, HERC6, ISG20, IFIT3, HLA-C, OAS1, IFI35, IRF9, EPSTI1, USP18, BST2, CSF1, C1S, DHX58, TRIM14, OASL, IRF7, LGALS3BP, DDX60, LAP3, LAMP3, PARP12, PARP9, SP110, PLSCR1 и WARS.

В одном варианте осуществления рак демонстрирует повышенную экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти или более из IRF7, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-ВМ1, STAT2, RUNX3, SREBF1, IRF9 и FLU.

В другом варианте осуществления рак демонстрирует повышенную экспрессию IRF7, IFITM1, IRF9, MX1 или IFI35.

В другом варианте осуществления рак демонстрирует повышенную экспрессию одного или более, например двух или более, из IRF7, IFITM1, IRF9, MX1, IFI35, CXCL10 или CXCL11.

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

В одном варианте осуществления он повышен или увеличен относительно нормальных уровней.

Верхний предел нормы (ULN) 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 повышенный уровень представляет собой > 1-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом, верхним пределом нормы (ULN) или образцом, полученным от упомянутого 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 любым диапазонам между ними. В одном варианте осуществления повышенный уровень представляет 1–50-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом или ULN. В одном варианте осуществления повышенный уровень является очень высоким, например, > 10-кратной разницей по сравнению с контрольным образцом, ULN или образцом, полученным от упомянутого 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 любым диапазонам между ними. В одном варианте осуществления повышенный уровень представляет 10–1000-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом или ULN. В одном варианте осуществления повышенный уровень представляет 2–10-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом или ULN (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, утрата TP53 дикого типа и биомаркера DDR). В одном варианте осуществления различие в экспрессии генов интерферона в нормальных тканях (источник: GTEch; Nat Biotechnol. 2017 Apr 11;35(4):314-316) для образцов мезотелиомы пациента (источник: TCGA) составляет от более чем 5-кратного до 0,05-кратного (шкала  $\log_2$ ), в частности, имеет место в среднем 1,5-кратное (шкала  $\log_2$ ) увеличение по набору генов.

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» (ULN), связанное с конкретным методом анализа. Такой ULN обычно определяют из имеющей достаточный размер выборки нормальных здоровых субъектов с использованием конкретного метода анализа для измерения концентрации РНК. Затем ULN 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 ULN будут варьироваться в зависимости от конкретного метода анализа, используемого для измерения концентрации, каждый конкретный анализ будет иметь уникальное значение ULN, связанное с этим методом анализа.

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

#### *Анализ биомаркеров DDR*

В одном варианте осуществления уровень белка одного или более биомаркеров DDR снижен по сравнению с количеством упомянутого белка в контрольном образце, полученном от здорового субъекта без рака.

В альтернативном варианте уровень белка одного или более из биомаркеров DDR снижен по сравнению с количеством упомянутого белка в более раннем образце, полученном от того же пациента.

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

Верхний предел нормы (ULN) 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 (ULN) или образцом, полученным от упомянутого 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 любым диапазоном между ними. В одном варианте осуществления сниженный уровень представляет 1–0,01-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом или ULN.

В одном варианте осуществления сниженный уровень является очень низким, например представляет собой > 0,01-кратную разницу по сравнению с контрольным образцом, ULN или образцом, полученным от упомянутого пациента, например, разницу, кратную 0,001 или любым диапазоном между ними. В одном варианте осуществления сниженный уровень равен 0, т. е. полностью отсутствует.

В другом варианте осуществления уровень биомаркера или биомаркеров DDR определяют посредством иммуногистохимии.

Белки, белковые комплексы или протеомные маркеры можно специфически идентифицировать и/или количественно определять различными способами, известными в данной области, 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), 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,  
5 которые определяются аминокислотным составом белка или белкового комплекса, и  
конкретной последовательностью аминокислот.

В одном варианте осуществления экспрессия одного или более биомаркеров DDR  
отсутствует. Образцы, имеющие низкие уровни одного или более биомаркеров DDR,  
могут быть идентифицированы как отрицательные по биомаркерам DDR, например с  
10 утратой биомаркеров DDR.

В одном варианте осуществления утрату одного или более биомаркеров DDR оценивают  
с помощью мутационного анализа, например секвенирования ДНК.

Также можно определить уровни цитоплазматической, а также ядерной экспрессии  
одного или более биомаркеров DDR. Ядерная локализация белка является маркером в  
15 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 иммуноокрашиванию.

Уровни одного или более биомаркеров DDR в цитоплазме также можно измерить с  
20 помощью иммуногистохимии или иммунофлуоресценции.

В одном варианте осуществления уровень одного или более биомаркеров DDR снижен  
по сравнению с количеством упомянутого белка в контрольном образце, полученном от  
здорового субъекта без рака.

В одном варианте осуществления уровень одного или более биомаркеров DDR снижен в  
25 опухоли по сравнению с количеством упомянутого белка в неопухоловом образце,  
полученном от того же пациента.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии одного или более биомаркеров  
DDR 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  
30 некоторых вариантах осуществления обеспечивается снижение на по меньшей мере

50%. В некоторых вариантах осуществления обеспечивается снижение на по меньшей мере 75%.

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

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

#### *Методы количественного определения*

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

(a) приведение образца от пациента в контакт с антителом к одному или более биомаркерам DDR (или одному или более субстратам биомаркеров DDR);

(b) проведение ИФА или иммуногистохимического анализа упомянутого образца;

15 (c) определение уровня одного или более биомаркеров DDR; и

(d) идентификацию пациента как кандидата для лечения антагонистом MDM2, когда (i) уровень одного или более биомаркеров DDR снижен относительно верхнего предела нормы (ULN); или (ii) один или более биомаркеров DDR отсутствуют; или (iii) уровень одного или более биомаркеров  
20 DDR является низким относительно верхнего предела нормы (ULN).

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

(a) приведение образца от пациента в контакт с антителом к одному или более биомаркерам DDR (и/или одному или более субстратам биомаркеров DDR) для  
25 определения уровня экспрессии белка; и/или

(b) приведение образца от пациента в контакт с антителом к одному или более различным биомаркерам DDR для (a) (и/или одному или более субстратам биомаркеров DDR) для определения уровня экспрессии белка;

(с) лечение пациента антагонистом MDM2, когда уровень одного или более биомаркеров DDR снижен относительно верхнего предела нормы (ULN).

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

- 5 (a) приведение образца от пациента в контакт с антителом к одному или более биомаркерам DDR для определения уровня экспрессии белка; и/или
- (b) приведение образца от пациента в контакт с антителом к одному или более биомаркерам DDR для определения уровня экспрессии белка; и/или
- (с) приведение образца от пациента в контакт с множеством
- 10 олигонуклеотидных праймеров, причем упомянутое множество праймеров содержит по меньшей мере одну пару олигонуклеотидных праймеров для любого из одного или более биомаркеров DDR;
- (d) лечение пациента антагонистом MDM2, когда уровень одного или более биомаркеров DDR снижен относительно верхнего предела нормы (ULN).

15 Как правило, отобранный пациент болен раком. Пациента, как правило, выбирают, если у пациента уровень одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце от пациента ниже заданной величины (или отсутствует).

Способ прогнозирования эффективности антагониста MDM2 в отношении рака у пациента включает определение уровня одного или более биомаркеров DDR в

20 биологическом образце от пациента, где уровень одного или более биомаркеров DDR в биологическом образце, который меньше предварительно заданного значения, является прогнозирующим эффективность у пациента.

#### Системы для осуществления способов

В описанных в настоящем документе способах можно использовать систему для

25 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, причем 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, посредством 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 пациент-человек с раком для лечения антагонистом MDM2, содержит:

- (a) средства обнаружения, способные и адаптированные для обнаружения в образце, полученном от пациента-человека, биомаркера или биомаркеров по изобретению. Такие средства известны и легко доступны для специалиста в данной области. Как правило, предусмотрен контейнер для приема в него образца субъекта, причем контейнер снабжен средствами обнаружения;
- (b) процессор, способный и выполненный с возможностью определения из определенных концентраций упомянутых белков вероятности лечения пациента антагонистом MDM2.

Необязательно система содержит пользовательский интерфейс (или соединение данных с удаленным интерфейсом), в частности графический интерфейс пользователя (ГИП), выполненный с возможностью представления информации; ГИП представляет собой

тип пользовательского интерфейса, который позволяет пользователям взаимодействовать с электронными устройствами посредством графических значков и визуальных индикаторов, таких как вторичная нотация, вместо пользовательских интерфейсов на основе текста, условных знаков печатных команд или текстовой навигации (ни один из таких типов интерфейса не исключен в настоящем изобретении); ГИП по существу являются известными и используются, как правило, в портативных мобильных устройствах, таких как MP3-плееры, портативные мультимедиапроигрыватели, игровые устройства, смартфоны и небольшие бытовые, офисные и промышленные системы управления; как было упомянуто, интерфейс необязательно может быть выбран таким образом, чтобы он был пригоден для ввода информации, такой как информация о пациенте.

В одном варианте осуществления система для определения пригодности пациента-человека с раком 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, причем панель биомаркеров содержит один или более биомаркеров по изобретению; и процессор, соединенный с возможностью связи с запоминающим устройством для классификации пациента.

## 20 Наборы

В изобретении также предложен, либо отдельно, либо в качестве части вышеупомянутой системы, набор для обнаружения одного или более биомаркеров по изобретению для оценки вероятности ответа пациента на ингибирование MDM2 для терапии рака. Набор, как правило, содержит один или более реагентов для обнаружения одного или более биомаркеров по изобретению. Эти реагенты могут быть предназначены для прямого обнаружения или непрямого обнаружения биомаркера, например обнаружения соответствующего субстрата.

Как правило, набор содержит два или более или три или более реагентов для обнаружения, каждый из которых направлен на отличный биомаркер по изобретению.

Как обсуждалось выше со ссылкой на способы по изобретению, набор может содержать больше реагентов для обнаружения, например, для других белков. В предпочтительном варианте осуществления реагенты для обнаружения, доступные в наборе, состоят из реагентов для обнаружения 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 упомянутые реагенты для обнаружения. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат зонды для масс-спектрометрии.

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

Такие наборы будут приемлемым образом содержать биосенсор для обнаружения и/или количественного определения одного или более биомаркеров по изобретению, необязательно вместе с инструкциями по применению набора в соответствии с описанной в настоящем документе методологией.

Существуют хорошо зарекомендовавшие себя генетические и биохимические способы характеристики состояния одного или более биомаркеров 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 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 получения лекарственного средства для лечения рака у субъекта.

В одном варианте осуществления в изобретении предложен набор, или панель, или матрица для определения уровня одного или более биомаркеров по изобретению в одном образце от пациента.

30 **БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ**

Было показано, что описанные в настоящем 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 лечения болезненных состояний или патологических состояний, описанных в настоящем 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 для применения в изобретении могут быть полезны для уменьшения или снижения заболеваемости раком.

Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть полезны для лечения взрослой популяции. Соединения по настоящему изобретению могут быть полезны для лечения детской популяции.

Было показано, что описанные в настоящем документе соединения являются хорошими антагонистами образования комплекса MDM2-p53. Соединения, описанные в настоящем 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 настоящем документе, и другие методы, известные в данной области. Более конкретно, соединения формулы (I<sup>o</sup>) и их подгруппы обладают аффинностью к MDM2/p53.

Определенные соединения для применения в изобретении представляют собой соединения, имеющие значения IC<sub>50</sub> менее 0,1 мкМ, в частности менее 0,01 или 0,001 мкМ.

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 заболевания; 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, астму, ХОБЛ, ринит и заболевания верхних дыхательных путей; гиперкератозные заболевания, такие как аутосомный рецессивный врожденный ихтиоз (ARCI); заболевания почек, включая гломерулярные расстройства, хроническое заболевание почек (СКД), воспаление почек, потерю подоцитов, 5 гломерулосклероз, протеинурию и прогрессирующее заболевание почек; сердечно-сосудистые заболевания, например сердечную гипертрофию, рестеноз, аритмию, атеросклероз; инфаркт миокарда, связанный с ишемическим повреждением, повреждение сосудов, инсульт и реперфузионное повреждение; сосудистые пролиферативные заболевания; болезни глаз, такие как возрастная дегенерация макулы, 10 в частности, влажная форма возрастной дегенерации макулы, ишемические пролиферативные ретинопатии, такие как ретинопатия недоношенных (ROP) и диабетическая ретинопатия, и гемангиома.

Предполагается, что вследствие их аффинности к MDM2 соединения могут оказаться полезными для лечения или предотвращения пролиферативных расстройств, таких как 15 рак.

Примеры рака (и их доброкачественных аналогов), которые можно лечить (или ингибировать), включают в себя, без ограничений, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточные карциномы, переходноклеточные карциномы и другие виды 20 карцином), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевыводящих путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая пищевод, желудок (карцинома желудка), тонкую кишку, толстую кишку, кишечник, ободочную и прямую кишку, прямую кишку и задний проход), печени (гепатоцеллюлярная карцинома), желчного пузыря и желчевыводящих путей, экзокринной части поджелудочной железы, почки 25 (например, почечно-клеточная карцинома), легкого (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легкого, немелкоклеточные карциномы легкого, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), головы и шеи (например, рак языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, полости носа и околоносовых пазух), яичника, фаллопиевых труб, брюшины, влагалища, вульвы, 30 полового члена, яичек, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярная карцинома щитовидной железы), головного мозга,

надпочечников, предстательной железы, кожи и прилежащих органов (например, меланома, базальноклеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, кератоакантома, диспластический невус); гематологические злокачественные заболевания (т. е. лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические расстройства и расстройства пограничной

5 злокачественности, включая гематологические злокачественные заболевания и связанные патологические состояния лимфоидного происхождения (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ОЛЛ], хронический лимфоцитарный лейкоз [ХЛЛ], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная В-крупноклеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, мантийноклеточная лимфома,

10 Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы из натуральных киллерных клеток [NK], лимфомы Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональная гаммапатия неопределенной значимости, плазмоцитома, множественная миелома и посттрансплантационные лимфопролиферативные расстройства), и гематологические злокачественные заболевания и родственные патологические состояния миелоидного

15 происхождения (например, острый миелогенный лейкоз [AML], хронический миелогенный лейкоз [СМЛ], хронический миеломоноцитарный лейкоз [СММЛ], гиперэозинофильный синдром, миелопролиферативные расстройства, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелопролиферативный синдром, миелодиспластический синдром и

20 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, гастроинтестинальные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные

25 гистиоцитомы и взрывающаяся дерматофибросаркома; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы (например, глиомы), невромы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли шишковидной железы и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли паращитовидной железы,

30 карциноидные опухоли и медуллярная карцинома щитовидной железы); опухоли глаз и придаточных органов (например, ретинобластома); герминогенные и трофобластические опухоли (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы,

хорионаденомы и хориокарциномы); и детские и эмбриональные опухоли (например, медуллобластома, нейробластома, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают пациента восприимчивым к злокачественным опухолям (например, пигментная ксеродерма).

Рост клеток является строго контролируемой функцией. Рак, представляющий собой патологическое 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 (запрограммированной гибели клеток), некроза или аноиксиса. 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.

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 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 разрушению тканей посредством инвазивной пролиферации кровеносных сосудов. Было обнаружено, что рост и метастазирование опухолей зависят от ангиогенеза. Таким образом, соединения для применения в 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 для применения в 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 по настоящему изобретению, включают в себя первичные опухоли (т. е. раковые клетки в месте возникновения), локальную инвазию (раковые клетки, которые проникают и инфильтрируют окружающие нормальные ткани в локальной области) и метастатические (или вторичные) опухоли, т. е. опухоли, которые образовались из злокачественных клеток, циркулирующих в кровотоке (гематогенное распространение), или через лимфатическую систему, или через полости тела (трансцеломическое) в другие участки и ткани организма. В частности, соединения для применения в изобретении могут быть полезны при лечении метастазирования и метастатических раковых заболеваний.

В одном варианте осуществления гематологические злокачественные заболевания представляют собой лейкоз. В другом варианте осуществления гематологические злокачественные заболевания представляют 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.

- 5 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, применяемое в изобретении, предназначено для применения в профилактике или лечении гематологических злокачественных заболеваний (т. е. лейкозов, лимфом) и предраковых гематологических расстройств и расстройств пограничной злокачественности, включая гематологические злокачественные заболевания и связанные патологические состояния лимфоидного происхождения (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ОЛЛ], хронический лимфоцитарный лейкоз [ХЛЛ], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная В-крупноклеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, мантийноклеточная лимфома, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы из натуральных киллерных клеток [NK], лимфомы Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональная гаммопатия неопределенной значимости, плазмоцитомы, множественная миелома и посттрансплантационные лимфопролиферативные расстройства), и гематологические злокачественные заболевания и родственные патологические состояния миелоидного происхождения (например, острый миелогенный лейкоз [AML], хронический миелогенный лейкоз [CML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелолиферативные расстройства, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелолиферативный 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.

- 5 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-функциональные опухоли. В одном варианте осуществления это заболевание, подлежащее лечению, представляет собой p53-функциональную солидную опухоль и гематологические злокачественные заболевания. 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 стромальную опухоль ЖКТ (GIST), 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.

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

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

В одном варианте осуществления рак представляет собой детский рак.

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

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

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

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

Субъекты с анемией Фанкони имеют повышенный риск развития острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), плоскоклеточной карциномы или опухолей головы, шеи, кожи, желудочно-кишечного тракта или половой системы.

20 Дефицит гомологичной рекомбинации (HRD) усиливается при раке предстательной железы, яичника, молочной железы и гинекологическом раке. Таким образом, в одном варианте осуществления рак представляет собой рак предстательной железы, яичника, молочной железы или гинекологический рак. В одном варианте осуществления рак с дефицитом пути HRR (HRD) представляет собой рак предстательной железы, яичника, молочной железы или гинекологический рак.

25 Обогащение MSI-H наблюдается при раке толстой кишки, раке желудка и гинекологическом раке. Таким образом, в одном варианте осуществления рак представляет собой рак толстой кишки, рак желудка и гинекологический рак.

Определенные виды рака резистентны к лечению конкретными лекарственными средствами. 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 посредством сенсбилизации 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 препаратов с потенциалом для: (i) сенсбилизации злокачественных клеток к противораковым лекарственным средствам и/или лечению; (ii) ослабления или уменьшения частоты резистентности к противораковым лекарственным средствам и/или лечению; (iii) обращения устойчивости к противораковым лекарственным средствам и/или лечению; (iv) усиления активности противораковых лекарственных средств и/или лечения; (v) задержки или предотвращения наступления резистентности к противораковым лекарственным средствам и/или лечению.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложено соединение для применения при 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 копий MDM2 и/или p53 дикого типа.

- 5 В дополнительном аспекте предложено применение соединения для получения лекарственного средства для лечения заболевания или патологического состояния, описанного в настоящем документе, в частности, рака.

В одном варианте осуществления предложено соединение для применения 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 определенного соединения.

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

## **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОСТАВЫ**

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 смешивания) по меньшей мере один антагонист MDM2, включая одно соединение формулы (I<sup>o</sup>) (и его подгруппы по определению в настоящем документе), вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами и необязательно другие терапевтические или профилактические агенты, описанные в настоящем документе.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты могут быть выбраны, например, из носителей (например, твердого, жидкого или полутвердого носителя), адъювантов,

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 настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый» относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках медицинского суждения являются приемлемыми 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 соединения формулы (I<sup>o</sup>), могут быть приготовлены в соответствии с известными методиками, описанными, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, США.

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 посредством инъекции, инфузии или 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, адаптированные 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, 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 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 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 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 посредством лиофилизации антагониста MDM2, включая соединение формулы (I<sup>o</sup>), или его подгрупп. Лиофилизация относится к процедуре сушки композиции замораживанием. Таким образом, сушка вымораживанием и лиофилизация используются в настоящем документе как синонимы.

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

Композиции по настоящему изобретению могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено посредством 15 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 инъекционной фармацевтической формы может быть достигнута включением агентов, замедляющих абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

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

В другом типичном варианте осуществления фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для подкожного (п/к) введения.

Фармацевтические лекарственные формы, пригодные для перорального введения, включают таблетки (с покрытием или без покрытия), капсулы (с твердой или мягкой 30 оболочкой), каплеты, пилюли, пастилки, сиропы, растворы, порошки, гранулы,

эликсиры и суспензии, сублингвальные таблетки, облатки или пластыри, такие как буккальные пластыри.

Таким образом, композиции в таблетках могут содержать однократную дозировку активного соединения вместе с инертным разбавителем или носителем, таким как сахар или сахарный спирт, например; лактоза, сахароза, сорбит или маннит; и/или не полученный из сахара разбавитель, такой как карбонат натрия, фосфат кальция, карбонат кальция или целлюлоза или ее производные, такие как микрокристаллическая целлюлоза (МСС), 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 настоящем документе.

Таблетки могут быть выполнены с возможностью высвобождения лекарственного средства либо при контакте с жидкостями желудка (таблетки немедленного высвобождения), либо высвобождения контролируемым образом (таблетки с контролируемым высвобождением) в течение длительного периода времени или в конкретной области ЖКТ.

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 дозированные формы (например, таблетки, капсулы и т. д.) могут иметь покрытие или быть без покрытия. 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 pH в желудочно-кишечном тракте, тем самым избирательно высвобождая соединение в желудке или в подвздошной кишке, двенадцатиперстной кишке, тощей кишке или толстой кишке.

Вместо покрытия или в дополнение к покрытию лекарственное средство может быть представлено в твердой матрице, содержащей агент, контролирующей высвобождение, например, агент, задерживающий высвобождение, который может быть адаптирован для высвобождения соединения контролируемым образом в желудочно-кишечном тракте.

Альтернативно лекарственное средство может быть представлено в полимерном покрытии, например, в полиметакрилатном полимерном покрытии, которое может быть адаптировано для селективного высвобождения соединения в условиях переменной кислотности или щелочности в желудочно-кишечном тракте. Альтернативно материал матрицы или покрытие, замедляющее высвобождение, может иметь форму разлагаемого полимера (например, полимера на основе малеинового ангидрида), который по существу непрерывно разлагается при прохождении дозированной формы через желудочно-кишечный тракт. В другом в альтернативном варианте покрытие может быть разработано для разложения под действием микробов в кишечнике. 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 способами, хорошо известными специалистам в данной области.

Антагонист MDM2, включая соединение формулы (I<sup>o</sup>), можно составлять в смеси 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 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.

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 приблизительно 20% (масс./масс.) до приблизительно 90% (масс./масс.) активного ингредиента и от 80% (масс./масс.) до 10% фармацевтически приемлемого эксципиента или комбинации эксципиентов. Фармацевтические композиции содержат от приблизительно 1% до приблизительно 95%, обычно от приблизительно 20% до приблизительно 90% активного ингредиента. Фармацевтические композиции в соответствии с изобретением могут быть, например, в форме однократной дозы, такой как ампулы, флаконы, суппозитории, предварительно наполненные шприцы, драже, порошки, таблетки или капсулы.

Фармацевтически приемлемый (-ые) эксципиент (-ы) может (могут) быть выбран (-ы) в соответствии с желаемой физической формой состава и может (могут) быть, например, выбран (-ы) из разбавителей (например, твердых разбавителей, таких как наполнители или объемообразующие средства; и жидких разбавителей, такие как растворители и соразтворители), разрыхлителей, буферных агентов, смазывающих веществ, агентов для повышения текучести, агентов, контролирующих высвобождение (например, замедляющих высвобождение полимеров или восков), связующих веществ, гранулирующих агентов, пигментов, пластификаторов, антиоксидантов, консервантов, ароматизаторов, корригентов вкуса, веществ, регулирующих тоничность, и средств для нанесения покрытия.

Квалифицированный специалист будет иметь опыт, позволяющий выбрать подходящее количество ингредиентов для применения в упомянутых 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 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 посредством 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  
15 отмеренных количествах.

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  
20 использования в фармацевтической 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 данном изобретении также предложены твердые лекарственные формы, содержащие твердый раствор, описанный в настоящем документе. Твердые лекарственные формы  
25 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 (а) разрыхлителем и смазывающим веществом, или (b) разрыхлителем, смазывающим веществом и поверхностно-активным веществом. Кроме  
30 того, капсула может содержать объемобразующий агент, такой как лактоза или

микрокристаллическая 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  
5 объемобразующим агентом, смазывающим веществом и, при желании, с дополнительным подсластителем (таким как искусственный подсластитель) и подходящими вкусовыми веществами. Твердые растворы также могут быть получены посредством распыления растворов лекарственного средства и подходящего полимера на поверхность инертных носителей, таких как сахарные шарики (сахарная крупка  
10 нонпарель). Эти шарики впоследствии могут быть заполнены в капсулы или спрессованы в таблетки.

Фармацевтические составы могут быть представлены пациенту в «упаковках для пациентов», содержащих полный курс лечения в одной упаковке, обычно в блистерной упаковке. Упаковки для пациентов имеют преимущество перед традиционными  
15 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.

20 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 пессарии и суппозитории, которые могут быть, например, сформированы из формуемого  
25 или воскообразного материала, содержащего активное соединение. Для ректального введения могут также применяться растворы активного соединения.

Композиции для введения посредством 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  
30 устройств для распыления аэрозоля. Такие устройства хорошо известны. Для введения

посредством ингаляции порошкообразные составы обычно содержат активное соединение вместе с инертным твердым порошкообразным разбавителем, таким как лактоза.

5 Антагонист MDM2, включая соединения формулы (I°), будет по существу представлен в единичной лекарственной форме и, следовательно, как правило, будет содержать достаточное количество соединения для обеспечения необходимого уровня биологической активности. Например, состав может содержать от 1 нанограмма до 2 граммов активного ингредиента, например, от 1 нанограмма до 2 миллиграммов активного ингредиента. В пределах этих диапазонов, конкретные поддиапазоны  
10 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 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).

15 Для пероральных композиций стандартная лекарственная форма может содержать от 1 миллиграмма до 2 граммов, чаще от 10 миллиграммов до 1 грамма, например, от 50 миллиграммов до 1 грамма, например, от 100 миллиграммов до 1 грамма, активного соединения.

20 Активное соединение будут вводить нуждающемуся в этом пациенту (например, человеку или животному) в количестве, достаточном для достижения необходимого терапевтического эффекта.

#### Комбинации с другими противораковыми агентами

Антагонист MDM2 по определению в настоящем документе можно применять для профилактики или лечения ряда болезненных состояний или патологических состояний,  
25 опосредованных MDM2/p53. Примеры таких болезненных состояний и патологических состояний описаны выше.

