



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120423** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)

**A61K 31/435** (2006.01)  
**A61K 31/437** (2006.01)  
**A61K 31/5025** (2006.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)  
**A61P 35/00**

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21)	Номер заявки:	<b>а 2016 03616</b>	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою: HATZIVASSILIOU G ET AL, "ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK Inhibitors", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS 2012 AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH INC. USA, vol. 11, no. 5, 2012, pages 1143 - 1154 WO 2012/145503 A1 HUYNH H ET AL, "AZD6244 enhances the anti-tumor activity of sorafenib in ectopic and orthotopic models of human hepatocellular carcinoma (HCC)", JOURNAL OF HEPATOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 52, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 79 - 87 E. W. JOSEPH ET AL, "The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 33, 17 August 2010 (2010-08-17), pages 14903 - 14908 BOGATCHEVA N V ET AL, "Mechanism of fluoride-induced MAP kinase activation in pulmonary artery endothelial cells", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 200606 US, vol. 290, no. 6, June 2006 (2006-06), pages L1139 - L1145 LI LIU ET AL, "Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 66, no. 24, 18 December 2006 (2006-12-18), pages 11851 - 11858
(22)	Дата подання заявки:	<b>04.09.2014</b>		
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>10.12.2019</b>		
(31)	Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/874,206</b>		
(32)	Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>05.09.2013</b>		
(33)	Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		
(41)	Публікація відомостей про заявку:	<b>24.06.2016, Бюл.№ 12</b>		
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.12.2019, Бюл.№ 23</b>		
(86)	Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/EP2014/068776, 04.09.2014</b>		
(72)	Винахідник(и):	<b>Белвін Марсія (US), Моффет Джон (US), Мьорчант Марк (US)</b>		
(73)	Власник(и):	<b>Ф. ХОФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel, Switzerland (CH)</b>		
(74)	Представник:	<b>Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36</b>		

(54) КОМБІНАЦІЯ ІНГІБІТОРА МЕК ТА ІНГІБІТОРА ЕРК ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В ЛІКУВАННІ ГІПЕРПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

(57) Реферат:

UA 120423 C2

Згідно з винаходом запропоновані комбінації, що містять інгібітор MEK (такий як GDC-0973 або GDC-0623) або його фармацевтично прийнятну сіль та інгібітор ERK (такий як GDC-0994). Дані комбінації особливо корисні для лікування гіперпроліферативних розладів, таких як рак.

## Область винаходу

Винахід, загалом, належить до фармацевтичних комбінацій інгібіторів MEK (MEKi) та інгібітора ERK (ERKi) з активністю проти гіперпроліферативних розладів, таких як рак. Винахід також належить до способів застосування даних сполук для лікування ссавців.

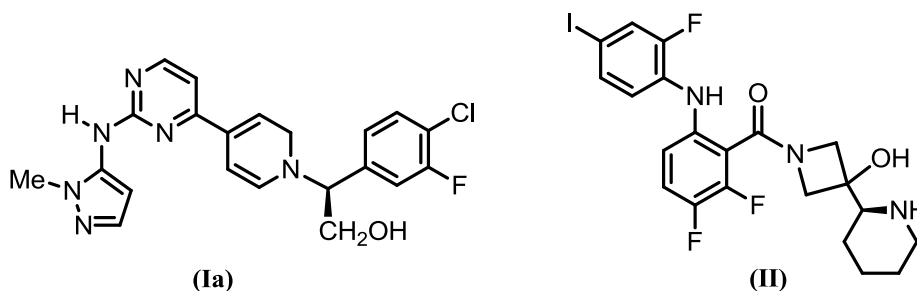
## 5 Попередній рівень техніки

Шлях RAS/RAF/MEK/ERK активується при більше ніж 30 % людських ракових захворювань, найчастіше за допомогою мутації у онкогені K-ras і також за допомогою мутацій у BRAF. Отже, цей шлях привернув значний інтерес як терапевтична мішень для лікування ракового захворювання [P.J. Roberts and C.J. Der, *Oncogene* 2007 26:3291-310]. Спроби безпосередньої спрямованої дії на RAS до теперішнього часу не були успішними, але недавні клінічні випробування з інгібіторами BRAF і мітогенактивованої кінази, регульованої позаклітинним сигналом (MEK) свідчили про те, що спрямована дія на дані ефектори RAS, що діють нижче, має потенціал у лікуванні ракових захворювань, що мають онкогенні мутації в даному шляху [Flaherty et al., *Curr. Opin. Oncol.* 2010 22:178-83]. Незважаючи на те, що клінічні відповіді і протипухлинна активність можуть бути вражаючими, зокрема для інгібіторів BRAF при меланомі з мутацією BRAF, у більшості пацієнтів, кінець кінцем, розвивалася клінічна резистентність і прогресуюче захворювання [Flaherty, вище; D.B. Solit and N. Rosen, *N. Engl. J. Med.* 2011 364:772-4]. У доклінічних дослідженнях були ідентифіковані численні механізми набутої стійкості до інгібіторів BRAF, що включають перемикання між ізоформами RAF [J. Villaneuva et al., *Cancer Cell* 2010 18:683-95], підвищуючу регуляцію сигналізації RTK або NRAS [R. Nazarian et al., *Nature* 2010 468:973-7] і реактивацію сигналізації мітогенактивованої кінази (MAPK) через активацію COT [C.M. Johannessen et al., *Nature* 2010 468:968-72] або активуючу мутацію MEK кінази [N. Wagle et al., *J. Clin. Oncol.* 2011 29:3085-96]. Аналогічно, у доклінічних дослідженнях були ідентифіковані відмінні механізми, за допомогою яких клітина набуває резистентності до інгібування MEK, що включають ампліфікацію мутантного BRAF [R.B. Corcorran et al., *Sci. Signal* 2011 3:ra84], що підвищує регуляцію STAT3 [B. Dai et al., *Cancer Res.* 2011 71:3658-68] або мутації в алостеричній кишені MEK, які можуть безпосередньо пов'язувати інгібітори з активністю MEK кінази [H. Wang et al., *Cancer Res.* 2011 71:5535-45; C.M. Emery et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2009 106:20411-6]. Мутації MEK були описані у зразках пухлин від пацієнтів, яких лікували інгібіторами MEK (Emera, вище) або BRAF (Wagle, вище), демонструючи клінічну релевантність. У той час, як порівняно з інгібіторами RAF і MEK були описані селективні інгібітори ERK 1/2 (кіназа 1/2, регульована позаклітинним сигналом), і вони в даний час знаходяться у клінічній розробці, ідентифікація і розробка низькомолекулярних інгібіторів проти ERK 1/2, які діють безпосередньо нижче MEK, запізнилася.

## 35 Короткий виклад суті винаходу

Винахід, загалом, належить до синергічних комбінацій інгібіторів MEK та інгібіторів ERK з протираковою активністю, які, при введенні у комбінації, інгібують ріст ракових клітин. Комбінації і способи за винаходом можуть бути корисними у лікуванні гіперпроліферативних розладів, таких як рак. Дані композиції можуть інгібувати ріст пухлини у ссавців і можуть бути корисними для лікування пацієнтів-людей з раковим захворюванням.

В одному аспекті винахід включає спосіб лікування гіперпроліферативного розладу, що включає введення ссавцю терапевтичної комбінації у вигляді об'єднаної композиції або введення по черзі, де терапевтична комбінація містить терапевтично ефективну кількість сполуки MEKi і терапевтично ефективну кількість ERKi. В одному аспекті даного винаходу інгібітор ERK вибраний з (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфеніл)-2-гідроксиетил)-4-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-ону (Ia, GDC-0994), 4-(3-((етилдиметилсиліл)метил)-[1,2,4]тріазоло[4,3-а]піридин-7-іл)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-аміну (Ib), (S)-4-(3-(2-(4-хлорфеніл)-2-метоксиетил)-[1,2,4]тріазоло[4,3-б]піридазин-7-іл)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-аміну (Iv) або (S)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)-4-(3-(2-метилбутил)-[1,2,3]тріазоло[1,5-а]піридин-6-іл)піримідин-2-аміну (Iг), і інгібітор MEK є кобіметінібом (II, GDC-0973) або 5-((2-фтор-4-йодфеніл)аміно)-N-(2-гідроксиетокси)імідазо[1,5-а]піридин-6-карбоксамід (IIa, GDC-0623). В іншому аспекті винаходу інгібітор MEK є (II), і інгібітор ERK є GDC-0994 (Ia).



В іншому аспекті винаходу запропонований спосіб лікування гіперпроліферативного захворювання або розладу, модульованого кіназами RAS/RAF/MEK/ERK, що включає введення ссавцю, який цього потребує, ефективних кількостей сполуки Формули Ia-Ig і сполуки Формули II або IIa. Сполуки Формули Ia-Ig і II або IIa можуть бути спільно приготовані для введення у комбінації у вигляді фармацевтичної композиції, або вони можуть бути введені окремо по черзі (поспідовно) у вигляді терапевтичної комбінації.

В іншому аспекті винаходу запропоновані способи лікування гіперпроліферативного розладу, що включають введення ссавцю, який цього потребує, ефективних кількостей сполуки Формули Ia-Ig, сполуки Формули II (GDC-0973) або IIa та іншого хіміотерапевтичного агента.

Інший аспект винаходу включає вироби або набори, які містять сполуку Формули Ia-Ig і сполуку формули II (GDC-0973) або IIa, контейнер і, можливо, листок-вкладиш в упаковці або етикетку, на яких вказано лікування.

Інший аспект винаходу включає спосіб визначення сполук, які підлягають застосуванню у комбінації для лікування раку, що включає: а) введення терапевтичної комбінації MEKi і ERKi до лінії пухлинних клітин з мутацією Kras in vitro і б) вимірювання синергічного або несинергічного ефекту.

Короткий опис графічних матеріалів

На Фіг. 1 показана проліферація клітин A549 недрібноклітинного раку легені (NSCLC) при дозуванні GDC-0994, Ib, Iv або Ig і GDC-0973 індивідуально або при дозуванні GDC-0994, Ib, Iv або Ig у поєднанні з GDC-0973 з використанням протоколу у Прикладі 6. Клітини інкубували з зазначеною максимальною концентрацією лікарського засобу з використанням серії 3-кратного розведення. Життєздатність клітин визначали з використанням аналізу CellTiter-Glo® (CTG).

На Фіг. 2 показана проліферація клітин і ступінь апоптозу у клітин A549 недрібноклітинного раку легені (NSCLC) при дозуванні дозами GDC-0994, Ib, Iv або Ig і GDC-0973 індивідуально або при дозуванні дозами GDC-0994, Ib, Iv або Ig у поєднанні з GDC-0973. Проліферацію клітин визначали з використанням аналізу BrdU. Апоптоз вимірювали з використанням аналізу nucELISA.

На Фіг. 3 показані фармакодинамічні наслідки лікування комбінацією інгібіторів MEK і ERK, одних або у комбінації. Фосфорилування RSK допомогою ERK інгібується. Прогресування клітинного циклу значущо знижується, що підтверджується зменшенням цикліну D1 і збільшенням p27. Посилена загибель клітин (апоптоз) підтверджується підвищеними рівнями розщепленого PARP.

Фіг. 4 Поверхня надлишку за Бліссом, що описує інгібування синтезу ДНК в асинхронних експоненціально зростаючих клітинах A549, визначене за допомогою обробки клітин у 384-лункових планшетах зазначеними концентраціями кожного лікарського засобу протягом 48 год. Для останніх 2 год. обробки клітини обробляли 1 мкМ 5-етиніл-2'-дезоксидефторуидину (EdU) для мічення знову синтезованої ДНК. Клітини потім фіксували і пермеабілізували додаванням 2 % параформальдегіду і 0,02 % Triton X-100 у ростове середовище на тридцять хвилин, з подальшим флуоресцентним міченням включеного EdU за допомогою Alexa-Fluor 635 азиду згідно з інструкціями виробників (Life Technologies, Eugene, OR) або контрастного забарвлювання ДНК з використанням Hoechst 33342.

Зображення флуоресцентної мікроскопії отримували багатопараметричною системою візуалізації Perkin Elmer Opera. Частку клітин, мічених EdU, по відношенню до загального числа клітин визначали з використанням програми аналізу зображень Acapella.

Для визначення можливих взаємодій між обробками лікарським засобом, спостережувану відповідь для кожної пари концентрацій порівнювали з очікуваною відповіддю для двох невазємодіючих агентів на основі адитивності за Бліссом ( $F_{a+b} = F_a + F_b - F_a \cdot F_b$ , де  $F_a$  і  $F_b$  є частковими ефектами агентів а і b). Різниця між спостережуваним і прогнозованим частковим ефектом називається надлишком за Бліссом.

Фіг. 5. Обробка клітин NSCLC комбінаціями інгібіторів MEKi (GDC-0973) і ERKi (GDC-0994). 19/29 протестованих ліній клітин демонструють певний комбінований ефект при використанні

ERK плюс MEK. Усі лінії, які не є мутантами Q61H Kras, демонструють певну чутливість до комбінації. Не спостерігали комбінованих ефектів у двох лініях у панелі з мутацією Braf.

На Фіг. 6 показаний графік змінення середнього об'єму пухлини з часом у самок мишей Taconic nu/nu (голі) з ксенотрансплантатами пухлини - недрібноклітинного раку легені (NSCLC) NCI-H2122, яким щодобово дозували: носій MCT (0,5 % метилцелюлоза/0,2 % Tween 80), 60 мг/кг Формули Ia (GDC-0994) і 5 мг/кг Формули II (GDC-0973) (Фіг. 6а) або щодобово дозували 60 мг/кг Формули Ia (GDC-0994) і 15 мг/кг кожні три доби (Q3D, тобто, переривчасте дозування) Формули II (GDC-0973) (Фіг. 6б). Дозування мишам здійснювали пероральним зондовим харчуванням. Фармакодинамічні маркери підтверджують ослаблений ріст клітин (Фіг. 6в і 6г), що підтверджується зменшенням рівнів цикліну D1 і Ki67 і підвищеним апоптозом (Фіг. 6д), який доводиться збільшенням розщепленої каспази 3 у ксенорентгенографічному аналізі NSCLC H2122 KRAS.

На Фіг. 7 показаний графік змінення середнього об'єму пухлини з часом у самок мишей Taconic nu/nu (голі) з ксенотрансплантатами пухлини - недрібноклітинного раку легені (NSCLC) NCI-H2122, яким щодобово дозували: носій MCT (0,5 % метилцелюлоза/0,2 % Tween 80), 100 мг/кг GDC-0994 і 5 мг/кг GDC-0973 (Фіг. 7а), щодобово дозували 100 мг/кг GDC-0994 і 4 мг/кг GDC-0973 (Фіг. 7б) або щодобово дозували 100 мг/кг GDC-0994 і 15 мг/кг кожні три доби (Q3D, тобто, переривчасте дозування) GDC-0973 (Фіг. 7в). Дозування мишам здійснювали пероральним зондовим харчуванням.

На Фіг. 8 показаний графік змінення середнього об'єму пухлини з часом у самок мишей Taconic nu/nu (голі) з ксенотрансплантатами пухлини - недрібноклітинного раку легені (NSCLC) A549, яким щодобово дозували: носій MCT (0,5 % метилцелюлоза/0,2 % Tween 80), 60 мг/кг Формули GDC-0994 і 5 мг/кг GDC-0973 (Фіг. 8а) або щодоби дозували 60 мг/кг Формули GDC-0994 і 15 мг/кг кожні три доби (Q3D, тобто, переривчасте дозування) GDC-0973 (Фіг. 8б). Дозування мишам здійснювали пероральним зондовим харчуванням.

На Фіг. 9 показано узагальнення ефективності GDC-0994 і GDC-0973 у дослідженні ефективності комбінації варіюючих доз у лінії клітин колоректального раку, вираженої як відсоток інгібування росту пухлини. Ділянки з сірим фоном показують найкращу ефективність для схеми, яку переносять. Ділянки з чорним фоном показують непереносиму комбінацію. Дозування здійснювали щодобовим (QD) пероральним зондовим харчуванням (PO).

На Фіг. 10 описана надійна протипухлинна активність кобіметінібу і GDC-0994 у моделях GEM з мутацією KRAS аденокарциноми протоки підшлункової залози (PDAC) MJ.

Моделі GEM з мутацією KRAS, що мають пухлину, обробляли носієм, GDC-0973 (5 мг/кг, PO, QD), GDC-0994 (60 мг/кг, PO, QD) або комбінацією GDC-0973 і GDC-0994. На Фіг. 10а показані каскадні діаграми, що описують відсоткове змінення об'єму пухлини від початкового рівня, основане на ультразвуковій візуалізації (доба 0, доба 7) у моделі PDAC після 7-добової обробки носієм (чорний, n дорівнює 8), кобіметінібом (зелений, n дорівнює 8), GDC-0994 (синій, n дорівнює 8) і комбінацією (червоний, n дорівнює 9). Фіг. 10б - графік Каплана-Майєра загальної виживаності з моделі PDAC від когорт обробки носієм (чорний, n дорівнює 13), гемцитабіном (помаранчевий, n дорівнює 10), ІІб (зелений, n дорівнює 9), GDC-0994 (синій, n дорівнює 8) і комбінацією GDC-0994 і GDC-0973 (червоний, n дорівнює 13). Ефект обробки комбінацією є значущим відносно носія, \*\*p менше 0,0001, і гемцитабіну, \*p дорівнює 0,0159, логранговий критерій.

Фіг. 11а. Життєздатність ліній клітин, що походять від KRAS<sup>G12D</sup>, p16/19<sup>FL/FL</sup> PDX-CRE, у присутності GDC-0973, GDC-0994 і комбінацій GDC-0994 і GDC-0973, зумовлена посиленням придушення шляху MAPK.

Фіг. 11б. PD (фармакодинамічні) маркери у лініях клітин, що походять від KRAS<sup>G12D</sup>, p16/19<sup>FL/FL</sup> PDX-CRE, у присутності GDC-0973, GDC-0994 і комбінацій GDC-0994 і GDC-0973.

Фіг. 12. Активність росту клітин під час розвитку, яка спостерігається при використанні комбінацій GDC-0994 і численних інгібіторів MEK.

Фіг. 13. Оцінка синергічного інгібування синтезу ДНК. Експоненціально зростаючі клітини HCT116 (А, Б) і A549 (В, Г) обробляли зазначеними концентраціями GDC-0994 і GDC-0973 протягом 47 годин перед додаванням 5-етиніл-2'-дезоксиридину (EdU) протягом 60 хв, з подальшою фіксацією параформальдегідом і міченням ДНК, що містить EdU, Alexa Fluor 647 азидом (Life Technologies, Madison WI). Загальну кількість ядер, мічених Hoechst 33542, і частку ядер, мічених EdU, визначали автоматизованою флуоресцентною мікроскопією та аналізом зображень з використанням приладу Perkin Elmer Opera і програми AcaPella.

А, В, Графіки-ізоболограми. Лінії з'єднують точки рівного інгібування синтезу ДНК, що досягається за допомогою різних комбінацій двох лікарських засобів. Товста пунктирна діагональна лінія показує очікувану ізоболу 50 %-вого інгібування, якщо комбінації сполук

демонстрували просту адитивність згідно моделі [Loewe N.Geary, Understanding synergy. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2012. doi:10.1152/ajpendo.00308.2012].

Б, Г, Матриця доз аналізу синергії, що демонструє: 1 - спостережуване відсоткове змінення частки клітин, позитивних щодо EdU, відносно контролів, оброблених DMSO, 2 - прогнозований ефект комбінацій лікарського засобу на основі моделі адитивності Loewe, застосовуваної до кривих доза-відповідь для одного агента, 3 - відмінність між спостережуваними даними і прогнозованими адитивними ефектами, числа, менші за нуль, показували більше інгібування синтезу ДНК, ніж очікувалося для адитивних лікарських засобів.

Дані аналізували з використанням модуля Compound Synergy Extension програми Genedata Screener (Genedata AG, Базель).

Докладний опис винаходу  
Визначення

Мається на увазі, що слова "містити", "що містить", "включати", "що включає" і "включає", при використанні в даному описі винаходу і формулі винаходу, позначають присутність викладених характеристик, цілих чисел, компонентів або стадій, але вони не виключають присутності або додавання однієї або більше ніж однієї характеристики, цілого числа, компонента, стадії або їх груп.

Терміни "лікувати" і "лікування" належать до терапевтичного лікування, де метою є попередження або уповільнення (ослаблення) небажаної фізіологічної зміни або розладу, такого як ріст, розвиток або поширення ракового захворювання. Для мети даного винаходу корисні або бажані клінічні результати включають полегшення симптомів, зменшення ступеня захворювання, стабілізований (тобто такий, що не погіршується) стан захворювання, затримку або уповільнення прогресування захворювання, зменшення інтенсивності або тимчасове полегшення хворобливого стану і ремісію (або часткову, або повну), або яка спостерігається, або не спостерігається, але не обмежуються ними. "Лікування" також може означати продовження виживання у порівнянні з очікуваним виживанням при відсутності отримання лікування. Ті, що потребують лікування, включають тих, які вже мають стан або розлад, наприклад, пацієнта з раковим захворюванням.

Термін "інгібувати" означає зменшувати або знижувати активність, функцію і/або кількість порівняно з контролем.

Фраза "терапевтично ефективна кількість" означає кількість, яка (i) лікує конкретне захворювання, стан або розлад, (ii) послаблює, зменшує інтенсивність або усуває один або більше ніж один симптом конкретного захворювання, стану або розладу, або (iii) попереджає або затримує початок одного або більше ніж одного симптому конкретного захворювання, стану або розладу, описаних в даному документі. У разі ракового захворювання терапевтично ефективна кількість може зменшувати число ракових клітин; зменшувати розмір пухлини; інгібувати (наприклад, деякою мірою сповільнювати або краще зупиняти) інфільтрацію ракових клітин у периферичні органи; інгібувати (наприклад, деякою мірою сповільнювати або краще зупиняти) розвиток метастазів пухлини; деякою мірою інгібувати ріст пухлини; і/або деякою мірою полегшувати один або більше ніж один симптом, асоційований з раковим захворюванням. Залежно від ступеня, в якому комбінація може попереджувати ріст і/або убивати існуючі ракові клітини, вона може бути цитостатичною і/або цитотоксичною. Для терапії раку ефективність можна вимірювати, наприклад, оцінюванням часу до прогресування захворювання (TTP) і/або визначенням частоти відповіді (RR).

Крім надання покращеного лікування для даного гіперпроліферативного розладу, введення певних комбінацій за винаходом може покращувати якість життя для пацієнта порівняно з якістю життя, яку має той самий пацієнт, що отримує інше лікування. Наприклад, введення комбінації пацієнту може забезпечувати покращену якість життя порівняно з якістю життя, яку мав би той самий пацієнт, якби він отримував лише один з індивідуальних агентів в якості терапії. Наприклад, комбінована терапія комбінацією, описаною у даному документі, може зменшувати необхідну дозу терапевтичних агентів. Комбінована терапія також може зменшувати або усувати потребу в застосуванні хіміотерапевтичних агентів і побічні ефекти, асоційовані з хіміотерапевтичними агентами у високій дозі (наприклад, нудота, блювання, втрата волосся, висип, знижений апетит, втрата маси і т.д.). Комбінація також може викликати зменшення пухлинної маси і асоційованих небажаних явищ, таких як біль, дисфункція органу, втрата маси і т.д. Відповідно, в одному аспекті винаходу запропонована комбінація для терапевтичного застосування для поліпшення якості життя пацієнта, якого лікують від гіперпроліферативного розладу агентом, описаним у даному документі.

Терміни "рак" і "раковий" відносяться до або описують фізіологічний стан у ссавців, який типово характеризується нерегульованим ростом клітин. "Пухлина" містить одну або більше ніж

одну ракову клітину. Приклади ракового захворювання включають карциному, лімфому, бластоми, саркому і лейкозні або лімфоїдні злоякісні захворювання, але не обмежуються ними. Конкретніші приклади таких ракових захворювань включають плоскоклітинний рак (наприклад, епітеліальний плоскоклітинний рак), рак легені, включаючи дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені ("NSCLC"), аденокарциному легені і плоскоклітинну карциному легені, рак очеревини, печінково-клітинний рак, рак шлунково-кишкового тракту або шлунка, включаючи шлунково-кишковий рак, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак прямої кишки, колоректальний рак, карциному ендометрію або матки, карциному слинної залози, рак нирки або нирковий рак, рак передміхурової залози, рак вульви, рак щитовидної залози, карциному печінки, карциному ануса, саркому пеніса, а також рак голови і шиї. Рак шлунково-кишкового тракту в тому вигляді, в якому цей термін використовується в даному документі, включає рак шлунка, який може розвиватися в будь-якій частині шлунка і може поширюватися по всьому шлунку і в інші органи, зокрема, у стравохід, легені, лімфатичні вузли і в печінку.

