

(19) C2 (11) 128921 (13) UA

(98) а/с 24, м. Київ, 01135
(85) 2021-06-18
(74) Бочаров Максим Анатолійович, (UA)
(45) [2024-11-27]
(43) [2021-08-11]
(24) 2024-11-28
(22) 2019-11-18
(12) Патент України (на 20 р.)
(21) а202103483
(46) 2024-11-27

(86) PCT/US2019/062064 2019-11-18
(30) 62/769,355 2018-11-19 US 62/821,376 2019-03-20 US 62/865,819 2019-06-24 US
(54) КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ, ЩО ВКЛЮЧАЄ ІНГІБІТОР KRAS^{G12C} ТА ОДИН АБО ДЕКІЛЬКА ДОДАТКОВИХ
ФАРМАЦЕВТИЧНО АКТИВНИХ ЗАСОБІВ, ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ВИДІВ РАКУ COMBINATION THERAPY INCLUDING A KRASG12C I
NHIBITOR AND ONE OR MORE ADDITIONAL PHARMACEUTICALLY ACTIVE AGENTS FOR THE TREATMENT OF CANCERS
(56) WO 2016/044772 A1, 24.03.2016 2 WO 2018/119183 A2, 28.06.2018 2 EP 3401314 A1, 14.11.2018 2 WO 2018/217651 A1, 29.11.2018 a
nd UA 201912099, 25.02.2020 2
(71) ЕМДЖЕН ІНК. US ЭМДЖЕН ИНК. US AMGEN INC. US
(72) Ліпфорд Джеймс Расселл US Липфорд Джеймс Расселл US Lipford, James Russell US Кенон Джуд Роберт US Кено
н Джуд Роберт US Canon, Jude Robert US Саїкі Анн Й. US Саїкі Анн Й. US Saiki, Anne Y. US Рекс Карен Луїз US Ре
кс Карен Луїз US Rex, Karen Louise US
(73) ЕМДЖЕН ІНК. US ЭМДЖЕН ИНК. US AMGEN INC. US

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

За даною заявкою заявляється пріоритет і перевага на підставі попередньої заявки на патент США № 62/865819, поданої 24 червня 2019 року, попередньої заявки на патент США № 62/821376, поданої 20 березня 2019 року, і попередньої заявки на патент США № 62/769355, поданої 19 листопада 2018 року, усі з яких включені в даний документ шляхом посилання в усій їхній повноті для всіх цілей.

ПЕРЕЛІКИ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

Дана заявка подається разом із переліком послідовностей в електронній формі. Перелік послідовностей представлений у вигляді файлу під назвою A-2326-US-NP_SeqList_102919_ST25.txt, створеного 29 жовтня 2019 року, розмір якого становить 15,4 КБ. Інформація щодо переліку послідовностей в електронній формі включена в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ, ДО ЯКОЇ НАЛЕЖИТЬ ВІНАХІД

У даному винаході передбачена комбінована терапія, яка включає інгібітор KRAS^{G12C} та один або декілька додаткових фармацевтично активних засобів, зокрема, для лікування видів раку. Даний винахід також стосується фармацевтичних композицій, які містять інгібітор KRAS^{G12C} та один або декілька додаткових фармацевтично активних засобів для лікування видів раку.

ПЕРЕДУМОВИ ВІНАХОДУ

Мутації гена KRAS часто зустрічаються в разі раку підшлункової залози, аденокарциноми легені, колоректального раку, раку жовчного міхура, раку щитоподібної залози й раку жовчних проток. Мутації KRAS також спостерігаються у приблизно 25 % пацієнтів із NSCLC, при цьому деякі дослідження свідчать про те, що мутації KRAS є негативним прогностичним фактором у пацієнтів із NSCLC. Нещодавно було виявлено, що мутації гомолога вірусного онкогену V-Ki-ras2 саркоми щурів Кірстен (KRAS) зумовлюють виникнення стійкості до видів терапії, які цілеспрямовано впливають на рецептор епідермального фактора росту (EGFR), у разі колоректального раку; відповідно, мутаційний статус KRAS може надати важливу інформацію перед призначенням терапії з використанням TKI. Загалом у медицині існує необхідність у нових способах лікування пацієнтів із раком підшлункової залози, аденокарциномою легені або колоректальним раком, особливо це стосується тих, у кого були діагностовані такі види раку, які характеризуються мутацією KRAS, і в тому числі тих, у кого спостерігалось прогресування після хіміотерапії. Онкогенні мутації KRAS за залишками G12, G13 і Q61 являють собою найпоширеніші мутації RAS, виявлені в солідних злоякісних пухлинах. Нещодавно було продемонстровано, що на KRAS^{G12C} можна націлювати ковалентні низькомолекулярні інгібітори, які вступають у реакцію з мутантним цистеїном, що межує із кишенею перемикання афінності II (SIIP), блокуючи KRAS у його неактивному стані, пов'язаному з GDP.

