

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047770**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.06

(21) Номер заявки
202091761

(22) Дата подачи заявки
2019.01.31

(51) Int. Cl. *A61K 31/155* (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

(31) 62/624,448

(32) 2018.01.31

(33) US

(43) 2020.12.14

(86) PCT/US2019/016148

(87) WO 2019/152711 2019.08.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЕСИФЕРА ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
Флинн Дэниел Л., Смит Брайан Д.,
Гупта Ану (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2013184119

US-A1-2015320759

F. JANKU ET AL.: "Pharmacokinetic-driven phase I study of DCC-2618 a pan-KIT and PDGFR inhibitor in patients (pts) with gastrointestinal stromal tumor (GIST) and other solid tumors", 53RD ANNU MEET AM SOC CLIN ONCOL (ASCO), 1 June 2017 (2017-06-01), pages 1-1, XP055577956, the whole document

WO-A1-2018222173

(57) Изобретение относится к применению 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или 1-(5-(7-амино-1-этил-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил)-4-бром-2-фторфенил)-3-фенилмочевины или их фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором МАРКАР-киназы для лечения видов рака, в том числе видов рака, опосредованных с-KIT, таких как GIST.

B1

047770

047770

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Изобретение испрашивает приоритет по заявке на патент США № 62/624448, поданной 31 января 2018 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Уровень техники

c-KIT (также известный как KIT, CD117 и рецептор фактора роста стволовых клеток) представляет собой трансмембранный белок-тирозинкиназу массой 145 кДа, который выполняет функцию рецептора III типа. Протоонкоген c-KIT, расположенный на хромосоме 4q11-21, кодирует рецептор c-KIT, лиганд которого представляет собой фактор роста стволовых клеток (SCF, стальной фактор, лиганд kit, фактор роста тучных клеток). Рецептор обладает активностью тирозиновой протеинкиназы, и связывание лиганда SCF приводит к аутофосфорилированию c-KIT и к его ассоциации с такими субстратами, как фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K). Фосфорилирование тирозина протеинтирозинкиназами является особенно важным в передаче сигнала в клетке и может опосредовать передачу сигналов для основных клеточных процессов, таких как пролиферация, выживаемость, дифференциация, апоптоз, прикрепление, инвазивность и миграция.

Роль экспрессии и активности c-KIT была исследована при гемобластозах и солидных опухолях, как, например, при острых лейкомиях и гастроинтестинальных стромальных опухолях (GIST). Большинство GIST характеризуются первичными активирующими мутациями в генах, кодирующих близкородственные RTK c-KIT (75-80% GIST) или PDGFR α (8% из GIST без мутации в c-KIT), и мутациями с приобретением функции в гене c-KIT, также при многих GIST выявляют экспрессию конститутивно фосфорилированного c-KIT. Большинство первичных мутаций c-KIT, приводящих к GIST, воздействуют на околомембранный (JM) участок белка, кодируемый экзоном 11, и они включают делеции или вставки внутри рамки считывания или миссенс-мутации (т.е. V560D). Мутации в экзоне 11 в c-KIT были идентифицированы в качестве первичных мутаций в примерно 65% случаев GIST. Такие мутации в домене JM нарушают механизм аутоингибирования киназы c-KIT, что приводит к конститутивной активности киназы и клеточно-трансформирующим событиям, обуславливающим GIST. Другие первичные мутации c-KIT, приводящие к GIST, располагаются в экзоне 9 (удвоение/вставка AY501-502, 8%), экзоне 13 (мутация, 1%) и экзоне 17 (мутация, 1%).

Клиническая значимость экспрессии c-KIT в злокачественных опухолях была продемонстрирована в исследованиях с применением Gleevec® (иматиниба мезилата, STI571 (ингибитора трансдукции сигнала под номером 571), Novartis Pharma AG, Базель, Швейцария), который специфически ингибирует тирозинкиназные рецепторы. Более того, клинически значимым прорывом стало обнаружение противоопухолевых эффектов этого соединения при GIST, группе опухолей, которая обычно считается резистентной к стандартной химиотерапии. Однако, несмотря на то, что основные ответы были отмечены после терапии первой линии, осуществляемой в отношении GIST с использованием Gleevec®, ингибитора c-KIT, и значительное число пациентов с метастатической и/или неоперабельной GIST получили пользу от лечения с использованием Gleevec®, полные ремиссии опухолей были редки и у приблизительно 50% пациентов возникал рецидив заболевания в течение двух лет после проведения лечения. Также сообщалось о том, что комбинация ингибитора c-KIT, иматиниба, и ингибитора MEK-киназы, MEK162, в результате приводила к повышенной супрессии роста *in vitro* и регрессии опухоли *in vivo* в различных линиях раковых клеток GIST по сравнению с лечением отдельным средством.

GIST наиболее часто становится резистентной к Gleevec® и низкомолекулярные средства терапии, целенаправленно воздействующие на молекулярном уровне, которые целенаправленно воздействуют на вторичные мутации c-KIT, остаются ненадежными. У пациентов с GIST, у которых происходит рецидив после лечения с помощью Gleevec® или Sutent®, имеется заболевание, которое, по-прежнему, контролируется мутациями c-KIT. Эти вторичные мутации возникают в тех же аллелях, где и первичная мутация JM-участка, и, таким образом, они представляют собой еще более агрессивные активированные формы c-KIT по сравнению с исходной первичной мутацией. Данные вторичные мутанты c-KIT, идентифицированные в GIST, приводят к приобретенной лекарственной резистентности. Вторичные мутации обнаружены в АТФ-связывающем кармане (экзон 13, т.е. K642E, V654A; экзон 14, т.е. T670I) и активационной петле (экзон 17, т.е. N822K, D816H, D816V, D820A; экзон 18 A829P). Об этих разнообразных вторичных мутациях c-KIT уже были сообщения. Сунитиниба малат (Sutent™, Pfizer) является ингибитором нескольких RTK, в частности, в данном контексте c-KIT и PDGFR α , и было показано, что он является эффективным в отношении определенных мутантных вариантов c-KIT, резистентных к иматинибу, таких как варианты с мутациями V654A и T670I в АТФ-связывающем кармане. Определенные мутантные варианты, резистентные к Gleevec®, также являются резистентными к сунитинибу, например D816H и D816V, которые располагаются в активационной петле каталитического домена c-KIT, кодируемой экзоном 17. Медианная выживаемость после прогрессирования, обусловленного резистентностью к Gleevec®, остается относительно короткой.

Было продемонстрировано, что у отдельных пациентов могут возникать и варьировать несколько комплексных вторичных мутаций c-KIT, при этом такая изменчивость мутационного статуса c-KIT демонстрировалась с помощью биоптатов, полученных из разных прогрессирующих метастазов у каждого

пациента. Комплексная мутационная неоднородность с-KIT у отдельных пациентов подчеркивает неудовлетворенную медицинскую потребность в идентификации ингибиторов киназы с-KIT, которые являлись бы эффективными в отношении широкого спектра первичных и вторичных мутаций с-KIT. Кроме того, существует необходимость в идентификации средств терапии, которые являются цитотоксическими или цитоцидными по отношению к GIST, опосредованных с-KIT, а не только цитостатическими, и которые в результате приводят к ремиссии заболевания и/или уменьшению частоты рецидива заболевания.

Краткое описание

Настоящее изобретение направлено на комбинацию соединения А, представляющего собой ингибитор с-KIT, или соединения В, представляющего собой ингибитор с-KIT, с ингибитором сигнального пути MAPKAP-киназы. В данном документе путь MAPKAP определяется как передача сигналов посредством $RAF \rightarrow DMEK \rightarrow ERK$ -киназа. Неожиданно было продемонстрировано, что комбинация соединения А или соединения В, представляющих собой ингибитор с-KIT, с ингибитором MEK, включающим траметиниб, ингибитором ERK, включающим уликсертиниб, или ингибитором RAF, включающим LY3009120, приводит к гибели клеток, апоптозу или длительной остановке роста клеток у клеток GIST, усиленной регрессии GIST-опухоли *in vivo* или ликвидации клеток GIST в анализах колониеобразования по сравнению с комбинацией иматиниба с ингибитором MEK или по сравнению с монотерапией соединением А, иматинибом или ингибитором MEK. Кроме того, было продемонстрировано, что комбинация соединения А, представляющего собой ингибитор с-KIT, с ингибитором MEK приводит к усилению гибели клеток или апоптоза и ликвидации линий раковых клеток GIST, которые резистентны к иматинибу в комбинации с ингибитором MEK. В исследованиях прорастания колоний в клетках GIST соединение А демонстрировало превосходный синергизм в комбинации с ингибитором MEK по сравнению с иматинибом в комбинации с ингибитором MEK. Настоящее изобретение частично относится к способам лечения опухолей у пациентов с применением соединения А, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Например, в настоящем изобретении описан способ лечения опухоли с одной или более мутациями с-KIT у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли, и эффективного количества ингибитора митоген-активируемой протеинкиназы (ингибитора MEK), и/или эффективного количества ингибитора киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ингибитора ERK).

В настоящем изобретении также представлен способ лечения солидной опухоли у пациента с резистентностью к иматинибу, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора MEK или ERK, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, глиобластомы, глиомы у детей, астроцитомы, саркомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) и меланомы.

В данном документе также рассматривается способ лечения гастроинтестинальной стромальной опухоли, резистентной к иматинибу, или меланомы, резистентной к иматинибу, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора MEK или ERK, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба.

В настоящем изобретении также представлен способ лечения солидной опухоли у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора MEK или ERK, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, глиобластомы, глиомы у детей, астроцитомы, саркомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) и меланомы.

В данном документе также рассматривается способ лечения гастроинтестинальной стромальной опухоли или меланомы у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора MEK или ERK, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба.

Кроме того, в данном документе рассматривается способ лечения солидной опухоли у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее

На фиг. 14А показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1, подсчитанных после различных обработок с помощью соединения А и ингибитора ERK, уликсертиниба, в течение 2 недель с последующим 10-дневным периодом восстановления.

На фиг. 14В показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/D816E, подсчитанных после различных обработок с помощью соединения А и уликсертиниба в течение 2 недель с последующим 10-дневным периодом восстановления.

На фиг. 14С показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/T670I, подсчитанных после различных обработок с помощью соединения А и уликсертиниба в течение 2 недель с последующим 10-дневным периодом восстановления. На правой верхней панели показаны репрезентативные культуральные чашки после дополнительных 10 дней восстановления.

На фиг. 15 показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/D816E, подсчитанных после различных обработок с помощью соединения В и уликсертиниба в течение 2 недель.

На фиг. 16А показаны графические представления активности каспаз после различных обработок с помощью соединения А и траметиниба в течение 48 ч в клетках GIST-T1, трансфицированных контрольным вектором или N-ras G12D.

На фиг. 16В показаны изображения репрезентативных культуральных чашек с колониями клеток GIST-T1, трансфицированных контрольным вектором (фиг. 16В.1) или N-ras G12D (фиг. 16В.2), после различных обработок с помощью соединения А, иматиниба и траметиниба и последующего 10-дневного периода восстановления.

На фиг. 16С показано графическое представление числа колоний клеток GIST-T1, трансфицированных контрольным вектором (фиг. 16С.1) или N-ras G12D (фиг. 16С.2), подсчитанных после различных обработок с помощью соединения А, иматиниба и траметиниба и последующего 10-дневного периода восстановления.

На фиг. 16D показаны изображения репрезентативных культуральных чашек с колониями клеток GIST-T1, трансфицированных N-ras G12D, после различных обработок с помощью соединения А и траметиниба и последующего 21-дневного периода восстановления.

На фиг. 17А приведены графические представления прорастания колоний клеток Ba/F3 V560D KIT с вторичными мутациями с-KIT в T670I, K807E или D816V или прорастания колоний клеток, сохраняющих только исходную мутацию с-KIT V560D и дополнительные механизмы резистентности, не обусловленные с-KIT, после насыщающего мутагенеза с последующими обработками отдельным средством - либо иматинибом (левая панель), либо соединением А (правая панель).

На фиг. 17В приведены графические представления прорастания колоний клеток Ba/F3 V560D KIT с вторичными мутациями с-KIT в T670I, K807E или D816V или прорастания колоний клеток, сохраняющих только исходную мутацию с-KIT V560D и дополнительные механизмы резистентности, не обусловленные с-KIT, после насыщающего мутагенеза с последующими обработками комбинациями - либо иматиниба с траметинибом (левая панель), либо соединением А с траметинибом (правая панель).

На фиг. 18А приведено графическое представление роста ксенотрансплантатной GIST-опухоли T1 после обработок отдельным средством, представляющим собой соединение А, отдельным средством, представляющим собой траметиниб, или комбинацией соединения А и траметиниба.

На фиг. 18В показано графическое представление фиг. 18А в увеличенном масштабе, на котором в лучшем разрешении показаны эффекты в отношении регрессии опухоли после обработок отдельным средством, представляющим собой соединение А, отдельным средством, представляющим собой траметиниб, или комбинацией соединения А и траметиниба.

Подробное описание

Было обнаружено, что комбинация 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины (соединения А) и ингибитора пути MAPKAP-киназы, например траметиниба, неожиданным образом действует синергически, что приводит к гибели клеток, апоптозу или длительной остановке роста клеток у клеток GIST, индуцированию ликвидации опухолевых клеток, индуцированию регрессии опухоли, уменьшению объема опухоли, подавлению возобновления роста опухоли, и/или приводит к повышенному уровню гибели клеток, апоптозу, остановке роста клеток или ликвидации линий раковых клеток GIST, которые резистентны к иматинибу в комбинации с ингибитором MEK, в прилагаемых примерах. Кроме того, способы комбинированной терапии, раскрытые в данном документе, по-видимому, проявляют цитотоксическое действие, а не только цитостатическое.

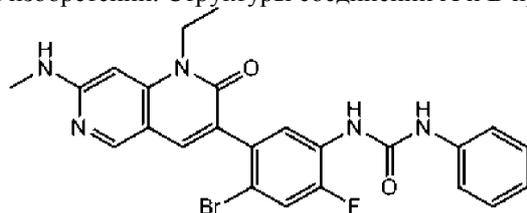
Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что многие ингибиторы с-KIT ингибируют только определенные мутантные формы с-KIT, как, например, показательную мутацию в экзоне 11, которая наблюдается при GIST. Другие мутантные формы с-KIT оказываются резистентными ко многим ингибиторам с-KIT, и они часто возникают в виде вторичных мутаций в экзонах 13, 14, 17 и 18, что делает опухоль резистентной к лечению ингибиторами с-KIT. В настоящем изобретении представлены способы лечения опухолей, например, с-KIT-опосредованных опухолей, таких как GIST, путем ингиби-

рования пути как с-KIT-киназы, так и MAPKAP-киназы с применением ингибитора с-KIT, описанного в данном документе в качестве соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли. Неожиданным образом соединение А и соединение В (и их фармацевтически приемлемые соли) действуют синергически с ингибитором MEK, ингибитором ERK или ингибитором RAF, что индуцирует гибель клеток, апоптоз или длительную остановку роста клеток GIST, индуцирует ликвидацию опухолевых клеток до предела обнаружения, уменьшает объем опухоли, ингибирует возобновление роста опухоли и/или приводит к повышенному уровню гибели клеток, апоптозу, остановке роста клеток или ликвидации до предела обнаружения линий раковых клеток GIST, которые резистентны к иматинибу в комбинации с ингибитором MAPKAP-киназы. Соединение А проявляет превосходную активность и синергизм в комбинации с ингибированием MEK по сравнению с иматинибом в комбинации с ингибированием MEK в клетках GIST, содержащих мутации с-KIT, приводящие к резистентности. Кроме того, по уровню активности и синергизма и показателю длительной остановки роста клеток в опухолевых клетках GIST или их ликвидации соединение А в комбинации с ингибированием MEK превосходит иматиниб в комбинации с ингибированием MEK даже в тех линиях клеток, которые, как известно, являются чувствительными к иматинибу. Опять же, без ограничения какой-либо конкретной теорией, полагают, что соединение А способно ингибировать более широкий спектр мутантных форм с-KIT, чем предыдущие ингибиторы с-KIT, в том числе иматиниб, в клетках GIST, возможно, посредством механизмов, которые включают ингибирование эффлюксных насосов лекарственных средств, включая эффлюксный насос BCRP, в опухолевых клетках, например в клетках GIST. Иматиниб является субстратом для эффлюксного насоса BCRP, который приводит к снижению внутриклеточных концентраций в опухолевых клетках, в которых присутствует этот эффлюксный насос (Eechoute, K, et al., Clin Cancer Res. 2015, 17, 406-15). Было продемонстрировано, что GIST-опухоли характеризуются избыточной экспрессией эффлюксного насоса BCRP в 93% (42/45) оцениваемых опухолей у пациентов с GIST (Feldman, R, et al., J Clin Oncol. 2015, 33, 58). Соединение А является сильным ингибитором эффлюксного транспортера BCRP, демонстрирующим значение IC_{50} , составляющее 40 нМ.

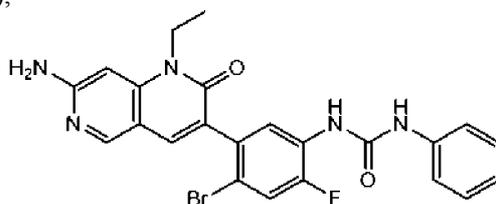
Соответственно, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы индуцирования длительной остановки роста опухолевых клеток, индуцирования гибели клеток, индуцирования апоптоза опухолевых клеток, индуцирования ликвидации опухолевых клеток, индуцирования регрессии опухоли, уменьшения объема опухоли, ингибирования возобновления роста опухоли или ингибирования роста резистентных опухолевых клеток, при этом способы предусматривают введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества (i) 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли или 1-(5-(7-амино-1-ЭТИЛ-2-ОКСО-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил)-4-бром-2-фторфенил)-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и (ii) ингибитора MAPKAP-киназы, например ингибитора MEK, траметиниба, биниметиниба или кобиметиниба; ингибитора ERK, уликсертиниба, или ингибитора RAR В конкретных вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, опухоль представляет собой солидную опухоль, опосредованную с-KIT, например GIST, опосредованную с-KIT, или меланому.

Определения.

Термин "соединения А и В", используемый в данном документе, относится к 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевине и 1-(5-(7-амино-1-этил-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил)-4-бром-2-фторфенил)-3-фенилмочевине соответственно. Фармацевтически приемлемые соли, таутомеры, гидраты и сольваты соединений А и В также предусмотрены в настоящем изобретении. Структуры соединений А и В представлены ниже:



1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевина (соединение А),



1-(5-(7-амино-1-этил-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил)-4-бром-2-фторфенил)-3-

фенилмочевина (соединение В).

Способы получения соединения А и соединения В раскрыты в US 8461179B1, содержание которого включено в данной документ посредством ссылки.

Далее описаны иллюстративные способы и материалы. В описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также включают множественное число, если контекст явно не указывает иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, в котором они обычно понимаются специалистом в данной области техники.

По всему данному изобретению различные патенты, заявки на выдачу патентов и публикации приведены в качестве ссылок. Раскрытия таких патентов, заявок на выдачу патентов и публикаций во всей их полноте включены в настоящее изобретение посредством ссылки для более полного описания уровня техники, известного специалистам в данной области техники на дату настоящего изобретения. Настоящее изобретение будет определяющим в случае, если имеется любое несоответствие между патентами, заявками на выдачу патентов и публикациями и настоящим изобретением.

Из соображений удобства определенные термины, используемые в описании, примерах и формуле изобретения, собраны в данной части. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют такие же значения, что и значения, которые обычно понимаются специалистом в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Первоначальное определение, предусмотренное для группы или термина, приведенных в настоящем изобретении, применимо к этой группе или термину по всему настоящему изобретению отдельно или в качестве части другой группы, если не указано иное.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество" включает без ограничения любой адъювант, носитель, вспомогательное вещество, вещество, способствующее скольжению, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/красящее вещество, интенсификатор вкуса и аромата, поверхностно-активное вещество, смачивающее средство, диспергирующее средство, суспендирующее средство, стабилизатор, изотоническое средство, растворитель или эмульгатор, который был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США как являющийся приемлемым для применения в отношении людей или домашних животных.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" включает соли присоединения кислоты.

Термин "фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты" относится к таким солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований, которые не являются нежелательными с биологической или иной точки зрения и которые образованы с неорганическими кислотами, такими как без ограничения хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т.п., и органическими кислотами, такими как без ограничения уксусная кислота, 2,2-дихлоруксусная кислота, адипиновая кислота, альгиновая кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, бензолсульфоновая кислота, бензойная кислота, 4-ацетамидобензойная кислота, камфорная кислота, камфор-10-сульфоновая кислота, каприновая кислота, капроновая кислота, каприловая кислота, угольная кислота, коричная кислота, лимонная кислота, цикламная кислота, додецилсерная кислота, этан-1,2-дисульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, муравьиная кислота, фумаровая кислота, галактаровая кислота, гентициновая кислота, глюкогептоновая кислота, глюконовая кислота, глюкуроновая кислота, глутаминовая кислота, глутаровая кислота, 2-оксо-глутаровая кислота, глицеринофосфорная кислота, гликолевая кислота, гиппуровая кислота, изомастная кислота, молочная кислота, лактобионовая кислота, лауриновая кислота, малеиновая кислота, яблочная кислота, малоновая кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, муциновая кислота, нафталин-1,5-дисульфоновая кислота, нафталин-2-сульфоновая кислота, 1-гидрокси-2-нафтойная кислота, никотиновая кислота, олеиновая кислота, оротовая кислота, щавелевая кислота, пальмитиновая кислота, памоевая кислота, пропионовая кислота, пироглутаминовая кислота, пировиноградная кислота, салициловая кислота, 4-аминосалициловая кислота, себадиновая кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, винная кислота, тиоциановая кислота, п-толуолсульфоновая кислота, трифторуксусная кислота, ундециленовая кислота и т.п.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к составу на основе соединения, описанного в данном документе (например, соединения А или его фармацевтически приемлемой соли), и среды, общепринятой в данной области техники, для доставки биологически активного соединения млекопитающим, например людям. Такая среда включает все фармацевтически приемлемые носители, разбавители или вспомогательные вещества, предназначенные для нее.

Субъекты или пациенты "нуждающиеся в лечении" с помощью комбинированной терапии по настоящему изобретению, например соединения А в комбинации с ингибитором МЕК, включают пациентов с заболеваниями и/или состояниями, которые можно лечить с помощью комбинации, раскрытой в данном документе, с достижением благоприятного терапевтического результата, например пациента с GIST. Благоприятный исход включает объективный ответ, повышение выживаемости без прогрессирования заболевания, повышение выживаемости, продление состояния стабилизации заболевания и/или

снижение тяжести симптомов или остановку в появления симптомов. В определенных вариантах осуществления пациент, нуждающийся в лечении, страдает от роста опухоли или прогрессирования опухоли; пациент страдает от без ограничения аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, глиобластомы, глиомы у детей, астроцитом, сарком, меланомы или гастроинтестинальных стромальных опухолей.

Термин "эффективное количество" при использовании в связи с соединением или другим терапевтическим средством, раскрытым в данном документе, относится к количеству терапевтического средства, например соединения А или ингибитора MEK, по отдельности или в комбинации, которое является применимым для лечения или предупреждения заболевания или нарушения. Эффективное количество терапевтических средств, используемых в комбинированной терапии, представляет собой количество каждого из терапевтических средств, которое является применимым для лечения или предупреждения заболевания или нарушения при использовании в комбинированной терапии, даже если количество одного из терапевтических средств или обоих в отсутствие другого терапевтического средства является неэффективным для лечения или предупреждения заболевания или нарушения. В определенных вариантах осуществления эффективное количество представляет собой количество, которое в результате приводит к длительной остановке роста клеток у клеток GIST, цитоцидному уничтожению клеток GIST, апоптозу клеток GIST, ликвидации клеток GIST, регрессии GIST, уменьшению объема GIST-опухоли, ингибированию рецидива GIST, и/или приводит к повышенной остановке роста клеток, гибели клеток, апоптозу или ликвидации до предела обнаружения линий раковых клеток GIST, которые резистентны к иматинибу в комбинации с ингибитором MEK, и/или приводит к благоприятному клиническому исходу состояния, которое лечат соединением, по сравнению с отсутствием лечения. "Эффективное количество" может варьировать в зависимости от способа введения, конкретной локализации заболевания или нарушения, а также возраста, веса тела и общего состояния здоровья субъекта. Количество вводимых соединений будет зависеть от степени, тяжести и типа заболевания или состояния, количества необходимого средства терапии и характеристик высвобождения фармацевтического (фармацевтических) состава (составов). Оно также будет зависеть от состояния здоровья, размерных параметров, веса, возраста, пола субъекта и переносимости лекарственных средств субъектом. Как правило, соединения вводят в течение достаточного периода времени для достижения требуемого терапевтического эффекта.

Термины "лечение", "лечить" и "проведение лечения" означают включение полного спектра вмешательства у пациентов с "раком" с целью индуцирования длительной остановки роста клеток у клеток GIST, индуцирования цитоцидного уничтожения клеток GIST, индуцирования апоптоза клеток GIST, индуцирования ликвидации опухолевых клеток GIST до предела визуального обнаружения при определении с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, вызова регрессии GIST-опухоли у пациента, уменьшения объема GIST-опухоли, ингибирования рецидива GIST и/или ингибирования роста резистентных клеток GIST при указанном лечении, как, например, проведение комбинированной терапии, раскрытой в данном документе, для ослабления, замедления или обратного развития одного или более симптомов и для индуцирования регрессии GIST, даже если GIST фактически не устранена. В некоторых вариантах осуществления лечение включает полное устранение заболевания или нарушения, например GIST. Проведение лечения может представлять собой способствование выздоровлению, улучшение состояния или по меньшей мере частичное уменьшение тяжести нарушения.

"Рак", как определено в данном документе, относится к новообразованию, которое обладает способностью внедряться в окружающие ткани, метастазировать (распространяться в другие органы) и которое в конечном итоге может привести к смерти пациента при отсутствии лечения. В определенных вариантах осуществления "рак" может представлять собой солидную опухоль.

Термин "опухоль", используемый в данном документе, относится к скоплению опухолевых клеток. Данный термин может относиться к доброкачественным (обычно безвредным) или злокачественным (раковым) новообразованиям. Злокачественное новообразование может возникать в плотном органе или костном мозге.

"Рост опухоли", как определено в данном документе, относится к росту скопления опухолевых клеток, вызванному геномными альтерациями в гене с-KIT, которые могут изменять экспрессию и/или активность белка с-KIT.

"Прогрессирование опухоли", как определено в данном документе, относится к росту существующей опухоли, зависимой от с-KIT, например GIST, где такой рост существующего скопления опухолевых клеток может быть вызван дополнительными геномными альтерациями в с-KIT, резистентном к лечению.

"Регрессия опухоли", "полный ответ" и "частичный ответ", определяемые в данном документе, относятся к уменьшению размера опухоли, определяемому по весу или объему согласно критериями RECIST 1.1 или Choi.

Ликвидацию существующей с-KIT-опосредованной опухоли, например с-KIT-опосредованной GIST, определяют как "полное цитоцидное уничтожение клеток" опухоли до предела визуального обнаружения при определении с помощью микроскопии с использованием 5× объектива для оценок *in vitro*,

или определяют как полный ответ при определении согласно критериям RECIST 1.1 или Choi для доклинических или клинических оценок *in vivo* без возможности рецидива опухоли в доклинических или клинических условиях. Соответственно, "ликвидация с-KIT-опосредованной опухоли" означает, что все клетки с-KIT-опосредованной опухоли уничтожены или удалены до предела обнаружения без возможности рецидива с-KIT-опосредованной опухоли.

Выражение "возобновление роста опухоли", используемое в данном документе, относится к росту опухоли, рост которой ранее остановился или которая регрессировала после лечения, например лечения с помощью Gleevec® или Sutent®. В определенных вариантах осуществления возобновление роста опухоли возникает вследствие возникновения вторичной мутации с-Kit в опухолевой клетке. В других вариантах осуществления возобновление роста опухоли возникает вследствие активации или мутации разных сигнальных путей, включая без ограничения активацию сигнального пути MAPKAP, который включает передачу сигнала посредством MEK-киназы.

Выражение "остановка роста клетки", используемое в данном документе, относится к клеткам, прекратившим деление и остающимся в нерепликативном состоянии покоя.

Термин "апоптоз", используемый в данном документе, относится к запрограммированной гибели клеток. Признаки апоптоза, выявляемые с помощью гистологических и гистохимических методик, включают сжатие клеток; повышенную проницаемость мембран; конденсацию ядра и цитоплазмы; эндолитическое расщепление ядерной ДНК на олигонуклеосомные фрагменты; и в конечном итоге формирование апоптотических тел, которые поглощаются и удаляются макрофагами. Апоптоз в основном опосредуется каспазами, которые являются аспартат-специфичными сериновыми протеазами. Апоптоз может быть индуцирован посредством внутреннего генетического программирования в ответ на различные условия, например повреждение ДНК или устранение фактора роста, или апоптоз может быть вызван внешними факторами, такими как повреждение клеточной ДНК излучением и некоторыми цитотоксическими средствами, используемыми для лечения рака. Его можно подавлять встречающимися в природе факторами (например, цитокинами) и некоторыми лекарственными средствами (например, ингибиторами протеаз). В злокачественных клетках апоптоз, как правило, не происходит или он нарушен. В конкретных вариантах осуществления апоптоз относится к запрограммированной гибели клеток, которая определяется по повышению содержания расщепленных и активированных каспазы 3 и каспазы 7.

"Комбинированная терапия" представляет собой лечение, которое включает введение пациенту двух или более терапевтических средств, например соединения А и ингибитора MEK. Два или более терапевтических средства могут доставляться в одно и то же время, например в отдельных фармацевтических композициях или в одной и той же фармацевтической композиции, или они могут доставляться в разные моменты времени. Например, они могут доставляться одновременно или в течение перекрывающихся периодов времени, и/или одно терапевтическое средство может доставляться перед доставкой другого терапевтического (терапевтических) средства (средств) или после нее. Лечение с помощью комбинации ингибитора KIT, такого как соединение А, и ингибитора MEK необязательно включает лечение с помощью любого отдельного средства с предшествующим или последующим периодом одновременного лечения с помощью обоих средств. Однако предполагается, что в течение некоторого периода времени эффективные количества двух или более терапевтических средств присутствуют в организме пациента.

"Ингибитор пути MAPKAP" представляет собой ингибитор сигнального пути MAP-киназы. Ингибиторы данного пути включают ингибиторы RAS, ингибиторы RAF (например, дабрафениб, вемурафениб, LY3009120), ингибиторы MEK (например, траметиниб, биниметиниб, кобиметиниб) и ингибиторы ERK (например, уликсертиниб). Термины "ингибитор пути MAPKAP" и "ингибитор MAPKAP-киназы" используются в данном документе взаимозаменяемо.

Способы лечения.

Соединения и композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения опухолей у нуждающегося в этом пациента. Например, в данном документе представлен способ лечения опухоли с одной или более мутациями с-KIT у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и эффективного количества одного или более ингибиторов MAPKAP-киназы. В одном варианте осуществления ингибитор MAPKAP-киназы выбран из группы, состоящей из ингибитора митоген-активируемой протеинкиназы (ингибитора MEK) и эффективного количества ингибитора киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ингибитора ERK).

Мутация с-KIT может быть первичной мутацией в экзоне 9, экзоне 11, экзоне 13 или экзоне 17 гена с-KIT. В другом варианте осуществления мутация с-KIT представляет собой делеционную мутацию.

Кроме того, в опухоли могут присутствовать одна или более вторичных мутаций гена с-KIT, приводящих к резистентности. В некоторых вариантах осуществления вторичная мутация, приводящая к резистентности, расположена в экзоне 13, экзоне 14, экзоне 17 или экзоне 18 гена с-KIT. В некоторых вариантах осуществления вторичная мутация, приводящая к резистентности, расположена в экзоне 17 гена с-KIT. В некоторых вариантах осуществления вторичная мутация, приводящая к резистентности, пред-

ставляет собой замену аспарагиновой кислоты в кодоне 816 или замену аспарагина в кодоне 822. В некоторых вариантах осуществления вторичная мутация, приводящая к резистентности, представляет собой одну из D816V, D816E, D816H, D820A, T670I или N822V. В некоторых вариантах осуществления приобретение вторичной мутации, приводящей к резистентности, произошло после предыдущего введения пациенту иматиниба, сунитиниба или регорафениба или их фармацевтически приемлемой соли.

Такой раскрытый способ дополнительно предусматривает определение того, присутствует ли в опухоли вторичная мутация с-KIT. В некоторых вариантах осуществления определение того, присутствует ли в опухоли вторичная мутация с-KIT, предусматривает идентифицирование мутаций в ДНК, выделенной из образца опухоли. В некоторых вариантах осуществления определение того, присутствует ли в опухоли вторичная мутация с-KIT, предусматривает идентифицирование мутаций в циркулирующей опухолевой ДНК. В другом варианте осуществления опухоль была резистентной к лечению с помощью иматиниба мезилата, сунитиниба малата или регорафениба.

Кроме того, опухоль может быть выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, глиобластомы, глиомы у детей, астроцитомы, саркомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) и меланомы. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой GIST.

Способ может дополнительно предусматривать введение пациенту средства таргетной противораковой терапии, биологического средства таргетной противораковой терапии, ингибитора контрольных точек иммунного ответа и/или химиотерапевтического средства. Способ также может дополнительно предусматривать введение субъекту ингибитора RAF.