Термін "ссавець" включає людей, мишей, щурів, морських свинок, мавп, собак, кішок, коней, корів, свиней, овець і свійську птицю, але не обмежується ними. Термін "пацієнт" відноситься до ссавця і, в одному втіленні, пацієнт є людиною чоловічої або людиною жіночої статі.

Термін "синергічний" у тому вигляді, в якому він використовується в даному документі, відноситься до терапевтичної комбінації, яка є ефективнішою, ніж адитивні ефекти двох або більше ніж двох окремих агентів. Визначення синергічної взаємодії може бути основане на результатах, отриманих з аналізів, відомих у даній області. Результати цих аналізів можна аналізувати з використанням комбінованого способу Чоу (Chou) і Талалея (Talalay) і аналізу доза-ефект програмою CalcuSyn для того, щоб отримати показник адитивності [Chou and Talalay, Adv. Enzyme Regul. 1984 22:27-55]. Комбінації, запропоновані в даному документі, можна аналізувати з використанням стандартної програми для кількісного вимірювання синергії, адитивності і антагонізму серед протиракових агентів. Типовою програмою є програма, описана [Chou і Talalay у "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy, » Academic Press, 1987, розділ 2]. Значення показника адитивності менші ніж 0,8 вказують на синергію, значення більші ніж 1,2 вказують на антагонізм, і значення від 0,8 до 1,2 вказують на адитивні ефекти. Комбінована терапія може забезпечувати "синергію" і виявлятися "синергічною", тобто ефект, якого досягають при спільному застосуванні активних інгредієнтів, більше, ніж сума ефектів, які виникають через роздільне застосування сполук. Синергічний ефект може досягатися, коли активні інгредієнти: (1) спільно готують у вигляді препарату і вводять або доставляють одночасно в комбінованій стандартній лікарській формі; (2) доставляють по черзі або паралельно у вигляді окремих композицій; або (3) за допомогою якоїсь іншої схеми. При доставці у терапії по черзі синергічний ефект може досягатися, коли сполуки вводяться або доставляються послідовно, наприклад, за допомогою різних ін'єкцій в окремих шприцах. Загалом, під час терапії по черзі, ефективне дозування кожного активного інгредієнта вводиться послідовно, тобто серійно, тоді як під час комбінованої терапії ефективні дозування двох або більше ніж двох активних інгредієнтів вводяться спільно. Комбіновані ефекти оцінювали як з використанням моделі незалежності Блісса, так і моделі найефективнішого одиночного агента (HSA) [Lehár et al. 2007, Molecular Systems Biology 3:80]. Бали за Бліссом кількісно оцінюють ступінь потенціювання від одиночних агентів, і позитивний бал за Бліссом (більший ніж 0) свідчить про більше ніж просту адитивність. Сукупний позитивний бал за Бліссом, більший ніж 250, вважається сильною синергією, яку спостерігають у межах протестованих концентраційних інтервалів. Бал HSA (більший ніж 0) свідчить про ефект комбінації, більший, ніж максимальні відповіді на одиночні агенти у відповідних концентраціях.

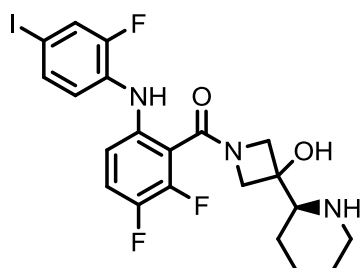
Способи вимірювання TGI (інгібування росту пухлини) відомі в даній області. В одному типовому способі вимірюються середні об'єми пухлин і порівнюються у пацієнта до і після лікування. Об'єми пухлин можна вимірювати у двох вимірах (довжина і ширина) з використанням будь-якого способу, відомого в даній області, наприклад, циркулів UltraCal IV (компанія Fred V. Fowler) або за допомогою PET (позитронно-емісійна томографія), або якимось іншим способом. Можна використовувати наступну формулу: об'єм пухлини (мм<sup>3</sup>) = (довжина x ширина<sup>2</sup>) x 0,5. Вимірювання об'ємів пухлини протягом багатьох періодів часу можна робити з використанням підходу за змішаним моделюванням лінійних змішаних ефектів (LME) [Pinheiro et al. 2009]. У даному підході можуть розглядатися і повторні вимірювання (і багато пацієнтів). Для апроксимації нелінійного профілю до ходу змінення об'єму пухлини у часі при кожному рівні дози можна використовувати поліноміальні криві кубічної регресії. Ці нелінійні профілі можна потім пов'язувати з дозою в межах змішаної моделі. Інгібування росту пухлини залежно від

відсотка вмісту носія можна обчислювати як відсоток площі під апроксимованою кривою (AUC) на добу у зв'язку з носієм, використовуючи наступну формулу:

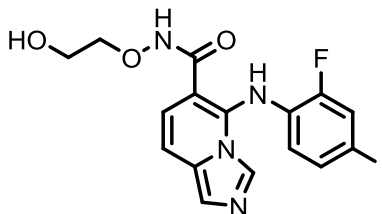
$$\% \text{ TGI} = 100 \left[ 1 - \left( \frac{\text{AUC}_{\text{обробка/доба}}}{\text{AUC}_{\text{носії/доба}}} \right) \right]$$

- 5 При використанні цієї формули значення TGI 100 % вказує на стаз пухлини, більше ніж приблизно 1 %, але менше, ніж приблизно 100 % вказує на інгібування росту пухлини, і більше ніж приблизно 100 % вказує на регресію пухлини.

Інгібітори MEK



(II)



(IIa)

- Даний винахід належить до інгібіторів MEK і їх застосування у комбінованій терапії з інгібіторами HER3 та інгібіторами EGFR (рецептор епідермального чинника росту). Інгібітори MAK всебічно розглядалися в оглядах [S. Price, Putative Allosteric MEK1 and MEK2 inhibitors, Expert Opin. Ther. Patents, 2008 18(6):603; J.I. Trujillo, MEK Inhibitors: a patent review 2008-2010 Expert Opin. Ther. Patents 2011 21 (7):1045]. Краще інгібітор MEK міг би бути обраний з GDC-0973 (кобіметиніб), GDC-0623, AZD6244 (селуметиніб), AZD8330, BAY 86-9766 (рефаметиніб), GSK-1120212 (траметиніб), ARRY-162, MSC1936369, MK162, TAK733 і PD-325901. Найкраще інгібітор MEK є GDC-0973 (кобіметиніб) або GDC-0623.

- Кобіметиніб (GDC-0973, також званий в даному документі "Сполука II") являє собою перорально доступний потужний і високоселективний інгібітор MEK1 і MEK2 центральних компонентів шляху RAS/RAF, і має протипухлинну активність одного агента у багатьох моделях людського раку. GDC-0973 має хімічну назву [3,4-дифтор-2-[(2-фтор-4-йодфеніл)аміно]феніл][3-гідрокси-3-[(2S)-2-піперидиніл]-1-азетидиніл]метанон. Кобіметиніб має наступний реєстраційний номер CAS (Хімічна реферативна служба): 934660-93-2.

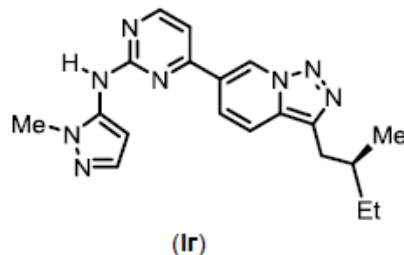
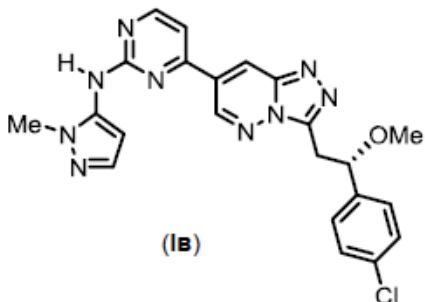
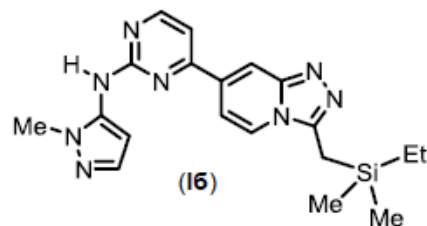
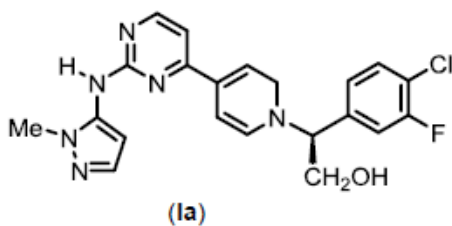
- GDC-0623 (також званий в даному документі "Сполука IIa") являє собою перорально доступний, потужний і високоселективний інгібітор MEK1 і MEK2 центральних компонентів шляху RAS/RAF, і має протипухлинну активність одного агента у багатьох моделях людського раку. GDC-0623 має хімічну назву 5-[(2-фтор-4-йодфеніл)аміно]-N-(2-гідроксиетокси)-імідазо[1,5-a]піридин-6-карбоксамід і має наступний реєстраційний номер CAS 1168091-68-6.

Інгібітори ERK

- Інгібітори ERK використовуються для лікування ракових захворювань і гіперпроліферативних захворювань. Сполуки Ia-Ig інгібують фосфорилування ERK1 і ERK2 і мають протипухлинну активність одного агента у багатьох моделях людського раку. ERK є єдиним відомим субстратом для MEK1 і MEK2. Фосфорилування ERK приводить до транслокації в ядро, де вона фосфорилує ядерні мішені і регулює різні клітинні процеси, такі як проліферація, диференціація і прогресія клітинного циклу [J.L. Yap et al., Chem. Med. Chem. 2011 6:38].

Наводився огляд інгібіторів ERK [K. Burkhard et al., Curr. Top. Med. Chem. 2009 9(8):678-689]. Також були розкриті піразольні та індазольні інгібітори ERK [D. Fairfax et al., WO2012094313; G.W Shipps, Jr. et al., WO2012087772; G.W Shipps, Jr. et al., WO2012036997 and Y. Deng et al., WO2012030685; A.M. Aronov et al., J. Med. Chem. 2009 52:6362-68].





Незважаючи на недавні успіхи у профілюванні людських пухлин і конструюванні низько- і високомолекулярних лікарських засобів, що приводять до відкриття спрямовано діючих терапевтичних засобів, які змінили історію захворювань, проти яких вони були спочатку розроблені, загальні показники успіху спрямовано діючих агентів у онкології, проте, все ще досить низькі, що може частково пояснюватися гетерогенністю багатьох ракових захворювань, а також складними шляхами, у яких задіяні мішені, які включають численні надлишкові шляхи і взаємний вплив серед багатьох молекулярних шляхів.

Одним підходом до вирішення даної проблеми є лікування пухлин комбінацією спрямовано діючих агентів або комбінаціями спрямовано діючих агентів і хімотерапевтичних агентів. Це слугує як спроба досягнення спрямованої дії на багато шляхів, які незалежно і спільно керують проліферацією в багатьох пухлинах і зазвичай активуються в пухлинах цілим рядом геномних подій. Даний підхід має подвійну користь: він має потенціал збільшувати початкову частоту відповіді пухлини у пухлинах, керованих багатьма онкогенними подіями, а також знижувати частоти набуті резистентності, яка могла б відбуватися при використанні кожного агента поодиноці. Це зумовлено інгібуванням активації компенсаторних шляхів, що в такому випадку продовжило б активність комбінації порівняно з активністю, що спостерігається під впливом кожного агента поодиноці.

Комбінована обробка мутантних клітин K-ras інгібіторами MEK і ERK інгібувала розростання резистентних клітин, тоді як обробка клітин з набутою резистентністю до інгібітора MEK інгібітором ERK ефективно блокувала проліферацію [G Hatzivassiliou et al., Mol. Cancer Ther. 2012 11:1143-1154]. У даному документі автори винаходу продемонстрували, що одночасне інгібування двох кіназ у тому самому шляху приводило до поліпшеного інгібування клітини.

Комбінація GDC-0994 і GDC-0973 приводила до синергічного пригнічення росту клітин NSCLC KRAS A549 (Фіг. 5). Комбінація MEKi та ERKi приводила до уповільнення клітинного циклу (знижені рівні цикліну D1 і підвищені рівні p27) і до посилення апоптозу (підвищені рівні розщепленого PARP та рівні в аналізі nucELISA) (Фіг. 2 і 3). Спільне введення двох агентів приводило до синергічного зменшення проліферації клітин, виміряної за зниженням синтезом ДНК (Фіг. 4). Цей інгібуючий ефект також спостерігали in vivo у ксенотрансплантатах з клітинами NSCLC H2122 (що також демонструвало значуще зменшення проліферації клітин і збільшення апоптозу) (Фіг. 6в-6д) і NSCLC A549 (Фіг. 6а і 6б, і 7а, 7б і 7в). Синергія також була продемонстрована в моделі GEMM (гранулоцити-еритроцити-макрофаги-мегакаріоцити) аденокарциноми протоки підшлункової залози з мутацією KRAS (Фіг. 10а і 10б), в якій були очевидними ті самі фармакодинамічні маркери (Фіг. 11а і 11б).

Синергію спостерігали з усіма інгібіторами MEKi, спільно введеними з GDC-0994 (Фіг. 12) і з усіма ERKi, спільно введеними з GDC-0973 (Фіг. 1).

Відповідно до одного аспекту винаходу запропоновано спосіб лікування раку у пацієнта, що потребує цього, з використанням комбінованої терапії, що включає введення інгібітора MEK та інгібітора ERK, або фармацевтично прийнятної солі одного з них.

В одному втіленні інгібітор MEK комбінованої терапії є одним з GDC-0973 або GDC-0623. GDC-0973 і GDC-0623 є потужними і високоселективними низькомолекулярними алостеричними

інгібіторами MEK 1/2, кіназ, які активують ERK 1/2. Інгібування MEK 1/2 є стратегією контролю росту пухлин, які є залежними від порушеної сигналізації у шляху MEK/ERK. Доклінічні дослідження продемонстрували, що обидва інгібітора ефективні в інгібуванні росту пухлинних клітин, що мають активуючі мутації B-RAF, які асоційовані з багатьма типами пухлин, причому GDC-0973 демонструє більшу активність в даній моделі. Доклінічні дослідження продемонстрували, що обидва інгібітора ефективні в інгібуванні росту пухлинних клітин, що мають активуючі мутації Ras, які асоційовані з багатьма типами пухлин, причому GDC-0623 демонструє більшу активність в даній моделі. Введення інгібітора MEK об'єднують з інгібітором ERK. У конкретному втіленні інгібітор ERK вибраний з Ia, Ib, Iv або Ig.

Ця комбінована терапія також слугувала б для попередження або затримки прояву вродженої або набутої резистентності, приписуваної до активації шляху RAS/RAF/MEK/ERK, що спостерігається при інгібуванні MEK, і для попередження або затримки прояву вродженої або набутої резистентності, опосередкованої активацією шляху RAS.

Дану комбінацію можна використовувати в комбінації з хімотерапевтичними агентами для лікування гіперпроліферативного захворювання або розладу, що включає пухлини, ракові захворювання і тканину новоутворення, поряд з передзлжакісними і ненеопластичними або незлжакісними гіперпроліферативними розладами.

У деяких втіленнях комбінацію об'єднують у схемі дозування у вигляді комбінованої терапії з іншою сполукою, яка має антипроліферативні властивості, або яка є корисною для лікування гіперпроліферативного розладу. Додаткова сполука схеми дозування переважно має додаткові активності по відношенню до комбінації, і такі, що вони не здійснюють шкідливого впливу одна на одну. Такі сполуки можуть вводитися в кількостях, ефективних для наміченої мети.

В одному втіленні терапевтична комбінація вводиться схемою дозування, в якій терапевтично ефективна кількість сполуки-інгібітора MEK (такого як GDC-0973 або GDC-0623) або його фармацевтично прийнятної солі вводиться в інтервалі від одного разу на добу протягом трьох тижнів до одного разу кожні три доби (Q3D) протягом трьох тижнів, і терапевтично ефективна кількість сполуки формули Ia-Ig - один раз на добу протягом трьох тижнів.

Комбіновану терапію можна вводити у вигляді одночасної або послідовної схеми. При введенні послідовно цю комбінацію можна вводити у двох або більше ніж двох введеннях. Об'єднане введення включає спільне введення з використанням роздільної композиції і послідовне введення в будь-якому порядку, при якому переважно має місце період, коли обидва (або усі) активні агенти одночасно надають їх біологічні активності.

В одному втіленні винаходу гіперпроліферативний розлад є раком.

В іншому втіленні винаходу при раковому захворюванні експресується мутантний KRAS.

В іншому втіленні даного винаходу MEKi є GDC-0973 (II).

В іншому втіленні даного винаходу MEKi є GDC-0623 (IIa).

В іншому втіленні даного винаходу MEKi є GSK-1120212 (траметініб).

В іншому втіленні даного винаходу MEKi є AZD-6244 (селуметініб).

В іншому втіленні даного винаходу MEKi є BAY 86-9766 (рефаметініб).

В іншому втіленні даного винаходу ERKi є сполукою формули Ia.

В іншому втіленні даного винаходу ERKi є сполукою формули Ib.

В іншому втіленні даного винаходу ERKi є сполукою формули Iv.

В іншому втіленні даного винаходу ERKi є сполукою формули Ig.

В іншому втіленні даного винаходу запропонований спосіб лікування ракового захворювання комбінацією MEKi і ERKi, де зазначене ракове захворювання або гіперпроліферативний розлад вибрано з групи, що складається з наступних: аденома, рак сечового міхура, рак мозку, рак молочної залози, рак товстої кишки, епідермальна карцинома, фолікулярна карцинома, рак сечостатевого тракту, гліобластома, лімфогрануломатоз, ракові захворювання голови і шиї, гепатома, кератоакантома, рак нирки, крупноклітинна карцинома, лейкози, аденокарцинома легені, рак легені, лімфоїдні розлади, меланома і немеланомний рак шкіри, мієлодиспластичний синдром, нейробластома, неходжкінська лімфома, рак яєчника, папілярна карцинома, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак прямої кишки, саркома, дрібноклітинна карцинома, рак яєчка, тетракарциноми, рак щитовидної залози і недиференційована карцинома.

В іншому втіленні даного винаходу запропонований спосіб лікування ракового захворювання комбінацією MEKi і ERKi, де зазначене ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: колоректальний рак, рак легені, мезотеліома, рак молочної залози, рак підшлункової залози, гліома, рак шлунка, рак нирки, рак яєчника, рак ендометрію, рак сечового міхура та рак голови і шиї.

В іншому втіленні даного винаходу запропонований спосіб лікування ракового захворювання комбінацією MEKі II і ERKі Ia, де зазначене ракове захворювання або гіперпроліферативний розлад вибрано з групи, що складається з наступних: аденома, рак сечового міхура, рак мозку, рак молочної залози, рак товстої кишки, епідермальна карцинома, фолікулярна карцинома, рак сечостатевого тракту, гліобластома, лімфогрануломатоз, ракові захворювання голови і шиї, гептома, кератоакантома, рак нирки, крупноклітинна карцинома, лейкози, аденокарцинома легені, рак легені, лімфоїдні розлади, меланома і немеланомний рак шкіри, мієлодиспластичний синдром, нейробластома, неходжкінська лімфома, рак яєчника, папілярна карцинома, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак прямої кишки, саркома, дрібноклітинна карцинома, рак яєчка, тетракарциноми, рак щитовидної залози і недиференційована карцинома.

В іншому втіленні даного винаходу запропонований спосіб лікування ракового захворювання комбінацією MEKі II і ERKі Ia, де зазначене ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: колоректальний рак, рак легені, мезотеліома, рак молочної залози, рак підшлункової залози, гліома, рак шлунка, рак нирки, рак яєчника, рак ендометрію, рак сечового міхура та рак голови і шиї.

В іншому втіленні даного винаходу запропонований спосіб лікування ракового захворювання комбінацією MEKі IIa і ERKі Ia, де зазначене ракове захворювання або гіперпроліферативне захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: аденома, рак сечового міхура, рак мозку, рак молочної залози, рак товстої кишки, епідермальна карцинома, фолікулярна карцинома, рак сечостатевого тракту, гліобластома, лімфогрануломатоз, ракові захворювання голови і шиї, гептома, кератоакантома, рак нирки, крупноклітинна карцинома, лейкози, аденокарцинома легені, рак легені, лімфоїдні розлади, меланома і немеланомний рак шкіри, мієлодиспластичний синдром, нейробластома, неходжкінська лімфома, рак яєчника, папілярна карцинома, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак прямої кишки, саркома, дрібноклітинна карцинома, рак яєчка, тетракарциноми, рак щитовидної залози і недиференційована карцинома.

В іншому втіленні даного винаходу запропонований спосіб лікування ракового захворювання комбінацією MEKі IIa і ERKі Ia, де зазначене ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: колоректальний рак, рак легені, мезотеліома, рак молочної залози, рак підшлункової залози, гліома, рак шлунка, рак нирки, рак яєчника, рак ендометрію, рак сечового міхура та рак голови і шиї.

В іншому втіленні запропонований спосіб лікування раку комбінацією II або IIa і Ia, які вводяться супутньо.

В іншому втіленні запропонований спосіб лікування раку комбінацією II або IIa і Ia, які вводяться послідовно.

В іншому втіленні даного винаходу запропонована композиція для лікування раку, що містить GDC-0973 (II) або GDC-0623 (IIa), або їх фармацевтично прийнятну сіль, та інгібітор ERK, обраний з Ia, Ib, Iv або Ig, або їх фармацевтично прийнятної солі для лікування раку.

В іншому втіленні даного винаходу запропонована композиція для лікування раку, що містить GDC-0973 (II) або його фармацевтично прийнятну сіль, і інгібітор ERK, обраний з Ia, Ib, Iv або Ig, або їх фармацевтично прийнятної солі для лікування раку.

В іншому втіленні даного винаходу запропонована композиція для лікування раку, що містить GDC-0973 (II) або GDC-0623 (IIa), або їх фармацевтично прийнятну сіль, і інгібітор ERK, обраний з Ia, Ib, Iv або Ig, або їх фармацевтично прийнятної солі для лікування ракового захворювання, де зазначене ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: колоректальний рак, рак легені, мезотеліома, рак молочної залози, рак підшлункової залози, гліома, рак шлунка, рак нирки, рак яєчника, рак ендометрію, рак сечового міхура та рак голови і шиї.

В іншому втіленні даного винаходу запропонована композиція для лікування раку, що містить GDC-0973 (II) або його фармацевтично прийнятну сіль, і інгібітор ERK, обраний з Ia, Ib, Iv або Ig, або їх фармацевтично прийнятної солі для лікування ракового захворювання, де зазначене ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: колоректальний рак, рак легені, мезотеліома, рак молочної залози, рак підшлункової залози, гліома, рак шлунка, рак нирки, рак яєчника, рак ендометрію, рак сечового міхура та рак голови і шиї.

В іншому втіленні даного винаходу запропоновано застосування MEKі формули II і інгібітора ERK формули Ia для виготовлення лікарського засобу для лікування раку або гіперпроліферативного захворювання.

В іншому втіленні даного винаходу запропоновано застосування MEKі формули II і інгібітора ERK формули Ia для виготовлення лікарського засобу для лікування раку.

В іншому втіленні даного винаходу запропоновано набір, що містить GDC-0973 або GDC-0623, або їх фармацевтично прийнятну сіль, GDC-0994 або його фармацевтично прийнятну сіль, контейнер і листок-вкладиш в упаковці або етикетку, на яких зазначено, що введення GDC-0973 або GDC-0623, або їх фармацевтично прийнятної солі і GDC-0994 призначене для лікування раку.

В іншому втіленні даного винаходу запропонований продукт, що містить GDC-0973 або GDC-0623, або їх фармацевтично прийнятну сіль, і GDC-0994 або його фармацевтично прийнятну сіль, у вигляді комбінованого препарату для окремого, одночасного або послідовного застосування в лікуванні раку.

В іншому втіленні даного винаходу запропонована комбінація GDC-0973 або GDC-0623, або їх фармацевтично прийнятної солі та інгібітора ERK для терапевтичного лікування раку.

В іншому втіленні винаходу запропонований спосіб лікування раку або гіперпроліферативного захворювання, де кожний з GDC-0973 або його фармацевтично прийнятної солі, або GDC-0623, або його фармацевтично прийнятної солі і GDC-0994 вводиться в кількості від приблизно 1 мг до приблизно 1000 мг на стандартну лікарську форму.

В іншому втіленні даного винаходу запропонований спосіб лікування раку або гіперпроліферативного захворювання, в якому GDC-0973 або його фармацевтично прийнятна сіль вводиться в дозі 60 мг на добу 1-21 28-добового циклу, і GDC-0994 або його фармацевтично прийнятна сіль вводиться в кількості від приблизно 1 мг до приблизно 1000 мг на стандартну лікарську форму.