У разі раку людини KRAS є онкогеном, що найбільш часто мутує, і кодує ключовий сигнальний білок у пухлинах. Мутантна форма KRAS^{G12C} містить цистеїн, який було використано для створення ковалентних інгібіторів з багатообіцяючою доклінічною активністю. Автори даного винаходу оптимізували серію інгібіторів з новими зв'язувальними взаємодіями й помітно підвищили їхню ефективність та селективність. Ці зусилля зумовили відкриття AMG 510, першого інгібітора KRAS^{G12C}, що перебуває на стадії клінічної розробки. У доклінічних дослідженнях лікування за допомогою AMG 510 зумовило регресію пухлин із KRAS p.G12C і значно поліпшило протипухлинну ефективність хіміотерапії й засобів спрямованої дії. В імунотропних мишей лікування за допомогою AMG 510 зумовило прозапальне мікрооточення пухлини й забезпечило надійні результати лікування у комбінації з інгібуванням імунних контрольних точок. У вилікуваних мишей не відбувався ріст ізогенних пухлин із KRAS p.G12D, що свідчить про адаптивний імунітет проти гетерологічних антигенів. У першій когорті із уведенням дози AMG 510 продемонстрував попередній доказ клінічної протипухлинної активності і являє собою терапію, що має потенціал для перетворення для пацієнтів, для яких відсутні ефективні методи лікування.

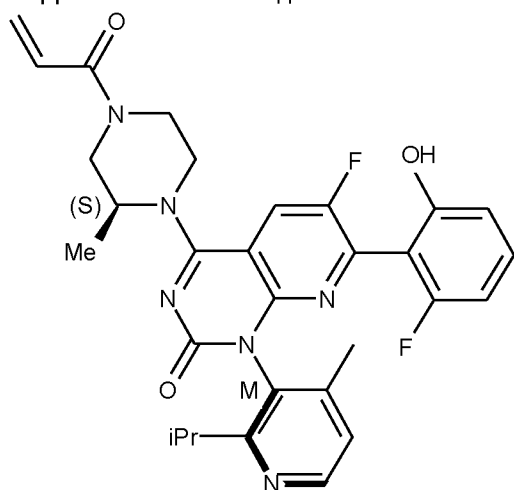
Онкопротеїн KRAS являє собою GTPазу, яка є важливим медіатором внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, залучених у ріст і виживання пухлинних клітин. У нормальних клітинах KRAS функціонує як молекулярний перемикач, що забезпечує перебування по черзі у неактивному пов'язаному з GDP та активному пов'язаному з GTP стані. Переходу між цими станами сприяють фактори обміну гуанінових нуклеотидів (GEF), які завантажують GTP і активують KRAS, та гідроліз GTP, який для інактивації KRAS каталізують білки, що активують GTPазу (GAP). Зв'язування GTP з KRAS сприяє зв'язуванню ефекторів для активації шляхів передачі сигналу, включно з RAF-MEK-ERK (MAPK). Соматичні активувальні мутації в KRAS є характерною ознакою раку й запобігають асоціації з GAP, тим самим стабілізуючи зв'язування ефекторів і підсилюючи передачу сигналу KRAS. Пацієнти з пухлинами, що містять мутантну форму KRAS, характеризуються значно гіршими результатами хвороби й гіршим прогнозом. Хоча й існують клінічно схвалені інгібітори декількох білків шляху MAPK (наприклад, MEK, BRAF, EGFR) для певної підгрупи типів пухлин, на сьогодні не існує клінічних молекул, селективних до пухлин, що містять мутантну форму KRAS. Крім того, деякі з націлених на шлях MAPK терапевтичних засобів протипоказані для лікування пухлин, що містять мутантну форму KRAS, через брак клінічної ефективності. Крім того, не селективні до пухлини або мутанта

терапевтичні засоби можуть викликати токсичність щодо мішені через інгібування передачі сигналу MAPK у нормальних клітинах. Це може обмежувати застосовність комбінації таких засобів зі стандартним лікуванням або імунотерапією. Таким чином, існує гостра незадоволена потреба в розробці селективних щодо пухлини терапевтичних засобів, які би не створювали перешкод для нормальних клітин.

