

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045888**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.12

(21) Номер заявки
201992026

(22) Дата подачи заявки
2018.02.26

(51) Int. Cl. *C12Q 1/48* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАЦИЕНТОВ, ИМЕЮЩИХ РАК, КОТОРЫЕ БУДУТ ХАРАКТЕРИЗОВАТЬСЯ НАЛИЧИЕМ ВОСПРИИМЧИВОСТИ К ЛЕЧЕНИЮ ИНГИБИТОРОМ PRMT5**

(31) **62/464006**

(32) **2017.02.27**

(33) **US**

(43) **2020.01.31**

(86) **PCT/EP2018/054644**

(87) **WO 2018/154104 2018.08.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(72) Изобретатель:
Бремер Дирк, Беке Лейс (BE), Гаффни Дана Сьюзанн, Мой Кристофер Х (US)

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

(56) ELAYNE CHAN-PENEBRE ET AL.: "A selective inhibitor of PRMT5 with in vivo and in vitro potency in MCL models", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 11, no. 6, 27 April 2015 (2015-04-27), pages 432-437, XP055297240, Basingstoke ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/nchembio.1810, abstract

OLENA BARBASH ET AL.: "Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibition as a therapeutic strategy in B-cell lymphoma", CANCER RESEARCH, vol. 75, no. S15, 18 April 2015 (2015-04-18), pages 1b-248, XP055466190, US, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2015-LB-248, abstract

ELAYNE PENE BRE ET AL.: "Identification of a First-in-Class PRMT5 Inhibitor with Potent in Vitro and in Vivo Activity in Preclinical Models of Mantle Cell Lymphoma", BLOOD, vol. 124, no. 21, 6 December 2014 (2014-12-06), page 438, XP055466226, US, ISSN: 0006-4971, abstract

QIANQIAN WANG ET AL.: "Identification of a Novel Protein Arginine Methyltransferase 5 Inhibitor in Non-small Cell Lung Cancer by Structure-Based Virtual Screening", FRONTIERS IN PHARMACOLOGY, vol. 9, 1 March 2018 (2018-03-01), XP055466231, DOI: 10.3389/fphar.2018.00173, abstract

BRAUN CHRISTIAN J ET AL.: "Coordinated Splicing of Regulatory Detained Introns within Oncogenic Transcripts Creates an Exploitable Vulnerability in Malignant Glioma", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 32, no. 4, 28 September 2017 (2017-09-28), page 411, XP085210741, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2017.08.018, abstract, page 417

(57) Настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента, который, вероятно, будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению ингибитором белковой аргинин-N-метилтрансферазы 5 (PRMT5), предусматривающий: оценку биологического образца от пациента на наличие изменения сплайсосомы, где наличие любого указанного изменения свидетельствует о более высокой вероятности того, что указанный пациент будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению указанным ингибитором PRMT5, чем при отсутствии любой указанной мутации или изменения.

B1**045888****045888****B1**

Область техники

В данном документе предусмотрены способы идентификации пациента, характеризующегося высокой вероятностью наличия восприимчивости к лечению ингибитором белковой аргинин-N-метилтрансферазы 5, и способы его лечения.

Предпосылки изобретения

Белковая аргинин-N-метилтрансфераза 5 (PRMT5), также описанная как Hsl7, Jbp1, Skb1, Capsuleen или Dart5, является одной из основных метилтрансфераз, ответственных за моно- и симметричное диметилирование аргининов. PRMT5 принадлежит к семейству ферментов *sym*-Arg диметилтрансфераз. Каталитическая активность связана с активацией сигнального пути онкогенного фактора в легких (сплайсинг и передача сигнала с участием WNT) и эпигенетической репрессией опухолевых супрессоров, а также опухолевых иммуногенных хемокинов. Уровень и локализация белка коррелирует с более высоким клеточным метилированием, потерей фенотипа бронхиального эпителия и слабым прогрессирующим заболеванием.

Посттрансляционное метилирование аргинина на гистоновых и негистоновых белках имеет решающее значение для множества биологических процессов, таких как организация генома, транскрипция, дифференциация, функционирование сплайсосом, передача сигнала и регуляция прохождения клеточного цикла, направление развития стволовых клеток и Т-клеток. PRMT5 многоклеточных животных образует функциональный комплекс с метилосомным белком 50 (MEP50), также называемым Wdr77, коактиватором андрогенового рецептора p44 и Valois. Как повышенный уровень, так и цитоплазматическое накопление белка PRMT5-MEP50 вовлечены в онкогенез рака, и недавно была установлена их взаимосвязь с неблагоприятным клиническим исходом. Эксперименты по восстановлению клеток, которые направлены как на каталитическую, так и на каркасную функцию комплекса PRMT5-MEP50, помимо всесторонних ферментативных исследований, доказали онкогенную связь между уровнем белка, локализацией и ферментативной функцией. Эта корреляция превращает PRMT5 в важную мишень для низкомолекулярных лекарственных средств против рака и других заболеваний.

PRMT5 является членом подсемейства PRMT II типа, который предусматривает использование S-аденозилметионина (SAM) для получения симметричного диметилированного аргинина на гистоновых и негистоновых белковых субстратах и S-аденозилгомоцистеина (SAH). Регуляция активности PRMT5 происходит посредством огромного числа различных участников связывания, посттрансляционных модификаций, miRNA и субклеточной локализации. Метилирование гистонов H2A и H4 по Arg3 и гистона H3 по Arg8 регулирует организацию хроматина для специфической репрессии/активации экспрессии генов транскриптов, которые вовлечены в дифференциацию, трансформацию, прохождение клеточного цикла и подавление роста опухолей. Кроме того, опосредованное PRMT5 метилирование гистона H4 на Arg3 может способствовать связыванию гистона с ДНК-метилтрансферазой DNMT3A и метилированию ДНК для длительного сайленсинга гена.

Негистоновое метилирование может происходить либо в цитоплазме, либо в ядре в зависимости от клеточной локализации PRMT5. Метилирование Sm белков D1 и D3, которые требуются для сборки ядерной сплайсосомы, происходит в цитоплазме как часть PRMT5-содержащей "метилосомы". Дополнительные доказательства того, что PRMT5 вовлечен в сплайсинг, были получены посредством условного нокаута PRMT5 в нейтральных стволовых клетках мыши. Клетки, в которых отсутствовал PRMT5, показали избирательное удержание интронов и пропускание экзонов со слабыми 5'-донорными сайтами. Помимо участия в сплайсинге, PRMT5 оказывает влияние на ключевые сигнальные пути, вовлеченные в направление развития клеток и гомеостаз, путем непосредственного метилирования ключевых узлов передачи сигнала, таких как p53,30 EGFR,26 CRAF,3 PI3K/АКТ,64 и NFkB.

Поскольку PRMT5 представляет собой одну из основных *sym*-Arg метилтрансфераз и вовлечен во множество клеточных процессов, повышенная экспрессия белка, похоже, является важным фактором в его онкогенности. Интересно, что трансляция PRMT5 при лимфоме из клеток мантийной зоны (MCL), по-видимому, регулируется miRNA. Хотя клетки MCL характеризуются меньшим количеством мРНК и более медленной скоростью транскрипции PRMT5, чем нормальные В-лимфоциты, уровень PRMT5 и метилирование H3R8 и H4R3 значительно увеличены. Повторная экспрессия miRNA, которая связывает 3'UTR область PRMT5 снижает уровень белка PRMT5. Удивительно, что антисмысловая РНК PRMT5 была обнаружена в гене PRMT5 человека, что подтверждает гипотезу о специфичной регуляции трансляции, а не о высоком уровне экспрессии мРНК.

Хотя PRMT5 уделяется значительное внимание как клинически подходящей мишени, пока что имеется крайне мало публикаций в отношении селективных ингибиторов PRMT5. Недавно был описан новый субнаномолярный сильный ингибитор PRMT5 (EPZ015666) с противоопухолевой активностью в нескольких моделях ксенотрансплантатов MCL как первый химический зонд, подходящий для дальнейшего установления биологии PRMT5 и его роли при раке (Chan-Penebre E, Kuplast KG, Majer CR, et al. A selective inhibitor of PRMT5 with in vivo and in vitro potency in MCL models. Nat Chem Biol. Jun 2015; 11(6):432-437).

В документе WO 2014100695A1 раскрыты соединения, пригодные для ингибирования активности PRMT5; также описаны способы применения соединений для лечения опосредованных PRMT5 наруше-

ний.

В документе WO 2014100730A1 раскрыты ингибиторы PRMT5, содержащие дигидро- или тетрагидроизохинолин, и пути их применения.

В Devkota, K. et al., ACS Med Chem Lett, 2014. 5: p. 293-297 описан синтез ряда аналогов природного продукта синефунгина и способность этих аналогов ингибировать EHMT1 и EHMT2.

В документе WO 2003070739 раскрыты частичные и полные агонисты аденозиновых рецепторов A1, их получение и их терапевтическое применение.

В документе WO 2012082436 раскрыты соединения и композиции в качестве модуляторов метилтрансфераз гистонов и применяемые для лечения заболеваний, вызванных модуляцией активности метилтрансфераз гистонов.

В документе WO 2014100719 раскрыты ингибиторы PRMT5 и пути их применения.

В документе WO 03074083 раскрыты комбинированные терапевтические средства, которые селективно уничтожают дефицитные по метилтиоаденозинфосфорилазе клетки. Аналоги МТА описаны в этом документе в качестве антиоксичных средств.

В Rung, P.-P. et al., Bioorg Med Chem Lett, 2005. 15: p. 2829-2833 описаны структура, синтез и биологическая оценка новых субстратов 5'-дезоксид-5'-метилтиоаденозинфосфорилазы (МТАР) человека.

В документе WO 2012075500 раскрыты 7-дезапуриновые модуляторы метилтрансферазы гистонов.

В документе WO 2014035140 раскрыты соединения и композиции для модуляции активности метилтрансферазы гистонов.

В документе WO 2015200680 описаны ингибиторы PRMT5 и пути их применения.

В документах WO 2017/032840 и WO 2017/153186 также описаны ингибиторы PRMT5 и пути их применения, и они включены в данный документ посредством ссылки.

PRMT5 был связан с раком легких посредством нескольких механизмов. Повышенная экспрессия PRMT5 и MEP50 при NSCLC высоко коррелирует с более низкой выживаемостью. Механистическое понимание этой повышенной экспрессии при аденокарциноме легких было показано исследованиями, в которых высокая экспрессия PRMT5 в цитоплазме непосредственно коррелировала с неблагоприятным прогнозом, вероятно, опосредованная эпителиально-мезенхимальным переходом и метилированием гистонов. Помимо этого, сверхэкспрессия PRMT5 вызывает образование опухолей у голых мышей. Механизм, лежащий в основе способностей PRMT5 трансформировать клетки, неясен, однако предполагается, что фермент играет роль в клеточной смерти, прохождении клеточного цикла, сплайсинге, росте и пролиферации клеток.

Доклинические данные демонстрируют, что ингибирование PRMT5 вызывает гибель клеток рака легких подгруппы популяции рака легких, в то время как на другие подгруппы длительное воздействие ингибитора PRMT5 не влияет. Таким образом, существует явная потребность в фармакодинамических (PD) и/или предиктивных биомаркерах для определения либо того, характеризуется ли заболевание конкретного пациента, опосредованное PRMT5, высокой вероятностью ответа на лечение ингибитором PRMT5, либо для измерения фармакодинамических эффектов лечения ингибитором PRMT5 у пациента с NSCLC, или SCLC, или другими заболеваниями, опосредованными PRMT5. Такие биомаркеры в настоящее время неизвестны.

Краткое описание изобретения

В данном документе раскрыты способы идентификации пациента, который будет характеризоваться высокой вероятностью наличия восприимчивости к лечению ингибитором белковой аргинин-N-метилтрансферазы 5 (PRMT5).