В іншому втіленні даного винаходу запропонований спосіб лікування ракового або гіперпроліферативного захворювання комбінацією GDC-0973 і GDC-0994, в якому GDC-0973 вводиться один раз або двічі на добу протягом трьох тижнів чотиритижневого циклу в дозі від 3 мг/кг до 7,5 мг/кг, і GDC-0994 вводиться один раз або двічі на добу протягом трьох тижнів чотиритижневого циклу в дозі від 25 мг/кг до 75 мг/кг.

#### Фармацевтичні композиції

Фармацевтичні композиції або препарати за даним винаходом включають комбінації, описані в даному документі.

Сполука або її фармацевтично прийнятна сіль також можуть існувати в різних таутомерних формах, і усі такі форми охоплені в межах обсягу винаходу. Термін "таутомер" або "таутомерна форма" відноситься до структурних ізомерів різних енергій, які взаємно перетворюються через малий енергетичний бар'єр. Наприклад, протонні таутомери (також відомі як прототропні таутомери) включають взаємоперетворення через міграцію протона, такі як кето-енольні та імін-енамінні ізомеризації. Валентні таутомери включають взаємоперетворення за допомогою реорганізації деяких зв'язуючих електронів.

Фармацевтичні композиції охоплюють і об'ємну композицію, і індивідуальні одиниці дозування, що складаються з більше ніж одного (наприклад, двох) фармацевтично активних агентів, поряд з будь-якими фармацевтично неактивними ексципієнтами, розріджувачами, носіями або ковзними речовинами. Об'ємна композиція і кожна індивідуальна одиниця дозування може містити фіксовані кількості вищезгаданих фармацевтично активних агентів. Об'ємна композиція є речовиною, яку ще не було перетворено на індивідуальні одиниці дозування. Ілюстративною одиницею дозування є пероральна одиниця дозування, така як таблетки, пігулки, капсули і т.п. Аналогічним чином, також мається на увазі, що описаний в даному документі спосіб лікування пацієнта шляхом введення фармацевтичної композиції за даним винаходом охоплює введення об'ємної композиції та індивідуальних одиниць дозування.

Фармацевтично прийнятні солі сполук готують згідно зі стандартною фармацевтичною практикою для застосування у терапевтичній комбінації для терапевтичного лікування гіперпроліферативних розладів (таких як рак, таких як потрійний негативний рак молочної залози) у ссавців, включаючи людину (таких як люди чоловічої і жіночої статі). Згідно з винаходом запропонована фармацевтична композиція, що містить комбінацію, як описано в даному документі, у асоціації з одним або більше ніж одним фармацевтично прийнятним носієм, ковзною речовиною, розріджувачем або ексципієнтом.

Відповідні носії, розріджувачі і ексципієнти добре відомі фахівцям в даній області і включають такі речовини, як вуглеводи, воски, водорозчинні та/або набухаючі полімери, гідрофільні або гідрофобні речовини, желатин, масла, розчинники, воду і т.п. Конкретний використовуваний носій, розріджувач або ексципієнт буде залежати від засобів і мети, для якої застосовується сполука за даним винаходом. Розчинники зазвичай вибирають на основі розчинників, відомих фахівцям в даній області як безпечні (GRAS), такі, що підлягають введенню ссавцю. Загалом, безпечними розчинниками є нетоксичні водні розчинники, такі як вода та інші нетоксичні розчинники, які розчинні у воді або змішуються з водою. Відповідні водні

розчинники включають воду, етанол, пропіленгліколь, поліетиленгліколи (наприклад, PEG 400, PEG 300) і т.д., та їх суміші. Композиції також можуть включати один або більше ніж один буфер, стабілізуючий агент, поверхнево-активну речовину, зволожувач, змашувальний агент, емульгатор, суспендувальний агент, консервант, антиоксидант, агент, що забезпечує непрозорість, ковзну речовину, допоміжну речовину для переробки, барвник, підсолоджувач, ароматизуючу добавку, коригент та інші відомі добавки для забезпечення привабливого вигляду лікарського засобу (тобто сполуки за даним винаходом або її фармацевтичної композиції) або сприяння у виготовленні фармацевтичного продукту (тобто лікарського засобу).

Фармацевтична композиція (або препарат) для введення може бути упакована безліччю способів, залежно від способу, використовуваного для введення лікарського засобу. Загалом, розповсюджуваний виріб включає контейнер, що містить вміщену у нього фармацевтичну композицію у відповідній формі. Відповідні контейнери добре відомі фахівцям в даній області і включають такі матеріали, як бутлі (пластмасові та скляні), пакетики, ампули, пластмасові мішки, металеві циліндри і т.п. Контейнер також може включати блок, що оберігає від невмілого поводження, для запобігання необережного доступу до вмісту упаковки. Крім того, контейнер має етикетку, накладену на нього, на якій описано вміст контейнера. Етикетка також може включати відповідні попередження.

Фармацевтичні композиції будуть дозуватися і вводитися способом, наприклад, у кількостях, концентраціях, схемах, курсах, носіях та шляху введення, що узгоджуються з належною медичною практикою. Чинники для розгляду в даному контексті включають конкретний розлад, який лікують, конкретного ссавця, якого лікують, клінічний стан індивідуального пацієнта, причину розладу, місце доставки агента, спосіб введення, схему введення та інші чинники, відомі практикуючим лікарям. "Терапевтично ефективна кількість", що підлягає введенню, буде визначатися такими міркуваннями, і являє собою мінімальну кількість, необхідну для попередження, зменшення інтенсивності або лікування розладу, опосередкованого чинником згортання. Така кількість переважно менша за кількість, яка є токсичною для господаря або робить господаря значно чутливішим до кровотечі.

Композиції комбінацій, які підходять для перорального введення, можна отримувати у вигляді дискретних одиниць, таких як пігулки, тверді або м'які, наприклад, желатинові капсули, крохмальні облатки, коржі, льодяники, водні або масляні суспензії, дисперговні порошки або гранули, емульсії, сиропи або еліксири, причому кожний містить задану кількість GDC-0973 і GDC-0623 або її фармацевтично прийнятної солі; та інгібітор ERK формули Ia-Ig. Кількість GDC-0973 або GDC-0623 і Ia-Ig або їх фармацевтично прийнятної солі може бути приготовлена у пігулці, капсулі, розчині або суспензії у вигляді об'єднаної композиції. Як альтернатива, дана комбінація може бути приготовлена окремо в пігулці, капсулі, розчині або суспензії для введення по черзі.

Композиції можуть бути отримані відповідно до будь-якого способу, відомого в області виготовлення фармацевтичних композицій, і такі композиції можуть містити один або більше ніж один агент, що включає підсолоджувачі, коригенти, барвники і консерванти, для отримання препарату з привабливим смаком. Пресовані таблетки можна отримувати пресуванням у відповідній машині активного інгредієнта у формі, що має вільну сипкість, такий як порошок або гранули, можливо у суміші зі зв'язувальною речовиною, мастилом, інертним розріджувачем, консервантом, поверхнево-активною речовиною або диспергуючим агентом. Відлиті таблетки можна робити шляхом відливання у відповідній машині суміші порошкового активного інгредієнта, зволоженого інертним рідким розріджувачем. Таблетки, можливо, можна покривати або наносити на них риси і можливо готувати так, щоб забезпечувати повільне або контрольоване вивільнення з них активного інгредієнта. Експіцієнти таблеток фармацевтичної композиції можуть включати: наповнювач (або розріджувач) для збільшення насипного об'єму порошкового лікарського засобу, з якого складається таблетка; розпушувачі для стимулювання розпаду таблетки на маленькі фрагменти, ідеально - індивідуальні частинки лікарського засобу, при її ковтанні і стимулювання швидкого розчинення і поглинання лікарського засобу; зв'язувальну речовину для забезпечення утворення гранул і таблеток з необхідною механічною міцністю і збереження цілісної таблетки після її пресування, запобігаючи її розпаду на порошки, що її складають, під час пакування, доставки і звичайного поводження з нею; ковзну речовину для поліпшення сипкості порошку, з якого складається таблетка, під час виробництва; змашувальну речовину для забезпечення того, щоб порошок, який таблетують, не прилипав до обладнання, використовуваного для пресування таблетки під час виготовлення. Вони покращують сипкість порошкових сумішей крізь преси та мінімізують тертя і розпад, коли готові таблетки викидаються з обладнання; протиадгезивний засіб з функцією, аналогічною функції ковзної речовини, що зменшує прилипання між порошком, з якого складається таблетка, і

машиною, яка використовується для виштамповування форми таблетки під час виготовлення; коригент, включений до таблеток для надання їм більш приємного смаку або для маскування неприємного смаку, і барвник для допомоги у ідентифікації та дотриманні пацієнтом схеми і режиму лікування.

5 Прийнятними є таблетки, що містять активний інгредієнт у суміші з нетоксичним фармацевтично прийнятним ексципієнтом, який підходить для виготовлення таблеток. Даними ексципієнтами можуть бути, наприклад, інертні розріджувачі, такі як карбонат кальцію або натрію, лактоза, фосфат кальцію або натрію; гранулятори і розпушувачі, такі як кукурудзяний крохмаль або альгінова кислота; зв'язувальні агенти, такі як крохмаль, желатин або аравійська камедь; і змащувальні агенти, такі як стеарат магнію, стеаринова кислота або тальк. Таблетки  
10 можуть бути непокритими або можуть бути покриті за допомогою відомих методик, що включають мікроінкапсулювання для затримки розпаду і поглинання в шлунково-кишковому тракті і, за допомогою цього, забезпечення тривалої дії протягом більш тривалого періоду. Наприклад, може бути використана речовина, що забезпечує затримку вивільнення у часі, така як гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат, одна або з воском.

Масляна фаза емульсій за даним винаходом може бути складена з відомих інгредієнтів відомим способом, що включає отримання суміші щонайменше одного емульгатора з жиром або маслом, або як з жиром, так і з маслом. Переважно гідрофільний емульгатор включений разом з ліпофільним емульгатором, який діє як стабілізатор. Спільно емульгатор(ри) з або без  
20 стабілізатора(рів) складають емульгуючий віск, і цей віск разом з маслом і жиром складають емульгуючу основу мазі, яка утворює масляну дисперсну фазу композицій у вигляді крему. Емульгатори і стабілізатори емульсій, що підходять для застосування у композиції, включають Tween® 60, Span® 80, цетостеариловий спирт, бензиловий спирт, міристиловий спирт, гліцерилмоностеарат і лаурилсульфат натрію.

Водні суспензії фармацевтичних композицій містять активні речовини в суміші з відповідними ексципієнтами для виготовлення водних суспензій. Такі ексципієнти включають суспендувальний агент, такий як натрію карбоксиметилцелюлоза, кроскармелоза, повідон, метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, альгінат натрію, полівінілпіролідон, трагакантова камедь і аравійська камедь, і диспергуючий агент або зволожувач, такий як  
30 фосфатид (наприклад, лецитин), що зустрічається у природі, продукт конденсації алкіленоксиду з жирною кислотою (наприклад, поліоксіетиленстеарат), продукт конденсації етиленоксиду з довголанцюговим аліфатичним спиртом (наприклад, гептадекаетиленоксицетанол), продукт конденсації етиленоксиду з частковим складним ефіром, що походить з жирної кислоти і ангідриду гекситолу (наприклад, поліоксіетиленсорбітану моноолеат). Водна суспензія також  
35 може містити один або більше ніж один консервант, такий як етил- або н-пропіл-п-гідроксибензоат, один або більше ніж один барвник, один або більше ніж один коригент і один або більше ніж один підсолоджувач, такий як сахароза або сахарин.

Кількість(ті) активного(них) інгредієнта(тів), яку (які) можна об'єднувати з речовиною-носієм з отриманням однієї лікарської форми, буде варіювати, залежно від господаря, якого лікують, і  
40 конкретного способу введення. Наприклад, композиція з регульованим у часі вивільненням, призначена для перорального введення людині, може містити приблизно від 1 до 1000 мг активної речовини, приготованої з відповідною і зручною кількістю речовини-носія, яка може варіювати від приблизно 5 до приблизно 95 % від повних композицій (мас./мас.). Фармацевтичну композицію можна приготувати так, щоб вона давала легко вимірні кількості для  
45 введення. Наприклад, водний розчин, призначений для внутрішньовенної інфузії, може містити від приблизно 3 до 500 мкг активного інгредієнта на мілілітр розчину для того, щоб могла відбуватися інфузія відповідного об'єму зі швидкістю приблизно 30 мл/год.

#### Вироби

В іншому втіленні винаходу запропоновано виріб або "набір", що містить корисну комбінацію  
50 для лікування захворювань і розладів, описаних вище. В одному втіленні набір містить контейнер і комбінацію, описану в даному документі.

Цей набір може додатково містити етикетку або листок-вкладиш в упаковці, на або асоційований з контейнером. Термін "листок-вкладиш в упаковці" використовується для назви інструкцій, які традиційно включають у наявні в продажу упаковки терапевтичних продуктів, які  
55 містять інформацію про показання, застосування, дозування, введення, протипоказання і/або попередження щодо застосування таких терапевтичних продуктів. Відповідні контейнери включають, наприклад, бутлі, флакони, шприци, блістерну упаковку і т.д. Контейнер може бути створений з цілого ряду матеріалів, таких як скло або пластмаса. Контейнер може вміщати комбінацію або її препарат, яка є ефективною для лікування стану, і може мати стерильний порт доступу (наприклад, контейнер може бути мішком з внутрішньовенним розчином або флаконом,  
60

що має пробку, проникну підшкірною ін'єкційною голкою). На етикетці або листку-вкладиші в упаковці вказано, що композиція використовується для лікування обраного стану, такого як рак. В одному втіленні на етикетці або листах-вкладишах в упаковці вказано, що композицію, що містить комбінацію, можна використовувати для лікування розладу, що виникає через ненормальний ріст клітин. На етикетці або листку-вкладиші в упаковці також може бути зазначено, що композицію можна використовувати для лікування інших розладів. Як альтернативу або додатково, виріб може додатково містити другий контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкції (BFWI), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрози. Він може додатково включати інші матеріали, бажані з комерційної або користувацької точки зору, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Цей набір може додатково містити вказівки для введення комбінації і, за її наявності, другої фармацевтичної композиції. Наприклад, якщо набір містить першу композицію, яка містить GDC-0973 або GDC-0623 або їх фармацевтично прийнятну сіль, і другу фармацевтичну композицію, що містить інгібітор ERK, або його фармацевтично прийнятну сіль, цей набір може додатково містити вказівки для одночасного, послідовного або роздільного введення першої і другої фармацевтичних композицій пацієнту, який цього потребує.

В іншому втіленні набори підходять для доставки твердих пероральних форм комбінації, таких як таблетки або капсули. Такий набір переважно включає цілий ряд одиничних дозувань. Такі набори можуть включати картку, на якій є дозування, зазначені у порядку їх наміченого застосування. Прикладом такого набору є "блістерна упаковка". Блістерні упаковки добре відомі в пакувальній промисловості і широко використовуються для пакування фармацевтичних стандартних лікарських форм. Якщо це бажано, може бути надана пам'ятка, наприклад, у вигляді чисел, літер або інших позначок, або зі вставкою календаря, з позначенням діб у схемі лікування, в які можна вводити дозування.

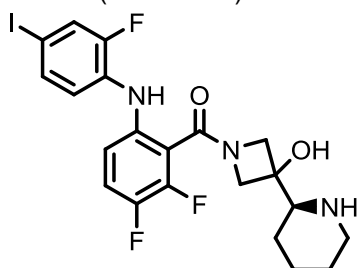
Відповідно до одного втілення набір може містити: (а) перший контейнер з GDC-0973 або GDC-0623, (б) другий контейнер з інгібітором ERK, або його фармацевтично прийнятною сіллю, що міститься у ньому, і (в) третій контейнер з третьою фармацевтичною композицією, що міститься у ньому, де третя фармацевтична композиція містить іншу сполуку з антигіперпроліферативною активністю. Як альтернативу або додатково цей набір може містити третій контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкції (BFWI), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрози. Він може додатково включати інші матеріали, бажані з комерційної або користувацької точки зору, включаючи інші буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Коли набір містить композицію GDC-0973 або GDC-0623, або її фармацевтично прийнятну сіль і інгібітор ERK, або його фармацевтично прийнятну сіль, цей набір може включати контейнер для уміщення окремих композицій, такий як розділений бутель або розділений пакет з фольги, однак, окремі композиції також можуть міститися в одному, нерозділеному контейнері. Типово цей набір містить вказівки для введення окремих компонентів. Форма набору є особливо корисною, коли окремі компоненти переважно вводяться в різних лікарських формах (наприклад, пероральній і парентеральній), вводяться з різними інтервалами дозування, або, коли, згідно з виписаним лікарем рецептом, бажане титрування індивідуальних компонентів комбінації.

Фраза "фармацевтично прийнятна сіль" у тому вигляді, в якому вона використовується в даному документі, відноситься до фармацевтично прийнятних органічних або неорганічних солей сполуки за даним винаходом. Типові солі включають сульфатні, цитратні, ацетатні, оксалатні, хлоридні, бромідні, йодидні, нітратні, бісульфатні, фосфатні, кислі фосфатні, ізонікотинатні, лактатні, саліцилатні, кислі цитратні, тартратні, олеатні, танатні, пантотенатні, бітартратні, аскорбатні, сукцинатні, малеатні, гентизинатні, фумаратні, глюконатні, глюкуронатні, сахаратні, форміатні, бензоатні, глутаматні, метансульфонатні "мезилатні", етансульфонатні, бензолсульфонатні, п-толуолсульфонатні і памоатні (тобто 1,1'-метилеи-бис-(2-гідрокси-3-нафтоатні)) солі, але не обмежуються ними. Фармацевтично прийнятна сіль може мати включення іншої молекули, такої як ацетатний іон, сукцинатний іон або інший протиіон. Протиіон може бути будь-яким органічним або неорганічним угрупованням, яке стабілізує заряд на батьківській сполуці. Крім того, фармацевтично прийнятна сіль може мати більше ніж один заряджений атом у її структурі. Приклади, коли багато заряджених атомів є частиною фармацевтично прийнятної солі, можуть мати численні протиіони. Отже, фармацевтично прийнятна сіль може мати один або більше ніж один заряджений атом і/або один або більше ніж один протиіон.

Довідковий приклад 1

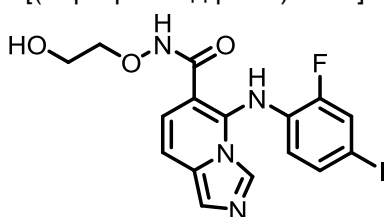
(S)-(3,4-дифтор-2-((2-фтор-4-йодфеніл)аміно)феніл)(3-гідрокси-3-(піперидин-2-іл)азетидин-1-іл)метанон (GDC-0973)



Сполуку, вказану в заголовку, можна отримувати, як описано K. D. Rice, et al., ACS Med. Chem. Lett. 2012 3:416-421 у Прикладі 22 WO2007044515 або, як альтернативу, як описано K. D. Rice et al., Novel Carboxamide-Based Allosteric MEK inhibitors: Discovery and Optimization Efforts toward XL518 (GDC-0973), Med. Chem. Lett. 2012 3:416.

Довідковий приклад 2

5-[ (2-фтор-4-йодфеніл)аміно]-N-(2-гідроксиетокси)-імідазо[1,5-a]піридин-6-карбоксамід

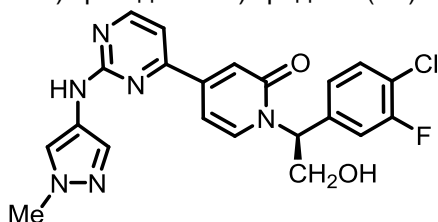


IIa

Сполуку, вказану в заголовку, можна отримувати, як описано у Прикладі 5 WO2009085983.

Довідковий приклад 3

(S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфеніл)-2-гідроксиетил)-4-((1-метил-1H-піразол-4-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-он



4-(2-(метилтіо)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-он

Стадія 1: суспензію 4-бром-2-(метилтіо)піримідину (7,00 г, 34,1 ммоль), 2-фторпіридин-4-ілборонової кислоти (5,05 г, 35,8 ммоль),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10,9 г, 102 ммоль) і  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1,40 г, 1,71 ммоль) у діоксані/ $\text{H}_2\text{O}$  (100 мл; 1:1) нагрівали до  $85^\circ\text{C}$  під балоном з Ar протягом 2 год. Реакційну суміш охолоджували до RT (кімнатна температура) і концентрували. Залишок розбавляли етилацетатом (200 мл) і водою (100 мл). Шари розділяли, і водний шар екстрагували етилацетатом (1X). Органічні сполуки сушили, фільтрували і концентрували. Неочищений продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії, елюючи гексанами/етилацетатом (3:1), з отриманням 4-(2-фторпіридин-4-іл)-2-(метилтіо)піримідину (6,83 г, 90 %) у вигляді твердої речовини.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  8.85 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8.46 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8.11 (m, 1H), 7.96 (d, J=5,2 Гц, 1H), 7.92 (s, 1H), 2.62 (s, 3H); m/z (ХІАТ-поз.) (хімічна іонізація при атмосферному тиску в режимі визначення позитивних іонів)  $M+1=222,1$ .

Стадія 2: суспензію 4-(2-фторпіридин-4-іл)-2-(метилтіо)піримідину (6,83 г, 30,9 ммоль) у 2 н.  $\text{HCl}$  (100 мл) нагрівали до температури флегмоутворення протягом 2 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і поміщали у баню з льодом. рН підводили приблизно до 7 2 н.  $\text{NaOH}$  (приблизно 100 мл). Тверді речовини, що утворювалися, збирали фільтруванням, промивали водою і сушили з отриманням 4-(2-(метилтіо)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-ону (5,07 г) у вигляді твердої речовини. Цю речовину поміщали у муфту установки Soxhlet і приєднували до 1-літрової колби, завантаженої етилацетатом (500 мл). Речовину безперервно екстрагували протягом 3 діб. Білий осад, що утворювався з шару етилацетату збирали фільтруванням (3,3 г, вихід 49 %).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ )  $\delta$  11.85 (br, s, 1H), 8.75 (d, J=5,0 Гц, 1H), 7.79 (d, J=5,0 Гц, 1H), 7.54 (d, J=7,0 Гц, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.86 (d, J=7,0 Гц, 1H), 2.58 (s, 3H); m/z (ХІАТ-поз.)  $M+1=220,0$ .

(R)-2-(трет-бутилдиметилсилілокси)-1-(4-хлор-3-фторфеніл) етилметансульфонат



Стадія 1: гідрид натрію (8,549 г, 213,7 ммоль, 60 %-ва суспензія в мінеральному маслі) додавали частинами у холодний (0 °C) розчин 4-хлор-3-фторбензальдегіду (26,07 г, 164,4 ммоль) і метилтрифенілфосфонію броміду (70,48 г, 197,3 ммоль) у THF (тетрагідрофуран) (400 мл). Реакційній суміші давали нагрітися до RT протягом ночі. Тверді речовини видаляли фільтруванням, і осад на фільтрі промивали ефіром. Фільтрат концентрували (водна баня з температурою приблизно 20 °C), і залишок суспендували у гексанах і перемішували протягом 30 хвилин. Тверді речовини (головним чином  $\text{PPh}_3\text{O}$ ) видаляли фільтруванням, і осад на фільтрі промивали гексанами. Фільтрат концентрували, і неочищений продукт очищали колонковою хроматографією, елюючи гексанами/етилацетатом (25:1) з отриманням 1-хлор-2-фтор-4-вінілбензолу (12,1 г, 47 %) у вигляді масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33 (m, 1H), 7.18 (m, 1H), 7.10 (m, 1H), 6.63 (m, 1H), 5.74 (d,  $J=17,4$  Гц, 1H), 5.32 (d,  $J=10,8$  Гц, 1H).

Стадія 2: 1-хлор-2-фтор-4-вінілбензол (12,1 г, 77,3 ммоль) додавали у холодний (0 °C) розчин AD-mix- $\beta$  (108 г, 139 ммоль) у  $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  (600 мл, 1:1), і давали даній суміші нагрітися до RT протягом ночі. Наступної доби реакційну суміш поміщали у баню з льодом і гасили твердим  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (114 г). Цю суміш перемішували протягом 1 год. і потім екстрагували етилацетатом (3  $\times$  500 мл). Об'єднані органічні сполуки сушили, фільтрували і концентрували з отриманням (R)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етан-1,2-діолу у вигляді масла. Неочищений продукт використовували на наступній стадії без очищення.