В другом варианте осуществления 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевину или ее фармацевтически приемлемую соль и ингибитор MAPKAP-киназы вводят по сути одновременно или последовательно.

В данном раскрытом способе ингибитор MEK может быть выбран из группы, состоящей из траметиниба, селуметиниба, кобиметиниба и биниметиниба. В некоторых вариантах осуществления ингибитор MEK представляет собой биниметиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор MEK представляет собой траметиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ERK выбран из группы, состоящей из уликсертиниба, SCH772984 и LY3214996.

Введение в течение двух недель или более в соответствии с таким раскрытым способом может в результате приводить к тому, что у пациента происходит частичное уменьшение объема опухоли, составляющее по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления лечение в результате приводит к полному уменьшению объема опухоли.

Раскрытый способ может дополнительно предусматривать определение того, содержат ли опухоль или опухолевые клетки первичную мутацию гена с-KIT. В некоторых вариантах осуществления первичная мутация расположена в экзоне 11 гена с-KIT. В некоторых вариантах осуществления первичная мутация расположена в экзоне 9 гена с-KIT. В некоторых вариантах осуществления первичная мутация представляет собой делеционную мутацию. В некоторых вариантах осуществления первичная мутация представляет собой V560D. В других вариантах осуществления присутствуют одна или более дополнительных вторичных мутаций с-KIT.

В настоящем изобретении также представлен способ лечения солидной опухоли у пациента с резистентностью к иматинибу, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора MAPKAP-киназы, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, глиобластомы, глиомы у детей, астроцитомы, саркомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) и меланомы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает введение ингибитора RAR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор RAF представляет собой ингибитор всех изоформ RAR.

В данном документе также представлен способ лечения гастроинтестинальной стромальной опухоли, резистентной к иматинибу, или меланомы, резистентной к иматинибу, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора MAPKAP-киназы, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает определение того, присутствует ли в опухоли мутация гена с-KIT. В некоторых вариантах осуществления мутация расположена в экзоне 17 гена с-KIT. В некоторых вариантах осуществления вторичная мутация с-KIT представляет собой замену аспарагиновой кислоты в кодоне 816 или замену аспарагина в кодоне 822. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой одну из D816V, D816E, D816H, D820A, T670I или N822V.

Кроме того, представлен способ лечения солидной опухоли у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора RAF.

В таком раскрытом способе солидная опухоль может быть выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, GIST и меланомы. В некоторых вариантах осуществления в солидной опухоли присутствуют одна или более мутаций гена с-KIT.

Кроме того, ингибитор RAF может представлять собой ингибитор всех изоформ RAR. В другом варианте осуществления ингибитором RAF является дабрафениб, вемурафениб или LY3009120.

В настоящем изобретении также представлен способ лечения солидной опухоли у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора MAPKAP-киназы, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, глиобластомы, глиомы у детей, астроцитомы, саркомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) и меланомы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает введение ингибитора RAR. В некоторых вариантах осуществления ингибитором RAF представляет собой ингибитор всех изоформ RAR.

В данном документе также представлен способ лечения гастроинтестинальной стромальной опухоли или меланомы у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества 1-[4-бром-5-[1-этил-7-(метиламино)-2-оксо-1,2-дигидро-1,6-нафтиридин-3-ил]-2-фторфенил]-3-фенилмочевины или ее фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора MAPKAP-киназы, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба и уликсертиниба.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает определение того, присутствует ли в опухоли мутация гена с-KIT. В некоторых вариантах осуществления мутация расположена в экзоне 17 гена с-KIT. В некоторых вариантах осуществления вторичная мутация с-KIT представляет собой замену аспарагиновой кислоты в кодоне 816 или замену аспарагина в кодоне 822. В некоторых вариантах осуществления мутация представляет собой одну из D816V, D816E, D816H, D820A, T670I или N822V.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения представлены способы лечения или предупреждения опухоли у пациента, необязательно с-KIT-опосредованной опухоли, например GIST, предусматривающие введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения А или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством ингибитора MEK, например траметиниба. В одном родственном варианте осуществления настоящего изобретения представлены способы лечения или предупреждения опухоли у пациента, необязательно с-KIT-опосредованной опухоли, например GIST, предусматривающие введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством ингибитора MEK, например траметиниба.

В конкретных вариантах осуществления данные способы включают способы индуцирования длительной остановки роста опухолевых клеток, например клеток GIST; уничтожения опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирования апоптоза опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирования ликвидации опухолевых клеток до предела обнаружения, например клеток GIST; индуцирования регрессии опухоли, например регрессии GIST; уменьшения объема опухоли, например объема GIST-опухоли; ингибирования возобновления роста опухоли, например возобновления роста GIST. В другом конкретном варианте осуществления данные способы включают способы индуцирования длительной остановки роста опухолевых клеток, например клеток GIST. В другом конкретном варианте осуществления данные способы включают способы уничтожения опухолевых клеток, например клеток GIST. В другом конкретном варианте осуществления данные способы включают способы индуцирования апоптоза опухолевых клеток, например клеток GIST. В другом конкретном варианте осуществления данные способы включают способы, предназначенные для индуцирования ликвидации опухолевых клеток до предела обнаружения, например клеток GIST. В другом конкретном варианте осуществления данные способы включают способы индуцирования регрессии опухоли, например регрессии GIST. В другом конкретном варианте осуществления данные способы включают способы уменьшения объема опухоли, например объема GIST-опухоли. В другом конкретном варианте осуществления данные способы включают способы ингибирования возобновления роста опухоли, например возобновления роста GIST. В другом конкретном варианте осуществления данные способы включают способы ингибирования роста опухолевых клеток, резистентных к лекарственному средству, например клеток GIST, резистентных к лекарственному средству. В определенных вариантах осуществления способы охватывают способы ликвидации у субъекта опухоли, например GIST, до предела обнаружения. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, рост опухоли или прогрессирование опухоли у па-

циента вызвано сверхэкспрессией с-KIT, конститутивным фосфорилированием с-KIT, повышенной активностью с-KIT, онкогенными миссенс-мутациями с-KIT, онкогенными делеционными мутациями с-KIT, онкогенными дупликациями/вставками нуклеотидов, онкогенными перегруппировками гена с-KIT, приводящими к образованию слитых с-KIT белков, внутригенными делециями со сдвигом рамки с-KIT и/или онкогенной амплификацией гена с-KIT. В одном варианте осуществления рост опухоли или прогрессирование опухоли обусловлены конститутивным фосфорилированием с-KIT. В конкретных вариантах осуществления в опухоли имеются одна или более из первичных активирующих мутаций с-KIT и/или вторичных мутаций с-KIT, раскрытых в данном документе. В другом конкретном варианте осуществления в опухоли имеются одна или более мутаций в генах, отличных от с-KIT, которые приводят к росту опухоли посредством передачи сигнала через путь MAPKAP, включающий активацию RAF-, MEK- или ERK-киназы.

Если способы, описанные в данном документе, относятся к лечению соединением А или его фармацевтически приемлемой солью или соединением В или его фармацевтически приемлемой солью, то подразумевается, что требуется только одно из соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли. Однако следует понимать, что данные способы охватывают введение пациенту как соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, так и соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором MEK, ингибитором ERK или ингибитором RAF. Кроме того, следует понимать, что при введении соединения А в комбинации с ингибитором MEK, ингибитором ERK или ингибитором RAF субъекту некоторое количество соединения А подвергается метаболизму *in vivo* до соединения В, и что *in vivo* смесь соединения А и соединения В также можно использовать для эффективного лечения субъекта в комбинации с ингибитором MEK, ингибитором ERK или ингибитором RAF.

Иллюстративные ингибиторы MEK, которые можно применять в соответствии с раскрытыми способами и композициями, включают без ограничения траметиниб, селуметиниб, кобиметиниб и биниметиниб.

Иллюстративные ингибиторы ERK, которые можно применять в соответствии с раскрытыми способами и композициями, включают без ограничения уликсертиниб, SCH772984, LY3214996, равоксертиниб и VX-11e.

Иллюстративные ингибиторы RAF, которые можно применять в соответствии с раскрытыми способами и композициями, включают без ограничения LY3009120, дабрафениб и вемурафениб.

В одном варианте осуществления соединение А или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор MEK, например траметиниб, вводят пациенту с с-KIT-опосредованной опухолью, например GIST. В другом варианте осуществления соединение В или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор MEK, например траметиниб, вводят пациенту с с-KIT-опосредованной опухолью, например GIST.

В родственном варианте осуществления соединение А или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор MEK, например траметиниб, вводят пациенту с опухолью, например пациенту, имеющему GIST, при этом рост опухоли или прогрессирование опухоли обусловлены первичной активирующей мутацией с-KIT и/или вторичной мутацией с-KIT. В другом варианте осуществления соединение В или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор MEK, например траметиниб, вводят пациенту с опухолью, например пациенту, имеющему GIST, при этом рост опухоли или прогрессирование опухоли обусловлены первичной активирующей мутацией с-KIT и/или вторичной мутацией с-KIT. В определенных вариантах осуществления первичная активирующая мутация с-KIT представляет собой мутацию в экзоне 11 (например, делецию 57 пары оснований в экзоне 11). В определенных вариантах осуществления первичная активирующая мутация с-KIT представляет собой удвоение А-У 502-503 в экзоне 9. В определенных вариантах осуществления первичная активирующая мутация с-KIT представляет собой мутацию в экзоне 13. В определенных вариантах осуществления первичная активирующая мутация с-KIT представляет собой мутацию в экзоне 17. В определенных вариантах осуществления вторичная мутация с-KIT является любой раскрытой в данном документе мутацией, приводящей к резистентности, например мутацией T670I или мутацией D816E. В определенных вариантах осуществления у субъекта одновременно существуют несколько вторичных мутаций с-KIT, приводящих к резистентности.

В определенных вариантах осуществления соединение А или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор MEK, например траметиниб, вводят пациенту, страдающему от рака. В определенных вариантах осуществления соединение В или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор MEK, например траметиниб, вводят пациенту, страдающему от рака. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, опухоль или рак представляет собой аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого, глиобластому, глиому у детей, астроцитому, саркому, меланому или гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST). В одном варианте осуществления рак представляет собой меланому. В другом варианте осуществления опухоль или рак представляет собой гастроинтестинальную стромальную опухоль (GIST). В конкретных вариантах осуществления любого из данных способов опухоль или рак представляет собой рак, опосредованный с-KIT, например GIST или меланому, опосредованные с-KIT.

Лечение соединением А или его фармацевтически приемлемой солью или соединением В или его фармацевтически приемлемой солью в комбинации с ингибитором МЕК, например траметинибом, включает введение соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или фармацевтически приемлемой соли до, после, одновременно с или в течение периода времени, перекрывающегося с введением ингибитора МЕК. Понятно, что эффективное количество любого из соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, соединения В или его фармацевтически приемлемой соли или ингибитора МЕК, например траметиниба, может отличаться в случае использования в комбинациях, раскрытых в данном документе, по сравнению с тем случаем, когда любое из данных средств используют по отдельности для той же цели, например для лечения или предупреждения опухоли. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли является более низким количеством в случае введения в виде комбинированной терапии с ингибитором МЕК, например траметинибом, по сравнению с таковым в случае введения в виде монотерапии, например, для лечения или предупреждения GIST. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество ингибитора МЕК, например траметиниба, является более низким количеством в случае введения в составе комбинированной терапии с соединением А или его фармацевтически приемлемой солью или в случае введения в составе комбинированной терапии с соединением В или его фармацевтически приемлемой солью, например, для лечения или предупреждения GIST.

Любой из способов, раскрытых в данном документе, может дополнительно включать определение того, что в опухоли, подвергаемой лечению, имеются одна или более мутаций гена с-KIT. Такое определение можно осуществить с помощью обычных способов определения наличия мутации в гене в биологическом образце, например образце опухоли, образце крови или образце плазмы крови, полученных от пациента. Кроме того, такое определение можно осуществить посредством обзора результатов исследований, проведенных для определения наличия одной или более мутаций в гене с-KIT в биологическом образце, например образце опухоли, образце крови или образце плазмы крови, полученных от пациента. В определенных вариантах осуществления любого из способов, раскрытых в данном документе, способы осуществляют в отношении пациентов, у которых опухоль была идентифицирована как содержащая одну или более мутаций в гене с-KIT. Мутации в гене с-KIT включают без ограничения любую из конкретно описанных в данном документе.

В различных аспектах любого из способов, раскрытых в данном документе, лечение либо соединением А или его фармацевтически приемлемой солью, либо соединением В или его фармацевтически приемлемой солью в комбинации с ингибитором МЕК, например траметинибом, индуцирует длительную остановку роста клеток у опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует уничтожение опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует апоптоз опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует ликвидацию опухолевых клеток до предела обнаружения, например клеток GIST; индуцирует регрессию опухоли, например GIST-опухоли; уменьшает вес или объем опухоли, например GIST-опухоли; ингибирует возобновление роста опухоли, например GIST-опухоли. В другом аспекте любого из способов, раскрытых в данном документе, лечение либо с помощью соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо с помощью соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором МЕК, например траметинибом, индуцирует длительную остановку роста клеток у опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует уничтожение опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует апоптоз опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует ликвидацию опухолевых клеток до предела обнаружения, например клеток GIST; индуцирует регрессию опухоли, например GIST-опухоли; уменьшает вес или объем опухоли, например GIST-опухоли; ингибирует возобновление роста опухоли, например GIST-опухоли, в случае опухоли, резистентной к лекарственному средству, например GIST, резистентной к лекарственному средству. В другом аспекте любого из способов, раскрытых в данном документе, лечение либо с помощью соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо с помощью соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором МЕК, например траметинибом, обеспечивает ликвидацию опухоли до предела обнаружения у пациента, находящегося на лечении, например пациента с GIST. Способы измерения или определения числовых показателей остановки роста опухолевых клеток, гибели опухолевых клеток, апоптоза опухолевых клеток, регрессии опухоли, веса или объема опухоли, возобновления роста опухоли, роста резистентных опухолевых клеток и ликвидации опухолей известны из уровня техники и включают любые способы, описанные в данном документе.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора МЕК, например траметиниба, в результате приводит к повышению числового показателя остановки роста опухолевых клеток, уничтожения опухолевых клеток или апоптоза опухолевых клеток, например клеток GIST, по сравнению с числовым показателем остановки роста, уничтожения клеток или апоптоза опухолевых клеток того же типа или опухоли того же типа либо без лечения, либо при лечении с помощью только ингибитора МЕК, например траметиниба, или только с помощью ингибитора с-KIT, например иматиниба, или с помощью комбинации ингибитора МЕК, например траметиниба, с ингибито-

ром с-KIT, представляющим собой иматиниб. Например, уровень остановки роста клеток, уничтожения или апоптоза клеток можно повысить по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в 10 раз или по меньшей мере в 20 раз. В определенных вариантах осуществления числовые показатели апоптоза определяют путем измерения активности каспаз опухолевых клеток.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора MEK, например траметиниба, в результате приводит к повышению уровня регрессии опухоли или уменьшению размера или объема опухоли (например, GIST) по сравнению с размером, например весом или объемом, опухоли того же типа или такой же опухоли либо без лечения, либо при лечении с помощью только ингибитора MEK, например траметиниба, или с помощью только ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, вес или объем опухоли можно уменьшить по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора MEK, например траметиниба, обеспечивает ингибирование в отношении числового показателя роста или возобновления роста опухоли, например роста или возобновления роста GIST, в большей степени по сравнению с числовым показателем роста или возобновления роста опухоли того же типа или такой же опухоли либо без лечения, либо при лечении с помощью только ингибитора MEK, например траметиниба, или с помощью только ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, уровень роста или возобновления роста опухоли можно ингибировать на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора MEK, например траметиниба, ингибирует рост резистентных опухолевых клеток, например резистентных клеток GIST, в большей степени по сравнению с числовым показателем роста резистентных опухолевых клеток того же типа или такой же опухоли либо без лечения, либо при лечении только с помощью ингибитора MEK, например траметиниба, или только с помощью ингибитора с-KIT, например иматиниба, или с помощью комбинации ингибитора MEK, например траметиниба, и ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, можно обеспечить ингибирование в отношении числового показателя роста или числа резистентных опухолевых клеток на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%. В конкретных вариантах осуществления резистентные опухолевые клетки являются резистентными к лечению с помощью ингибитора с-KIT, например иматиниба, и/или ингибитора MEK, например траметиниба. В определенных вариантах осуществления резистентные опухолевые клетки содержат вторичную мутацию с-KIT. В определенных вариантах осуществления вторичная мутация с-KIT представляет собой мутацию любого из следующих аминокислотных остатков с-KIT: V654, N655, T670, L783, D816, D820, N822, Y823, A829 и/или T847, включая без ограничения любую из замен аминокислот, изображенных на прилагаемых фигурах. В конкретных вариантах осуществления резистентные опухолевые клетки содержат элементы активированного пути киназы MAPKAP, и в определенных вариантах осуществления они характеризуются мутацией в гене RAS, например гене N-RAS или K-RAS, гене рецептора фактора роста фибробластов (FGFR) и/или гене нейрофибромина-1 (NF1). В определенных вариантах осуществления мутация представляет собой мутацию G12D в N-RAS.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации либо соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором MEK, например траметинибом, в результате приводит к ликвидации опухоли, например GIST, до предела обнаружения. В конкретных вариантах осуществления ликвидация опухоли означает, что у пациента больше нет выявляемой опухоли до предела обнаружения. В конкретных вариантах осуществления у пациента нет выявляемой опухоли в течение по меньшей мере шести месяцев, по меньшей мере одного года, по меньшей мере двух лет, по меньшей мере пяти лет или по меньшей мере 10 лет после ликвидации опухоли, например GIST, с помощью комбинированной терапии, раскрытой в данном документе. Ликвидацию опухоли можно определить с помощью фотонной эмиссионной томографии (PET), сканограмм СТ, по отсутствию циркулирующей внеклеточной ДНК (cfDNA), содержащей мутацию с-KIT, отсутствию циркулирующих опухолевых клеток (СТС), присутствующих в сосудистой системе субъекта, или отсутствию биомаркера раковой клетки в циркулирующей крови сосудистой системы субъекта.

В различных аспектах любого из способов, раскрытых в данном документе, лечение либо с помо-

стью соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо с помощью соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором ERK, например уликсертинибом, индуцирует длительную остановку роста клеток у опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует уничтожение опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует апоптоз опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует ликвидацию опухолевых клеток до предела обнаружения, например клеток GIST; индуцирует регрессию опухоли, например GIST-опухоли; уменьшает вес или объем опухоли, например, GIST-опухоли; ингибирует возобновление роста опухоли, например, GIST-опухоли. В другом аспекте любого из способов, раскрытых в данном документе, лечение либо с помощью соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо с помощью соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором ERK, например уликсертинибом, индуцирует длительную остановку роста клеток у опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует уничтожение опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует апоптоз опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует ликвидацию опухолевых клеток до предела обнаружения, например клеток GIST; индуцирует регрессию опухоли, например GIST-опухоли; уменьшает вес или объем опухоли, например GIST-опухоли; ингибирует возобновление роста опухоли, например GIST-опухоли, в случае опухоли, резистентной к лекарственному средству, например GIST, резистентной к лекарственному средству. В другом аспекте любого из способов, раскрытых в данном документе, лечение либо с помощью соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо с помощью соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором ERK, например уликсертинибом, обеспечивает ликвидацию опухоли до предела обнаружения у пациента, находящегося на лечении, например пациента с GIST. Способы измерения или определения числовых показателей остановки роста опухолевых клеток, гибели опухолевых клеток, апоптоза опухолевых клеток, регрессии опухоли, веса или объема опухоли, возобновления роста опухоли, роста резистентных опухолевых клеток и ликвидации опухолей известны из уровня техники и включают любые способы, описанные в данном документе.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора ERK, например уликсертиниба, в результате приводит к повышению числового показателя остановки роста опухолевых клеток, уничтожения опухолевых клеток или апоптоза опухолевых клеток, например, клеток GIST, по сравнению с числовым показателем остановки роста, уничтожения клеток или апоптоза опухолевых клеток того же типа или опухоли того же типа либо без лечения, либо при лечении с помощью только ингибитора ERK, например, уликсертиниба, или только с помощью ингибитора с-KIT, например, иматиниба или с помощью комбинации ингибитора ERK, например, уликсертиниба с ингибитором с-KIT иматинибом. Например, уровень остановки роста клеток, уничтожения или апоптоза клеток можно повысить по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в 10 раз или по меньшей мере в 20 раз. В определенных вариантах осуществления числовые показатели апоптоза определяют путем измерения активности каспаз опухолевых клеток.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора ERK, например уликсертиниба, в результате приводит к повышению уровня регрессии опухоли или уменьшению размера или объема опухоли (например, GIST) по сравнению с размером, например весом или объемом, опухоли того же типа или такой же опухоли либо без лечения, либо при лечении с помощью только ингибитора ERK, например уликсертиниба, или с помощью только ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, вес или объем опухоли можно уменьшить по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора ERK, например уликсертиниба, обеспечивает ингибирование в отношении числового показателя роста или возобновления роста опухоли, например роста или возобновления роста GIST, в большей степени по сравнению с числовым показателем роста или возобновления роста опухоли того же типа или такой же опухоли либо без лечения, либо при лечении с помощью только ингибитора ERK, например уликсертиниба, или с помощью только ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, уровень роста или возобновления роста опухоли можно ингибировать на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора ERK, например уликсертиниба, ингибирует рост резистентных опухолевых клеток, например, резистентных клеток GIST, в большей степени по сравнению с числовым показателем роста резистент-

ных опухолевых клеток того же типа или такой же опухоли либо без лечения, либо при лечении только с помощью ингибитора ERK, например уликсертиниба, или только с помощью ингибитора с-KIT, например иматиниба, или с помощью комбинации ингибитора ERK, например уликсертиниба, и ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, можно обеспечить ингибирование в отношении числового показателя роста или числа резистентных опухолевых клеток на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%. В конкретных вариантах осуществления резистентные опухолевые клетки являются резистентными к лечению с помощью ингибитора с-KIT, например иматиниба, и/или ингибитора ERK, например уликсертиниба. В определенных вариантах осуществления резистентные опухолевые клетки содержат вторичную мутацию с-KIT. В определенных вариантах осуществления вторичная мутация с-KIT представляет собой мутацию любого из следующих аминокислотных остатков с-KIT: V654, N655, T670, L783, D816, D820, N822, Y823, A829 и/или T847, включая без ограничения любую из замен аминокислот, изображенных на прилагаемых фигурах. В конкретных вариантах осуществления резистентные опухолевые клетки содержат компоненты активированного пути киназы MAPKAP, и в определенных вариантах осуществления они характеризуются мутацией в гене RAS, например гене N-RAS или K-RAS, гене рецептора фактора роста фибробластов (FGFR) и/или гене нейрофибромина A (NF1). В определенных вариантах осуществления мутация представляет собой мутацию G12D в N-RAS.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации либо соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором ERK, например уликсертинибом, в результате приводит к ликвидации опухоли, например GIST, до предела обнаружения. В конкретных вариантах осуществления ликвидация опухоли означает, что у пациента больше нет выявляемой опухоли до предела обнаружения. В конкретных вариантах осуществления у пациента нет выявляемой опухоли в течение по меньшей мере шести месяцев, по меньшей мере одного года, по меньшей мере двух лет, по меньшей мере пяти лет или по меньшей мере 10 лет после ликвидации опухоли, например GIST, с помощью комбинированной терапии, раскрытой в данном документе. Ликвидацию опухоли можно определить с помощью фотонной эмиссионной томографии (PET), сканограмм СТ, по отсутствию циркулирующей внеклеточной ДНК (cfDNA), содержащей мутацию с-KIT, отсутствию циркулирующих опухолевых клеток (CTC), присутствующих в сосудистой системе субъекта, или отсутствию биомаркера раковой клетки в циркулирующей крови сосудистой системы субъекта.

В различных аспектах любого из способов, раскрытых в данном документе, лечение либо с помощью соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо с помощью соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором RAF, например дабрафенибом, индуцирует длительную остановку роста клеток у опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует уничтожение опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует апоптоз опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует ликвидацию опухолевых клеток до предела обнаружения, например клеток GIST; индуцирует регрессию опухоли, например GIST-опухоли; уменьшает вес или объем опухоли, например GIST-опухоли; ингибирует возобновление роста опухоли, например GIST-опухоли. В другом аспекте любого из способов, раскрытых в данном документе, лечение с помощью либо соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором RAF, например дабрафенибом, индуцирует длительную остановку роста клеток у опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует уничтожение опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует апоптоз опухолевых клеток, например клеток GIST; индуцирует ликвидацию опухолевых клеток до предела обнаружения, например клеток GIST; индуцирует регрессию опухоли, например GIST-опухоли; уменьшает вес или объем опухоли, например GIST-опухоли; ингибирует возобновление роста опухоли, например GIST-опухоли, в случае опухоли, резистентной к лекарственному средству, например GIST, резистентной к лекарственному средству. В другом аспекте любого из способов, раскрытых в данном документе, лечение либо с помощью соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо с помощью соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором RAF, например дабрафенибом, обеспечивает ликвидацию опухоли до предела обнаружения у пациента, находящегося на лечении, например пациента с GIST. Способы измерения или определения числовых показателей остановки роста опухолевых клеток, гибели опухолевых клеток, апоптоза опухолевых клеток, регрессии опухоли, веса или объема опухоли, возобновления роста опухоли, роста резистентных опухолевых клеток и ликвидации опухолей известны из уровня техники и включают любые способы, описанные в данном документе.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора RAF, например дабрафениба, в результате приводит к повышению числового показателя остановки роста опухолевых клеток, уничтожения опухолевых клеток или апоптоза опухолевых клеток, например клеток GIST, по сравнению с числовым показателем остановки роста, уничтожения клеток или апоптоза опухолевых клеток того же типа или опухоли того же типа либо без лечения, либо при лечении

с помощью только ингибитора RAF, например дабрафениба, или только с помощью ингибитора с-KIT, например иматиниба, или с помощью комбинации ингибитора RAF, например дабрафениба и ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, уровень остановки роста клеток, уничтожения или апоптоза клеток можно повысить по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в 10 раз или по меньшей мере в 20 раз. В определенных вариантах осуществления числовые показатели апоптоза определяют путем измерения активности каспаз опухолевых клеток.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора RAF, например дабрафениба, в результате приводит к повышению уровня регрессии опухоли или уменьшению размера или объема опухоли (например, GIST) по сравнению с размером, например весом или объемом, опухоли того же типа или такой же опухоли либо без лечения, либо при лечении с помощью только ингибитора RAF, например дабрафениба, или с помощью только ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, вес или объем опухоли можно уменьшить по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора RAF, например дабрафениба, обеспечивает ингибирование в отношении числового показателя роста или возобновления роста опухоли, например роста или возобновления роста GIST, в большей степени по сравнению с числовым показателем роста или возобновления роста опухоли того же типа или такой же опухоли либо без лечения, либо при лечении только с помощью ингибитора RAF, например дабрафениба, или только с помощью ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, уровень роста или возобновления роста опухоли можно ингибировать на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации соединения А или его фармацевтически приемлемой соли или соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора RAF, например дабрафениба, ингибирует рост резистентных опухолевых клеток, например резистентных клеток GIST, в большей степени по сравнению с числовым показателем роста резистентных опухолевых клеток того же типа или такой же опухоли либо без лечения, либо при лечении только с помощью ингибитора RAF, например дабрафениба, или только с помощью ингибитора с-KIT, например иматиниба, или с помощью комбинации ингибитора RAF, например дабрафениба, и ингибитора с-KIT, например иматиниба. Например, можно обеспечить ингибирование в отношении числового показателя роста или числа резистентных опухолевых клеток на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%. В конкретных вариантах осуществления резистентные опухолевые клетки являются резистентными к лечению с помощью ингибитора с-KIT, например иматиниба, и/или ингибитора RAF, например дабрафениба. В определенных вариантах осуществления резистентные опухолевые клетки содержат вторичную мутацию с-KIT. В определенных вариантах осуществления вторичная мутация с-KIT представляет собой мутацию любого из следующих аминокислотных остатков с-KIT: V654, N655, T670, L783, D816, D820, N822, Y823, A829 и/или T847, включая без ограничения любую из замен аминокислот, изображенных на прилагаемых фигурах. В конкретных вариантах осуществления резистентные опухолевые клетки содержат компоненты активированного пути киназы MAPKAP, и в определенных вариантах осуществления они характеризуются мутацией в гене RAS, например гене N-RAS или K-RAS, гене рецептора фактора роста фибробластов (FGFR) и/или гене нейрофибромина-1 (NF1). В определенных вариантах осуществления мутация представляет собой мутацию G12D в N-RAS.

В конкретных вариантах осуществления лечение с помощью комбинации либо соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо соединения В или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором RAF, например дабрафенибом, в результате приводит к ликвидации опухоли, например GIST, до предела обнаружения. В конкретных вариантах осуществления ликвидация опухоли означает, что у пациента больше нет выявляемой опухоли до предела обнаружения. В конкретных вариантах осуществления у пациента нет выявляемой опухоли в течение по меньшей мере шести месяцев, по меньшей мере одного года, по меньшей мере двух лет, по меньшей мере пяти лет или по меньшей мере 10 лет после ликвидации опухоли, например GIST, с помощью комбинированной терапии, раскрытой в данном документе. Ликвидацию опухоли можно определить с помощью фотонной эмиссионной томографии (PET), сканограмм СТ, по отсутствию циркулирующей внеклеточной ДНК (cfDNA), содержащей мутацию с-KIT, отсутствию циркулирующих опухолевых клеток (CTC), присутствующих в сосудистой системе субъекта, или отсутствию биомаркера раковой клетки в циркулирующей крови сосудистой сис-

темы субъекта.

В настоящем изобретении описаны виды комбинированной терапии, которые включают введение либо соединения А или его фармацевтически приемлемой соли, либо соединения В или его фармацевтически приемлемой соли и одного или более ингибиторов MAPKAP-киназы, например ингибитора MEK, ингибитора ERK или ингибитора RAF. Виды комбинированной терапии, описанные в данном документе, можно применять по отдельности или кроме того в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами (например, одним или более дополнительными терапевтическими средствами, описанными ниже). Например, либо соединение А или его фармацевтически приемлемую соль, либо соединение В или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор MEK можно вводить совместно со средством таргетной противораковой терапии, биологическим средством таргетной противораковой терапии, ингибитором контрольных точек иммунного ответа или химиотерапевтическим средством. В другом варианте осуществления соединение А или соединение В и ингибитор MEK вводят без какого-либо другого терапевтического средства. В случае комбинированной терапии терапевтические средства можно вводить вместе с другим терапевтическим средством, описанным в данном документе, или последовательно с ним.

Эффекта комбинированной терапии можно достичь путем введения двух или более средств, каждое из которых составлено и вводится по отдельности, или путем введения двух или более средств в одном составе. Другие комбинации также охватываются комбинированной терапией. Хотя два или более средств в комбинированной терапии можно вводить одновременно, это не является обязательным. Например, введение первого средства (или комбинации средств) может предшествовать введению второго средства (или комбинации средств) на минуты, часы, дни или недели. Таким образом, два или более средств можно вводить с интервалом нескольких минут друг от друга или с интервалом 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 или 24 ч друг от друга, или с интервалом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 дней друг от друга, или с интервалом 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или недель друг от друга. В некоторых случаях возможны еще более длительные интервалы. Хотя во многих случаях желательно, чтобы два или более средств, применяемых в комбинированной терапии, присутствовали в организме пациента в одно и то же время, это не является обязательным.

Комбинированная терапия также может предусматривать два или более введений одного или более из средств, применяемых в комбинации с использованием разного порядка введения составных средств. Например, если средство X и средство Y применяют в комбинации, то их можно вводить последовательно в любой комбинации один или более раз, например в порядке X-Y-X, X-X-Y, Y-X-Y, Y-Y-X, X-X-Y-Y и т.д.

Одно или более дополнительных терапевтических средств, которые можно вводить в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничения цитотоксические средства, цисплатин, доксорубин, этопозид, иринотекан, топотекан, паклитаксел, доцетаксел, эпотилоны, тамоксифен, 5-фторурацил, метотрексат, темозоломид, циклофосфамид, лонафарниб, типифарниб, 4-((5-((3-хлорфенил)-3-оксопиперазин-1-ил)метил)-1H-имидазол-1-ил)метил)бензонитрила гидрохлорид, (R)-1-((1H-имидазол-5-ил)метил)-3-бензил-4-(тиофен-2-илсульфонил)-2,3,4,5-тетрагидро-1H-бензодиазепин-7-карбонитрил, цетуксимаб, иматиниб, интерферон альфа-2b, пегилированный интерферон альфа-2b, комбинации с ароматазой, гемцитабин, урамустин, хлорметин, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилентиофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабинфосфат, лейковорин, оксалиплатин, пентостатин, винбластин, винкристин, виндезин, блеомицин, дактиномицин, даунорубин, эпирубицин, идарубицин, митрамицин, дезоксикоформицин, митомицин-С, L-аспарагиназу, тенипозид, 17 α -этинилэстрадиол, диэтилстильбэстрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестрола ацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, 17 α -гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамустин, медроксипрогестерона ацетат, лейпролида ацетат, флутамид, торемифена цитрат, гозерелина ацетат, карбоплатин, гидроксимочевину, амсакрин, прокарбазин, митотан, митоксантрон, левамизол, винорелбин, анастрозол, летрозол, капецитабин, ралоксифен, дролоксафин, гексаметилмеламин, бевацизумаб, трастузумаб, тозитумаб, бортезомиб, ибритумаб тиуксетан, триоксид мышьяка, порфирин натрия, цетуксимаб, тиоптепу, алтретамин, фулвестрант, эксеместан, ритуксимаб, алемтузумаб, дексаметазон, бикалутамид, хлорамбуцил и валрубицин.