Ингибиторы PRMT5 могут связывать фермент PRMT5, конкурируя с природным субстратом SAM (S-аденозил-L-метионином), с ингибированием такого фермента.

Таким образом, предполагается, что ингибиторы PRMT5 или фармацевтические композиции на их основе могут быть пригодными для лечения или предупреждения, в частности лечения, заболеваний, таких как нарушение крови, нарушения обмена веществ, аутоиммунные нарушения, рак, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, панкреатит, полиорганная недостаточность, заболевания почек, агрегация тромбоцитов, недостаточная подвижность сперматозоидов, отторжение трансплантата, отторжение трансплантата ткани, повреждения легких и т.п.

В частности, ингибиторы PRMT5 или фармацевтические композиции на их основе могут быть пригодными для лечения или предупреждения, в частности лечения, заболеваний, таких как аллергия, астма, рак гемопозитической системы, рак легкого, рак предстательной железы, меланома, нарушение обмена веществ, диабет, ожирение, нарушение крови, серповидноклеточная анемия и т.п.

Ингибиторы PRMT5 или фармацевтические композиции на их основе могут быть пригодными для лечения или предупреждения, в частности лечения, заболеваний, как например пролиферативное нарушение, такое как аутоиммунное заболевание, рак, доброкачественное новообразование или воспалительное заболевание.

Ингибиторы PRMT5 или фармацевтические композиции на их основе могут быть пригодными для лечения или предупреждения, в частности лечения, заболеваний, таких как нарушение обмена веществ, включающее диабет, ожирение; пролиферативное нарушение, включающее рак, рак гемопозитической

системы, рак легкого, рак предстательной железы, меланому или рак поджелудочной железы; нарушение крови; гемоглобинопатия; серповидноклеточная анемия; β -талассемия, воспалительное заболевание и аутоиммунное заболевание, например ревматоидный артрит, системная красная волчанка, синдром Шегрена, диарея, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь и подобные.

В некоторых вариантах осуществления ингибирование PRMT5 может быть пригодным для лечения или предупреждения, в частности лечения, следующего неограничивающего перечня видов рака: рака молочной железы, рака легкого, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака гемопоэтической системы, лимфомы, медуллобластомы, аденокарциномы прямой кишки, аденокарциномы толстой кишки, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы, рака печени, аденокистозной карциномы, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, опухолей головного мозга, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, меланомы, олигодендроглиомы, светлоклеточной карциномы яичников и серозной кистозной аденомы яичников.

Примеры нарушений обмена веществ, которые можно лечить или предупреждать, в частности лечить, включают без ограничения диабет или ожирение.

Примеры заболеваний крови, которые можно лечить или предупреждать, в частности лечить, включают без ограничения гемоглобинопатию, такую как серповидноклеточная анемия или β -талассемия.

Примеры видов рака, которые можно лечить или предупреждать, в частности лечить, включают без ограничения невриному слухового нерва, аденокарциному, рак надпочечника, рак анального канала, ангиосаркому (например, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиальная саркома, гемангиосаркома), рак аппендикса, доброкачественную моноклональную гаммапатию, рак желчных протоков (например, холангиокарцинома), рак мочевого пузыря, рак груди (например, аденокарцинома молочной железы, папиллярная карцинома молочной железы, рак молочной железы, медуллярная карцинома молочной железы), рак головного мозга (например, менингиома; глиома, например астроцитома, олигодендроглиома; медуллобластома), рак бронхов, карциноидную опухоль, рак шейки матки (например, аденокарцинома шейки матки), хордому, хориокарциному, краниофарингиому, колоректальный рак (например, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальная аденокарцинома), карциному эпителия, эндометриому, эндотелиосаркому (например, саркома Капоши, идиопатическая множественная геморрагическая саркома), рак эндометрия (например, рак матки, саркома матки), рак пищевода (например, аденокарцинома пищевода, аденокарцинома Барретта), саркому Юинга, рак глаза (например, внутриглазная меланома, ретинобластома), семейную гиперэозинофилию, рак желчного пузыря, рак желудочно-кишечного тракта (например, аденокарцинома желудка), гастроинтестинальную стромальную опухоль (GIST), рак головы и шеи (например, плоскоклеточная карцинома головы и шеи), рак ротовой полости (например, плоскоклеточная карцинома ротовой полости (OSCC), рак горла (например, рак глотки, рак гортани, рак носоглотки, рак ротоглотки)), виды рака гемопоэтической системы (например, лейкемия, такая как острый лимфоцитарный лейкоз (ALL) (например, В-клеточный ALL, Т-клеточный ALL), острый миелоцитарный лейкоз (AML) (например, В-клеточный AML, Т-клеточный AML), хронический миелоцитарный лейкоз (CML) (например, В-клеточный CML, Т-клеточный CML) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) (например, В-клеточный CLL, Т-клеточный CLL); лимфому, такую как Ходжкинская лимфома (HL) (например, В-клеточная HL, Т-клеточная HL) и неходжкинская лимфома (NHL) ((например, В-клеточная NHL, такая как диффузная крупноклеточная лимфома (DLCL) (например, диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (DLBCL)), фолликулярную лимфому, хронический лимфолейкоз/мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (CLL/SLL), лимфому из клеток мантимальной зоны (MCL), лимфомы из В-клеток маргинальной зоны (например, лимфомы, ассоциированные с лимфоидной тканью слизистых оболочек (MALT), узловые лимфомы из В-клеток краевой зоны, лимфома из В-клеток маргинальной зоны селезенки), первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, лимфому Беркитта, лимфоплазматическую лимфому (т.е. "макроглобулинемия Вальденстрема"), иммунобластную крупноклеточную лимфому, волосатоклеточный лейкоз (HCL), В-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников и первичную лимфому центральной нервной системы (CNS); а также Т-клеточную NHL, такую как Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников/лейкемия, периферическая Т-клеточная лимфома (PTCL) (например, кожная Т-клеточная лимфома (CTCL) (например, грибовидный микоз, синдром Сезари), ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, экстранодальная Т-клеточная лимфома из естественных киллеров, Т-клеточная лимфома энтеропатического типа, подкожная Т-клеточная лимфома типа панникулита, анапластическая крупноклеточная лимфома); сочетание одного или нескольких видов лейкозий/лимфом, описанных выше; и множественную миелому (MM)), болезнь тяжелых цепей (например, болезнь альфа-цепей, болезнь гамма-цепей, болезнь мю-цепей), гемангиобластома, воспалительные миофибробластические опухоли, иммуноцитарный амилоидоз, рак почек (например, нефробластома почки, также называемая опухолью Вильмса, почечноклеточная карцинома), рак печени (например, гепатоцеллюлярный рак (HCC), злокачественная гепатома), рак легкого (например, бронхогенный рак, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), плоскоклеточный рак легких (SLC), аденокарцинома легкого, карцинома легкого Льюиса, нейроэндокринная опухоль легкого: типичный карциноид, атипичный карциноид, мелкоклеточный рак легких (SCLC) и крупноклеточная нейроэндокринная карцинома), лейомиосаркому (LMS), мастоци-

тоз (например, системный мастоцитоз), миелодиспластические синдромы (MDS), мезотелиому, миело-пролиферативные нарушения (MPD) (например, истинная полицитемия (PV), эссенциальный тромбоцитоз (ЕТ), агногенная миелоидная метаплазия (АММ), также называемая миелофиброзом (MF), хронический идиопатический миелофиброз, хронический миелоцитарный лейкоз (СМЛ), хронический нейтрофильный лейкоз (СНЛ), гиперэозинофильный синдром (HES)), нейробластому, нейрофибромату (например, нейрофиброматоз (NF) типа 1 или типа 2, шванноматоз), нейроэндокринный рак (например, гастроэнтеропанкреатическая нейроэндокринная опухоль (GEP-NET), карциноидная опухоль), остеосаркому, рак яичников (например, цистаденокарцинома, эмбриональный рак яичников, аденокарцинома яичников), папиллярную аденокарциному, рак поджелудочной железы (например, аденокарцинома поджелудочной железы, внутрипротоковая папиллярно-муцинозная опухоль (IPMN), инсуломы), рак полового члена (например, болезнь Педжета полового члена и мошонки), пинеалому, примитивную нейроэктодермальную опухоль (PNT), рак предстательной железы (например, аденокарцинома предстательной железы), рак прямой кишки, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, рак кожи (например, плоскоклеточная карцинома (SCC), кератоакантома (КА), меланома, базальноклеточная карцинома (BCC)), рак тонкой кишки (например, рак аппендикса), карциному мягких тканей (например, злокачественная фиброзная гистиоцитома (MFH), липосаркома, злокачественная опухоль оболочек периферических нервов (MPNST), хондросаркома, фибросаркома, миксосаркома), карциному сальных желез, карциному потовых желез, синовиому, рак яичка (например, семинома, эмбриональная карцинома яичка), рак щитовидной железы (например, папиллярная карцинома щитовидной железы, папиллярная тиреоидная карцинома (PTC), медуллярный рак щитовидной железы), рак уретры, рак влагалища, рак вульвы (например, болезнь Педжета вульвы).

Примеры нейродегенеративных заболеваний, которые можно лечить или предупреждать, в частности лечить, включают без ограничения заболевание двигательных нейронов, прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Пика, болезнь Альцгеймера, деменцию, ассоциированную со СПИДом, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, пигментный ретинит, спинальную мышечную атрофию и мозжечковую дегенерацию.

Примеры сердечно-сосудистых заболеваний, которые можно лечить или предупреждать, в частности лечить, включают без ограничения гипертрофию сердца, рестеноз, атеросклероз и гломерулонефрит.

Примеры воспалительных заболеваний, которые можно лечить или предупреждать, в частности, лечить, включают без ограничения воспаление, ассоциированное с акне, анемию (например, апластическую анемию, гемолитическую аутоиммунную анемию), ринит, астму, артериит (например, полиартериит, височный артериит, узелковый периартериит, артериит Такаясу), артрит (например, кристаллический артрит, остеоартрит, псориатический артрит, подагрический артрит, реактивный артрит, ревматоидный артрит и артрит Рейтера), заболевание верхних дыхательных путей, анкилозирующий спондилит, амилоз, боковой амиотрофический склероз, аутоиммунные заболевания, аллергии или аллергические реакции, атеросклероз, бронхит, бурсит, хронический простатит, конъюнктивит, болезнь Чагаса, хроническое obstructивное заболевание легкого, дивертикулит, дерматомиозит, диабет (например, сахарный диабет 1-го типа, сахарный диабет 2-го типа), заболевание кожи (например, псориаз, экзема, реакции гиперчувствительности при экземе, ожоги, дерматит, зуд (чесотка)), эндометриоз, синдром Гийена-Барре, инфекцию, ишемическую болезнь сердца, болезнь Кавасаки, гломерулонефрит, гингивит, гиперчувствительность, головные боли (например, головные боли при мигрени, головные боли тензионного типа), кишечную непроходимость (например, послеоперационную кишечную непроходимость и кишечную непроходимость при сепсисе), идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, интерстициальный цистит (синдром раздраженного мочевого пузыря), нарушение работы желудочно-кишечного тракта (например, выбранное из пептических язв, регионарного энтерита, дивертикулита, желудочно-кишечного кровотечения, эозинофильных нарушений работы желудочно-кишечного тракта (например, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастрита, эозинофильного гастроэнтерита, эозинофильного колита), гастрита, диареи, гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (GORD или ее синоним GERD), воспалительного заболевания кишечника (IBD) (например, болезни Крона, язвенного колита, коллагенозного колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, воспаления в отключенной кишке, синдрома Бехчета, не уточненного колита) и синдрома воспаленного кишечника (IBS)), волчанку, кольцевидную склеродермию, миастению гравис, ишемию миокарда, рассеянный склероз, нефротический синдром, обыкновенную пузырчатку, пернициозную анемию, пептические язвы, полимиозит, первичный билиарный цирроз, нейровоспаление, ассоциированное с мозговыми нарушениями (например, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона и болезнь Альцгеймера), простатит, хроническое воспаление, ассоциированное с лучевым поражением черепа, воспалительное заболевание органов таза, реперфузионное повреждение, регионарный энтерит, ревматическую лихорадку, системную красную волчанку, склеродермию, склеродому, саркоидоз, виды спондилоартропатии, синдром Шегрена, тиреоидит, отторжение трансплантата, тендинит, травму или повреждение (например, обморожение, воздействие химических раздражителей, токсины, рубцевание, ожоги, физическое повреждение), васкулит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

В частности, воспалительное заболевание может представлять собой острое воспалительное заболевание (например, воспаление вследствие инфекции). В частности, воспалительное заболевание может

представлять собой хроническое воспалительное заболевание (например, состояния, вызванные астмой, артритом и воспалительным заболеванием кишечника). Ингибиторы PRMT5 могут также быть пригодны в лечении воспаления, ассоциированного с травмой и миалгией невоспалительного характера. Соединения могут также быть пригодны в лечении воспаления, ассоциированного с раком.