Стадія 3: імідазол (13,1 г, 193 ммоль) додавали у холодний (0 °C) розчин (R)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етан-1,2-діолу (14,7 г, 77,1 ммоль) у DCM (дихлорметан) (100 мл), з подальшим додаванням TBSCl (12,8 г, 84,8 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 0 °C протягом 1 години і потім гасили водою (50 мл). Шари розділяли, і органічні сполуки сушили, фільтрували і концентрували. Неочищений продукт очищали колонковою хроматографією, елюючи гексанами/етилацетатом (100:1) з отриманням (R)-2-(трет-бутилдиметилсилілокси)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етанолу (11,0 г, 47 % за два етапи).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.08 (m, 1H), 4.71 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 2.96 (d,  $J=2,6$  Гц, 1H), 0.90 (s, 9H), 0.07 (s, 3H), 0.06 (s, 3H).

Стадія 4: триетиламін (2,09 мл, 15,0 ммоль) додавали у холодний (0 °C) розчин (R)-2-(трет-бутилдиметилсилілокси)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етанолу (3,05 г, 10,0 ммоль) у DCM (100 мл), з подальшим додаванням метансульфонілхлориду (0,929 мл, 12,0 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 0 °C протягом 30 хвилин і потім гасили водою (50 мл). Шари розділяли, і органічний шар промивали насиченою  $\text{NaHCO}_3$ , сушили, фільтрували і концентрували з отриманням неочищеного продукту. Неочищений продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії, елюючи гексанами/етилацетатом (25:1) з отриманням (R)-2-(трет-бутилдиметилсилілокси)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етилметансульфонату (3,80 г, 99 %) у вигляді масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.42 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 5.50 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 2.98 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.05 (s, 3H), 0.04 (s, 3H).

(S)-1-(2-(трет-бутилдиметилсилілокси)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етил)-4-(2-(метилсульфоніл)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-он

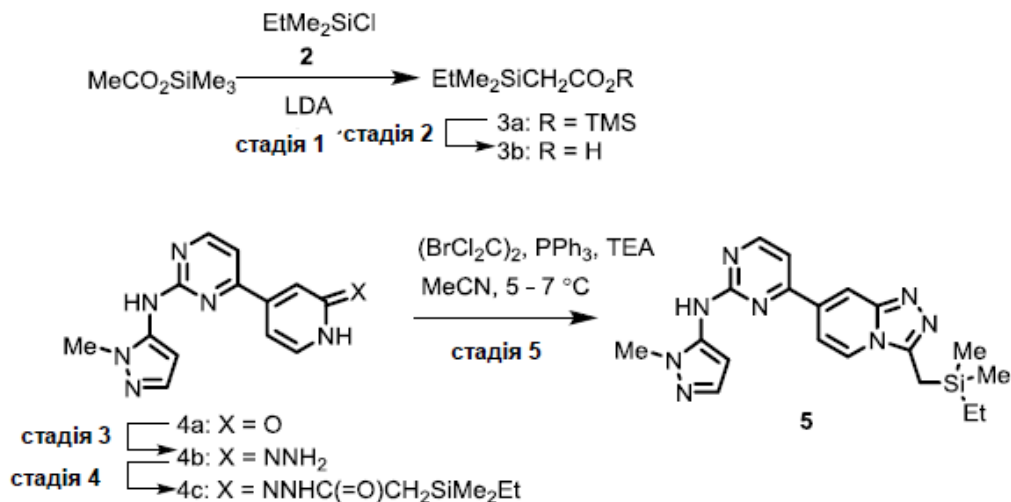
Стадія 1: 1,0 M KHMDS (біс (триметилсиліл)амід калію) (5,09 мл, 5,09 ммоль) у вигляді розчину в THF додавали у холодну (0 °C) суспензію 4-(2-(метилтіо)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-ону (0,93 г, 4,24 ммоль) у THF (тетрагідрофуран) (20 мл). Реакційну суміш перемішували при 0 °C протягом 10 хвилин перед додаванням (R)-2-(трет-бутилдиметилсилілокси)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етилметансульфонату (2,44 г, 6,36 ммоль) у вигляді розчину в THF (5 мл). Реакційну суміш нагрівали до температури флегмоутворення протягом 30 год. і потім охолоджували до RT та концентрували. Залишок відбирали у етилацетат (200 мл) і промивали водою. Органічні речовини сушили, фільтрували і концентрували. Неочищений продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії, елюючи гексанами/етилацетатом (4:1) з отриманням (S)-1-(2-(трет-бутилдиметилсилілокси)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етил)-4-(2-(метилтіо)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-ону (1,35 г, 63 %) у вигляді твердої речовини.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.66 (d,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7.43 (m, 2H), 7.34 (d,  $J=5,0$  Гц, 1H), 7.32-7.28 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.24 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 2.65 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), -0.03 (s, 3H);  $m/z$  (ХІАТ-поз.)  $M+1=506,1$ , 508,1.

Стадія 2: mCPBA (мета-хлорпербензойна кислота) (7,1 г, 29 ммоль) додавали у холодний (0 °C) розчин (S)-1-(2-(трет-бутилдиметилсилілокси)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етил)-4-(2-(метилтіо)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-ону (5,8 г, 11 ммоль) у DCM (100 мл), і перемішували цю суміш протягом 2 годин. Реакційну суміш промивали насиченим  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (1X),  $\text{NaHCO}_3$  (1X), сушили, фільтрували і упарювали. Неочищений продукт очищали за допомогою колонкової хроматографії, елюючи гексанами/етилацетатом (1:1) з отриманням (S)-1-(2-(трет-бутилдиметилсилілокси)-1-(4-хлор-3-фторфеніл)етил)-4-(2-(метилсульфоніл)піримідин-4-

іл)піридин-2(1H)-ону (5,5 г, 89 %) у вигляді твердої речовини.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.06 (d,  $J=5,2$  Гц, 1H), 7.91 (d,  $J=5,4$  Гц, 1H), 7.55 (d,  $J=7,4$  Гц, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.32 (d,  $J=2,4$  Гц, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.22 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.24 (m, 1H), 3.45 (s, 3H), 0.88 (s, 9H), 0.03 (s, 3H), -0.03 (s, 3H);  $m/z$  (ХІАТ-поз.)  $M+1=538,1, 540,0$ .

5 Довідковий приклад 4

4-[3-[[етил(диметил)силіл]метил]-[1,2,4]триазоло[4,3-а]піридин-7-іл]-N-(2-метилпіразол-3-іл)піримідин-2-амін



2-(етилдиметилсиліл)оцтова кислота (4)

10 У розчин THF (40 мл) і LDA (діізопропіламід літію) (8,8 мл, 17,5 ммоль), охолоджений до мінус 78 °С, повільно додавали триметилсилілацетат (2,0 г, 15,1 ммоль). Цю суміш перемішували при мінус 78 °С протягом 2 год. Додавали хлор(етил)диметилсилан (2,1 г, 17,5 ммоль), і розчин, що утворювався, перемішували протягом 2 год. Суміш гасили розсолон (10 мл), потім повільно додавали HCl (10 мл, 1 н.), і розчин, що утворювався, екстрагували

15 МТБЕ (метил-трет-бутиловий ефір) (3 × 20 мл). Об'єднані екстракти сушили, концентрували і залишок очищали  $\text{SiO}_2$ -хроматографією, елюючи EtOAc/гексаном (1:10) з отриманням 1,0 г (45 %) 2-(етилдиметилсиліл)оцтової кислоти у вигляді безбарвного масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ =1.80 (s, 1H), 0.84 (t,  $J=8,0$  Гц, 3H), 0.50 (q,  $J=8,0$  Гц, 2H), 0.00 (s, 6H).

20 (Z)-2-(етилдиметилсиліл)-N'-(4-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-іліден)ацетогідрозид (7)

До 2-хлор-1-метилпіридин-1-ію (1,36 г, 5,3 ммоль) у DCM (10 мл) додавали (Z)-4-(2-гідразоно-1,2-дигідропіридин-4-іл)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-амін (1,3 г, 4,6 ммоль) і 2-(етилдиметилсиліл)оцтову кислоту (0,67 г, 4,6 ммоль) з подальшим додаванням трибутиламіну (1,96 г, 10,6 ммоль). Цю суміш перемішували при 60-80 °С протягом 1 год. Суміш концентрували, очищали на колонці  $\text{SiO}_2$ , елюючи EtOAc, потім DCM/MeOH (10:1), з отриманням

25 (Z)-2-(етилдиметилсиліл)-N'-(4-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-іліден)ацетогідрозиду (1,1 г, 44 %) у вигляді жовтої твердої речовини.

4-(3-((етилдиметилсиліл)метил)-[1,2,4]триазоло[4,3-а]піридин-7-іл)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-амін (GNT\_D379\_285-1)

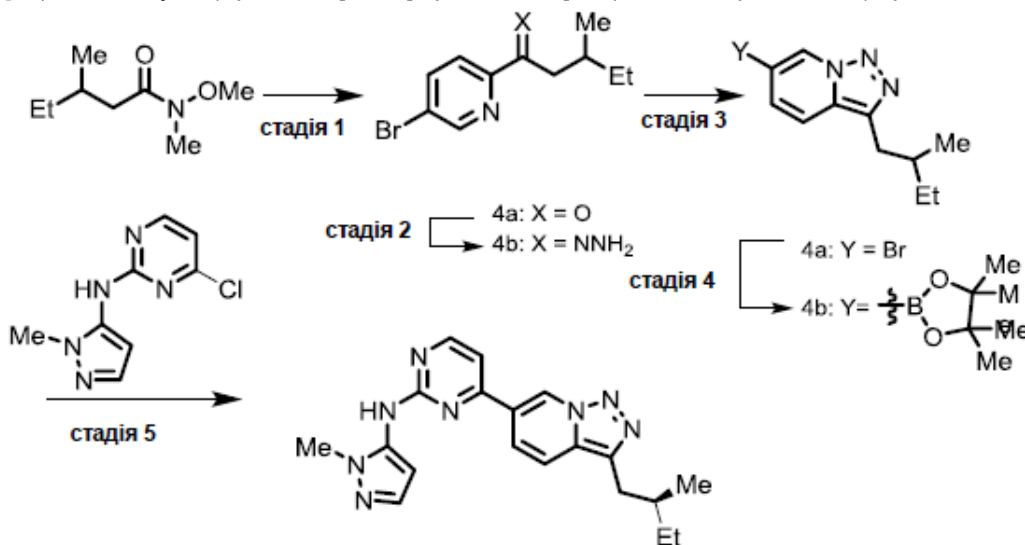
30 Колбу завантажували (Z)-2-(етилдиметилсиліл)-N'-(4-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-іліден)ацетогідрозидом (7) (500 мг, 1,22 ммоль) і 1,2-дибромтетрахлоретаном (793 мг, 2,44 ммоль), потім додавали  $\text{CH}_3\text{CN}$  (20 мл), з подальшим порційним додаванням  $\text{PPh}_3$  (798 мг, 3,0 ммоль). Цю суміш перемішували при 5-7 °С протягом 1 години, потім додавали краплями TEA (триетиламін) (1,0 мл), і суміш, що утворювалася,

35 перемішували при 5-7 °С протягом 2 годин. Суміш фільтрували, фільтрат концентрували, очищали  $\text{SiO}_2$ -хроматографією, елюючи EtOAc, потім MeOH/DCM (1:20), з отриманням неочищеної речовини (200 мг), яку промивали EtOAc і MeOH (три рази) з отриманням 4-(3-((етилдиметилсиліл)метил)-[1,2,4]триазоло[4,3-а]піридин-7-іл)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-аміну (GNT\_D379\_285-1) (73 мг, 15 %) у вигляді білої твердої речовини.

40  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  = 9.58 (s, 1H), 8.60 (d,  $J=5,2$  Гц, 1H), 8.56 (d,  $J=7,6$  Гц, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.68 (d,  $J=5,2$  Гц, 1H), 7.59 (d,  $J=7,6$  Гц, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.60 (s, 2H), 0.88 (t,  $J=8,0$  Гц, 3H), 0.58 (t,  $J=8,0$  Гц, 2H), 0.05 (s, 6H); МС (масспектрометрія)  $[M+H]^+ = 392,19$ .

Довідковий приклад 5

## 4-[3-(2-метилбутил)триазоло[1,5-а]піридин-6-іл]-N-(2-метилпіразол-3-іл)піримідин-2-амін



## 1-(5-бромпіридин-2-іл)-3-метилпентан-1-он

Розчин 2,5-дибромпіридину (3,72 г, 15,8 ммоль) у толуолі (30 мл) охолоджували до мінус 40 °С і додавали краплями *n*-BuLi (6,32 мл, 15,8 ммоль). Цю суміш перемішували при мінус 40 °С протягом 1 години, і потім додавали краплями розчин *N*-метокси-*N*, 3-диметилпентанаміду (2,1 г, 13,2 ммоль, CASRN (реєстраційний номер CAS 1051483-44-3) і толуолу (5 мл). Суміш перемішували протягом ще 2 годин, потім гасили водним NH<sub>4</sub>Cl (водн.) і екстрагували EtOAc (2 × 50 мл). Органічну фазу сушили, концентрували і очищали на SiO<sub>2</sub> колонці, елюючи EtOAc/гексаном (1:10) з отриманням сполуки, зазначеної у заголовку (2 г, 59 %) у вигляді жовтого масла.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ: 8.75 (d, *J*=2,0 Гц, 1H), 8.13 (dd, *J*=8,4, 2,4 Гц, 1H), 7.92 (d, *J*=8,4 Гц, 1H), 3.17-3.12 (m, 1H), 2.98-2.92 (m, 1H), 2.02-2.00 (m, 1H), 1.41-1.21 (m, 2H), 0.93-0.89 (m, 6H).

## (Z)-5-бром-2-(1-гідразоно-3-метилпентил)піридин

1-(5-Бромпіридин-2-іл)-3-метилпентан-1-он (2,0 г, 6,2 ммоль) розчиняли у MeOH (50 мл) і додавали NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (5 мл). Цю суміш перемішували при температурі флегмоутворення протягом 4 годин. Додавали 2 н. NaOH (5 мл) і H<sub>2</sub>O (20 мл), і суміш, що утворювалася, екстрагували EtOAc (3 × 50 мл). Органічну фазу сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фільтрували і концентрували. Залишок використовували безпосередньо на наступній стадії без подальшого очищення: МС [M+H]<sup>+</sup> = 269,7.

## 6-бром-3-(2-метилбутил)-[1,2,3]триазоло[1,5-а]піридин

До розчину неочищеного (Z)-5-бром-2-(1-гідразоно-3-метилпентил)піридину (1,9 г, 7,1 ммоль) у CHCl<sub>3</sub> (30 мл) додавали активний MnO<sub>2</sub> (3 г, 35,3 ммоль). Цю суміш нагрівали до температури флегмоутворення і перемішували протягом 16 годин. Суміш фільтрували, фільтрат концентрували і очищали SiO<sub>2</sub>-хроматографією з отриманням 1,6 г сполуки, зазначеної у заголовку: МС [M+H]<sup>+</sup> = 267,7.

## 3-(2-метилбутил)-6-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)-[1,2,3]триазоло[1,5-а]піридин

Розчин 6-бром-3-(2-метилбутил)-[1,2,3]триазоло[1,5-а]піридину (0,8 г, 3 ммоль), 4,4,4',4',5,5,5',5'-октаметил-2,2'-бі(1,3,2-діоксаборолану) (838 мг, 3,3 ммоль), KOAc (294 мг, 9 ммоль) і Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (329 мг, 0,45 ммоль) у діоксані (30 мл) нагрівали при 100 °С з перемішуванням під N<sub>2</sub> протягом 3 год. Потім неочищений продукт використовували на наступній стадії без подальшого очищення: МС [M+H]<sup>+</sup> = 233, 7.

## N-(1-Метил-1H-піразол-5-іл)-4-[3-(2-метилбутил)-[1,2,3]триазоло[1,5-а]піридин-6-іл]піримідин-2-амін (GNT\_D379\_260):

До продукту - неочищеного складного ефіру боронової кислоти, додавали 4-хлор-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-амін (755 мг, 3,6 ммоль), Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (329 мг, 0,45 ммоль) і Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,9 г, 9 ммоль) і воду - H<sub>2</sub>O (5 мл). Цю суміш перемішували при 100 °С протягом 4 годин. Суміш фільтрували. Фільтрат концентрували і очищали на SiO<sub>2</sub>-колонці, за допомогою колонки з силікагелем, з подальшим очищенням перед-ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія) з утворенням сполуки, зазначеної у заголовку (250 мг). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ: 9.58 (s, 1H), 8.54 (d, *J*=5,2 Гц, 1H), 8.00-7.90 (m, 2H), 7.50-7.47 (m, 2H), 6.36 (d, *J*=2

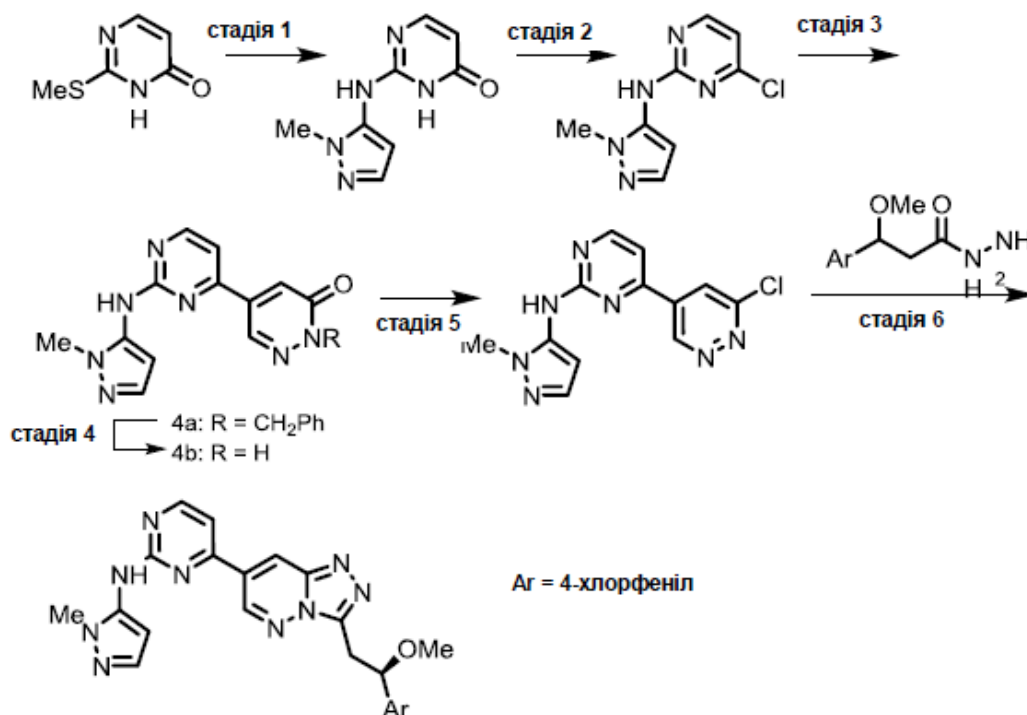
Гц, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.03-2.99 (m, 1H), 2.87-2.81 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.46-1.42 (m, 1H), 1.28-1.24 (m, 1H), 0.98-0.91 (m, 6H); МС [M+H]<sup>+</sup> = 362,9.

(S)-енантіомер отримували за допомогою SFC (надкритична рідинна хроматографія) на хіральній підкладці.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOH-d<sub>4</sub>) δ: 9.58 (s, 1H), 8.53 (d, J=5,2 Гц, 1H), 8.00-7.90 (m, 2H), 7.50-7.46 (m, 2H), 6.36 (d, J=2 Гц, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.05-2.99 (m, 1H), 2.87-2.81 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.46-1.27 (m, 1H), 1.26-1.24 (m, 1H), 0.98-0.91 (m, 6H).

Довідковий приклад 6

4-[3-[2-(4-хлорфеніл)-2-метокси-етил]-[1,2,4]триазоло[4,3-b]піридазин-7-іл]-N-(2-метилпіразол-3-іл)піримідин-2-амін



Стадія 1: 2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4(3H)-он (6)

Суміш 2-(метилтіо)піримідин-4(3H)-ону (10 г, 70 ммоль, CASRN 5751-20-2) та 1-метил-1H-піразол-5-аміну (10 г, 103 ммоль) у Me<sub>3</sub>CCO<sub>2</sub>H (50 г) нагрівали до 160 °C протягом 48 год. Цій суміші давали охолотитися до 40-50 °C, і додавали DCM (30 мл). Після перемішування протягом 10 хв розчин розбавляли н-гексаном (200 мл), що приводило до утворення червоної суспензії. Суміші давали постояти протягом 0,5 год., після чого декантували верхню прозору органічну фазу. Червону суспензію розчиняли у DCM (50 мл) і концентрували при зниженому тиску з отриманням неочищеного продукту 2 (16,5 г), який використовували на наступній стадії без будь-якого очищення.

Стадія 2: 4-хлор-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-амін (7)

До розчину 2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4(3H)-ону (16,5 г, неочищений) у MeCN (200 мл) додавали POCl<sub>3</sub> (30 мл, 0,33 моль). Цю суміш нагрівали до температури флегмоутворення протягом 15 хв. Суміш гасили льодом-водою (100 г), і pH доводили до 10 порошком Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Суміш екстрагували EtOAc (3 × 100 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), фільтрували і концентрували при зниженому тиску з отриманням неочищеного продукту. Неочищений продукт очищали SiO<sub>2</sub>-хроматографією, елюючи петролейним ефіром/EtOAc (1:1) з отриманням 7,5 г (51 % за 2 стадії) сполуки, зазначеної у заголовку. <sup>1</sup>H ЯМР (MeOH-d<sub>4</sub>, 400 МГц) δ: 8.30 (d, J=5,2, 1H), 7.42 (d, J=1,6, 1H), 6.90 (d, J=5,2, 1H), 6.28 (d, J=1,6, 1H), 3.72 (s, 3H).

Стадія 3: 2-бензил-5-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридазин-3(2H)-он (9)

До розчину 4-хлор-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-аміну (25,0 г, 119 ммоль) у діоксані (300 мл) додавали Me<sub>3</sub>SnSnMe<sub>3</sub> (46,9 г, 143,11 ммоль) і Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (13,8 г, 11,93 ммоль), цю суміш нагрівали при 125 °C в атмосфері N<sub>2</sub> протягом 3 год. До зазначеного вище розчину додавали 2-бензил-5-йодпіридазин-3(2H)-он 3 (44,7 г, 143,1 ммоль, CASRN 825633-93-0), LiCl (10,1 г, 238,5 ммоль), CuI (11,4 г, 59,6 ммоль) і Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (13,8 г, 11,93 ммоль). Цю суміш нагрівали при 125 °C в атмосфері N<sub>2</sub> протягом 16 год. Суміш охолоджували до RT і фільтрували через Celite®. Осад на фільтрі промивали DCM (3 × 200 мл). Розчини, об'єднані з DCM,

концентрували, очищали SiO<sub>2</sub>-хроматографією, елюючи градієнтом MeOH/DCM (1-5 % MeOH) з отриманням сполуки г (34 г, 84 %) у вигляді жовтої твердої речовини.

Стадія 4: 5-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридазин-3(2H)-он (10)

До розчину безводного толуолу (500 мл) і 2-бензил-5-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридазин-3(2H)-ону (34 г, 94,6 ммоль) додавали AlCl<sub>3</sub> (63 г, 473 ммоль). Цю суміш нагрівали при 120 °C в атмосфері N<sub>2</sub> протягом 1 год. Суміш охолоджували до RT, і верхній прозорий шар декантували. Тверду речовину, що залишалася, додавали у крижану воду (200 г) і перемішували при RT доти, поки початкова тверда речовина не розпадалася і не з'являлася жовта тверда речовина. Тверду речовину фільтрували і промивали крижаною водою (3 × 100 мл). Після сушіння отримували приблизно 35 г неочищеного жовтого твердого продукту.

Стадія 5: 4-(6-хлорпіридазин-4-іл)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-амін

До перемішаного POCl<sub>3</sub> (200 мл) додавали 5-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридазин-3(2H)-он (10) (35 г неочищеної сполуки, 0,13 моль) при RT. Цю суміш нагрівали при 80 °C протягом 2 год. Суміш концентрували насухо, розчиняли CHCl<sub>3</sub> (200 мл) і потім виливали у крижану воду (500 г) з перемішуванням. Суміш, що утворювалася, доводили приблизно до pH8. Цю суміш екстрагували DCM (5 × 300 мл). Об'єднаний органічний шар концентрували і очищали SiO<sub>2</sub>-хроматографією, елюючи градієнтом петролейного ефіру/EtOAc (від 1 до 50 % EtOAc) з отриманням 13 г (47 % за два етапи) сполуки, зазначеної у заголовку, у вигляді жовтої твердої речовини. <sup>1</sup>H ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 МГц) δ: 9.80 (s, 1H), 9.74 (s, 1H), 8.70 (d, J=4,8, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.72 (d, J=5,2, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.68 (s, 3H).