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, угрожающих жизни) преимущества введения соединения, используемого в изобретении (например, соединения формулы (I<sup>o</sup>)), 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. Альтернативно их можно вводить непрерывно или способом, который обеспечивает интервальное введение (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 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<sup>o</sup>) можно вводить ежедневно или повторно, например, каждые 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 10, или 14, или 21, или 28 дней.

Дозировки можно также выразить как количество вводимого лекарственного средства 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 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 формулы (I<sup>o</sup>) можно вводить ежедневно или повторно, например, каждые 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 10, или 14, или 21, или 28 дней.

Соединения согласно настоящему изобретению 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 примеры доз включают 10, 20, 50 и 80 мг. Соединение можно вводить один или более одного раза каждый день.

5 Соединение можно вводить непрерывно (т. е. принимать каждый день без перерыва в течение всей схемы лечения). Альтернативно соединение можно вводить интервально (т. е. принимать непрерывно в течение определенного периода времени, такого как неделя, затем прекращать прием на период времени, такой как неделя, и затем принимать непрерывно в течение другого периода времени, такого как неделя, и так

10 далее в течение всей схемы лечения). Примеры схем лечения с периодическим введением включают в себя схемы, в которых введение осуществляют циклами с одной неделей с введением, одной неделей без введения; или двумя неделями с введением, одной неделей без введения; или тремя неделями с введением, одной неделей без введения; или двумя неделями с введением, двумя неделями без введения; или четырьмя

15 неделями с введением, двумя неделями без введения; или одной неделей с введением, тремя неделями без введения — для 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 и отсутствие введения дозы в течение от 1 до 6

20 дней с повторением этой схемы 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 осуществления соединения, применяемые в изобретении, можно

25 вводить в количествах от 3 мг/м<sup>2</sup> до 125 мг/м<sup>2</sup> ежедневно. Лечение может представлять собой непрерывное ежедневное введение дозы или чаще состоять из множества циклов лечения, разделенных перерывами в лечении. Одним из примеров единичного цикла лечения является 5 последовательных ежедневных доз, за которыми следуют 3 недели без лечения.

30 Один конкретный режим дозирования представляет собой один раз в день (например, перорально) в течение недели (например, 5 дней лечения) с последующим перерывом в

лечении на 1, 2 или 3 недели. Альтернативный режим дозирования представляет собой один раз в неделю (например, перорально) в течение 1, 2, 3 или 4 недель.

5 В одном конкретном режиме дозирования пациенту будут проводить инфузию соединения формулы (I<sup>o</sup>) в течение одного часа ежедневно на протяжении до десяти дней, в частности до пяти дней в течение одной недели, причем лечение будут повторять через необходимый интервал времени, такой как от двух до четырех недель, в частности каждые три недели.

10 Более конкретно, пациенту могут проводить инфузию соединения формулы (I<sup>o</sup>) в течение одного часа ежедневно в течение 5 дней и повторять лечение каждые три недели.

В другом конкретном режиме дозирования 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.

15 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 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  
20 течение недели (или нескольких дней), отсутствие введения дозы в течение недели (или нескольких дней), причем схему повторяют в течение цикла лечения.

В дополнительном конкретном режиме дозирования 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.

25 В конечном итоге количество вводимого соединения и тип применяемой композиции будут соответствовать природе заболевания или физиологического патологического состояния, лечение которого проводят, и будут определены по усмотрению врача.

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. 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 настоящем 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 патологических 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, без ограничений:

- ингибиторы топоизомеразы I,
- антиметаболиты,
- агенты, нацеленные на тубулин,
- ДНК-связывающие агенты и ингибиторы топоизомеразы II,
- алкилирующие агенты,
- моноклональные антитела,
- антигормональные агенты.
- ингибиторы передачи сигнала
- ингибиторы протеасом,
- ингибиторы ДНК-метилтрансферазы,
- цитокины и ретиноиды,

- нацеленные на хроматин терапевтические средства,
- лучевую терапию и
- другие терапевтические или профилактические агенты.

Конкретные примеры противоопухолевых агентов или адъювантов (или их солей) включают, без ограничений, 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 (Абраксан™), доцетаксел, кабазитаксел или ларотаксел;
- (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, винкристин, липосомальный винкристин (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, азациитидин, цитарабин, флоксуридин, пентостатин, тиогуанин, тиопурин, б-меркаптопурин или гидроксимочевина (гидроксикарбамид);
- (viii) алкилирующие агенты, такие как азотистый иприт или нитромочевина, например, циклофосфамид, хлорамбуцил, кармустин (BCNU), бендамустин, тиотепа, мелфалан, тресульфат, ломустин (CCNU), альтретамин, бусульфат, дакарбазин, эстрамустин, фотемустин, ифосфамид (необязательно в сочетании с месной), пипоброман, прокарбазин, стрептозоцин, темозоломид, урацил, мехлорэтамин, метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевина или нимустин (ACNU);

- (ix) антрациклины, антрацендионы и родственные лекарственные средства, например, даунорубицин, доксорубицин (необязательно в комбинации с дексразоксаном), липосомальные составы доксорубицина (например, Caelyx™, Myocet™, Doxil™), 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, азациитидин или децитабин; (xii) антифолаты, например метотрексат, динатрий пеметрексед или ралтитрексед;
- (xiii) цитотоксические антибиотики, например антиномицин D, блеомицин, митомицин С, дактиномицин, карминомицин, дауномицин, левамизол, пликамицин или митрамицин;
- (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 тромбоцитарного фактора роста), ингибиторы Axl, MTKI (мультитаргетные ингибиторы киназ), ингибиторы Raf, ингибиторы ROCK, ингибиторы mTOR, ингибиторы MEK или ингибиторы PI3K) например иматиниба мезилат, эрлотиниб, gefитиниб, дазатиниб, лапатиниб, довотиниб, акситиниб, нилотиниб, вандетаниб, ваталиниб, пазопаниб, сорафениб, сунитиниб, темсиролимус, 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, идедалисиб (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),  
5 ТАК-901, МК0457 (VX680), ценисертиб (R-763), данусертиб (РНА-739358), алисертиб (MLN-8237) или МР-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), РНА533533, ZK-304709  
10 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  
15 forkhead), API-2/TCN (трицирибин), RX-0201, энзастаурин HCl (LY317615),  
NL-71, 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,  
20 17-диметиламиноэтиламино-17-десметоксигелданамицина гидрохлорид  
(17-DMAG), например, NSC-707545 и Kos-1022, NVP-AUY922 (VER-52296),  
NVP-VEP800, CNF-2024 (ВІВ-021, пероральный пурин), ганетеспиб  
(STA-9090), SNX-5422 (SC-102112) или IPI-504;

(xx) моноклональные антитела (неконъюгированные или конъюгированные с  
25 радиоизотопами, токсинами или другими агентами), производные антител и  
родственные агенты, такие как антитела к CD, антитела к VEGFR, антитела к  
HER2 или антитела к EGFR, например ритуксимаб (CD20), офатумумаб (CD20),  
ибритумомаб тиуксетан (CD20), GA101 (CD20), тозитумомаб (CD20),  
эпратузумаб (CD22), линтузумаб (CD33), гемтузумаб озогамидин (CD33),  
30 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 (EpCAM и CD3), абаговомаб (CA125), фарлетузумаб (фолатный рецептор), элотузумаб (CS1), деносумаб (лиганд RANK), фигитумумаб (IGF1R), CP751,871 (IGF1R), мапатумумаб (рецептор TRAIL), metMAB (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), MK-3475 (пембролизумаб, ранее ламбролизумаб, антитело к PD-1), ниволумаб (антитело к PD-1), BMS-936559 (антитело к PD-L1), MPDL320A, AMP-514 или MEDI4736 (антитело к PD-L1) или тремелимумаб (ранее тицилимумаб, CP-675,206, антитело к 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 средства, такие как экземестан, анастрозол, летразол, тестолактон, аминоглютетимид, 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, диэтилстилбестрол (также известный как диэтилстилбоэстро́л) или октреотид;
- (xxv) мтероиды, 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;
- (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;
- (xxix) дифференцирующие агенты, такие как ретиноиды, рексиноиды, витамин D или ретиноевая кислота, и агенты, блокирующие метаболизм ретиноевой кислоты (RAMBA), например аккутан, алитретиноин, бексаротен или третиноин;

- (xxx) ингибиторы фарнезилтрансферазы, например типифарниб;
- (xxxi) варианты терапии, нацеленные на хроматин, такие как ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), например бутират натрия, субероиланилидгидроксамидная кислота (SAHA), депсипептид (FR 901228), дацинонат (NVP-LAQ824), R306465/JNJ-16241199, JNJ-26481585, трихостатин А, воринонат, хламидоцин, А-173, JNJ-MGCD-0103, PXD-101 или апицидин;
- 5 (xxxii) лекарственные средства, нацеленные на убиквитин-протеасомный путь, включая ингибиторы протеасом, например бортезомиб, карфилзомиб, CEP-18770, MLN-9708 или ONX-0912; ингибиторы NEDD8; антагонист HDM2 и
- 10 деубиквитиназы (DUB);
- (xxxiii) фотодинамические лекарственные средства, например порфирин натрия или темопорфин;
- (xxxiv) противораковые агенты, полученные из морских организмов, такие как трабектидин;
- 15 (xxxv) радиоактивно меченые лекарственные средства для радиоиммунотерапии, например с изотопом, излучающим бета-частицы (например, йод-131, иттрий-90), или изотопом, излучающим альфа-частицы (например, висмут-213 или актиний-225), например, ибритумомаб, тозитумомаб йода или альфа-радий 223;
- 20 (xxxvi) ингибиторы теломеразы, например теломестатин;
- (xxxvii) ингибиторы матриксных металлопротеиназ, например, батимастат, маримастат, принонат или метанат;
- (xxxviii) рекомбинантные интерфероны (такие как интерферон- $\gamma$  и интерферон  $\alpha$ ) и интерлейкины (например, интерлейкин 2), например альдеслейкин, денилейкин
- 25 дифтитокс, интерферон-альфа 2a, интерферон-альфа 2b или пэгинтерферон-альфа 2b;
- (xxxix) селективные модуляторы иммунной реакции, например талидомид или леналидомид;
- (xl) терапевтические вакцины, такие как sipuleucel-T (Provenge) или OncoVex;
- 30 (xli) цитокин-активирующие агенты, включая пицибанил, ромуртид, сизофиран, вирулизин или тимозин;
- (xlii) триоксид мышьяка;

- (xlii) ингибиторы рецепторов, связанных с G-протеином (GPCR), например, атрасентан;
- (xliii) ферменты, такие как L-аспарагиназа, пэгаспаргаза, расбуриказа или пэгадемаза;
- (xliv) ингибиторы репарации ДНК, такие как ингибиторы PARP, например олапариб, веллапариб, инипариб, INO-1001, AG-014699 или ONO-2231;
- (xlv) 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;
- (xlvi) средства для иммунотерапии, такие как иммунные ингибиторы контрольной точки; противораковые вакцины и терапия CAR-T-клетками;
- (xlvii) регуляторы клеточной гибели (апоптоза), включая антагонисты Bcl-2 (В-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);
- (xlviii) профилактические агенты (добавки); т. е. агенты, которые 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, 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 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,
- 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 соматостатина, например, октреотида ацетат,
- антитоты к лекарственным средствам, снижающим уровни фолиевой кислоты, такие как лейковорин или фолиновая кислота,
- обезболивающие средства, например опиаты, такие как морфин, диаморфин и фентанил,
- нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), такие как ингибиторы COX-2, например целекоксиб, эторикоксиб и лумиракоксиб,
- агенты против мукозита, например палифермин,
- агенты для лечения побочных эффектов, включая анорексию, кахексию, отек или тромбозмболические эпизоды, такие как мегестрола ацетат.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с пунктами (i)–(xlix) ниже. В одном варианте осуществления биомаркер (-ы) по изобретению можно использовать для выбора 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 генов или продуктов генов пути DDR, 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 ATM, ATRX, BRCA1 и/или BRCA2 и/или нормальный или низкий уровень MSI, и лечат ее антагонистом MDM2 в комбинации с дополнительным противораковым агентом. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента характеризуется наличием ATM, ATRX, BRCA1 и/или BRCA2 дикого типа и/или нормальным уровнем или высокими уровнями экспрессии генов ATM, ATRX, BRCA1 и/или BRCA2, и лечат ее антагонистом MDM2 в сочетании с одним или более из перечисленных выше в (i) – (xlix) агентов.

В одном варианте осуществления биомаркер (-ы) по изобретению можно применять для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с одним или более из перечисленных выше в (i) – (xlix) агентов.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с повреждающими ДНК агентами, такими как химиотерапия и радиотерапия.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с иммунными ингибиторами контрольной точки для лечения опухолей MSI-H.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с рекомбинантными интерферонами (такими как интерферон- $\gamma$  и интерферон- $\alpha$ ) 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 нормальные или высокие уровни генов или продуктов генов пути DDR, и лечат ее антагонистом MDM2 в комбинации с одним или более рекомбинантными интерферонами.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с ингибиторами репарации ДНК, такими как ингибиторы PARP, например олапарибом, велапарибом, инипарибом, INO-1001, AG-014699 или ONO-2231. В одном варианте осуществления ингибитор PARP выбран из ингибиторов PARP, например олапариба, рукапариба,

велипариба, инипариба, INO-1001, AG-014699, ONO-2231; или талазопариба. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальные или высокие уровни генов или продуктов генов пути DDR, и лечат ее антагонистом MDM2 в комбинации с ингибитором PARP. В одном варианте осуществления PARP*i* представляет собой нирапариб, олапариб, рукапариб, велипариб, инипариб, INO-1001, AG-014699, ONO-2231; или талазопариб. В одном варианте осуществления PARP*i* представляет собой нирапариб, олапариб, рукапариб или талазопариб. В одном варианте осуществления PARP*i* представляет собой олапариб. В одном варианте осуществления PARP*i* представляет собой талазопариб. В одном варианте осуществления PARP*i* представляет собой стенопариб или памипариб.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с антагонистами IAP, включая LCL-161 (Novartis), Debio-1143 (ксевинапант) (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, например, выбран из LCL-161 (Novartis), Debio-1143 (Debiopharma/Ascenta) (ксеввинапант), 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), Debio-4028 и ингибитора IAP Ascentage, APG-1387. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальные или высокие уровни генов или продуктов генов пути DDR, и лечат ее антагонистом MDM2 в комбинации с ингибитором IAP.

В одном варианте осуществления биомаркеры по изобретению можно использовать для выбора пациента для лечения антагонистом MDM2 в комбинации с соединениями платины, например цисплатином (необязательно объединенным с амифостином), карбоплатином или оксалиплатином; алкилирующими агентами, такими как азотистый иприт или нитромочевина, например циклофосфамидом, хлорамбуцилом, кармустином (BCNU), бендамустином, тиотепой, мелфаланом, тресульфаном, ломустином (CCNU), альтретамином, бусульфаном, дакарбазином, эстрамустином, фотемустином, ифосфамидом (необязательно в сочетании с месной), пипоброманом, прокарбазином,

стрептозоцином, темозоломидом, урацилом, мехлорэтамином, метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевиной или нимустином (ACNU), и/или химиотерапией. 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, тиотепы, мелфалана, тресульфана, ломустина (CCNU), бусульфана, 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, триэтилентиофосфорамид или триметилломеламин. В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальные или высокие уровни генов или продуктов генов пути DDR, и лечат ее антагонистом MDM2 в комбинации с лучевой терапией.

В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальные или высокие уровни генов или продуктов генов пути DDR, и лечат ее антагонистом MDM2 в комбинации с ДНК-повреждающими агентами, такими как химиотерапия и/или радиотерапия.

В одном варианте осуществления определяют, что опухоль пациента имеет нормальные или высокие уровни генов или продуктов генов пути DDR, и лечат ее антагонистом MDM2 в комбинации с иммунными ингибиторами контрольных точек, такими как CTLA-4-блокирующие антитела и/или антитела против PD-1 и PD-L1 и/или PD-L2, например ипилимумаб (CTLA4), МК-3475 (пембролизумаб, ранее ламбролизумаб, анти-PD-1), ниволумаб (антитело к PD-1), BMS-936559 (антитело к PD-1), BMS-936559 (антитело к PD-L1), MPDL320A, AMP-514 или MEDI4736 (антитело к PD-L1) или

тремелимумаб (ранее тицилимумаб, CP-675,206, антитело к CTLA-4); необязательно для лечения опухолей MSI-H, которые могут быть идентифицированы посредством тестирования микросателлитной нестабильности (MSI).

5 В другом варианте осуществления предложен способ лечения рака у пациента, включающий этапы выбора пациента:

(a) наличие нормальных или высоких уровней биомаркера DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента; и

(b) введение упомянутому пациенту, выбранному на этапе (a), терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и агента для индукции чувствительности к антагонисту MDM2, например, посредством снижения уровней биомаркера DDR.

В одном варианте осуществления агент или лечение для снижения уровней биомаркера DDR представляет собой противораковый агент или лечение. В одном варианте осуществления агент или лечение для снижения уровней биомаркера DDR представляет собой рекомбинантные интерфероны (такие как интерферон-у и интерферон а) и интерлейкины (например, интерлейкин 2), например, альдеслейкин, денилейкин-дифтитокс, интерферон альфа 2а, интерферон альфа 2b или пегинтерферон альфа 2b, или ингибиторы репарации 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, циклофосамид, хлорамбуцил, кармустин (BCNU), бендамустин, тиотепа, мелфалан, тресульфат, ломустин (CCNU), альтретамин, бусульфат, дакарбазин, эстрамустин, фотемустин, ифосфамид (необязательно в сочетании с месной), пипоброман, прокарбазин, стрептозоцин, темозоломид, урацил, мехлорэтамин, метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевина или нимустин (ACNU), и/или химиотерапию.

В одном варианте осуществления агент или лечение для индукции чувствительности представляет собой рекомбинантные интерфероны и интерлейкины, ингибиторы репарации ДНК, антагонисты IAP или соединения платины. В одном варианте

осуществления агент или вариант лечения для индукции чувствительности 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, 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), Debio-4028 и ингибитор IAP Ascentage, APG-1387. В одном варианте осуществления антагонист IAP представляет собой ASTX660 (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

20 (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-она») или его таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли; и

25 (ii)

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») или его таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

30

В частности, в этом аспекте изобретения предложена:

Комбинация, содержащая комбинацию, описанную в настоящем документе (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).

Комбинация, описанная в настоящем 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.

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 настоящем 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: (a) находятся в смеси; (b) химически/физико-химически связаны; (c) химически/физико-химически совместно упакованы; или (d) не смешаны, но совместно упакованы или совместно представлены.

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 настоящем 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.

- 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 настоящем документе, причем комбинация содержит: (а) по меньшей мере одно из двух или более соединений вместе с инструкциями по объединению для немедленного введения с по меньшей мере одним соединением для получения физически ассоциированных двух или более соединений; или (b) по меньшей мере одно из двух или более соединений вместе с инструкциями по проведению комбинированной терапии двумя или более соединениями; или (с) по меньшей мере одно из двух или более соединений вместе с инструкциями по введению в популяции пациентов, которым уже ввели (или вводят) другой (другие) из двух или более соединений; или (d) по меньшей мере одно из двух или более соединений в количестве или в форме, специально адаптированной для применения в сочетании с другим (другими) из двух или более соединений.
- 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 настоящем документе, в форме фармацевтического набора или упаковки для пациентов.
- 20 Фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, содержащую 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 настоящем документе.
- 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, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, описанную в настоящем документе, для применения в терапии.
- 30 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, описанную в настоящем документе, для применения в профилактике или лечении болезненного состояния или патологического состояния, описанного в настоящем документе.

- 5 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 композиции, содержащей комбинацию, описанную в настоящем документе, для получения лекарственного средства для применения в профилактике или лечении болезненного состояния или патологического состояния, описанного в настоящем документе.

Способ профилактики или лечения заболевания или патологического состояния, описанного в настоящем 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 настоящем документе.

Способ профилактики или лечения заболевания или патологического состояния, описанного в настоящем 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 настоящем документе, или его таутомера, *N*-оксида, фармацевтически приемлемой соли или сольвата.

- 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, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, для применения, как описано в настоящем документе, в частности, для применения в способе профилактики или лечения, описанном в настоящем 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, как  
5 описано в настоящем документе, или способ профилактики или лечения с использованием комбинации, описанной в настоящем документе, причем пациент выбран в соответствии с биомаркерами, описанными в настоящем документе.

Комбинация, содержащая соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль и дополнительный терапевтический агент,  
10 например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую соль, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, для применения, как описано в настоящем документе, или способ профилактики или лечения с использованием комбинации, описанной в настоящем документе, причем пациент выбран в качестве имеющего опухоль с нормальным или высоким уровнем DDR.

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, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, для применения, как описано в настоящем документе, или способ профилактики или лечения с  
20 использованием комбинации, описанной в настоящем 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 терапевтический агент, например ASTX660 или его таутомер, или сольват, или фармацевтически приемлемую  
25 соль, или фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию, для применения, как описано в настоящем документе, или способ профилактики или лечения с использованием комбинации, описанной в настоящем документе, причем болезненное состояние или патологическое состояние представляет собой рак, который представляет собой острый миелоидный лейкоз.

30 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 настоящем документе, для применения, описанного в настоящем документе, для профилактики или лечения острого миелоидного лейкоза.

5 Соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в профилактике или лечении болезненного состояния или патологического состояния, описанного в настоящем 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.

10 Соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в профилактике или лечении рака, описанного в настоящем 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.

15 ASTX660 или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в профилактике или лечении болезненного состояния или патологического состояния, описанного в настоящем документе, причем терапевтический агент используют в комбинации с соединением изоиндолин-1-она или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

20 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  
25 терапевтическими агентами.

Применение соединения изоиндолин-1-она или его таутомера, *N*-оксида, фармацевтически приемлемой соли или сольвата для получения лекарственного средства для лечения рака, причем пациент проходит лечение другим терапевтическим агентом, например ASTX660 или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически  
30 приемлемой солью или сольватом.

5 Применение терапевтического агента, например ASTX660 или его таутомера, *N*-оксида, фармацевтически приемлемой соли или сольвата, для получения лекарственного средства для лечения рака, причем пациент проходит лечение соединением изоиндолин-1-она или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом, описанным в настоящем документе.

10 Применение соединения изоиндолин-1-она или его таутомера, *N*-оксида, фармацевтически приемлемой соли или сольвата для получения лекарственного средства для применения в увеличении или потенцировании скорости ответа у пациента, страдающего раком, где пациент получает лечение другим терапевтическим агентом, например ASTX660 или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

15 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, причем млекопитающее получает лечение другим терапевтическим агентом, например ASTX660 или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

20 Соединение изоиндолин-1-она или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в облегчении или снижении частоты возникновения заболевания или патологического состояния, включающего или возникающего в результате аномального роста клеток у млекопитающего, причем млекопитающее получает лечение другим терапевтическим агентом, например ASTX660 или его таутомером, *N*-оксидом, фармацевтически приемлемой солью или сольватом.

25 Применение комбинации, описанной в настоящем 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 получении фармацевтической композиции для ингибирования роста опухолевых клеток.

30 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.

5 В одном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент, используемый в комбинации, представляет собой агент или вариант лечения для снижения уровней одного или более продуктов генов пути DDR. В одном варианте осуществления агент или лечение для снижения уровней одного или более продуктов генов пути DDR представляет собой рекомбинантные интерфероны (такие как  
10 интерферон- $\gamma$  и интерферон  $\alpha$ ) и интерлейкины (например, интерлейкин 2), например, альдеслейкин, денилейкин-дифтитокс, интерферон альфа 2а, интерферон альфа 2b или пегинтерферон альфа 2b, или ингибиторы репарации ДНК, такие как ингибиторы PARP, или антагонисты IAP, или соединения платины, например цисплатин (необязательно в сочетании с амифостин), карбоплатин или оксалиплатин; алкилирующие агенты,  
15 такие как азотистый иприт или нитромочевина, например, циклофосфамид, хлорамбуцил, кармустин (BCNU), бендамустин, тиотепа, мелфалан, тресульфат, ломустин (CCNU), альтретамин, бусульфат, дакарбазин, эстрамустин, фотемустин, ифосфамид (необязательно в сочетании с месной), пипоброман, прокарбазин, стрептозоцин, темозоломид, урацил, мехлорэтамин,  
20 метилциклогексилхлорэтилнитрозомочевина или нимустин (ACNU), и/или химиотерапию.

В одном варианте осуществления агент для снижения уровней одного или более продуктов генов пути DDR представляет собой ингибитор BRCA1, BRCA2, ATM и/или ATRX.

25 В одном варианте осуществления антагонист MDM2 используется в комбинации с ингибитором ATM, например ингибитором ATM, выбранным из AZD-1390, M-4076 (от Merck KGaA) или IMP-08 (от IMPACT Therapeutics).

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 используется в комбинации с модулятором ATRX.

В одном варианте осуществления антагонист MDM2 используется в комбинации с иматинибом, нилотинибом, дазатинибом, флуматинибом, асциминибом, босутинибом, понатинибом или радотинибом.

Конкретный способ получения, выделения и очистки

5 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

10 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

15 вводить по индивидуально варьирующимся режимам дозирования 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 на основе своих общих знаний должен знать, какие схемы введения доз и варианты комбинированной терапии следует использовать. Например, соединение формулы (I<sup>o</sup>) можно использовать в комбинации с одним или несколькими другими агентами, которые вводятся в соответствии с их существующей комбинированной схемой. Примеры стандартных комбинированных схем приведены ниже.

25 Соединение таксана предпочтительно вводится в дозе от 50 до 400 мг на квадратный метр ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) площади поверхности тела, например, от 75 до 250  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в частности, в случае паклитаксела — в дозе от около 175 до 250  $\text{мг}/\text{м}^2$  и в случае доцетаксела — от около 75 до 150  $\text{мг}/\text{м}^2$  на курс лечения.

30 Соединение камптотецина предпочтительно вводится в дозе от 0,1 до 400 мг на квадратный метр ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) площади поверхности тела, например, от 1 до 300  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в частности, в случае иринотекана — в дозе от около 100 до 350  $\text{мг}/\text{м}^2$  и в случае топотекана — от около 1 до 2  $\text{мг}/\text{м}^2$  на курс лечения.