Примеры аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить или предупреждать, в частности, лечить, включают без ограничения артрит (включая ревматоидный артрит, спондилоартропатии, подагрический артрит, дегенеративные заболевания суставов, такие как остеоартрит, системная красная волчанка, синдром Шегрена, анкилозирующий спондилит, недифференцированный спондилит, болезнь Бехчета, гемолитические аутоиммунные анемии, боковой амиотрофический склероз, амилоз, рассеянный склероз, острый плечекистевой синдром, псориатический и хронический артрит у детей), астму, атеросклероз, остеопороз, бронхит, тендинит, бурсит, заболевание кожи (например, псориаз, экзема, реакции гиперчувствительности при экземе, ожоги, дерматит, зуд (чесотка)), энурез, эозинофильную болезнь, нарушение желудочно-кишечного тракта (например, выбранное из пептических язв, регионарного энтерита, дивертикулита, желудочно-кишечного кровотечения, эозинофильных нарушений желудочно-кишечного тракта (например, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастрит, эозинофильный гастроэнтерит, эозинофильный колит), гастрита, диареи, гастроэзофагеальной рефлюксной болезни (GORD или ее синоним GERD), воспалительного заболевания кишечника (IBD) (например, болезнь Крона, язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, воспаление в отключенной кишке, синдром Бехчета, неутонченный колит) и синдрома воспаленного кишечника (IBS)), и нарушения, тяжесть которых снижают гастропрокинетиическими средствами (например, непроходимость кишечника, послеоперационная непроходимость кишечника и непроходимость кишечника при сепсисе; гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (GORD или ее синоним GERD); эозинофильный эзофагит, парез желудка, такой как диабетический парез желудка; пищевая непереносимость и пищевые аллергии и другие функциональные нарушения кишечника, такие как безъязвенная диспепсия (NUD) и экстракардиальная боль в груди (NCCP, включая реберный хондрит)).

В конкретном варианте осуществления ингибитор PRMT5 может быть пригодным в перепрограммировании соматических клеток, как например перепрограммировании соматических клеток в стволовые клетки. В конкретном варианте осуществления ингибитор PRMT5 может быть пригодным в разработке технологии на основе зародышевых клеток и, таким образом, представляются пригодными для использования в областях репродуктивной технологии и регенеративной медицины.

Другие заболевания, которые можно лечить или предупреждать, в частности лечить, включают без ограничения инфаркты миокарда, ассоциированные с ишемическим повреждением, иммунные заболевания, инсульт, аритмию, заболевания печени, вызванные токсинами или связанные с приемом алкоголя, чувствительный к аспирину риносинусит, муковисцидоз, боли при раке и заболевания крови, например хроническую анемию и апластическую анемию.

Таким образом, настоящее изобретение предусматривает способ идентификации пациента, который, вероятно, будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению ингибитором белковой аргинин-N-метилтрансферазы 5 (PRMT5), включающий оценку биологического образца от пациента на наличие любого из следующего:

- активирующей мутации PIC3CA;
- изменение сплайсосомы;
- усиления сигнального пути циклина D1; и/или
- изменения сигнального пути WNT;

где наличие чего-либо из указанных мутации или изменения свидетельствует о более высокой вероятности того, что указанный пациент будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению указанным ингибитором PRMT5, чем при отсутствии чего-либо из указанных мутации или изменения.

В предпочтительном варианте осуществления изменение сплайсосомы предусматривает мутацию гена, выбранного из группы, состоящей из U2AF1, RBM10 и KIAA1429. В конкретном варианте осуществления ген представляет собой U2AF1 и мутация представляет собой S34F. В другом конкретном варианте осуществления ген представляет собой RBM10, и мутация выбрана из группы, состоящей из I696fs, I348N, G840fs. В еще одном конкретном варианте осуществления ген представляет собой KIAA1429, и мутация выбрана из группы, состоящей из L837V, F1260L, D251if, T1333M, V1548L, G397A и Q962E. Другие изменения сплайсосомы также могут указывать на более высокую вероятность того, что пациент будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению ингибитором PRMT5.

В другом варианте осуществления активирующая мутация PIC3CA, выбрана из группы, состоящей из H1047R, PG106-R108del, T1025A и E542K. Однако другая активирующая мутация также может указывать на более высокую вероятность того, что пациент будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению ингибитором PRMT5.

В другом варианте осуществления усиление сигнального пути циклина D1 представляет собой усиление экспрессии циклина D1, CDK4 или CDK6. Однако другие виды усиления сигнального пути циклина D1 также могут указывать на более высокую вероятность того, что пациент будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению ингибитором PRMT5.

В другом варианте осуществления изменение сигнального пути WNT предусматривает аутокринную передачу сигнала с участием WNT. Предпочтительно изменение сигнального пути WNT предусматривает мутацию гена APC или CTNNB1. В конкретном варианте осуществления ген представляет собой APC, и мутация выбрана из группы, состоящей из R213Q, R2673G, I1177M и D2796G. В другом конкретном варианте осуществления ген представляет собой CTNNB1, и мутация выбрана из группы, состоящей из Y670*, S45F и T41A. Однако другие изменения сигнального пути WNT также могут указывать на более высокую вероятность того, что пациент будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению ингибитором PRMT5.

В конкретном варианте осуществления мутация или изменение в соответствии с настоящим изобретением предусматривает изменение сплайсосомы, и при этом пациента имеется NSCLC.

В другом конкретном варианте осуществления мутация или изменение в соответствии с настоящим изобретением предусматривает усиление сигнального пути циклина D1 или изменение сигнального пути WNT, и при этом у пациента имеется NSCLC.

В другом конкретном варианте осуществления мутация или изменение в соответствии с настоящим изобретением предусматривает активирующую мутацию PIC3CA, а у пациента имеется SCLC.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор PRMT5 представляет собой соединение 2 или соединение 80.

В настоящей заявке раскрыта связь между восприимчивостью и мутациями, активирующими PI3K, при SCLC, и изменениями сплайсосомы и повышенной регуляцией сигнального пути WNT при NSCLC. Усиления сигнального пути циклина D1 ассоциированы с ответом на ингибиторы PRMT5 при NSCLC.

Наборы и праймеры для идентификации наличия одной или нескольких мутаций или изменений, описанных выше, в биологическом образце дополнительно предусмотрены в данном документе.

Более легкое понимание раскрытых способов, наборов и праймеров может быть достигнуто при обращении к следующему более подробному описанию, рассматриваемому в сочетании с прилагаемыми фигурами, которые образуют часть настоящего раскрытия. Следует понимать, что раскрытые способы, наборы и праймеры не ограничиваются конкретными способами, наборами и праймерами, описанными и/или показанными в данном документе, и что терминология, используемая в данном документе, представлена с целью описания конкретных вариантов осуществления только в качестве примера и не предполагает ограничения заявленных способов, наборов и праймеров.

Отсылка на определенное числовое значение включает в себя по меньшей мере это конкретное значение, если из контекста явно не следует иное. Если приводится диапазон значений, то любой вариант осуществления включает в себя значения от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Кроме того, ссылка на значения, указанные в диапазонах, включает в себя все без исключения значения в пределах этого диапазона. Все диапазоны являются включающими и комбинируемыми.

Следует понимать, что определенные свойства раскрытых способов, наборов и праймеров, которые для наглядности описаны в данном документе в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предусмотрены в комбинации в одном варианте осуществления. С другой стороны, различные свойства раскрытых способов, наборов и праймеров, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предусмотрены отдельно или в любой подкомбинации.

Используемые в данном документе формы единственного числа включают формы множественного числа.

Используемый в данном документе термин "лечение" и подобные термины относятся к уменьшению тяжести и/или частоты проявления симптомов рака, устранению симптомов рака и/или лежащей в основе причины указанных симптомов, уменьшению частоты или вероятности проявления симптомов рака и/или лежащей в их основе причины и уменьшению или восстановлению вреда, вызванного прямо или косвенно раком.

Термин "биологические образцы" относится к любому образцу от пациента, из которого могут быть получены раковые клетки и выделена РНК. Подходящие биологические образцы включают в себя без ограничения кровь, лимфатическую жидкость, костный мозг, образец солидной опухоли или любую их комбинацию.

Используемый в данном документе термин "преамплификация" относится к процедуре, связанной с ПЦР, которая проводится до стадии амплификации с целью повышения количества матричной cDNA для стадии амплификации. Стадию преамплификации можно осуществлять, например, с помощью мастер-микса TaqMan® PreAmp Master Mix (Life Technologies/Applied Biosystems®, № продукта 4391128).

Используемые в данном документе термины "амплифицирование", "амплифицировать" и т.п. относятся к образованию множества идентичных копий образца нуклеиновой кислоты. Подходящие методики амплификации образца нуклеиновой кислоты включают без ограничения полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и полимеразную цепную реакцию в реальном времени (RT-PCR). В некоторых вариантах осуществления стадия амплификации предусматривает RT-PCR.

Термин "секвенирование следующего поколения" или "NGS" относится к любому методу секвенирования, который определяет нуклеотидную последовательность либо отдельных молекул нуклеиновых

кислот (например, при одномолекулярном секвенировании), либо клонально размноженных эквивалентов индивидуальных молекул нуклеиновых кислот в высокоскоростном параллельном способе (например, более 103, 104, 105 или более молекул можно секвенировать одновременно). Иллюстративные методики секвенирования следующего поколения включают секвенирование путем синтеза, секвенирование путем лигирования и секвенирование путем гибридизации. Иллюстративные методы секвенирования следующего поколения включают в себя массивно-параллельное опознавательное секвенирование (Lynx Therapeutics); 454-пиросеквенирование (454 Life Sciences/Roche Diagnostics); твердофазное секвенирование по методу обратимых меченых красителем терминаторов (Solexa/Illumina); технологию SOLiD (Applied Biosystems); ионное полупроводниковое секвенирование (Ion Torrent) и секвенирование ДНК на наносферах (Complete Genomics). Описания определенных платформ NGS можно найти в следующих источниках: Shendure, et al, "Next-generation DNA sequencing," Nature, 2008, vol. 26, No. 10, 1135-1145; платформы NGS.

В некоторых вариантах осуществления при высокопроизводительном массивно-параллельном секвенировании используется секвенирование путем синтеза по методу обратимых меченых красителем терминаторов. В других вариантах осуществления секвенирование выполняют с помощью секвенирования путем лигирования. В еще одних вариантах осуществления секвенирование представляет собой секвенирование одной молекулы. Примеры методик секвенирования следующего поколения включают без ограничения пиросеквенирование, секвенирование по методу обратимых меченых красителем терминаторов, секвенирование SOLiD, ионное полупроводниковое секвенирование, одномолекулярное секвенирование Helioscope и т.д.