Стадія 6: 4-(3-(2-(4-хлорфеніл)-2-метоксиетил)-[1,2,4]триазоло[4,3-b]піридазин-7-іл)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-амін

До перемішаного розчину 4-(6-хлорпіридазин-4-іл)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-аміну (200 мг, 0,758 ммоль) в IPA (3 мл) додавали 3-(4-хлорфеніл)-3-метоксипропангідрозид (200 мг, 0,834 ммоль) і метансульфонову кислоту (1,2 мг, 1,6 ммоль). Реакційну суміш перемішували при 100 °C протягом 3 год. Розчинник випарювали насухо і очищали препаративною ВЕРХ (FA) з отриманням 40 мг (7 %) бажаного продукту. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOH-d<sub>4</sub>) δ: 9.24 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 8.63 (d, J=5,2, 1H), 7.63 (d, J=5,2, 1H), 7.51 (d, J=2,0, 1H), 7.36 (s, 4H), 6.39 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.81-3.74 (m, 1H), 3.59-3.54 (m, 1H), 3.20 (s, 3H); МС [M+H]<sup>+</sup> = 461,9.

Розділення енантіомера (R)-4-(3-(2-(4-хлорфеніл)-2-метоксиетил)-[1,2,4]триазоло[4,3-b]піридазин-7-іл)-N-(1-метил-1H-піразол-5-іл)піримідин-2-аміну здійснювали SFC з отриманням бажаного продукту (13,8 мг). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.70 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 9.00 (d, J=2,1H), 8.67 (d, J=4,8, 1H), 7.23 (d, J=4,8, 1H), 7.42-7.35 (m, 4H), 6.33 (s, 1H), 4.93-4.89 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.72-3.64 (m, 1H), 3.50-3.44 (m, 1H), 3.10 (s, 3H); МС [M+H]<sup>+</sup> = 461,9.

Біологічний приклад 1

Культура клітин і аналізи життєздатності

Для CellTiterGlo (Promega): клітини A549 переносили на планшет у нормальне ростове середовище (Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) з 10 % фетальної телячої сироватки, 2 мМ/л глутаміном і 100 одиницями/мл пеніциліну і стрептоміцину) у кількості 1500 клітин на лунку у 384-лунковий чорний планшет з прозорим дном. Наступної доби сполуки серійно розводили 1:2, починаючи з зазначених концентрацій, потім додавали до клітин у чотириразових повторностях. Через 96 годин після додавання сполуки додавали люмінісцентний реактив для визначення життєздатності клітин CellTiter-Glo згідно з протоколом виробника.

Для ELISA на BrdU (Roche): клітини A549 переносили на планшет у нормальне ростове середовище в кількості 3000 клітин на лунку у 96-лунковий чорний планшет з прозорим дном. Наступної доби додавали сполуку у потрібній повторності у зазначених концентраціях на основі результатів CTG. Через 48 і 72 години після додавання сполуки проводили хемілюмінісцентний ELISA для визначення проліферації клітин з BrdU згідно з протоколом виробника.

Для nucELISA для визначення загибелі клітин (Roche): клітини A549 переносили на планшет у нормальне ростове середовище в кількості 3000 клітин на лунку у 96-лунковий чорний планшет з прозорим дном. Наступної доби додавали сполуку у потрібній повторності в зазначених концентраціях на основі результатів CTG. Через 48 і 72 години після додавання сполуки проводили ELISA<sup>PLUS</sup> для визначення загибелі клітин згідно з протоколом виробника.

Біологічний приклад 2

Моделі ксенотрансплантатів пухлини

Клітини NCI-H520.X1 і EBC1, які культивували, видаляли з культури, суспендували у буферизованому сольовому розчині Хенкса (HBSS), змішаному 1:1 з Matrigel (BD Biosciences,

США), і підшкірно імплантували у правий бік наївних самок голих мишей NCR (Taconic Farms, Hudson, NY). Мишей з пухлинами середнього об'єму приблизно 250 мм<sup>3</sup> групували у когорти обробки по 10 мишей в кожній. Миші отримували тільки 5 %-ву сахарозу або 5 %-ву сахарозу плюс 1 мг/мл доксицикліну (Clontech, Mountain View, CA) для контрольної когорти і когорти нокдауну відповідно. Усі бутелі з водою міняли 3 рази на тиждень. Протягом дослідження вимірювання мас тіла і об'єму пухлини (отриманого за вимірюваннями довжини і ширини циркулем) здійснювали двічі на тиждень. Усі експериментальні методики відповідали керівним принципам Американського фізіологічного товариства і були схвалені інституціональним комітетом з догляду та використання тварин Genentech. Об'єми пухлин обчислювали за формулою: об'єм пухлини=0,5·(a·b<sup>2</sup>), де "a" є найбільшим діаметром пухлини, і "b" є перпендикулярним діаметром пухлини. Результати за об'ємом пухлини представлені як середні об'єми пухлини плюс/мінус стандартна похибка середнього (SEM). Відсоток інгібування росту (% INH) у кінці дослідження (EOS) обчислювали як: % INH=100[Носій EOS - Обробка EOS]/(Носій EOS)]. Аналіз даних і отримання значень p з використанням t-критерію Даннета здійснювали з використанням програми JMP (SAS Institute, Cary, NC).

Ia отримували у вигляді розчину в різних концентраціях (виражених у вигляді еквівалентів вільної основи) у 40 % PEG400 (поліетиленгліколь 400)/60 % [10 % HP-β-CD (гідроксипропіл-β-циклодекстрин)]. Контроль у вигляді носія був 40 % PEG400/60 % (10 % HP-β-CD) або МСТ. II отримували у вигляді суспензії в різних концентраціях у метилцелюлозі-Твеен (МСТ). Дозовані розчини Ia, II і контролю у вигляді носія отримували один раз на тиждень протягом трьох тижнів. Ці композиції добре перемішували на вихровій мішалці перед дозуванням. Дослідні зразки зберігали у холодильнику з установкою для підтримання температурного інтервалу 4 °C-7 °C.

#### Біологічний приклад 3

##### Моделі генетично модифікованих мишей

Автори винаходу отримували мишей з наступних організацій: миші Kras<sup>LSL-G12D</sup> були отримані від Тайлера Джекса (Tyler Jacks) (Массачусетський технологічний інститут), миші p16/p19<sup>fl/fl</sup> були отримані від Антона Бернса (Anton Berns) (NKI, Нідерланди), миші p53<sup>fl/fl</sup> були отримані від Exelixis, Inc., і миші Pdx1-Cre були отримані від Енді Лові (Andy Lowy) (Університет Огайо). Для експериментальних когорт використовували рівне число самців і самок тварин, дозування починалося після підтвердження пухлинної маси або за допомогою ультразвукової візуалізації для PDAC, або мікроСТ (комп'ютерна мікротомографія) для моделі NSCLC. Дозування і спостереження за тваринами здійснювали відповідно до інструкцій Інституційного комітету з догляду та використання тварин (IACUC) у Genentech, Inc. Усі вибрані схеми дозування добре переносилися у GEMM. Неінвазивну візуалізацію і оцінку загального виживання проводили, як описано раніше в {Singh:2010hv}. У моделях GEM кобіметиніб та Ia дозували в дозуванні 5 мг/кг і 60 мг/кг за допомогою перорального зондового харчування (PO), щодоби (QD).

Статистичні аналізи даних, показаних у вигляді оцінок виживання Каплана-Майєра, і наборів даних з візуалізації проводили, як описано раніше (M. Singh et al., Nature Biotechnol., 2010, 28(6):585-593). Зразки пухлини моделі GEM відбирали і зберігали у RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Загальну РНК екстрагували набором RNeasy Plus Mini (Qiagen), слідуючи інструкціям виробників. Якість РНК визначали з використанням Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA).

Характеристики, розкриті у наведеному вище описі або у наступній формулі винаходу, виражені в їх конкретних формах або у показниках середніх значень для здійснення розкритої функції, або спосіб, або процес отримання розкритого результату, згідно з обставинами, можуть використовуватися для здійснення винаходу в його різних формах окремо або в будь-якій комбінації таких характеристик.

Вищеописаний винахід був описаний в деяких подробицях за допомогою ілюстрації та прикладу з метою ясності і розуміння. Фахівцю в даній області буде очевидно, що можуть втілюватися на практиці зміни і модифікації, що знаходяться в межах обсягу доданої формули винаходу. Отже, слід розуміти, що наведений вище опис призначений для того, щоб бути ілюстративним, а не обмежувачим. Отже, обсяг винаходу слід визначати не з посиланням на наведений вище опис, але, натомість, він повинен визначатися з посиланням на наступну додану формулу винаходу, поряд з повним обсягом еквівалентів, яким дає право така формула винаходу.

Патенти, опубліковані заявки і наукова література, на яку дається посилання в даному документі, встановлюють знання фахівців в даній області і, тим самим, є включеними за допомогою посилання у всій їхній повноті тією мірою, як коли б кожна була конкретно і індивідуально вказана як включена за допомогою посилання. Будь-який конфлікт між будь-яким посиланням, процитованим в даному документі, і конкретними ідеями даних описів винаходу



повинен бути вирішений на користь останніх. Таким чином, будь-який конфлікт між зрозумілим в даній області визначенням слова або фрази і визначенням слова або фрази, конкретно викладеним в даному описі винаходу, повинен бути вирішений на користь останнього.

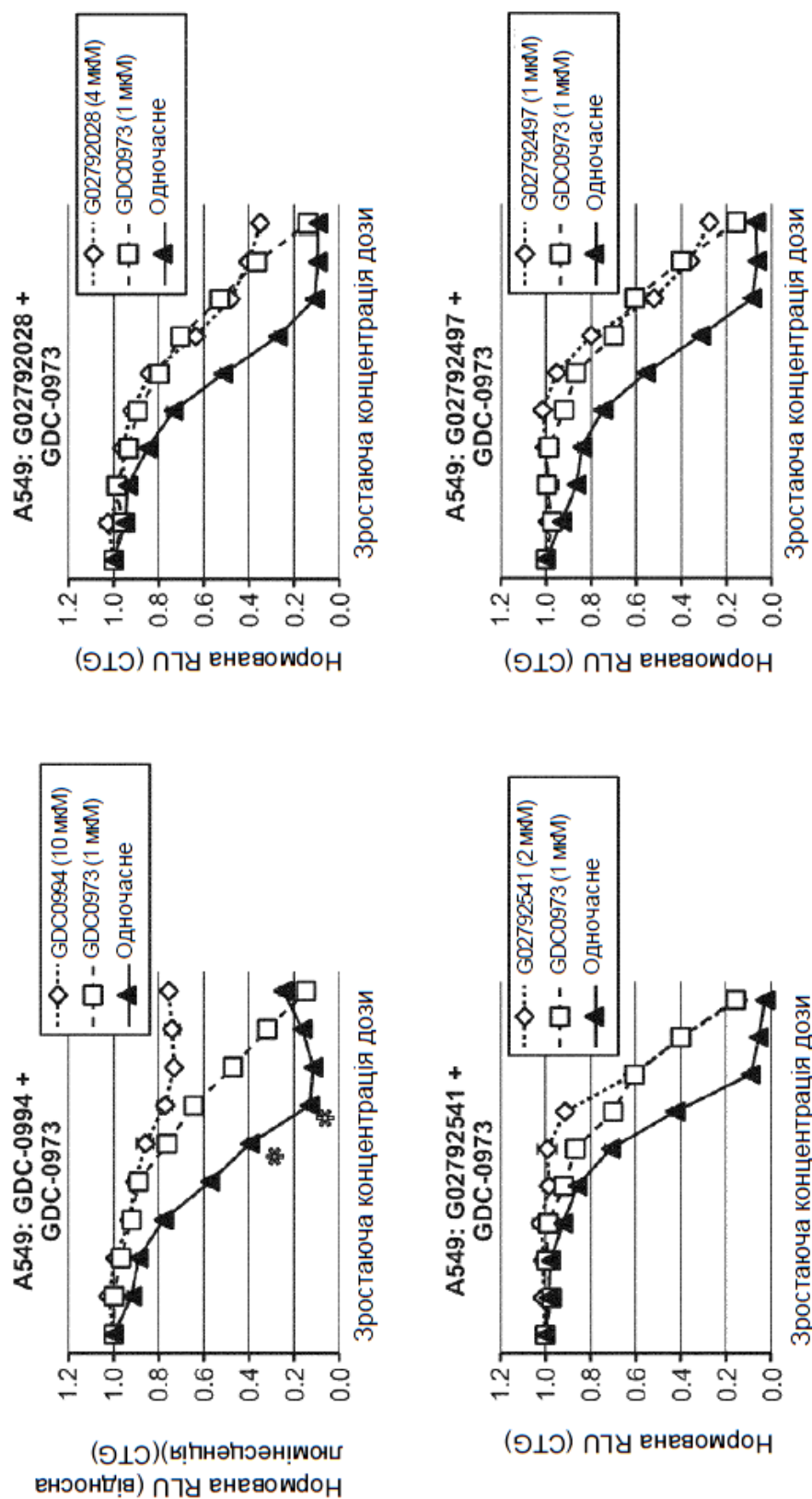
5

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування гіперпроліферативного розладу, що включає введення ссавцю, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості комбінації інгібітора MEK (мітогенактивована кіназа, регульована позаклітинним сигналом) або фармацевтично прийнятної солі та інгібітора ERK (кіназа, регульована позаклітинним сигналом), або фармацевтично прийнятної солі, або у вигляді об'єднаної композиції, або по черзі, в якому інгібітор MEK являє собою кобіметиніб, інгібітор ERK являє собою (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфеніл)-2-гідроксіетил)-4-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-он, а гіперпроліферативний розлад являє собою ракове захворювання.
2. Спосіб за п. 1, в якому зазначене ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: аденома, рак сечового міхура, рак мозку, рак молочної залози, рак товстої кишки, епідермальна карцинома, фолікулярна карцинома, рак сечостатевого тракту, гліобластома, лімфогрануломатоз, ракові захворювання голови і шиї, гептома, кератоакантома, рак нирки, крупноклітинна карцинома, лейкози, аденокарцинома легені, рак легені, лімфоїдні розлади, меланома і немеланомний рак шкіри, мієлодиспластичний синдром, нейробластома, неходжкінська лімфома, рак яєчника, папілярна карцинома, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак прямої кишки, саркома, дрібноклітинна карцинома, рак яєчка, тетракарциноми, рак щитовидної залози і недиференційована карцинома.
3. Спосіб за п. 2, в якому зазначене ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: колоректальний рак, рак легені, мезотеліома, рак молочної залози, рак передміхурової залози, гліома, рак шлунка, рак нирки, рак яєчника, рак ендометрія, рак сечового міхура та рак голови і шиї.
4. Спосіб за п. 3, в якому ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: колоректальний рак, недрібноклітинний рак легені, рак підшлункової залози або меланома.
5. Застосування комбінації інгібітора MEK або його фармацевтично прийнятної солі з інгібітором ERK, або його фармацевтично прийнятною сіллю для одержання лікарського засобу для лікування гіперпроліферативного розладу, в якому інгібітор MEK являє собою кобіметиніб, інгібітор ERK являє собою (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфеніл)-2-гідроксіетил)-4-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-он, а гіперпроліферативний розлад являє собою ракове захворювання.
6. Застосування комбінації інгібітора MEK або його фармацевтично прийнятної солі з інгібітором ERK, або його фармацевтично прийнятною сіллю для лікування гіперпроліферативного розладу, в якому інгібітор MEK являє собою кобіметиніб, інгібітор ERK являє собою (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфеніл)-2-гідроксіетил)-4-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-он, а гіперпроліферативний розлад являє собою ракове захворювання.
7. Застосування за п. 5 або 6, в якому рак являє собою ракове захворювання ссавця.
8. Застосування за п. 7, в якому ссавець являє собою людину.
9. Застосування за будь-яким з пп. 5-8, в якому зазначене ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: аденома, рак сечового міхура, рак мозку, рак молочної залози, рак товстої кишки, епідермальна карцинома, фолікулярна карцинома, рак сечостатевого тракту, гліобластома, лімфогранулематоз, ракові захворювання голови і шиї, гептома, кератоакантома, рак нирки, крупноклітинна карцинома, лейкози, аденокарцинома легені, рак легені, лімфоїдні розлади, меланома і немеланомний рак шкіри, мієлодиспластичний синдром, нейробластома, неходжкінська лімфома, рак яєчника, папілярна карцинома, рак підшлункової залози, рак передміхурової залози, рак прямої кишки, саркома, дрібноклітинна карцинома, рак яєчка, тетракарциноми, рак щитовидної залози і недиференційована карцинома.
10. Застосування за будь-яким з пп. 5-9, в якому зазначене ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: колоректальний рак, рак легені, мезотеліома, рак молочної залози, рак підшлункової залози, гліома, рак шлунка, рак нирки, рак яєчника, рак ендометрія, рак сечового міхура та рак голови і шиї.
11. Застосування за будь-яким з пп. 5-10, в якому ракове захворювання вибрано з групи, що складається з наступних: колоректальний рак, недрібноклітинний рак легені, рак підшлункової залози або меланома.
12. Набір для лікування ракового захворювання, що містить кобіметиніб або його фармацевтично прийнятну сіль і (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфеніл)-2-гідроксіетил)-4-(2-((1-метил-

1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-он, або його фармацевтично прийнятну сіль, контейнер і листок-вкладиш в упаковці або етикетку, причому на вкладиші зазначено, що введення кобіметинібу і (S)-1-(1-(4-хлор-3-фторфеніл)-2-гідроксіетил)-4-(2-((1-метил-1H-піразол-5-іл)аміно)піримідин-4-іл)піридин-2(1H)-ону служить для лікування ракового захворювання.

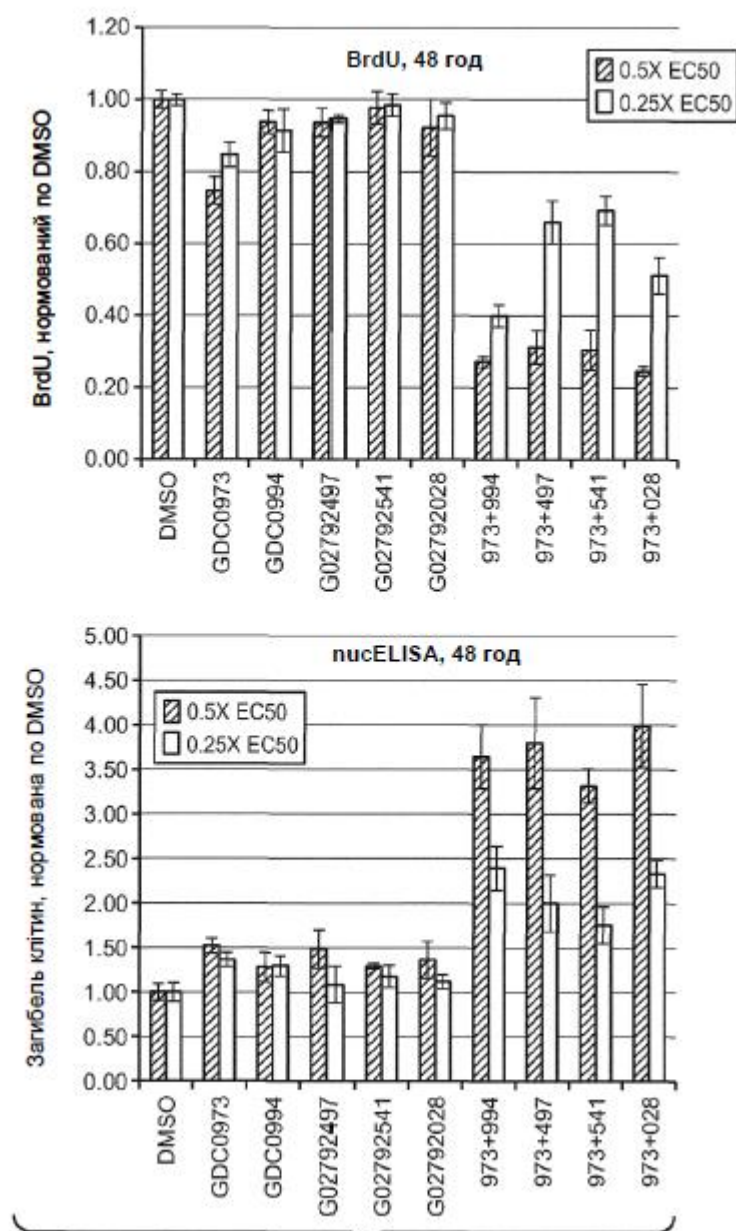
### СТГ 4-добових: комбінації ERKi + MEKi (GDC-0973) у A549 (NSCLC KRAS)