Одно или более дополнительных терапевтических средств, которые можно вводить, могут включать без ограничения ингибитор АКТ, алкилирующее средство, политрансретиноевую кислоту, антиандроген, азацитидин, ингибитор BCL2, ингибитор BCL-XL, ингибитор BCR-ABL, ингибитор BTK, ингибитор BTK/LCK/LYN, ингибитор CDK1/2/4/6/7/9, ингибитор CDK4/6, ингибитор CDK9, ингибитор CBP/p300, ингибитор EGFR, антагонист рецептора эндотелина, ингибитор RAF, ингибитор MEK, ингибитор ERK, ингибитор фарнезилтрансферазы, ингибитор FLT3, агонист глюкокортикоидного рецептора, ингибитор HDM2, ингибитор гистондеацетилазы, ингибитор IKK β , иммуномодулирующее лекарственное средство (IMiD), ингенол, ингибитор ITK, ингибитор JAK1/JAK2/JAK3/TYK2, ингибитор MTOR,

ингибитор киназы PI3, двойной ингибитор киназы PI3/MTOR, ингибитор протеасомы, агонист протеинкиназы C, ингибитора SUV39H1, TRAIL, ингибитор VEGFR2, ингибитор пути передачи сигнала Wnt/р-катенин, децитабин и моноклональное антитело к CD20.

В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммуномодулирующее средство, выбранное из группы, состоящей из ингибиторов CTLA4, таких как без ограничения ипилимумаб и тремелиумаб; ингибиторов PD1, таких как без ограничения пембролизумаб и ниволумаб; ингибиторов PDL1, таких как без ограничения атезолизумаб (ранее MPDL3280A), дурвалумаб (ранее MEDI4736), авелумаб, PDR001; ингибиторов 4 1BB или лиганда 4 1BB, таких как без ограничения урелумаб и PF-05082566; агонистов лиганда OX40, таких как без ограничения MEDI6469; средств на основе GITR, таких как без ограничения TRX518; ингибиторов CD27, таких как без ограничения варлилумаб; ингибиторов TNFRSF25 или TL1A; агонистов CD40, таких как без ограничения CP-870893; ингибиторов HVEM, или LIGHT, или LTA, или BTLA, или CD160; ингибиторов LAG3, таких как без ограничения BMS-986016; ингибиторов TIM3; ингибиторов Siglecs; агонистов ICOS или лиганда ICOS; ингибиторов B7 H3, таких как без ограничения MGA271; ингибиторов B7 H4; ингибиторов VISTA; ингибиторов HHLA2 или TMIGD2; ингибиторов бутирофилинов, включая ингибиторы BTNL2; ингибиторов CD244 или CD48; ингибиторов представителей семейства TIGIT и PVR; ингибиторов KIR, таких как без ограничения лирилумаб; ингибиторов ILT и LIR; ингибиторов NKG2D и NKG2A, таких как без ограничения IPH2201; ингибиторов MICA и MICB; ингибиторов CD244; ингибиторов CSF1R, таких как без ограничения эмактузумаб, кабирализумаб, пексидартиниб, ARRY382, BLZ945; ингибиторов IDO, таких как без ограничения INCB024360; талидомида, леналидомида, ингибиторов TGFP, таких как без ограничения галунизертиб; ингибиторов аденозина или CD39, или CD73; ингибиторов CXCR4 или CXCL12, таких как без ограничения улокуплумаб и (3S,6S,9S,12R,17R,20S,23S,26S,29S,34aS)-N-((S)-1-амино-5-гуанидино-1-оксопентан-2-ил)-26,29-бис(4-аминобутил)-17-((S)-2-((S)-2-((S)-2-(4-фторбензамидо)-5-гуанидинопентанамидо)-5-гуанидинопентанамидо)-3-(нафталин-2-ил)пропанамидо)-6-(3-гуанидинопропил)-3,20-бис(4-гидроксibenзил)-1,4,7,10,18,21,24,27,30-нонаоксо-9,23-бис(3-уреидо-пропил)триаконтагидро-1H,16H-пирроло[2,1-p][1,2]дитиа[5,8,11,14,17,20,23,26,29]нонаазациклодотриаконтин-12-карбоксамидо BKT140; ингибиторов фосфатидилсерина, таких как без ограничения бавитуксимаб; ингибиторов SIRPA или CD47, таких как без ограничения CC-90002; ингибиторов VEGF, таких как без ограничения бевализумаб; и ингибиторов нейропилина, таких как без ограничения MNRP1685A.

Фармацевтические композиции.

Аспекты настоящего описания направлены на способы лечения, включающие введение комбинации соединений, раскрытых в данном документе, или одной или более фармацевтических композиций, содержащих такие соединения и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель. В конкретных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают введение первой фармацевтической композиции, содержащей либо соединение А, либо его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель, и второй фармацевтической композиции, содержащей ингибитор MEK, например траметиниб, ингибитор ERK, например уликсертиниб, ингибитор RAF, например LY3009120, или их фармацевтически приемлемые соли и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель. В конкретных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают введение первой фармацевтической композиции, содержащей соединение В или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель, и второй фармацевтической композиции, содержащей ингибитор MEK, например траметиниб, ингибитор ERK, например уликсертиниб, ингибитор RAF, например LY3009120, или их фармацевтически приемлемые соли и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель. В конкретных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают введение фармацевтической композиции, содержащей соединение А или его фармацевтически приемлемую соль, ингибитор MEK, например траметиниб, и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель. В конкретных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают введение фармацевтической композиции, содержащей соединение В или его фармацевтически приемлемую соль, ингибитор MEK, например траметиниб, и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель.

В конкретных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают введение фармацевтической композиции, содержащей соединение А или его фармацевтически приемлемую соль, ингибитор ERK, например уликсертиниб, и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель. В конкретных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают введение фармацевтической композиции, содержащей соединение В или его фармацевтически приемлемую соль, ингибитор ERK, например уликсертиниб, и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель.

В конкретных вариантах осуществления способы, раскрытые в данном документе, включают введение фармацевтической композиции, содержащей соединение А или его фармацевтически приемлемую соль, ингибитор RAF, например LY3009120, и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомога-

тельное вещество или носитель. В конкретных вариантах осуществления, способы, раскрытые в данном документе, включают введение фармацевтической композиции, содержащей соединение В или его фармацевтически приемлемую соль, ингибитор RAF, например LY3001290, и фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное вещество или носитель.

При применении фармацевтических композиций на основе соединений, описанных в данном документе, фармацевтически приемлемые носители могут быть либо твердыми, либо жидкими. Твердые формы включают порошки, таблетки, диспергируемые гранулы, капсулы, крахмальные капсулы и суппозитории. Порошки и таблетки могут содержать от приблизительно 5 до приблизительно 95 процентов активного ингредиента. Подходящие твердые носители известны из уровня техники, например, карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар или лактоза. Таблетки, порошки, крахмальные капсулы и капсулы можно использовать в виде твердых лекарственных форм, подходящих для перорального введения. Примеры фармацевтически приемлемых носителей и способов получения различных композиций можно найти в A. Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е издание, (1990), Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии. Например, водные растворы или растворы на основе воды и пропиленгликоля для парентеральной инъекции или добавление подсластителей и замутнителей для пероральных растворов, суспензий и эмульсий. Препараты в жидкой форме могут также включать растворы для интраназального введения.

Жидкие, в частности инъекционные, композиции можно, например, получать путем растворения, диспергирования и т.д. Например, раскрытое соединение растворяют в фармацевтически приемлемом растворителе, таком как, например, вода, солевой раствор, водный раствор декстрозы, глицерин, этанол и т.п., или смешивают с ним с получением, таким образом, инъекционного изотонического раствора или суспензии. Для солюбилизации раскрытых соединений можно применять белки, такие как альбумин, частицы, представляющие собой хиломикроны, или белки сыворотки крови.

Парентеральное введение с помощью инъекции, как правило, применяют для подкожных, внутримышечных или внутривенных инъекций и инфузий. Инъекционные препараты можно получать в виде стандартных форм - либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий или твердых форм, подходящих для растворения в жидкости перед инъекцией.

Также можно применять аэрозольные препараты, подходящие для ингаляции. Данные препараты могут включать растворы и твердые вещества в форме порошка, которые могут быть в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, таким как инертный сжатый газ, например азот.

Также предполагается применение препаратов в твердой форме, которые предназначены для превращения незадолго до применения в препараты в жидкой форме либо для перорального, либо для парентерального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии.

Дозировка.

В некоторых вариантах осуществления, где по протоколу лечения соединение А или соединение В (или их фармацевтически приемлемые соли) применяют в комбинации с ингибитором MEK (например, траметинибом), два терапевтических средства можно вводить вместе или по "двойной схеме", где два терапевтических средства дозируют и вводят по отдельности. Если соединение А или В (или их фармацевтически приемлемые соли) и ингибитор MEK дозируют по отдельности, типичная дозировка соединения А или соединения В (или их фармацевтически приемлемых солей), вводимых субъекту, нуждающемуся в лечении, обычно составляет от приблизительно 5 мг в сутки до приблизительно 5000 мг в сутки и в других вариантах осуществления от приблизительно 50 мг в сутки до приблизительно 1000 мг в сутки. Другие дозировки могут составлять от приблизительно 10 ммоль до приблизительно 250 ммоль в сутки, от приблизительно 20 ммоль до приблизительно 70 ммоль в сутки или даже от приблизительно 30 ммоль до приблизительно 60 ммоль в сутки. Количества раскрытых соединений в эффективной дозировке при использовании для получения указанных эффектов находятся в диапазоне от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 5000 мг раскрытого соединения, необходимого для лечения состояния. Композиции для применения *in vivo* или *in vitro* могут содержать приблизительно 0,5, 5, 20, 50, 75, 100, 150, 250, 500, 750, 1000, 1250, 2500, 3500 или 5000 мг раскрытого соединения или в диапазоне от одного значения количества до другого значения количества в перечне доз. Типичная рекомендуемая схема суточной дозировки для перорального введения может варьировать от приблизительно 1 до приблизительно 500 мг/сутки или от 1 до 200 мг/сутки в виде одной дозы или от двух до четырех разделенных доз. В одном варианте осуществления суточная доза по обычной схеме составляет 150 мг.

В определенных вариантах осуществления дозировка ингибиторов MEK соответствует ранее раскрытым дозировкам и/или дозировкам, одобренным для применения Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами. В других вариантах осуществления дозировка ингибитора MEK меньше предварительного одобренных дозировок, например составляет приблизительно 20%, приблизительно 50% или приблизительно 80% от утвержденной дозировки. В определенных вариантах осуществления дозировка траметиниба составляет приблизительно от 0,5 до 20 мг в сутки перорально, например приблизительно 1 мг в сутки или приблизительно 2 мг в сутки. В определенных вариантах осуществления дозировка кобиметиниба составляет приблизительно от 10 до 200 мг в сутки, например

приблизительно 30 мг или приблизительно 60 мг в сутки. В определенных вариантах осуществления дозировка биниметиниба составляет от приблизительно 10 мг до приблизительно 200 мг два раза в сутки, например приблизительно 25 мг или приблизительно 45 мг два раза в сутки. В определенных вариантах осуществления дозировка селуметиниба составляет приблизительно от 10 до 200 мг в сутки, например приблизительно 30 мг или приблизительно 75 мг два раза в сутки.

Количество и частоту введения соединений, описанных в данном документе, и/или их фармацевтически приемлемых солей и других терапевтических средств регулируют в соответствии с решением лечащего врача с учетом таких факторов, как возраст, состояние и размерные параметры пациента, а также тяжесть симптомов, подлежащих лечению.

Соединения по настоящему изобретению (например, соединение А или соединение В (и его фармацевтически приемлемые соли), ингибиторы МЕК и другие терапевтические средства) можно вводить любым подходящим способом. Соединения можно вводить перорально (например, с пищей) в капсулах, суспензиях, таблетках, пилюлях, драже, жидкостях, гелях, сиропах, взвесьях и т.п. Способы инкапсуляции композиций (такие как в покрытие из твердого желатина или циклодекстрана) известны из уровня техники (Baker, et al., "Controlled Release of Biological Active Agents", John Wiley and Sons, 1986, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Соединения можно вводить субъекту в сочетании с приемлемым фармацевтическим носителем в качестве части фармацевтической композиции. Состав фармацевтической композиции будет варьировать в соответствии с выбранным способом введения. Подходящие фармацевтические носители могут содержать инертные ингредиенты, которые не взаимодействуют с соединением. Носители являются биологически совместимыми, т.е. нетоксичными, не вызывающими воспаление, неиммуногенными и не имеют других нежелательных реакций в месте введения.

Иллюстративные фармацевтические композиции представляют собой таблетки и желатиновые капсулы, содержащие соединение, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, такой как а) разбавитель, например очищенная вода, триглицеридные масла, такие как гидрогенизированное или частично гидрогенизированное растительное масло или их смеси, кукурузное масло, оливковое масло, масло подсолнечника, сафлоровое масло, виды рыбьего жира, такие как EPA или DHA или их сложные эфиры, или триглицериды, или их смеси, омега-3 жирные кислоты или их производные, лактоза, декстроза, сахароза, маннит, сорбит, целлюлоза, натрий, сахарин, глюкоза и/или глицин; b) смазывающее вещество, например диоксид кремния, тальк, стеариновая кислота, ее соли магния или кальция, олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и/или полиэтиленгликоль; для таблеток также c) связующее вещество, например алюмосиликат магния, крахмальная паста, желатин, трагакант, метилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза, карбонат магния, природные сахара, такие как глюкоза или бета-лактоза, сахаристые вещества из кукурузы, природные и синтетические камеди, такие как аравийская камедь, трагакант или альгинат натрия, воски и/или поливинилпирролидон, при необходимости; d) разрыхлитель, например виды крахмала, агар, метилцеллюлоза, бентонит, ксантановая камедь, альгиновая кислота или ее натриевая соль или шипучие смеси; e) абсорбент, красящее вещество, ароматизатор и подсластитель; f) эмульгатор или диспергирующее средство, такое как Tween 80, лабразол, HPMC, DOSS, капроил 909, лабрафак, лабрафил, пецеол, транскутол, капмул MCM, капмул PG-12, каптекс 355, гелюцир, витамин E TGPS или другой приемлемый эмульгатор; и/или g) средство, которое усиливает абсорбцию соединения, такое как циклодекстрин, гидроксипропилциклодекстрин, PEG400, PEG200.

При составлении в виде фиксированной дозы в таких комбинированных продуктах применяют соединения, описанные в данном документе, в диапазоне дозировок, описанном в данном документе или известном специалистам в данной области.

Поскольку соединения, описанные в данном документе (например, соединения А и В и ингибиторы МАРКАР-киназы, включая ингибиторы МЕК), предназначены для применения в фармацевтических композициях, специалистам в данной области техники будет понятно, что они могут быть обеспечены в практически чистых формах, например чистых по меньшей мере на 60%, чистых по меньшей мере на 75%, чистых по меньшей мере на 85% и чистых по меньшей мере на 98% вес./вес. Фармацевтический препарат может находиться в стандартной лекарственной форме. В такой форме препарат разделяют на однократные дозы подходящего размера, содержащие подходящие количества соединений А или В, например эффективное количество для достижения необходимой цели, описанной в данном документе.

Примеры

Было обнаружено, что обработка клеток с-KIT-опосредованной опухоли либо комбинацией соединения А, либо его фармацевтически приемлемой солью в комбинации с ингибитором МЕК, или ингибитором ERK, или ингибитором RAF неожиданно и синергически индуцирует апоптоз опухолевых клеток. Кроме того, данная комбинированная терапия предупреждает рост опухолевых клеток, в том числе опухолевых клеток, имеющих вторичную мутацию, придающую резистентность к другим ингибиторам с-KIT и/или ингибиторам МЕК, ERK или RAF. Кроме того, комбинированная терапия, раскрытая в данном документе, по-видимому, оказывала длительный эффект в отношении остановки роста опухолевых клеток, в отличие от быстрого возобновления роста опухоли при отсутствии комбинированного лечения

лекарственным средством. Кроме того, комбинированная терапия, раскрытая в данном документе, по-видимому, оказывала цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток, а не только цитостатический эффект. Кроме того, комбинированная терапия, раскрытая в данном документе, по-видимому, обеспечивала ликвидацию опухолевых клеток GIST до предела обнаружения, при этом прорастание колоний опухолевых клеток после отмены комбинированной терапии, предусматривающей периоды восстановления без применения лекарственных средств, составляющие не более 21 дня, не наблюдалось. Определение характеристик данного неожиданного открытия было осуществлено в биохимических анализах и клеточных анализах, включая описанные в данном документе.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует истолковывать как ограничивающие настоящее изобретение в объеме или сущности до конкретных процедур, описанных в данном документе. Следует понимать, что примеры приведены для иллюстрации определенных вариантов осуществления и что тем самым не подразумевается ограничение объема настоящего изобретения. Следует также понимать, что можно прибегнуть к различным другим вариантам осуществления, модификациям и их эквивалентам, которые могут быть предложены специалистам в данной области техники без отступления от сущности настоящего изобретения и/или объема прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Комбинированная обработка соединением А с траметинибом индуцирует апоптоз в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и в резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Провели исследование, которое продемонстрировало, что комбинированная обработка с помощью соединения А и траметиниба индуцировала апоптоз в чувствительных к иматинибу клетках GIST-T1 (деция 57 п. о. в экзоне 11), резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1 /T670I). Анализы проводили в 96-луночных планшетах с посевом 10000 клеток GIST-T1, GIST-T1/D816E или GIST-T1/T670I на лунку. Клетки обрабатывали контролем со средой-носителем, соединением А, траметинибом или их комбинациями при различных концентрациях и обеспечивали рост клеток в течение 24 и 48 при наличии обработок лекарственным средством. Апоптоз оценивали путем измерения активности каспаз 3/7.

На фиг. 1А и 1С показаны графические представления, показывающие относительную долю в процентах активности каспаз (по сравнению с контролем со средой-носителем, взятым за 100%), определенную для различных обработок клеток GIST-T1. На фиг. 1В и 1D показаны матричные диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, основанные на методе с показателем аддитивности (CI), описанном Chou и Talalay (1984) и компьютерном программном обеспечении от Chou и Martin (2005). $CI < 1$ указывает на синергизм, $CI = 1$ указывает на аддитивный эффект, и $CI > 1$ указывает на антагонизм. Комбинированные обработки в течение 24 ч (фиг. 1А, В) и 48 ч (фиг. 1С, D) соединением А и траметинибом показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза в клетках GIST-T1.

На фиг. 1Е показано графическое представление, показывающее активность каспаз при различных обработках резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E. На фиг. 1F показаны матричная диаграмма синергизма и график, построенный на основе показателя аддитивности, основанные на методе с показателем аддитивности (CI), описанном Chou и Talalay (1984) и компьютерном программном обеспечении от Chou и Martin (2005). $CI < 1$ указывает на синергизм, $CI = 1$ указывает на аддитивный эффект, и $CI > 1$ указывает на антагонизм. Комбинированные обработки в течение 24 ч соединением А и траметинибом показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/ D816E.

На фиг. 1G показано графическое представление, показывающее активность каспаз при различных обработках резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I. На фиг. 1H показаны матричная диаграмма синергизма и график, построенный на основе показателя аддитивности, основанные на методе с показателем аддитивности (CI), описанном Chou и Talalay (1984), и компьютерном программном обеспечении от Chou и Martin (2005). $CI < 1$ указывает на синергизм, $CI = 1$ указывает на аддитивный эффект, и $CI > 1$ указывает на антагонизм. Комбинированные обработки в течение 24 ч соединением А и траметинибом показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/ T670I.

Пример 2. Комбинированная обработка соединением В с траметинибом индуцирует апоптоз в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

На фиг. 2А показаны графические представления, показывающие относительную долю в процентах активности каспаз (по сравнению с контролем со средой-носителем, взятым за 100%), определенную для различных обработок клеток GIST-T1. На фиг. 2В показаны матричные диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, как описано в примере 1, где комбинированные обработки в течение 24 ч (фиг. 2А, В) соединением В и траметинибом показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза в клетках GIST-T1.

На фиг. 2С показано графическое представление, показывающее активность каспаз при различных

ма синергизма и график, построенный на основе показателя аддитивности, основанные на методе с показателем аддитивности (CI), как описано в примере 1. Комбинированные обработки в течение 24 ч с помощью соединения А и кобиметиниба показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/ D816E.

На фиг. 5E показано графическое представление, показывающее активность каспаз при различных обработках резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I. На фиг. 5F показаны матричная диаграмма синергизма и график, построенный на основе показателя аддитивности, основанные на методе с показателем аддитивности (CI), как описано в примере 1. Комбинированные обработки в течение 24 ч с помощью соединения А и кобиметиниба показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/ T670I.

Пример 6. Комбинированная обработка соединением В с кобиметинибом индуцирует апоптоз в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

На фиг. 6A показаны графические представления, показывающие относительную долю в процентах активности каспаз (по сравнению с контролем со средой-носителем, взятым за 100%), определенную для различных обработок клеток GIST-T1. На фиг. 6B показаны матричные диаграммы синергизма и график, построенный на основе показателя аддитивности. Комбинированные обработки в течение 24 ч (фиг. 6A, 6B) с помощью соединения В и кобиметиниба показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза в клетках GIST-T1.

На фиг. 6C показано графическое представление, показывающее активность каспаз при различных обработках резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E. На фиг. 6D показаны матричная диаграмма синергизма и график, построенный на основе показателя аддитивности. Комбинированные обработки в течение 24 ч с помощью соединения В и кобиметиниба показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/ D816E.

На фиг. 6E показано графическое представление, показывающее активность каспаз при различных обработках резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I. На фиг. 6F показаны матричная диаграмма синергизма и график, построенный на основе показателя аддитивности. Комбинированные обработки в течение 24 ч с помощью соединения В и кобиметиниба показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/ T670I.

Пример 7. Комбинированная обработка соединением А с уликсертинибом (BVD-523) индуцирует апоптоз в GIST-T1 и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

На фиг. 7A показаны графические представления, показывающие относительную долю в процентах активности каспаз (по сравнению с контролем со средой-носителем, взятым за 100%), определенную для различных обработок клеток GIST-T1. На фиг. 7B показаны матричные диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, основанные на методе с показателем аддитивности (CI), как описано в примере 1. Комбинированные обработки в течение 24 ч (фиг. 7A, 7B) с помощью соединения А и уликсертиниба показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза в клетках GIST-T1 при более высоких концентрациях.

На фиг. 7C показано графическое представление, показывающее активность каспаз при различных обработках резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I. На фиг. 7D показаны матричная диаграмма синергизма и график, построенный на основе показателя аддитивности, основанные на методе с показателем аддитивности (CI), как описано в примере 1. Комбинированные обработки в течение 24 ч с помощью соединения А и уликсертиниба показали сильный синергизм в отношении индуцирования апоптоза резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/ T670I.

Пример 8. Комбинированная обработка соединением В с уликсертинибом (Bvd-523) индуцирует апоптоз в GIST-T1 и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, для активности каспаз могут использоваться, чтобы показать синергизм для комбинации соединения В и уликсертиниба в индуцировании апоптоза в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1 /D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Пример 9. Комбинированная обработка соединением А с SCH772984 индуцирует апоптоз в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, для активности каспаз могут использоваться, чтобы показать синергизм для комбинации соединения А и SCH772984 в индуцировании апоптоза в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1 /D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Пример 10. Комбинированная обработка соединением В с SCH772984 индуцирует апоптоз в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, для активности каспаз могут использоваться, чтобы показать синергизм для комбинации соединения В и SCH772984

в индуцировании апоптоза в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1 /D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Пример 11. Комбинированная обработка соединением А с LY3009120 индуцирует апоптоз в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, для активности каспаз могут использоваться, чтобы показать синергизм для комбинации соединения А и LY3009120 в индуцировании апоптоза в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1 /D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Пример 12. Комбинированная обработка соединением В с LY3009120 индуцирует апоптоз в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, для активности каспаз могут использоваться, чтобы показать синергизм для комбинации соединения В и LY3009120 в индуцировании апоптоза в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1 /D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Пример 13. Комбинированная обработка соединением А с дабрафенибом индуцирует апоптоз в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, для активности каспаз могут использоваться, чтобы показать синергизм для комбинации соединения А и дабрафениба в индуцировании апоптоза в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1 /D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Пример 14. Комбинированная обработка соединением В с дабрафенибом индуцирует апоптоз в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Диаграммы синергизма и графики, построенные на основе показателя аддитивности, для активности каспаз могут использоваться, чтобы показать синергизм для комбинации соединения В и дабрафениба в индуцировании апоптоза в GIST-T1, резистентных к иматинибу клетках GIST-T1 /D816E и резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/T670I.

Пример 15. Комбинированная обработка предупреждает прорастание колоний в случае клеток GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E и GIST-T1/T670I.

Проводили исследования, которые демонстрируют, что комбинированная обработка с помощью соединения А и траметиниба предупреждает прорастание колоний в случае чувствительных к иматинибу клеток GIST-T1 (делеция 57 п. о. в экзоне 11), резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E и резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I. Анализы проводили в 6-луночных планшетах с посевом 100 клеток на лунку. Клетки обрабатывали с помощью контроля со средой-носителем, соединения А, траметиниба, иматиниба (IM) или их комбинаций при различных концентрациях и культивировали клетки в течение 2 недель. После обработки лекарственное средство вымывали и клетки культивировали в нормальных средах в течение 1-3 недель. Проросшие клеточные колонии окрашивали с помощью кристаллического фиолетового и подсчитывали.

На фиг. 8А показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1, подсчитанных при различных обработках. Клетки GIST T1 являются чувствительными к иматинибу и соединению А в качестве отдельных средств. Следует отметить, что иматиниб и соединение А в качестве отдельных средств демонстрируют примерно аналогичное уменьшение уровня прорастания колоний GIST T1, до 23-30% от такового для контроля со средой-носителем. Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 50 нМ соединения А и либо 50 нМ, либо 100 нМ траметиниба неожиданно приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1 до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 9 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 8А). В отличие от этого, комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 100 нМ иматиниба и либо 50 нМ, либо 100 нМ траметиниба не приводила к полной остановке роста или ликвидации опухолевых клеток после отмены комбинированной терапии на 9 дней.

На фиг. 8В показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/D816E, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что иматиниб (500 нМ) и соединение А (100 нМ или 250 нМ) в качестве отдельных средств демонстрируют примерно аналогичный уровень недостаточности цитотоксической эффективности в отношении GIST T1/D816E с уровнем прорастания колоний, составляющим примерно 61-72% от такового для контроля со средой-носителем (фиг. 8В). Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью соединения А (100 нМ или 250 нМ) и траметиниба (100 нМ) приводила к практически полной остановке роста клеток в случае соединения А (100 нМ) и полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний у

клеток GIST-T1/D816E до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива в случае комбинации траметиниба (100 нМ) и соединения А (250 нМ) после десяти дней восстановления (см. стрелки, фиг. 8B), в то время как комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью иматиниба (500 нМ) и траметиниба (50 или 100 нМ) не приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации опухолевых клеток (см. график на фиг. 8B). Это было заметно, когда клетки культивировали в течение дополнительных 10 дней без применения лекарственного средства иросло ~20-25 колоний. На фиг. 8C показаны изображения репрезентативных культуральных чашек, когда концентрацию соединения А дополнительно понизили до 25, 50 или 100 нМ и оценивали в комбинации с 50 нМ траметиниба. Была достигнута полная остановка роста или ликвидация опухолевых клеток до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива в случае 100 нМ соединения А в комбинации с траметинибом после десяти дней восстановления (см. стрелки, фиг. 8C), была достигнута практически полная остановка роста или почти полная ликвидация опухолевых клеток (1% от такового для контроля со средой-носителем) в случае 50 нМ соединения А в комбинации с траметинибом (см. стрелки, фиг. 8C), и были достигнуты значительные уровни остановки роста или уничтожения опухолевых клеток в случае 25 нМ соединения А (11% от такового для контроля со средой-носителем). В отличие от этого, комбинация 100 нМ иматиниба с 50 нМ траметиниба не обеспечивала ликвидации прорастания колоний опухоли, обеспечивая умеренный уровень остановки роста или уничтожения опухолевых клеток после десяти дней восстановления (60% от такового для контроля со средой-носителем).

На фиг. 8D показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1 /T670I, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что иматиниб (500 нМ) и соединение А (250 или 500 нМ) в качестве отдельных средств демонстрируют примерно аналогичное уменьшение уровня прорастания колоний GIST T1/T670I, до примерно 44-49% от такового для контроля со средой-носителем. Обработка в течение 2 недель с помощью либо 250 нМ, либо 500 нМ соединения А в комбинации с либо 50 нМ, либо 100 нМ траметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1/T670I до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 8D). В отличие от этого, обработка в течение 2 недель с помощью 500 нМ иматиниба в комбинации с либо 50 нМ, либо 100 нМ траметиниба не приводила к полной остановке роста опухолевых клеток или ликвидации опухолевых клеток после отмены комбинированной терапии на 9 дней.

Пример 16. Комбинированная обработка соединением В с траметинибом предупреждает прорастание колоний в случае клеток GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E и GIST-T1/T670I.

Исследования, рассмотренные в примере 8, также проводили при комбинированной обработке с помощью соединения В и траметиниба на 3 линиях клеток GIST.

На фиг. 9A показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1, подсчитанных при различных обработках. Клетки GIST T1 были чувствительны к соединению В в качестве отдельного средства и показали уменьшение уровня прорастания колоний GIST T1 до 42-54% по сравнению с таковым для контроля со средой-носителем. Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 50 или 100 нМ соединения В и либо 50 нМ, либо 100 нМ траметиниба приводили к значительной остановке роста клеток с незначительным уровнем прорастания колоний, в то время как комбинированная обработка с помощью 250 нМ соединения А с либо 50 нМ, либо 100 нМ траметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1 до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 9A). Предупреждение прорастания колоний обеспечивалось даже после продленного продолжительного восстановления в общей сложности в течение 20 дней.

На фиг. 9B показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/D816E, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что соединение В (50, 100 или 250 нМ) в качестве отдельного средства демонстрирует цитотоксическую эффективность в отношении GIST T1/D816E с уровнем прорастания колоний, составляющим примерно 59-84% от такового для контроля со средой-носителем (фиг. 9B). Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью соединения В (250 нМ) и траметиниба (50 нМ) или с помощью соединения В (100 или 250 нМ) и траметиниба (100 нМ) приводила к >90% остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний у клеток GIST-T1/D816E при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива после десяти дней восстановления (см. стрелки, фиг. 9B). Обработка с помощью соединения В (250 нМ) обеспечивала сохранение остановки роста клеток или уничтожения клеток, в комбинации с траметинибом (100 нМ), даже после продленного продолжительного срока, составляющего 20 дней.

На фиг. 9C показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/T670I, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить,

что соединение В (50, 100 или 250 нМ) в качестве отдельного средства демонстрирует уровень прорастания колоний GIST T1/T670I, составляющий до примерно 75-78% от такового для контроля со средой-носителем. Обработка в течение 2 недель с помощью либо 100 нМ, либо 250 нМ соединения В в комбинации с либо 50 нМ, либо 100 нМ траметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1/T670I до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 9С). Ингибирование прорастания сохранялось даже после продолжительного срока без лекарственного средства, составляющего 20 дней.

Пример 17. Комбинированная обработка соединением А с биниметинибом предупреждает прорастание колоний у GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E и GIST-T1/T670I.

Проводили исследования, которые демонстрируют, что комбинированная обработка с помощью соединения А и биниметиниба предупреждает прорастание колоний в 3 линиях клеток GIST, как рассмотрено в примере 15.

На фиг. 10А показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что иматиниб и соединение А в качестве отдельных средств демонстрируют примерно аналогичное уменьшение уровня прорастания колоний GIST T1, до 36-41% от такового для контроля со средой-носителем. Оценивали комбинированную обработку в течение 2 недель с помощью 100 нМ или 250 нМ соединения А и либо 500 нМ, 1 мкМ, 2 мкМ, либо 3 мкМ биниметиниба. Комбинация соединения А (100 нМ или 250 нМ) с биниметинибом (2 мкМ или 3 мкМ) приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1 до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 10А). В отличие от этого, комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью даже 500 нМ иматиниба и либо 500 нМ, 1 мкМ, 2 мкМ, либо 3 мкМ биниметиниба не приводила к полной остановке или ликвидации роста опухолевых клеток после отмены комбинированной терапии на 10 дней. Эффект был более выраженным после инкубации в течение продленного периода времени без лекарственного средства, где в случае иматиниба визуально определяли наличие ~10-15 колоний, а в случае соединения А наблюдали отсутствие прорастания колоний.