В системе секвенирования ампликонов Ion Torrent™ (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния) используется проточный подход, который выявляет изменения значения pH, вызванные высвобождением ионов водорода во время включения немодифицированных нуклеотидов при репликации ДНК. Для применения в данной системе изначально получают библиотеку для секвенирования путем генерации фрагментов ДНК, фланкированных с помощью адаптеров для секвенирования. В некоторых вариантах осуществления эти образцы могут быть клонально амплифицированы на частицах путем эмульсионной ПЦР. Частицы с амплифицированной матрицей затем помещают в кремниевый полупроводниковый чип для секвенирования. Во время репликации чип заполняют одним нуклеотидом за другим, и если нуклеотид комплементарен молекуле ДНК в определенной микролунке в чипе, то будет происходить его включение. Когда нуклеотид включается с помощью полимеразы в молекулу ДНК, то естественным образом высвобождается протон, приводя к детектируемому локальному изменению значения pH. Значение pH раствора в этой лунке затем изменяется и выявляется с помощью ионного сенсора. Если гомополимерные повторы присутствуют в последовательности матрицы, то за один цикл будут включены несколько нуклеотидов. Это приводит к соответствующему количеству высвобожденного водорода и пропорционально более высокому электронному сигналу.

В системе секвенирования 454™ GS FLX™ (Roche, Германия) используется методика световой детекции в крупномасштабной параллельной системе пиросеквенирования. При пиросеквенировании используется полимеризация ДНК, добавляя по одной молекуле нуклеотида и осуществляя детекцию и количественную оценку числа нуклеотидов, добавленных к определенному положению, с помощью света, испускаемого при высвобождении присоединенных пирозинатов. Для применения с системой 454™ фрагменты ДНК, лигированные с адаптером, фиксируют на небольших гранулах для захвата ДНК в эмульсии по типу "вода в масле" и амплифицируют путем ПЦР (эмульсионная ПЦР). Каждую связанную с ДНК гранулу помещают в лунку на пикотитровальный планшет, и реагенты для секвенирования доставляют во все лунки планшета. По четыре нуклеотида ДНК добавляют последовательно в установленном порядке во все лунки пикотитровального планшетного устройства во время цикла секвенирования. Во время прохождения потока нуклеотидов миллионы копий ДНК, связанных с каждой из гранул, секвенируют параллельно. Когда нуклеотид, комплементарный нити матрицы, добавляют в лунку, нуклеотид включается в существующую нить ДНК, генерируя световой сигнал, который записывается ПЗС-камерой в устройстве.

Технология секвенирования на основе обратимых меченых красителем терминаторов: молекулы ДНК вначале присоединяют к праймерам на пластине и амплифицируют таким образом, что образуются локальные клональные колонии. Добавляют четыре типа обратимых оснований-терминаторов (RT-оснований), а невключенные нуклеотиды вымывают. В отличие от пиросеквенирования, ДНК может удлиняться только на один нуклеотид за один раз. Фотоаппарат фиксирует изображения флуоресцентно меченых нуклеотидов, затем краситель вместе с концевым 3'-блокатором химически удаляют из ДНК, обеспечивая возможность осуществления следующего цикла.

При одномолекулярном секвенировании Helicos используются фрагменты ДНК с добавленными полиаденильными хвостовыми адаптерами, которые прикрепляются к поверхности проточной ячейки. При каждом цикле добавляются ДНК-полимераза и один вид молекул флуоресцентно меченого нуклеотида, приводя к зависимому от матрицы удлинению иммобилизованных на поверхности дуплексов праймер-матрица. Прочтения выполняли с помощью секвенатора Helioscope. После получения изобра-

жений, покрывающих полный массив, химическое расщепление и высвобождение флуоресцентной метки обеспечивает последующий цикл удлинения и визуализации.

Секвенирование путем синтеза (SBS), подобно "устаревшему" электрофоретическому секвенированию с использованием меченых красителем терминаторов, основано на включении нуклеотидов с помощью ДНК-полимеразы для определения последовательности оснований. Библиотеку ДНК с прикрепленными адаптерами денатурируют на отдельные нити и прививают к проточной ячейке с последующей мостиковой амплификацией с образованием высокоплотного массива пятен на стеклянном чипе. В методах на основе обратимых терминаторов используют обратимые варианты меченых красителем терминаторов, осуществляя добавление по одному нуклеотиду с выявлением флуоресценции в каждом положении в результате повторяющегося удаления блокирующей группы с обеспечением полимеризации присоединением другого нуклеотида. Сигнал, свидетельствующий о включении нуклеотида, может варьировать в зависимости от всех используемых флуоресцентно меченых нуклеотидов, опосредованных фосфатом световых реакций и детекции ионов водорода. Примеры платформ SBS включают в себя Illumina GA и HiSeq 2000. В системе персонального секвенирования MiSeq® (Illumina, Inc.) также используется секвенирование путем синтеза с помощью химии обратимых терминаторов.

В отличие от метода секвенирования путем синтеза, в методе секвенирования путем лигирования используется ДНК-лигаза для определения целевой последовательности. Этот метод секвенирования основан на ферментативном лигировании олигонуклеотидов, которые располагаются рядом в результате локальной комплементарности на нити матричной ДНК. В данной технологии используется разделение всех возможных олигонуклеотидов определенной длины, меченых в соответствии с положением, подлежащим секвенированию. Олигонуклеотиды отжигают и лигируют, а предпочтительное лигирование с помощью ДНК-лигазы в случае совпадающих последовательностей приводит к образованию сигнала цветового пространства кодируемого динуклеотида в этом положении (путем высвобождения флуоресцентно меченого зонда, который соответствует известному нуклеотиду в известном положении в олигонуклеотиде). Данный метод преимущественно используется секвенаторами SOLiD™ от Life Technologies. Перед секвенированием ДНК амплифицируют с помощью эмульсионной ПЦР. Образующиеся в результате гранулы, каждая из которых содержит только копии одной и той же молекулы ДНК, помещают на твердый плоский субстрат.

Секвенирование SMRT™ основано на секвенировании на основе подхода с использованием синтеза. ДНК синтезируется в лункообразных контейнерах с использованием волноводов нулевой моды (ZMW), при этом средства захвата располагаются на дне лунки. Секвенирование осуществляют с помощью немодифицированной полимеразы (прикрепленной ко дну ZMW) и флуоресцентно меченых нуклеотидов, свободно двигающихся в растворе. Лунки конструируют таким образом, чтобы выявлять только флуоресценцию, происходящую на дне лунки. Флуоресцентную метку отделяют от нуклеотида при его включении в нить ДНК, оставляя немодифицированную нить ДНК.

Праймеры для амплификации мутантных вариантов.

Специалисту в данной области техники известно, что для амплификации нуклеиновой кислоты требуются праймеры, которые являются комплементарными и связываются с 5'- и 3'-участками нити нуклеиновой кислоты, которые фланкируют область, подлежащую амплификации. Используемый в данном документе термин "пара праймеров" относится к прямому и обратному праймерам, используемым на стадии амплификации.

Специалист в данной области техники может легко идентифицировать подходящие праймеры для амплификации и выявления определенных мутаций, описанных выше, с помощью известных способов.

Геномика и анализ.

Функциональная геномика и анализ транскрипции могут быть использованы для анализа усиления сигнальных путей и генов с помощью стандартных методик и протоколов.

Ингибиторы PRMT5 для применения в раскрытых способах.

В данном документе предусмотрены подходящие ингибиторы PRMT5 для применения в раскрытых способах. В некоторых вариантах осуществления в случае, если одна или несколько мутаций или усилений, в том числе активирующая мутация PIC3CA, изменение сплайсосомы, усиление сигнального пути циклина D1 и/или изменение сигнального пути WNT присутствуют в образце, пациента можно лечить ингибитором PRMT5, раскрытым в документе PCT/EP2016/070097 (включенном в данный документ посредством ссылки), в том числе любой его таутомерной или стереохимически изомерной формой, а также его N-оксидом, его фармацевтически приемлемыми солями или его сольватом (подходящие R-группы также раскрыты в PCT/EP2016/070097). В некоторых аспектах, например, пациента можно лечить соединением 2 или соединением 80, в том числе любой их таутомерной или стереохимически изомерной формой, а также их N-оксидом, их фармацевтически приемлемыми солями или их сольватом. В некоторых аспектах фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль HCl.

В некоторых вариантах осуществления пациента можно лечить ингибитором PRMT5, если одна или несколько мутаций или усилений, в том числе активирующая мутация PIC3CA, изменение сплайсосомы, усиление сигнального пути циклина D1 и/или изменение сигнального пути WNT присутствуют в образ-

це, при этом ингибитор PRMT5 представляет собой антитело к PRMT5.

Соли могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, традиционными химическими способами, такими как способы, описанные в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002, которое включено в данный документ посредством ссылки. Как правило, такие соли могут быть получены путем реагирования свободных кислотных или основных форм этих соединений с подходящими основанием или кислотой в воде, или в органическом растворителе, или в смеси и того и другого; причем, как правило, используют неводные среды, такие как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил. Ингибиторы PRMT5 для применения в раскрытых способах могут существовать в виде моно- или дисолей в зависимости от рКа кислоты, с использованием которой образована соль.

Соли присоединения кислоты могут быть образованы с использованием множества кислот, являющихся как неорганическими, так и органическими. Примеры солей присоединения кислоты включают соли, образованные с помощью кислоты, включающей без ограничения уксусную, 2,2-дихлоруксусную, адипиновую, альгиновую, аскорбиновую (например, L-аскорбиновую), L-аспарагиновую, бензолсульфоновую, бензойную, 4-ацетамидобензойную, бутановую, (+)-камфорную, камфорсульфоновую, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновую, каприновую, капроновую, каприловую, коричную, лимонную, цикламную, додецилсерную, этан-1,2-дисульфоновую, этансульфоновую, 2-гидроксиэтансульфоновую, муравьиную, фумаровую, галактаровую, гентизиновую, глюкогептоновую, D-глюконовую, глюкуроновую (например, D-глюкуроновую), глутаминовую (например, L-глутаминовую), α -оксоглутаровую, гликолевую, гиппуровую, бромистоводородную, хлористоводородную, йодистоводородную, изэтиновую, молочную (например, (+)-L-молочную, (\pm)-DL-молочную), лактобионовую, малеиновую, яблочную, (-)-L-яблочную, малоновую, (\pm)-DL-миндальную, метансульфоновую, нафталинсульфоновую (например, нафталин-2-сульфоновую), нафталин-1,5-дисульфоновую, 1-гидрокси-2-нафтойную, никотиновую, азотную, олеиновую, оротовую, щавелевую, пальмитиновую, памоевую, фосфорную, пропионовую, L-пироглутаминовую, пировиноградную, салициловую, 4-аминосалициловую, себациновую, стеариновую, янтарную, сернистую, дубильную, (+)-L-винную, тиоциановую, толуолсульфоновую (например, п-толуолсульфоновую), ундециленовую и валериановую кислоты, а также ацилированные аминокислоты и катионообменные смолы.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных из уксусной, хлористоводородной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изэтиновой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, метансульфоновой (мезилата), этансульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, уксусной, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислот. Другая группа солей присоединения кислоты включает соли, образованные из уксусной, адипиновой, аскорбиновой, аспарагиновой, лимонной, DL-молочной, фумаровой, глюконовой, глюкуроновой, гиппуровой, хлористоводородной, глутаминовой, DL-яблочной, метансульфоновой, себациновой, стеариновой, янтарной и винной кислот.

Если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может представлять собой -COO⁻), то можно образовывать соль с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают без ограничения ионы щелочных металлов, такие как Na⁺ и K⁺, катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca²⁺ и Mg²⁺, и другие катионы, такие как Al³⁺. Примеры подходящих органических катионов включают без ограничения ион аммония (т.е. NH₄⁺) и ионы замещенного аммония (например, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺).

Примерами некоторых подходящих ионов замещенного аммония являются ионы, полученные из этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером распространенного иона четвертичного аммония является N(CH₃)₄⁺.