Фіг. 1

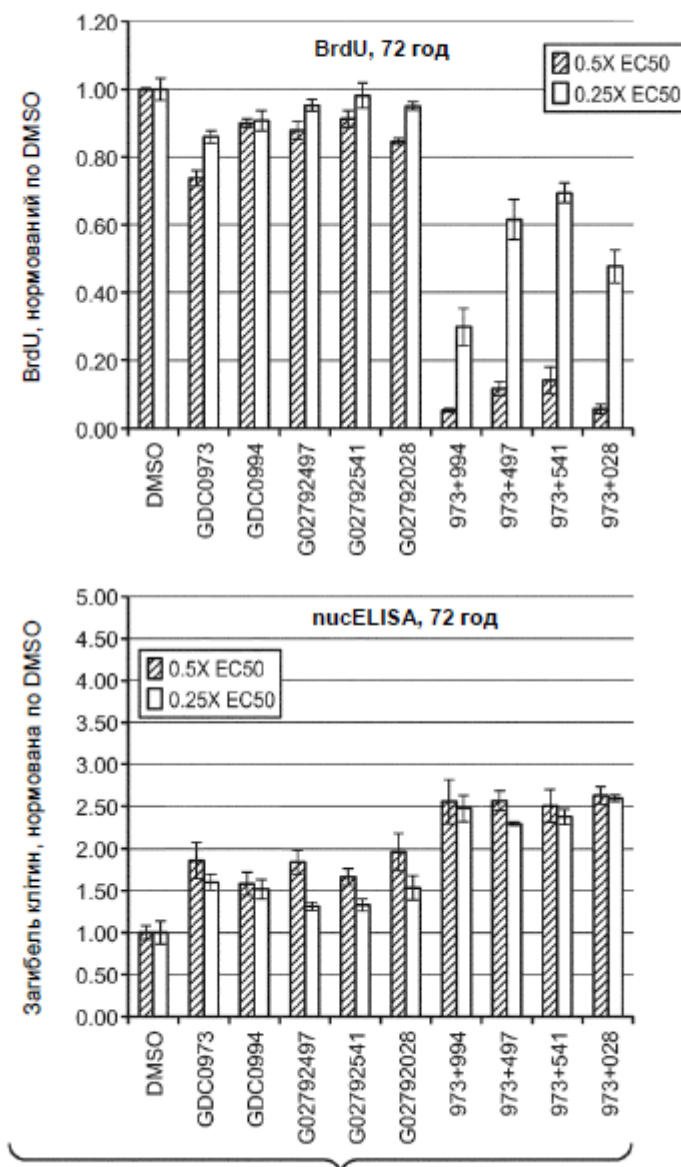


**Проліферація і загибель клітин: комбінації MEKі (GDC-0973) + ERKі у A549**



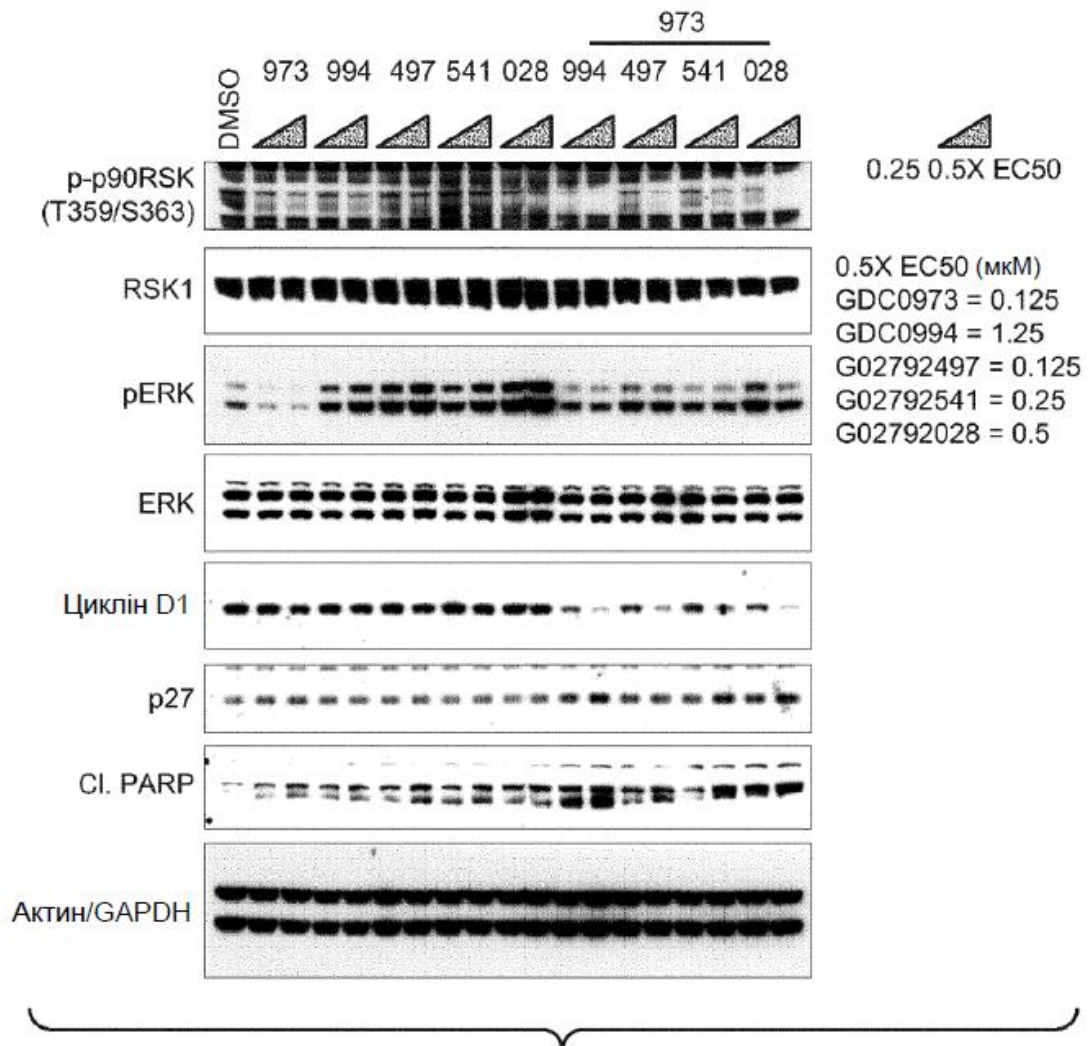
Фіг. 2А

# Проліферація і загибель клітин: комбінації MEKі (GDC-0973) + ERKі у A549



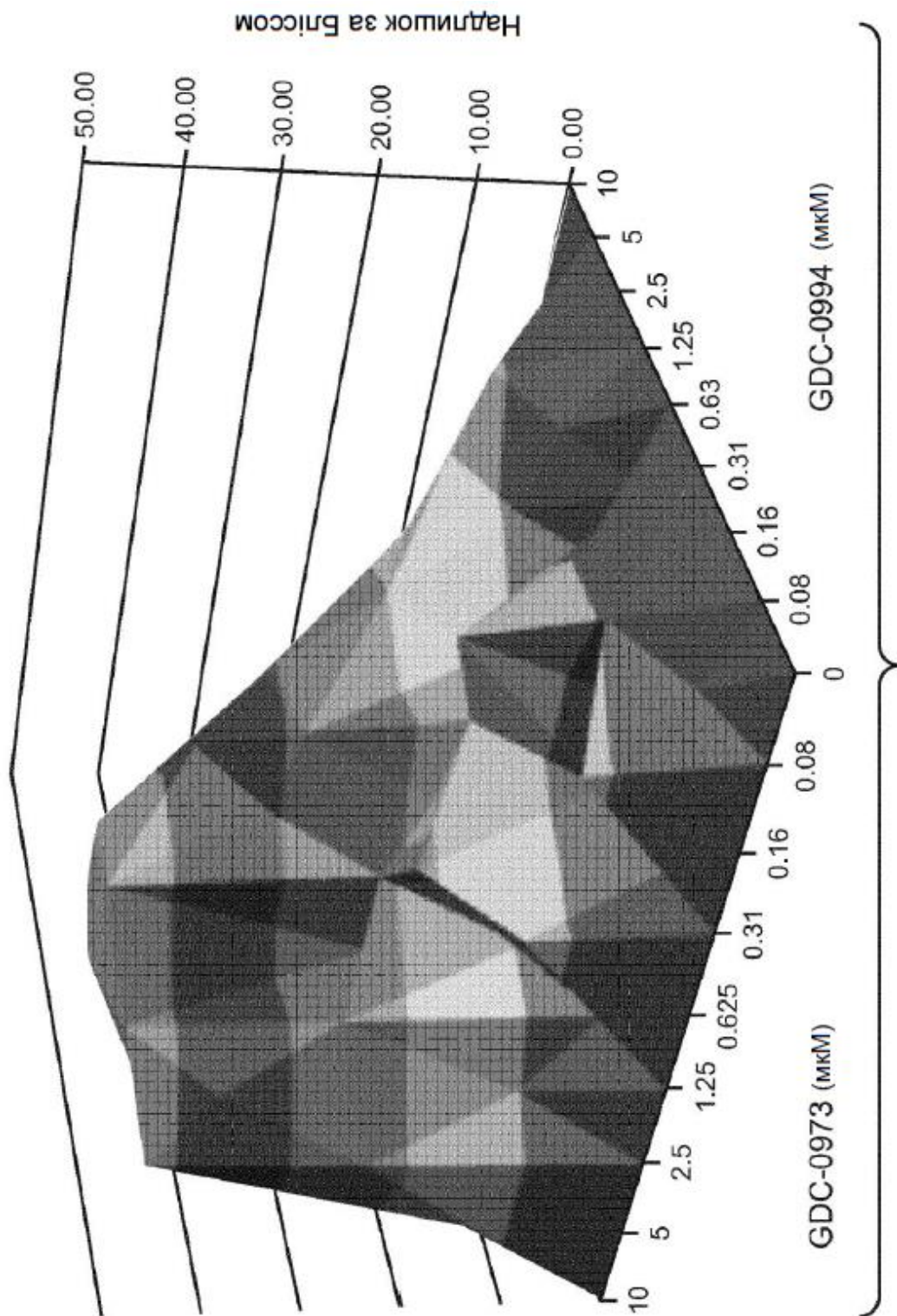
Фіг. 2Б

**Аналіз PD (фармакодинаміка): комбінації MEKi (GDC-0973) + ERKi у A549, 24 год.**



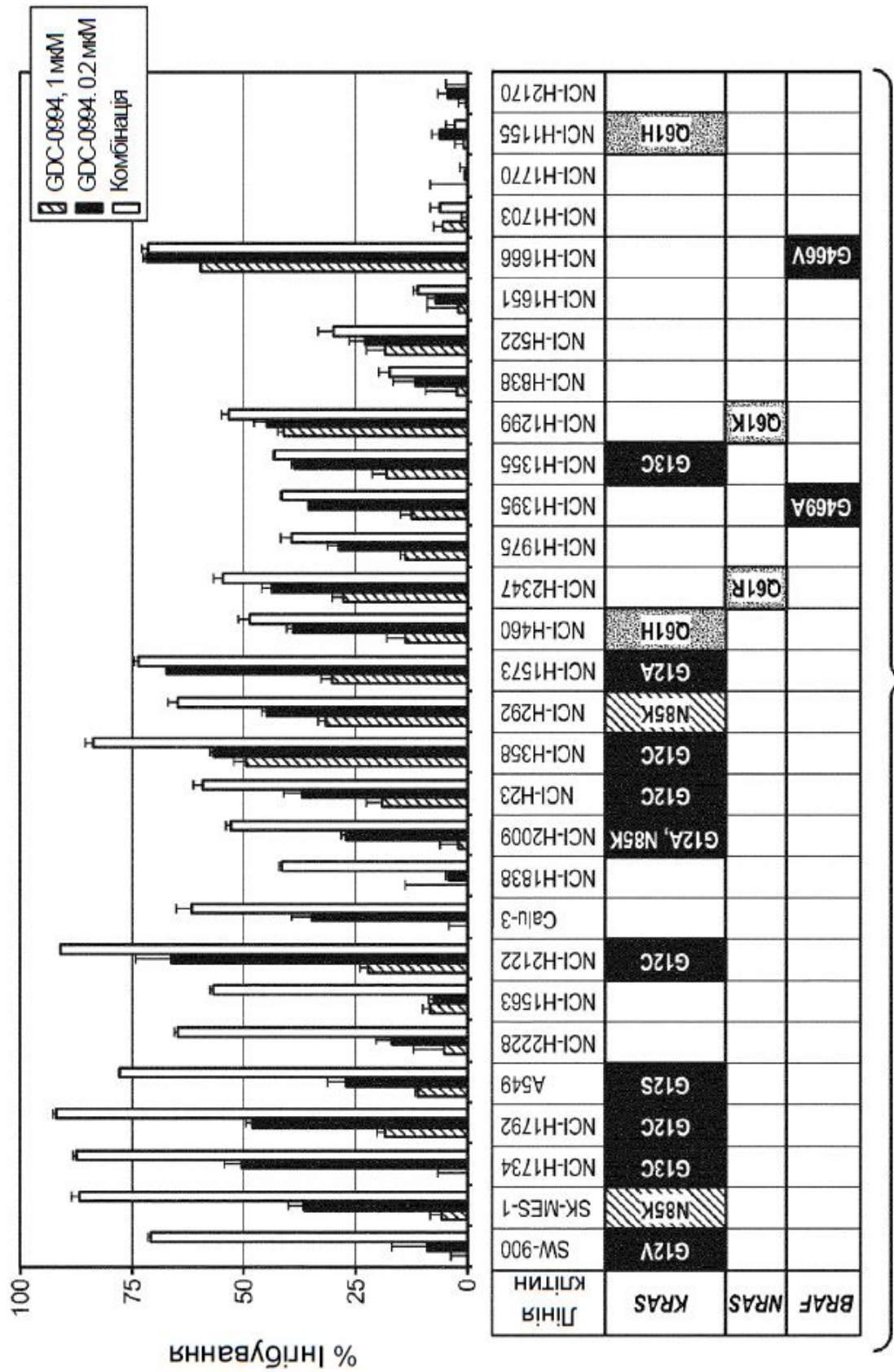
Фіг. 3

# Синергічне інгібування синтезу ДНК



Фіг. 4



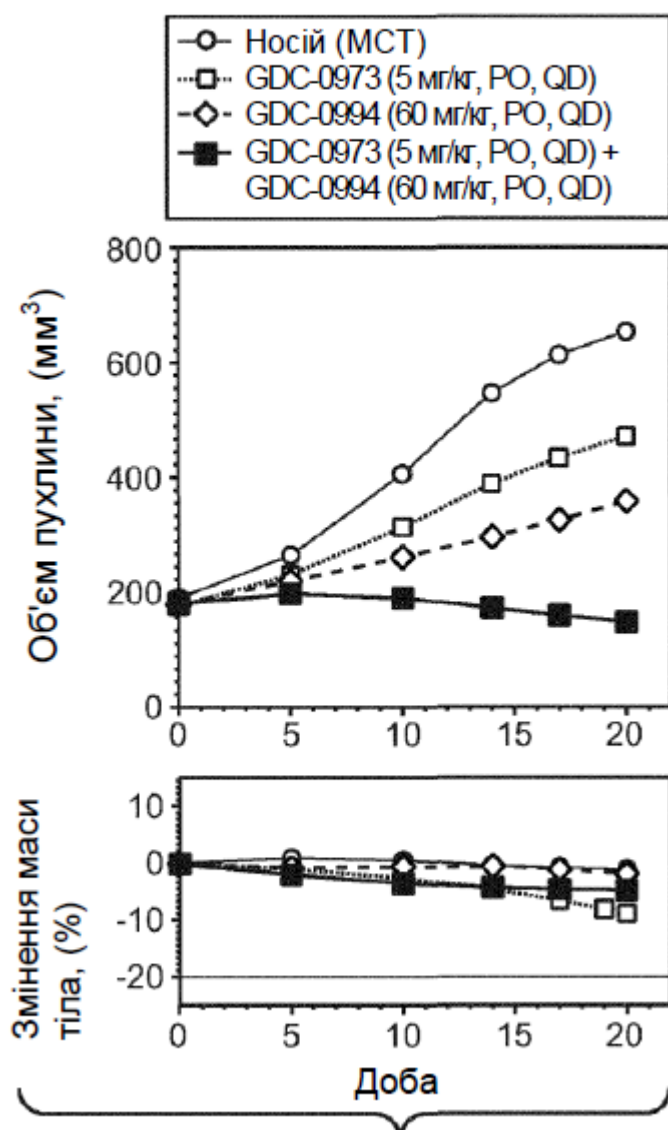


Фіг. 5

# NSCLC NCI-H2122

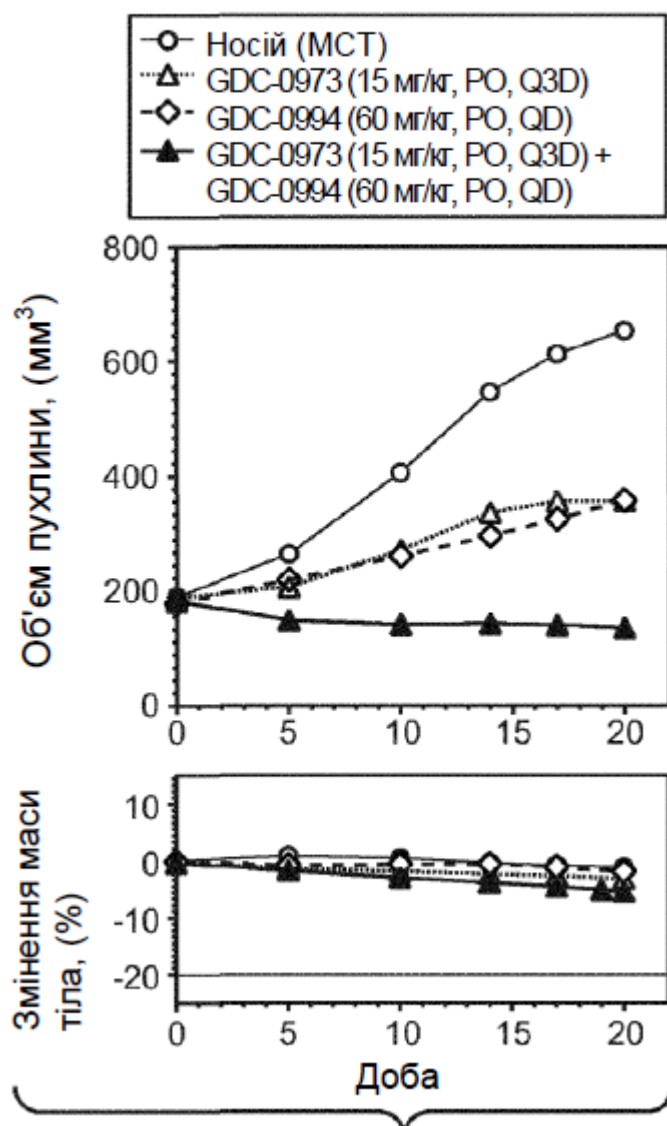
Щодоби MEKi +

Щодоби ERKi



Фіг. 6А

**NSCLC NCI-H2122**  
**Періодично MEKі +**  
**Щодоби ERKі**



Фіг. 6Б

**ІНС (імуногістохімія)  
демонструє ефекти комбінації  
на пухлинні маркери  
проліферації і апоптозу**

- Ксенотрансплантат NSCLC  
KRAS H2122
- GDC-0973 5 мг/кг QD
- ◇ GDC-0994 60 мг/кг

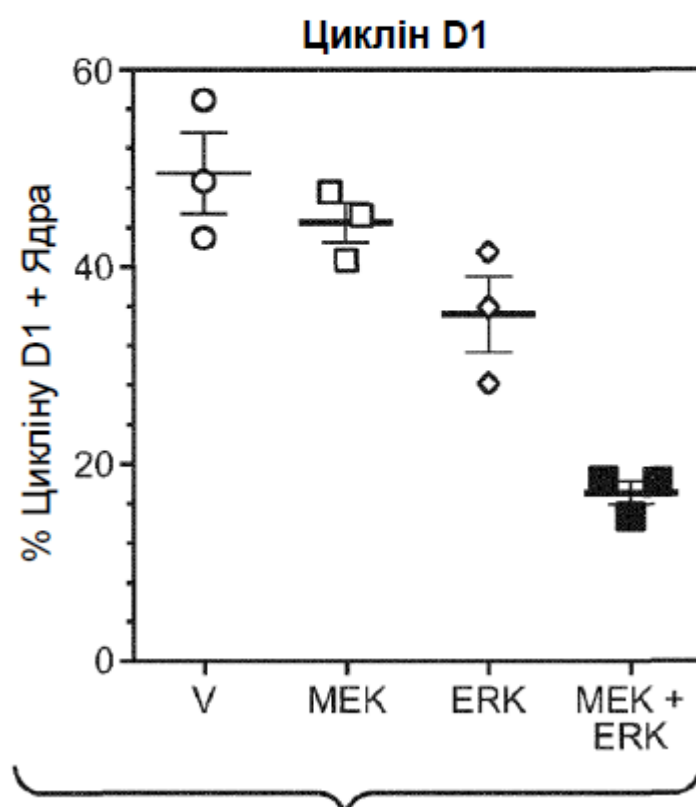
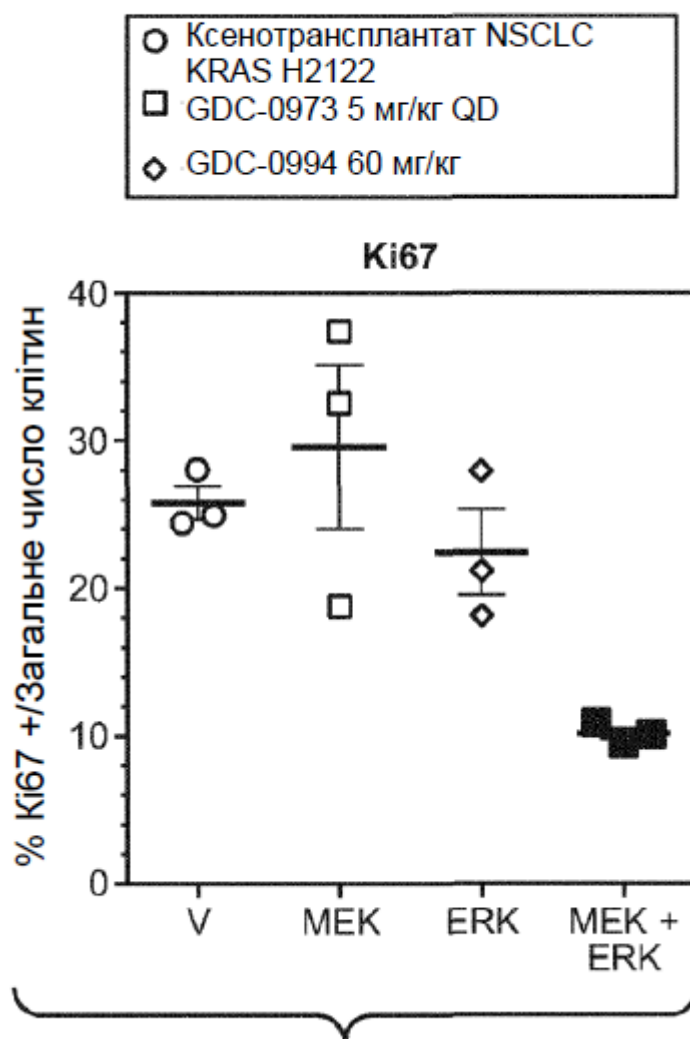


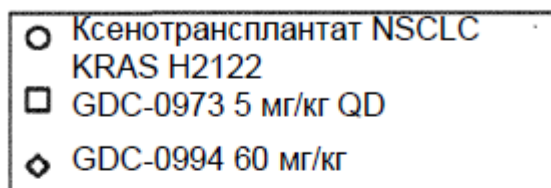
Fig. 6B



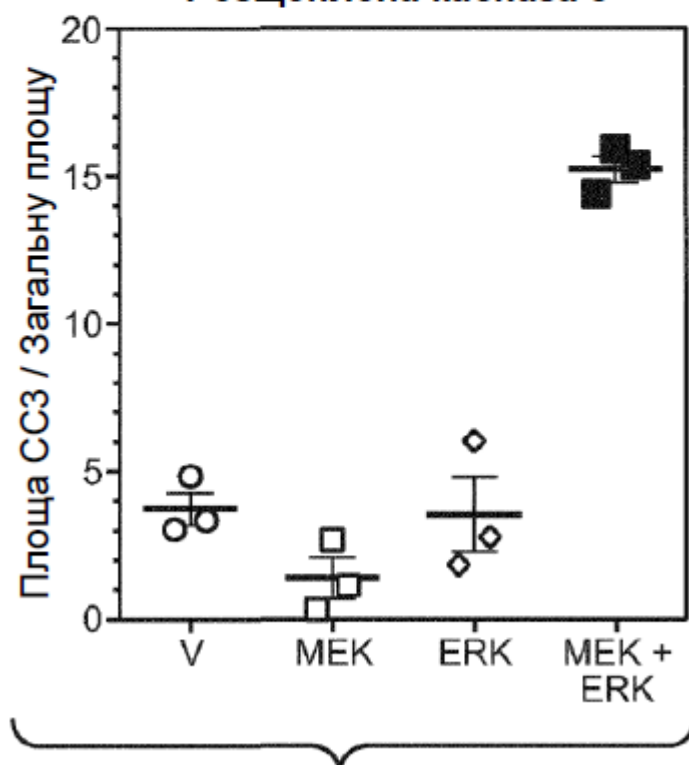
**ІНС демонструє ефекти  
комбінації на пухлинні маркери  
проліферації і апоптозу**



**ІНС демонструє ефекти  
комбінації на пухлинні маркери  
проліферації і апоптозу**



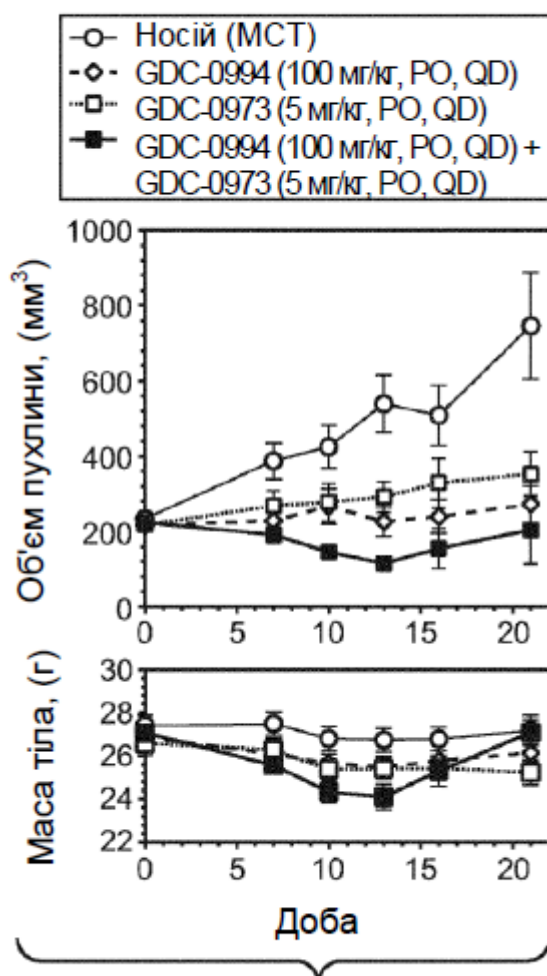
**Розщеплена каспаза 3**



Фіг. 6Д

NCI-H2122

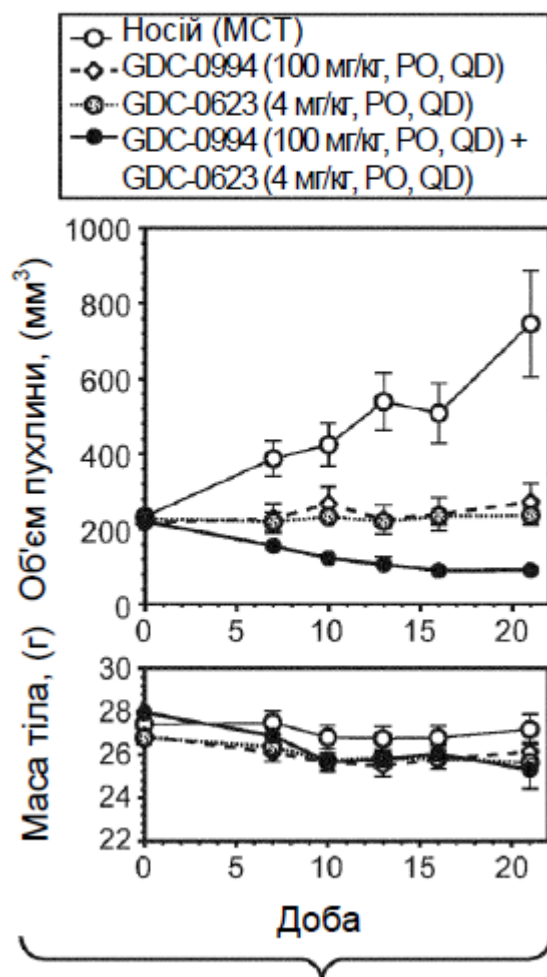
**Щодоби MEKi (GDC-0973) +  
Щодоби ERKi (GDC-0994)**