На фиг. 10В показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/D816E, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что иматиниб (500 нМ) и соединение А (100 нМ или 250 нМ) в качестве отдельных средств демонстрируют недостаточность цитотоксической эффективности в отношении GIST T1/D816E с уровнем прорастания колоний, составляющим примерно 60-95% от такового для контроля со средой-носителем (фиг. 10В). Оценивали комбинированную обработку в течение 2 недель с помощью соединения А (100 нМ или 250 нМ) и биниметиниба (500 нМ, 1 мкМ, 2 мкМ или 3 мкМ). Комбинация соединения А (100 нМ или 250 нМ) с биниметинибом (3 мкМ) приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний у клеток GIST-T1/D816E до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива после десяти дней восстановления (см. стрелки, фиг. 10В), в то время как комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью иматиниба (500 нМ) и биниметиниба (500 нМ, 1 мкМ, 2 мкМ или 3 мкМ) не приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации опухолевых клеток. Эффект был более выражен после инкубации в течение продленного периода времени, где обработка иматинибом не приводила к полному ингибированию, в то время как соединение А показывало сохранение остановки роста клеток или уничтожения клеток даже после 20 дней.

На фиг. 10С показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/T670I, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что для иматиниба (500 нМ) в качестве отдельного средства не показано какого-либо уменьшения колоний, в то время как соединение А (100 нМ или 250 нМ) в качестве отдельного средства демонстрирует зависимое от дозы уменьшение уровня прорастания колоний, составляющее до приблизительно 78-89% от такового для контроля со средой-носителем. Обработка в течение 2 недель с помощью 250 нМ соединения А в комбинации с 1 мкМ, 2 мкМ или 3 мкМ биниметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1/T670I до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 10С). Обработка в течение 2 недель с помощью 100 нМ соединения А в комбинации с 3 мкМ биниметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1/T670I до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 10С). Остановка роста клеток сохранялась даже после продленного периода, составляющего 20 дней, после отмены лекарственного средства. В отличие от этого, обработка в течение 2

недель с помощью 500 нМ иматиниба в комбинации с либо 500 нМ, 1 мкМ, 2 мкМ, либо 3 нМ биниметиниба не приводила к полной остановке роста опухолевых клеток или ликвидации опухолевых клеток после отмены комбинированной терапии на 10 дней.

Пример 18. Комбинированная обработка соединением В с биниметинибом предупреждает прорастание колоний у G1ST-T1, резистентных к иматинибу клеток G1ST-T1/D816E и G1ST-T1/T670I.

Проводили исследования, которые демонстрируют, что комбинированная обработка с помощью соединения В и биниметиниба предупреждает прорастание колоний в 3 линиях клеток G1ST, как рассмотрено в примере 15.

На фиг. 11А показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний G1ST-T1, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что каждая концентрация соединения В в качестве отдельного средства демонстрирует примерно аналогичное уменьшение уровня прорастания колоний G1ST T1, составляющее до 27-31% от такового для контроля со средой-носителем. Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 250 нМ соединения В и 2 мкМ или 3 мкМ биниметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний G1ST T1 до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 11А) и значительный уровень остановки роста клеток или уничтожения клеток G1ST-T1 сохранялся даже после продленного продолжительного восстановления в течение 20 дней (фиг. 11А верхняя правая панель). Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 100 нМ соединения В и 3 мкМ биниметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний G1ST T1 до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 11А).

На фиг. 11В показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний G1ST-T1/D816E, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что соединение В (100 нМ или 250 нМ) в качестве отдельного средства демонстрирует примерно аналогичный уровень недостаточности цитотоксической эффективности в отношении G1ST T1/D816E с уровнем прорастания колоний, составляющим примерно 74-83% от такового для контроля со средой-носителем (фиг. 11В). Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 100 нМ или 250 нМ соединения В и либо 2 мкМ, либо 3 мкМ биниметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний клеток G1ST-T1/D816E до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива после десяти дней восстановления (см. стрелки, фиг. 11В). При наивысшей концентрации соединения В остановка роста клеток сохранялась даже после продленного периода, составляющего 20 дней.

На фиг. 11С показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний G1ST-T1/T670I, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что соединение В (100 нМ или 250 нМ) в качестве отдельного средства демонстрирует уменьшение прорастания колоний G1ST T1/T670I до приблизительно 72-78% от такового для контроля со средой-носителем. Обработка в течение 2 недель с помощью либо 100 нМ, либо 250 нМ соединения В и 3 мкМ биниметиниба неожиданно приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний G1ST T1/T670I до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 11С). Обработка в течение 2 недель с помощью 250 нМ соединения В и 2 мкМ биниметиниба неожиданно приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний G1ST T1/T670I до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелку на фиг. 11С). Остановка роста клеток сохранялась даже после продленного периода, составляющего 20 дней, после отмены лекарственного средства.

Пример 19. Комбинированная обработка соединением А с кобиметинибом предупреждает прорастание колоний у G1ST-T1, резистентных к иматинибу клеток G1ST-T1/D816E и G1ST-T1/T670I.

Проводили исследования, которые демонстрируют, что комбинированная обработка с помощью соединения А и кобиметиниба предупреждает прорастание колоний в 3 линиях клеток G1ST, как рассмотрено в примере 15.

На фиг. 12А показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний G1ST-T1, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что иматиниб и соединение А в качестве отдельных средств демонстрируют примерно аналогичное уменьшение уровня прорастания колоний G1ST T1 до 18-23% от такового для контроля со средой-носителем. Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 250 нМ соединения А и либо 100 нМ, 200 нМ, либо 500 нМ кобиметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний G1ST T1 до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использова-

нием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 12A). Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 100 нМ соединения А и 500 нМ кобиметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1 до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелку на фиг. 12A). В отличие от этого, комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 500 нМ иматиниба и либо 100 нМ, 200 нМ, либо 500 нМ кобиметиниба не приводила к полной остановке роста или ликвидации опухолевых клеток после отмены комбинированной терапии на 10 дней.

Эффект был более заметным после инкубации в течение продленного периода времени, где в случае 500 нМ иматиниба выросло ~10-15 колоний, а в случае 500 нМ соединения А и 500 нМ кобиметиниба прорастания колоний не наблюдали.

На фиг. 12B показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/D816E, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что иматиниб (500 нМ) и соединение А (100 или 250 нМ) в качестве отдельных средств демонстрируют примерно аналогичный уровень недостаточности цитотоксической эффективности в отношении GIST T1/D816E с уровнем прорастания колоний, составляющим примерно 65-74% от такового для контроля со средой-носителем (фиг. 12B). Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью соединения А (250 нМ) и кобиметиниба (100, 200 или 500 нМ) приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний клеток GIST-T1/D816E до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива после десяти дней восстановления (см. стрелки, фиг. 12B), в то время как комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью иматиниба (500 нМ) и кобиметиниба (100, 200 или 500 нМ) не приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации опухолевых клеток. Эффект был более заметным после инкубации в течение продленного периода времени, где обработка иматинибом не приводила к полному ингибированию, в то время как соединение А показывало сохранение значительного уровня остановки роста клеток или уничтожения клеток даже после 20 дней.

На фиг. 12C показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/T670I, подсчитанных при различных обработках. Обработка в течение 2 недель с помощью либо 50 нМ, либо 100 нМ соединения А в комбинации с кобиметинибом (200 нМ или 500 нМ) неожиданно приводила к >99% ингибированию прорастания колоний GIST T1/T670I при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива (обратите внимание на стрелки на фиг. 12C). Остановка роста клеток сохранялась даже после продленного периода, составляющего 20 дней, после отмены лекарственного средства. В отличие от этого, обработка в течение 2 недель с помощью 500 нМ иматиниба в комбинации с не более чем 500 нМ кобиметиниба не приводила к устойчивой остановке роста клеток или ликвидации клеток после отмены комбинированной терапии на 10 дней.

Пример 20. Комбинированная обработка соединением В с кобиметинибом предупреждает прорастание колоний у GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E и GIST-T1/T670I.

Проводили исследования, которые демонстрируют, что комбинированная обработка с помощью соединения В и кобиметиниба предупреждает прорастание колоний в 3 линиях клеток GIST, как рассмотрено в примере 15.

На фиг. 13A показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что соединение В в качестве отдельного средства демонстрирует примерно аналогичное уменьшение уровня прорастания колоний GIST T1, составляющее до 42-54% от такового для контроля со средой-носителем. Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 50 нМ, 100 нМ или 250 нМ соединения В и либо 200 нМ, либо 500 нМ кобиметиниба приводила к полной или почти полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1 до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 13A). При комбинированной обработке в течение 2 недель с помощью 100 нМ или 250 нМ соединения В и либо 200 нМ, либо 500 нМ кобиметиниба сохранялся значительный уровень остановки роста клеток или уничтожения клеток GIST-T1 даже после продленного долгосрочного восстановления в течение 20 дней.

На фиг. 13B показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/D816E, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что соединение В (100 или 250 нМ) в качестве отдельного средства демонстрирует недостаток цитотоксической эффективности в отношении GIST T1/D816E с уровнем прорастания колоний, составляющим примерно 58-84% от такового для контроля со средой-носителем (фиг. 13B). Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 50, 100 или 250 нМ соединения В и либо 200 нМ, либо 500 нМ кобиметиниба приводила к >90 ингибированию прорастания колоний клеток GIST-T1/D816E при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива после десяти дней восстановления (см. стрелки,

фиг. 13В). При более высокой концентрации соединения В остановка роста клеток в значительной степени сохранялась даже после продленного периода, составляющего 20 дней.

На фиг. 13С показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/T670I, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что соединение В (100 или 250 нМ) в качестве одного средства демонстрирует уменьшение уровня прорастания колоний GIST T1/T670I до приблизительно 75-78% от такового для контроля со средой-носителем. Обработка в течение 2 недель с помощью либо 50, 100, либо 250 нМ соединения В и либо 200 нМ, либо 500 нМ кобиметиниба приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1/T670I до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 13С). Остановка роста клеток сохранялась даже после продленного периода, составляющего 20 дней, после отмены лекарственного средства.

Пример 21. Комбинированная обработка соединением А с уликсертинибом предупреждает прорастание колоний у GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E и GIST-T1/T670I.

Проводили исследования, которые демонстрируют, что комбинированная обработка с помощью соединения А и уликсертиниба предупреждает прорастание колоний в 3 линиях клеток GIST, как рассмотрено в примере 15.

На фиг. 14А показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что соединение А в качестве отдельного средства демонстрирует примерно аналогичное уменьшение уровня прорастания колоний GIST T1, составляющее до 37-41% от такового для контроля со средой-носителем. Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 50, 100 или 250 нМ соединения А и 1 мкМ, 2 мкМ либо 3 мкМ уликсертиниба приводила к значительному уменьшению уровня прорастания колоний GIST T1 при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива (обратите внимание на стрелки на фиг. 14А).

На фиг. 14В показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/D816E, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что соединение А (50, 100 или 250 нМ) в качестве отдельного средства демонстрирует примерно аналогичный уровень недостаточности цитотоксической эффективности в отношении GIST T1/D816E с уровнем прорастания колоний примерно 81-93% от такового для контроля со средой-носителем (фиг. 14В). Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью соединения А (250 нМ) и уликсертиниба (2 мкМ или 3 мкМ) приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний клеток GIST-T1/D816E до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива после десяти дней восстановления (см. стрелки, фиг. 14В).

На фиг. 14С показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/T670I, подсчитанных при различных обработках. Обработка в течение 2 недель с помощью либо 100 нМ, либо 250 нМ соединения А в комбинации с уликсертинибом (2 мкМ или 3 мкМ) неожиданно приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1/T670I до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелки на фиг. 14С). Остановка роста клеток сохранялась даже после продленного периода, составляющего 20 дней, после отмены лекарственного средства.

Пример 22. Комбинированная обработка соединением В с уликсертинибом предупреждает прорастание колоний резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E.

На фиг. 15 показаны изображения репрезентативных культуральных чашек и графическое представление числа колоний GIST-T1/D816E, подсчитанных при различных обработках. Следует отметить, что соединение В (50, 100 или 250 нМ) в качестве отдельного средства демонстрировало примерно аналогичный уровень недостаточности цитотоксической эффективности в отношении GIST T1/D816E с уровнем прорастания колоний примерно 52-95% от такового для контроля со средой-носителем (фиг. 15). Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью соединения В (250 нМ) и уликсертиниба (3 мкМ) приводила к полной остановке роста клеток или ликвидации прорастания колоний GIST T1/D816E до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива, при этом выявляемые колонии отсутствовали после отмены комбинированной терапии на 10 дней (обратите внимание на стрелку на фиг. 15).

Пример 23. Комбинированная обработка соединением А и ингибитором ERK, SCH772984, предупреждает прорастание колоний в резистентных к иматинибу клетках GIST-T1/D816E.

Протокол, приведенный в примере 15, можно применять для демонстрации синергизма комбинации соединения А и SCH772984 в отношении предупреждения прорастания колоний клеток GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I и GIST-T1/D816E.

Пример 24. Комбинированная обработка соединением В и ингибитором ERK SCH772984 предупреждает прорастание колоний резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E.

Протокол, приведенный в пример 15 можно применять для демонстрации синергизма комбинации соединения В и SCH772984 в предупреждении прорастания колоний клеток GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I и GIST-T1 /D816E.

Пример 25. Комбинированная обработка соединением А и ингибитором RAF, LY3009120, предупреждает прорастание колоний резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E.

Протокол, приведенный в примере 15, можно применять для демонстрации синергизма комбинации соединения А и LY3009120 в отношении предупреждения прорастания колоний клеток GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I и GIST-T1 /D816E.

Пример 26. Комбинированная обработка соединением В и ингибитором RAF, LY3009120, предупреждает прорастание колоний резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E.

Протокол, приведенный в пример 15, можно применять для демонстрации синергизма комбинации соединения В и LY3009120 в отношении предупреждения прорастания колоний у клеток GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I и GIST-T1/D816E.

Пример 27. Комбинированная обработка соединением А и ингибитором RAF, дабрафенибом, предупреждает прорастание колоний резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E.

Протокол, указанный в примере 15, можно применять для демонстрации синергизма комбинации соединения А и дабрафениба в отношении предупреждения прорастания колоний клеток GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I и GIST-T1 /D816E.

Пример 28. Комбинированная обработка соединением В и ингибитором RAF, дабрафенибом, предупреждает прорастание колоний у резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/D816E.

Протокол, приведенный в пример 15, можно применять для демонстрации синергизма комбинации соединения В и дабрафениба в отношении предупреждения прорастания колоний у клеток GIST-T1, резистентных к иматинибу клеток GIST-T1/T670I и GIST-T1/D816E.

Пример 29. Комбинированная обработка индуцирует апоптоз в клетках GIST-T1, трансфицированных N-gas G12D.

Проводили исследование, которое демонстрирует, что комбинированная обработка соединением А и траметинибом индуцирует апоптоз в клетках GIST-T1, трансфицированных контрольным пустым вектором (EV) и вариантом N-gas с мутацией G12D. Анализы проводили в 96-луночных планшетах с посевом 10000 клеток на лунку для клеток GIST-T1, трансфицированных контрольным вектором или N-gas G12D. Клетки обрабатывали с помощью контроля со средой-носителем, соединения А, траметиниба или их комбинаций в различных концентрациях и обеспечивали рост клеток в течение 48 ч. Апоптоз оценивали путем измерения активности каспаз 3/7.

На фиг. 16А представлены графические представления активности каспаз, измеренной после различных обработок. Комбинированная обработка в течение 48 ч с помощью 50 нМ соединения А и траметиниба (50 нМ или 100 нМ) индуцировала повышенный апоптоз в клетках GIST-T1, трансфицированных вариантом N-gas с мутацией G12D, по сравнению с клетками, обработанными любым отдельным средством -соединением А или траметинибом.

Пример 30. Комбинированная обработка предупреждает прорастание колоний у клеток GIST-T1, трансфицированных N-gas G12D.

Проводили исследование, которое демонстрирует, что комбинированная обработка соединением А и траметинибом предупреждает прорастание резистентных колоний клеток GIST-T1, трансфицированных контрольным пустым вектором (EV) и вариантом N-gas с мутацией G12D. Анализы проводили в 6-луночных планшетах с посевом 100 клеток на лунку. Клетки обрабатывали с помощью контроля со средой-носителем, 50 нМ соединения А, 50 нМ или 100 нМ траметиниба или их комбинациями и клетки культивировали в течение 2 недель. В том же эксперименте клетки обрабатывали с помощью контроля со средой-носителем, 100 нМ иматиниба, 50 нМ или 100 нМ траметиниба или их комбинаций. Через 2 недели лекарственное средство вымывали и клетки культивировали в нормальных средах в течение 1-3 недель. Колонии окрашивали с помощью кристаллического фиолетового и подсчитывали.

На фиг. 16В показаны изображения репрезентативных культуральных чашек, и на фиг. 16С показаны графические представления числа колоний GIST-T1, трансфицированных контрольным вектором (фиг. 16В.1) и вариантом N-gas с мутацией G12D (фиг. 16В.2), подсчитанных после различных обработок. Количественная оценка уровня прорастания колоний у клеток GIST T-1, трансфицированных контрольным вектором и N-gas G12D, показана на фиг. 16С.1 и фигуре 16С.2 соответственно. Комбинированная обработка с помощью 100 нМ иматиниба и 50 нМ траметиниба в результате приводила к прорастанию колонии (35% от такового для контроля со средой-носителем), и комбинация 100 нМ иматиниба с 100 нМ траметиниба также в результате приводила к прорастанию колонии (19% от такового для среды-носителя). В отличие от этого, комбинации соединения А с траметинибом неожиданно в результате приводили к превосходящему уровню остановки роста клеток или уничтожения клеток по сравнению с таковым для комбинации с иматинибом. Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 50 нМ соединения А и 50 нМ траметиниба приводила к практически полной остановке роста клеток или уничтожению клеток (2% от такового для контроля со средой-носителем), и комбинация 50 нМ соединения А с 100 нМ траметиниба приводила к полной остановке роста клеток или уничтожению клеток (0% прорас-

тание колоний, обработанных контролем со средой-носителем) до предела обнаружения при визуализации с помощью микроскопии с использованием 5× объектива после десяти дней вымывания лекарственного средства и восстановления (см. стрелки, фиг. 16C.2).

На фиг. 16D показаны изображения репрезентативных культуральных чашек с числом колоний G1ST-T1, трансфицированных вариантом N-ras с мутацией G12D, подсчитанных после длительного периода восстановления без применения лекарственного средства. Комбинированная обработка в течение 2 недель с помощью 100 нМ соединения А и 50 нМ или 100 нМ траметиниба приводила к почти полной блокаде прорастания колоний у клеток G1ST-T1, трансфицированных N-ras G12D, после продленного продолжительного периода восстановления, составляющего 21 день.

Пример 32. Комбинированная обработка предупреждает прорастание колоний у клеток G1ST, резистентных к лекарственному средству.

Проводили исследование по насыщающему мутагенезу в клетках Ва/F3, трансформированных онкогенным вариантом КИТ с мутацией V560D. Введение одонитевого разрыва в ДНК индуцировали с помощью N-этил-N-нитрозомочевины (ENU) в течение 18 ч для создания дополнительных мутаций в гене КИТ или других генах случайным образом. Анализы проводили в 6-луночных планшетах с посевом 100 клеток на лунку. После вымывания ENU, лунки инкубировали с 100 нМ, или 250 нМ, или 500 нМ иматиниба, 100 нМ, или 250 нМ, или 500 нМ иматиниба в комбинации с 10 нМ траметиниба, 25 нМ, или 100 нМ, или 250 нМ соединения А, или комбинацией 25 нМ, 100 нМ или 250 нМ соединения А с 10 нМ траметиниба. Лунки, которые демонстрировали резистентность к обработкам лекарственными средствами, демонстрировали прорастание клеток Ва/F3. Эти клетки подвергали ПЦР и секвенированию гена КИТ для определения наличия вторичной мутации, обеспечивающей резистентность, индуцированной обработкой с помощью ENU.

На фиг. 17A показано графическое представление, демонстрирующее рост колоний Ва/F3, резистентных к иматинибу. Варианты КИТ с вторичными мутациями T670I, K807E и/или D816V, обеспечивающими резистентность к иматинибу, идентифицировали с помощью ПЦР и секвенирования ДНК геномной ДНК в клетках Ва/F3, подвергшихся воздействию 100 нМ, 250 нМ или 500 нМ иматиниба в качестве отдельного средства (фиг. 17A, левая панель). На фиг. 17A (правая панель) показано графическое представление исследования с применением насыщающего мутагенеза, осуществляемого в отношении клеток Ва/F3 с соединением А. Монотерапия с помощью 25 нМ, 100 нМ или 250 нМ соединения А не приводила к прорастанию ни при одной из новых вторичных мутаций, обеспечивающих резистентность, что определено с помощью ПЦР и секвенирования ДНК. Было показано, что только клетки Ва/F3, содержащие КИТ с исходной мутацией V560D (первичной), росли после воздействия соединением А, вероятно, свидетельствуя о наличии мутации в генах, отличных от КИТ (фиг. 17A, правая панель). На фиг. 17B представлено графическое представление, демонстрирующее прорастание колоний клеток Ва/F3 с иматинибом в присутствии траметиниба или соединением А в присутствии траметиниба. Комбинация иматиниба при 250 нМ или 500 нМ с 10 нМ траметиниба не приводила к прорастанию ни при одной из новых вторичных мутаций, обеспечивающих резистентность, но приводила к прорастанию клеток с КИТ с исходной V560D (первичной), вероятно, свидетельствуя о наличии мутации в генах, отличных от КИТ (фиг. 17B, левая панель). Важным является то, что, в отличие от результатов исследования комбинации иматиниба с траметинибом, комбинация 25, 100 или 250 нМ соединения А с 10 нМ траметиниба приводила к полной остановке роста клеток или уничтожению клеток без прорастания клеток до предела обнаружения, определенного с помощью визуального исследования в любой лунке (фиг. 17B, правая панель).

Пример 33. Исследование соединения А в комбинации с траметинибом на ксенотрансплантате *in vivo*.

Ксенотрансплантатную модель G1ST T1 реализовали в соответствии со всеми законодательными, нормативно-правовыми актами и руководствами Национальных институтов здравоохранения (NIH) и после получения одобрения Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных для MI Bioresearch (Энн-Арбор, Мичиган), лаборатории, аккредитованной AAALAC. Все мыши имели свободный доступ к еде и воде. Всех мышей подвергали осмотру на предмет появления клинических признаков по меньшей мере один раз в сутки. Самкам безтимусных мышей Envigo (HsdCrl:Athymic Nude-NU-Foxnlnc; в возрасте 6-7 недель) инокулировали подкожно сразу ниже правой верхней части подмышечной впадины пять миллионов клеток в фосфатно-солевом буфере Дульбекко, смешанном с равным объемом матригеля, с применением иглы калибра 27 и шприца. Когда значения опухолевой нагрузки достигали 117 мм в среднем на день 10, мышей произвольным образом распределяли по группам так, чтобы средняя опухолевая нагрузка для всех групп находилась в пределах 10% от общей средней опухолевой нагрузки для исследуемой популяции. Группы обрабатывали в дни 10-27 следующим образом: рацион с контролем со средой-носителем (n=10); соединение А, включаемое в рацион мыши с обеспечением примерно 100 мг/кг в сутки соединения А (n=10); или соединение А, включаемое в рацион мыши с обеспечением примерно 25 мг/кг в сутки соединения А (n=10), траметиниб, вводимый перорально по 0,5 мг/кг дважды в сутки, и скармливаемый рацион с контролем со средой-носителем (n=10), траметиниб, вводимый перорально по 0,5 мг/кг дважды в сутки, и скармливаемый рацион с включенным соединением А (с обеспечением обработки с помощью примерно 100 мг/кг в сутки соединения А) (n=10), или траме-

тиниб, вводимый перорально по 0,5 мг/кг дважды в сутки, и скормливаемый рацион с включенным соединением А (с обеспечением обработки с помощью примерно 25 мг/кг в сутки соединения А (n=10)). В день 27 всех животных помещали на контрольный рацион для осуществления мониторинга возобновления роста опухоли. Объем опухоли и вес тела измеряли трижды в неделю. Опухолевую нагрузку (мг) оценивали по данным измерений штангенциркулем с помощью формулы:

$$\text{опухолевая нагрузка (мг=мм}^3\text{)}=(\text{длина}\times\text{ширина}^2)/2.$$

На фиг. 18А и 18В показано графическое представление, демонстрирующее ингибирование роста опухоли по сравнению с контролем со средой-носителем. На фиг. 18В показаны те же данные, что и на фиг. 18А, но в увеличенном масштабе, чтобы показать отличия между когортами, обрабатываемыми соединением А или соединением А/траметинибом. Обработка с помощью траметиниба приводила к слабому ингибированию роста опухоли по сравнению с контролем со средой-носителем. При высокой дозе соединения А (примерно 100 мг/кг в сутки) у 6/10 мышей происходила полная регрессия опухоли, при этом у оставшихся 4/10 мышей происходила частичная регрессия опухоли в течение периода введения. При низкой дозе соединения А (примерно 25 мг/кг в сутки) у 2/10 мышей происходила полная регрессия опухоли, и у 6/10 происходила частичная регрессия опухоли. При высокой дозе соединения А (примерно 100 мг/кг в сутки), комбинированного с траметинибом, у 10/10 мышей происходила полная регрессия опухоли в течение периода введения. При низкой дозе соединения А (примерно 25 мг/кг в сутки), комбинированного с траметинибом, у 5/10 мышей происходила полная регрессия опухоли, и у 5/10 происходила частичная регрессия опухоли. Кроме того, после периода введения все когорты, обрабатываемые соединением А, характеризовались более медленным возобновлением роста опухоли, чем рост исходной опухоли в случае контроля со средой-носителем, указывая на длительный эффект в отношении роста опухолевых клеток до конца исследования в день 66. При высокой дозе соединения А (примерно 100 мг/кг в сутки) у 1/10 мышей сохранялась частичная регрессия опухоли в конце исследования. При низкой дозе соединения А (примерно 25 мг/кг в сутки) у 2/10 мышей сохранялась частичная регрессия опухоли в конце исследования. При высокой дозе соединения А (примерно 100 мг/кг в сутки), комбинированного с траметинибом, у 1/10 мышей сохранялась полная регрессия опухоли и у 4/10 мышей сохранялась частичная регрессия опухоли в конце исследования. При низкой дозе соединения А (примерно 25 мг/кг в сутки), комбинированного с траметинибом, у 2/10 мышей сохранялась частичная регрессия опухоли в конце исследования. Такие данные демонстрируют, что комбинация соединения А и траметиниба индуцирует гибель клеток и/или длительную остановку роста клеток в течение по меньшей мере 40 дней после завершения введения доз.

Пример 34. Соединение А является сильным ингибитором эффлюксного транспортера BCRP.

Для исследования ингибирования BCRP, представляющего собой эффлюксный транспортер лекарственных средств, с помощью соединения А, проводили анализ ингибирования везикулярного транспорта с применением маркерного субстрата с низкой проникающей способностью и везикул с обращенной мембраной, полученных из клеток, экспрессирующих BCRP, в присутствии АТФ. Измеряли способность соединения А модифицировать поглощение маркерного субстрата в везикулы, содержащие транспортер.

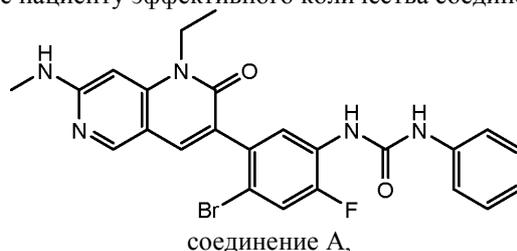
Возможность взаимодействия соединения А с эффлюксным транспортером BCRP человека *in vitro* исследовали при 7 концентрациях в анализах ингибирования везикулярного транспорта. Соединение А обеспечивало сильное ингибирование транспорта маркерного субстрата BCRP, где ингибирование на 44% наблюдали при наиболее низкой испытуемой концентрации (0,04 мкМ). Согласно оценке, значение IC₅₀ составляло примерно 0,04 мкМ.

Эквиваленты.

Различные эквиваленты конкретных вариантов осуществления, конкретно описанных в настоящем изобретении, будут очевидными для специалиста в данной области техники или он будет способен установить их с применением не более чем обычных экспериментов. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в объем нижеследующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения опухоли с одной или более мутациями с-KIT у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества соединения А, представленного



или его фармацевтически приемлемой соли и эффективного количества одного или более ингибиторов МАРКАР-киназы, где ингибитор МАРКАР-киназы выбирают из группы, состоящей из ингибитора

митоген-активируемой протеинкиназы (ингибитора MEK) и/или ингибитора киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ингибитора ERK), где ингибитор MEK выбирают из группы, состоящей из траметиниба, кобиметиниба и биниметиниба, и ингибитор ERK выбирают из группы, состоящей из уликсертиниба и SCH772984.

2. Способ по п.1, где мутация с-KIT представляет собой первичную мутацию в экзоне 9, экзоне 11, экзоне 13 или экзоне 17 гена с-KIT.

3. Способ по п.1 или 2, где в опухоли присутствует одна или более вторичных мутаций гена с-KIT, приводящих к резистентности.

4. Способ по любому из пп.1-3, где мутация с-KIT представляет собой делеционную мутацию.

5. Способ по п.3 или 4, где приобретение вторичной мутации, приводящей к резистентности, произошло после предыдущего введения пациенту иматиниба, сунитиниба или регорафениба или их фармацевтически приемлемой соли.

6. Способ по любому из пп.3-5, дополнительно предусматривающий определение того, присутствует ли в опухоли вторичная мутация с-KIT.

7. Способ по любому из пп.3-6, где определение того, присутствует ли в опухоли вторичная мутация с-KIT, предусматривает идентифицирование мутаций в циркулирующей опухолевой ДНК.

8. Способ по любому из пп.1-7, где опухоль была резистентной к лечению иматиниба мезилатом, сунитиниба малатом или регорафенибом.

9. Способ по любому из пп.1-8, где опухоль выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, глиобластомы, глиомы у детей, астроцитомы, саркомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) и меланомы.

10. Способ по п.9, где опухоль представляет собой меланому.

11. Способ по п.9, где опухоль представляет собой GIST.

12. Способ по любому из пп.1-11, дополнительно предусматривающий введение пациенту средства таргетной противораковой терапии, биологического средства таргетной противораковой терапии, ингибитора контрольных точек иммунного ответа, иммуномодулирующего средства и/или химиотерапевтического средства.

13. Способ по любому из пп.1-12, дополнительно предусматривающий введение ингибитора RAF.

14. Способ по любому из пп.1-13, где соединение А или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор MAPKAP-киназы вводят по сути одновременно или последовательно.

15. Способ по любому из пп.1-14, где ингибитор MAPKAP-киназы представляет собой ингибитор MEK, выбранный из группы, состоящей из траметиниба, селуметиниба, кобиметиниба и биниметиниба.

16. Способ по любому из пп.1-14, где ингибиторов MAPKAP-киназы представляет собой ингибитор ERK, выбранный из группы, состоящей из уликсертиниба, SCH772984 и LY3214996.

17. Способ по любому из пп.1-16, дополнительно предусматривающий определение того, содержат ли опухоль или опухолевые клетки первичную мутацию гена с-KIT.

18. Способ по п.17, где первичная мутация представляет собой делеционную мутацию.

19. Способ по любому из пп.1-18, где присутствуют одна или более дополнительных вторичных мутаций с-KIT.

20. Способ лечения солидной опухоли у пациента с резистентностью к иматинибу, предусматривающий введение пациенту эффективного количества соединения А, представленного

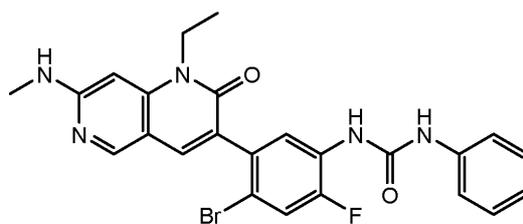


или его фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора MAPKAP-киназы, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба, где солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, глиобластомы, глиомы у детей, астроцитомы, саркомы, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST) и меланомы.

21. Способ по п.20, дополнительно предусматривающий введение ингибитора RAF.

22. Способ по п.21, где ингибитор RAF представляет собой ингибитор всех изоформ RAF.

23. Способ лечения опухоли, резистентной к иматинибу, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества соединения А, представленного



соединение А,

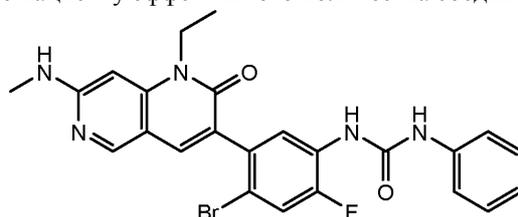
или его фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора МАРКАР-киназы, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба, где опухоль представляет собой гастроинтестинальную стромальную опухоль или меланому.

24. Способ по п.23, дополнительно предусматривающий определение того, присутствует ли в опухоли мутация гена с-KIT.

25. Способ по п.24, где мутация расположена в экзоне 17 гена с-KIT.

26. Способ по п.24, где мутация представляет собой мутацию V654A в экзоне 13 или мутацию T670I в экзоне 14.