Если соединения содержат функциональную аминогруппу, то они могут формировать соли четвертичного аммония, например, путем реакции с алкилирующим средством согласно способам, хорошо известным специалисту. Такие соединения четвертичного аммония находятся в пределах объема раскрытых соединений. Соединения, содержащие функциональную аминогруппу, также могут образовывать N-оксиды. Упоминание в данном документе соединения, которое содержит функциональную аминогруппу, также предусматривает N-оксид. Если соединение содержит несколько функциональных аминогрупп, то один или несколько атомов азота могут быть окислены с образованием N-оксида. Конкретными примерами N-оксидов являются N-оксиды третичного амина или атома азота в азотсодержащем гетероцикле. N-оксиды могут быть образованы путем обработки соответствующего амина окислителем, таким как пероксид водорода или перкислота (например, пероксикарбоновая кислота), см., например, *Advanced Organic Chemistry*, by Jerry March, 4th Edition, Wiley Interscience, pages. Более конкретно, N-оксиды могут быть получены с помощью процедуры из L.W. Deady (*Syn. Coll.* (1977), 7, 509-514), при которой аминокислотное соединение подвергают реакции с м-хлорпероксибензойной кислотой (MCPBA), например, в инертном

растворителе, таком как дихлорметан.

Используемый в данном документе термин "сольват" означает физическую связь соединения с одной или несколькими молекулами растворителя. Эта физическая связь подразумевает различную степень ионного и ковалентного связывания, включая водородную связь. В некоторых случаях сольват будет способен к выделению, например, когда одна или несколько молекул растворителя включены в кристаллическую решетку кристаллического твердого вещества. Подразумевается, что термин "сольват" охватывает как жидкофазовые, так и изолируемые сольваты. Неограничивающие примеры подходящих сольватов включают раскрытые соединения в комбинации с водой, изопропанолом, этанолом, метанолом, DMSO, этилацетатом, уксусной кислотой или этаноламином и т.п. Соединение может оказывать свои биологические эффекты, находясь в растворе.

Сольваты хорошо известны в фармацевтической химии. Они могут быть важными для способов получения вещества (например, в отношении его очистки), хранения вещества (например, его стабильности) и удобства осуществления манипуляций с веществом, и зачастую их образуют как часть стадий выделения или очистки при химическом синтезе. Специалист в данной области сможет определить посредством стандартных и длительно используемых методов, образовался ли гидрат или другой сольват при условиях выделения или условиях очистки, используемых для получения данного соединения. Примеры таких методик включают в себя термогравиметрический анализ (TGA), дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC), рентгеновскую кристаллографию (например, монокристаллическую рентгеновскую кристаллографию или рентгеновскую порошковую дифрактометрию) и ЯМР твердого тела (SS-NMR, также известный как ЯМР с вращением образца под магическим углом или MAS-NMR). Такие методики являются такой же частью стандартного аналитического инструментария квалифицированного химика, как ЯМР, IR, HPLC и MS. В качестве альтернативы квалифицированный специалист сможет при необходимости сформировать сольват с использованием условий кристаллизации, которые предусматривают количество растворителя, необходимое для конкретного сольвата. Впоследствии стандартные способы, описанные выше, могут быть использованы для установления формирования сольватов. Также охватываются любые комплексы (например, комплексы включения или клатраты с соединениями, такими как циклодекстрины, или комплексы с металлами) ингибитора PRMT5.

Кроме того, соединение может иметь одну или несколько полиморфных (кристаллических) или аморфных форм.

Соединения включают соединения с одним или несколькими изотопными замещениями, и упоминание конкретного элемента включает в свой объем все изотопы данного элемента. Например, упоминание водорода включает в свой объем ^1H , ^2H (D) и ^3H (T). Подобным образом, упоминания углерода и кислорода включают в свой объем ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C и ^{16}O и ^{18}O соответственно. Изотопы могут быть радиоактивными или нерадиоактивными. В одном варианте осуществления соединения не содержат радиоактивные изотопы. Такие соединения являются предпочтительными для терапевтического применения. В другом варианте осуществления, однако, соединение может содержать один или несколько радиоизотопов. Соединения, содержащие такие радиоизотопы, могут быть применимы в диагностическом контексте.

В некоторых вариантах осуществления пациента лечат ингибитором PRMT5, если в образце присутствует один или несколько мутантных вариантов U2AF1, при этом ингибитор PRMT5 представляет собой соединение 2 или соединение 80, или их фармацевтически приемлемую соль, или их сольват.

Способы лечения рака у пациента.

В данном документе раскрыты способы лечения рака у пациента, предусматривающие: оценку биологического образца от пациента на наличие одной или нескольких мутаций или усилений, в том числе активирующей мутации PIC3CA, изменения сплайсосомы, усиления сигнального пути циклина D1 и/или изменения сигнального пути WNT; и лечение пациента ингибитором PRMT5, если одна или несколько мутаций или усилений, в том числе активирующая мутация PIC3CA, изменение сплайсосомы, усиление сигнального пути циклина D1 и/или изменение сигнального пути WNT присутствуют в образце.

Раскрытые способы могут быть использованы для лечения ряда типов рака, в том числе без ограничения рака мочевого пузыря, метастатического рака мочевого пузыря, рака яичников, рака головы и шеи, рака пищевода, немелкоклеточной аденокарциномы легких, немелкоклеточной плоскоклеточной карциномы легких, рака предстательной железы, рака легких, рака желудочно-кишечного тракта, уротелиальной карциномы, мелкоклеточного рака легких, рака молочной железы, рака эндометрия, холангиокарциномы, глиобластомы, глиом, карциномы толстой кишки, сарком, солидных опухолей плоскоклеточного происхождения и множественной миеломы.

В некоторых вариантах осуществления стадия оценки предусматривает: выделение РНК из биологического образца; синтез cDNA на основе выделенной РНК; преамплификацию cDNA; и амплификацию преамплифицированной cDNA с помощью пары праймеров, которые связывают и амплифицируют одну или несколько мутаций, в том числе активирующую мутацию PIC3CA, изменение сплайсосомы, усиление сигнального пути циклина D1 и/или изменением сигнального пути WNT.

Выделение РНК из биологического образца можно выполнять с помощью ряда процедур, известных специалисту в данной области техники. В одном варианте осуществления РНК можно выделить из биологического образца с помощью набора AllPrep DNA/RNA FFPE от Qiagen (продукт № 80234).

Синтез cDNA на основе выделенной РНК можно осуществлять с помощью ряда процедур, известных специалисту в данной области. В одном варианте осуществления cDNA можно синтезировать на основе выделенной РНК с помощью высокопроизводительного набора на основе обратной транскриптазы cDNA с ингибитором РНКазы от ABI (продукт № 4374966).

Преамплификацию cDNA можно осуществлять с помощью ряда процедур, известных специалисту в данной области. Процедуры амплификации хорошо известны в данной области техники. В одном варианте осуществления cDNA можно преамплифицировать с помощью мастер-микса TaqMan® PreAmp Master Mix (Life Technologies/Applied Biosystems®, продукт № 4391128).

Подходящие ингибиторы PRMT5 для применения в способах лечения включают описанные ранее в данном документе.

Способы идентификации пациента, имеющего рак, который будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению ингибитором белковой аргинин-N-метилтрансферазы 5 (PRMT5).

Наборы для идентификации наличия мутантных или измененных генов.

Кроме того, раскрыты наборы для идентификации наличия одной или нескольких мутаций или усилений, в том числе активирующей мутации PIC3CA, изменения сплайсосома, усиления сигнального пути D1 и/или изменения сигнального пути WNT в биологическом образце, содержащие: пары праймеров, имеющих последовательности их комбинации; и инструкции для осуществления анализа для выявления одной или нескольких мутаций или усилений, в том числе активирующей мутации PIC3CA, изменения сплайсосома, усиления сигнального пути циклина D1 и/или изменения сигнального пути WNT.

Краткое описание, а также ниже следующее подробное описание будут более понятны при их рассмотрении в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. С целью иллюстрации раскрытых способов, наборов и праймеров в графических материалах показаны иллюстративные варианты осуществления способов, наборов и праймеров; однако способы, наборы и праймеры не ограничены конкретными раскрытыми вариантами осуществления.

Подробное описание иллюстративных вариантов осуществления

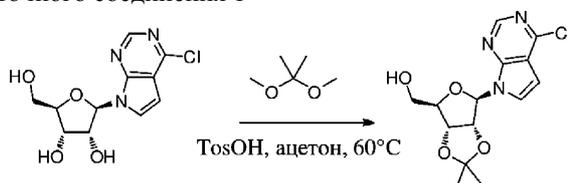
Ингибиторы PRMT5, представляющие собой соединения 2 и 80, используемые в примерах, также представлены в качестве примера в документе PCT/EP2016/070097.

Далее в данном документе термин "кт", "к.т." или "КТ" означает комнатную температуру; "Me" означает метил; "MeOH" означает метанол; "Et" означает этил; "EtOH" означает этанол; "NaH" означает гидрид натрия; "DEAD" означает диэтилазодикарбоксилат; "HMPT" означает гексаметилфосфора триамид; "Woc₂O" означает трет-бутоксикарбонил ангидрид; "ButONO" означает трет-бутилнитрит; "TosOH" означает 4-метилбензолсульфовую кислоту; "TosCl" означает 4-метилбензолсульфонилхлорид (также п-толуолсульфонилхлорид); "СМВР" означает цианометилтрибутилфосфоран; "DBAD" означает ди-трет-бутилазодикарбоксилат; "LAN" означает алюмогидрид лития; "NaBH(AcO)₃" или "NaBH(OAc)₃" означает триацетоксидборгидрид натрия; "EtOAc" означает этилацетат; "TEA" или "Et₃N" означает триэтиламин; "DCM" означает дихлорметан; "q.s." означает достаточное количество; "пром. соед." означает промежуточное соединение; "MeCN" или "ACN" означает ацетонитрил; "DMF" означает N,N-диметилформамид; "DMA" означает N,N-диметилацетамид; "DMF-DMA" означает N,N-диметилформамида диметилацеталь; "Pd(dppf)Cl₂" означает [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II); "THF" означает тетрагидрофуран; "C₃₄H₂₈FeP₂Cl₂Pd" означает [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(ii); "i-PrOH" или "iPrOH" означает 2-пропанол; "LC" означает жидкостную хроматографию; "LCMS" означает жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию; "HPLC" означает высокоэффективную жидкостную хроматографию; "пром. соед." означает промежуточное соединение; "prep-HPLC" означает препаративную высокоэффективную жидкостную хроматографию; "m-CPBA" означает мета-хлорпероксибензойную кислоту; "TFA" означает трифторуксусную кислоту; "т. пл." означает температуру плавления; "RP" означает обращенную фазу; "мин" означает минуту(минуты); "ч" означает час(ы); "PE" означает петролейный эфир; "об./об." означает отношение объема к объему; "Celite®" означает диатомитовую землю; "DMSO" означает диметилсульфоксид; "SFC" означает сверхкритическую флюидную хроматографию; "DIPE" означает диизопропиловый эфир; "dppf" или "DPPF" означает 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен; "DIPEA" или "DIEA" означает N,N-диизопропилэтиламин; "PPh₃" означает трифенилфосфин; "Et₂O" означает диэтиловый эфир; "Pd/C" означает палладий на угле; "Pt/C" означает платину на угле; "Pd(OH)₂/C" означает гидроксид палладия на угле; "CPME" означает циклопентилметиловый эфир; "Pd₂(dba)₃" означает трис(добензилиденацетон)дипалладий; "DIAD" означает диизопропилазодикарбоксилат; "TMSCF₃" означает триметил(трифторметил)силан; "TBAF" означает тетрабутиламмония фторид; "фунт/кв. дюйм" означает фунт-силу на квадратный дюйм; "Et₄NCl" означает тетраэтиламмония хлорид; "экв." означает эквивалент(ы); "Pd(OAc)₂" означает ацетат палладия(II); "AcOH" означает уксусную кислоту; "DMAP" означает 4-(диметиламино)пиридин; "t-BuOK", "tBuOK" или "KOtBu" означает трет-бутоксид калия; "периодинан Десс-Мартина" означает 1,1,1-триацетокси-1,1-дигидро-1,2-бензиодоксол-3(1H)-он; "TBDMSCl" означает трет-бутилдиметилсилилхлорид; "PPh₃-полимер" или "PPh₃-pol" означает полимер-связанный трифенилфосфин; "Ph₃PCH₃Br" означает метилтрифенилфосфония бромид; "Bn" означает