Фіг. 7А

NCI-H2122

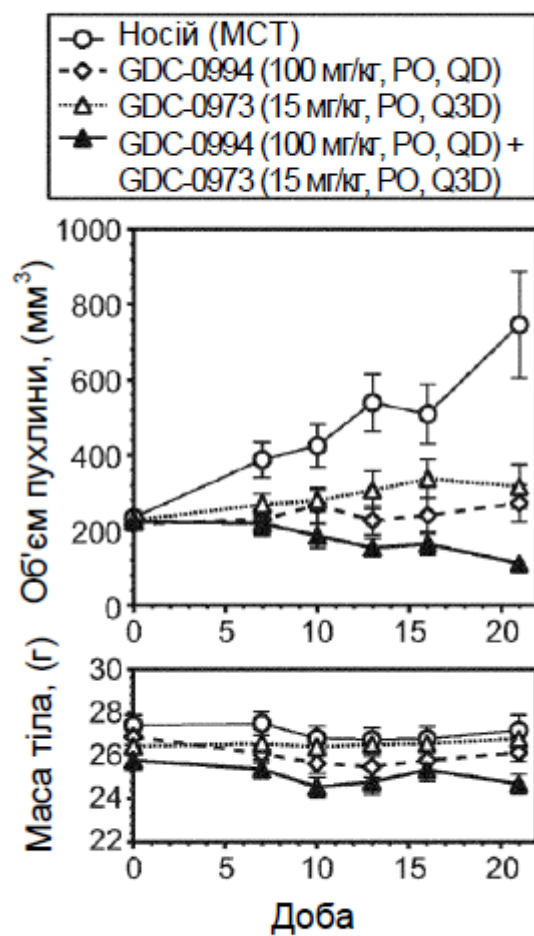
**Щодоби MEKi (GDC-0623) +  
Щодоби ERKi (GDC-0994)**



Фіг. 7Б

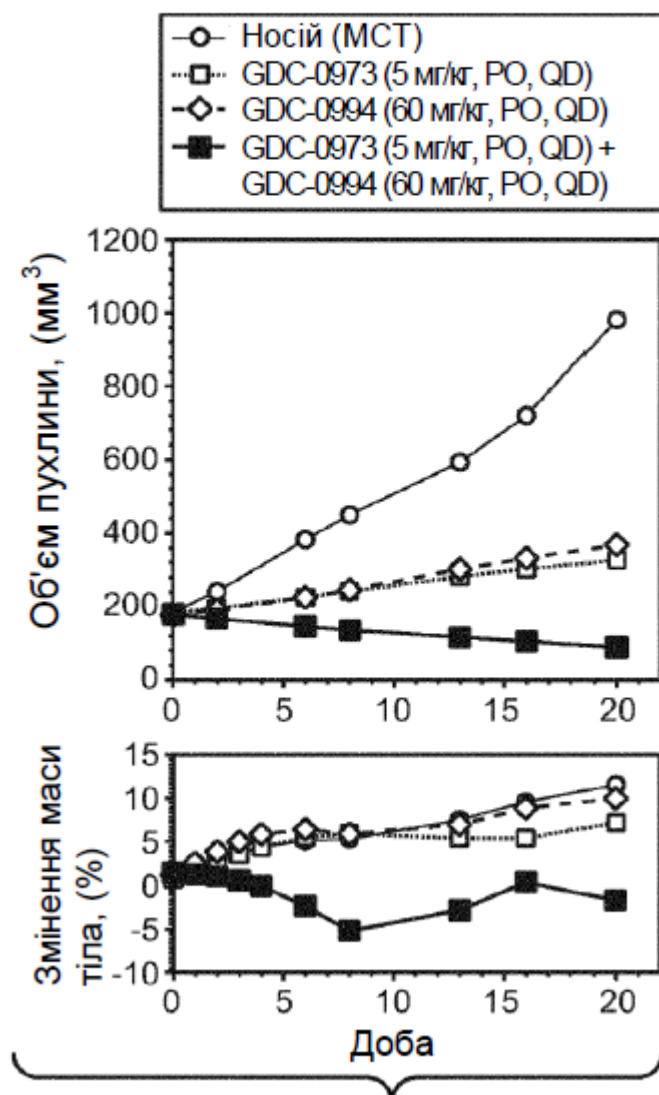
NCI-H2122

Періодично MEKi (GDC-0973) +  
Щодоби ERKi (GDC-0994)



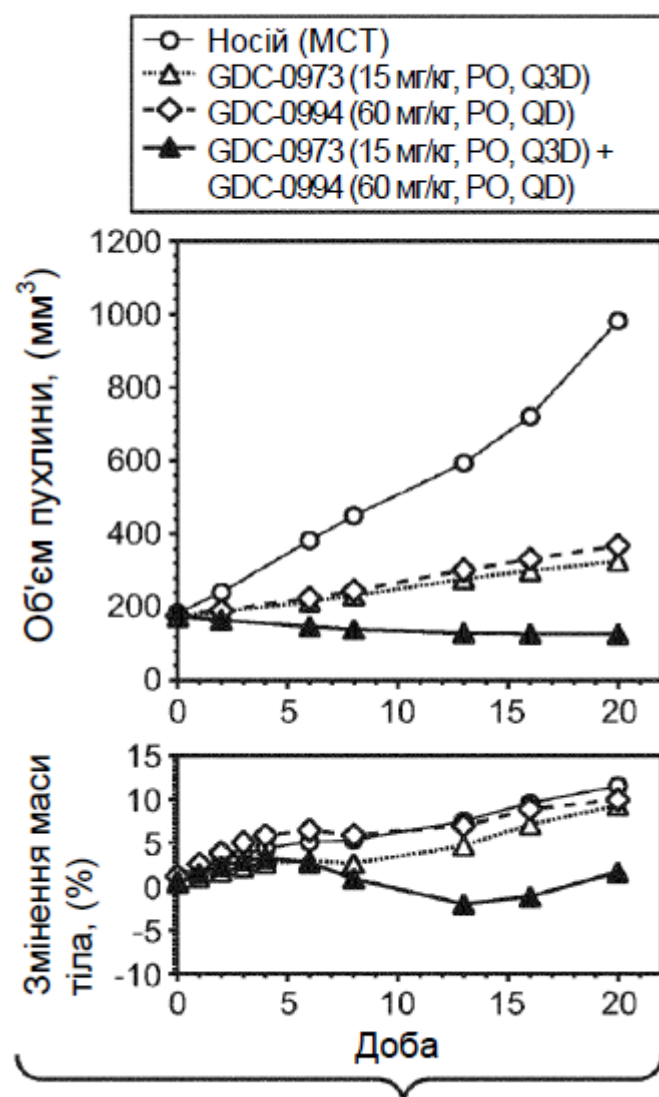
Фіг. 7В

**NSCLC A549**  
**Щодооби GDC-0973) +**  
**Щодооби GDC-0994)**



Фіг. 8А

**NSCLC A549**  
**Періодично GDC-0973) +**  
**Щодоби GDC-0994)**



Фіг. 8Б

**Ефективність комбінації при переносимих дозах спостерігається  
у клітинах НСТ116 при застосуванні комбінацій GDC-0973 і GDC-0994**

% TGI (нижній, верхній Ді (довірчий інтервал)		GDC-0994 (мг/кг)						
		0	25	37.5	50	62.5	75	150
0	0 (0,0)	38 (-49,80)	Н.В.	79 (52,99)	Н.В.	66 (22,87)	104 (90,119)	
1	48 (-5,77)	57 (11,81)	Н.В.	73 (39,90)	Н.В.	74 (42,95)	Н.В.	
2	Н.В.	Н.В.	81 (53,97)	Н.В.	93 (72,110)	0 (0,0)	Н.В.	
3	41 (-18,72)	73 (43,91)	Н.В.	68 (35,89)	Н.В.	97 (79,113)	Н.В.	
5	62 (19,86)	85 (61,102)	80 (55,98)	Н.В.	98 (80,113)	112 (100,131)	Н.В.	
7.5	72 (39,92)	100 (86,116)	Н.В.	111 (99,126)	Н.В.	117 (106,138)	Н.В.	
10	87 (68,101)	Н.В.	Н.В.	Н.В.	Н.В.	Н.В.	Н.В.	

GDC-0973 (мг/кг)	

- Сірі ділянки показують найкращу ефективність комбінації для переносимості схеми
- Чорні ділянки показують непереносимі комбінації
- Дозування являло собою щодобове (QD) пероральне зондове харчування (PO)
- Числа показують % інгібування росту пухлини (%TGI) відносно носія (0,0) +/- 95-відсоткові довірчі інтервали (ДІ).
- Н.В. = не визначається

Фіг. 9



### Обробка кобіметінібом + ERKi моделі GEM PDAC з мутацією KRAS

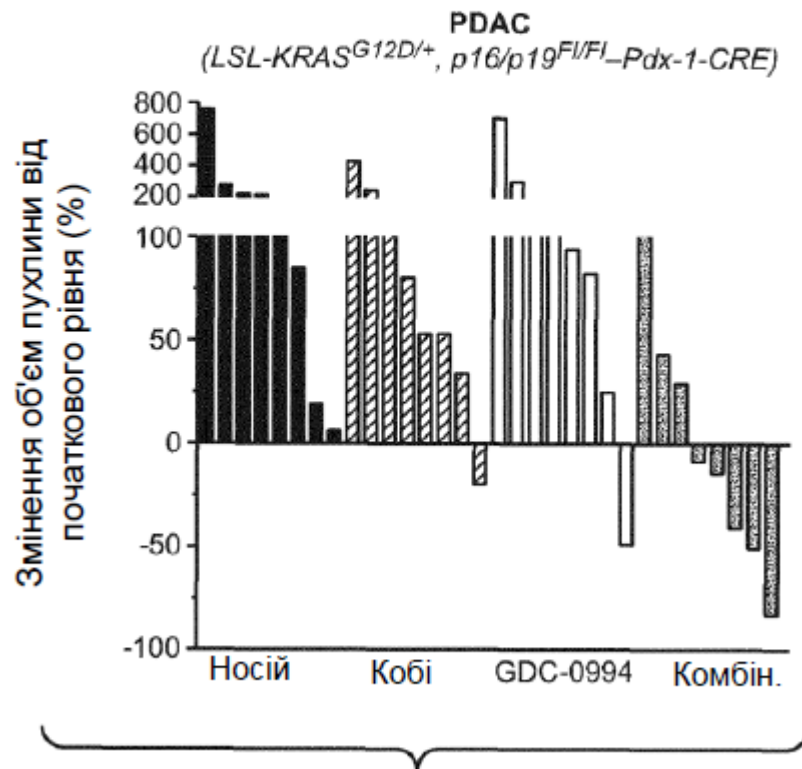
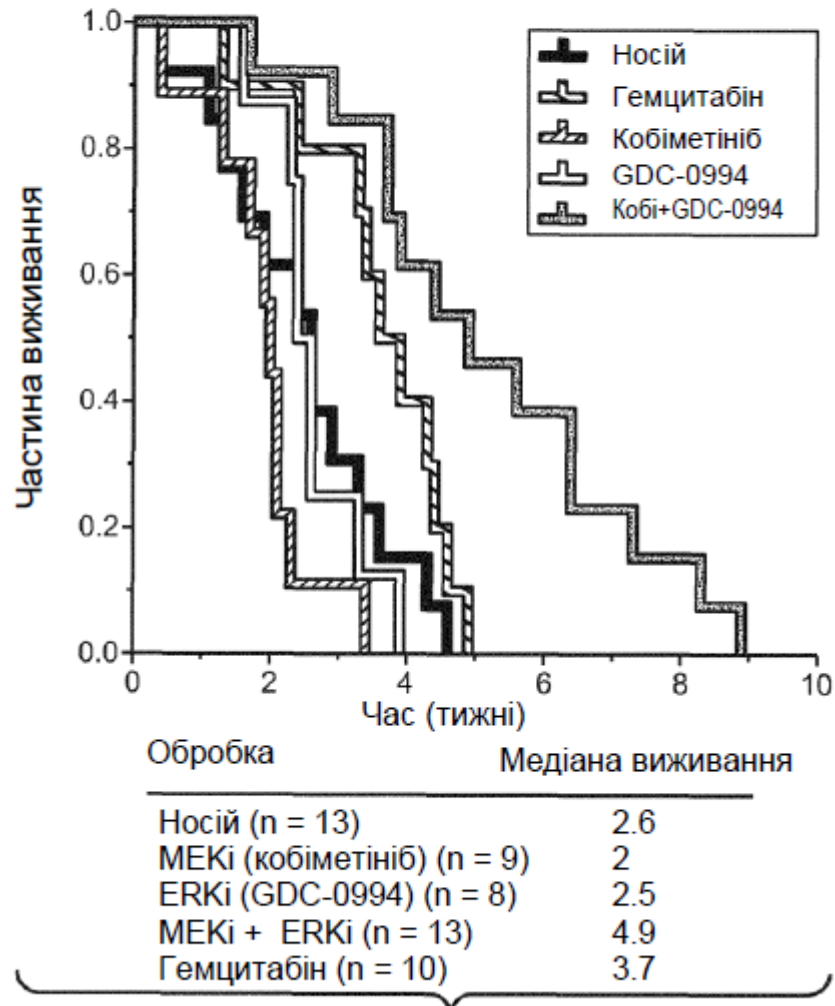
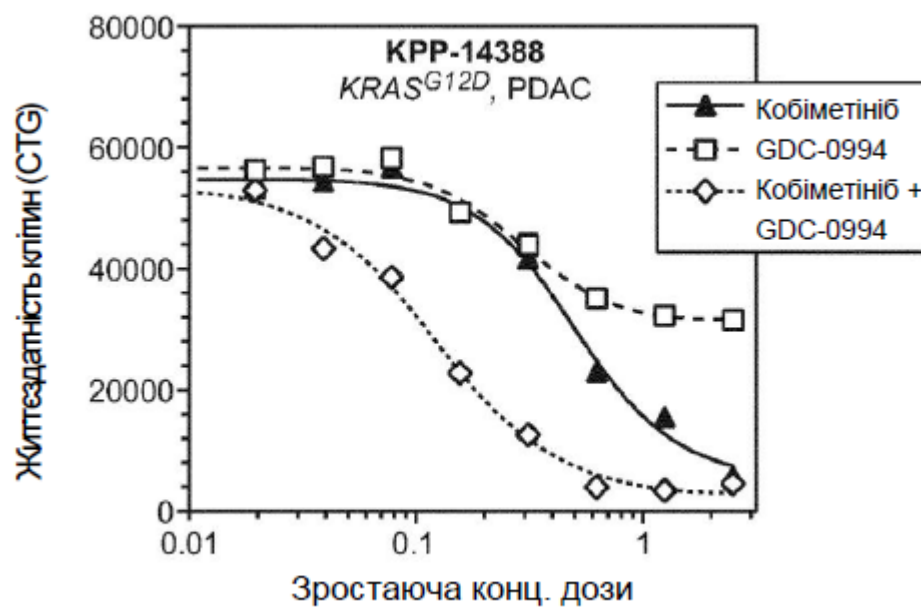


Fig. 10A

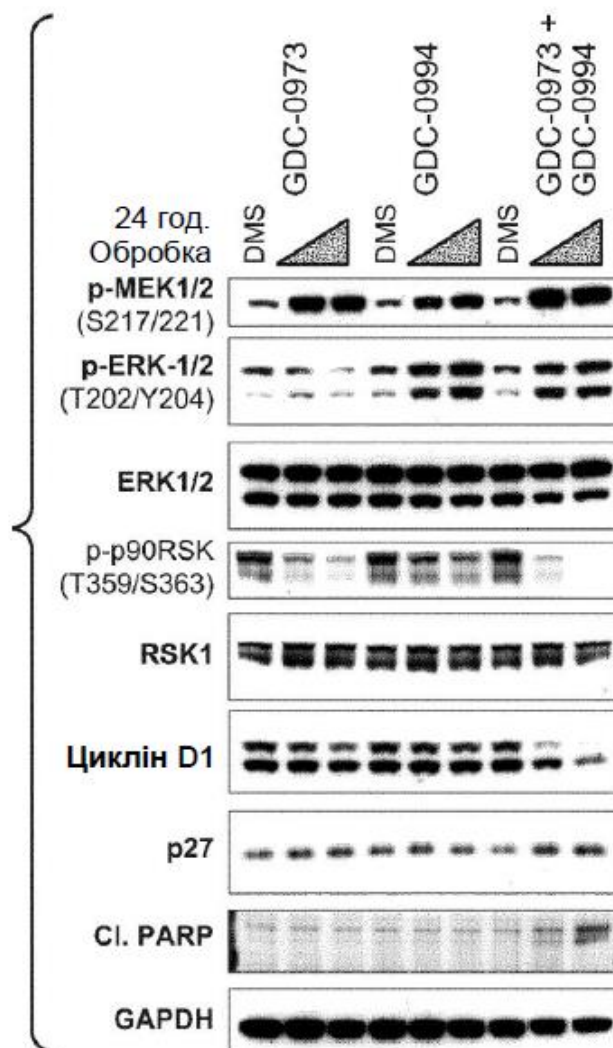
**Обробка кобіметінібом +  
ERKi моделі GEM PDAC з  
мутацією KRAS**