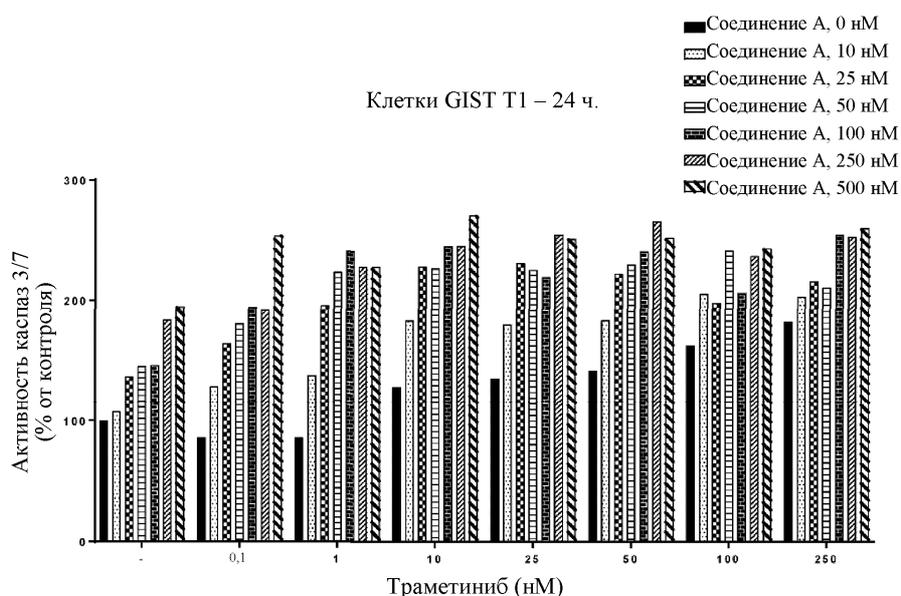
27. Способ лечения опухоли с одной или более мутациями с-KIT у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту эффективного количества соединения А, представленного



соединение А,

или его фармацевтически приемлемой соли и введение пациенту эффективного количества ингибитора МАРКАР-киназы, выбранного из группы, состоящей из траметиниба, биниметиниба, кобиметиниба и уликсертиниба, где опухоль представляет собой гастроинтестинальную стромальную опухоль или меланому.

28. Способ по п.27, где мутация представляет собой мутацию V654A в экзоне 13 или мутацию T670I в экзоне 14.



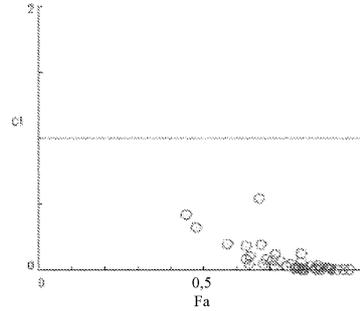
Фиг. 1А

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

CI	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 250 нМ	Соединение А, 500 нМ
Траметиниб, 0,1 нМ	0,41635	0,20181	0,18684	0,19377	0,53669	0,01446
Траметиниб, 1 нМ	0,32337	0,04483	0,01746	0,00975	0,06517	0,13033
Траметиниб, 10 нМ	0,04689	0,00672	0,01463	0,00706	0,01761	0,0012
Траметиниб, 25 нМ	0,08445	0,00557	0,01592	0,0473	0,00679	0,01911
Траметиниб, 50 нМ	0,1024	0,01154	0,01213	0,01019	0,00149	0,01747
Траметиниб, 100 нМ	0,03211	0,0835	0,00501	0,12226	0,03448	0,0413
Траметиниб, 250 нМ	0,07868	0,03424	0,07228	0,00273	0,00836	0,007

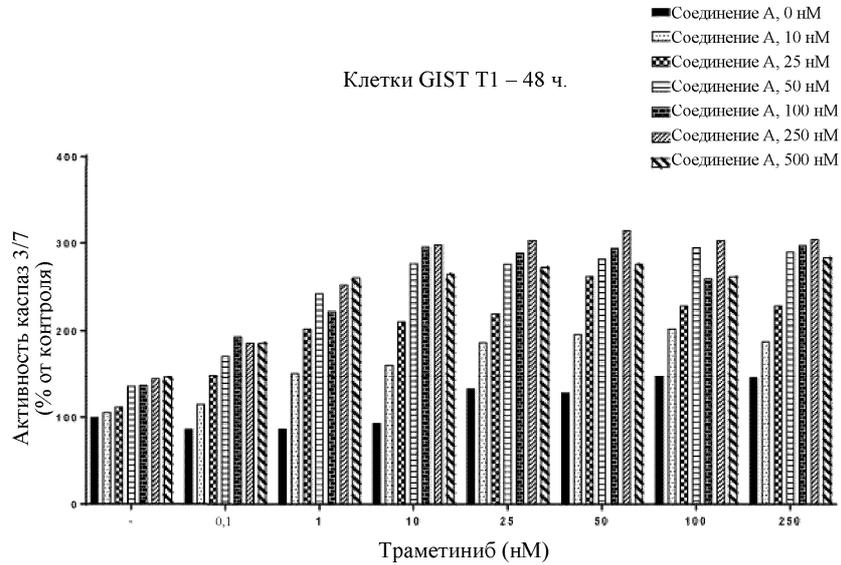
CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 1В

Клетки GIST T1 – 48 ч.



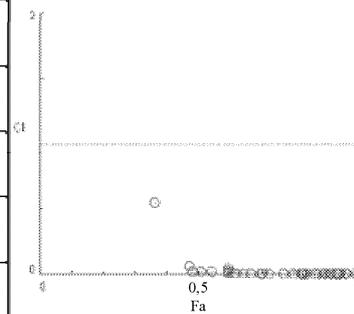
Фиг. 1С

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

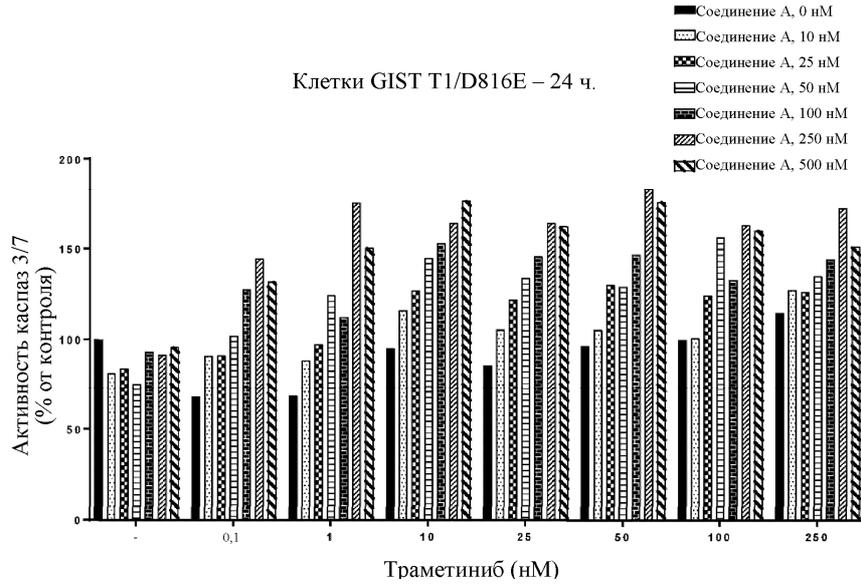
CI	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 250 нМ	Соединение А, 500 нМ
Траметиниб, 0,1 нМ	0,544	0,06109	0,01804	0,00494	0,02246	0,04491
Траметиниб, 1 нМ	0,02154	5,23E-04	1,55E-05	3,09E-04	2,10E-05	1,29E-05
Траметиниб, 10 нМ	0,01666	2,97E-04	7,82E-08	9,90E-10	9,00E-05	6,44E-06
Траметиниб, 25 нМ	0,0022	1,33E-04	8,55E-08	9,57E-09	5,70E-11	1,63E-06
Траметиниб, 50 нМ	0,00133	6,05E-07	2,55E-08	1,79E-09	1,10E-21	8,28E-07
Траметиниб, 100 нМ	0,00116	8,38E-05	7,50E-10	3,55E-06	5,70E-11	1,09E-05
Траметиниб, 250 нМ	0,01223	1,51E-04	4,04E-09	5,00E-10	3,10E-11	1,69E-05

CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 1D



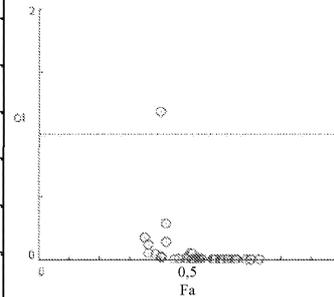
Фиг. 1Е

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Галала

Показатель CI	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 250 нМ	Соединение А, 500 нМ
Траметиниб, 0,1 нМ	0,05427	0,11928	0,0195	0,000143	8,28E-06	0,000253
Траметиниб, 1 нМ	0,18113	0,0469	0,02853	0,00535	7,11E-08	8,34E-06
Траметиниб, 10 нМ	0,01105	0,00199	0,000117	3,21E-05	5,07E-06	5,61E-07
Траметиниб, 25 нМ	0,14462	0,01078	0,00166	0,000258	1,26E-05	1,64E-05
Траметиниб, 50 нМ	0,28757	0,00592	0,00668	0,000438	7,57E-07	2,91E-06
Траметиниб, 100 нМ	1,18272	0,02898	0,000185	0,00772	5,94E-05	9,92E-05
Траметиниб, 250 нМ	0,04532	0,05299	0,01351	0,00313	0,000029	0,00106

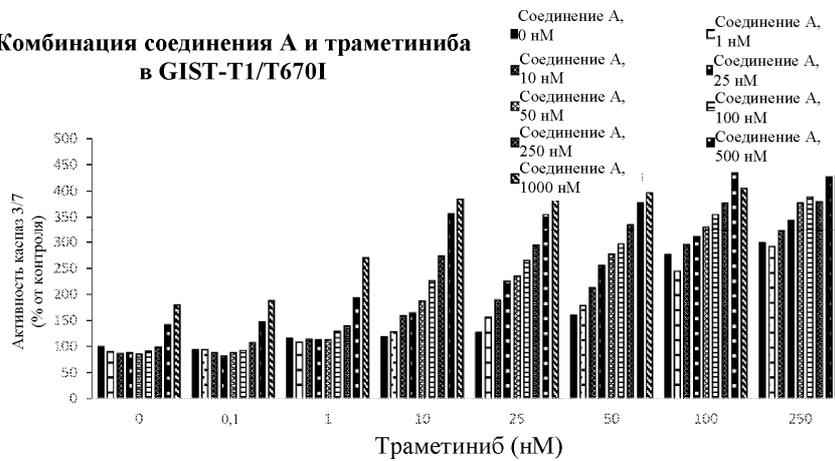
CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 1F

Комбинация соединения А и траметиниба в G1ST-T1/T6701



Фиг. 1G

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талая

CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

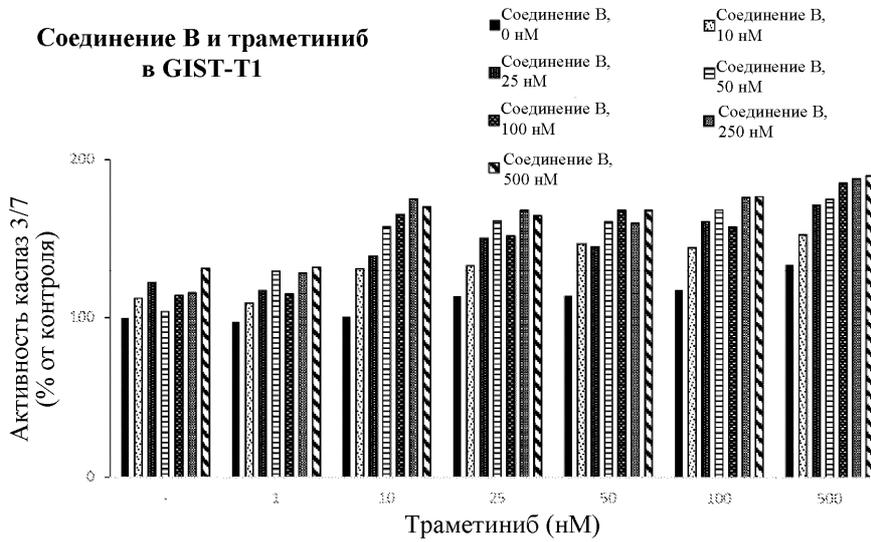
CI	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 250 нМ	Соединение А, 500 нМ	Соединение А, 1000 нМ
Траметиниб, 1 нМ	0,89607	1,05715	1,20054	0,54408	0,42371	0,03244	0,00155
Траметиниб, 10 нМ	1,04701	0,8501	0,32966	0,07514	0,0131	5,13E-04	1,32E-04
Траметиниб, 25 нМ	0,74569	0,19466	0,13966	0,04476	0,01521	0,00128	3,14E-04
Траметиниб, 50 нМ	0,63181	0,12923	0,05747	0,02767	0,00618	8,94E-04	3,39E-04
Траметиниб, 100 нМ	0,0564	0,03232	0,01456	0,00513	0,00183	5,78E-05	4,17E-04
Траметиниб, 250 нМ	0,05133	0,02117	0,00447	0,00255	0,00425	2,46E-04	2,20E-04



График, построенный на основе показателя аддитивности

Фиг. 1Н

Соединение В и траметиниб в GIST-T1



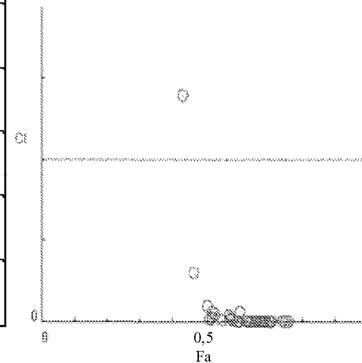
Фиг. 2А

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талая

CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

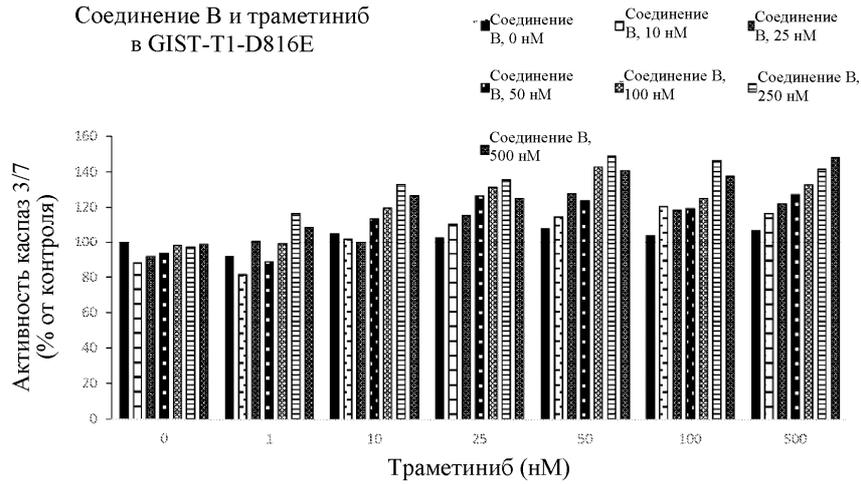
Показатель CI	Соединение В, 10 нМ	Соединение В, 25 нМ	Соединение В, 50 нМ	Соединение В, 100 нМ	Соединение В, 250 нМ	Соединение В, 500 нМ
Траметиниб, 1 нМ	1,39845	0,30024	0,01632	2,30138	0,10126	0,064
Траметиниб, 10 нМ	0,02443	0,00825	6,55E-04	2,14E-04	4,87E-05	1,10E-04
Траметиниб, 25 нМ	0,04489	0,00449	9,92E-04	0,00355	3,69E-04	5,99E-04
Траметиниб, 50 нМ	0,014	0,0184	0,00206	7,38E-04	0,00246	7,39E-04
Траметиниб, 100 нМ	0,03929	0,00411	0,00137	0,00631	4,00E-04	3,70E-04
Траметиниб, 500 нМ	0,06136	0,00435	0,00244	4,54E-04	2,94E-04	2,15E-04

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 2В

Соединение В и траметиниб
в G1ST-T1-D816E



Траметиниб (нМ)

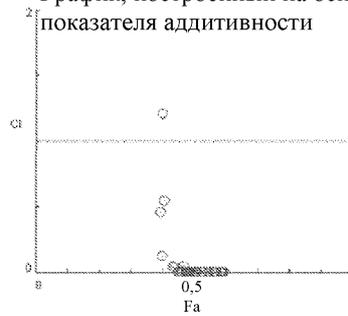
Фиг. 2С

Показатель аддитивности, полученный с
помощью анализа Чоу-Талала

CI < 1 = синергизм
CI = 1 = аддитивный эффект
CI > 1 = антагонизм

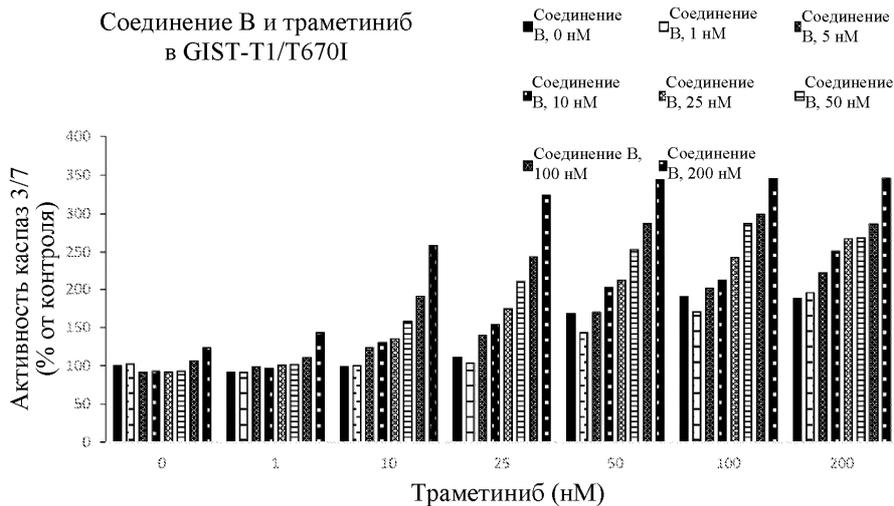
CI	Соединение В, 10 нМ	Соединение В, 25 нМ	Соединение В, 50 нМ	Соединение В, 100 нМ	Соединение В, 250 нМ	Соединение В, 500 нМ
Траметиниб, 1 нМ	665,864	0,12785	26,2251	0,45772	0,00161	0,04969
Траметиниб, 10 нМ	0,54776	1,20639	0,00454	4,57E-04	6,01E-06	1,07E-04
Траметиниб, 25 нМ	0,03782	0,0046	4,67E-05	8,93E-06	2,92E-06	2,39E-04
Траметиниб, 50 нМ	0,01217	4,63E-05	2,61E-04	1,36E-07	2,74E-08	9,66E-07
Траметиниб, 100 нМ	0,00188	0,00445	0,0033	3,10E-04	8,20E-08	3,44E-06
Траметиниб, 500 нМ	0,04614	0,00446	5,99E-04	4,82E-05	1,36E-06	1,23E-07

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 2D

Соединение В и траметиниб
в G1ST-T1/T670I



Траметиниб (нМ)

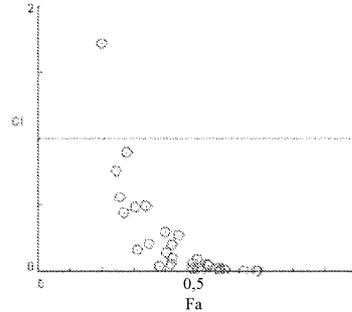
Фиг. 2E

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

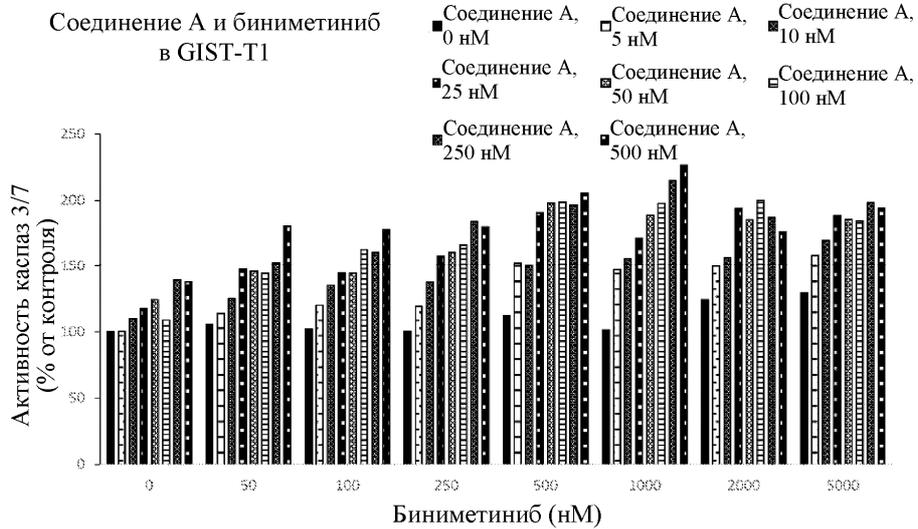
CI	Соединение В, 1 нМ	Соединение В, 5 нМ	Соединение В, 10 нМ	Соединение В, 25 нМ	Соединение В, 50 нМ	Соединение В, 100 нМ	Соединение В, 200 нМ
Трамeтиниб, 1 нМ	1,14152	0,68225	1,61409	0,98075	1,71864	0,29552	0,03118
Трамeтиниб, 10 нМ	2,69122	0,75205	0,55106	0,43683	0,16308	0,04278	0,0037
Трамeтиниб, 25 нМ	5,2964	0,89005	0,48271	0,20367	0,05226	0,01535	7,67E-04
Трамeтиниб, 50 нМ	1,55676	0,48782	0,13831	0,09887	0,02177	0,00642	6,93E-04
Трамeтиниб, 100 нМ	0,95619	0,29266	0,19773	0,06368	0,01283	0,00935	0,00127
Трамeтиниб, 200 нМ	0,72063	0,27355	0,09362	0,05242	0,04964	0,02614	0,0108

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 2F

Соединение А и биниметиниб в GIST-T1



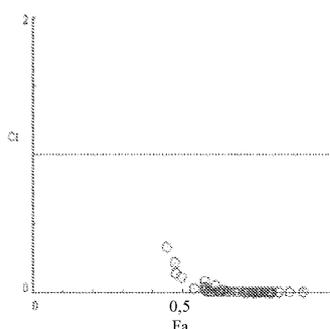
Фиг. 3А

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

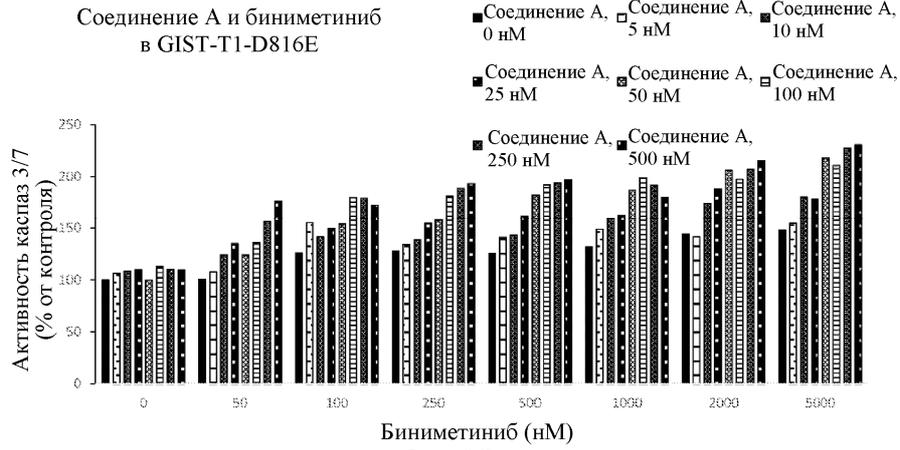
CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

CI	Соединение А, 0 нМ	Соединение А, 5 нМ	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 250 нМ
Биниметиниб, 50 нМ	0,33162	0,11367	0,01361	0,03539	0,08336	0,05317	0,0021
Биниметиниб, 100 нМ	0,13977	0,03047	0,02054	0,04202	0,00686	0,0182	0,00352
Биниметиниб, 250 нМ	0,2221	0,00601	0,00355	0,0046	0,00416	5,34E-04	0,00246
Биниметиниб, 500 нМ	0,00186	0,00463	2,11E-05	1,03E-05	1,45E-05	5,78E-05	2,16E-05
Биниметиниб, 1000 нМ	0,00584	0,0022	4,83E-04	5,74E-05	2,16E-05	9,19E-07	5,62E-08
Биниметиниб, 2000 нМ	0,00526	0,00249	1,18E-05	1,11E-04	1,39E-05	3,10E-04	0,00447
Биниметиниб, 5000 нМ	0,00224	4,19E-04	3,22E-05	1,09E-04	2,53E-04	3,75E-05	2,22E-04

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 3В



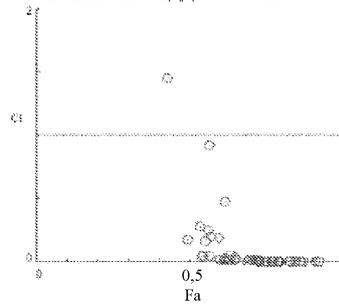
Фиг. 3С

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

$CI < 1$ = синергизм
 $CI = 1$ = аддитивный эффект
 $CI > 1$ = антагонизм

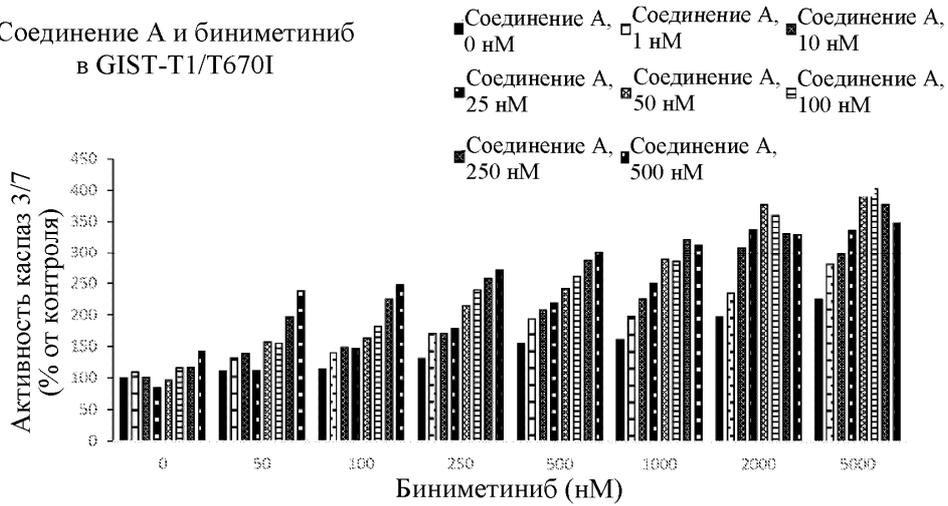
СЭ	Соединение А, 5 нМ	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 250 нМ	Соединение А, 500 нМ
Биниметиниб, 50 нМ	1,4426	0,18041	0,04953	0,18041	0,04533	0,00368	2,70E-04
Биниметиниб, 100 нМ	0,00887	0,04581	0,018	0,01068	3,28E-04	3,65E-04	9,10E-04
Биниметиниб, 250 нМ	0,2784	0,16365	0,02359	0,01571	6,58E-04	2,18E-04	1,05E-04
Биниметиниб, 500 нМ	0,25046	0,19724	0,0189	0,00118	2,38E-04	1,70E-04	1,06E-04
Биниметиниб, 1000 нМ	0,19128	0,05539	0,03323	0,0011	1,63E-04	5,17E-04	0,00294
Биниметиниб, 2000 нМ	0,91612	0,0148	0,00181	7,43E-05	3,72E-04	5,74E-05	8,87E-06
Биниметиниб, 5000 нМ	0,4718	0,01468	0,01892	1,25E-05	7,15E-05	6,91E-07	2,20E-07

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 3D

Соединение А и биниметиниб в G1S-T1/T670I



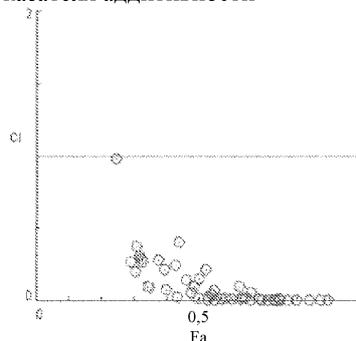
Фиг. 3E

**Показатель аддитивности, полученный с
помощью анализа Чоу-Талалая**

CI < 1 = синергизм
CI = 1 = аддитивный эффект
CI > 1 = антагонизм

CI	Соединение A, 5 нМ	Соединение A, 10 нМ	Соединение A, 25 нМ	Соединение A, 50 нМ	Соединение A, 100 нМ	Соединение A, 250 нМ	Соединение A, 500 нМ
Биниметиниб, 50 нМ	0,26759	0,19769	0,97922	0,09229	0,1009	0,02216	0,00492
Биниметиниб, 100 нМ	0,37303	0,26335	0,28329	0,31079	0,07363	0,01588	0,00691
Биниметиниб, 250 нМ	0,27979	0,27979	0,21379	0,05549	0,02307	0,0121	0,00751
Биниметиниб, 500 нМ	0,2403	0,14108	0,0946	0,04058	0,02056	0,00922	0,00547
Биниметиниб, 1000 нМ	0,40206	0,1466	0,06912	0,01474	0,01722	0,00394	0,00588
Биниметиниб, 2000 нМ	0,21654	0,01366	0,00386	4,15E-04	0,0012	0,00506	0,00572
Биниметиниб, 5000 нМ	0,10041	0,05372	0,01007	3,42E-04	1,38E-04	0,00104	0,00569

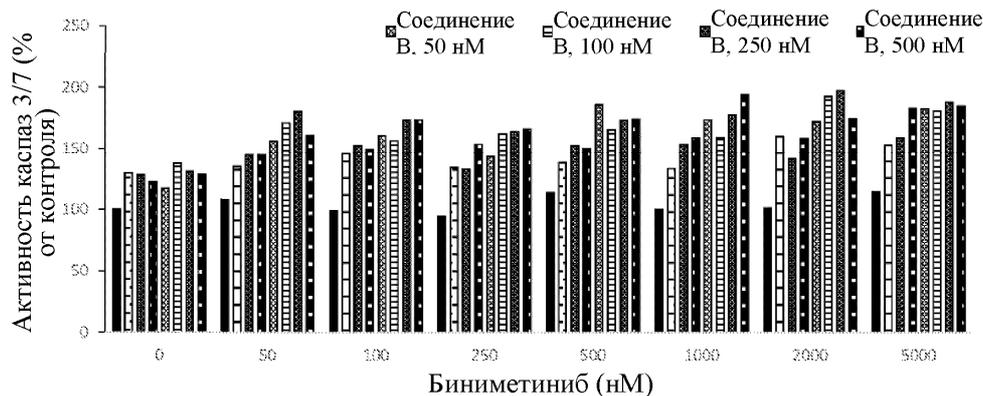
График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 3F

**Соединение В и биниметиниб
в GIST-T1**

■ Соединение В, 0 нМ □ Соединение В, 5 нМ ■ Соединение В, 10 нМ ■ Соединение В, 25 нМ



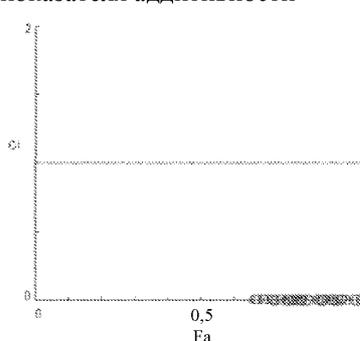
Фиг. 4A

**Показатель аддитивности, полученный
с помощью анализа Чоу-Талалая**

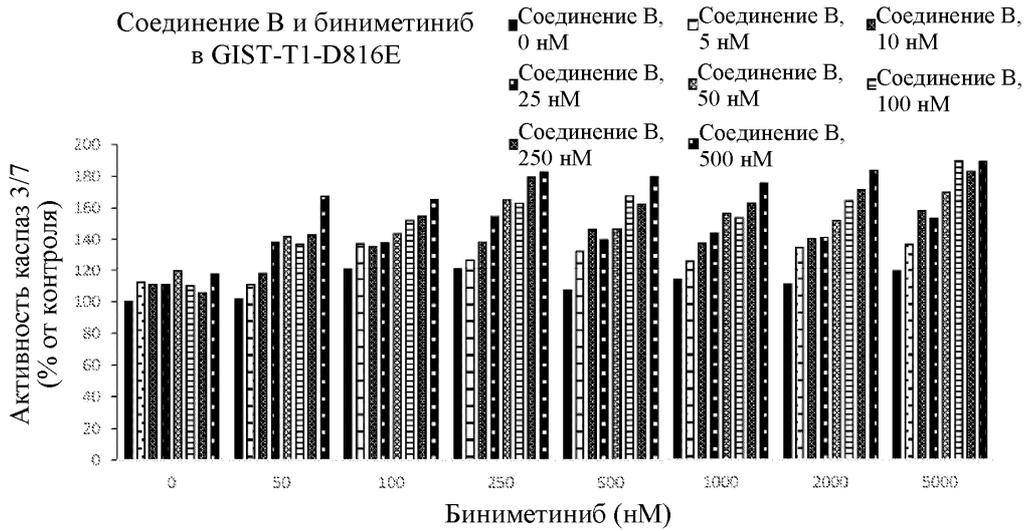
CI < 1 = синергизм
CI = 1 = аддитивный эффект
CI > 1 = антагонизм