бензил; "Bz" означает бензоил; "p-TSA" означает 4-метилбензолсульфовую кислоту; "BF₃.Et₂O" означает комплекс бора трифторида-этилового эфира; "9-BBN" означает 9-борабицикло[3.3.1]нонан; "Pd-118" означает дихлор[1,1'-бис(ди-трет-бутилфосфино)ферроцен]палладий(II); и "TLC" означает тонкослойную хроматографию; "prep-TLC" означает препаративную TLC; "p-MeC₆H₄SO₃H.H₂O" означает пара-толуолсульфоновой кислоты гидрат; "PMB" означает пара-метоксибензил; "KOAc" означает ацетат калия; "PTSA" означает пара-толуолсульфовую кислоту; "MTBE" означает метил-трет-бутиловый эфир; Rh(acac)(eth)₂ означает ацетилацетонатобис(этилен)родий(I); "(S)-MonoPhos" означает (S)-N,N-диметилдинафто[2,1-D:1',2'-F][1,3,2]диоксафосфепин-4-амин; "Tf₂O" означает трифторметансульфовый ангидрид; "MeI" означает метилйодид; "Me₂NH" означает диметиламин; "Me₂NH.HCl" означает диметиламин-хлористоводородная кислота; "Me₄NCl" означает тетраметиламмония хлорид; "MeONa" означает метоксид натрия; "Ts" означает тозил; "MsCl" означает мезилхлорид; "DIBALH" означает диизобутилалюминия гидрид; "TBDMS" означает трет-бутилдиметилсилил; "Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂" означает [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладий(II) в комплексе с дихлорметаном; "PPA" означает полифосфорную кислоту; "NH₂Bn" означает бензиламин; "Pd(PPh₃)₂Cl₂" означает дихлорбис(трифенилфосфин)палладий(II).

Для промежуточных соединений, которые применяли на следующей стадии реакции в качестве неочищенного или частично очищенного промежуточного соединения, рассчитанные мольные количества (в некоторых случаях указанные при помощи ≈) указаны в протоколах реакций, описанных ниже, или, в качестве альтернативы, указаны теоретические мольные количества.

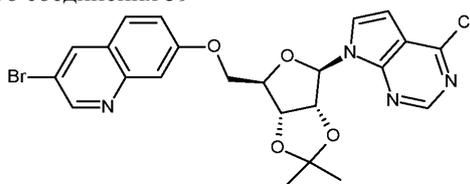
Получение промежуточного соединения 1



Промежуточное соединение 1

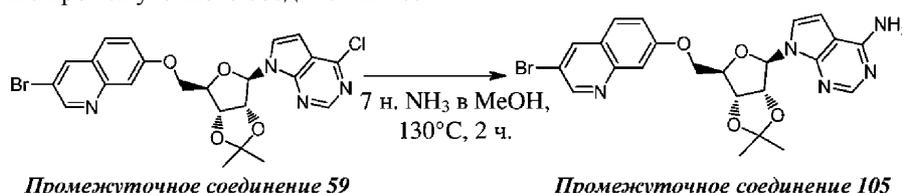
В смесь 6-хлор-7-дезапурина-β-D-рибозида (25,0 г, 87,5 ммоль) в ацетоне (330 мл) одной порцией добавляли 2,2-диметоксипропан (18,2 г, 175 ммоль) и 4-метилбензолсульфовую кислоту (TosOH) (1,51 г, 8,75 ммоль) при 25°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 60°C в течение 2 ч. Смесь охлаждали до 25°C. Реакцию гасили путем медленного добавления насыщенного NaHCO₃ (100 мл) и затем экстрагировали этилацетатом (125 мл × 5). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором (120 мл), высушивали с помощью безводного MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали посредством хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование: DCM/этилацетат от 1:0 до 2:1) с получением неочищенного промежуточного соединения 1 (38,0 г) в виде светло-желтой камеди.

Получение промежуточного соединения 59



Диизопропилазидикарбоксилат (0,221 мл, 1,125 ммоль) добавляли по каплям в перемешанную суспензию промежуточного соединения 1 (0,27 г, 0,80 ммоль), 3-бромхиолин-7-ола (0,18 г, 0,80 ммоль) и трифенилфосфиновой смолы (0,375 г, 3 ммоль/г, 1,125 ммоль) в THF (8 мл) при комнатной температуре. После добавления реакцию смесь перемешивали в течение 18 ч. Реакционную смесь фильтровали через подушку из Dicalite®. Остаток промывали метанолом. Растворители из фильтрата выпаривали. Остаток использовали как таковой на следующей стадии.

Получение промежуточного соединения 105



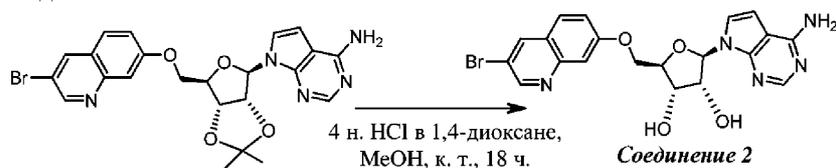
Промежуточное соединение 59

Промежуточное соединение 105

Неочищенное промежуточное соединение 59 (q.s., теоретически 0,83 ммоль) растворяли в 7M NH₃ в MeOH (20 мл, 7M, 140 ммоль). Полученный раствор перемешивали и нагревали при 130°C при помощи микроволнового излучения в течение 2 ч. Растворители выпаривали. Остаток растворяли в дихлорметане и очищали на колонке с SiO₂, типа Grace Reveleris SRC, 12 г, Si 40, на системе очистки Grace Reveleris X2, используя дихлорметан и метанол в качестве элюентов с градиентом, начиная со 100% DCM для 20

объемов колонки до 20% MeOH и 80% DCM для 20 объемов колонки. Фракции, содержащие продукт, объединяли, и выпаривали растворители с получением неочищенного промежуточного соединения 105 (175 мг), которое применяли как таковое на следующей стадии реакции.

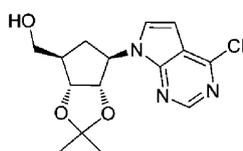
Получение соединения 2



Промежуточное соединение 105

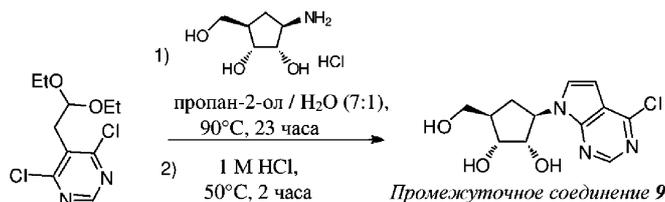
4M HCl в диоксане (0,7 мл, 2,9 ммоль) добавляли в перемешанный раствор промежуточного соединения 105 (175,1 г, неочищенное, ≈0,29 ммоль) в MeOH (10 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакцию гасили добавлением 1,5 мл 7 н. раствора NH₃ в MeOH. Растворители выпаривали. Остаток растворяли в DCM. Осадок отфильтровывали. Фильтрат очищали на колонке с SiO₂, типа Grace Reveleris SRC, 12 г, Si 40, на системе для очистки Armen Spot II Ultimate, используя DCM и MeOH в качестве элюентов в градиенте, начиная со 100% DCM и заканчивая 40% MeOH и 60% DCM. Фракции, содержащие продукт, объединяли, и растворители выпаривали с получением 24,5 мг соединения 2.

Получение промежуточного соединения 10



Промежуточное соединение 10

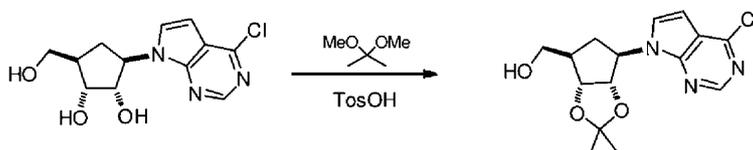
Стадия а)



Промежуточное соединение 9

В смесь 4,6-дихлор-5-(2,2-диэтоксипропан-1-ил)пиримидина (14,0 г, 52,8 ммоль) и гидрохлорида (1R, 2S,3R,5R)-3-амино-5-(гидрокси-метил)циклопентан-1,2-диола (10,7 г, 58,1 ммоль) в пропан-2-оле/H₂O (208 мл, 7:1) одной порцией добавляли Et₃N (13,4 г, 132 ммоль) при 25°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 90°C в течение 23 ч. Смесь охлаждали до 50°C, и медленно добавляли 4M HCl (24 мл, 106 ммоль). Остаток затем перемешивали при 50°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до 25°C, и медленно добавляли NaHCO₃ (14 г, 100 ммоль). Добавляли этилацетат (230 мл) с последующим добавлением полунасыщенного раствора NaHCO₃ (q.s.). Органическую фазу выделяли, и водную фазу экстрагировали этилацетатом (230 мл ×2). Объединенную органическую фазу высушивали над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением промежуточного соединения 9 в виде желтого твердого вещества (17,4 г, количественный выход на 2 стадиях). Неочищенный продукт непосредственно применяли как таковой на следующей стадии реакции без дополнительной очистки.

Стадия б)



Промежуточное соединение 9

Промежуточное соединение 10

В смесь промежуточного соединения 9 (17,4 г, ≈52,7 ммоль) в ацетоне (250 мл) добавляли 2,2-диметоксипропан (11,0 г, 105 ммоль) и TsOH·H₂O (908 мг, 5,27 ммоль) одной порцией при 25°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 60°C в течение 2 ч. Смесь охлаждали до 25°C, и раствор концентрировали под вакуумом, медленно гасили насыщенным NaHCO₃ (100 мл), а затем экстрагировали этилацетатом (100 мл ×3). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором (100 мл), сушили над безводным MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (градиентное элюирование: DCM/этилацетат от 1/0 до 2/1) с получением промежуточного соединения 10 в виде светло-желтой камеди (15,5 г, выход 89%).

Получение промежуточного соединения 33

**Промежуточное соединение 1****Промежуточное соединение 33**

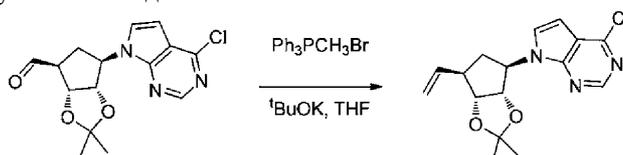
В смесь промежуточного соединения 1 (2,00 г, теоретически 6,18 ммоль) в DCM (40 мл) одной порцией добавляли периодиан Десса-Мартина (5,24 г, 12,36 ммоль) при 0°C в атмосфере N₂. Смесь перемешивали при 0°C в течение 3 ч. В смесь добавляли Na₂S₂O₃ (4 г) в насыщенном NaHCO₃ (20 мл) и перемешивали в течение 10 мин. Водную фазу экстрагировали с помощью DCM (20 мл ×3). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором (20 мл ×2), сушили над безводным MgSO₄, фильтровали и концентрировали под вакуумом с получением промежуточного соединения 33 (1,80 г, неочищенное) в виде светло-желтой камеди. Неочищенный продукт непосредственно применяли на следующей стадии реакции без дополнительной очистки.

Промежуточные соединения, указанные ниже, получали с помощью протокола реакции, аналогичного применяемому для получения промежуточного соединения 33, с применением соответствующих исходных веществ (табл. 6).

Пром. соед.	Таблица 6 Структура	Исходное вещество
35		Промежуточное соединение 10

Способ 1.