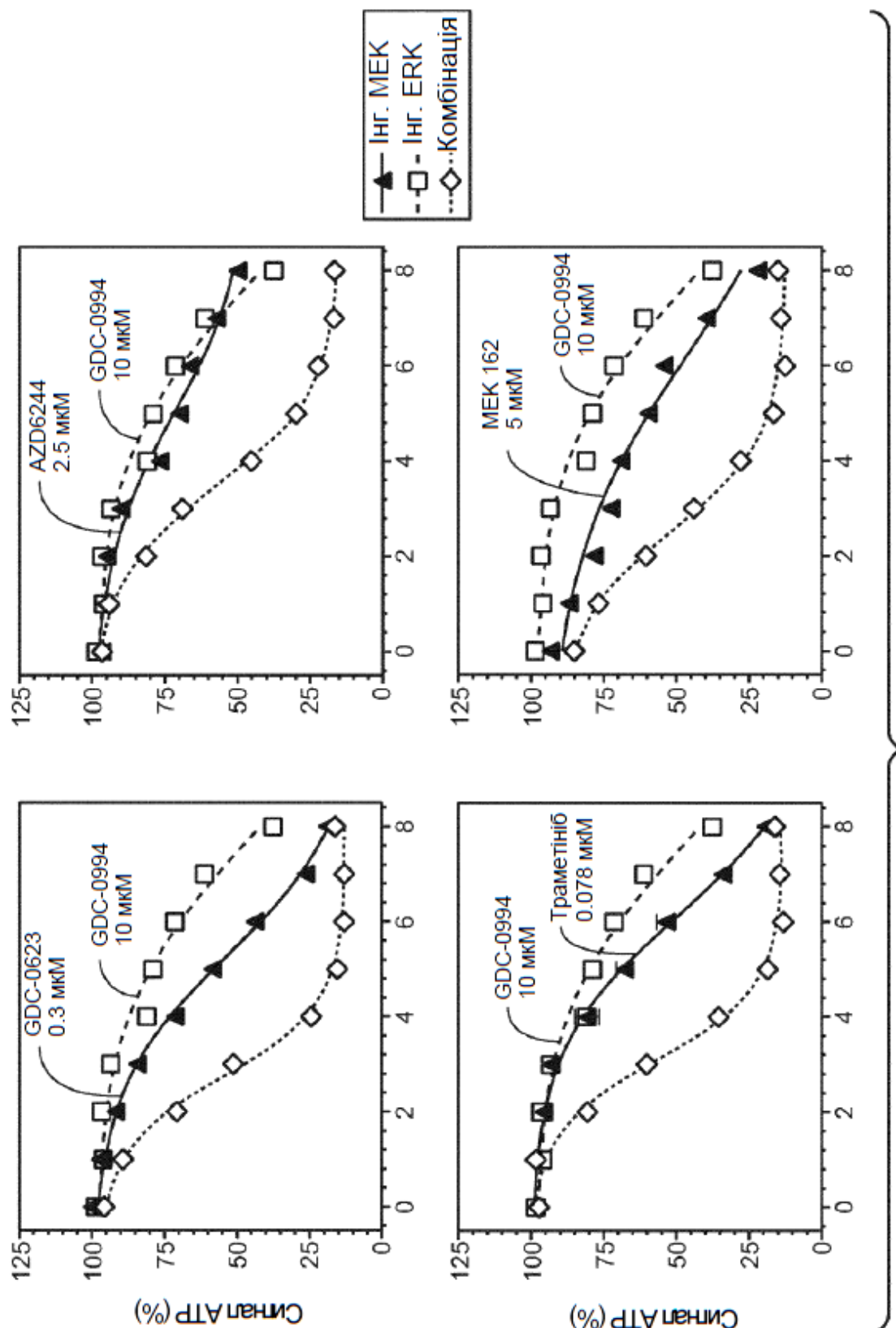
Фіг. 10Б



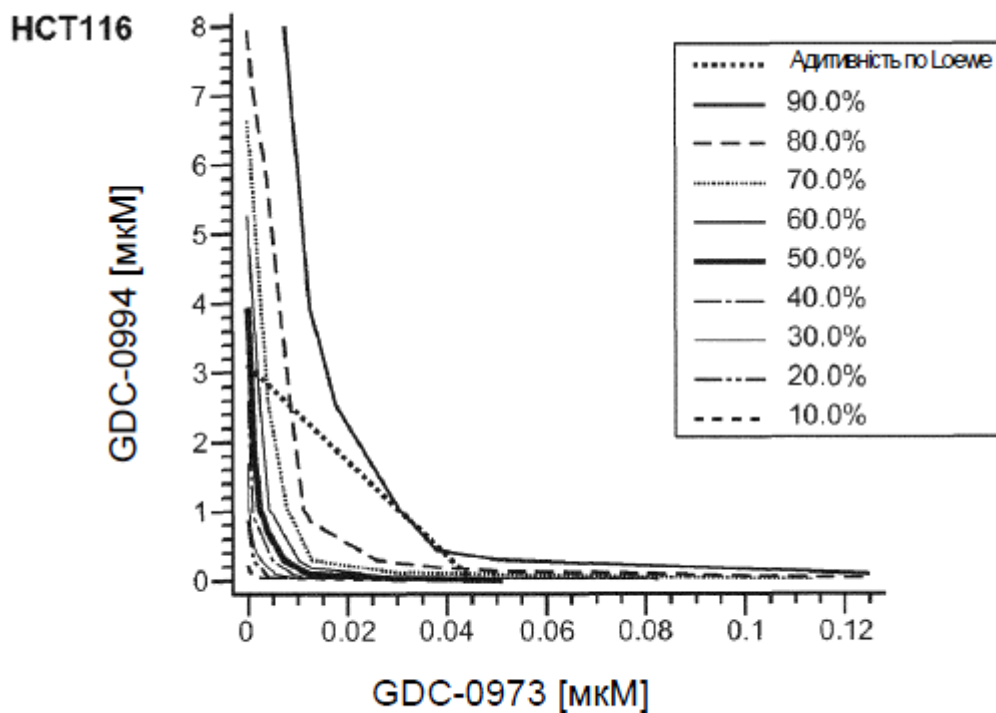
Фіг. 11А



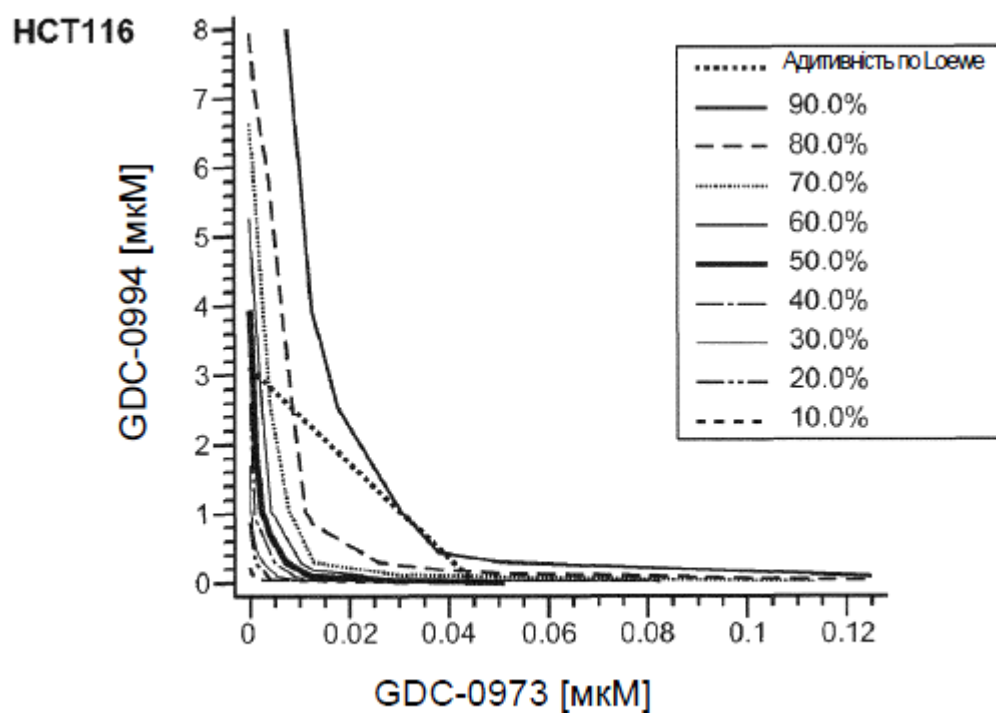
Фіг. 11Б



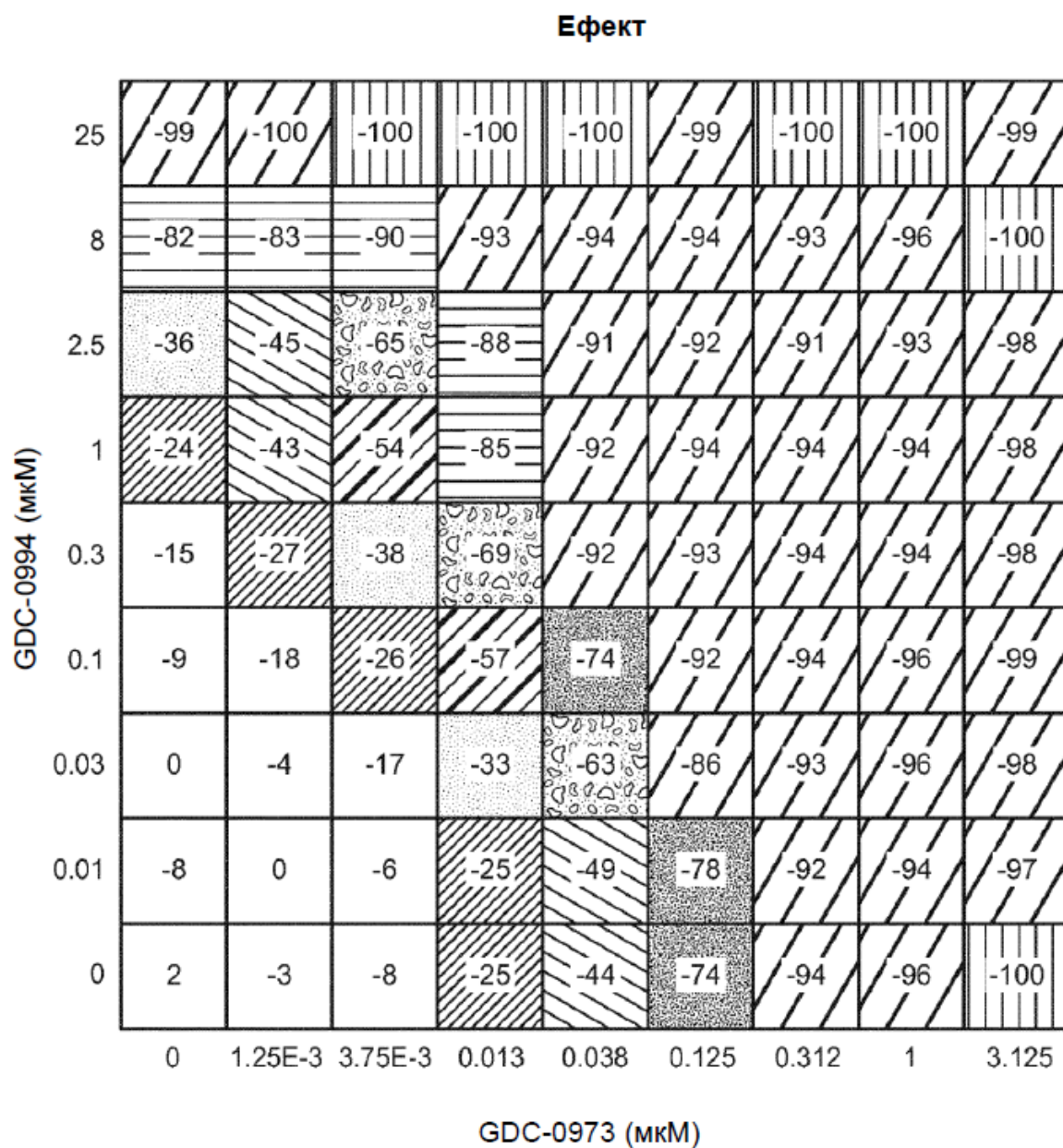
Фіг. 12



Фіг. 13А

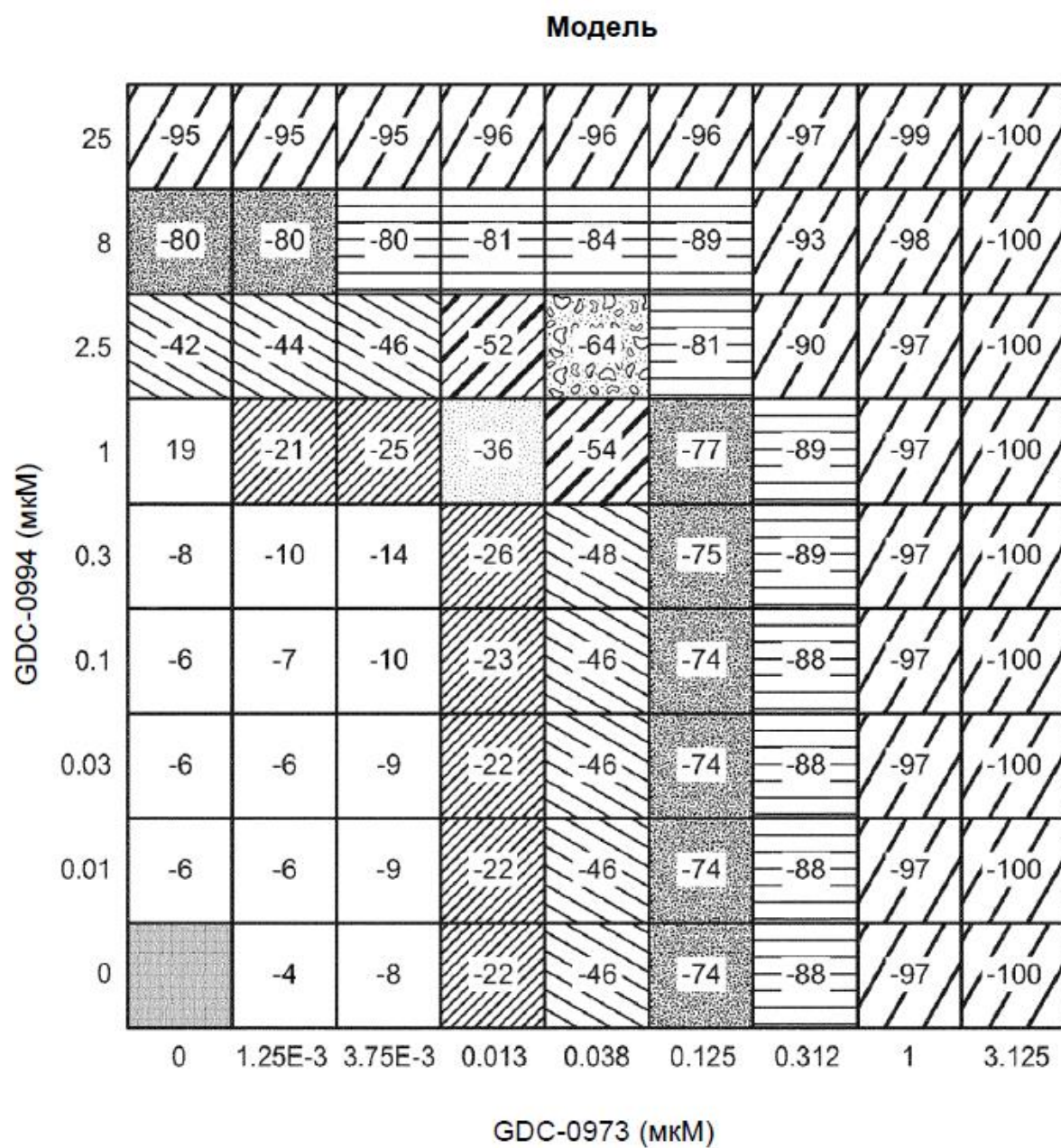


Фіг. 13В



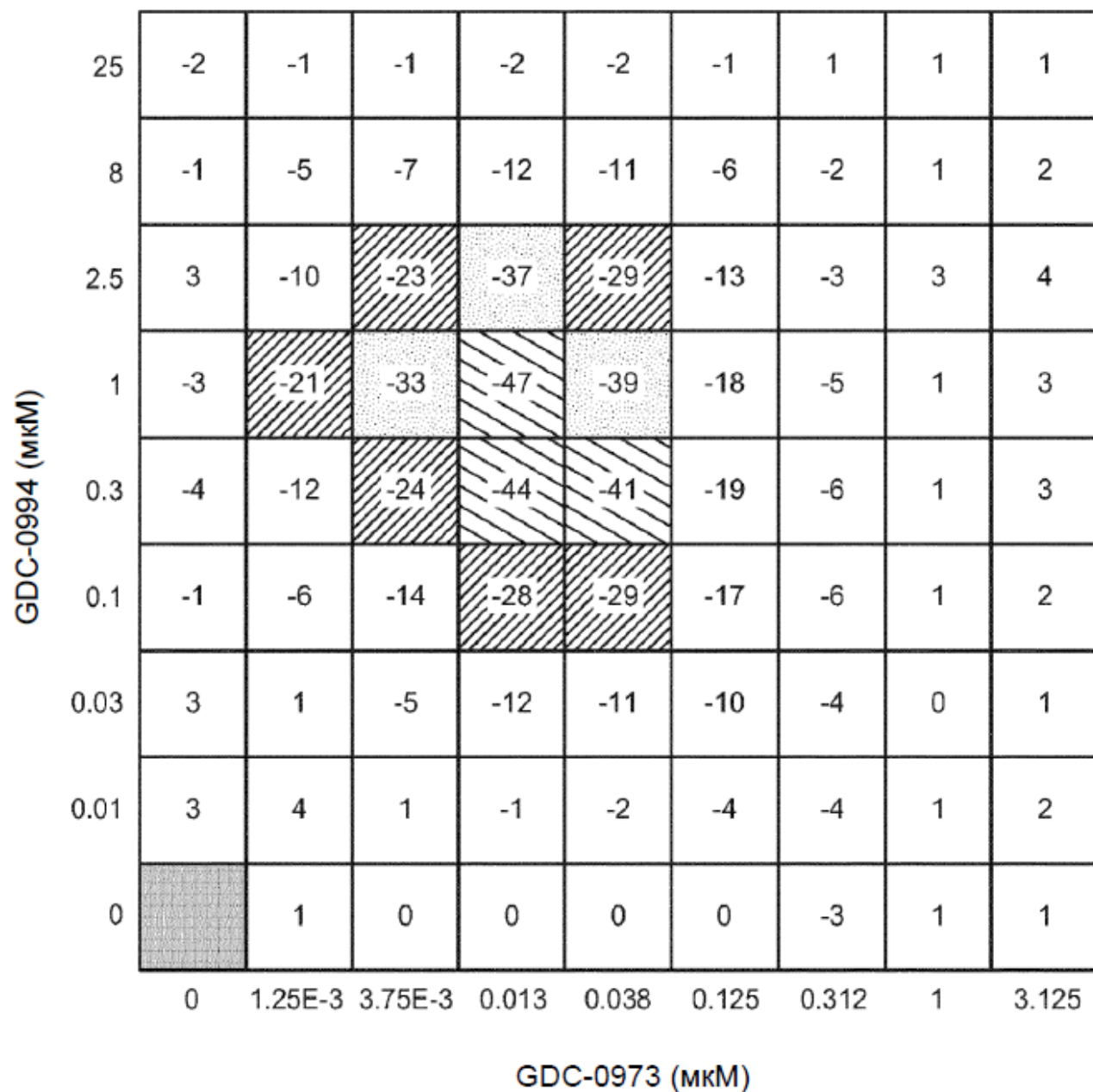
Фиг. 13Б -1





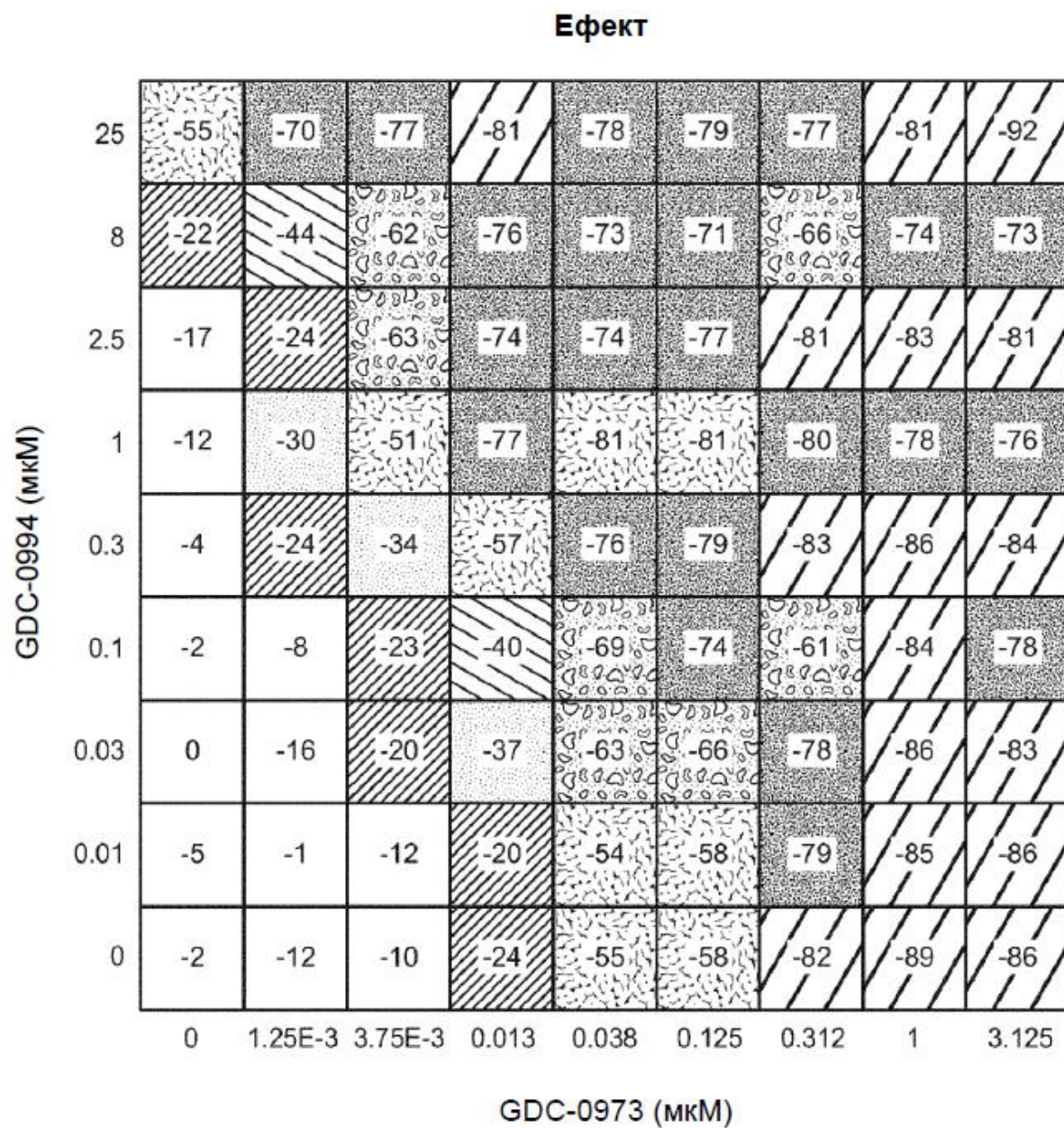
Фіг. 13Б - 2

**Надлишок**

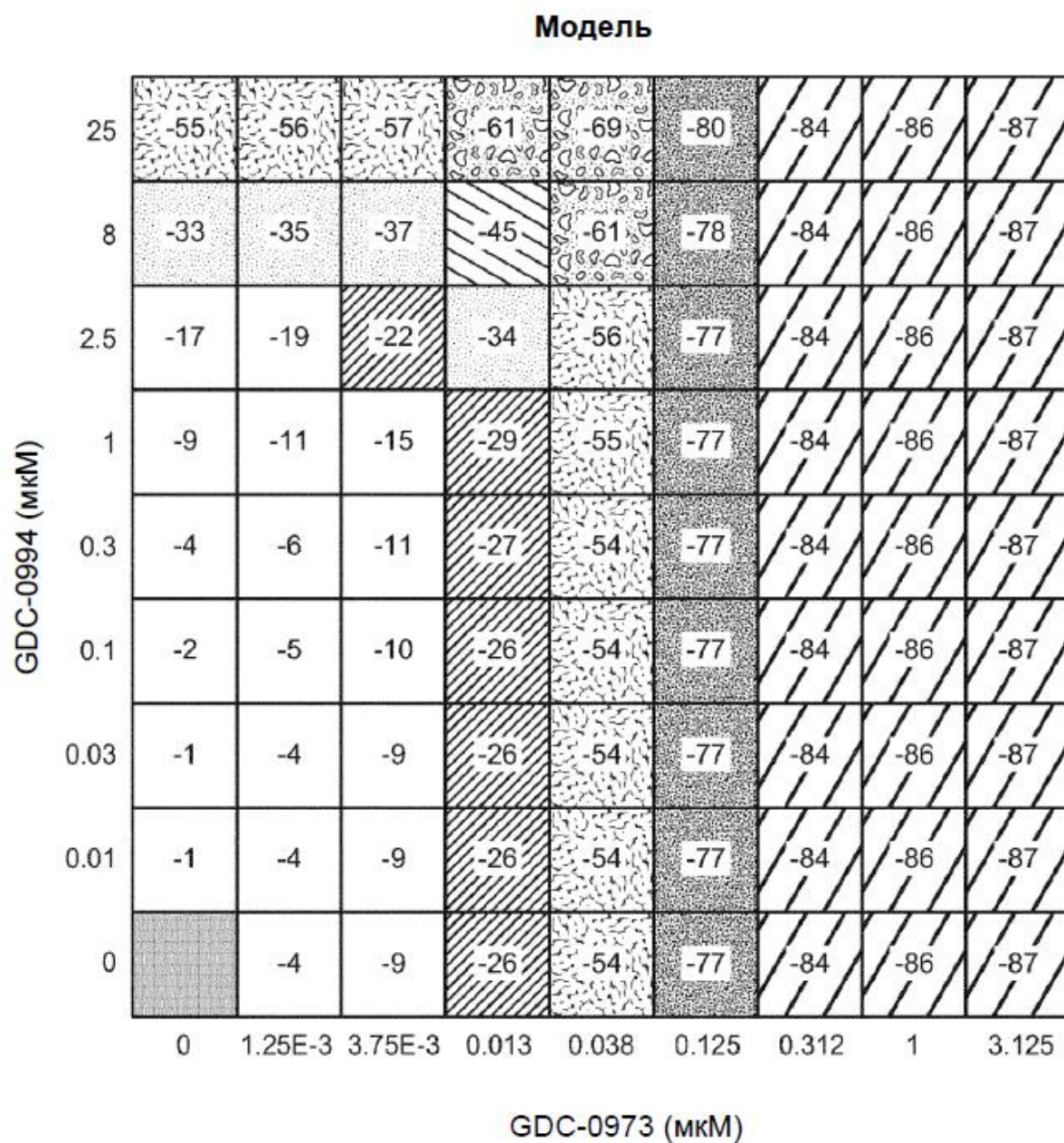


Фіг. 13Б - 3

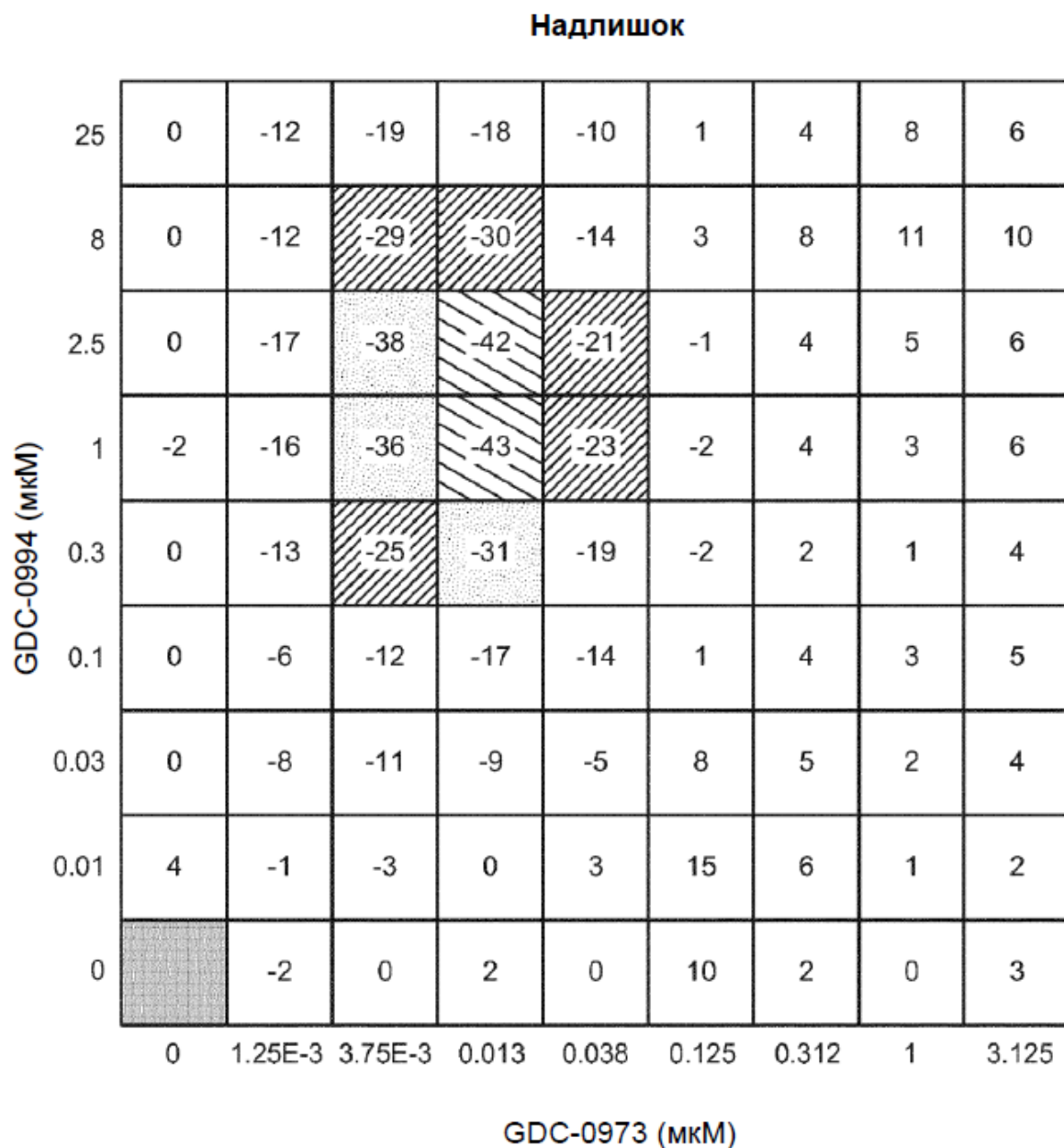




Фиг. 13Г - 1



Фиг. 13Г - 2



Фіг. 13Г - 3

Комп'ютерна верстка В. Юкін

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601