KRAS p.G12C знаходиться у приблизно 13 % випадків аденокарциноми легені, 3 % випадків колоректального раку та 2 % випадків інших солідних пухлин. Мутантний цистеїн у KRAS^{G12C}, що розташовується суміжно з кишенею (P2), є властивим для неактивної пов'язаної з GDP форми KRAS. Близькість P2 та мутантного цистеїну зумовила великий пошук ковалентних інгібіторів. Перший описаний в літературі електрофільний скринінг KRAS^{G12C} зумовив можливу ідентифікацію ARS-1620, що демонструє ефективність *in vivo* на доклінічних моделях із KRAS p.G12C. При цьому ARS-1620 від компанії Aroxas Pharma став важливою віхою в експериментальній перевірці концепції селективного щодо мутанта інгібування KRAS, його позиціонували як інструментальну сполуку для доклінічних досліджень. Вчені з Amgen, Inc. ідентифікували серію нових молекул на основі акриламідів, які використовують жолобок на поверхні KRAS^{G12C}, що раніше не був використовуваний у цей спосіб, для значного підвищення ефективності й селективності. Інтенсивний електрофільний скринінг та дизайн на основі структури зумовили відкриття AMG 510, першого інгібітора KRAS^{G12C}, який пройшов клінічне тестування на людях (див. www.clinicaltrials.gov NCT03600883). У даному винаході передбачена переконлива доклінічна активність AMG 510, його здатність підсилювати знищення пухлинних клітин у вигляді монотерапії або в комбінації з іншими терапевтичними засобами, а також сильний вплив на інфільтрацію імунних клітин, що робить мікрооточення пухлини надзвичайно чутливим до імунотерапії. У даному документі також представлений попередній доказ клінічної ефективності.

СТИСЛИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід включає фармацевтичну композицію, що містить



AMG 510 або його фармацевтично прийнятну сіль та один або декілька терапевтичних або фармацевтично активних засобів і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

Даний винахід додатково включає спосіб лікування видів раку, таких як солідні пухлини, включаючи без обмеження рак легені, товстої кишки й підшлункової залози, за допомогою комбінації AMG 510 або фармацевтично прийнятної солі й щонайменше одного терапевтичного засобу, при цьому терапевтичний засіб вибраний з антитіла до PD-1, хімотерапевтичного засобу, інгібітора MEK, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2, інгібітора PI3K та інгібітора AKT.

Даний винахід додатково включає виділену лінію клітин, що містять два алелі KRAS^{G12C}, при цьому лінія клітин являє собою CT-26 KRAS p.G12C.

Даний винахід додатково включає спосіб створення лінії клітин, що містять два алелі KRAS^{G12C}, при цьому спосіб включає

а) інкубування лінії клітин, що містять два алелі KRAS^{G12D}, із конструкцією CRISPR, яка індукуює заміщення нуклеотиду в кожному із двох алелів KRAS у такий спосіб, що утворюються два алелі KRAS^{G12C}, та

б) виділення лінії клітин, що містять два алелі KRAS^{G12C}.

ПЕРШИЙ РЯД ВАРІАНТІВ ЗДІЙСНЕННЯ

1. В одному варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб лікування раку підшлункової залози, при цьому спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітора KRAS^{G12C} і щонайменше одного хімотерапевтичного засобу.

2. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб лікування раку товстої кишки, при цьому спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично

26. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб лікування раку

легені, при цьому спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітора KRAS^{G12C} та інгібітора PI3K.

27. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за будь-яким із варіантів здійснення 24-26, де інгібітор PI3K являє собою AMG 511.

28. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за варіантом здійснення 26, де інгібітор PI3K являє собою бупарлісіб.

29. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб лікування раку підшлункової залози, при цьому спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітора KRAS^{G12C} та інгібітора АКТ.

30. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб лікування раку легені, при цьому спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітора KRAS^{G12C} та інгібітора АКТ.

31. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за будь-яким із варіантів здійснення 29-30, де інгібітор АКТ являє собою AZD5363.

32. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб лікування раку товстої кишки, при цьому спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітора KRAS^{G12C} та антитіла до EGFR.

33. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за варіантом здійснення 32, де антитіло до EGFR являє собою цетуксимаб.

32. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб лікування раку товстої кишки, при цьому спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітора KRAS^{G12C} та антитіла до PD-1.

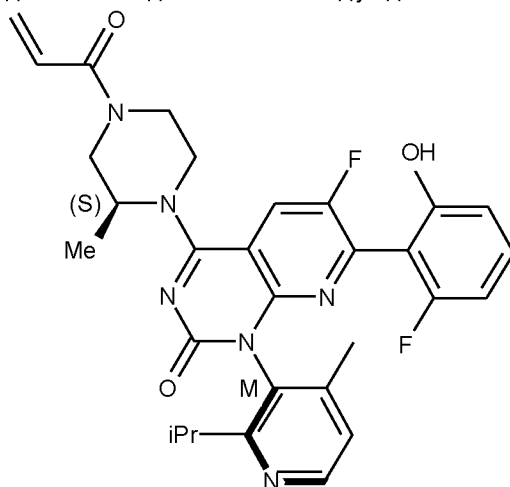
33. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за варіантом здійснення 32, де антитіло до PD-1 вибрано з AMG 404, пембролізумабу й ніволумабу.

34. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за варіантом здійснення 33, де антитіло до PD-1 являє собою пембролізумаб.

35. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за варіантом здійснення 33, де антитіло до PD-1 являє собою AMG 404.

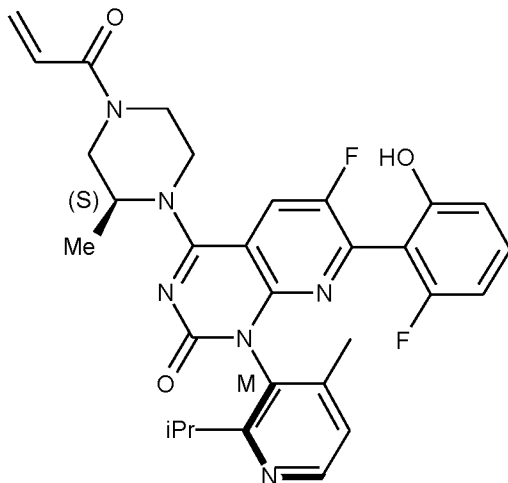
36. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за варіантом здійснення 33, де антитіло до PD-1 являє собою ніволумаб.

37. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



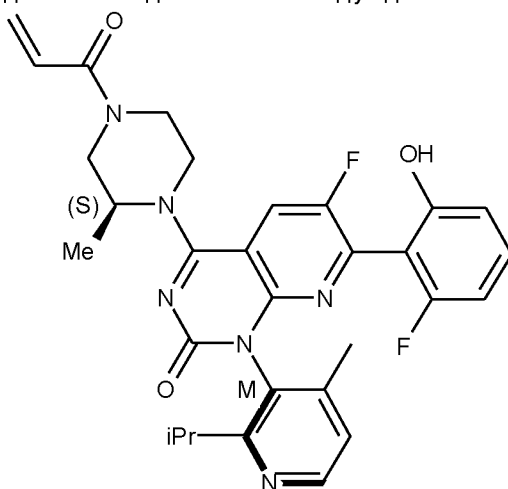
композицію, що містить або його фармацевтично прийнятну сіль, карбоплатин і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

38. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



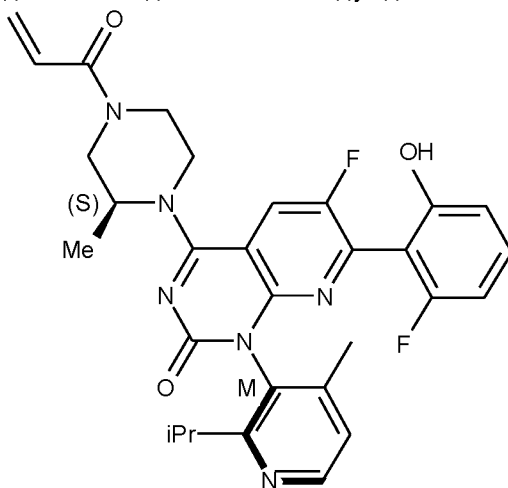
композицію, що містить або його фармацевтично прийнятну сіль, траметиніб і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

39. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



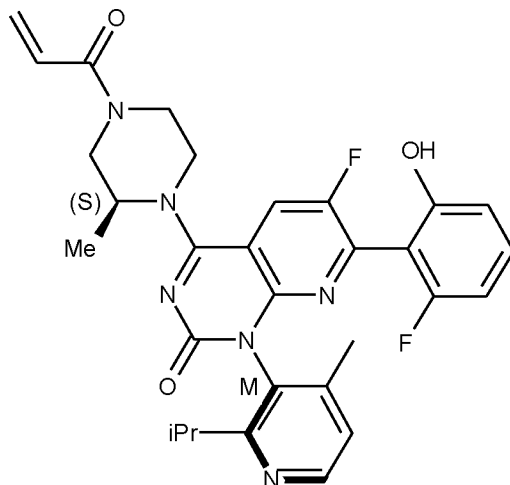
композицію, що містить або його фармацевтично прийнятну сіль, афатиніб і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

40. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



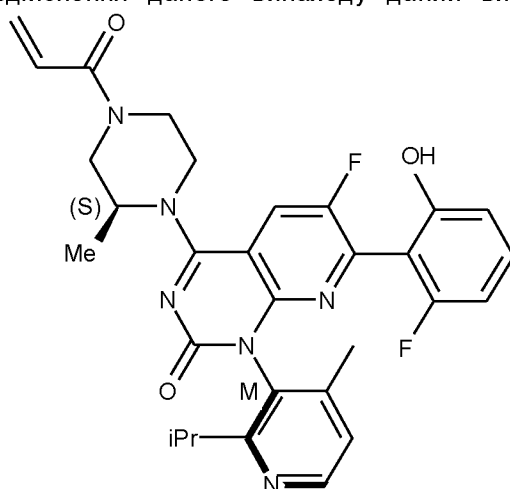
композицію, що містить або його фармацевтично прийнятну сіль, ерлотиніб і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

41. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



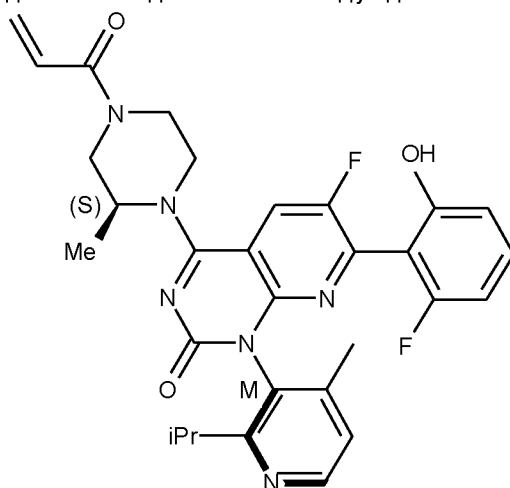
композицію, що містить прийнятну сіль, лапатиніб і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину. або його фармацевтично

42. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



композицію, що містить прийнятну сіль, RMC-4550 і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину. або його фармацевтично

43. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



композицію, що містить прийнятну сіль, AMG 511 і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину. або його фармацевтично

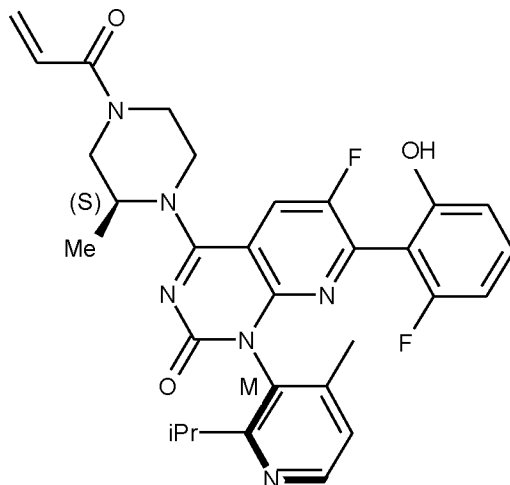
44. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