Противоопухолевое производное подофиллотоксина предпочтительно вводится в дозе от 30 до 300 мг на квадратный метр ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) площади поверхности тела, например, от 50 до 250  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в частности, в случае этопозиды — в дозе от около 35 до 100  $\text{мг}/\text{м}^2$  и в случае тенипозиды — от около 50 до 250  $\text{мг}/\text{м}^2$  на курс лечения.

- 5 Противоопухолевый алкалоид барвинка предпочтительно вводится в дозе от 2 до 30 мг на квадратный метр ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) площади поверхности тела, в частности, в случае винбластина — в дозе от около 3 до 12  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в случае винкристина — в дозе от около 1 до 2  $\text{мг}/\text{м}^2$  и в случае винорелбина — в дозе от около 10 до 30  $\text{мг}/\text{м}^2$  на курс лечения.

- 10 Противоопухолевое производное нуклеозида предпочтительно вводится в дозе от 200 до 2500 мг на квадратный метр ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) площади поверхности тела, например, от 700 до 1500  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в частности, в случае 5-FU — в дозе от 200 до 500  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в случае гемцитабина — в дозе от около 800 до 1200  $\text{мг}/\text{м}^2$  и в случае капецитабина — от около 1000 до 2500  $\text{мг}/\text{м}^2$  на курс лечения.

- 15 Алкилирующие агенты, такие как азотистый иприт или нитромочевина, предпочтительно вводятся в дозе от 100 до 500 мг на квадратный метр ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) площади поверхности тела, например, от 120 до 200  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в частности, в случае циклофосфида — в дозе от около 100 до 500  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в случае хлорамбуцила — в дозе от около 0,1 до 0,2 мг/кг, в случае кармустина — в дозе от около 150 до 200  $\text{мг}/\text{м}^2$  и в случае ломустина — в дозе от около 100 до 150  $\text{мг}/\text{м}^2$  на курс лечения.

- 20 Противоопухолевое производное антрациклина предпочтительно вводится в дозе от 10 до 75 мг на квадратный метр ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ) площади поверхности тела, например, от 15 до 60  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в частности, в случае доксорубицина — в дозе от около 40 до 75  $\text{мг}/\text{м}^2$ , в случае даунорубицина — в дозе от около 25 до 45  $\text{мг}/\text{м}^2$  и в случае идарубицина — в дозе от около 10 до 15  $\text{мг}/\text{м}^2$  на курс лечения.

- 25 Антиэстрогенный агент предпочтительно вводится в дозе от около 1 до 100 мг в день в зависимости от конкретного агента и патологического состояния, лечение которого проводят. Тамоксифен предпочтительно вводится перорально в дозе от 5 до 50 мг, как правило, от 10 до 20 мг, два раза в день, с продолжением терапии в течение времени, достаточного для достижения и поддержания терапевтического эффекта. Торемифен  
30 предпочтительно вводится перорально в дозе около 60 мг один раз в день с продолжением терапии в течение времени, достаточного для достижения и поддержания

терапевтического эффекта. Анастрозол предпочтительно вводится перорально в дозе около 1 мг один раз в день. Дролоксифен предпочтительно вводится перорально в дозе около 20–100 мг один раз в день. Ралоксифен предпочтительно вводится перорально в дозе около 60 мг один раз в день. Экземестан предпочтительно вводится перорально в дозе около 25 мг один раз в день.

Антитела предпочтительно вводятся 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, если она отличается. Трастузумаб предпочтительно вводится 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.

10 Когда соединение формулы (I<sup>o</sup>) вводят в комбинированной терапии с одним, двумя, тремя, четырьмя или более другими терапевтическими агентами (как правило, 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 количества и режимы для каждого компонента комбинации будут зависеть от конкретного другого лекарственного средства и соединения по настоящему изобретению, которое вводят, от способа их введения, конкретной опухоли, которую лечат, и конкретного хозяина, которого лечат. Специалисты в данной области легко могут определить оптимальный способ и порядок введения, а также дозы и схемы введения доз с использованием традиционных способов и с учетом изложенной в настоящем документе информации.

Специалисты в данной области могут определить массовое соотношение соединения в соответствии с настоящим изобретением и одного или более других противораковых агентов, при их применении в виде комбинации. Упомянутое соотношение, точная дозировка и частота введения зависят от конкретного соединения в соответствии с изобретением и другого (-их) используемого (-ых) противоракового (-ых) агента (-ов), конкретного патологического состояния, лечение которого проводят, тяжести патологического состояния, лечение которого проводят, возраста, массы, пола, рациона, времени введения и общего физического состояния конкретного пациента, способа введения, а также других лекарственных средств, которые может принимать индивид, как хорошо известно специалистам в данной области. Кроме того, очевидно, что эффективное суточное количество можно уменьшать или увеличивать в зависимости от ответа субъекта, проходящего лечение, и/или в зависимости от оценки врача, назначающего соединения по настоящему изобретению. 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.

Соединения по настоящему изобретению также можно вводить в сочетании с нехимиотерапевтическими методами лечения, такими как лучевая терапия, фотодинамическая терапия, генная терапия, хирургия и контролируемые диеты. Лучевую терапию можно применять в радикальных, паллиативных, адъювантных, неоадъювантных или профилактических целях.

Соединения для применения в настоящем изобретении также имеют терапевтическое применение для сенсibilизации опухолевых клеток к лучевой терапии и химиотерапии. Таким образом, соединения по настоящему изобретению можно использовать в качестве «радиосенсibilизатора» и/или «хемосенсibilизатора», или их можно вводить в комбинации с другим «радиосенсibilизатором» и/или «хемосенсibilизатором». В одном варианте осуществления соединения формулы (I<sup>o</sup>) предназначено для использования в качестве хемосенсibilизатора.

Термин «радиосенсibilизатор» определяется как молекула, которую вводят пациентам в терапевтически эффективных количествах для повышения чувствительности клеток к

ионизирующему излучению и/или для содействия лечению заболеваний, которые поддаются лечению ионизирующим излучением.

Термин «хемосенсибилизатор» определяется как молекула, которую вводят пациентам в терапевтически эффективных количествах для повышения чувствительности клеток к химиотерапии и/или содействия лечению заболеваний, которые поддаются лечению химиотерапевтическими средствами.

Во многих протоколах лечения рака в настоящее время используют радиосенсибилизаторы в сочетании с облучением рентгеновскими лучами. Примеры активируемых рентгеновскими лучами радиосенсибилизаторов включают в себя, без ограничений, следующее: метронидазол, мизонидазол, десметилмизонидазол, пимонидазол, этанидазол, ниморазол, митомицин С, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB 6145, никотинамид, 5-бромдезоксисуридин (BUdR), 5-йоддезоксисуридин (IUdR), бромдезоксцитидин, фтордезоксисуридин (FudR), гидроксимочевину, цисплатин и их терапевтически эффективные аналоги и производные.

В фотодинамической терапии (ФДТ) раковых заболеваний используется видимый свет в качестве активатора излучения сенсibiliзирующего агента. Примеры фотодинамических радиосенсибилизаторов включают, без ограничений, 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, без ограничений: соединения, которые способствуют включению радиосенсибилизаторов в клетки-мишени; соединения, которые контролируют поток терапевтических средств, питательных веществ и/или кислорода к клеткам-мишеням; химиотерапевтические препараты, которые действуют на опухоль, с дополнительным излучением 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, без ограничений:

соединения, которые способствуют включению хемосенсибилизаторов в клетки-мишени; соединения, которые контролируют поток терапевтических средств, питательных веществ и/или кислорода к клеткам-мишеням; химиотерапевтические препараты, которые действуют 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 лекарственным средствам злокачественных новообразованиях.

Для применения в комбинированной терапии с другим химиотерапевтическим агентом соединение формулы (I<sup>o</sup>) и один, два, три, четыре или более других терапевтических агентов могут быть, например, объединены 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 (I<sup>o</sup>) вместе с фармацевтически приемлемым носителем и необязательно одним или более терапевтическими агентами.

В другом варианте осуществления изобретение относится к применению комбинации по изобретению в получении фармацевтической композиции для ингибирования роста опухолевых клеток.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к продукту, содержащему соединение формулы (I<sup>o</sup>) и один или более противораковых агентов, в качестве комбинированного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения при лечении пациентов с раком.

#### Пронумерованные варианты осуществления

Изобретение включает в себя по меньшей мере следующие пронумерованные варианты осуществления:

1. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR), или при этом рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в по меньшей мере одном гене пути DDR.  
5
2. Антагонист MDM2 для применения в способе в соответствии с вариантом осуществления 1, причем путь DDR представляет собой:
  - a. путь репарации путем гомологичной рекомбинации (HRR);
  - b. путь негомологичного соединения концов (NHEJ);
  - 10 c. путь репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR);
  - d. путь анемии Фанкони (FA); и/или
  - e. путь эксцизионной репарации оснований (BER).
3. Антагонист MDM2 для применения в способе в соответствии с вариантом осуществления 1 или вариантом осуществления 2, причем:  
15           один или более генов или продуктов генов содержат или состоят из генов или продуктов генов пути HRR, отличных от ATM; или  
             один или более генов или продуктов генов содержат или состоят из BRCA1, BRCA2 и/или ATM.
4. Антагонист MDM2 для применения в способе в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–3, причем один или более генов или продуктов генов содержат или состоят из ATRX.  
20
5. Антагонист MDM2 для применения в способе в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–4, причем:  
25           один или более генов или продуктов генов содержат или состоят из MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS2, POLE и/или POLD1; или  
             рак включает мутационную сигнатуру SBS6 или SBS26, ассоциированную с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК, и/или мутационную сигнатуру SBS20 POLD1.
6. Антагонист MDM2 для применения в способе в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–5, причем один или более генов или продуктов генов содержат или состоят из FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE,  
30



немелкоклеточную карциному легкого, мезотелиому, глиобластоми или светлоклеточную карциному почки; или

рак матки, эндометрия, мочевого пузыря, желудка, толстой кишки, предстательной железы или диффузную В-крупноклеточную лимфому;

5 или рак головного мозга, светлоклеточную карциному почки (СККП), рак пищевода или меланому.

14. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с любым предшествующим вариантом осуществления, причем рак представляет собой P53 дикого типа.

10 15. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с любым предшествующим вариантом осуществления, причем раковые клетки подвергаются апоптозу после этапа лечения.

16. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с любым предшествующим вариантом осуществления, причем активированная каспаза-3 индуцируется антагонистом MDM2 в по меньшей мере части раковых клеток.

15 17. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с вариантом осуществления 16, причем активированная каспаза-3 индуцируется антагонистом MDM2 в по меньшей мере 40% раковых клеток или в по меньшей мере 60% раковых клеток.

18. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с любым предшествующим вариантом осуществления, причем рак демонстрирует:

20 сниженную относительно контроля экспрессию одного, двух или трех из CDKN2A, BAP1 и SKP2; и/или

повышенную относительно контроля экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти или более генов сигнатуры интерферона.

19. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с вариантом осуществления

25 18, причем:

гены сигнатуры интерферона представляют собой CXCL10, CXCL11, RSAD2, MX1, BATF2, IFI44L, IFITM1, ISG15, CMPK2, IFI27, CD74, IFIH1, CCRL2, IFI44, HERC6, ISG20, IFIT3, HLA-C, OAS1, IFI35, IRF9, EPSTI1, USP18, BST2, CSF1, C1S, DHX58, TRIM14, OASL, IRF7, LGALS3BP, DDX60, LAP3, LAMP3, PARP12, PARP9, SP110, PLSCR1, WARS, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1 и FLI1; или

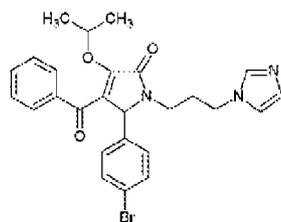
рак демонстрирует повышенную экспрессию CXCL10 или CXCL11.

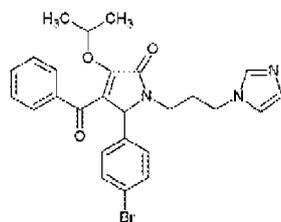
30

20. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с любым предшествующим вариантом осуществления, причем рак демонстрирует повышенную экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти или более из IRF7, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1, IRF9 и FLI1.

5 21. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с любым предшествующим вариантом осуществления, представляющий собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, как определено в настоящем документе, например  
 10 (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.

22. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с любым предшествующим вариантом осуществления, выбранный из группы, состоящей из идасанутлина  
 15 (RG-7388), HDM-201, KRT-232 (AMG-232), ALRN-6924, MI-773 (SAR405838), CGM-097, миладеметана тозилата, 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,



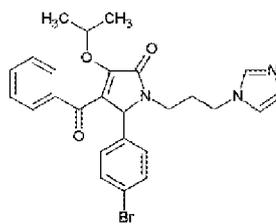
MMRi-64 и , или их таутомера, или сольвата, или  
 20 фармацевтически приемлемой соли.

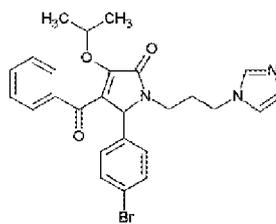
23. Использование уровня экспрессии или активности одного или более в одном или более генах или продуктах генов пути DDR в образце раковых клеток  
 25 пациента-человека в качестве биомаркера или биомаркеров для оценки того, является ли рак восприимчивым к лечению антагонистом MDM2, например, при этом антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, как определено в настоящем 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-метилпро

пановую кислоту или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

24. Способ прогнозирования или оценки чувствительности пациента-человека с раком к лечению антагонистом MDM2, включающий оценку уровня экспрессии или активности в образце одного или более генов пути DDR от пациента с раком и определение того, указывает ли исследуемый уровень экспрессии или активности на то, что рак следует лечить антагонистом MDM2.
25. Способ в соответствии с вариантом осуществления 24, в котором этап оценки включает сравнение уровня экспрессии или активности с уровнем экспрессии или активности, (i) ассоциированным с чувствительностью или нечувствительностью к лечению антагонистом MDM2 или (ii) наблюдающимся в здоровой нераковой клетке того же типа.
26. Способ в соответствии с вариантом осуществления 24 или вариантом осуществления 25, в котором пациента классифицируют в группу на основании профиля биомаркеров, причем необязательно группы включают или состоят из:
- (i) ответивших на лечение пациентов и не ответивших на лечение пациентов; или
  - (ii) пациентов с сильным ответом на лечение.
27. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 24–26, в котором пациента идентифицируют как особенно подходящего для лечения, когда 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более генов пути DDR экспрессируются на более низком уровне, чем у пациента, идентифицированного как не подходящего для лечения.
28. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 24–27, в котором пациента идентифицируют для лечения антагонистом MDM2 при обнаружении сниженной экспрессии одного или более генов пути DDR по сравнению с уровнем экспрессии, (i) ассоциированным с нечувствительностью к лечению антагонистом MDM2 или (ii) наблюдающимся в здоровой нераковой клетке того же типа.
29. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 24–28, включающий этап обнаружения уровня экспрессии или активности биомаркеров в образце раковых клеток от упомянутого пациента-человека.

30. Способ в соответствии с вариантом осуществления 29, в котором обнаружение проводят с применением анализа на обнаружение *in vitro*.
31. Способ определения чувствительности пациента-человека с раком к лечению антагонистом MDM2, включающий обнаружение в образце раковых клеток от пациента экспрессии или активности одного или более генов пути DDR и оценку того, будет ли рак у пациента с вероятностью отвечать на лечение антагонистом MDM2, на основании уровня экспрессии или активности биомаркеров в образце.
32. Способ обнаружения уровня экспрессии или активности одного или более генов пути DDR у пациента-человека, страдающего раком.
33. Способ в соответствии с вариантом осуществления 32, включающий в себя этапы, на которых:
- (a) получают образец раковых клеток от пациента-человека; и
  - (b) обнаруживают экспрессию упомянутого биомаркера или биомаркеров в отобранных раковых клетках посредством приведения образца в контакт с одним или более реагентами для обнаружения экспрессии биомаркера или биомаркеров.
34. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 24–33, в котором антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, как определено в настоящем документе, 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.
35. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 24–33, в котором антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из идасанутлина, HDM-201, KRT-232, ALRN-6924, ALRN-6924, CGM-097, миладеметана тозилата, 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,



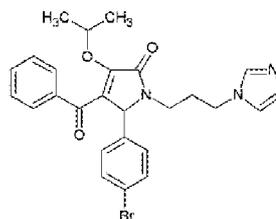
SAH-p53-8, PM-2, K-178, MMRi-64 и , или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

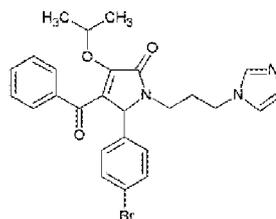
36. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 24–35, дополнительно включающий этап лечения рака у пациента посредством введения антагониста MDM2.

37. Способ в соответствии с вариантом осуществления 36, в котором антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I°) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, как определено в настоящем 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.

38. Способ в соответствии с вариантом осуществления 36, в котором антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из идасанутлина, HDM-201, KRT-232, ALRN-6924, CGM-097, миладеметана тозилата, 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 , или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

39. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 36–38, в котором лечение обеспечивается пациенту на основании результата способа.

40. Набор или устройство для обнаружения уровня экспрессии или активности по меньшей мере одного биомаркера чувствительности к ингибированию MDM2 в

образце от пациента-человека, содержащие реагенты для обнаружения одного или более генов или продуктов генов пути DDR.

41. Система для определения пригодности пациента-человека с раком для лечения антагонистом MDM2, содержащая запоминающее устройство для хранения данных, связанных с образцом от пациента, включающих данные, связанные с панелью биомаркеров, указывающие уровни экспрессии или активности биомаркеров в образце от субъекта, причем панель биомаркеров содержит один или более генов или продуктов генов пути DDR; и
- 5
- процессор, соединенный с возможностью связи с запоминающим устройством для классификации пациента.
- 10
42. Антагонист MDM2 для применения, применение, способ, набор или система в соответствии с любым предшествующим вариантом осуществления, причем рак демонстрирует утрату одного или более генов, продуктов генов или активностей пути DDR.
- 15
43. Антагонист MDM2 для применения, применение или способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 1–39 или 42, причем антагонист MDM2 является частью комбинированной терапии со вторым терапевтическим агентом.
44. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака,
- 20
- причем рак характеризуется нормальными или высокими уровнями одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR), или при этом рак характеризуется отсутствием обнаруживаемой мутации с потерей функции в любом гене пути DDR,
- 25
- в комбинации с агентом для индуцирования чувствительности к антагонисту MDM2, например для снижения уровней одного или более генов или продуктов генов в пути репарации повреждения ДНК (DDR).
45. Способ лечения рака у пациента, включающий в себя этапы выбора пациента:
- (a) наличие нормальных или высоких уровней генов или продуктов генов пути DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента; и
- (b) введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и агента для индукции чувствительности к антагонисту MDM2, например, посредством снижения уровней одного или более генов или продуктов генов в
- 30

пути репарации повреждения ДНК (DDR), у упомянутого пациента, выбранного на этапе (а).

46. Антагонист MDM2 в соответствии с вариантом осуществления 44 или способ в соответствии с вариантом осуществления 45, в котором агент для индуцирования чувствительности к антагонисту MDM2 представляет собой ДНК-повреждающий агент или ингибитор репарации ДНК. .
47. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор MDM2, причем ингибитор MDM2 представляет собой соединение формулы (I°) 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, причем рак соответствует определению в любом из вариантов осуществления 1–7.
48. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения пациента с раком, при этом способ включает в себя этапы, на которых:
- (i) определяют, что образец от пациента характеризуется истощением одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR), или при этом рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в гене пути DDR;
  - (ii) вводят пациенту эффективное количество антагониста MDM2.
49. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется низкими уровнями одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждений ДНК (DDR), или при этом рак характеризуется отсутствием обнаруживаемой мутации с потерей функции в любом гене пути DDR, в комбинации с противораковым агентом, например ДНК-повреждающим агентом или ингибитором репарации ДНК.
50. Способ лечения рака у пациента, включающий в себя этапы выбора пациента:
- (а) наличие низких уровней генов или продуктов генов пути DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента; и



FANCM, FANCN, FANCO, FANCP, FANCQ, FANCR, FANCS, FANCT, FANCU, FANCV и FANCW.

57. Способ по любому из вариантов осуществления 51–56, дополнительно включающий проведение оценки или наличие оцененного одного или более из статуса микросателлитной нестабильности рака и мутационной нагрузки опухоли рака, а истощение или мутацию в гене пути DDR определяют посредством одного или более из статуса микросателлитной нестабильности и мутационной нагрузки опухоли.
58. Способ по варианту осуществления 57, в котором рак представляет собой MSI-high.
59. Способ по любому из вариантов осуществления 51–58, дополнительно включающий проведение тестирования или наличие протестированного образца ткани пациента для определения профиля экспрессии рака до введения.
60. Способ по варианту осуществления 59, в котором образец содержит ДНК рака, цоДНК или раковые клетки.
61. Способ по варианту осуществления 59 или варианту осуществления 60, в котором тестирование включает анализ для обнаружения одного или более из белка, мРНК и цоДНК.
62. Способ по варианту осуществления 61, который включает в себя одно или оба из (i) обнаружения белка, которое 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; и (ii) обнаружения мРНК, которое проводят с помощью ОТ-ПЦР или количественного анализа геной экспрессии; и/или (iii) при этом ДНК или РНК обнаруживают посредством секвенирования нового поколения; и/или (iv) при этом белок обнаруживают посредством иммуногистохимии.

63. Способ по любому из вариантов 59–62, в котором пациента выбирают для лечения на основании определенного профиля экспрессии рака.
64. Способ по любому предшествующему варианту осуществления, в котором рак представляет собой:
- 5                   немелкоклеточную карциному легкого, мезотелиому, глиобластому или светлоклеточную карциному почки; или
- рак матки, эндометрия, мочевого пузыря, желудка, толстой кишки, предстательной железы или диффузную В-крупноклеточную лимфому; или
- 10                  рак головного мозга, светлоклеточную карциному почки (ccRCC), рак пищевода или меланому, или
- острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), плоскоклеточную карциному или опухоли головы, шеи, кожи, желудочно-кишечного тракта или половой системы; или
- 15                  рак предстательной железы, яичника, молочной железы или гинекологический рак; или
- рак толстой кишки, рак желудка или гинекологический рак.
65. Способ по любому предшествующему пункту, в котором рак представляет собой P53 дикого типа.
- 20   66. Способ по любому предшествующему пункту, в котором раковые клетки подвергаются апоптозу после введения.
67. Способ по любому предшествующему варианту осуществления, в котором индукция активированной каспазы-3 антагонистом MDM2 происходит в по меньшей мере части раковых клеток.
- 25   68. Способ по варианту осуществления 67, в котором индукция активированной каспазы-3 антагонистом MDM2 происходит в по меньшей мере 40% раковых клеток или по меньшей мере 60% раковых клеток.
69. Способ по любому предшествующему варианту осуществления, в котором рак демонстрирует одно или более из:
- 30                   сниженной относительно контроля экспрессии одного, двух или трех из CDKN2A, BAP1 и SKP2; и

повышенной относительно контроля экспрессии одного, двух, трех, четырех, пяти или более генов сигнатуры интерферона.

70. Способ по варианту осуществления 69, в котором:

один или более генов сигнатуры интерферона выбраны из CXCL10, CXCL11, RSAD2, MX1, BATF2, IFI44L, IFITM1, ISG15, CMPK2, IFI27, CD74, IFIH1, CCRL2, IFI44, HERC6, ISG20, IFIT3, HLA-C, OAS1, IFI35, IRF9, EPSTI1, USP18, BST2, CSF1, C1S, DHX58, TRIM14, OASL, IRF7, LGALS3BP, DDX60, LAP3, LAMP3, PARP12, PARP9, SP110, PLSCR1, WARS, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1 и FLI1; или

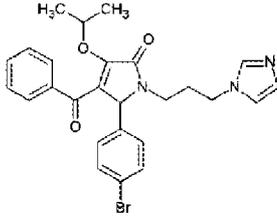
рак демонстрирует повышенную экспрессию CXCL10 или CXCL11.

71. Способ по любому предшествующему варианту осуществления, в котором рак демонстрирует повышенную экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти или более из IRF7, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1, IRF9 и FLI1.

72. Способ по любому предшествующему варианту осуществления, в котором антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

73. Способ по любому предшествующему варианту осуществления, в котором антагонист MDM2 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 или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват,

74. Способ по любому предшествующему варианту осуществления, в котором антагонист MDM2 выбран из соединения 1, идасанутлина (RG-7388), HDM-201, KRT-232 (AMG-232), ALRN-6924, MI-773 (SAR405838), CGM-097, миладеметана тозилата, 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,



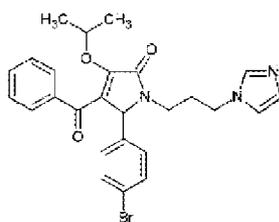
и одного или более из таутомера, сольвата и фармацевтически приемлемой соли любого из указанных выше веществ.

75. Способ лечения рака, восприимчивого к антагонисту MDM2, у пациента, включающий обнаружение в образце раковых клеток от упомянутого пациента уровня экспрессии или активности одного или более генов пути DDR и введение пациенту антагониста MDM2, если уровень экспрессии или активности одного или более генов пути DDR у пациента ниже уровня экспрессии или активности соответственно одного или более из одного или более генов пути DDR в образце нераковых клеток или в образце клеток у второго пациента, причем у второго пациента имеется рак, не восприимчивый к лечению антагонистом MDM2, при этом необязательно один или более генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2.
76. Способ по варианту осуществления 75, дополнительно включающий классификацию пациента в группу на основании уровня экспрессии или активности одного или более генов пути DDR в образце раковых клеток от пациента
77. Способ по варианту осуществления 76, в котором группа выбрана из:
- (i) ответивших на лечение пациентов и не ответивших на лечение пациентов; и
  - (ii) пациентов с сильным ответом на лечение.
78. Способ по любому из вариантов осуществления 75–77, включающий введение пациенту антагониста MDM2, если уровень экспрессии или активности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10 или более генов пути DDR ниже, чем уровень экспрессии или активности, соответственно, в образце нераковых клеток или образце клеток от пациента, имеющего рак, не восприимчивый к лечению антагонистом MDM2.
79. Способ по любому из вариантов осуществления 75–78, в котором обнаружение проводят с применением анализа на обнаружение *in vitro*.