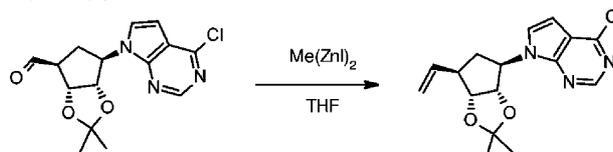
Получение промежуточного соединения 38

**Промежуточное соединение 35****Промежуточное соединение 38**

В смесь метилтрифенилфосфония бромид (4,87 г, 13,62 ммоль) в THF (500 мл) добавляли t-BuOK (11,4 мл, 1М в THF, 1,27 г, 11,35 ммоль,) по каплям при 0°C в атмосфере N₂. Суспензия становилась ярко-желтой, и ее перемешивали при 0°C в течение 0,5 ч, а затем нагревали до 25°C в течение 0,5 ч. Смесь охлаждали до -40°C. Добавляли по каплям раствор промежуточного соединения 35 (1,46 г, теоретически 4,54 ммоль) в THF (130,0 мл), а затем перемешивали при -20°C в течение 1 ч, после этого смесь нагревали до 25°C в течение 2 ч. В смесь добавляли насыщенный NH₄Cl (300 мл) и перемешивали в течение 10 мин. Слои разделяли, и водную фазу экстрагировали с помощью DCM (300 мл ×2). Объединенную органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором (500 мл), высушивали с помощью безводного MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (ISCO®; 80 г колонка SepaFlash® для флэш-хроматографии на силикагеле, градиентное элюирование: от 0 до 15% этилацетата/петролейного эфира). Необходимые фракции собирали, и растворитель выпаривали. Промежуточное соединение 38 получали в виде грязно-белого твердого вещества (530 мг, выход 36%).

Способ 2.

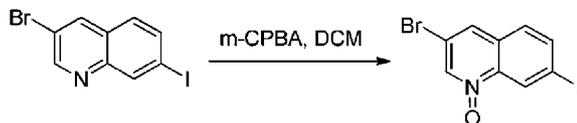
Промежуточное соединение 38

**Промежуточное соединение 35****Промежуточное соединение 38**

Раствор промежуточного соединения 35 (10,0 г, теоретически 31,1 ммоль) в THF (100 мл) добавляли по каплям в атмосфере N₂ в течение периода 30 мин в раствор бис(йодцинк)метана в THF (180 мл, 0,31М, 55,9 ммоль, полученный согласно процедуре, описанной в Tetrahedron 2002, 58, 8255-8262), при этом

перемешивание продолжали до полного превращения (приблизительно 2 ч). Реакционную смесь гасили медленным добавлением насыщенного водного раствора NH_4Cl , во время чего наблюдали образование соли. Перед экстракцией (EtOAc , 2×200 мл) соли снова растворяли добавлением водного раствора аммиака (25%). Объединенные органические фазы промывали водным раствором бисульфита натрия и соевым раствором, высушивали над безводным MgSO_4 , фильтровали и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали хроматографией на силикагеле (элюент: дихлорметан/ EtOAc 95/5) с получением промежуточного соединения 38 в виде грязно-белого твердого вещества (6,9 г, 66%).

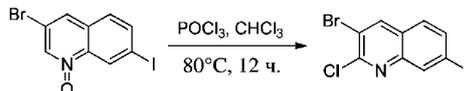
Получение промежуточного соединения 174



Промежуточное соединение 174

3-бром-7-йодхинолин (5,99 г, 17,7 ммоль) растворяли в дихлорметане (60 мл), затем добавляли порциями *m*-CPBA (4,57 г, 26,5 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 дней. Смесь гасили насыщенным водным раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (40 мл) и насыщенным водным раствором NaHCO_3 (pH до 6-7), затем экстрагировали дихлорметаном (50 мл $\times 3$). Органическую фазу промывали H_2O (50 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали посредством колонки на силикагеле (элюент: петролейный эфир/этилацетат = от 10/1 до 1/1) с получением требуемого продукта, представляющего собой промежуточное соединение 174 (1,9 г, выход 14,1%), в виде желтого твердого вещества.

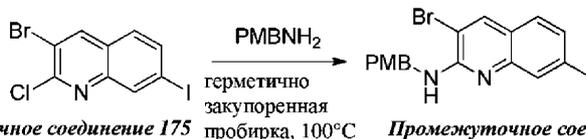
Получение промежуточного соединения 175



Промежуточное соединение 174 **Промежуточное соединение 175**

В раствор промежуточного соединения 174 (2,9 г, 8,29 ммоль) в хлороформе (60 мл) добавляли фосфорилтрихлорид (8,3 г, 54,1 ммоль). Смесь перемешивали при 80°C в течение 12 ч. Смесь выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией (элюент: петролейный эфир/этилацетат = от 10/1 до 1/1). Требуемые фракции собирали и концентрировали с получением продукта, представляющего собой промежуточное соединение 175 (1,3 мг, выход 41,5%), в виде белого твердого вещества.

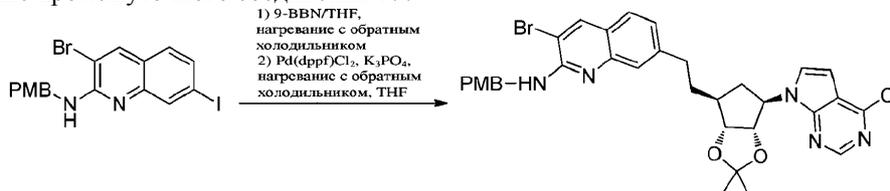
Получение промежуточного соединения 176



Промежуточное соединение 175 **Промежуточное соединение 176**

4-Метоксипензиламин (1,34 г, 9,78 ммоль) добавляли в смесь промежуточного соединения 175 (0,8 г, $\approx 1,95$ ммоль) в этаноле (10 мл). Смесь нагревали в герметично закупоренной пробирке при 100°C в течение 12 ч. Смесь выпаривали под вакуумом с получением неочищенного продукта. Его очищали колоночной хроматографией (градиент элюента: этилацетат/петролейный эфир от 0/1 до 1/10). Требуемые фракции собирали и концентрировали с получением продукта, представляющего собой промежуточное соединение 176 (600 мг, выход 51,6%), в виде масла.

Получение промежуточного соединения 177



Промежуточное соединение 176

Промежуточное соединение 177

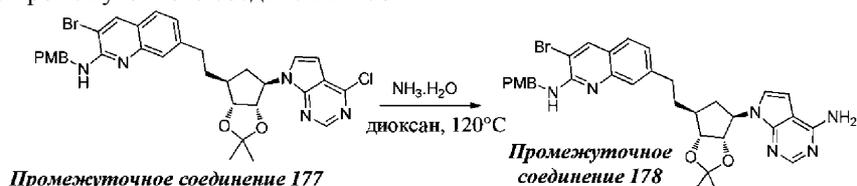
Смесь промежуточного соединения 38 (44 мг, 0,138 ммоль) в 9-BBN (1,3 мл, 0,69 ммоль, 0,5M в THF) нагревали с обратным холодильником в течение 1 ч в атмосфере N_2 . Смесь охлаждали до комнатной температуры, затем добавляли K_3PO_4 (87 мг, 0,413 ммоль) в H_2O (1 мл), с последующим добавлением THF (5 мл), промежуточного соединения 176 (122,727 мг, $\approx 0,206$ ммоль) и [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия(II) (4,48 мг, 0,007 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 3 ч. Смесь концентрировали. Остаток растворяли в этилацетате (40 мл), промывали водой (6 мл), соевым раствором (6 мл). Органическую фазу сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением фракции 1 в виде неочищенного промежуточного соеди-

нения 177 (120 мг, выход 71,5%).

Смесь промежуточного соединения 38 (233,7 мг, 0,73 ммоль) в 9-BBN (7,31 мл, 3,65 ммоль, 0,5M в THF) нагревали с обратным холодильником в течение 1 ч в атмосфере N₂. Смесь охлаждали до комнатной температуры, затем добавляли КЗРО₄ (87 мг, 0,413 ммоль) в H₂O (1 мл), с последующим добавлением THF (5 мл), промежуточного соединения 176 (478 мг, ≈0,80 ммоль) и [1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия(II) (23,8 мг, 0,037 ммоль). Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 3 ч. Смесь концентрировали. Остаток растворяли в этилацетате (40 мл), промывали водой (6 мл), соевым раствором (6 мл). Органическую фазу сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением фракции 2 в виде неочищенного промежуточного соединения 177 (600 мг, выход 63,1%).

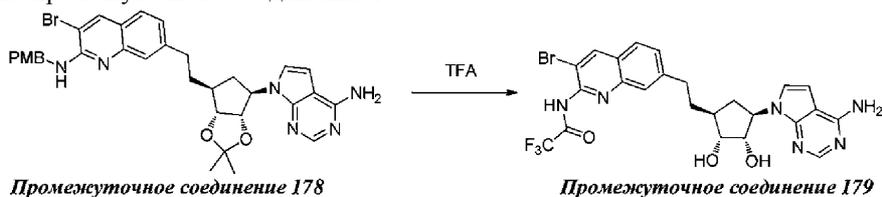
Две фракции объединяли и очищали колоночной хроматографией (градиент элюента: этилацетат/петролейный эфир от 1/10 до 1/1). Требуемые фракции собирали и концентрировали с получением промежуточного соединения 177 (300 мг, выход 61,0%) в виде твердого вещества.

Получение промежуточного соединения 178



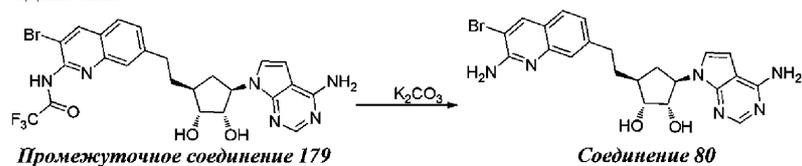
Смесь промежуточного соединения 177 (300 мг, ≈0,446 ммоль) и NH₃·H₂O (10 мл) в диоксане (10 мл) перемешивали в герметично закупоренной пробирке при 120°C в течение 14 ч. Эту реакционную смесь выпаривали под вакуумом с получением промежуточного соединения 178 (250 мг, выход 87,1%) в виде масла.

Получение промежуточного соединения 179



Смесь промежуточного соединения 178 (250 мг, ≈0,388 ммоль) в TFA (5 мл) перемешивали при 50°C в течение 1 ч. Смесь выпаривали под вакуумом с получением промежуточного соединения 179 (350 мг, выход 63,4%) в виде масла.

Получение соединения 80



Смесь промежуточного соединения 179 (350 мг) и K₂CO₃ (102 мг, 0,74 ммоль) в метаноле (3 мл) перемешивали при 60°C в течение 1 ч. Смесь фильтровали и выпаривали под вакуумом с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали с помощью ргср-HPLC (колонокка: Waters Xbridge Rгсr OBD C18 150×30 мм, 5 мкм, условие: градиент вода (0,05% гидроксида аммония об./об.)-ACN). Требуемые фракции собирали, и растворитель выпаривали с получением соединения 80 (113,3 мг, выход 94,9%) в виде белого твердого вещества.

Аналитическая часть.

ЯМР.

Для ряда соединений ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на Bruker DPX-360, функционирующем при 360 МГц, на Bruker Avance 600, функционирующем при 600 МГц, на Bruker Avance 400, функционирующем при 400 МГц, или на спектрометре Varian 400MR, функционирующем при 400 МГц. В качестве растворителей применяли хлороформ-d (дейтерированный хлороформ, CDCl₃), метанол-d₄ или DMSO-d₆ (дейтерированный DMSO, диметилсульфоксид-d₆). Значения химического сдвига (δ) указаны в частях на миллион (ppm) относительно тетраметилсилана (TMS), который применяли в качестве внутреннего стандарта.