CI	Соединение В, 5 нМ	Соединение В, 10 нМ	Соединение В, 25 нМ	Соединение В, 50 нМ	Соединение В, 100 нМ	Соединение В, 250 нМ	Соединение В, 500 нМ
Биниметиниб, 50 нМ	4,65E-06	1,70E-11	3,20E-11	4,90E-19	7,80E-28	2,00E-34	5,50E-22
Биниметиниб, 100 нМ	1,40E-12	4,60E-17	1,40E-14	1,10E-21	3,70E-19	4,30E-29	5,80E-29
Биниметиниб, 250 нМ	1,39E-05	1,87E-04	1,80E-17	3,80E-10	4,30E-22	4,00E-23	5,50E-24
Биниметиниб, 500 нМ	4,02E-08	5,20E-17	2,20E-17	4,50E-39	1,40E-23	4,00E-28	8,40E-29
Биниметиниб, 1000 нМ	4,15E-05	1,80E-17	7,80E-20	5,80E-28	6,50E-20	3,80E-31	4,10E-54
Биниметиниб, 2000 нМ	5,10E-20	1,44E-09	3,00E-19	7,20E-27	3,00E-49	7,20E-68	1,80E-28
Биниметиниб, 5000 нМ	1,30E-16	4,80E-19	4,90E-35	1,20E-34	5,80E-33	7,00E-41	3,70E-37

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 4B



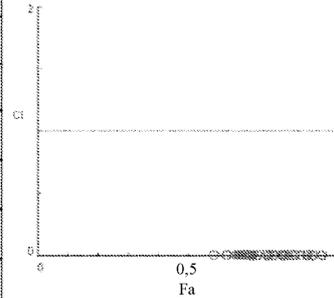
Фиг. 4С

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талала

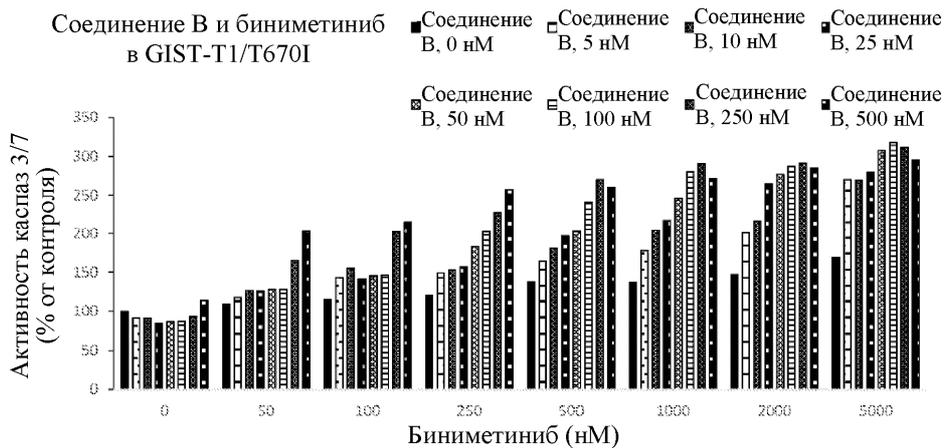
CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

CI	Соединение В, 5 нМ	Соединение В, 10 нМ	Соединение В, 25 нМ	Соединение В, 50 нМ	Соединение В, 100 нМ	Соединение В, 250 нМ	Соединение В, 500 нМ
Биниметиниб, 50 нМ	1,606,78	0,00356	9,50E-11	3,40E-12	3,40E-10	1,10E-12	9,80E-25
Биниметиниб, 100 нМ	4,70E-10	2,81E-09	2,70E-10	1,20E-12	2,60E-16	1,60E-17	3,10E-23
Биниметиниб, 250 нМ	9,63E-06	4,80E-10	3,90E-17	1,00E-22	1,80E-21	6,80E-33	3,20E-36
Биниметиниб, 500 нМ	1,64E-07	4,10E-13	3,20E-10	3,30E-13	9,80E-24	1,00E-20	5,80E-33
Биниметиниб, 1000 нМ	8,87E-05	4,71E-09	1,20E-11	3,30E-17	5,90E-16	9,50E-21	6,10E-29
Биниметиниб, 2000 нМ	9,56E-08	8,80E-10	2,90E-10	6,50E-15	4,00E-21	1,40E-25	5,70E-36
Биниметиниб, 5000 нМ	4,83E-08	1,70E-17	4,50E-15	4,00E-24	3,00E-44	6,30E-35	6,30E-43

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 4D



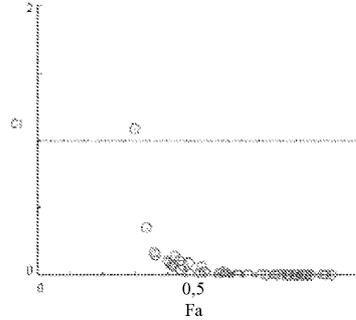
Фиг. 4E

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

CI	Соединение В, 5 нМ	Соединение В, 10 нМ	Соединение В, 25 нМ	Соединение В, 50 нМ	Соединение В, 100 нМ	Соединение В, 250 нМ	Соединение В, 500 нМ
Биниметиниб, 50 нМ	0,34963	,016862	,017353	1,08713	0,15037	0,00828	4,63E-04
Биниметиниб, 100 нМ	0,0904	0,03897	0,10661	0,07571	0,06878	0,00101	3,34E-04
Биниметиниб, 250 нМ	0,13837	0,10561	0,07858	0,01969	0,00238	3,25E-04	2,35E-05
Биниметиниб, 500 нМ	0,0897	0,02509	0,00754	0,00476	1,96E-04	1,17E-05	3,46E-05
Биниметиниб, 1000 нМ	0,06371	0,00878	0,00298	2,52E-04	7,39E-06	2,35E-06	2,08E-05
Биниметиниб, 2000 нМ	0,02182	0,00631	8,43E-05	2,32E-05	6,49E-06	3,90E-06	8,47E-06
Биниметиниб, 5000 нМ	1,21E-04	1,26E-04	4,19E-05	7,69E-07	1,09E-07	3,77E-07	5,71E-06

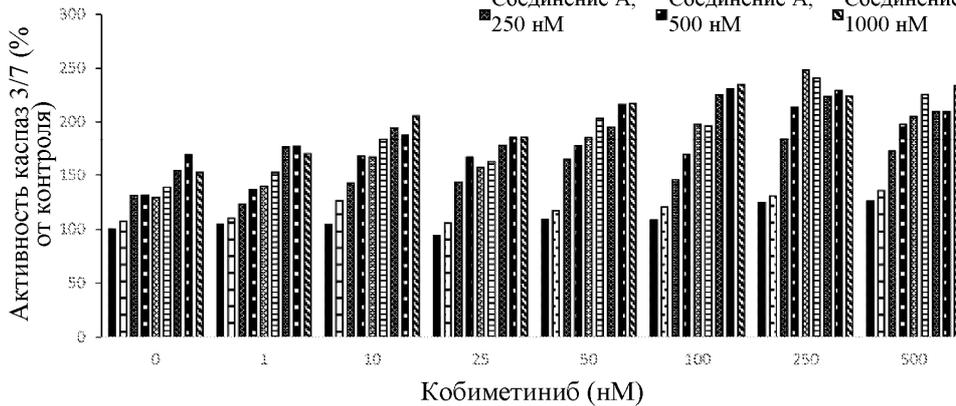
График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 4F

Соединение А и кобиметиниб в GIST-T1

■ Соединение А, 0 нМ
 ■ Соединение А, 25 нМ
 ■ Соединение А, 250 нМ
 □ Соединение А, 1 нМ
 □ Соединение А, 50 нМ
 □ Соединение А, 500 нМ
 ■ Соединение А, 10 нМ
 ■ Соединение А, 100 нМ
 ■ Соединение А, 1000 нМ



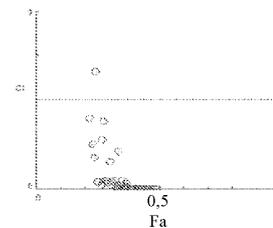
Фиг. 5А

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

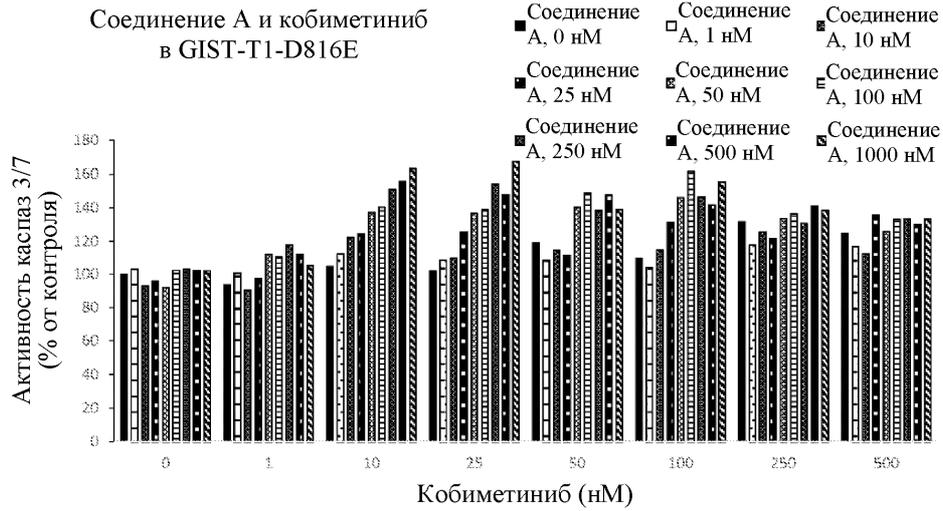
CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

CI	Соединение А, 1 нМ	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 200 нМ	Соединение А, 500 нМ	Соединение А, 1000 нМ
Кобиметиниб, 1 нМ	0,79708	1,31592	0,55315	0,75613	0,30708	0,04872	0,09745	0,42662
Кобиметиниб, 10 нМ	0,0855	0,0977	0,01338	0,02833	0,00855	0,0069	0,02772	0,00822
Кобиметиниб, 25 нМ	3,4939	0,09192	0,01338	0,08493	0,0949	0,04362	0,03441	0,06882
Кобиметиниб, 50 нМ	0,50545	0,00754	0,00461	0,00363	0,00107	0,00621	0,00138	0,00249
Кобиметиниб, 100 нМ	0,34962	0,0678	0,01067	9,52E-04	0,00223	2,74E-04	3,13E-04	4,17E-04
Кобиметиниб, 250 нМ	0,08223	8,55E-04	8,95E-04	5,31E-06	2,27E-05	3,37E-04	3,47E-04	0,00122
Кобиметиниб, 500 нМ	0,04575	0,00305	4,76E-04	4,33E-04	1,04E-04	0,00135	0,00271	4,62E-04

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 5B



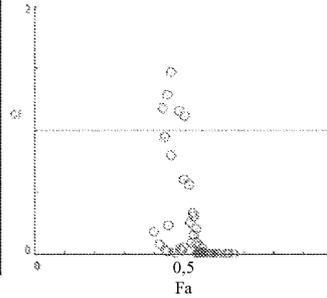
Фиг. 5С

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талала

CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

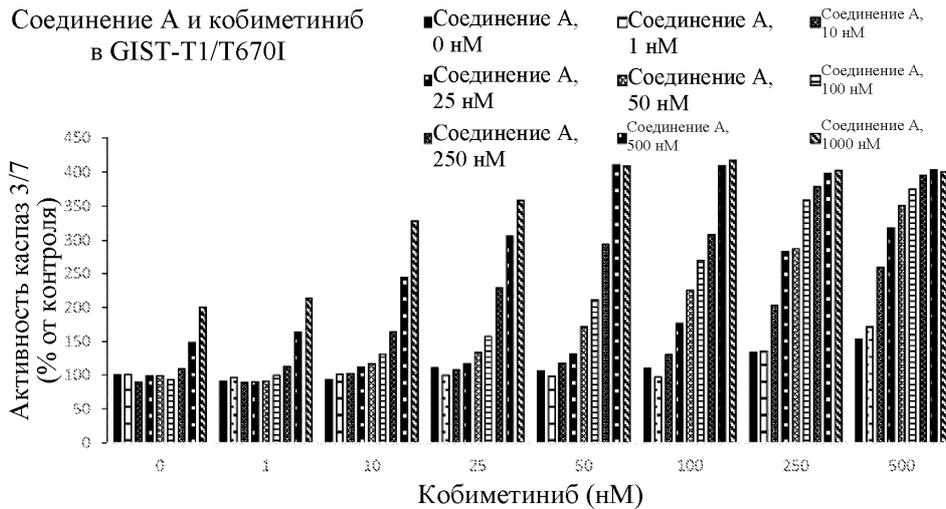
CI	Соединение А, 1 нМ	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 200 нМ	Соединение А, 500 нМ	Соединение А, 1000 нМ
Кобиметиниб, 1 нМ	0,18534	438696	4,76549	0,02461	0,03479	0,00915	0,02461	0,08008
Кобиметиниб, 10 нМ	0,23568	0,04233	0,03138	0,00324	0,00193	3,04E-04	1,35E-04	3,08E-05
Кобиметиниб, 25 нМ	1,17886	0,94861	0,0607	0,00882	0,00598	4,44E-04	0,00129	3,77E-05
Кобиметиниб, 50 нМ	2,46263	0,79943	1,28476	0,00963	0,00227	0,01361	0,00259	0,01248
Кобиметиниб, 100 нМ	10,3649	1,46703	0,09078	0,00705	4,08E-04	0,00675	0,01549	0,00135
Кобиметиниб, 250 нМ	2,28677	0,60705	1,15264	0,15427	0,09612	0,25807	0,04413	0,06806
Кобиметиниб, 500 нМ	5,42979	11,784	0,20954	1,11463	0,33621	0,30855	0,56228	0,30855

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 5D

Соединение А и кобиметиниб в G1ST-T1/T670I



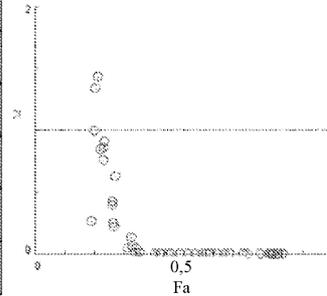
Фиг. 5E

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

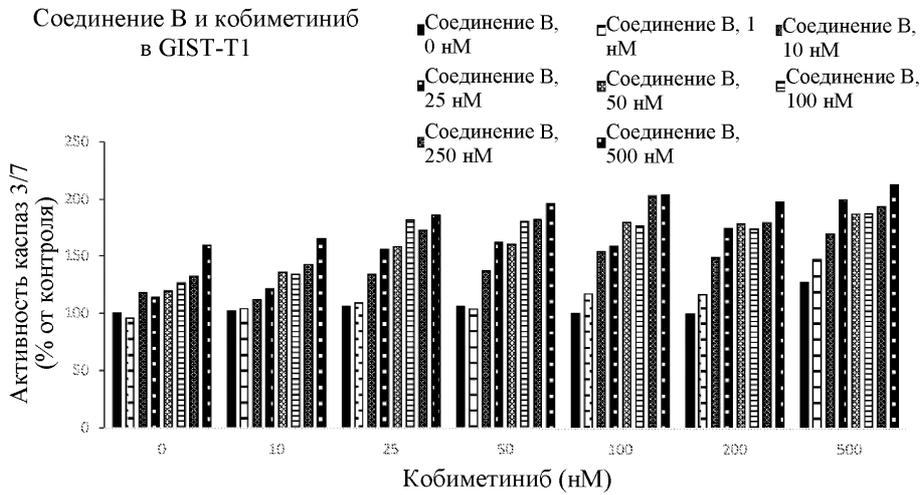
CI	Соединение А, 1 нМ	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 200 нМ	Соединение А, 500 нМ	Соединение А, 1000 нМ
Кобиметиниб, 1 нМ	0,26554	2,67726	5,76653	10,5467	7,71672	4,89163	0,13285	0,0072
Кобиметиниб, 10 нМ	0,9985	1,33769	0,84391	0,86036	0,39351	0,06559	4,54E-04	2,51E-06
Кобиметиниб, 25 нМ	2,8673	1,43276	0,75657	0,22264	0,04996	6,46E-04	6,27E-06	2,47E-07
Кобиметиниб, 50 нМ	6,77934	0,90654	0,2524	0,01232	0,00104	7,27E-06	8,00E-10	1,99E-09
Кобиметиниб, 100 нМ	16,1737	0,4255	0,00853	2,79E-04	1,89E-05	3,10E-06	9,50E-10	7,40E-10
Кобиметиниб, 250 нМ	0,62392	0,0019	5,23E-06	4,56E-06	3,00E-08	1,07E-08	3,20E-09	4,13E-09
Кобиметиниб, 500 нМ	0,04617	5,14E-05	5,56E-07	4,53E-08	1,19E-09	2,52E-09	1,94E-09	5,19E-09

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 5F

Соединение В и кобиметиниб в GIST-T1



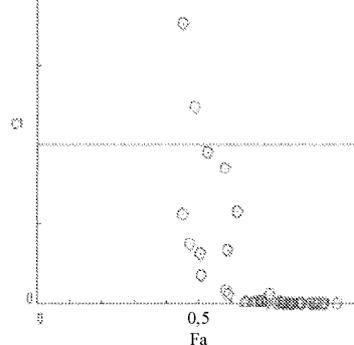
Фиг. 6A

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

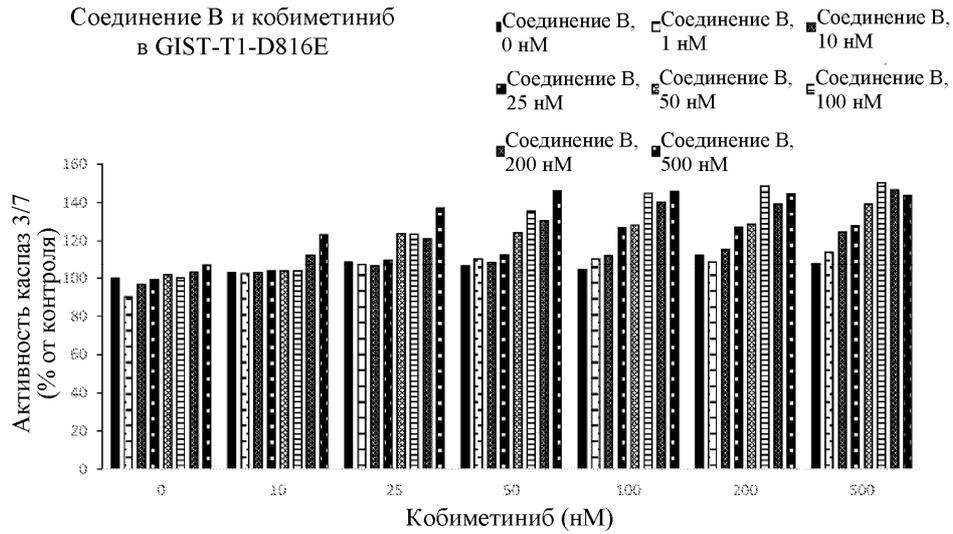
CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

CI	Соединение В, 1 нМ	Соединение В, 10 нМ	Соединение В, 25 нМ	Соединение В, 50 нМ	Соединение В, 100 нМ	Соединение В, 200 нМ	Соединение В, 500 нМ
Кобиметиниб, 10 нМ	0,56205	1,23447	0,95172	0,33923	0,8499	0,57466	0,05953
Кобиметиниб, 25 нМ	0,37301	0,08307	0,01254	0,01607	0,000825	0,00764	0,00181
Кобиметиниб, 50 нМ	1,76547	0,06105	0,00477	0,01282	0,000975	0,00158	0,0002
Кобиметиниб, 100 нМ	0,17549	0,00644	0,0073	0,000551	0,00193	1,34E-05	2,54E-05
Кобиметиниб, 200 нМ	0,3168	0,01266	0,000656	0,000703	0,00317	0,00249	0,000126
Кобиметиниб, 500 нМ	0,00186	0,000613	4,14E-06	0,000144	0,000251	0,000131	8,3E-07

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 6B



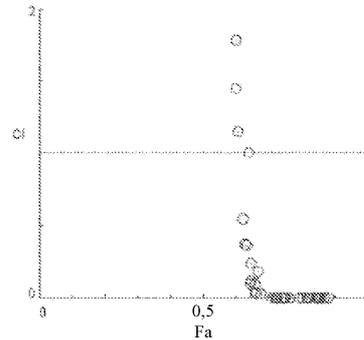
Фиг. 6С

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

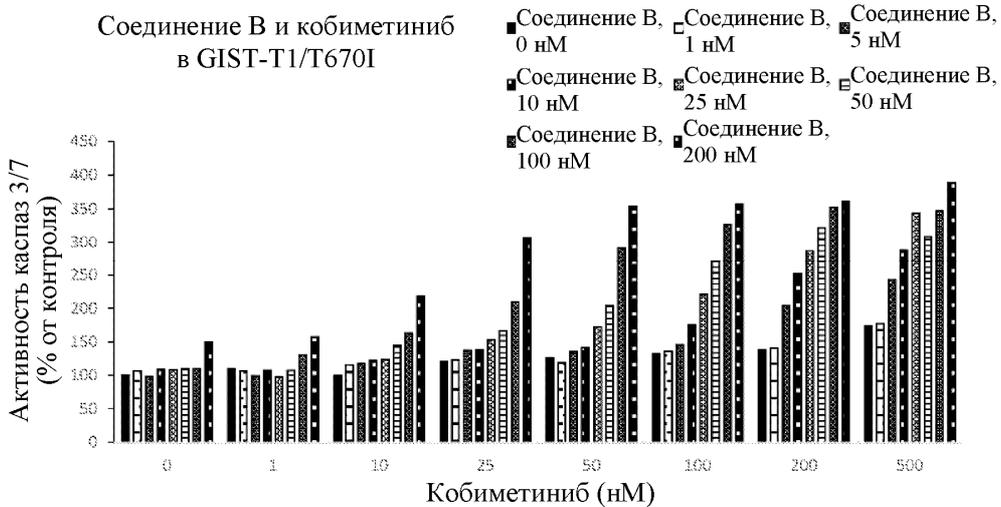
$CI < 1$ = синергизм
 $CI = 1$ = аддитивный эффект
 $CI > 1$ = антагонизм

График, построенный на основе показателя аддитивности

CI	Соединение В, 1 нМ	Соединение В, 10 нМ	Соединение В, 25 нМ	Соединение В, 50 нМ	Соединение В, 100 нМ	Соединение В, 200 нМ	Соединение В, 500 нМ
Кобиметиниб, 10 нМ	1,78658	1,4423	33,0169	1,15037	7,15955	0,03569	0,000619
Кобиметиниб, 25 нМ	0,37205	0,54877	0,09771	7,19E-05	0,000137	0,000781	3,5E-07
Кобиметиниб, 50 нМ	0,12042	0,36756	0,0391	8,29E-05	2,14E-07	6,79E-06	7,2E-10
Кобиметиниб, 100 нМ	0,24051	0,09661	2,61E-05	1,04E-05	4,2E-10	2,11E-08	1,07E-09
Кобиметиниб, 200 нМ	1,00074	0,03502	3,02E-05	1,47E-05	1,8E-11	3,89E-08	2,34E-09
Кобиметиниб, 500 нМ	0,1855	0,000379	4,48E-05	1,86E-08	4,1E-12	1,8E-10	3,97E-09



Фиг. 6D



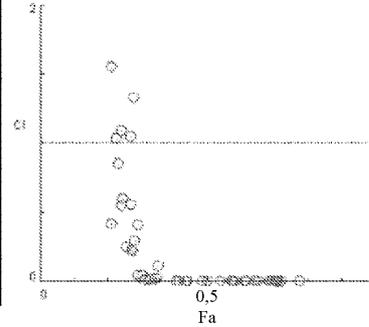
Фиг. 6E

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

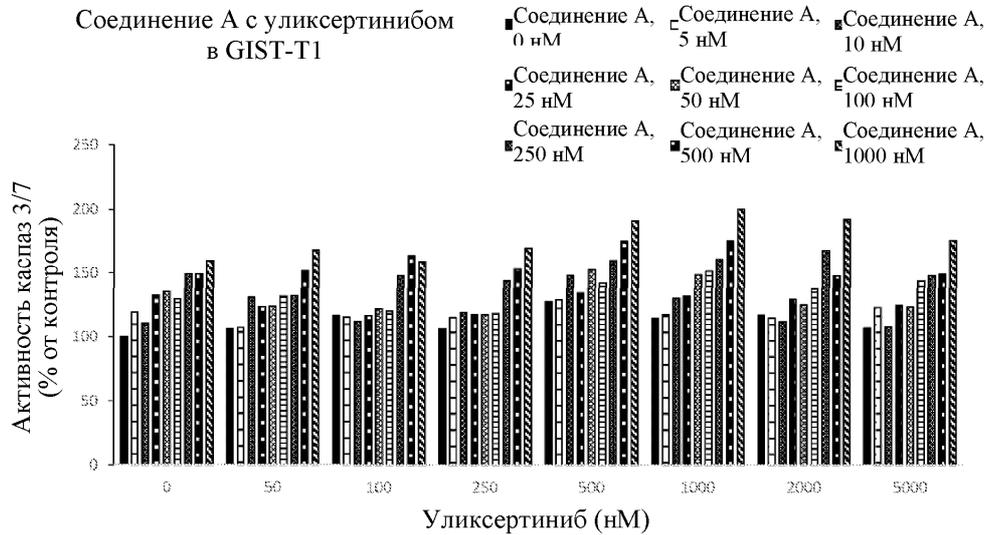
CI	Соединение В, 1 нМ	Соединение В, 5 нМ	Соединение В, 10 нМ	Соединение В, 25 нМ	Соединение В, 50 нМ	Соединение В, 100 нМ	Соединение В, 200 нМ
Кобиметиниб, 1 нМ	0,41369	3,735	1,55347	21,4235	6,74637	0,24978	0,00783
Кобиметиниб, 10 нМ	1,03215	0,85167	0,54699	0,59718	0,05047	0,00877	6,73E-05
Кобиметиниб, 25 нМ	1,09419	0,2284	0,22022	0,04847	0,0152	3,62E-04	1,23E-07
Кобиметиниб, 50 нМ	3,39319	0,55609	0,29001	0,01725	0,00105	8,66E-07	3,52E-09
Кобиметиниб, 100 нМ	1,04878	0,40707	0,02628	5,35E-04	9,31E-06	8,64E-08	5,25E-09
Кобиметиниб, 200 нМ	1,33157	0,00418	9,39E-05	5,03E-06	2,57E-07	1,63E-08	6,70E-09
Кобиметиниб, 500 нМ	0,10996	4,48E-04	1,11E-05	9,15E-08	2,16E-06	5,98E-08	8,60E-10

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 6F

Соединение А с уликсртинибом в GIST-T1



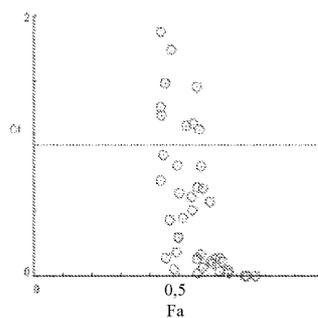
Фиг. 7A

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

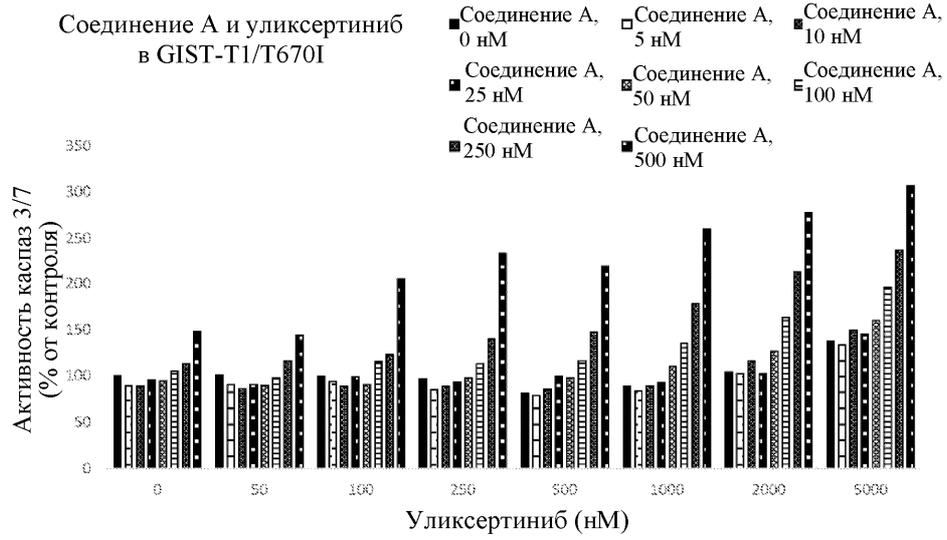
CI < 1 = синергизм
 CI = 1 = аддитивный эффект
 CI > 1 = антагонизм

CI	Соединение А, 5 нМ	Соединение А, 5 нМ	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 200 нМ	Соединение А, 500 нМ	Соединение А, 1000 нМ
Уликсртиниб, 50 нМ	397033	12152,7	0,29353	2,00594	3,73337	2,73202	6,357	0,83994	0,143
Уликсртиниб, 100 нМ	15,0853	1,23598	7,30524	4,9472	4,97932	12,3642	0,67675	0,13312	0,57025
Уликсртиниб, 250 нМ	1,3E+11	1,29932	1,48118	4,60126	9,20222	16,5094	1,16864	0,67302	0,1129
Уликсртиниб, 500 нМ	0,14288	0,18202	0,0261	0,44394	0,06984	0,60244	0,12257	0,0243	0,00367
Уликсртиниб, 1000 нМ	0,05213	0,92137	0,30425	0,6357	0,13049	0,16799	0,10139	0,02333	6,50E-04
Уликсртиниб, 2000 нМ	9233,7	1,87274	70,9971	0,84709	3,23328	1,15347	0,03718	1,45611	0,00291
Уликсртиниб, 5000 нМ	0,7266	0,43113	274131	1,73715	3,87011	0,50263	0,67675	1,12708	0,0448

График, построенный на основе показателя аддитивности



Фиг. 7B



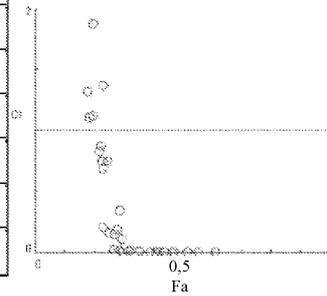
Фиг. 7С

Показатель аддитивности, полученный с помощью анализа Чоу-Талалая

$CI < 1$ = синергизм
 $CI = 1$ = аддитивный эффект
 $CI > 1$ = антагонизм

CI	Соединение А, 5 нМ	Соединение А, 10 нМ	Соединение А, 25 нМ	Соединение А, 50 нМ	Соединение А, 100 нМ	Соединение А, 200 нМ	Соединение А, 500 нМ
Уликсртиниб, 50 нМ	1,31834	3,57672	2,90308	5,56256	3,88493	1,36233	0,3461
Уликсртиниб, 100 нМ	1,10711	3,91925	1,11824	5,40429	0,75024	0,75332	0,00559
Уликсртиниб, 250 нМ	17,7013	8,33131	4,13239	2,71447	0,87632	0,19479	9,10E-04
Уликсртиниб, 500 нМ	175,181	27,9521	1,87828	0,83106	0,68648	0,11088	0,00217
Уликсртиниб, 1000 нМ	87,5534	27,0813	11,9376	3,57	0,14557	0,013	1,83E-04
Уликсртиниб, 2000 нМ	2,74177	0,20886	3,54357	0,1633	0,01821	0,00135	6,21E-05
Уликсртиниб, 5000 нМ	0,02425	0,00614	0,01896	0,01184	0,00199	2,93E-04	9,86E-06

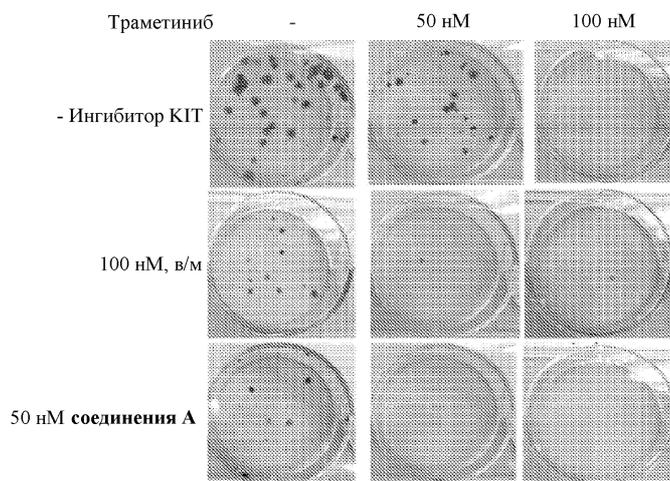
График, построенный на основе показателя аддитивности