80. Способ по любому из вариантов осуществления 75–79, в котором антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (1°) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

81. Способ по любому из вариантов осуществления 75–80, в котором антагонист MDM2 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 или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

82. Способ по любому из вариантов осуществления 75–81, в котором антагонист MDM2 выбран из соединения 1, идасанутлина, HDM-201, KRT-232, ALRN-6924, ALRN-6924, CGM-097, миладеметана тозилата, 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,



К-178, MMRi-64 и , и или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

83. Способ лечения рака у пациента, в котором рак демонстрирует потерю одного или более генов, продуктов генов или активностей пути DDR, включающий введение пациенту антагониста MDM2, причем необязательно один или более генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2.

84. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления, дополнительно включающий введение пациенту второго терапевтического агента (например, ингибитора PARP) в рамках комбинированной терапии.

85. Способ лечения рака у пациента,

в котором рак характеризуется нормальными или высокими уровнями одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждений ДНК (DDR), или при этом рак характеризуется отсутствием обнаруживаемой мутации с потерей функции в любом гене пути DDR, включающий

введение пациенту антагониста MDM2 в комбинации с агентом для индуцирования чувствительности к антагонисту MDM2.

86. Способ по варианту осуществления 85, в котором агент для индуцирования чувствительности к антагонисту MDM2 снижает уровень одного или более генов или продуктов генов в пути репарации повреждения ДНК (DDR).  
5
87. Способ по варианту осуществления 85 или варианту осуществления 86, в котором агент для индуцирования чувствительности к антагонисту MDM2 представляет собой ДНК-повреждающий агент или ингибитор репарации ДНК.
88. Способ лечения пациента с раком, восприимчивым к лечению антагонистом MDM2, включающий в себя этапы, на которых:  
10
- (i) определяют, что образец от пациента характеризуется истощением одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR), или при этом рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в гене пути DDR;
  - (ii) вводят пациенту эффективное количество антагониста MDM2.
89. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту антагониста MDM2 в комбинации с противораковым агентом, например ДНК-повреждающим агентом или ингибитором репарации ДНК, причем  
20
- рак характеризуется низкими уровнями одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждений ДНК (DDR), или при этом рак характеризуется отсутствием обнаруживаемой мутации с потерей функции в любом гене пути DDR.
90. Варианты осуществления способа, описанные выше, в которых один или более генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2.  
25
91. Варианты осуществления способа, описанные выше, в которых два или более генов пути DDR не содержат ATM и/или ATR.
92. Варианты осуществления способа, описанные выше, в которых два или более генов пути DDR содержат ATR и/или ATM.
- 30 93. Варианты осуществления способа или применения, описанные выше, в которых два или более генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2 и ATM.

94. Вариант осуществления способа или применения, описанный выше, в котором второй агент представляет собой ингибитор PARP.

Далее изобретение описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

### ПРИМЕРЫ

- 5 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.
- 10 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-(гидроксиметил)циклопропил]метокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-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-1H-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-1H-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-1H-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-1H-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-1H-изоиндол-1-он                  |

| Пр.     | Название  |
|---------|---|
| 16      | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-(3-гидрокси-3-метилбутокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он  |
| 17      | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[(1H-пиразол-4-ил)метокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он   |
| 18      | 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-карбонитрил                                     |
| 19      | N-{{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)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-1H-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-1H-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-1H-изоиндол-1-он                               |
| 24      | 4-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{1-[гидрокси(2H2)метил]циклопропил}(2H2)метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-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-1H-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-1H-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-1H-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-1H-изоиндол-1-он   |
| 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(2H2)метил]циклопропил}(2H2)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 |

| Пр.     | Название  |
|---------|---|
| 45      | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1S)-1-(4-хлорфенил)этил]-3-[[3S,4R)-4-гидроксиоксолан-3-ил]окси}-6-(2-гидрокси пропан-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-гидрокси пропан-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-изоиндо л-1-он   |
| 48      | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-({1-[гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )метокси)-6-(2-г идроксипропан-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-гидроксипропокси)-2,3-дигидр о-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-гидроксипропокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил) -2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он   |
| 52 и 53 | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-3-{{1-(гидроксиметил)циклобутил}метокси}-6-(2-гидроксипро пан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-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-1H-изоиндол-1-он                          |
| 56 и 57 | 2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-диг идро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N,N-диметилпропанамида                                  |
| 58 и 59 | 2-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(4-хлорфенил)метил]-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-диг идро-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N-метилпропанамида                                      |
| 60      | (3R)-2-{{4-хлор-2-(метилсульфанил)фенил}метил}-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-[[1-(гидроксиметил)циклопроп ил]метокси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-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-1H-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-1H-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-1H-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-1H-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-1H-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-ил окси]-2,3-дигидро-1H-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-о ксо-2,3-дигидро-1H-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-1H-п иразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-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-1H-пирazo л-4-ил)этил]-3-[[1-(гидроксициклопропил)метокси]-2,3-дигидро-1H-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-1H-изоиндол-1-он    |
| 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                                    |

| Пр.       | Название  |
|-----------|---|
| 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-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                                   |

| Пр.          | Название  |
|--------------|---|
| 115          | 2-(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-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)  |
| 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»)<br>(трис(гидроксиметил)аминометановая соль)   |
| 125 и<br>126 | (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   |
| 127 и<br>128 | (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  |
| 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-[дис-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 и<br>133 | трет-бутил<br>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 трет-бутил<br>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 |
| 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<br>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   |

5

| Пр. | Название   |
|-----|--|
| 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(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )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(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )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-1λ5-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(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )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(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )метокси)-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он              |
| 18 и 19 | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2,4-дигидроксипропан-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-дигидроксипропан-2-ил)-7-фтор-1-({1-[гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )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(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )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(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )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      | (3R)-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      | (3R)-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  |

| Пр.        | Название   |
|------------|--|
|            | ан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он  |
| 32         | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-({1-гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил}циклопропил)(2H <sub>2</sub> )метокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-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-1Н-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-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропил]ацетамид  |
| 35         | 6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-({1-[гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )метокси)-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-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-1Н-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил  |
| 37         | (3R)-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-({1-[гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )метокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2-[(6-метилоксипиридин-3-ил)метил]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он  |
| 38 и<br>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-1Н-изоиндол-1-он и<br>(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{(1R,3S)-3-гидроксициклопентил}окси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он                                 |
| 40 и<br>41 | 6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{(1S,3R)-3-гидроксициклопентил}окси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил и<br>6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{(1R,3S)-3-гидроксициклопентил}окси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил |
| 42 и<br>43 | 6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-[(3-гидроксициклопентил)окси]-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил  |
| 44 и<br>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-1Н-изоиндол-1-он и<br>(3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{(1S,3S)-3-гидроксициклопентил}окси}-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-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-1Н-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-1Н-изоиндол-1-он   |
| 48         | 4-[(1R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-1-({1-[гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )метокси)-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]бензонитрил  |
| 49         | (3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-(4-фторфенил)-3-{{1-[гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )метокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он  |
| 50         | (3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{1-[гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )метокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[4-(трифторметил)фенил]-2,3-дигидро-1Н-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-1Н-изоиндол-1-он  |
| 52         | (3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-(3,4-дифторфенил)-3-{{1-[гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )метокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он  |
| 53         | (3R)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-{{1-[гидрокси(2H <sub>2</sub> )метил]циклопропил}(2H <sub>2</sub> )метокси)-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-[4-(трифторметокси)фенил]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он  |
| 54         | (3R)-4-хлор-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он   |
| 55 и<br>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<br>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(3,3-2H <sub>2</sub> )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(3,3-2H <sub>2</sub> )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}-1λ6-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}-1λ6-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   |

| Пр.          | Название   |
|--------------|--|
| 65           | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-3-[3-(гидроксиметил)циклобутокси]-6-(2-гидроксипропан-2-ил)-2,3-дигидро-1H-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-1H-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-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)-N-метилциклопропан-1-карбоксамид  |
| 68 и<br>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-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид   |
| 70 и<br>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-1H-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид и<br>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-1H-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-1H-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-1H-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-1H-изоиндол-1-он   |
| 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<br>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<br>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-{{цис-3-гидроксициклобутил}метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил   |
| 82 и<br>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<br>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-1λ5-пиридин-3-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он   |
| 89 и<br>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<br>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<br>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<br>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<br>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   |
| 104 и<br>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<br>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  |

| Пр.       | Название  |
|-----------|---|
| 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 и 133 | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-5-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он   |
| 134 и 135 | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[1-гидрокси-1-(1H-пиразол-5-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-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-1H-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-1H-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-1H-изоиндол-1-он   |
| 142 и 143 | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)(2H <sub>2</sub> )метил]-4-фтор-6-[2-гидрокси-1-(2H <sub>3</sub> )метоксипропан-2-ил]-3-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-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-1H-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-1H-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-1H-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-1H-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-1H-изоиндол-5-ил]-2-гидрокси-N-(пропан-2-ил)пропанамид   |
| 153 и 154 | 6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-1-{{1-(1-гидроксиэтил)циклопропил}метокси}-5-(2-гидроксипропан-2-ил)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-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-1H-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-1H-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-оксоимидазолдин-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он  |
| 159 и 160 | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-[2-гидрокси-1-(1H-имидазол-1-ил)пропан-2-ил]-3-метокси-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он  |
| 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  |

| Пр.       | Название   |
|-----------|--|
|           | кси-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-метансульфинил)циклопропил]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-хлорпиримидин-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 и 186 | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(5-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-[цис-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-[транс-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-[транс-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-[цис-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      |
| 211       | 6-{{(1R)-1-(4-хлорфенил)-1-[(1-цианоциклопропил)метокси]-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)этил]-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил}метил}пиридин-3-карбонитрил             |





| Пр.       | Название  |
|-----------|---|
| 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-1Н-изоиндол-1-он                                    |
| 275       | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(2-гидрокси-1-{4Н,5Н,6Н,7Н-[1,2,3]триазоло[1,5-а]пирозин-5-ил}пропан-2-ил)-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-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-1Н-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-1Н-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-1Н-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-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид                |
| 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-1Н-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил                        |
| 284 и 285 | 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-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид                 |
| 286       | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[1-(пиримидин-2-ил)пиперидин-4-ил]этил}-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-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-1Н-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-1Н-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-1Н-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-1Н-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил  |
| 293       | (3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он  |
| 294       | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[1-гидрокси-1-(1-метансульфонилпиперидин-4-ил)этил]-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он                                    |
| 295       | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[1-(1,3-оксазол-2-карбонил)пиперидин-4-ил]этил}-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он                          |
| 296       | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-6-{1-гидрокси-1-[1-(2-гидроксиацетил)пиперидин-4-ил]этил}-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-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-1Н-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил                                  |
| 298 и 299 | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-6-(1-{{1-[2-(диметиламино)ацетил]пиперидин-4-ил}-1-гидроксиэтил}-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он                         |
| 300       | (3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-4-фтор-3-[[1-гидроксициклопропил]метокси]-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-он                   |
| 301       | 1-({[(1R)-5-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-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-хлорпиридин-2-ил)метил]-7-фтор-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-1-ил]окси}метил)циклопропан-1-карбоксамид     |
| 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-1Н-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-1Н-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-1Н-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-1Н-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-1Н-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-1Н-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-гидроксиэтокс)-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-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-1Н-изоиндол-1-он   |
| 316 и 317 | 6-{{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1Н-пирозол-4-ил)этил]-1-{{1-(гидроксиметил)циклопропил}метокси}-3-оксо-2,3-дигидро-1Н-изоиндол-2-ил]метил}пиридин-3-карбонитрил |





| Пр.       | Название   |
|-----------|--|
| 393 и 394 | 3-{1-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-цианопиримидин-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-хлорпиримидин-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-[(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-[транс-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}метилциклопропан-1-карбоксамид                            |
| 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}пиримидин-3-карбонитрил   |
| 407       | (3R)-2-[(5-хлор-1-оксо-1λ5-пиримидин-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-1λ5-пиримидин-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}метилциклопропан-1-карбонитрил |
| 409       | (3R)-2-[(5-хлор-1-оксо-1λ5-пиримидин-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}пиримидин-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}пиримидин-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}пиримидин-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}пиримидин-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}пиримидин-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}пиримидин-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}пиримидин-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}пиримидин-3-карбонитрил                |
| 418       | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(1R)-1-(5-хлорпиримидин-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}пиримидин-3-карбонитрил                               |
| 420       | 1-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-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}метилциклопропан-1-карбонитрил    |
| 421       | (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-1H-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-1H-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-1H-изоиндол-1-он                                    |
| 424       | (3R)-6-[1-(1-ацетилпиперидин-4-ил)-1-гидроксиэтил]-2-{[5-хлор-3-(гидроксиметил)пиримидин-2-ил]метил}-3-(4-хлорфенил)-4-фтор-3-метокси-2,3-дигидро-1H-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-[чис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он                              |
| 426       | 6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3R)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-3-карбонитрил                      |
| 427       | 6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-3-оксо-1-[(3R)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-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-1H-пиразол-4-ил)этил]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-3-карбонитрил           |
| 429       | 6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-(2-метоксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-3-карбонитрил                            |
| 430       | 6-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-гидрокси-1-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)пропил]-1-(2-метоксиэтокси)-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]метил}пиримидин-3-карбонитрил                            |







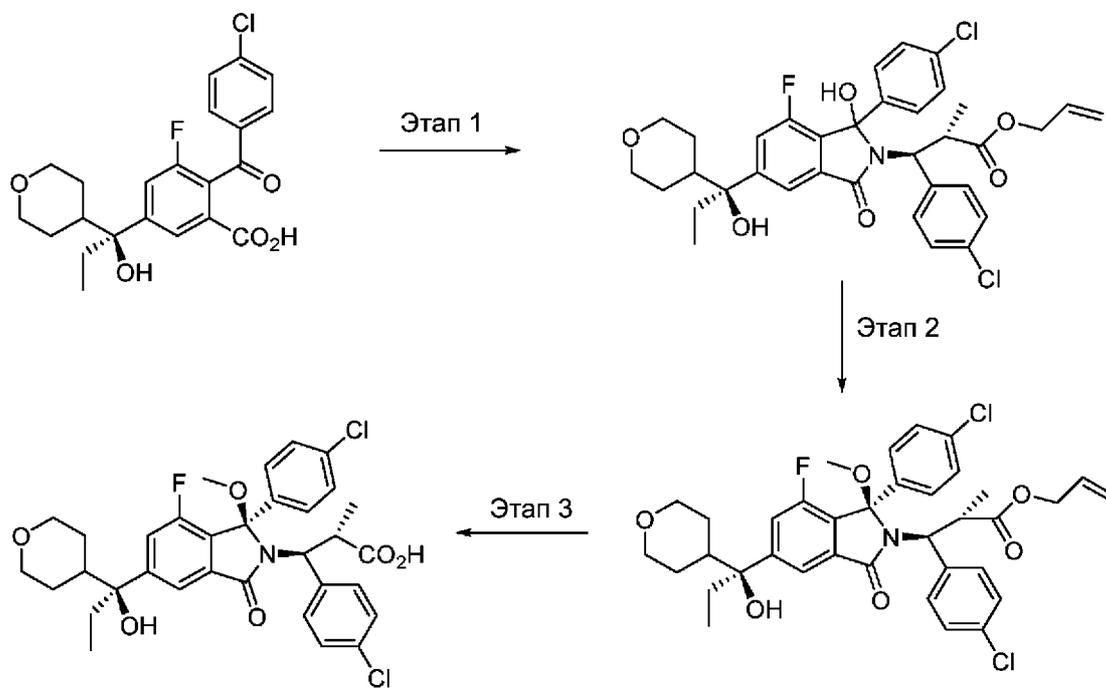


| Пр.  | Название   |
|------|--|
| 560  | (3R)-3-(4-хлорфенил)-2-[(5-хлорпиримидин-2-ил)метил]-4-фтор-6-[(1S)-1-гидрокси-1-(1-метилпиперидин-4-ил)пропил]-3-[цис-3-гидроксициклобутокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-1-он  |
| 561  | 2-{[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[1-(4-фтор-1-метилпиперидин-4-ил)-1-гидроксипропил]-3-оксо-1-[(3S)-оксолан-3-илокси]-2,3-дигидро-1H-изоиндол-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-гидроксипропокси]-2,3-дигидро-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-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-[гидроксидайтеерометил]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-[гидроксидайтеерометил]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}пиримидин-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                                    |

## Приготовление

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 («соединения 1»)**



5

**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**

**В** раствор

10 (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 ч. Добавляли воду и  
 15 экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу промывали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , соевым раствором, сушили и 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**

Указанное в заголовке соединение получали из  
 5 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 MeOH вместо 1,1-бис(гидроксиметил)циклопропана. Диастереоизомеры разделяли посредством хиральной СЖХ, указанное в заголовке соединение представляло собой  
 10 более быстро элюирующийся изомер. МС:  $[M+H]^+ = 670$ .

**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**

15 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, DMSO-d6): 12,5–12,00 (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:  $[M+H]^+ = 630$ .

**(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)**

25 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, DMSO-d6)  $\delta$  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),

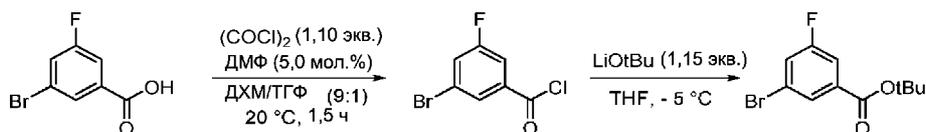
3,33–3,22 (м, 1H), 3,21–3,14 (м, 1H), 3,13 (с, 3H), 1,94 (тт,  $J = 12,2, 3,6$  Гц, 1H), 1,89–1,78 (м, 2H), 1,66 (д,  $J = 12,8$  Гц, 1H), 1,41–1,24 (м, 2H), 1,19 (д,  $J = 6,8$  Гц, 3H), 0,93 (д,  $J = 13,2$  Гц, 1H), 0,57 (т,  $J = 7,3$  Гц, 3H). МС:  $[M+H]^+ = 630$ .

## Приготовление

2

- 5 **(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 1»)**

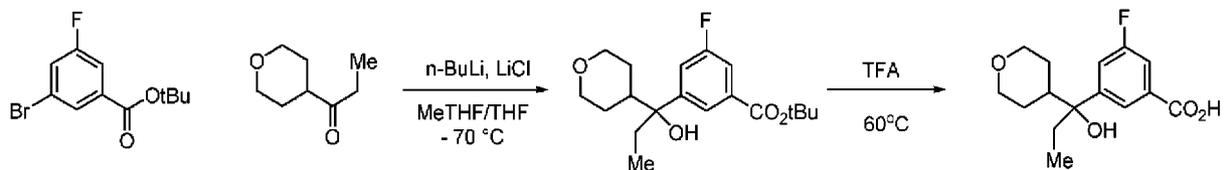
### Этап 1. Трет-бутил 3-бром-5-фторбензоат



- 10 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
- 15 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.)
- 20 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, причем 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,
- 25 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-флос. 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  $^1\text{H}$  (400 МГц;  $\text{CDCl}_3$ ): 7,89–7,88 (1H, м), 7,60–7,57 (1H, м), 7,40–7,37 (1H, м), 1,57 (9H, с).

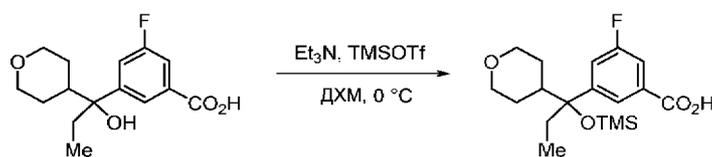
5 **Этап 2. 3-Фтор-5-(1-метил-1,4-оксадиазол-4-ил)бензойная кислота.**



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  $\text{LiCl}$  в ТГФ (72,7 мл, 0,5 экв.) и охлаждали до  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ . В течение 1 ч по каплям добавляли раствор  $n$ -бутиллития в гексанах (2,2 М, 39,0 мл, 1,1 экв.); реакция была завершена после окончания добавления. Смесь нагревали до  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , гасили полунасыщенным водн. раствором  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (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.) посредством дистилляции при пониженном давлении. Концентрированный раствор трет-бутил-3-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензоата обрабатывали ТФА (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 МТВЕ (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 посредством 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  $^1\text{H}$  (400 МГц;  $\text{DMSO}$ ): 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)<sup>+</sup>  
: m/z = 283,1

**Этап 3. 3-Фтор-5-[1-(оксан-4-ил)-1-[(триметилсилил)окси]пропил]бензойная кислота**



5

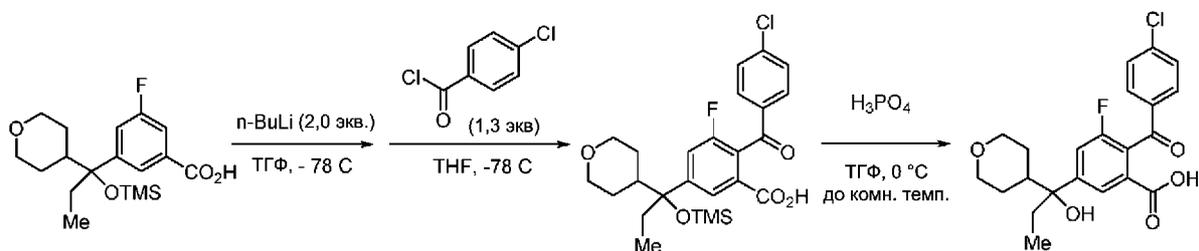
В суспензию 3-фтор-5-[1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойной кислоты (7,06 г, 1,0 экв.) в DCM (40 мл) при 0 °С добавляли Et<sub>3</sub>N (7,08 г, 2,6 экв.) в течение 30 мин (поддерживая температуру ниже 5 °С). Полученный прозрачный раствор обрабатывали раствором TMSOTf (13,34 г, 2,4 экв.) в ДХМ (40 мл) в течение 60 мин (поддерживая

10 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 раствора KHSO<sub>4</sub> (53 мл) и водой (2 x 88 мл). Раствор сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт (масло) кристаллизовали из смеси ДХМ/гептан с получением указанного в заголовке

15 соединения (8,24 г, 93%) в виде грязно-белого твердого вещества. ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц; DMSO): 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)<sup>+</sup> : m/z = 355,2

20

**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). 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 об.) добавляли по каплям в течение 60 мин, причем внутренняя

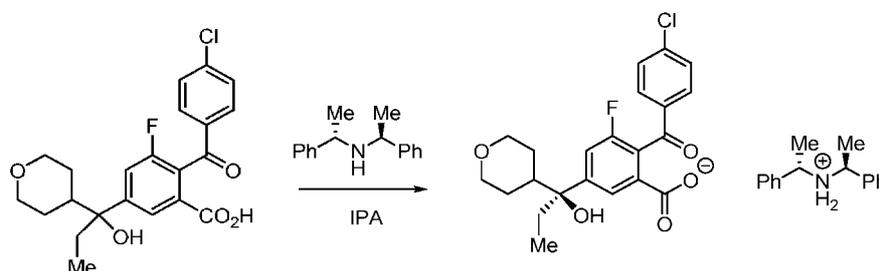
температура оставалась ниже  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Полученный бледно-красный раствор перемешивали в течение 30 мин после завершения добавления и добавляли 4-хлорбензоилхлорид (1,6 мл, 1,15 экв.) в ТГФ (2 об., 8,0 мл) в течение 10 мин, причем внутренняя температура оставалась ниже  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , реакция была завершена по окончании добавления; 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 качестве раствора в ТГФ. ЖХМС (M+H)<sup>+</sup> : m/z = 493,2

К раствору добавляли концентрированную H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (3,8 мл, 5,0 экв.) и смесь перемешивали при  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 18 ч. Смесь разбавляли 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 комнатной температуры 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+H)<sup>+</sup> : m/z = 421,1

20 Этап

5.

**2-(4-Хлорбензоил)-3-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойная кислота — соль бис[(1S)-1-фенилэтил]амин**



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) посредством 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 изопропиловом спирте (ИПС) (300 мл) в течение 2 минут с последующим промыванием ИПС (200 мл). Раствор перемешивали при температуре окружающей среды (22–23 °) в течение 15 минут и впоследствии вносили затравку с аутентичным образцом указанного в заголовке соединения (0,50 г); твердое вещество легко кристаллизовалось и наблюдался 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 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

Темп. колонки: 27°

Элюент: гептан/ИПС 80: 20 с 0,1% TFA

Скорость потока: 1,0 мл/мин при 254 нм

Удерживание Желательный (S) энантиомер, время удерживания (ВУ) = 4,60 мин

Нежелательный (R) энантиомер, ВУ = 5,83 мин Материал (250 г, 1,0 экв., 95 : 5 с. э.)

растворяли в ИПС (4000 мл, 16 об.) посредством 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 отделяли посредством фильтрации в вакууме, фильтровальный осадок промывали ИПС (2 x 450 мл) и высушивали фильтровальный осадок в течение 5 мин перед дополнительной сушкой в вакуумной печи при 50 °С.