Соед. 80: ¹H-ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 1,50-1,56 (m, 1H), 1,68-1,75 (m, 1H), 1,85-1,92 (m, 1H), 1,96 (ddt, J=13,0, 9,0, 6,5, 6,5 Гц, 1H), 2,25 (dt, J=12,7, 7,9 Гц, 1H), 2,69-2,80 (m, 2H), 3,76 (br t, J=4,7 Гц, 1H), 4,21 (dd, J=7,6, 6,0 Гц, 1H), 4,57 (br s, 1H), 4,72 (br s, 1H), 4,80 (dt, J=10,5, 7,9 Гц, 1H), 6,50 (br s, 2H), 6,59 (d, J=3,5 Гц, 1H), 7,07 (br s, 2H), 7,12 (dd, J=8,2, 1,6 Гц, 1H), 7,29 (d, J=3,6 Гц, 1H), 7,34 (s, 1H), 7,58 (d, J=8,1 Гц, 1H), 8,07 (s, 1H), 8,31 (s, 1H).

Экспериментальные процедуры. Анализ *in vitro* (анализ 1a и 1b).

Реагенты.

Фермент PRMT5-MEP50 приобретали у Charles River (Argenta). Ферментный комплекс продуцировали в клетках насекомых (Sf9), инфицированных одновременно двумя бакуловирусами. Один вирус экспрессирует полноразмерный PRMT5 человека с Flag-меткой на N-конце, второй вирус экспрессирует полноразмерный MEP50 с сайтом расщепления His6-TEV на N-конце. Белок аффинно очищали с использованием частиц, покрытых антителом к Flag (M2), с последующим элюированием пептидом 3xFLAG, а затем His-Select, проводя элюирование 0,5М имидазолом. Элюированный белок затем подвергали диализу против трис-буферного солевого раствора (TBS) (pH 8,0), содержащего 20% глицерина и 3 мМ дитиотреитол (DTT).

Полноразмерный немеченый рекомбинантный гистон H2A человека (остатки 1-130, номер доступа в Genbank NM 021052, MW=14,1 кДа), экспрессируемый в *E. coli*, приобретали у Reaction Biology Corporation, № по кат. НМТ-11-146. Приобретали реагенты, используемые для получения реакционного буфера или буфера для остановки реакции, в том числе основание Tris (№ по кат. Sigma T-1503), NaCl (№ по кат. Sigma RGF-3270), MgCl₂ (№ по кат. Sigma M0250), DTT (№ по кат. Invitrogen 15508-013) и муравьиную кислоту (№ по кат. Riedel deHaen 33015).

Анализ на высокопроизводительном масс-спектрометре PRMT5 катализирует последовательные метилирования концевых атомов азота на гуанидиновых группах остатков аргинина в белках, используя субстратный кофактор S-аденозил-L-метионин (AdoMet, SAM), при этом образуется монометил (MMA), симметричный диметиларгинин (sDMA) и S-аденозил-L-гомоцистеин (AdoHcy, SAH). Ферментативную активность определяли после образования продукта SAH, используя высокопроизводительную масс-спектрометрию (система Agilent Rapidfire 300 с трехквadrupольным MS/MS Sciex 4000 серии QTrap®). Реакционный буфер представлял собой 20 мМ Tris-HCl, pH 8,5, 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ DTT. Реакцию останавливали с использованием 1% муравьиной кислоты (конечная концентрация).

Исследования ингибирования. Исследования в отношении IC₅₀ проводили с использованием одиннадцати точек доз, полученных для каждого соединения путем последовательного разведения 1:2 в диметилсульфоксиде (DMSO), причем точка 12 представляла собой DMSO в качестве контроля. Соединения сначала наносили на планшеты, и затем добавляли смесь растворов 2 мкМ SAM и 0,6 мкМ H2A (гистон H2A). Такой же объем ферментного раствора добавляли для инициации ферментативных реакций. Конечные концентрации реакционной смеси составляли 1 мкМ SAM, 0,3 мкМ H2A и 10 нМ фермента (анализ 1a) или 1,25 нМ фермента (анализ 1b). Реакционную смесь инкубировали при 30°C в течение 60 мин, если использовали 10 нМ фермента, и в течение 120 мин, если использовали 1,25 нМ фермента. Затем реакционную смесь гасили путем добавления муравьиной кислоты до конечной концентрации 1%. Значения ингибирования образования SAH в присутствии соединений рассчитывали как процент контроля относительно неингибированной реакционной смеси в зависимости от концентрации ингибитора. Данные подгоняли следующим образом:

$$Y = \text{Нижнее значение} + (\text{Верхнее значение} - \text{Нижнее значение}) / (1 + 10^{-(\log \text{IC}_{50} - X) \cdot h});$$

где IC₅₀ представляет собой концентрацию ингибитора (в тех же единицах, что и X) при 50% ингибировании, и h представляет собой угловой коэффициент Хилла. Y представляет собой процент ингибирования, X представляет собой log концентрации соединения. Нижнее значение и верхнее значение представляют собой значения для плато в тех же единицах, что и Y.

Значения pIC₅₀ в табл. 1 ниже представляют собой усредненные значения (№ соед. означает номер соединения).

Таблица 1

№ соед.	pIC ₅₀ , анализ 1a	pIC ₅₀ , анализ 1b
2	8,1	7,6
80	9,9	9,7

Пример 1. Активирующие мутации PIK3CA ассоциированы с восприимчивостью к ингибиторам PRMT5 при SCLC.

Профиль восприимчивости клеток к соединению 2 оценивали в отношении SCLC-субкатегории широкой панели клеточных линий рака легких. Удивительно, что некоторые из наиболее восприимчивых клеточных линий содержали разные мутации приобретения функции в гене PIK3CA, и они упомянуты в табл. 2. Активация сигнального пути PI3Kα (мутации с приобретением функции или стимуляция сигнального пути) в качестве опухолевого ответа на стандарт лечения (цисплатин) или даже на средства целенаправленного воздействия, такие как ингибиторы PARP последнего поколения, подразумевает решающую роль в процессе устойчивости, с чем может быть связана низкая общая выживаемость пациентов с SCLC после лечения.

Таблица 2

Клеточная линия	Мутация PIK3CA	Подтип гистологического образца	GI50
NCI-H1048	H1047R	SCLC	94,62 нМ
LU99a	T1025A	SCLC	128,53 нМ
H69V	G106_R108del	SCLC	85,62 нМ

Пример 2. Изменения сплайсосомы ассоциированы с восприимчивостью к ингибиторам PRMT5 при NSCLC.

Известно, что специфические в отношении рака явления сплайсинга инициируют развитие злокачественной опухоли, а также способствуют прогрессированию заболевания. К настоящему времени были описаны два белка, вовлеченные в сплайсинг, представляющие собой U2AF1 и RBM10, которые характеризуются разрегуляцией при NSCLC.

U2AF1, представляющий собой хорошо описанный фактор сплайсинга, содержит мутацию с приобретения функции типа "горячей точки" (S34F) у 3-8% пациентов с NSCLC. Недавно РНК-связывающий белок RBM10, также являющийся критическим для сборки сплайсосомы, классифицировали в качестве опухолевого супрессора, который инактивируется в результате мутаций потери функции, главным образом у пациентов с NSCLC (~8%), в анамнезе которых имеет место курение.

Sm белки, являющиеся критическими для сборки сплайсосом, были описаны как непосредственные субстраты PRMT5, и, таким образом, функция PRMT5 была связана с модулированием активности сплайсосом.

Поскольку мутация с приобретением функции S34F в U2AF1 была подтверждена в качестве онкогенной, небольшую панель всех коммерчески доступных клеточных линий NSCLC, содержащих мутацию S34F, собирали для анализа потенциальной синтетической летальной связи между U2AF1-S34F и ингибированием PRMT5.

Все (три из трех) клеточных линий NSCLC, которые содержат эту мутацию типа "горячей точки", являются пролиферационно-чувствительными к ингибитору PRMT5, представляющему собой соединение 2, см. табл. 3.

Таблица 3

Клеточная линия	Ген/мутация	Подтип гистологического образца	GI50
NCI-H441	U2AF1-S34F	Аденокарцинома	98,40 нМ
LC-2/ad	U2AF1-S34F	Аденокарцинома	116,08 нМ
HCC78	U2AF1-S34F	Аденокарцинома	107,65 нМ

Пример 3. Усиления сигнального пути циклина D1 ассоциированы с восприимчивостью к ингибиторам PRMT5 при NSCLC.

Усиление и/или повышенная экспрессия представителей семейства циклинов G1 была описана при многих видах рака, в том числе NSCLC. Наблюдали корреляцию между PRMT5 и экспрессией модуляторов клеточного цикла, в том числе циклина D1, CDK4 и CDK6, указывая на то, что PRMT5 может оказывать регуляторный эффект на G1-фазу. Анализ панели линий клеток легкого, обработанных соединением 2, выявил значительную ассоциацию между усилением (усилениями) циклина D1/CDK4/CDK6 и восприимчивостью к PRMT5i, указывая на то, что нарушения сигнального пути циклина могут быть использованы в качестве маркеров для отбора пациентов. В табл. 4 показано, что клеточные линии NSCLC, содержащие такое (такие) усиление (усиления) циклина D1/CDK4/CDK6 восприимчивы к обработке соединением 2.

Таблица 4

Клеточная линия	Аплифицированный ген	Подтип гистологического образца	GI50
EPIC272H	Циклин D1	Аденокарцинома	98,53 нМ
NCI-H226	CDK4	Аденокарцинома	204,52 нМ
HLC1	CDK6	Плоскоклеточная карцинома	96,39 нМ

Пример 4. Изменения сигнального пути WNT ассоциированы с восприимчивостью к ингибиторам PRMT5.

Клеточные линии, содержащие мутации в ключевых генах сигнального пути Wnt, в том числе β -

катенине и APC, характеризуются восприимчивостью к лечению PRMT5i, как показано в табл. 5.

Таблица 5

Клеточная линия	Ген/мутация	Подтип гистологического образца	GI50
A427	CTNNB1/T41A	Аденокарцинома	166,52 нМ
HCC15	CTNNB1/s45F, Y670*	Плоскоклеточная карцинома	266,07 нМ
LK2	APC/W685*, E1020K	Плоскоклеточная карцинома	114,53 нМ

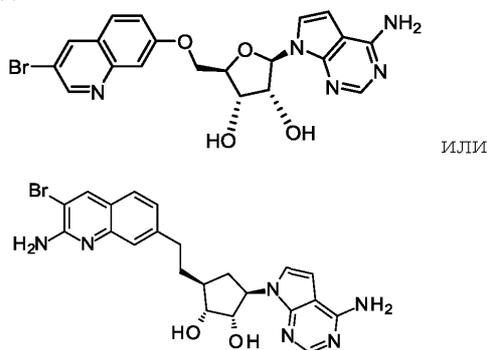
Примеры

Специалистам в данной области техники будет понятно, что многочисленные изменения и модификации могут быть выполнены в отношении предпочтительных вариантов осуществления, и что такие изменения и модификации могут быть выполнены без отклонения от сути настоящего изобретения. Таким образом, предусмотрено, что прилагаемая формула изобретения охватывает все такие эквивалентные вариации, которые находятся в пределах истинной сущности и объема настоящего изобретения.

Раскрытия каждого патента, заявки на патент и публикации, цитируемых или описываемых в данном документе, тем самым включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Способ идентификации пациента, который будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению ингибитором белковой аргинин-N-метилтрансферазы 5 (PRMT5), предусматривающий:
 - оценку биологического образца от пациента на наличие изменения сплайсосомы;
 - где наличие любого указанного изменения свидетельствует о более высокой вероятности того, что указанный пациент будет характеризоваться наличием восприимчивости к лечению указанным ингибитором PRMT5, чем при отсутствии любого указанного изменения;
 - где изменение сплайсосомы предусматривает мутацию S34F в гене U2AF1;
 - где ингибитор PRMT5 представляет собой



- Способ по п.1, где биологический образец предусматривает наличие изменения сплайсосомы, и у пациента имеется NSCLC.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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