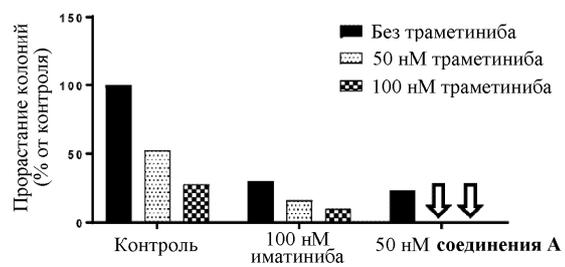
Фиг. 7D

GIST-T1

Обработка лекарственным средством – 2 нед.,
восстановление – 9 дней

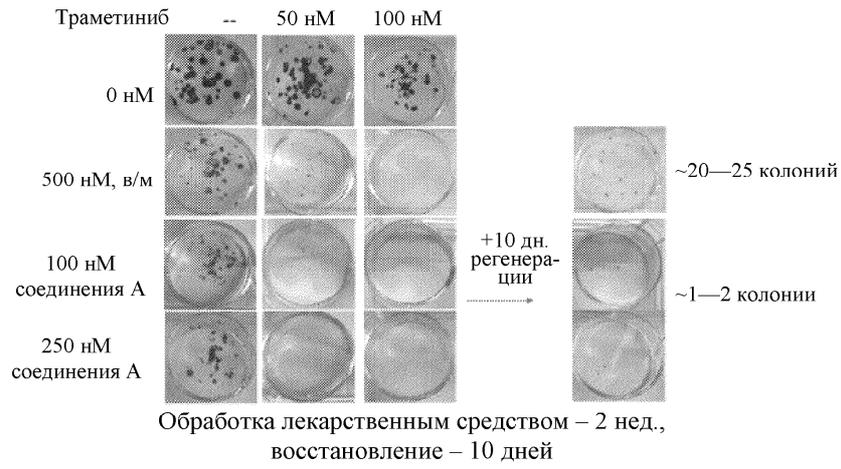


Клетки GIST T1

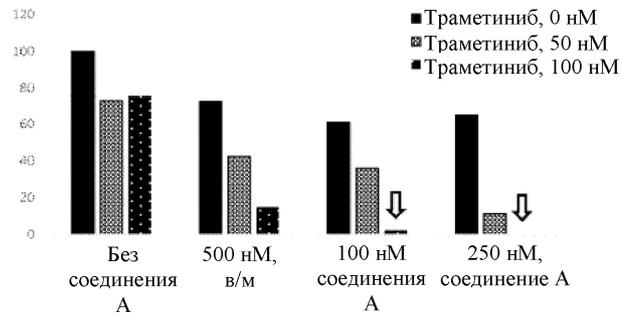


Фиг. 8А

GIST-T1/D816E

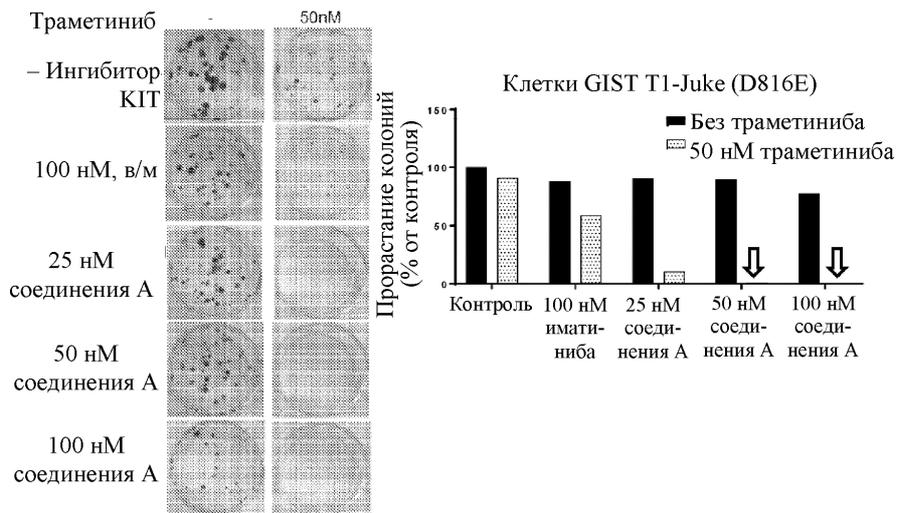


Иматиниб/соединение А в клетках GIST-T1/D816E



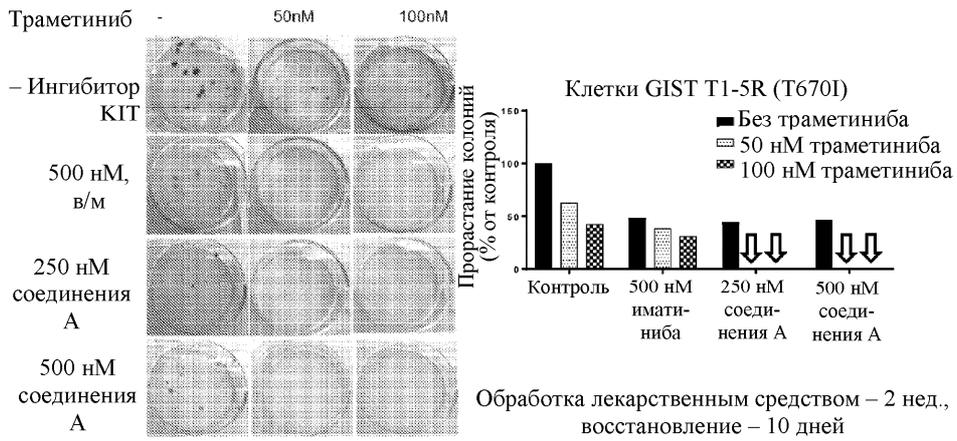
Фиг. 8В

GIST-T1/D816E



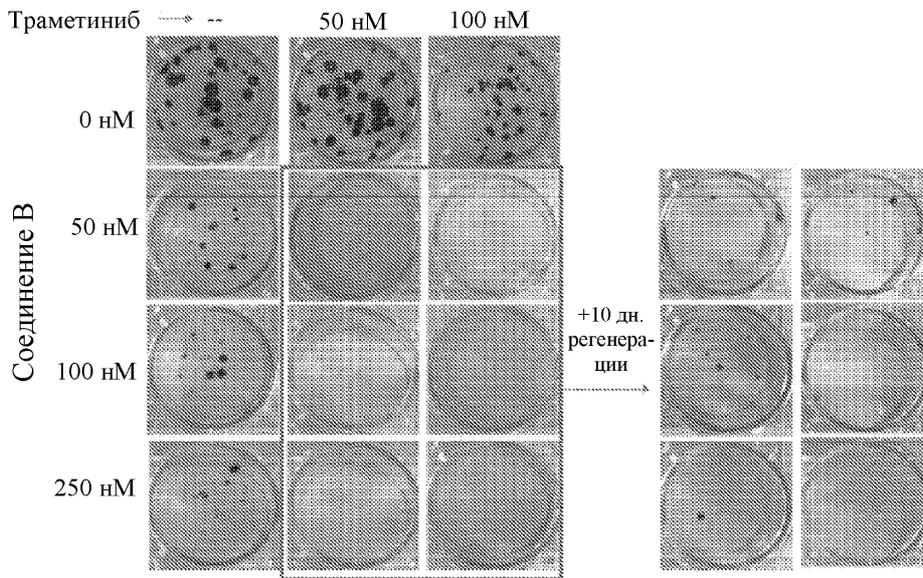
Фиг. 8С

GIST-T1/T670I

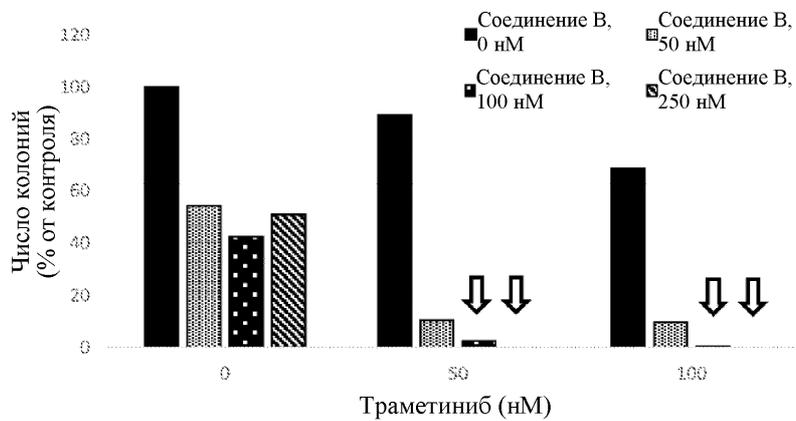


Фиг. 8D

GIST-T1

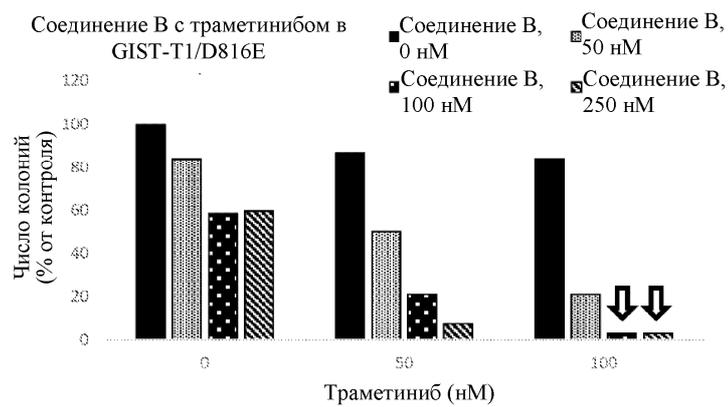
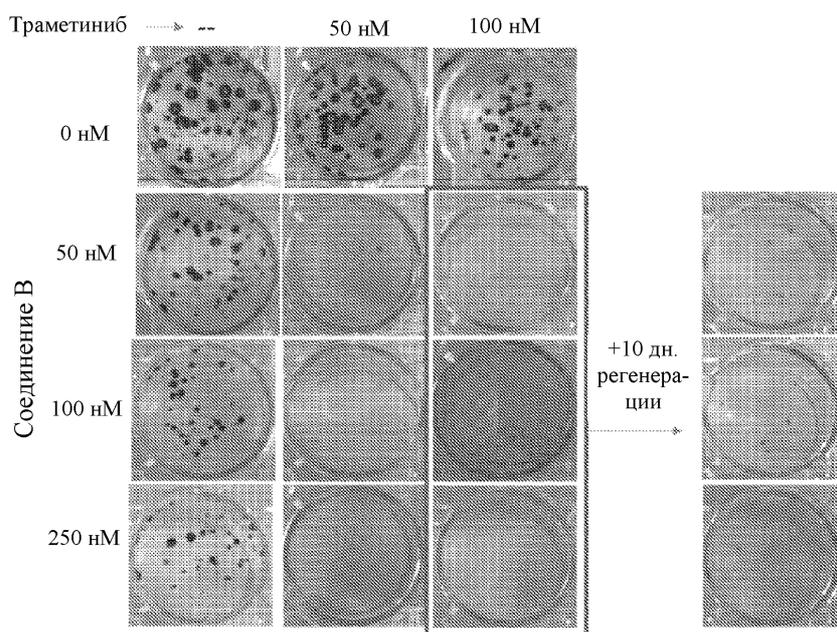


Соединение В и траметиниб в GIST-T1

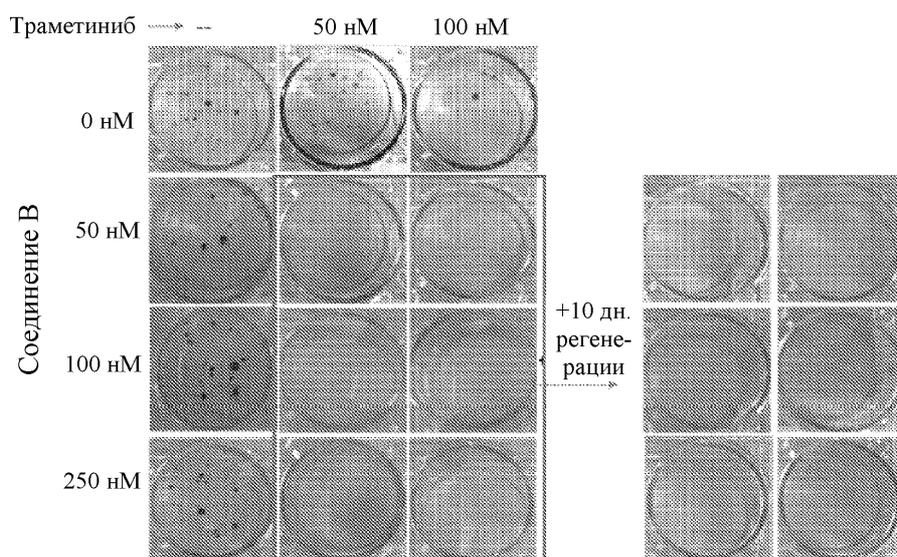


Фиг. 9А

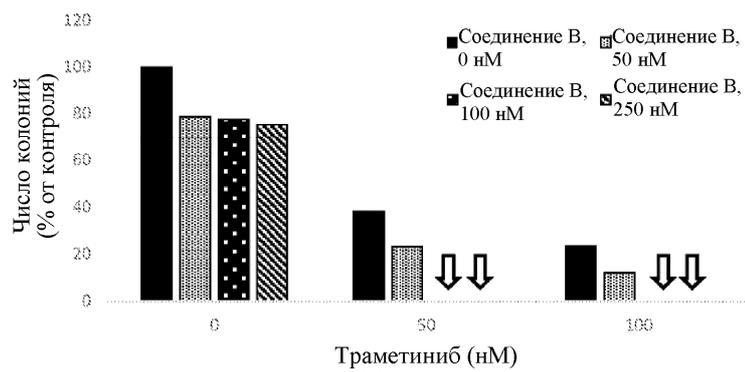
GIST-T1/D816E



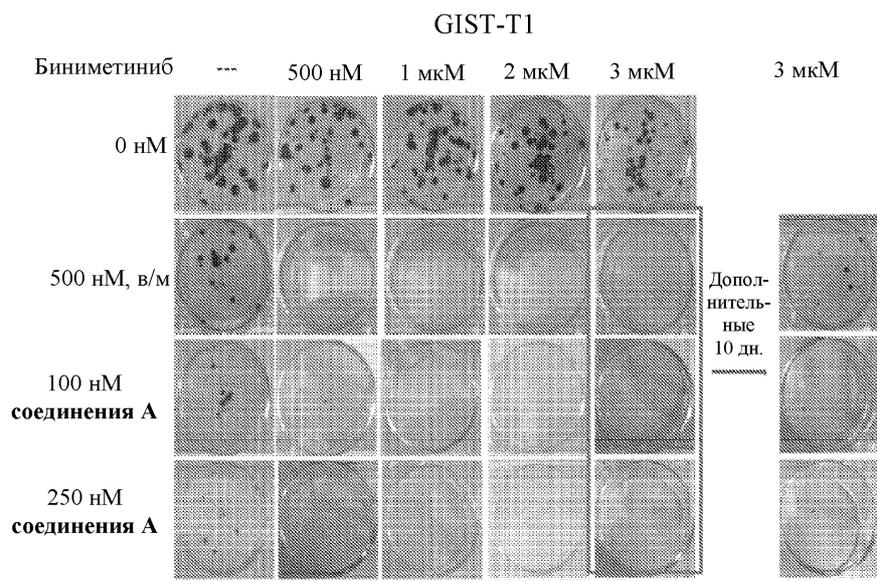
GIST-T1/T670I



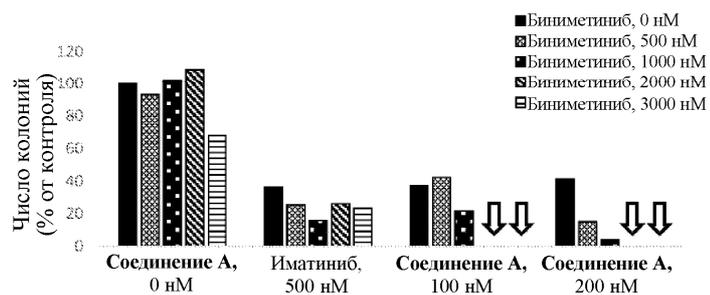
Соединение В с траметинибом в GIST-T1/T670I



Фиг. 9С

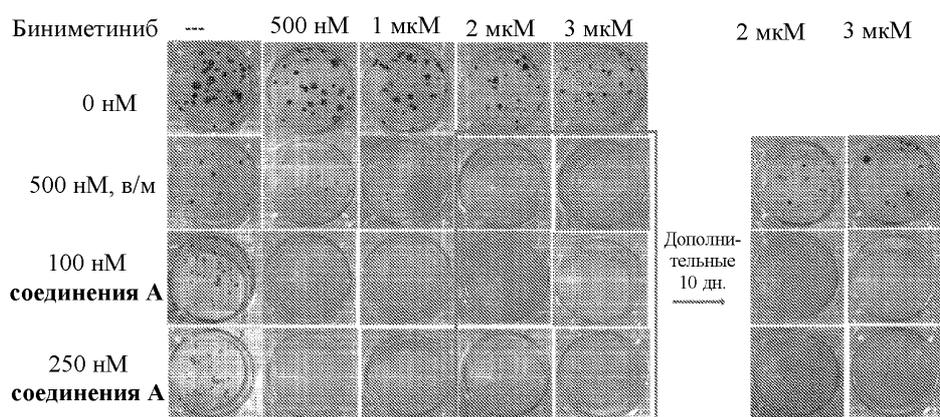


Иматиниб/соединение А с биниметинибом в GIST-T1

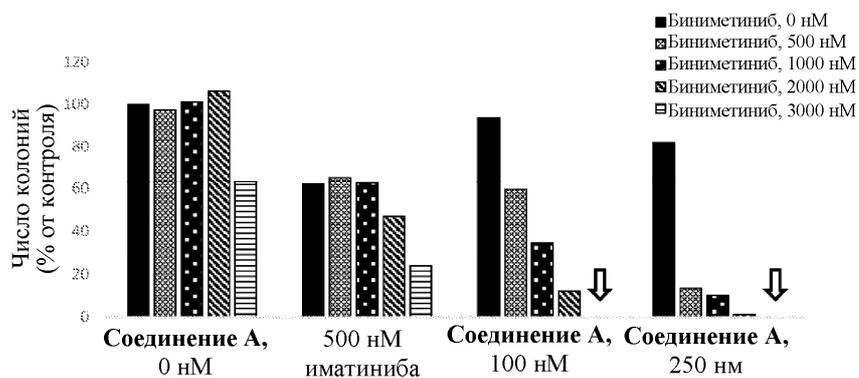


Фиг. 10А

GIST-T1/D816E

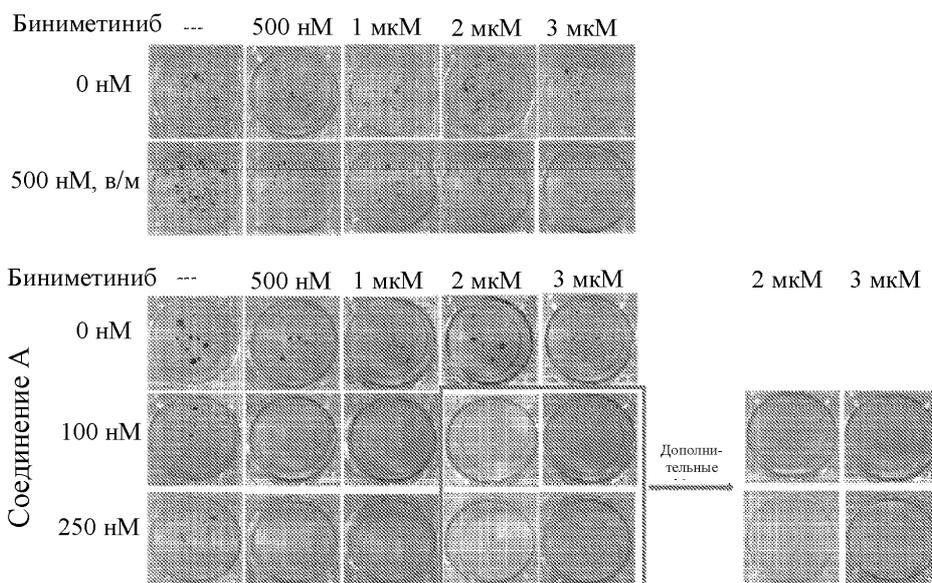


Иматиниб/соединение А и биниметиниб в GIST-T1/D816E

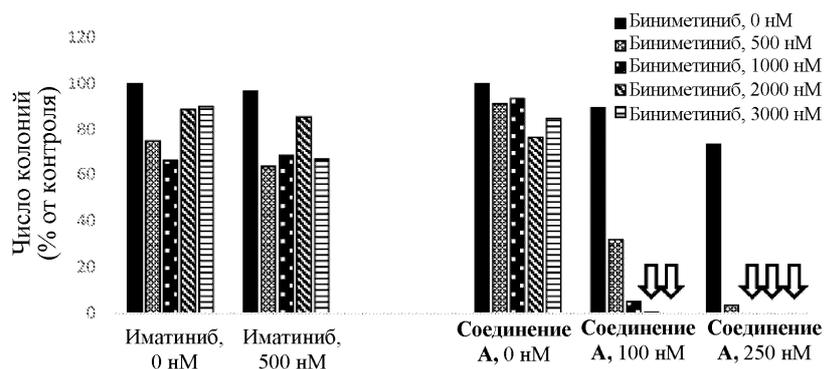


Фиг. 10В

GIST-T1/T670I



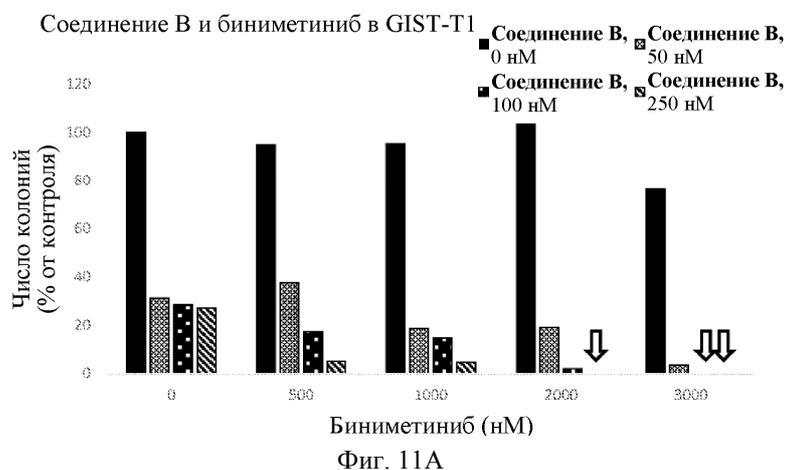
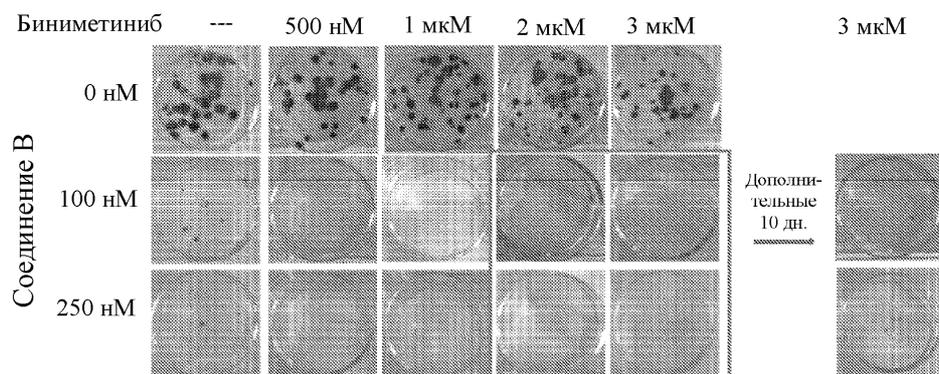
Иматиниб/соединение А и биниметиниб в GIST-T1/T670I