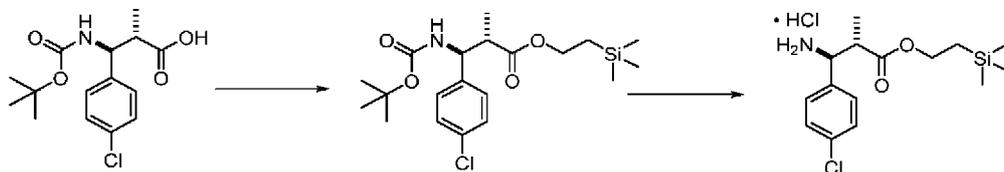
2-(4-хлорбензоил)-3-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойная

кислота — соль бис[(1S)-1- фенилэтил]амин а получали в виде бежевого твердого

вещества (219,2 г; выход 88%); по ВЭЖХ с. э. составляло 99,6 : 0,4. ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц; DMSO): 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**

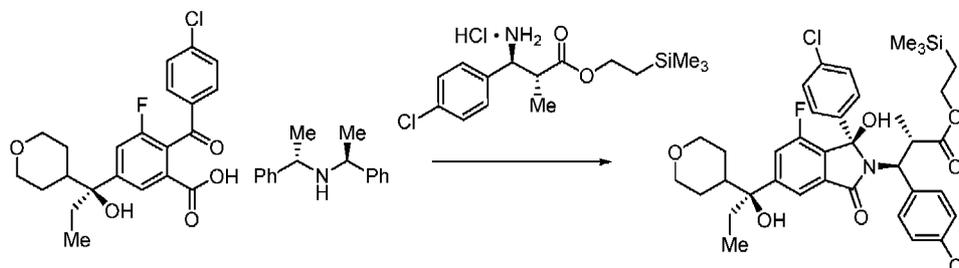


- 5 В суспензию (2S,3S)-3-[[трет-бутоксикарбонил]амино]-3-(4-хлорфенил)-2-метилпропановой кислоты (109,82 г, 1,0 экв.), 2-триметилсилилэтанола (49,66 г, 1,2 экв.) и ДМАП (4,28 г, 0,05 мол. %) в ДХМ (1100 мл, 10 об.) при -10 °С добавляли EDC•HCl (100,65 г, 1,5 экв.) пятью равными порциями в течение 75 мин (поддерживая температуру ниже 0 °С).
- 10 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 мин и разделяли фазы. Органическую фазу промывали 5% раствором NaHCO<sub>3</sub> (500 мл) и водой (2 x 500 мл). Органическую фазу концентрировали в вакууме с получением
- 15 2-(триметилсилил)этил(2S,3S)-3-[[трет-бутоксикарбонил]амино]-3-(4-хлорфенил)-2-метилпропаноата, который использовали непосредственно на следующем этапе. ЖХМС (M+H)<sup>+</sup> : m/z = 414,2
- 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.
- 20 раствор HCl в диоксане (350 мл, 4,0 экв.) в течение 2 ч. Во время этого добавления соль HCl начинала осаждаться, и суспензия постепенно густела при выдерживании реакции при комнатной температуре в течение 24 ч. Суспензию разводили МТВЕ (800 мл), фильтровали, а фильтровальный осадок промывали МТВЕ (2 x 200 мл) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого хлопьевидного твердого вещества
- 25 (108,22 г, 88%) после сушки в вакуумной печи при 50 °С до постоянной массы. ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц; CDCl<sub>3</sub>): 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)<sup>+</sup> : 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

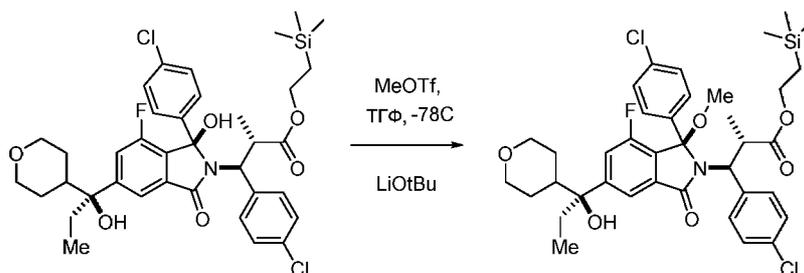
Дихлорметан (150 мл, 10 объемов) добавляли в смесь 2-(4-хлорбензоил)-3-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]бензойной кислоты, соли бис[(1S)-1-фенилэтил]амин (15,0 г, 1,0 экв.), 2-(триметилсилил)этил(2S,3S)-3-амино-3-(4-хлорфенил)-2-метилпропаноата, гидрохлоридной соли (8,2 г, 1,1 экв.), гидрохлорида EDC (4,7 г, 1,15 экв.), ДМАП (260 мг, 0,1 экв.) и 2-гидроксипиридин-N-оксида (230 мг, 0,1 экв.). Смесь перемешивали в течение 18 ч, затем гасили добавлением водн. NaHCO<sub>3</sub> (4,5 г, 2,5 экв. в 60 мл H<sub>2</sub>O). 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<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (3,5 мл, 2,5 экв. в 60 мл воды), водн. NaHCO<sub>3</sub> (4,5 г, 2,5 экв. в 60 мл H<sub>2</sub>O) и 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 часов, выдерживали в течение 1 ч, затем фильтровали. Осадок промывали смесью 2,5 / 1 MeOH : H<sub>2</sub>O (45 мл) и водой (45 мл) и сушили в вакуумной печи при 50 °С 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 <sup>19</sup>F ЯМР). ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц; CDCl<sub>3</sub>): 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–

25

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 19F (376 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: -119,1 и ЖХМС (M+H)<sup>+</sup> : 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



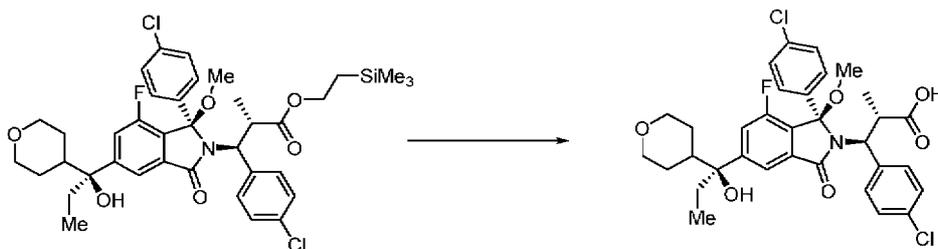
Твердый

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 °С и добавляли MeOTf (метилтрифторметансульфонат) (0,46 мл, 1,2 экв.). Полученный прозрачный раствор выдерживали при внутренней температуре -70 °С. 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 °С в течение 18 ч, впоследствии нагревали до -15 °С в течение 2 ч, причем конверсия составляла > 98%. 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 окружающей среды перед фильтрацией. Осадок промывали смесью 1 : 1 ИПС / вода (20 мл) и сушили в вакуумной печи при 50 °С с получением указанного в заголовке соединения (2,4 г) (нескорректированный выход 94%, с. д. 100:0,5 по 19F ЯМР). ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц; CDCl<sub>3</sub>): 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  $^{19}\text{F}$  (376 МГц, CDCh)  $\delta$ : -118,8 и ЖХМС (M+H) $^{+}$  : m/z = 730,3

### 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**



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 об.) 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 мин и добавляли 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):

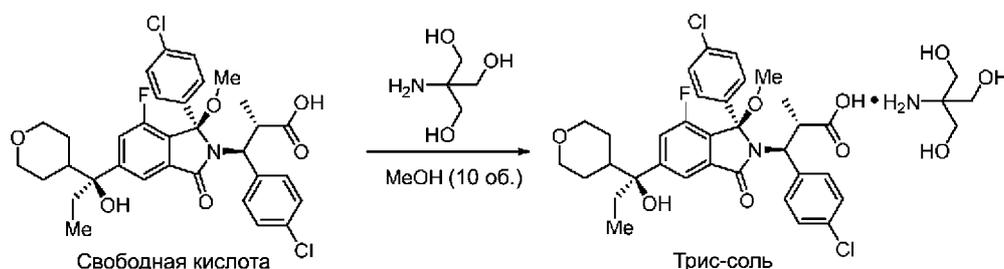
Таблица 6

| Положение<br>[°2-тета] | Высота [см] | ПШПМ [°2-тета] | d-расстояние<br>[Å] | Отн. инт. [%] |
|------------------------|-------------|----------------|---------------------|---------------|
| 5,5324                 | 119,60      | 0,4093         | 15,97459            | 3,19          |
| 8,0939                 | 363,89      | 0,0768         | 10,92389            | 9,72          |
| 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.

- 5 **(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**



- 10 **(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  
 15 вещества растворяли посредством 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).

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.

## БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

### Пример 1. Соединения формулы (I°)

Взаимодействие MDM2-p53 с использованием анализа связывания на 96-луночном планшете (ИФА)

Анализ ИФА проводили в планшетах, покрытых стрептавидином, которые предварительно инкубировали с 200 мкл на лунку 1 мкг мл<sup>-1</sup> биотинилированного пептида IP3. Планшеты были готовы к использованию для связывания MDM2 после промывания планшета фосфатно-солевым буферным раствором (PBS).

Соединения и контрольные растворы в DMSO, аликвотированные в 96-луночных планшетах, предварительно инкубировали в конечной концентрации 2,5–5% (об./об.) DMSO при комнатной температуре (например, 20 °С) в течение 20 мин с аликвотами по 190 мкл оптимизированных концентраций *in vitro* транслируемых MDM2 перед переносом смеси с соединением MDM2 в планшеты с стрептавидином b-IP3 и инкубацией при 4 °С в течение 90 мин. После трехкратной промывки с PBS для удаления несвязанных MDM2 каждую лунку инкубировали при 20 °С в течение 1 часа с TBS-Tween (50 мМ трис pH 7,5; 150 мМ NaCl; 0,05% неионогенного детергента Tween 20) буферного раствора первичного мышинового моноклонального антитела к MDM2 (Ab-5, Calbiochem, используемого в разведении 1/10000 или 1/200 в зависимости от используемого маточного раствора антитела), затем три раза промывали TBS-Tween перед инкубацией в течение 45 минут при 20 °С с забуференным раствором конъюгата вторичного антимышиного антитела козы с пероксидазой хрена (HRP) (используемым в разведении 1 / 20000 или 1 / 2000 в зависимости от маточного раствора антитела). Несвязанное вторичное антитело удаляли посредством трехкратной промывки TBS-Твин. Активность связанной HRP измеряли с помощью усиленной

хемилюминесценции (ECL™, Amersham Biosciences) с использованием окисления диацетилгидразидного субстрата, люминола, для получения поддающегося количественному определению светового сигнала. Процент ингибирования MDM2 при данной концентрации рассчитывают как  $[1 - (\text{ОЕЛ, обнаруженная в обработанном соединении образце,} - \text{ОЕЛ отрицательного контроля DMSO}) \div (\text{ОЕЛ положительного и отрицательного контроля DMSO})] \times 100$  или как  $(\text{ОЕЛ, обнаруженная в обработанном соединении образце,} \div \text{ОЕЛ контролей DMSO}) \times 100$ . Рассчитывали значение IC50, используя график зависимости % ингибирования MDM2 от концентрации, которое представляло собой среднее значение по двум или трем независимым экспериментам.

#### 10 Анализ методом вестерн-блоттинга

Клетки SJSА обрабатывали в течение 6 часов с 5, 10 и 20 мкМ соединений в 0,5% DMSO. Клетки вместе с 0,5% DMSO только контролей промывали ледяным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и белковыми экстрактами, полученными посредством лизирования клеток в буфере SDS (62,5 мМ трис рН 6,8; 2% додецилсульфата натрия (ДСН); 10% глицерина) с обработкой ультразвуком в течение 2 x 5 секунд (Soniprep 150ME) для расщепления ДНК с высокой молекулярной массой и снижения вязкости образцов. Концентрацию белка в образцах оценивали с использованием системы анализа BCA Pierce (Pierce, Rockford, IL) и 50 пг аликвот белка, проанализированных с использованием процедур стандартного электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) и вестерн-иммуноблоттинга, добавляли п-меркаптоэтанол (5%), и бромфенол синий (0,05%) и образцы, которые затем подвергали кипячению в течение 5 минут, затем кратковременно центрифугировали, затем загружали в готовый забуференный с трис-глицином ДСН-полиакриламидный гель с градиентом 4–20% (Invitrogen). Стандарты молекулярной массы (SeeBlue™, Invitrogen) включали в каждый 25 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. Первичные антитела, используемые для иммунологического анализа перенесенных белков, представляли собой: мышинное моноклональное антитело NCL-p53DO-7 (Novocastra) в 30

концентрации 1 : 1000; MDM2 (Ab-1, клон IF2) (Oncogene) в концентрации 1 : 500; WAF1 (Ab-1, клон 4D10) (Oncogene) в концентрации 1 : 100; Актин (AC40) (Sigma) в концентрации 1 : 1000. В качестве вторичного антитела использовали конъюгированное с пероксидазой аффинно очищенное козье антитело к мышинному белку (Dako) при 1:1000. Обнаружение и визуализацию белков проводили посредством усиленной хемилюминесценции (ECL™, Amersham) с детектированием света посредством 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 p53 дикого типа и мутантной остеосаркомы (SJSA-1 и SN40R2, соответственно). Все клеточные культуры выращивали в среде RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Великобритания), 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 сульфородамино В (SRB), как было описано ранее. 100 мкл 3 x 10<sup>4</sup>/мл и 2 x 10<sup>4</sup>/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% CO<sub>2</sub> 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 добавлением 25 мкл 50% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) для фиксации клеток в течение 1 ч 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% 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 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 АТФ, который сигнализирует о наличии метаболически активных клеток. Как SJSA-1, так и SN40R2 выращивали в среде RPMI 1640 (Life Technologies № 61870), дополненной 10% FBS (PAA № A15-204) 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% CO<sub>2</sub> на 24 ч. Затем к клеткам добавляли ряд концентраций антагониста MDM2-p53 в DMSO до конечной концентрации DMSO 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 EC<sub>50</sub> определяли по сигмоидальной аппроксимации 4-параметрической кривой с использованием XLfit в сочетании с Activity Base (IDBS; Guildford, Surrey, Великобритания).

*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% DMSO об./об.) еще в течение 72 часов. В конце периода инкубации добавляют 10% (об./об.) аламарового синего и инкубируют еще в течение 6 ч перед определением флуоресцентного продукта на 535 нм (возб.)/590 нм (исп.). Антипролиферативную активность соединений по изобретению можно определить посредством 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 настоящем документе*

| Патентный пример | MDM2 IC50 (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                     |
| 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  |
| 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   |
| 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 настоящем документе*

| Пример | MDM2 IC50 (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                     |
| 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         |            |
| 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 |            |
| 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         |            |
| 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    |            |      |            |            |
| 253a | 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     |       |       |            |            |
| 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    |       |       |     |            |
| 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 |
| 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       |            |            |
| 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 |
| 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  |
| 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<br>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           |       |             |            |            |
| 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 |
| 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  |
| 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  |
| 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. Ответ на повреждение ДНК (DDR) представляет собой приоритетный путь сенсбилизации к соединению 1, идентифицированный скринингом CRISPR на потерю функции и подтвержденный дополнительными экспериментами и данными**

Двойной CRISPR-скрининг (CRISPR-нокаут и CRISPRi) проводили в панели из трех линий клеток рака легкого P53 дикого типа в присутствии или в отсутствие соединения 1 для идентификации новых предиктивных биомаркеров чувствительности к антагонисту MDM2.

Несколько генов, связанных с ответом на повреждение ДНК (DDR), были идентифицированы как приоритетные результаты (Фиг. 1А-В). Интересно, что эти гены участвуют в нескольких путях DDR, таких как пути гомологичной рекомбинации, анемии Фанкони (FA), эксцизионной репарации оснований (BER) и стресса репликации.

5 На Фиг. 1А показано обогащение пути анемии Фанкони в результатах CRISPR.

Стресс репликации представляет собой считывание геномной нестабильности и вызывается множеством дефектов в пути DDR, что приводит к высоким уровням повреждения ДНК. Высокие уровни повреждения ДНК, в свою очередь, влияют на процесс репликации ДНК. Данные скрининга CRISPR показывают, что опухоли с  
10 дефектами в их механике DDR, как правило, чувствительны к лечению соединением 1.

Таким образом, эти данные демонстрируют связь между чувствительностью к антагонисту MDM2 и дефектами во множестве путей DDR, включая пути анемии Фанкони (FA) и эксцизионной репарации оснований (BER). Таким образом, потеря функции в пути DDR является биомаркером чувствительности к антагонисту MDM2.

15 Чтобы подтвердить результаты скрининга CRISPR, клетки мезотелиомы человека ранних пассажей, ранее охарактеризованные их чувствительностью к соединению 1, были использованы для идентификации транскриптомных сигнатур, дифференциально экспрессируемых между апоптотическими и неапоптотическими образцами. Сигнатура «стресса репликации» сильно обогащалась в линиях апоптотических клеток  
20 мезотелиомы, подтверждая связь между чувствительностью к соединению 1 и активированными путями DDR (Фиг. 1С).

В следующих примерах ниже описываются биоинформатический анализ и анализ «мокрым путем» в нескольких системах, которые подтверждают специфические биомаркеры в путях DDR в качестве биомаркеров для чувствительности к антагонисту  
25 MDM2. Эти дополнительно подтвержденные пути биомаркеров обобщены на Фиг. 5. В дополнение к предоставлению дополнительных доказательств по примерам путей биомаркеров эти данные повторно подтверждают надежность данных скрининга CRISPR в более широком смысле.

### **Биоинформатический анализ данных полногеномного скрининга CRISPR**

Полногеномные скрининги потери функции (CRISPRko и CRISPRi) в присутствии соединения 1 были проведены компанией Horizon Discovery (<https://horizondiscovery>) для панели трех линий раковых клеток P53 дикого типа (A549, NCI-H460, NCI-H292).  
5 CRISPRko и CRISPRi проводили параллельно и анализировали вместе для определения потенциальных совпадений и путей сенсibilизации к соединению 1.

Анализ NGS продемонстрировал превосходный контроль качества со средней оценкой качества 35, и все образцы секвенировались с > 97% прочтений с оценкой качества более 30. В целом наблюдалась превосходная корреляция между повторениями для всех  
10 образцов. Контрольные единые направляющие РНК (положительные, отрицательные и ненацеленные) функционировали в соответствии с ожиданиями с отчетливым выбыванием важных генов в образцах, обработанных контролем, по сравнению с плазмидой из исходной библиотеки.

Данные анализировались компанией Horizon, а также собственными силами с  
15 использованием двух различных способов вычислений: DrugZ и MAGeCK. Совпадения CRISPR ранжировали по кратности изменения и значимым p-значениям. Наблюдалось хорошее перекрытие значимых совпадений между CRISPRko и CRISPRi. Были идентифицированы как уникальные, так и перекрывающиеся сенсibilизирующие гены, в частности, гены, связанные с репарацией повреждения ДНК (DDR), демонстрировали  
20 явные выпадения в скринингах. Кроме того, сетевой анализ совпадений CRISPR продемонстрировал сильное обогащение генов из пути анемии Фанкони, что указывает на их роль в репарации межпочечных поперечных сшивок (FANCA, FANCB, FANCD2) (Фиг. 1A). Анализ обогащения набора генов (GSEA) проводили на совпадениях CRISPR, ранжированных по значениям кратности изменений с  
25 использованием различных сигнатур набора генов: путей Hallmark, Reactome, KEGG и Biocarta. Результаты GSEA выявили значительное обогащение путей, связанных с репарацией ДНК, таких как путь эксцизионной репарации оснований и гомологичная рекомбинация (Фиг. 1B) в приоритетных истощенных совпадениях.

На основании наших результатов скрининга CRISPR мы также исследовали сигнатуры  
30 экспрессии генов DDR в собственных данных РНК-секвенирования апоптотических и неапоптотических линий клеток мезотелиомы.

Линии клеток мезотелиомы человека ранних пассажей были приобретены у компании UK Mesobank ([www.mesobank.com](http://www.mesobank.com)). Профилирование экспрессии генов в линиях клеток Mesobank проводили с помощью секвенирования спаренных концов цепочечной РНК, используя платформу Illumina HiSeq и 3 биологических повтора для каждого образца.

5 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 37 миллионов прочтений. Прочтения секвенирования РНК выравнивали с геномом человека hg38/GRCh38, используя инструмент для выравнивания STAR (v2.5.4b). В среднем 94%

10 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 v27. Функцию преобразования стабилизации дисперсии из пакета DESeq2 R (v1.20.0) использовали для нормализации необработанных данных

15 подсчета и проводили неконтролируемую иерархическую кластеризацию. Биологические повторы отличались высоким уровнем корреляции ( $R^2 = 0,98$ ). Дифференциальную экспрессию генов проводили, используя пакет DESeq2 R. Гены с более чем 2-кратной экспрессией и скорректированными Р-значениями  $< 1e-7$  считали в значительной степени дифференциально экспрессируемыми между апоптотическими и

20 неапоптотическими образцами. Интересно, что авторы изобретения обнаружили значительную повышенную регуляцию генов, связанных со стрессом репликации, в линиях апоптотических клеток мезотелиомы (Фиг. 1С), что согласуется с выходными данными скрининга CRISPR.

### **Путь HR. Изменения BRCA1, BRCA2 и ATM**

25 Гены, участвующие в пути гомологичной рекомбинации, были определены при CRISPR-скрининге. Гомологичная рекомбинация (HR) представляет собой безошибочный путь репарации DSB, который в значительной степени ограничен S- и G2-фазами клеточного цикла. Огромное значение пути HR для поддержания генома продемонстрировано посредством идентификации нескольких подавляющих рак

мутаций в BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, RAD50, RAD51C при многочисленных видах рака.

Одним из центральных компонентов HR является серин-треонин-киназа, мутантный при атаксии-телеангектазии белок (ATM), который фосфорилирует множество ключевых участников в различных ветвях DDR. Соматические мутации или делеции ATM обычно встречаются в лимфоидных злокачественных новообразованиях, а также в некоторых солидных опухолях, что приводит к потере экспрессии белка и нарушению репарации двухцепочечных разрывов ДНК в геноме.

Биоинформатический анализ общедоступных данных DepMAP RNAi (версия 20Q4) для MDM2 предсказывал, что линии клеток с мутантным ATM значительно больше зависят от MDM2 по сравнению с линиями клеток с ATM дикого типа (Фиг. 2а). Дополнительно сильное обогащение мутацией ATM было обнаружено в полученных от пациентов линиях апоптотических клеток мезотелиомы (6/9) по сравнению с неапоптотическими линиями, все из которых представляют собой ATM дикого типа (6/6) (Фиг. 2В).

Кроме того, *in vitro* валидация на четырех линиях клеток с мутантным ATM из разных показаний (HCC1500 — молочная железа, LNCap — предстательная железа, HT-144 — меланома, HepG2 — печень) показали чувствительность к соединению 1, определенную по снижению пролиферации клеток (Фиг. 2С), в то время как данные по LNCap (предстательная железа) и HepG2 (печень) показали чувствительность к соединению 1, определенную по повышенному апоптозу (Фиг. 2D). Кроме того, анализ методом вестерн-блоттинга показал четкое модулирование сигнального пути DDR при лечении соединением 1 (Фиг. 2Е).

Вместе с идентификацией мутаций ATM в качестве биомаркера для чувствительности к антагонисту MDM2 дополнительный биоинформатический анализ указывает на то, что потеря или мутация других генов пути HR может действовать в качестве биомаркеров для чувствительности к антагонисту MDM2. Гены пути HR, которые могут действовать в качестве биомаркеров терапии антагонистами MDM2, включают, без ограничений, BRCA1 и/или BRCA2.

Для подтверждения того, что мутации ATM, BRCA1 и/или BRCA2 (или потеря экспрессии) могут быть связаны с чувствительностью к антагонисту MDM2, дополнительно проводили валидацию *in vitro* на органоидах, полученных от пациента

(PDO). 4 PDO из различных показаний с изменениями ATM, BRCA1 и/или BRCA2 демонстрировали чувствительность к соединению 1, что было измерено по снижению пролиферации клеток (Фиг. 2F-G). Следует отметить, что 4 дополнительные PDO из тех же показаний, но без изменений ATM, BRCA1 и/или BRCA2, были устойчивыми к соединению 1.

Гены пути FA также идентифицированы в качестве биомаркеров терапии антагонистами MDM2.

### **Анализ биоинформатики**

Авторы изобретения исследовали общедоступные данные о зависимости РНКи от MDM2 (версия 20Q4) линий раковых клеток, полученных от DerMAP (www.dermap.org). Геномные признаки этих линий раковых клеток, такие как соматические мутации и изменения числа копий, были получены из наборов данных DerMAP. Авторы изобретения обнаружили, что линии клеток, дифференциально зависимые от MDM2, были обогащены мутациями в ATM (Фиг. 2A). На основании полученных результатов по мутациям ATM из общедоступных наборов данных о зависимости РНКи авторы изобретения дополнительно исследовали статус гена ATM в собственной панели линий апоптотических и неапоптотических клеток мезотелиомы (Фиг. 2B).

Выделение ДНК и экзомное секвенирование линий клеток мезотелиомы проводили с помощью GATC Biotech (теперь Eurofins) в соответствии с их рекомендациями. Экстрагировали геномную ДНК и проводили экзомное секвенирование с использованием набора Agilent SureSelect Human All Exon V6. Библиотеку секвенирования сконструировали и проанализировали с помощью Illumina HiSeq с использованием секвенирования спаренных концов 101-bp. Для анализа были удалены низкие показатели качества (средняя оценка Phred ниже 15) перед переходом к любой дополнительной обработке и для анализа использовали только совместимые пары (прямое и обратное прочтение). Сопоставление со сборкой эталонного человеческого генома hg19 проводили с использованием BWA v0.7.15 с параметрами по умолчанию. В среднем 96% прочтений были уникальным образом сопоставлены с эталонным геномом и среднее целевое перекрытие было кратно  $94,02 \pm 18,66$ . Данные экзома использовали для распознавания однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и вставок-делаций (InDel),

которое выполнялось с помощью GATC Biotech с использованием программного обеспечения GATK и Ingenuity. Данные также анализировали собственными силами с использованием VarScan2. Авторы изобретения учитывали только SNP и InDel, распознававшиеся, как правило, по меньшей мере двумя способами, для получения результатов с высокой степенью достоверности. Для GATK выравнивание последовательностей было уточнено посредством выполнения локального выравнивания, а ПЦР-дубликаты удаляли с использованием PICARD (<http://picard.sourceforge.net/>). Распознавание SNP и InDel проводили с использованием распознавателя гаплотипов GATK-и аннотировали с использованием snpEff. В случае varScan2 SNP и InDel распознавали, используя данные mpileup SAMtools в качестве входных данных и запуская varScan2 в соматическом режиме. Мутации ATM, определяемые в качестве вредных мутаций с потерей функции по меньшей мере двумя способами брались для дальнейшего анализа.

#### **Анализ пролиферации на линиях раковых клеток**

15 Раковые клетки культивировали в соответствующей среде. Клетки собирали, подсчитывали, 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 °C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Готовили 10 мМ маточный раствор соединения 1 в DMSO. Маточный раствор дополнительно разводили в DMSO перед добавлением в двух повторах в лунки 96-луночных планшетов, содержащих клетки, до получения конечной концентрации DMSO 0,1%. Впоследствии планшеты инкубировали при 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 дней. Каждую линию клеток испытывали в трех повторностях. 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. Каждую лунку рассчитывали, за исключением контрольной среды (без клеток), в виде процента от среднего контроля DMSO минус только контрольная среда. Сигмоидальные кривые доза – ответ (переменный наклон) и значения IC<sub>50</sub> рассчитывали, используя GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California, США).

### **Апоптозный анализ**

Клетки высевали в 6-луночные планшеты с плотностью  $2 \times 10^5$  на лунку и инкубировали в течение ночи при  $37^\circ\text{C}$  в увлажненной атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  в воздухе. Соединение 1 получали в DMSO и добавляли в клетки в указанных концентрациях. После инкубации 5 клеток с соединением в течение 72 часов клетки трипсинизировали, промывали PBS и сразу же использовали для анализа методом проточной цитометрии.

Образцы окрашивали с помощью набора для обнаружения апоптоза eBioscience™ Annexin V-FITC (#BMS500FI-100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, образцы промывали в PBS и 10 ресуспендировали в 200 мкл 1x буфера для связывания, содержащего 5 мкл Annexin V-FITC в течение 10 мин при комнатной температуре. После инкубации образцы промывали 1x буферным буфером для связывания и ресуспендировали в 200 мкл 1x буфера для связывания и 10 мкл 20 мкг/мл йодида пропидия (PI).

Затем окрашенные образцы незамедлительно анализировали посредством проточной 15 цитометрии на цитометре Guava easyCyte HT (Merck-Millipore). Популяции клеток разделяли на три группы: живые клетки, демонстрирующие низкий уровень флуоресценции (Annexin V-/PI-), апоптотические клетки, демонстрирующие зеленую флуоресценцию (Annexin V+/PI-) и мертвые клетки, демонстрирующие как красную, так и зеленую флуоресценцию (Annexin V+/PI+). Анализы данных выполняли с 20 использованием Microsoft Excel, а результаты наносили на график в Prism7 (GraphPad Software, California, США).

### **Вестерн-блоттинг**

Клеточные лизаты готовили, беря клеточный осадок и добавляя ледяной 1x полный 25 Трис-буфер для лизиса (1% Тритон X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Трис.HCl, pH 7,5, плюс ингибиторы протеазы (полный мини, 1 таблетка/10 мл, Roche, Welwyn Garden City, Herts, Великобритания), 50 mM NaF и 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). 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 и образец супернатанта удаляли для определения белка (анализ BCA — Pierce, Paisley, Великобритания).

Затем клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блоттинга. Эквивалентные количества белкового лизата смешивали с ДСН-буфером для образцов (Novex, Paisley, Великобритания) и ДТТ перед кипячением в течение 10 минут. Образцы разделяли с помощью ДСН-ПААГ (4–12% гель Nu-PAGE – Novex, Paisley, Шотландия), наносили на нитроцеллюлозные фильтры, блокировали блокирующим буфером Odyssey (LI-COR Bioscience, Lincoln, США) 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: 10 000 в блокирующем буфере Odyssey (LiCor Biosciences, Lincoln, США). Затем блоты сканировали для обнаружения инфракрасной флуоресценции на системе инфракрасной визуализации Odyssey (LiCOR Biosciences, Lincoln, США).

#### **Анализ пролиферации на полученных от пациента органоидах (PDO)**

Органоиды извлекали из банка органоидов CrownBIO и размножали до получения достаточного количества в соответствии со стандартной операционной процедурой. За день до засева органоидов необходимое количество органоидов пассировали в соотношении 1 : 1 с использованием 50% Matrigel и 50% соответствующей культуральной среды. В день 0 органоиды высевали и добавляли соединение: органоиды собирали посредством добавления 20 мкл 100x раствора диспазы в каждую лунку из 6-луночного планшета и инкубируя при 37°C в течение 30 минут. После инкубации органоиды собирали из всех лунок и пипеткой переносили через предварительно смоченный 100-мкм фильтр в пластиковую пробирку вместимостью 50 мл, затем поток фильтровали через предварительно смоченный 20-мкм фильтр, переворачивали 20-мкм фильтр и выделяли органоиды в новую пробирку вместимостью 50 мл. Собранные органоиды затем ресуспендировали в соответствующей культуральной среде и подсчитывали. Суспензии клеток с органоидами добавляли в 384-луночный планшет с помощью диспенсера Multidrop. Через 2–4 часа после высевания органоидов добавляли соединения с помощью Tecan D300e, затем планшеты помещали обратно в инкубатор для инкубации в течение 5 дней. В день 5 пролиферацию анализировали с помощью анализа CellTiter-Glo. В каждую лунку аналитического планшета добавляли реагент CTG. 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 Envision.

### **Путь NHEJ. Потеря ATRX**

Кроме того, биоинформатический анализ данных панели клеток предсказывал потерю ATRX в качестве значимого биомаркера чувствительности к соединению 1 MDM2 (Фиг. 3). ATRX также участвует в регуляции DDR как посредством негомологичного соединения концов (NHEJ), так и посредством репарации путем гомологичной рекомбинации (HRR).

Идентификация мутаций ATRX в качестве биомаркера для терапии антагонистом MDM2 и дополнительный биоинформатический анализ указывают на то, что потеря или мутация других генов пути NHEJ или HRR может действовать в качестве биомаркеров для чувствительности к антагонисту MDM2.

### **Анализ биоинформатики**

Соединение 1 подвергали скринингу на панели из 237 линий раковых клеток. Значения IC50 и площади активности рассчитывали по исходным кривым доза – ответ. Геномные признаки этих линий клеток, такие как соматические мутации, изменения числа копий и гиперметилирование, были получены из перечня Cancer Functional Events, как указано в публикации Garnett et al (2016). Для идентификации значимых связей особенностей геномики с ответом на лекарственное средство использовали дисперсионный анализ. Авторы изобретения идентифицировали потерю ATRX в качестве статистически значимого (скорректированное р-значение < 0,20) биомаркера чувствительности к соединению 1 (Фиг. 3а и 3b).

### **Путь MMR. Микросателлитная нестабильность (MSI)**

Микросателлиты представляют собой области, которые содержат множественные повторы от 1 до 5 пар оснований, которые широко диспергированы по всему человеческому геному. В нормальных клетках количество повторов микросателлитов подтверждается и поддерживается во время деления клеток посредством репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR). Нарушение системы MMR может сделать клетки неспособными регулировать длину их микросателлитов во время деления клеток,

что называется MSI (микросателлитной нестабильностью). MSI часто наблюдается при нескольких типах рака (аденокарциномах толстой кишки, эндометрия и желудка), и было показано, что MSI-High колоректальные опухоли являются более восприимчивыми к иммуностимулирующей терапии.

5 В данных панели клеток линии колоректальных клеток MSI-H были чувствительными к соединению 1. Информация о микросателлитной стабильности и мутационной нагрузке опухоли для линий клеток была получена из базы данных паспортов клеточных моделей по Сэнгеру. Мы обнаружили, что линии клеток MSI-H демонстрировали высокую мутационную нагрузку опухоли (мутации/Mb) и были обогащены мутациями, 10 связанными с путем репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК (например, MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS2). Кроме того, линии клеток MSI-H продемонстрировали сильное обогащение мутационных сигнатур, связанных с дефектами в репарации ошибочно спаренных нуклеотидов ДНК и мутациями POLD1 и/или POLE (Фиг. 4A). Вместе эти результаты были согласованными и указывали, что 15 опухоли MSI, такие как опухоли толстой кишки, эндометрия и желудка, будут чувствительны к антагонистам MDM2. Кроме того, валидация *in vitro* восьми линий клеток MSI-H из разных показаний продемонстрировала чувствительность к соединению 1, измеренную по снижению пролиферации клеток (Фиг. 4B). Для 20 подтверждения того, что статус MSI-H может быть связан с чувствительностью к антагонисту MDM2, дополнительно проводили валидацию *in vitro* на органоидах, полученных от пациента (PDO). 6 PDO колоректального рака MSI-H продемонстрировали чувствительность к соединению 1, измеренную по снижению эффективности пролиферации клеток (Фиг. 4C). Данные эффективности *in vivo* подтвердили, что соединение 1 существенно ингибирует рост опухоли в модели 25 ксенотрансплантата колоректального рака MSI-H (HCT-116) (Фиг. 4D).

#### **Анализ пролиферации на линиях раковых клеток**

Раковые клетки культивировали в соответствующей среде. Клетки собирали, подсчитывали, доводили до соответствующей плотности и высевали в объем 100 мкл в 96-луночные планшеты с непрозрачными стенками и прозрачным дном и инкубировали 30 в течение ночи при 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Готовили 10 мМ маточный раствор соединения 1 в DMSO. Маточный раствор дополнительно разводили в DMSO

перед добавлением в двух повторах в лунки 96-луночных планшетов, содержащих клетки, до получения конечной концентрации DMSO 0,1%. Впоследствии планшеты инкубировали при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 3 дней. Каждую линию клеток испытывали в трех повторностях. 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. Каждую лунку рассчитывали, за исключением контрольной среды (без клеток), в виде процента от среднего контроля DMSO минус только контрольная среда. Сигмоидальные кривые доза – ответ (переменный наклон) и значения IC<sub>50</sub> рассчитывали, используя GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California США).

#### **Анализ пролиферации на полученных от пациента органоидах (PDO)**

Органоиды извлекали из банка органоидов CrownBIO и размножали до получения достаточного количества в соответствии со стандартной операционной процедурой. За день до засева органоидов необходимое количество органоидов пассировали в соотношении 1 : 1 с использованием 50% Matrigel и 50% соответствующей культуральной среды. В день 0 органоиды высевали и добавляли соединение: органоиды собирали посредством добавления 20 мкл 100x раствора диспазы в каждую лунку из 6-луночного планшета и инкубируя при 37°C в течение 30 минут. После инкубации органоиды собирали из всех лунок и пипеткой переносили через предварительно смоченный 100-мкм фильтр в пластиковую пробирку вместимостью 50 мл, затем поток фильтровали через предварительно смоченный 20-мкм фильтр, переворачивали 20-мкм фильтр и выделяли органоиды в новую пробирку вместимостью 50 мл. Собранные органоиды затем ресуспендировали в соответствующей культуральной среде и подсчитывали. Суспензии клеток с органоидами добавляли в 384-луночный планшет с помощью диспенсера Multidrop. Через 2–4 часа после высевания органоидов добавляли соединения с помощью Tecan D300e, затем планшеты помещали обратно в инкубатор для инкубации в течение 5 дней. В день 5 пролиферацию анализировали с помощью анализа CellTiter-Glo. В каждую лунку аналитического планшета добавляли реагент CTG. Планшеты перемешивали на орбитальном шейкере в течение 10 минут, после чего

подвергали 10-минутной инкубации при комнатной температуре. Затем планшеты считывали (в отношении люминесценции) на планшет-ридере Envision.

### **Эффективность *in vivo***

5  $5 \times 10^6$  клеток НСТ116 (в 100  $\mu$ л PBS) вводили подкожно в правый задний бок групп бестимусных мышей линии BALB/c. Опухоли измеряли снаружи с использованием пары цифровых штангенциркулей и рассчитывали их объемы как длина  $\times$  ширина<sup>2</sup>  $\times$  0,523. Перед началом исследования мышей распределяли в группы по 8 в соответствии с объемом опухоли; средний объем должен составлять приблизительно 100 мм<sup>3</sup> с нормальным диапазоном от 50 до 150 мм<sup>3</sup>. Мышам ежедневно вводили по 50 мг/кг соединения 1 и ежедневно в течение экспериментального периода регистрировали массу тела. Дозирование прекращали, если животные демонстрировали любые признаки токсичности или их масса тела опускалась ниже 85% от исходной массы тела. Объемы опухолей измеряли каждые 2–3 дня; животных умерщвляли, когда объем опухоли достигал  $> 1000$  мм<sup>3</sup> или если опухоли начинали проявлять любые аномалии, такие как  
15 изъязвление.

### **Краткое описание данных о пути DDR**

Двойной скрининг на потерю функции с использованием CRISPR определил пути DDR в качестве приоритетного варианта сенсibilизации к антагонизму к MDM2. Эти анализы в целом согласуются с анализами HORIZON (HR, стресс репликации, NER, пути FA).

20 Дополнительные анализы подтверждают связь между дефицитом DDR и чувствительностью к антагонисту MDM2:

- Сигнатура DDR/стресса репликации присутствует в полученных от пациента апоптотических клетках мезотелиомы.
- Мутации ATRX ассоциированы с кластером ИФН в саркоме.
- 25 • Все полученные от пациента линии апоптотических клеток мезотелиомы, за исключением 1, несут мутации ATM. Все неапоптотические линии представляют собой ATM дикого типа.
- Мутации ATM связаны с зависимостью от MDM2 в наборе данных РНКи; что согласуется со свидетельствами из клинической практики.

- Линии клеток с мутантными ATM (HCC1500, HT-144, LNCap, HepG2) демонстрируют повышенную чувствительность к соединению 1.
- Полученные от пациента органоиды с мутантными BRCA1, BRCA2 и/или ATM демонстрируют повышенную чувствительность к соединению 1 по сравнению с полученными от пациента органоидами без изменений в этих генах.
- Линии клеток MSI-H из различных показаний и модели колоректального рака, полученные от пациента, демонстрируют чувствительность к соединению 1.
- Соединение 1 существенно ингибирует рост опухоли в модели ксенотрансплантата MSI-H (HCT-116).

### 10 **Пример 3. Комбинированное воздействие соединения 1 с ингибиторами PARP на жизнеспособность раковых клеток**

#### Цель

Целью данного исследования является исследование потенциального комбинированного воздействия соединения 1 с 2 соединениями на жизнеспособность раковых клеток. В первую очередь будет определена 50% ингибирующая концентрация (IC50) 3 соединений с использованием люминесцентных анализов жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (CTG) после инкубации с различными концентрациями исследуемого препарата. Впоследствии будет оцениваться эффект синергии соединения 1 в комбинации с 1 соединением (олапарибом, талазопарибом) с помощью матрицы комбинации соответственно.

#### **Схема эксперимента**

Линию клеток будут обрабатывать отдельно исследуемыми препаратами, матричными комбинациями с исследуемыми препаратами и культуральной средой в качестве контроля — несущей среды.

### 25 **Материалы и способы**

#### **1. Клеточная линия**

| Название клеточной линии | Происхождение ткани | Референсный контроль | Время инкубации |
|--------------------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| CAL-51                   | Молочная железа     | Цисплатин            | 72 ч            |
| A2780                    | Яичник              | Цисплатин            | 72 ч            |

Клетки будут культивировать в среде с добавлением 10% FBS (эмбриональной бычьей сыворотки) при температуре 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 95%.

## 2. Материал и реагенты

### Общие реагенты для культивирования клеток и пластиковые элементы

5 FBS (кат. № FND500, exCell Bio)

96-луночные обработанные культурой клеток микропланшеты из черного полистирола с прозрачным плоским дном (кат. № 3603, Corning).

Анализ на жизнеспособность клеток CellTiter-Glo® (кат. № G7572, Promega)

### Приготовление реагента

10 а. Размораживают буфер CellTiter-Glo и уравнивают до комнатной температуры (комн. темп.) перед использованием.

б. Выравнивают лиофилизированный субстрат CellTiter-Glo до комнатной температуры перед использованием.

15 в. Переносят соответствующий объем (100 мл) буфера CellTiter-Glo в бутылку янтарного цвета, содержащую субстрат CellTiter-Glo, для восстановления лиофилизированной смеси ферментов/субстрата. Таким образом формируется реагент CellTiter-Glo.

Виала с субстратом

20 д. Перемешивают посредством осторожного встряхивания, закручивания или переворачивания содержимого для получения гомогенного раствора. Субстрат CellTiter-Glo должен легко попасть в раствор менее чем за одну минуту.

## 3. Исследуемые препараты и референсный контроль

### 3.1 Исследуемые препараты

| № элемента | Метка образца | Описание образца | Количество (виала, мг) | Условия хранения | Молекулярная масса | Растворитель |
|------------|---------------|------------------|------------------------|------------------|--------------------|--------------|
| 1          | Соединение 1  | Порошок          | 31,41 мг + 30,75 мг    | комн. темп.      | 751,74             | DMSO         |
| 2          | Олапариб      | Порошок          | 10,74 мг + 12,54 мг    | комн. темп.      | 434,51             | DMSO         |
| 25 3       | Талазопариб   | Порошок          | 11 мг + 12,12 мг       | комн. темп.      | 380,39             | DMSO         |

### 3.2 Референсный контроль

| Субъект   | Молекулярная масса | Упаковка | Поставщик         | Свойства | Хранение    |
|-----------|--------------------|----------|-------------------|----------|-------------|
| Цисплатин | 300,05             | 20 мг    | Qilu Pharm, Китай | Порошок  | комн. темп. |

### Определение полумаксимальной ингибирующей концентрации IC50

Часть 1. Определение IC50 с использованием анализа жизнеспособности клеток

5 CellTiter-Glo™

1. Собирают клетки во время периода логарифмического роста и подсчитывают количество клеток.
2. Корректируют концентрации клеток до  $4,0 \times 10^4$  клеток/мл соответствующей культуральной средой.
- 10 3. Добавляют 100 мкл суспензии клеток в три 96-луночных планшета (планшеты А, В и С) с конечной плотностью клеток  $4 \times 10^3$  клеток/лунка.

#### **4а. На следующий день: для планшетов с показанием T0:**

- 1) Уравновешивают планшет А и его содержимое при комнатной температуре в течение приблизительно 30 мин.
- 15 2) В каждую лунку добавляют 50 мкл реагента CellTiter-Glo.
- 3) Смешивают содержимое в течение 5 мин на орбитальном шейкере для индукции лизиса клеток.
- 4) Оставляют планшет для инкубации при комнатной температуре в течение 20 мин для стабилизации люминесцентного сигнала.
- 20 5) Регистрируют люминесценцию (T0) с использованием многоканального ридера EnVision.

#### **4б. Для планшетов с показаниями испытуемого препарата:**

- 1) Готовят 500х раствор исследуемых препаратов (верхняя рабочая концентрация:  $10 \text{ мкМ}/100 \text{ мкМ}$  исследуемых препаратов в среде с 3-кратными последовательными разведениями для достижения 9 уровней дозы.
- 25

- 2) Готовят 10х растворы референсного контроля (верхняя рабочая концентрация: 100 мкМ в среде с 3,16-кратными последовательными разведениями.
- 3) Вносят 500х растворы лекарственного средства в каждую лунку (в трех повторностях для каждой концентрации лекарственного средства) планшета В с помощью цифрового диспенсера. (Конечная концентрация DMSO в культуральной среде: 0,2% [об./об.]
- 4) Извлекают 10 мл культуральной среды из планшета С с референсным контролем с помощью станции жидкостного дозирования Biomek FXP
- 5) Вносят 10 мкл (10х) раствора лекарственного средства референсного контроля в каждую лунку (в трех повторностях для каждой концентрации лекарственного средства) планшета С.
- 6) Инкубируют тест-планшеты В и С в течение 72 ч в увлажненном инкубаторе при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub>, а затем проводят измерения с помощью анализа СТГ.
5. Уравновешивают планшет и его содержимое при комнатной температуре в течение приблизительно 30 мин.
6. В каждую лунку добавляют 50 мкл реагента CellTiter-Glo.
7. Смешивают содержимое в течение 5 мин на орбитальном шейкере для индукции лизиса клеток.
8. Оставляют планшеты для инкубации при комнатной температуре в течение 20 мин для стабилизации люминесцентного сигнала.
9. Регистрируют люминесценцию (ТЗ) с использованием многоканального ридера EnVision.

## Часть 2. Определение синергии или антагонизма

1. Собирают клетки во время периода логарифмического роста и подсчитывают количество клеток.
2. Корректируют концентрации клеток до  $4,0 \times 10^4$  клеток/мл соответствующей культуральной средой.

3. Добавляют 100 мкл суспензии клеток в три 96-луночных планшета (планшеты А, В, С, D) с конечной плотностью клеток  $4 \times 10^3$  клеток/лунка.

**4а. На следующий день: для планшетов с показанием T0:**

- 5 1) Уравновешивают планшет А и его содержимое при комнатной температуре в течение приблизительно 30 мин.
- 2) В каждую лунку добавляют 50 мкл реагента CellTiter-Glo.
- 3) Смешивают содержимое в течение 5 мин на орбитальном шейкере для индукции лизиса клеток.
- 10 4) Оставляют планшет для инкубации при комнатной температуре в течение 20 мин для стабилизации люминесцентного сигнала.
- 5) Регистрируют люминесценцию (T0) с использованием многоканального ридера EnVision.

**4б. Для планшетов с показаниями испытуемого препарата:**

- 15 1) Готовят раствор лекарственного средства для каждого диапазона доз исследуемого препарата: 10 мкМ, 3,33 мкМ, 1,11 мкМ, 0,37 мкМ, 0,12 мкМ, 0,041 мкМ.
- 20 2) Вносят 1000х раствор лекарственного средства каждого тестируемого препарата одновременно в каждой лунке (в трех повторностях для каждой концентрации лекарственного средства) тест-планшетов В, С, D с использованием цифрового диспенсера для получения следующих конечных концентраций: 10 мкМ, 3,33 мкМ, 1,11 мкМ, 0,37 мкМ, 0,12 мкМ, 0,041 мкМ.
- 3) Инкубируют тест-планшеты В, С, D в течение 72 ч в увлажненном инкубаторе при 37 °С с 5% CO<sub>2</sub>, а затем проводят измерения с помощью анализа СТГ.
- 25 4) Уравновешивают планшет и его содержимое при комнатной температуре в течение приблизительно 30 мин.
- 5) В каждую лунку добавляют 50 мкл CellTiter-Glo.
- 6) Смешивают содержимое в течение 5 мин на орбитальном шейкере для индукции лизиса клеток.

- 7) Оставляют планшет для инкубации при комнатной температуре в течение 20 мин для стабилизации люминесцентного сигнала.

Примечание. Неравномерный люминесцентный сигнал в стандартных планшетах может быть вызван температурными градиентами, неравномерным засевом клеток или краевыми эффектами в многослойных планшетах.

- 8) Регистрируют люминесценцию (ТЗ) с использованием многоканального ридера EnVision.

### **Анализ данных**

#### Часть 1. Определение IC50

10 Данные будут отображаться графически с использованием GraphPad Prism 5.0.

Для расчета абсолютного значения IC50 (EC50) будет подождена кривая доза – ответ с использованием нелинейной модели регрессии с сигмоидальным дозозависимым ответом. Состав для вычисления степени выживаемости показан ниже, а абсолютное значение IC50 (EC50) будет рассчитано в соответствии с кривой доза – ответ, сгенерированной с помощью GraphPad Prism 5.0.

$$\text{Степень выживаемости (\%)} = (\text{Lum}_{\text{испытуемое изделие}} - \text{Lum}_{\text{контроль со средой}}) / (\text{Lum}_{\text{без обработки}} - \text{Lum}_{\text{контроль со средой}}) \times 100\%.$$

#### Часть 2. Определение синергии или антагонизма

Синергию рассчитывают на основании программного обеспечения Combenefit [Bioinformatics 2016, 32 (18), 2866-2868] с использованием одного из трех встроенных алгоритмов для расчета синергии — алгоритма наивысшего единственного агента (HSA) [Nature biotechnology 2012, 30 (11), 1125-30],

Средний показатель разницы выше 5 (5% ответа выходит за ожидаемые пределы) считается значимым.

25 Показатель разницы, описанный в настоящем документе, указывает на процент ответа, превышающий ожидаемый для комбинации лекарственного средства, при некоторых определенных уровнях дозы. Показатель разницы выше 5 (5% ответа выходит за ожидаемые пределы) считается значимым.

**Результаты**

| Клеточная линия | Лекарственное средство А | Лекарственное средство В | HSA_среднее<br>Антагонизм < -5<br>Синергия > +5 | Статус TP53 | Статус DDR   |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|---|-------------|--------------|
| CAL-51          | Олапариб                 | Соединение 1             | 8,0   | WT          | Мутант BRCA2 |
| CAL-51          | Галазопариб              | Соединение 1             | 15,7  | WT          | Мутант BRCA2 |
| A2780           | Олапариб                 | Соединение 1             | 6,2   | WT          | Дефект DDR*  |
| A2780           | Галазопариб              | Соединение 1             | 12,3  | WT          | Дефект DDR*  |

\* Сообщается, что **A2780** содержит дефекты DDR (The Journal of Molecular Diagnostics Volume 21, Issue 2, March 2019, Pages 198-213).

- 5 Результаты демонстрируют явную синергию между соединением 1 и ингибиторами PARP. В частности, результаты демонстрируют явную синергию между соединением 1 и ингибиторами PARP в линиях клеток с истощением по DDR.

**ПРИМЕРЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВОВ****(i) CD Состав для таблеток**

- 10 Композицию таблетки, содержащую соединение формулы (I<sup>o</sup>), получали посредством смешивания подходящего количества соединения (например, 50–250 мг) с подходящим разбавителем, разрыхлителем, средством для прессования и/или скользящим веществом. Одна предполагаемая таблетка содержит 50 мг соединения с 197 мг лактозы (BP) в качестве разбавителя и 3 мг стеарата магния в качестве смазывающего вещества,
- 15 которые спрессовывают с образованием таблетки известным способом. Прессованную таблетку, необязательно, можно покрывать пленкой.

**(ii) Состав для капсул**

- Состав для капсулы готовят смешиванием 100–250 мг соединения формулы (I<sup>o</sup>) с эквивалентным количеством лактозы и заполнением полученной смеси в стандартные
- 20 твердые желатиновые капсулы. Подходящий разрыхлитель и/или глидант можно при необходимости включать в соответствующих количествах.

**(iii) Инъекционный состав I**

- Парентеральную композицию для введения посредством инъекции можно приготовить посредством растворения соединения формулы (I<sup>o</sup>) (например, в солевой форме) в воде,
- 25 содержащей 10% пропиленгликоля, с получением концентрации активного соединения

1,5 мас. %. Затем раствор делают изотоническим, стерилизуют посредством фильтрации или окончательной стерилизации, наполняют им ампулу, флакон или предварительно наполняемый шприц и герметизируют.

(iv) Инъекционный состав II

- 5 Парентеральную композицию для инъекций получают посредством растворения в воде соединения формулы (I°) (например, в солевой форме) (2 мг/мл) и маннита (50 мг/мл), стерильной фильтрации раствора или окончательной стерилизации и наполнения герметичных флаконов по 1 мл или ампул или предварительно наполняемого шприца.

(v) Инъекционный состав III

- 10 Композиция для в/в доставки посредством инъекции или инфузии может быть приготовлена посредством растворения соединения формулы (I°) (например, в солевой форме) в воде при 20 мг/мл с последующим регулированием изотоничности. Флакон затем запечатывают и стерилизуют в автоклаве, или наполняют ампулу, флакон или предварительно заполняемый шприц, стерилизуют фильтрацией и запечатывают.