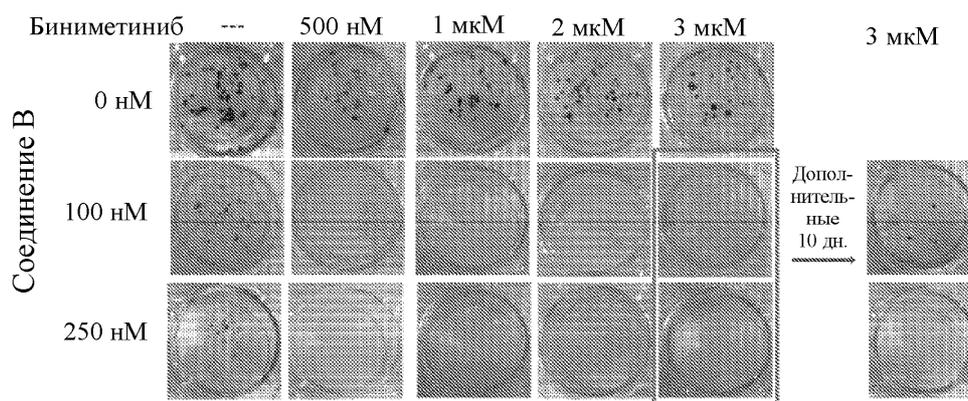
Фиг. 10С

047770

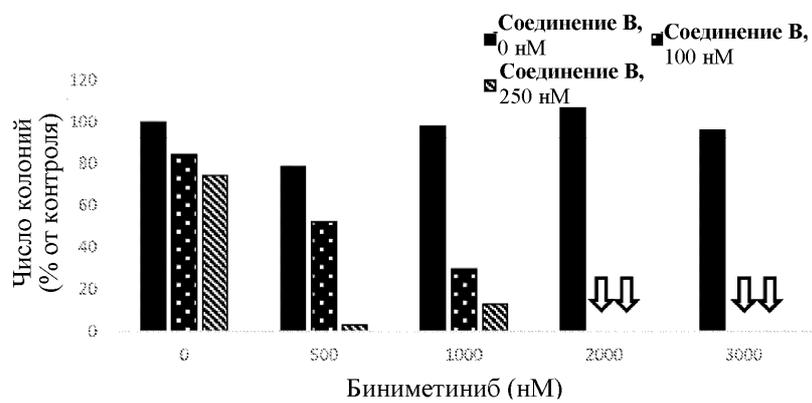
GIST-T1



GIST-T1/D816E

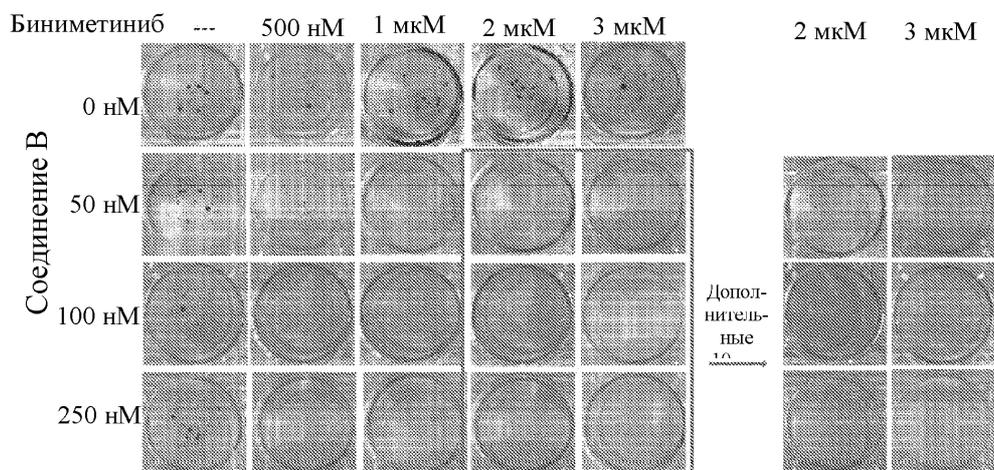


Соединение В и биниметиниб в GIST-T1/D816E

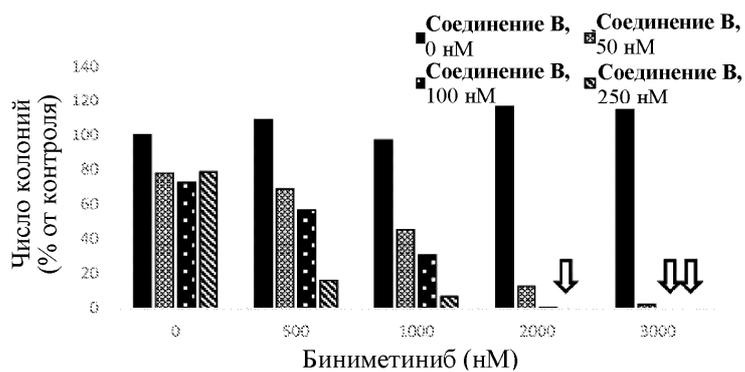


Фиг. 11В

GIST-T1/T670I

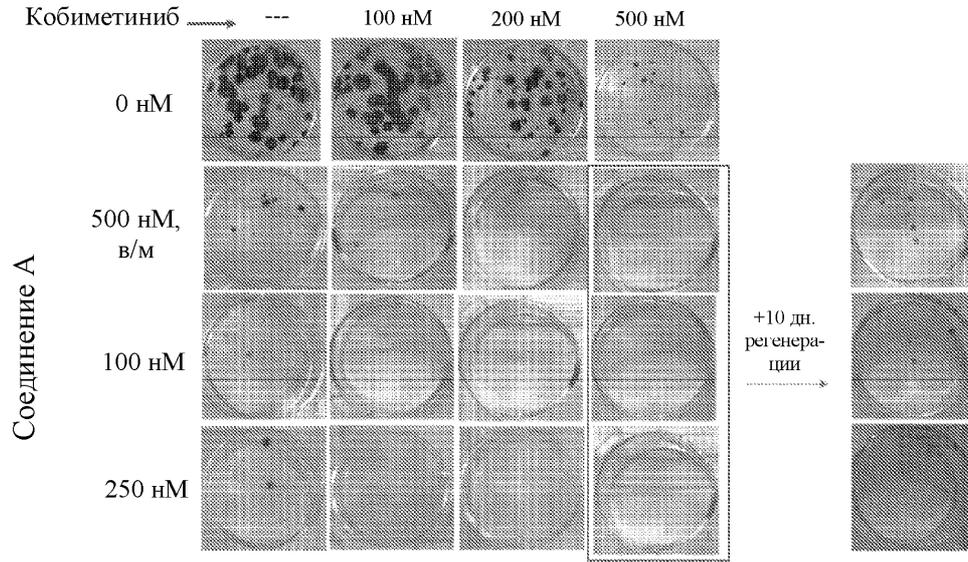


Соединение В и биниметиниб в GIST-T1/T670I

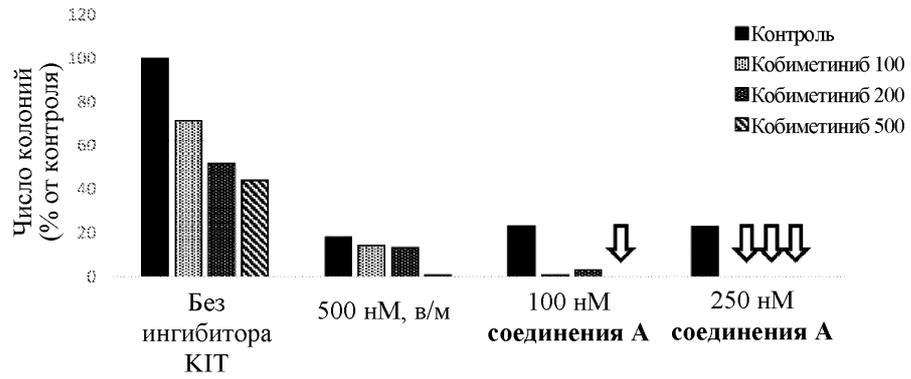


Фиг. 11С

GIST-T1

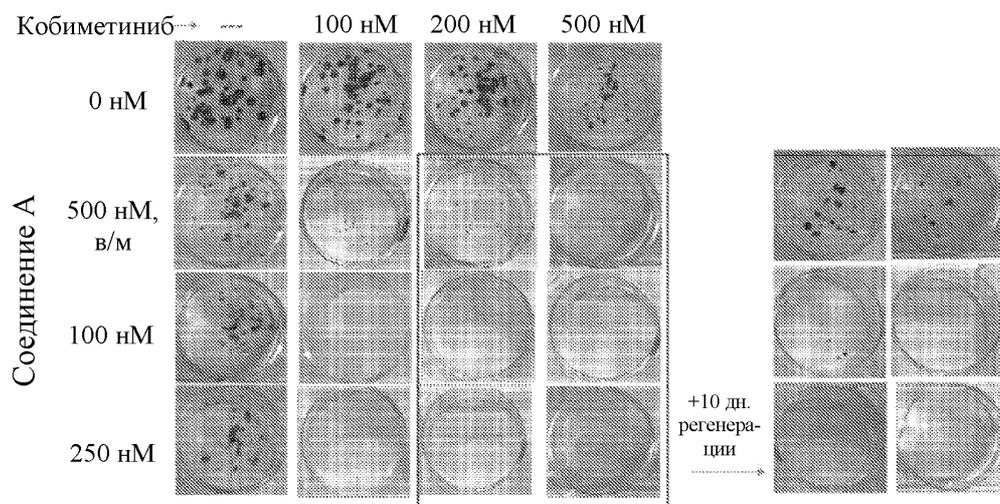


Иматиниб/соединение А с кобиметинибом в GIST-T1

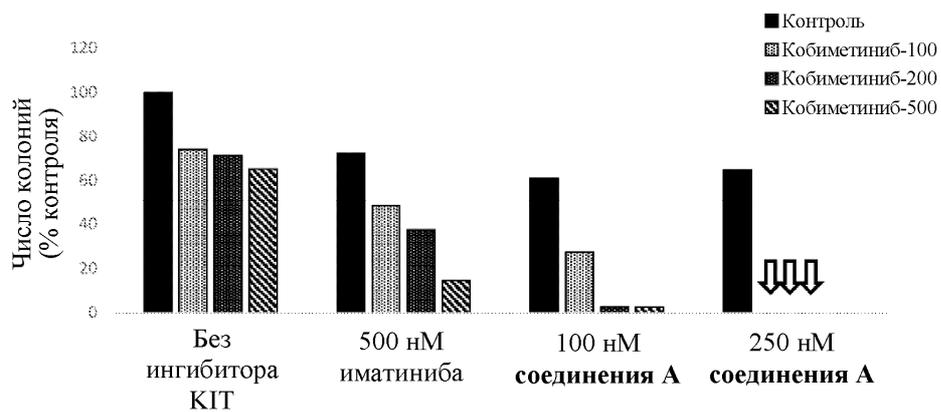


Фиг. 12А

GIST-T1/D816E

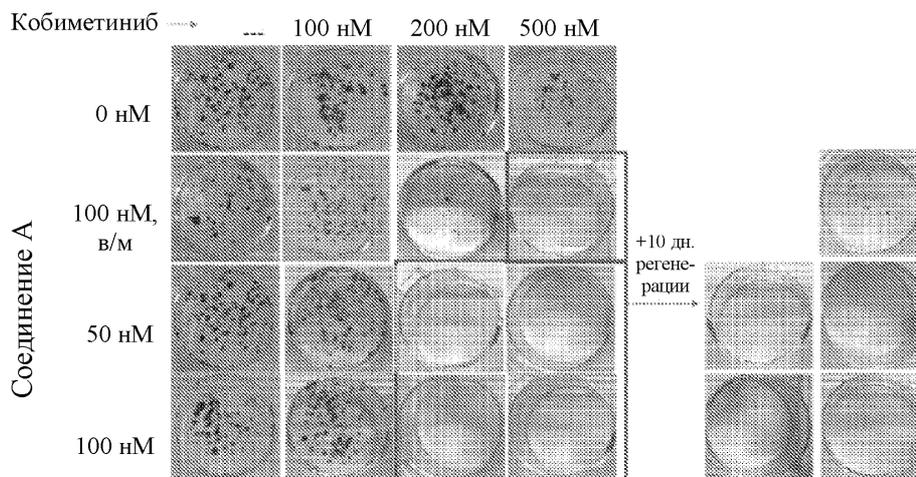


Иматиниб/соединение А с кобиметинибом в GIST-T1/D816E

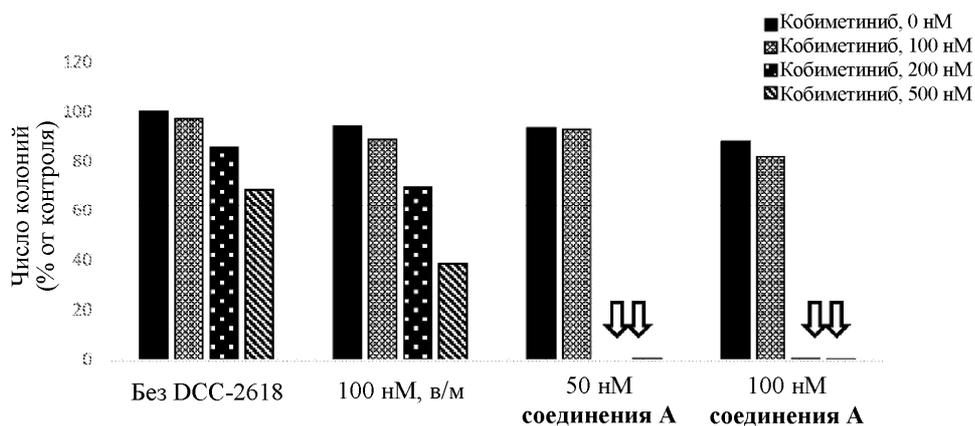


Фиг. 12В

GIST-T1/T670I

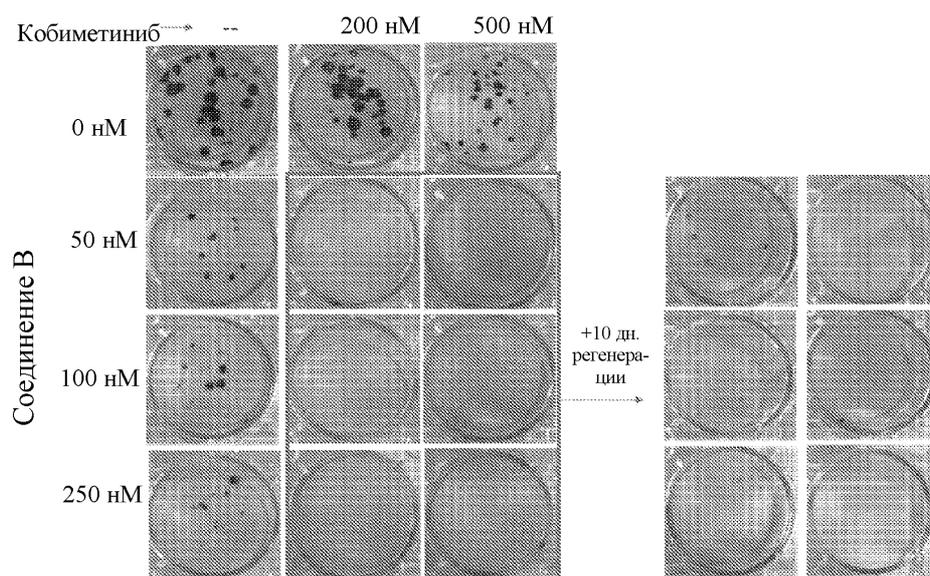


Иматиниб/соединение А с кобиметинибом в GIST-T1/T670I

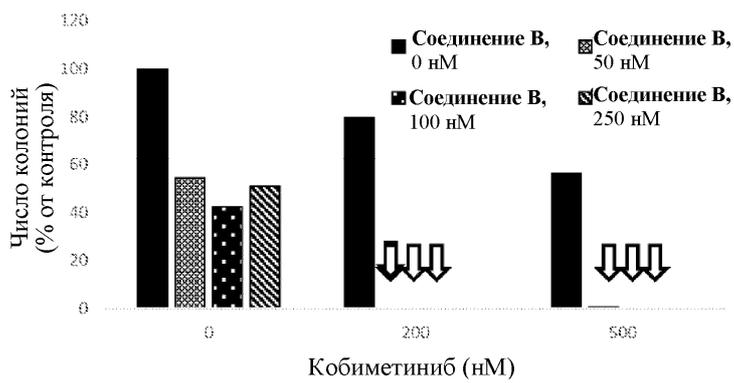


Фиг. 12С

GIST-T1

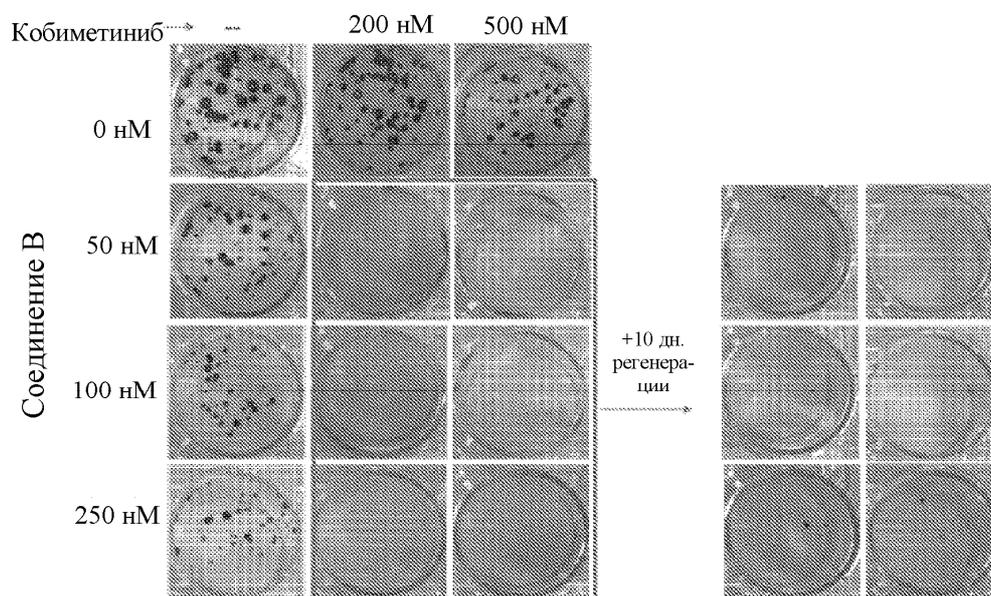


Соединение В и кобиметиниб в GIST-T1

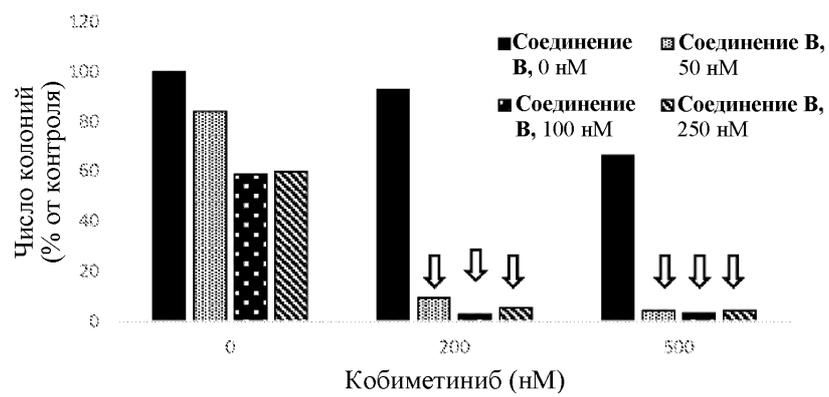


Фиг. 13А

GIST-T1/D816E

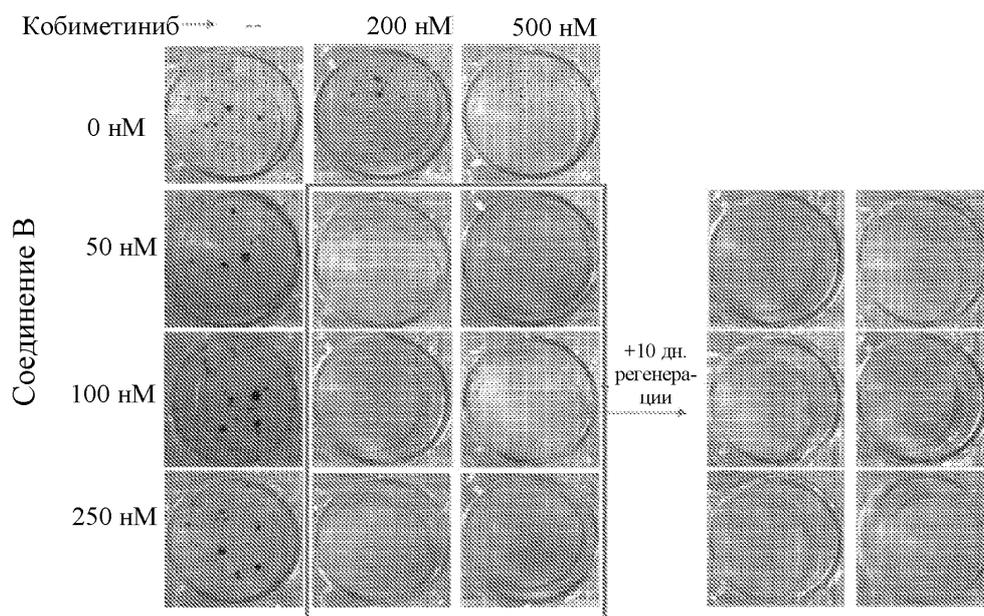


Соединение В с кобиметинибом в GIST-T1/D816E

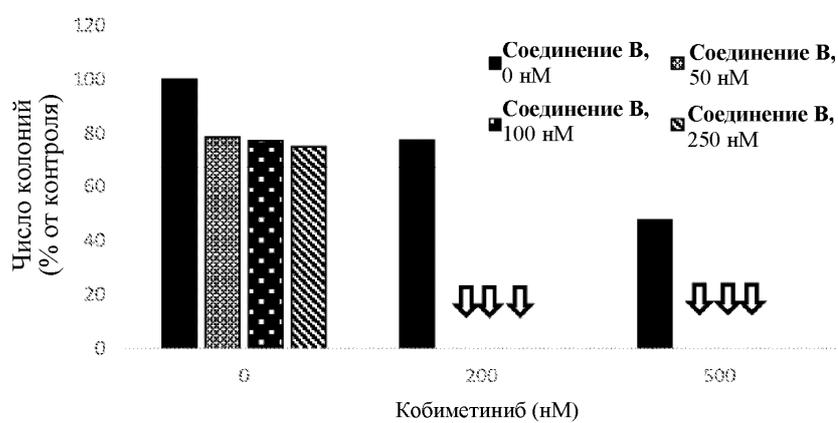


Фиг. 13В

GIST-T1/T670I

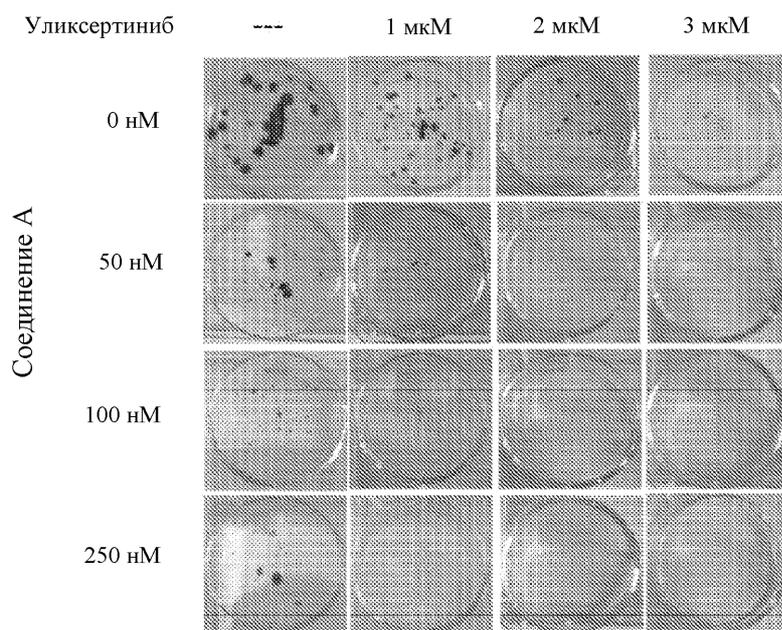


Соединение В с кобиметинибом в GIST-T1/T670I

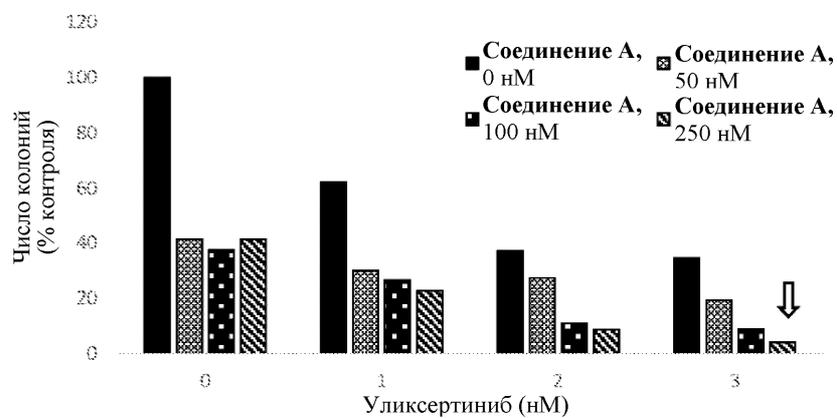


Фиг. 13С

GIST-T1

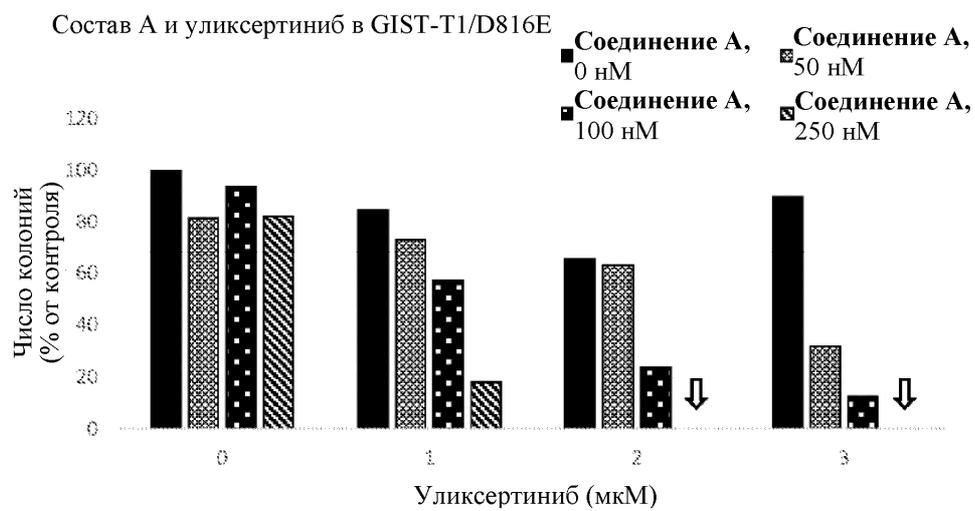
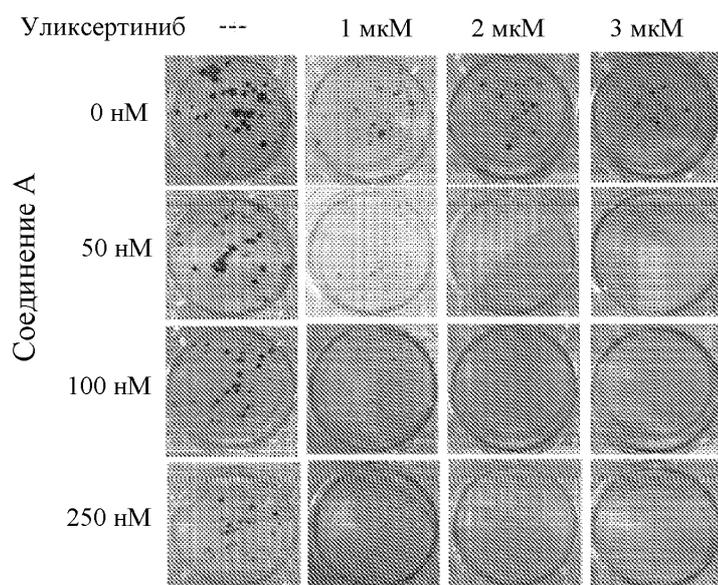


Состав А и уликсертиниб в GIST-T1



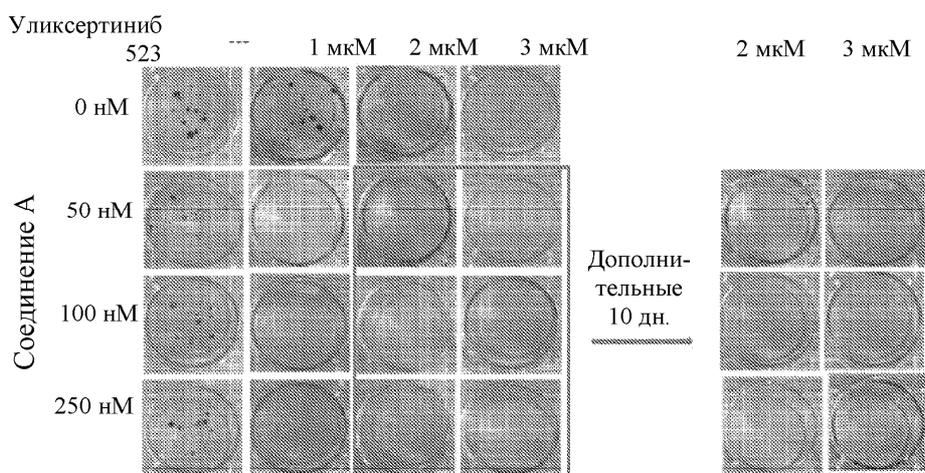
Фиг. 14А

GIST-T1/D816E

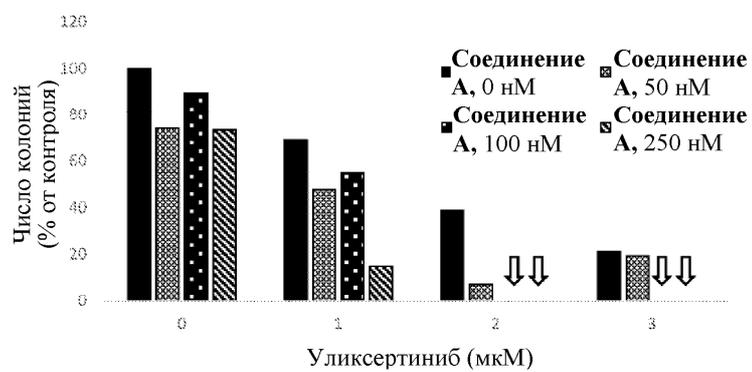


Фиг. 14В

GIST-T1/T670I

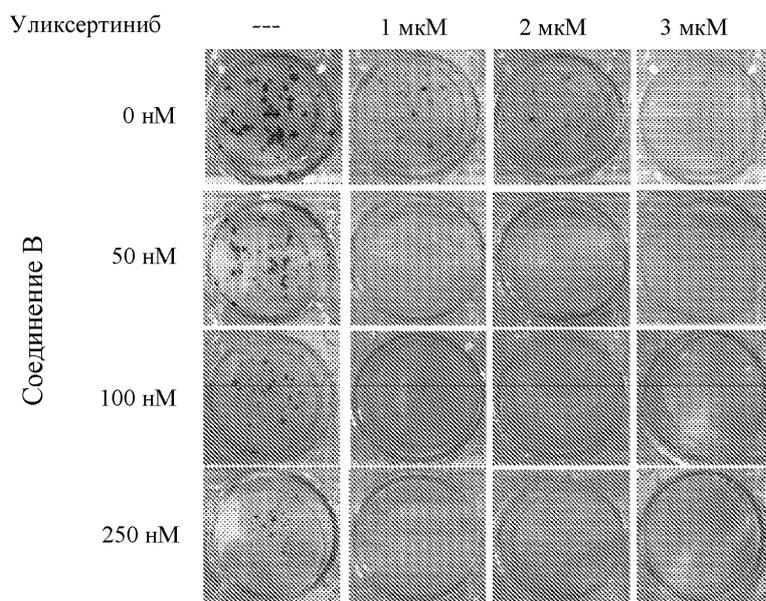


Соединение А и уликсертиниб в GIST-T1/T670I

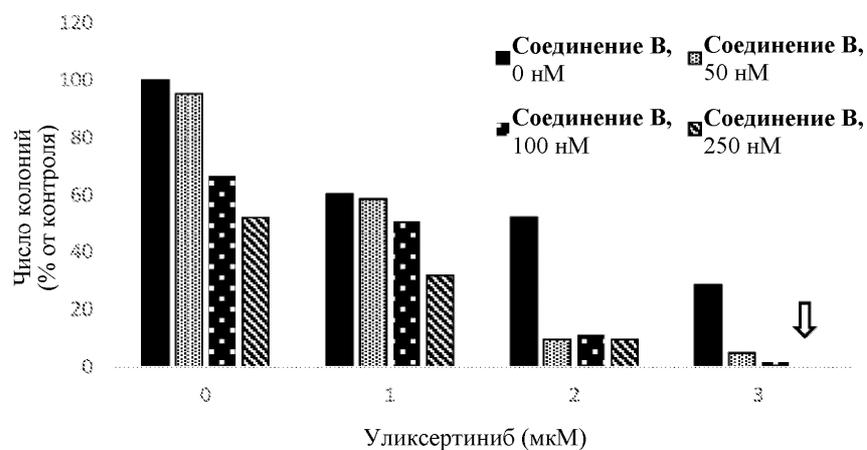


Фиг. 14С

GIST-T1/D816E

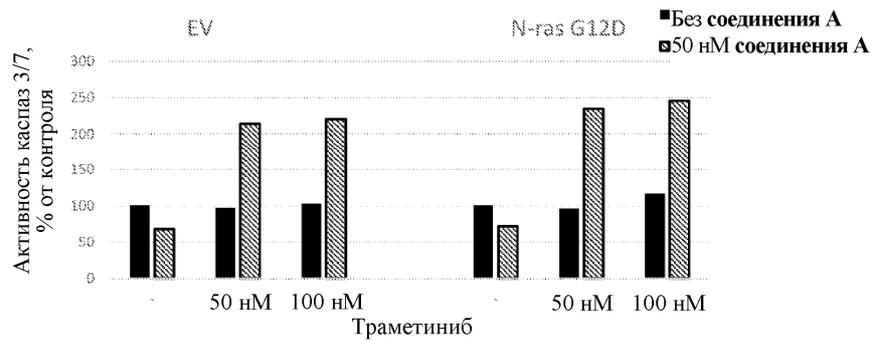


Соединение В с уликсертинибом в GIST-T1/D816E



Фиг. 15

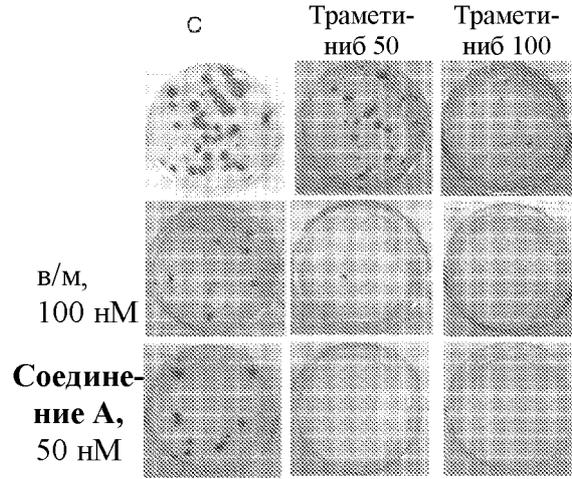
Клетки GIST T1 – 48 ч.



Фиг. 16А

Обработка лекарственным средством – 2 нед.,
восстановление – 10 дней

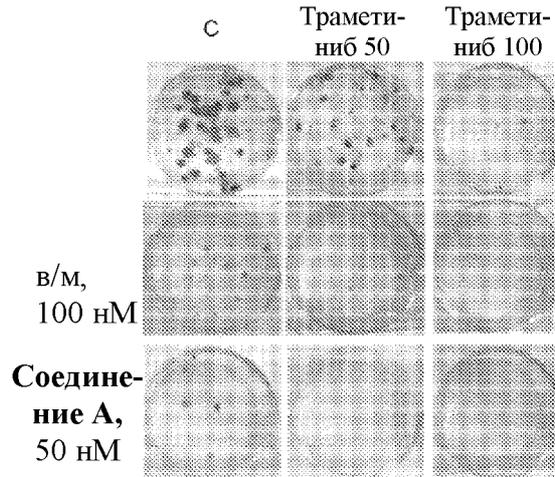
N-RAS G12D



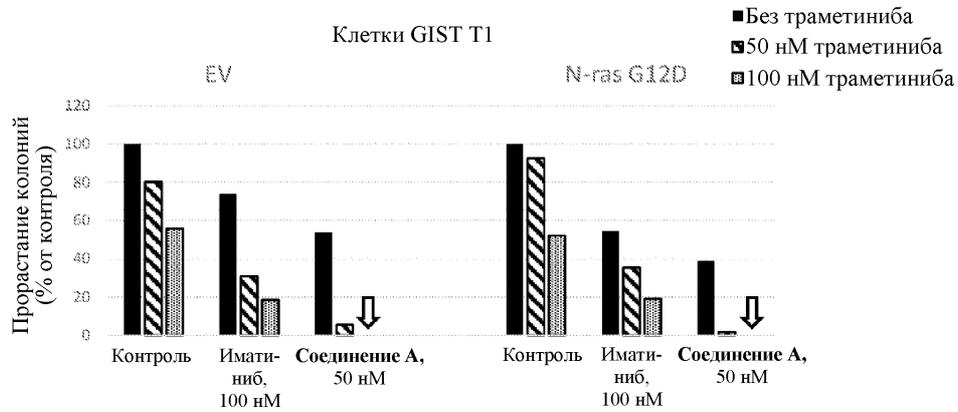
Фиг. 16B.1

Обработка лекарственным средством – 2 нед.,
восстановление – 10 дней

Контрольный вектор



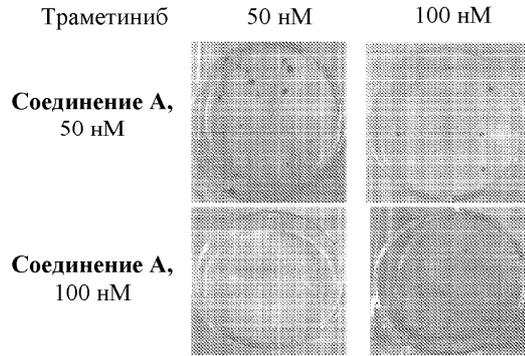
Фиг. 16B.2



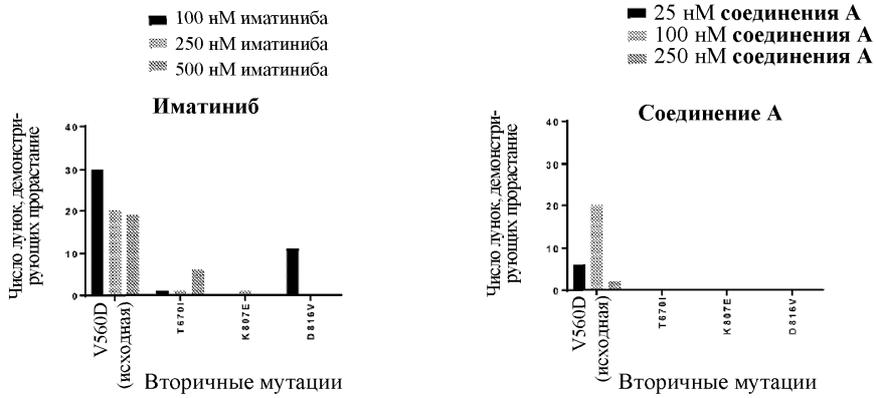
Фиг. 16C.1 - Фиг. 16C.2

Обработка лекарственным средством – 2 нед.,
восстановления – 21 день

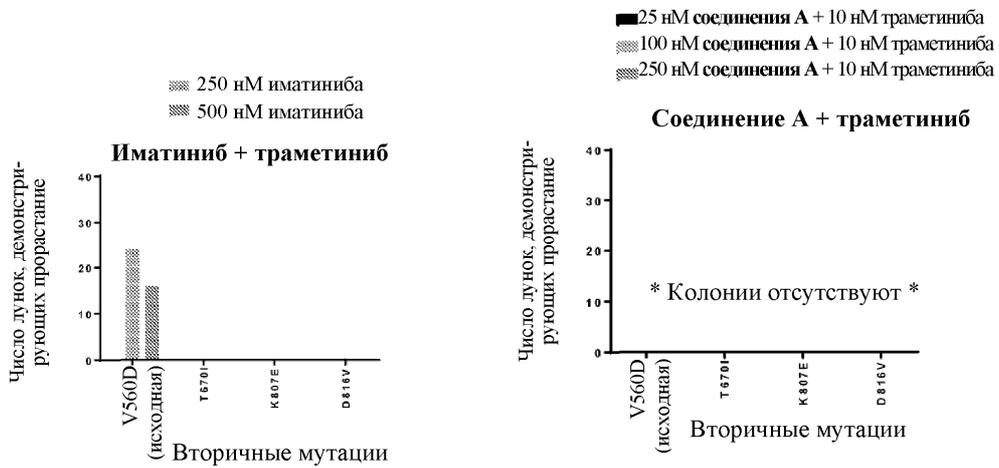
G12D



Фиг. 16D

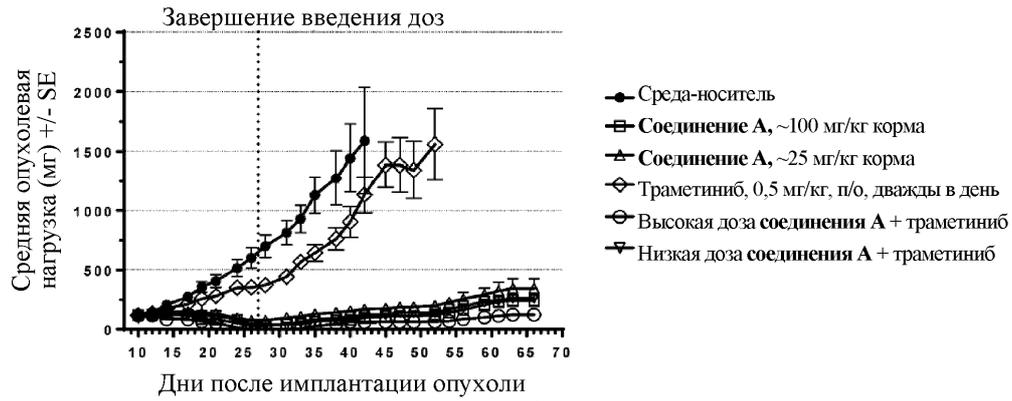


Фиг. 17А



Фиг. 17В

Рост ксенотрансплантатной опухоли G1ST T1



Фиг. 18А

Рост ксенотрансплантатной опухоли G1ST T1



Фиг. 18В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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