15 (vi) Инъекционный состав IV

- Композиция для в/в доставки посредством инъекции или инфузии может быть приготовлена посредством растворения соединения формулы (I°) (например, в солевой форме) в воде, содержащей буфер (например, 0,2 М ацетата, pH 4,6), при 20 мг/мл. Флакон, ампулу или предварительно заполняемый шприц затем запечатывают и  
20 стерилизуют в автоклаве, или стерилизуют фильтрацией и запечатывают.

(vii) Состав для подкожных или внутримышечных инъекций

- Композицию для подкожного или внутримышечного введения получают посредством смешивания соединения формулы (I°) с кукурузным маслом для применения в фармацевтике до концентрации 5–50 мг/мл. Композицию стерилизуют и помещают в  
25 подходящий контейнер.

(viii) Лиофилизированный состав I

- Аликвоты состава, содержащего соединение формулы (I°), помещают во флаконы по 50 мл и лиофилизируют. Во время лиофилизации композиции замораживают, используя протокол одноэтапного замораживания при (-45 °C). Температуру повышают до -10 °C  
30 для отжига, затем снижают до замерзания при -45 °C, затем проводят первичную сушку

при +25 °С в течение приблизительно 3400 минут, а затем вторичную сушку с увеличением этапов, если температура достигает 50 °С. Давление при первичной и вторичной сушке устанавливают на уровне 80 миллитор.

(ix) Лиофилизированный состав II

5 Аликвоты составленного соединения формулы (I°) или его соли, как определено в настоящем документе, помещают во флаконы на 50 мл и лиофилизируют. Во время лиофилизации композиции замораживают, используя протокол одноэтапного замораживания при (-45 °С). Температуру повышают до -10 °С для отжига, затем снижают до замерзания при -45 °С, затем проводят первичную сушку при +25 °С в  
10 течение приблизительно 3400 минут, а затем вторичную сушку с увеличением этапов, если температура достигает 50 °С. Давление при первичной и вторичной сушке устанавливают на уровне 80 миллитор.

(x) Лиофилизированный состав для применения при внутривенном введении III

Водный забуференный раствор готовят растворением соединения формулы (I°) в  
15 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 °С в течение приемлемого периода времени. Если состав не устойчив к автоклавированию, его можно  
20 стерилизовать, используя подходящий фильтр, и разливать в стерильных условиях по стерильным флаконам. Раствор лиофилизируют, 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 лиофилизированное  
25 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 готовят посредством заполнения бутылки или флакона соединением формулы (I°). 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 настоящем документе, приведены лишь в иллюстративных целях и что в их свете специалистам в данной области 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 настоящем документе, в полном объеме и во всех целях включены в настоящий документ посредством ссылки.



FANCN, FANCO, FANCP, FANCQ, FANCR, FANCS, FANCT, FANCU, FANCV и/или FANCW.

7. Антагонист MDM2 для применения в способе по любому предшествующему пункту, причем истощение или мутацию в гене DDR обнаруживают посредством оценки микросателлитной нестабильности и/или мутационной нагрузки опухоли рака, при этом необязательно рак представляет собой MSI-high.
8. Антагонист MDM2 для применения по любому из пп. 1–7, причем образец ткани пациента исследуют для определения профиля экспрессии рака до проведения лечения.
9. Антагонист MDM2 для применения по п. 8, причем образец содержит ДНК рака, цоДНК или раковые клетки.
10. Антагонист MDM2 для применения по п. 8 или п. 9, причем исследование включает анализ для обнаружения белка, мРНК и/или цоДНК.
11. Антагонист MDM2 для применения по п. 10, причем (i) обнаружение 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; и/или (ii) при этом обнаружение мРНК проводят с помощью ОТ-ПЦР или количественного анализа генной экспрессии; и/или (iii) при этом ДНК или РНК обнаруживают посредством секвенирования нового поколения; и/или (iv) при этом белок обнаруживают посредством иммуногистохимии.
12. Антагонист MDM2 для применения в соответствии с любым из пп. 8–11, причем пациента выбирают для лечения на основании определенного профиля экспрессии.

13. Антагонист MDM2 для применения по любому предшествующему пункту,  
 причем рак представляет собой:  
 острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), плоскоклеточную карциному или  
 опухоли головы, шеи, кожи, желудочно-кишечного тракта или половой  
 5 системы; или  
 рак предстательной железы, яичника, молочной железы или  
 гинекологический рак;  
 или рак толстой кишки, рак желудка или гинекологический рак.
14. Антагонист MDM2 для применения по любому предшествующему пункту,  
 10 причем рак представляет собой P53 дикого типа.
15. Антагонист MDM2 для применения по любому предшествующему пункту,  
 причем раковые клетки подвергаются апоптозу после этапа лечения.
16. Антагонист MDM2 для применения по любому предшествующему пункту,  
 15 причем индукция активированной каспазы-3 антагонистом MDM2 происходит в  
 по меньшей мере части раковых клеток.
17. Антагонист MDM2 для применения по п. 16, причем индукция активированной  
 каспазы-3 антагонистом MDM2 происходит в по меньшей мере 40% раковых  
 клеток или по меньшей мере 60% раковых клеток.
18. Антагонист MDM2 для применения по любому предшествующему пункту,  
 20 причем рак демонстрирует:  
 сниженную относительно контроля экспрессию одного, двух или трех из  
 CDKN2A, BAP1 и SKP2; и/или  
 повышенную относительно контроля экспрессию одного, двух, трех,  
 четырех, пяти или более генов сигнатуры интерферона.
- 25 19. Антагонист MDM2 для применения по п. 18, причем:  
 гены сигнатуры интерферона представляют собой CXCL10, CXCL11,  
 RSAD2, MX1, BATF2, IFI44L, IFITM1, ISG15, CMPK2, IFI27, CD74, IFIH1,  
 CCRL2, IFI44, HERC6, ISG20, IFIT3, HLA-C, OAS1, IFI35, IRF9, EPSTI1, USP18,  
 BST2, CSF1, C1S, DHX58, TRIM14, OASL, IRF7, LGALS3BP, DDX60, LAP3,  
 30 LAMP3, PARP12, PARP9, SP110, PLSCR1, WARS, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN,  
 SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1 и FLI1; или

рак демонстрирует повышенную экспрессию CXCL10 или CXCL11.

20. Антагонист MDM2 для применения по любому предшествующему пункту, причем рак демонстрирует повышенную экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти или более из IRF7, STAT1, IRF3, IRF5, MSC, JUN, SPI1, IRF1, COMMD3-BMI1, STAT2, RUNX3, SREBF1, IRF9 и FLI1.

5

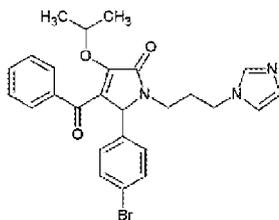
21. Антагонист MDM2 для применения по любому предшествующему пункту, представляющий собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, как определено в настоящем документе, например

10

(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.

22. Антагонист MDM2 для применения по любому предшествующему пункту, выбранный из группы, состоящей из соединения 1, идасанутлина (RG-7388), HDM-201, KRT-232 (AMG-232), ALRN-6924, MI-773 (SAR405838), CGM-097, миладеметана тозилата, 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



20

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

23. Использование уровня экспрессии или активности одного или более в одном или более генах или продуктах генов пути DDR в образце раковых клеток пациента-человека, причем один или более генов или продуктов генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2, в качестве биомаркера или биомаркеров для оценки того, является ли рак восприимчивым к лечению антагонистом MDM2, например, при этом антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват,

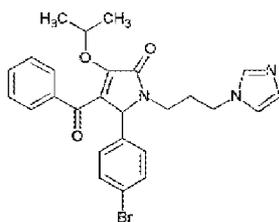
25

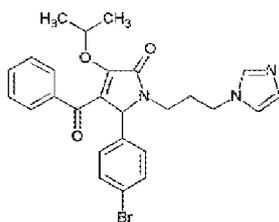
как определено в настоящем документе, например (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(оксан-4-ил)пропил]-1-метокси-3-оксо-2,3-дигидро-1H-изоиндол-2-ил]-2-метилпропановую кислоту или ее таутомер, *N*-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват.

- 5
24. Способ прогнозирования или оценки чувствительности пациента-человека с раком к лечению антагонистом MDM2, включающий оценку уровня экспрессии или активности в образце одного или более генов пути DDR от пациента с раком, причем один или более генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2, и
- 10 определение того, указывает ли исследуемый уровень экспрессии или активности на то, что рак следует лечить антагонистом MDM2.
25. Способ по п. 24, в котором этап оценки включает сравнение уровня экспрессии или активности с уровнем экспрессии или активности, (i) ассоциированным с чувствительностью или нечувствительностью к лечению антагонистом MDM2
- 15 или (ii) наблюдающимся в здоровой нераковой клетке того же типа.
26. Способ по п. 24 или п. 25, в котором пациента классифицируют в группу на основании профиля биомаркеров, причем необязательно группы включают или состоят из:
- 20 (i) ответивших на лечение пациентов и не ответивших на лечение пациентов; или
- (ii) пациентов с сильным ответом на лечение.
27. Способ по любому из пп. 24–26, в котором пациента идентифицируют как особенно подходящего для лечения, когда 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более генов пути DDR экспрессируются на более низком уровне, чем у пациента,
- 25 идентифицированного как не подходящего для лечения.
28. Способ по любому из пп. 24–27, в котором пациента идентифицируют для лечения антагонистом MDM2 при обнаружении сниженной экспрессии одного или более генов пути DDR по сравнению с уровнем экспрессии, (i) ассоциированным с нечувствительностью к лечению антагонистом MDM2 или
- 30 (ii) наблюдающимся в здоровой нераковой клетке того же типа.

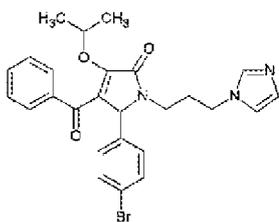
29. Способ по любому из пп. 24–28, включающий этап определения уровня экспрессии или активности биомаркеров в образце раковых клеток от упомянутого пациента-человека.
30. Способ по п. 29, в котором обнаружение проводят с применением анализа на обнаружение *in vitro*.
31. Способ определения чувствительности пациента-человека с раком к лечению антагонистом MDM2, включающий обнаружение в образце раковых клеток от пациента экспрессии или активности одного или более генов пути DDR, причем один или более генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2, и оценку того, будет ли рак у пациента с вероятностью отвечать на лечение антагонистом MDM2, на основании уровня экспрессии или активности биомаркеров в образце.
32. Способ обнаружения уровня экспрессии или активности одного или более генов пути DDR у пациента-человека, страдающего раком, в котором один или более генов DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2.
33. Способ по п. 32, включающий в себя этапы, на которых:
- (a) получают образец раковых клеток от пациента-человека; и
  - (b) обнаруживают экспрессию упомянутого биомаркера или биомаркеров в отобранных раковых клетках посредством приведения образца в контакт с одним или более реагентами для обнаружения экспрессии биомаркера или биомаркеров.
34. Способ по любому из пп. 24–33, в котором антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, как определено в настоящем документе, 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.
35. Способ по любому из пп. 24–33, в котором антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из соединения 1, идасанутлина, HDM-201, KRT-232, ALRN-6924, ALRN-6924, CGM-097, миладеметана тозилата, 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,



К-178, MMRi-64 и , или их таутомера, или сольвата, или фармацевтически приемлемой соли.

36. Способ по любому из пп. 24–35, дополнительно включающий этап лечения рака у пациента посредством введения антагониста MDM2.
37. Способ по п. 36, в котором антагонист MDM2 представляет собой соединение формулы (I<sup>o</sup>) или его таутомер, N-оксид, фармацевтически приемлемую соль или сольват, как определено в настоящем документе, например (2S,3S)-3-(4-хлорфенил)-3-[(1R)-1-(4-хлорфенил)-7-фтор-5-[(1S)-1-гидрокси-1-(о-ксан-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.
38. Способ по п. 36, в котором антагонист MDM2 выбран из группы, состоящей из идасанутлина, HDM-201, KRT-232, ALRN-6924, ALRN-6924, CGM-097, миладеметана тозилата, 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, К-178, MMRi-64 и



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

39. Способ по любому из пп. 36–38, в котором лечение обеспечивается пациенту на основании результата способа.
40. Набор или устройство для обнаружения уровня экспрессии или активности по меньшей мере одного биомаркера чувствительности к ингибированию MDM2 в образце от пациента-человека, содержащие реагенты для обнаружения одного

или более генов или продуктов генов пути DDR, причем один или более генов или продуктов генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2.

41. Система для определения пригодности пациента-человека с раком для лечения антагонистом MDM2, содержащая запоминающее устройство для хранения данных, связанных с образцом от пациента, включающих данные, связанные с панелью биомаркеров, указывающие уровни экспрессии или активности биомаркеров в образце от субъекта, причем панель биомаркеров содержит один или более генов или продуктов генов пути DDR, при этом один или более генов или продуктов генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2; и
- 5 процессор, соединенный с возможностью связи с запоминающим устройством для классификации пациента.
42. Антагонист MDM2 для применения, применение, способ, набор или система по любому предшествующему пункту, причем рак демонстрирует утрату одного или более генов, продуктов генов или активностей пути DDR, при этом один или более генов, продуктов генов или активностей пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2.
- 15 43. Антагонист MDM2 для применения, применение или способ по любому из пп. 1–39 или 42, причем антагонист MDM2 представляет собой часть комбинированной терапии со вторым терапевтическим агентом, необязательно ингибитором PARP.
- 20 44. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака,
- в котором рак характеризуется нормальными или высокими уровнями одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR), причем один или более генов или продуктов генов DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2, или при этом рак характеризуется
- 25 отсутствием обнаруживаемой мутации с потерей функции в любом гене пути DDR,
- в комбинации с агентом для индуцирования чувствительности к антагонисту MDM2, например для снижения уровней одного или более генов или продуктов генов в пути репарации повреждения ДНК (DDR).
- 30 45. Способ лечения рака у пациента, включающий в себя этапы выбора пациента:

- (a) наличие нормальных или высоких уровней генов или продуктов генов пути DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента, причем один или более генов или продуктов генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2; и
- 5 (b) введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и агента для индукции чувствительности к антагонисту MDM2, например, посредством снижения уровней одного или более генов или продуктов генов в пути репарации повреждения ДНК (DDR), у упомянутого пациента, выбранного на этапе (a).
- 10 46. Антагонист MDM2 по п. 44 или способ по п. 45, в котором агент для индуцирования чувствительности к антагонисту MDM2 представляет собой ДНК-повреждающий агент или ингибитор репарации ДНК.
47. Фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор MDM2, причем ингибитор MDM2 представляет собой соединение формулы (I°) или его таутомер,
- 15 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, причем рак
- 20 соответствует определению в любом из пп. 1–7.
48. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения пациента с раком, включающий в себя этапы, на которых:
- (i) определяют, что образец от пациента характеризуется истощением
- 25 одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR), или при этом рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в гене пути DDR, причем один или более генов или продуктов генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2;
- (ii) вводят пациенту эффективное количество антагониста MDM2.
49. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака,
- 30 причем рак характеризуется низкими уровнями одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК

(DDR), или при этом рак имеет обнаруживаемую мутацию с потерей функции в любом гене пути DDR, причем один или более генов или продуктов генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2;

в комбинации с противораковым агентом, например ДНК-повреждающим агентом или ингибитором репарации ДНК.

50. Способ лечения рака у пациента, включающий в себя этапы выбора пациента:
- (a) наличие низких уровней генов или продуктов генов пути DDR в биологическом образце, полученном от упомянутого пациента, причем гены или продукты генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2; и
  - (b) введение терапевтически эффективного количества антагониста MDM2 и противоракового агента, например ДНК-повреждающего агента или ингибитора ДНК, упомянутому пациенту, выбранному на этапе (a).
51. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR), или при этом рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в по меньшей мере одном гене пути DDR, причем один или более генов или продуктов генов DDR не состоят из ATM и/или ATR.
52. Антагонист MDM2 для применения в способе лечения рака, причем рак характеризуется истощением двух или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR), или при этом рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в по меньшей мере двух генах пути DDR.
53. Антагонист MDM2 для применения в способе по п. 51 или 52, причем путь DDR представляет собой:
- a. путь репарации путем гомологичной рекомбинации (HRR), при этом ген или продукт гена DDR не состоит из ATM и/или ATR;
  - b. путь негомологичного соединения концов (NHEJ);
  - c. путь репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR);
  - d. путь анемии Фанкони (FA); и/или
  - e. путь эксцизионной репарации оснований (BER).

53. Антагонист MDM2 для применения в способе в соответствии с любым вариантом осуществления в настоящем документе.

54. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение антагониста MDM2 субъекту, причем рак характеризуется истощением одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации повреждения ДНК (DDR), или при этом рак имеет по меньшей мере одну мутацию с потерей функции в по меньшей мере одном гене пути DDR, причем один или более генов или продуктов генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2.

55. Способ лечения рака у пациента, в котором рак демонстрирует потерю одного или более генов, продуктов генов или активностей пути DDR, включающий введение пациенту антагониста MDM2, причем один или более генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2.

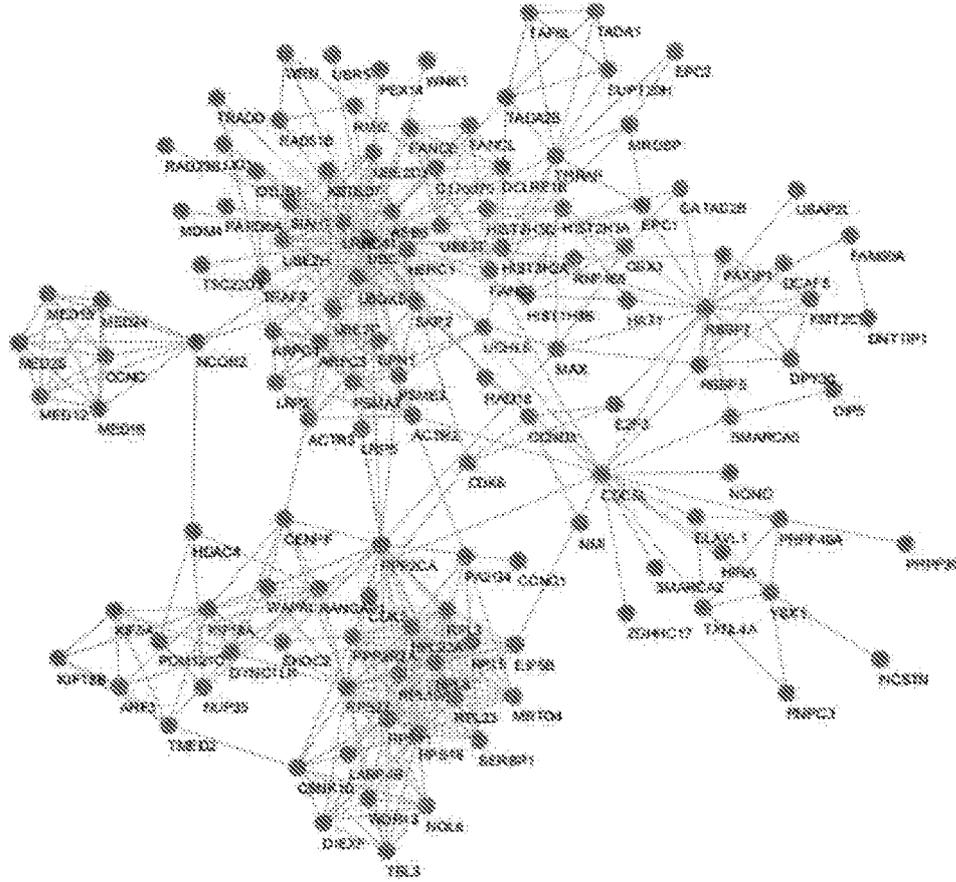
56. Способ лечения рака у пациента,  
в котором рак характеризуется нормальными или высокими уровнями  
одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации  
повреждений ДНК (DDR), или при этом рак характеризуется отсутствием  
обнаруживаемой мутации с потерей функции в любом гене пути DDR,  
включающий  
введение пациенту антагониста MDM2 в комбинации с агентом для  
индуцирования чувствительности к антагонисту MDM2.

57. Способ лечения пациента с раком, восприимчивым к лечению антагонистом MDM2, включающий в себя этапы, на которых:

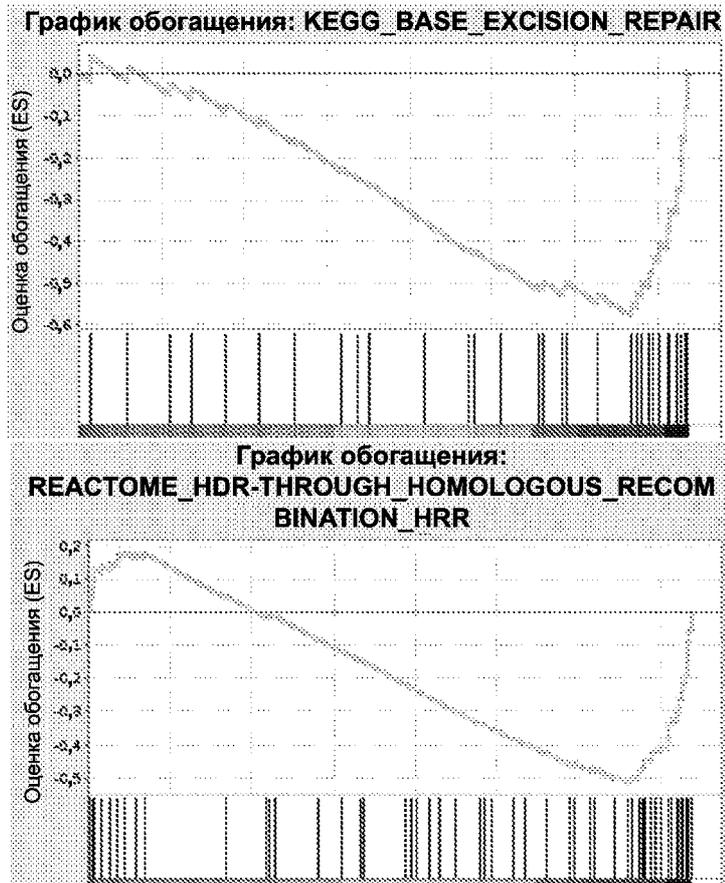
(i) определяют, что образец от пациента характеризуется истощением  
одного или более генов или продуктов генов в одном или более путях репарации  
повреждения ДНК (DDR), или при этом рак имеет по меньшей мере одну  
мутацию с потерей функции в гене пути DDR, причем один или более генов или  
продуктов генов пути DDR содержат BRCA1 и/или BRCA2;

(iii) вводят пациенту эффективное количество антагониста MDM2.

A.



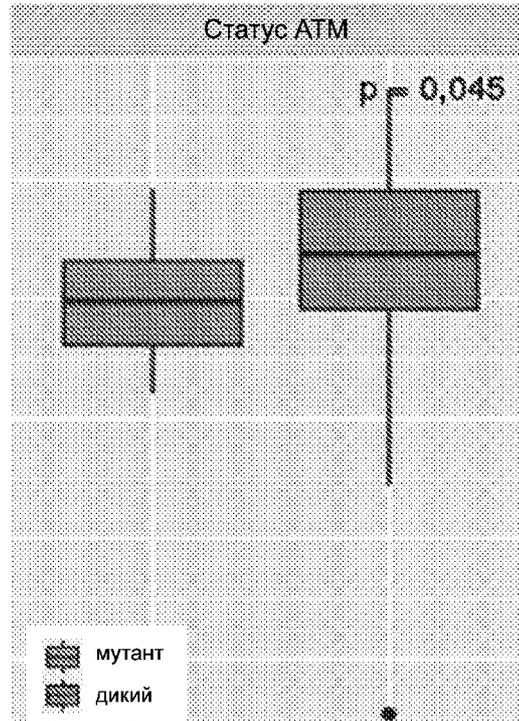
B.



Фиг. 1



A.



B.

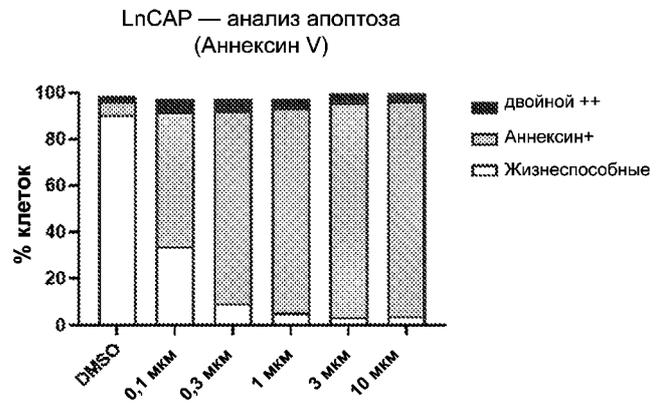
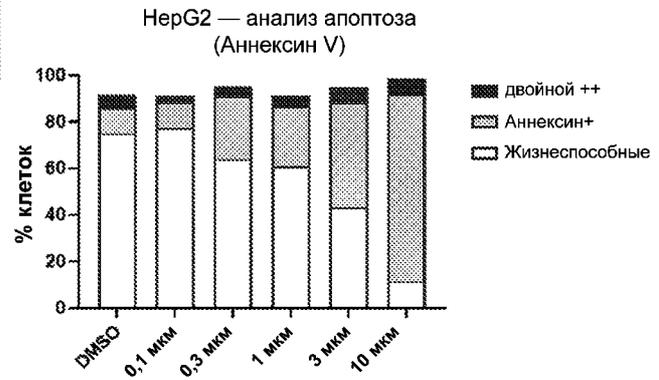
| Образец | Тип                          | Мутация ATM |
|---------|------------------------------|-------------|
| 12      | апоптотический               | мутант      |
| 19      | апоптотический               | мутант      |
| 2       | апоптотический               | мутант      |
| 36      | апоптотический               | мутант      |
| 40      | апоптотический               | мутант      |
| 45      | апоптотический               | дикий       |
| 52      | апоптотический               | мутант      |
| MESO7T  | апоптотический               | дикий       |
| MESO33T | апоптотический               | дикий       |
| 18      | неапоптотический             | дикий       |
| 24      | неапоптотический             | дикий       |
| 26      | неапоптотический             | дикий       |
| MESO29T | неапоптотический             | дикий       |
| MESO50T | неапоптотический             | дикий       |
| MESO53T | неапоптотический             | дикий       |
| 15      | Пограничный с апоптотическим | дикий       |
| 30      | Пограничный с апоптотическим | дикий       |
| 43      | Пограничный с апоптотическим | мутант      |
| MESO23T | Пограничный с апоптотическим | мутант      |

Фиг. 2

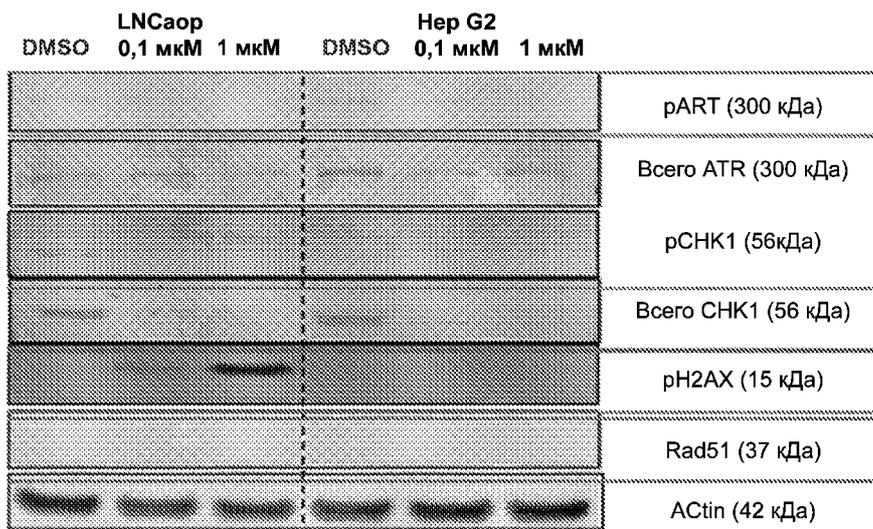
C. **Пролиферация клеток**

| Клеточная линия | Обозначение     | IC50 соединения 1 (мкМ) |
|-----------------|-----------------|-------------------------|
| HCC1500         | Молочная железа | 0,1673                  |
| LnCAP           | Простата        | 0,019                   |
| HT-144          | Меланома        | 0,2636                  |
| HepG2           | Печень          | 0,054                   |

D. **Апоптоз**



E. **Модуляция передачи сигналов DDR**



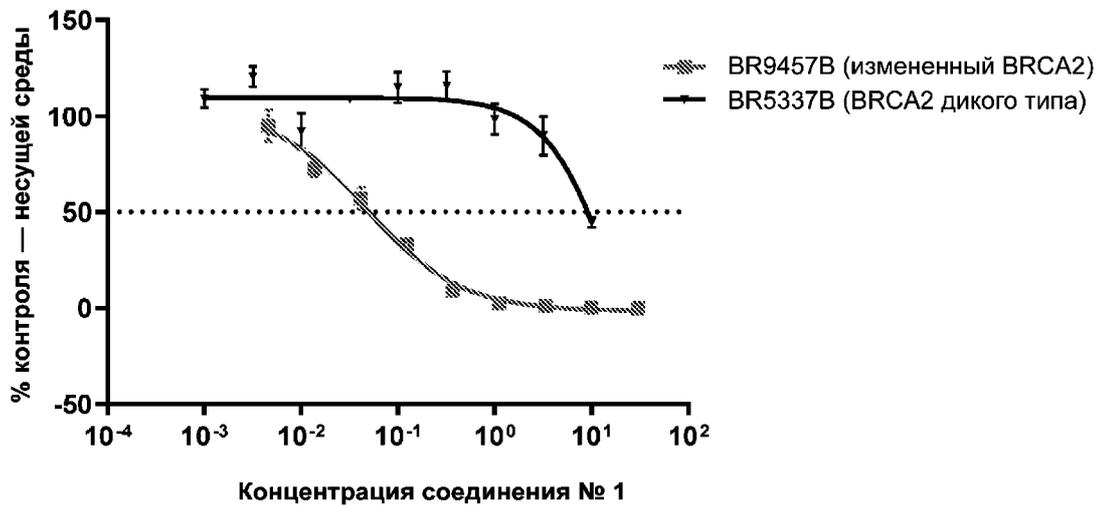
Фиг. 2

F.

| Идентификатор органоида | Происхождение ткани  | Статус TP53 | Изменение BRCA1 | Изменение BRCA2 | Изменение ATM | IC <sub>50</sub> соединения 1 (мкМ) |
|-------------------------|----------------------|-------------|-----------------|-----------------|---------------|-------------------------------------|
| BR9457B                 | Молочная железа      | WT          |                 | Да              |               | 0,05                                |
| GA6894B                 | Желудок              | WT          |                 |                 | Да            | 0,075                               |
| PA20069B                | Поджелудочная железа | WT          |                 | Да              | Да            | 0,07                                |
| PA20081B                | Поджелудочная железа | WT          |                 |                 | Да            | 0,063                               |
| BR5337B                 | Молочная железа      | WT          |                 |                 |               | 27                                  |
| GA0119B                 | Желудок              | WT          |                 |                 |               | 12                                  |
| GA0098B                 | Желудок              | WT          |                 |                 |               | 12                                  |
| PA20079B                | Поджелудочная железа | WT          |                 |                 |               | 20                                  |

G.

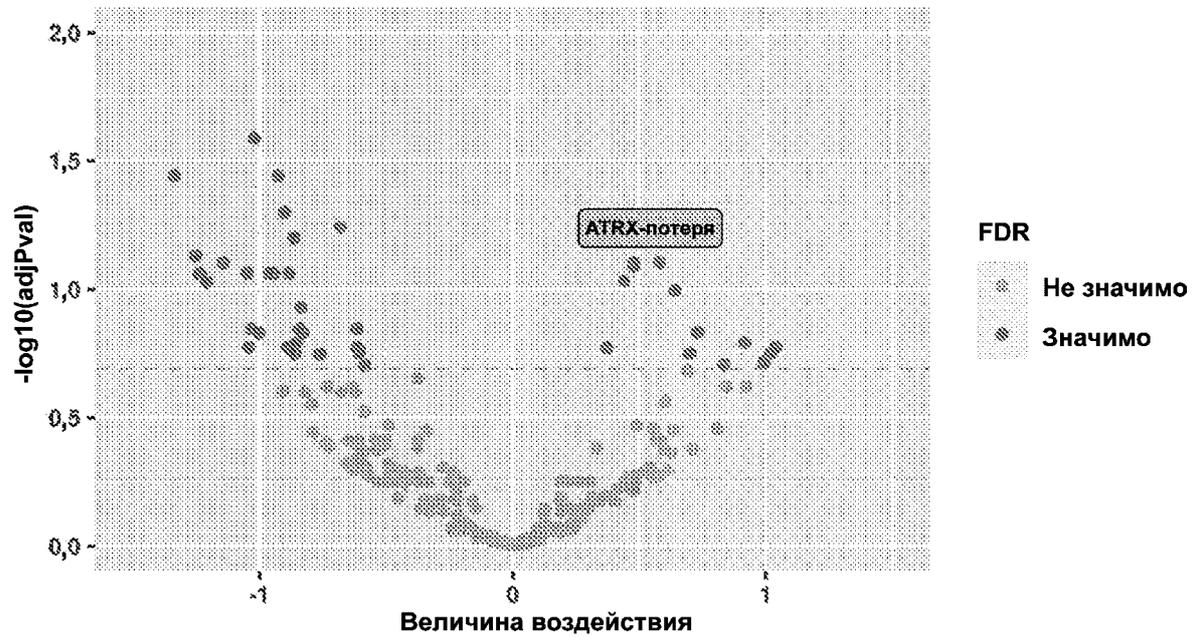
Полученные от пациента органоиды  
молочной железы\_кривые доза-ответ



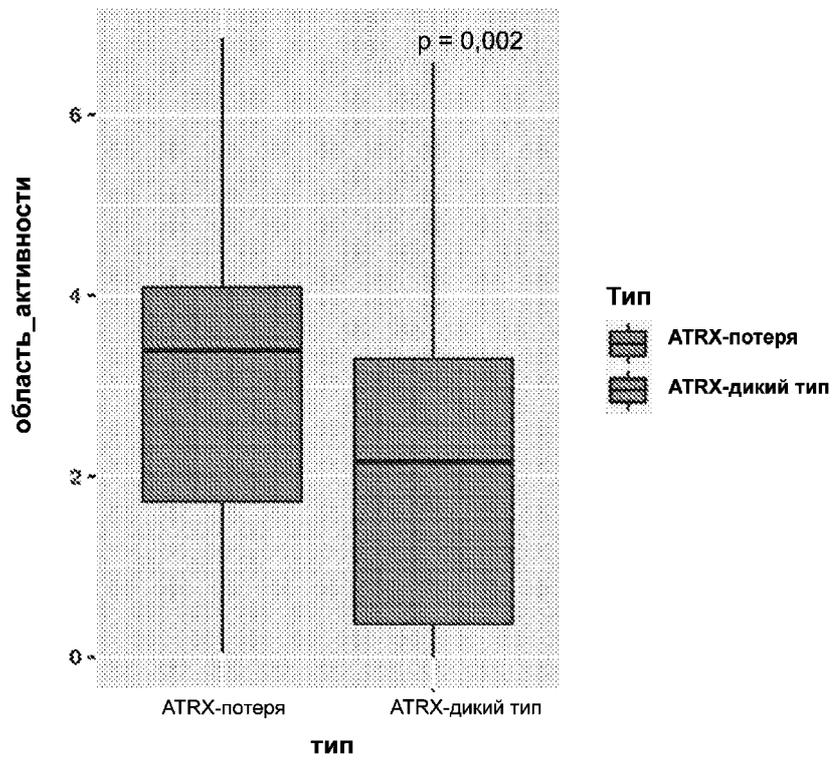
Фиг. 2

A.

## Диаграмма рассеяния



B.



Фиг. 3

А.

| Клеточная линия | Область активности | Состояние микросателлитов | Мутационная нагрузка опухоли (мутации/Mb) | POLD1  |
|-----------------|--------------------|---------------------------|---|--------|
| HCT116          | 3,55               | MSI-H                     | 70,63                                     | мутант |
| LOVO            | 3,41               | MSI-H                     | 56,07                                     | мутант |
| LS180           | 3,39               | MSI-H                     | 66,53                                     | мутант |
| RKO             | 3,00               | MSI-H                     | 81,4                                      | дикий  |
| SW48            | 2,99               | MSI-H                     | 66,07                                     | мутант |
| CW2             | 2,81               | MSI-H                     | 237,83                                    | мутант |
| GP2D            | 2,68               | MSI-H                     | -   | мутант |
| SNU-1           | 3,51               | MSI-H                     | 51,53                                     | мутант |
| SNGM            | 6,58               | MSI-H                     | 58,77                                     | дикий  |

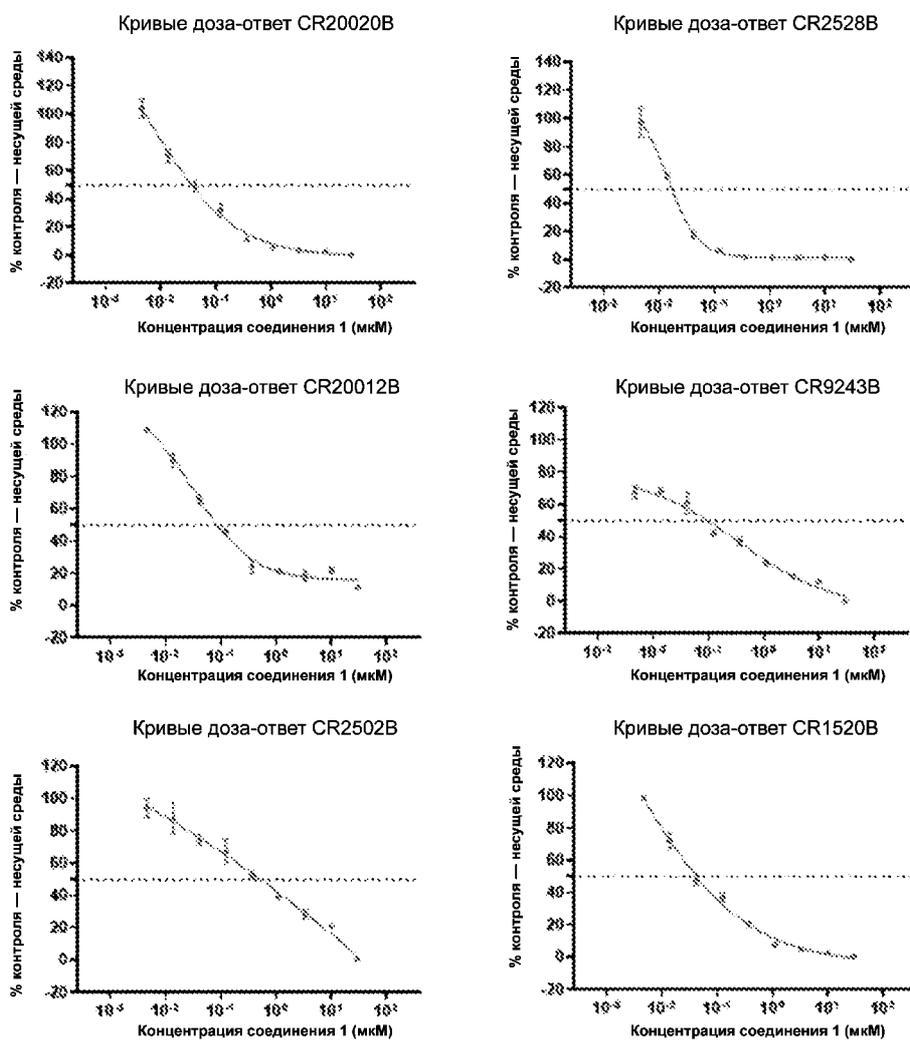
В.

| Клеточные линии MSI-H | Показатель  | IC50 соединения 1 |
|-----------------------|-------------|-------------------|
| CW2                   | CRC         | 0,5824 мкМ        |
| SW48                  | CRC         | 0,5682 мкМ        |
| RKO                   | CRC         | 0,5970 мкМ        |
| LS180                 | CRC         | 0,1550 мкМ        |
| LOVO                  | CRC         | 0,4329 мкМ        |
| HCT116                | CRC         | 0,1022 мкМ        |
| SNU-1                 | Желудок     | 0,0853 мкМ        |
| SNGM                  | Эндо метрий | 0,1106 мкМ        |

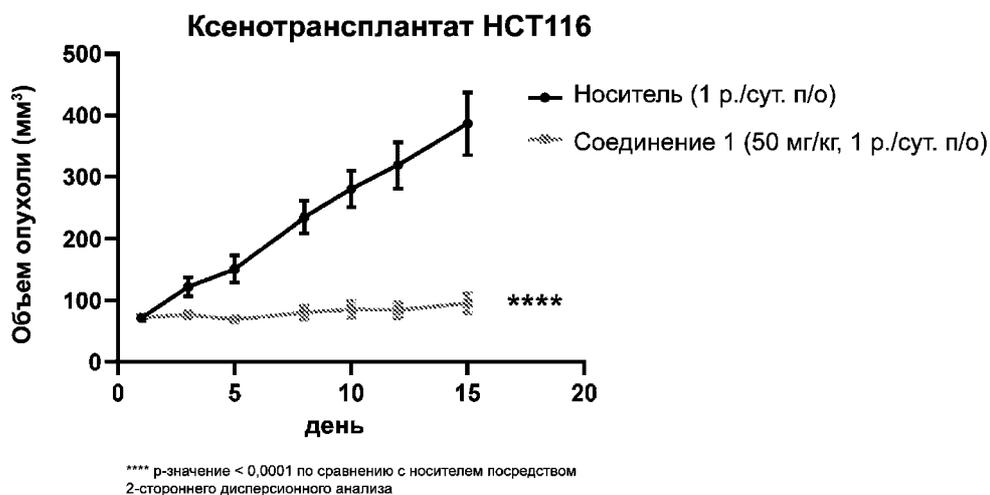
Фиг. 4

C.

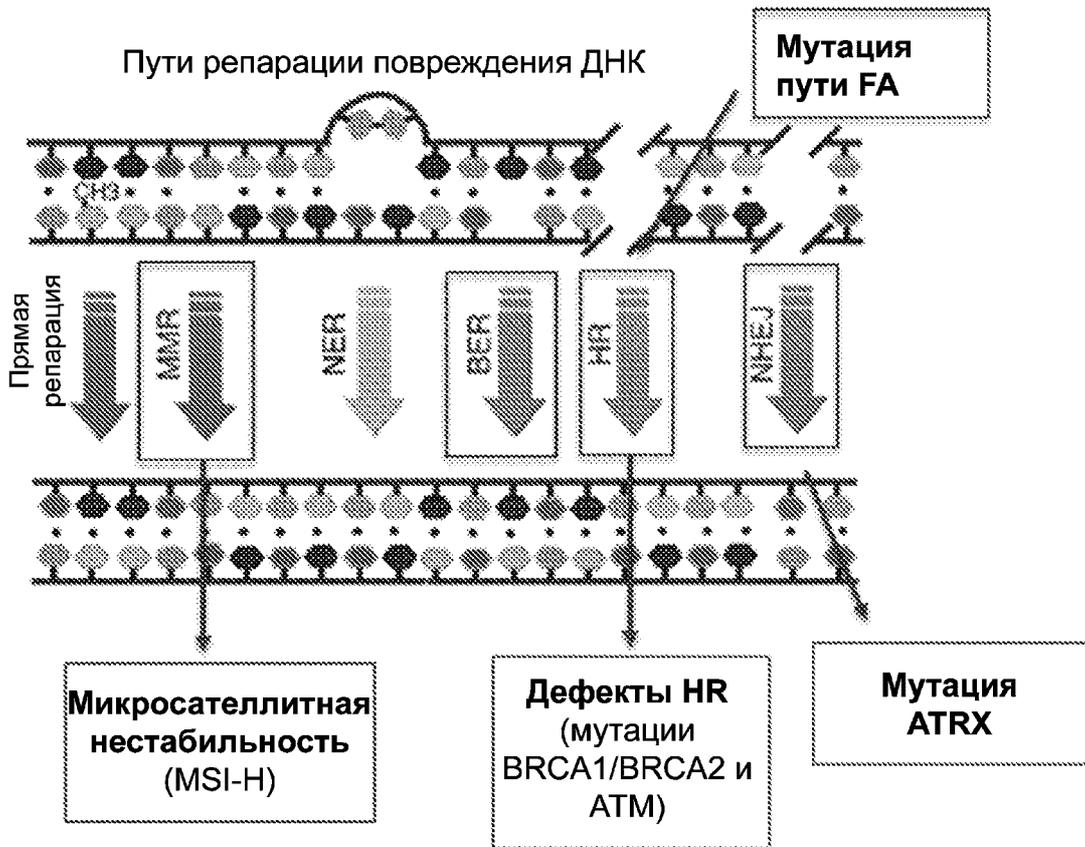
## Полученные от пациента органоиды MSI-H



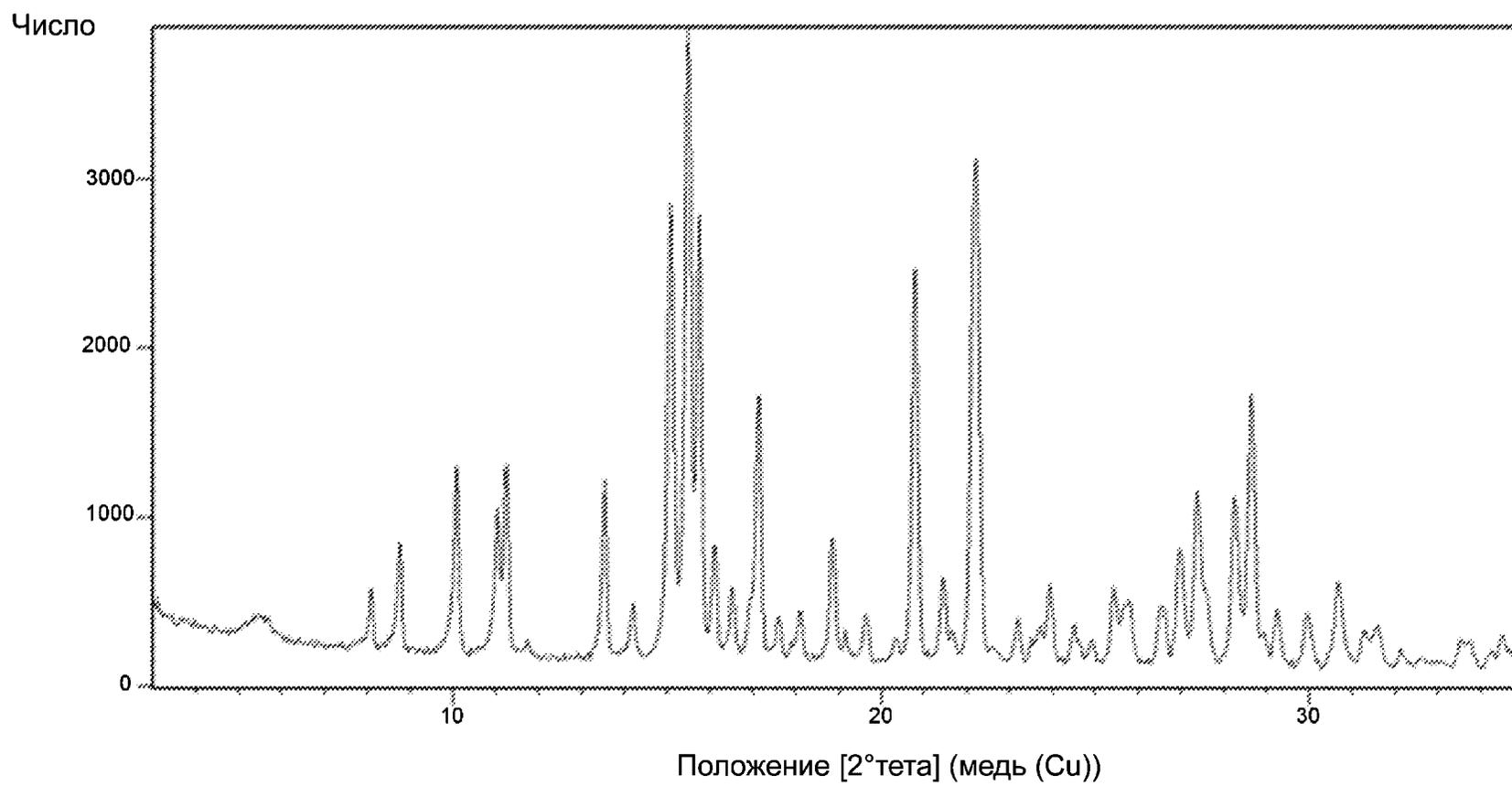
D.



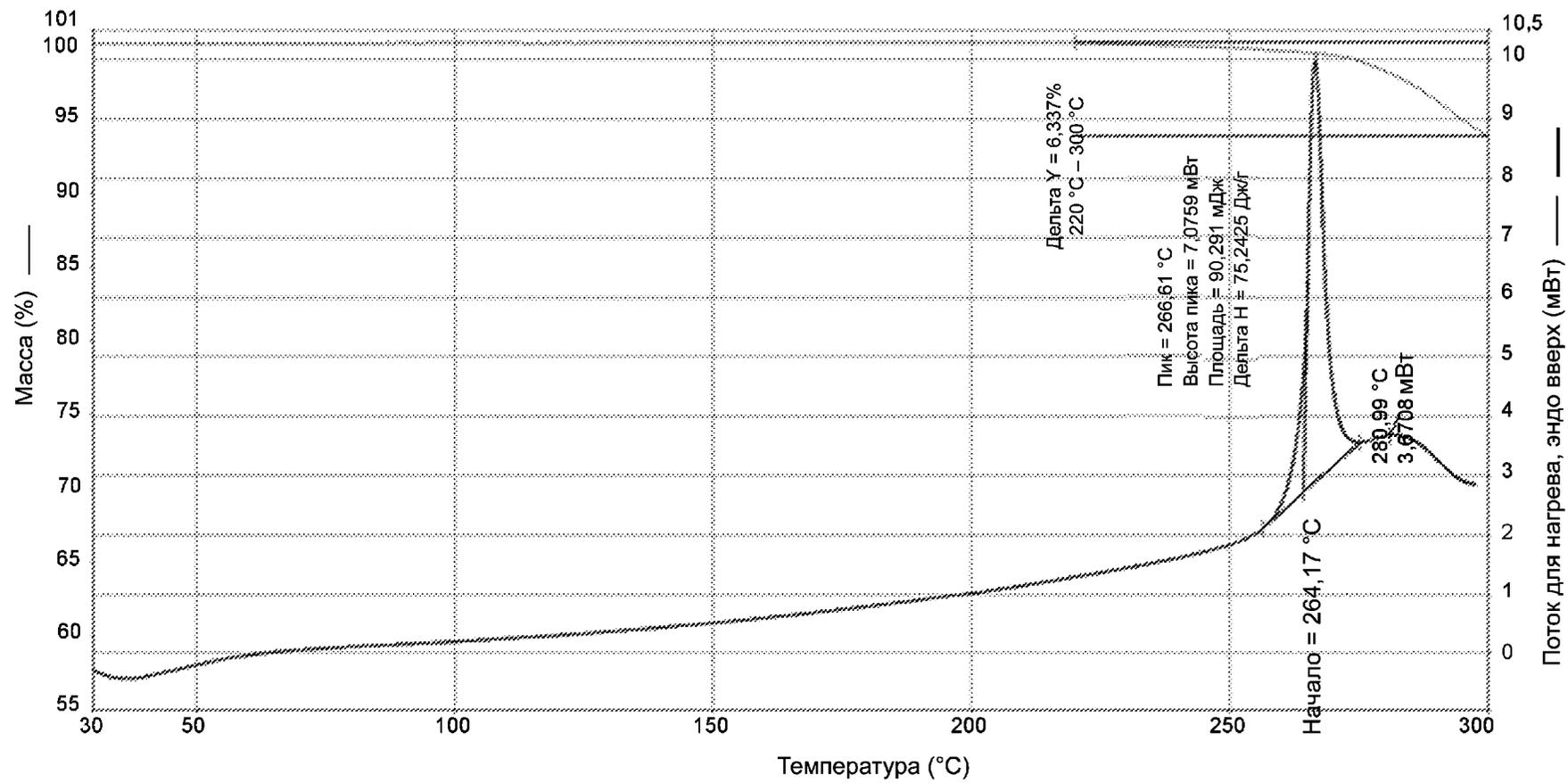
Фиг. 4



Фиг. 5



**Фиг. 6**



Фиг. 7