композицію, що містить  або його фармацевтично прийнятну сіль, AZD5363 і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

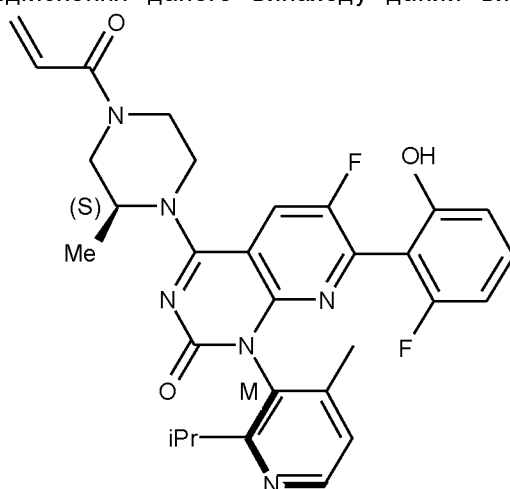
композицію, що містить або його фармацевтично прийнятну сіль, цетуксимаб і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

47. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



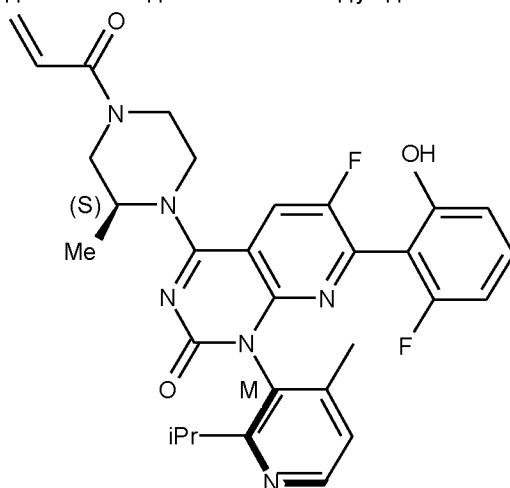
композицію, що містить або його фармацевтично прийнятну сіль, антитіло до PD-1 і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

48. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



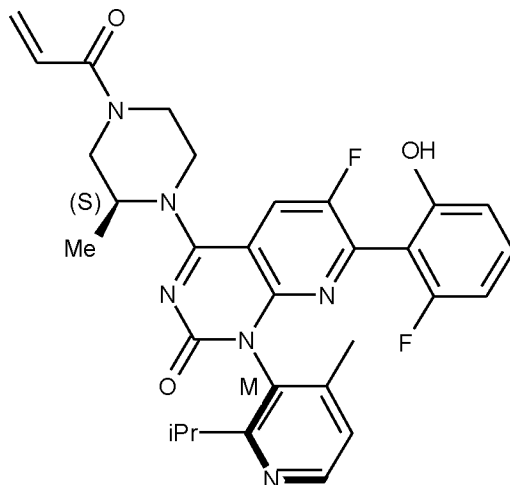
композицію, що містить або його фармацевтично прийнятну сіль, AMG 404 і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

49. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



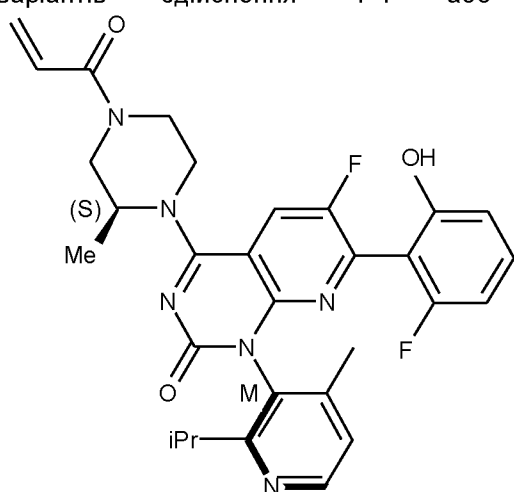
композицію, що містить або його фармацевтично прийнятну сіль, пембrolізумаб і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину.

50. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає фармацевтичну



композицію, що містить прийнятну сіль, ніволумаб і фармацевтично прийнятну допоміжну речовину. або його фармацевтично

51. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за будь-яким із варіантів здійснення 1-4 або 7-36, де інгібітор KRAS^{G12C} являє собою



або його фармацевтично прийнятну сіль.

52. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі інгібітора MEK для лікування солідної пухлини.

53. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі інгібітора MEK для лікування раку легені.

54. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі інгібітора MEK для лікування раку товстої кишки.

55. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі інгібітора MEK для лікування раку підшлункової залози.

56. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі хіміотерапевтичного засобу для лікування солідної пухлини.

57. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі хіміотерапевтичного засобу для лікування раку легені.

58. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі хіміотерапевтичного засобу для лікування раку товстої кишки.

59. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі хіміотерапевтичного засобу для лікування раку підшлункової залози.

60. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі інгібітора EGFR для

лікування солідної пухлини.

61. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі інгібітора EGFR для лікування раку легені.

62. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі інгібітора EGFR для лікування раку товстої кишки.

63. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі інгібітора EGFR для лікування раку підшлункової залози.

64. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі антитіла до PD-1 для лікування солідної пухлини.

65. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі антитіла до PD-1 для лікування раку легені.

66. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі антитіла до PD-1 для лікування раку товстої кишки.

67. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі антитіла до PD-1 для лікування раку підшлункової залози.

68. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає застосування інгібітора KRAS^{G12C} у комбінації з хіміотерапевтичним засобом для виготовлення лікарського препарату для контролю або лікування раку підшлункової залози, раку легені або раку товстої кишки в суб'єкта.

69. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає застосування інгібітора KRAS^{G12C} у комбінації з інгібітором MEK для виготовлення лікарського препарату для контролю або лікування раку підшлункової залози, раку легені або раку товстої кишки в суб'єкта.

70. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає застосування інгібітора KRAS^{G12C} у комбінації з інгібітором EGFR для виготовлення лікарського препарату для контролю або лікування раку підшлункової залози, раку легені або раку товстої кишки в суб'єкта.

71. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає застосування інгібітора KRAS^{G12C} у комбінації з антитілом до PD-1 для виготовлення лікарського препарату для контролю або лікування раку підшлункової залози, раку легені або раку товстої кишки в суб'єкта.

72. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає виділену лінію клітин, що містять два алелі KRAS^{G12C}.

73. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає лінію клітин за варіантом здійснення 68, де лінія клітин являє собою CT-26 KRAS p.G12C.

74. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб створення лінії клітин, що містять два алелі KRAS^{G12C}, при цьому спосіб включає

а) інкубування лінії клітин, що містять два алелі KRAS G12D, із конструкцією CRISPR, яка індукуює заміщення нуклеотиду в кожному із двох алелів KRAS у такий спосіб, що утворюються два алелі KRAS^{G12C}; і

б) виділення лінії клітин, що містять два алелі KRAS^{G12C}.

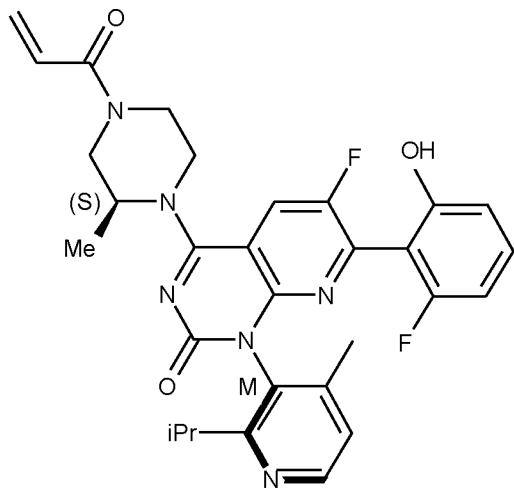
75. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за варіантом здійснення 70, де конструкція CRISPR містить послідовність CTTGTGATGGTTGGAGCTGA (SEQ ID NO.: 21).

76. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб лікування раку, при цьому спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітора KRAS^{G12C} і щонайменше одного додаткового хіміотерапевтичного засобу.

77. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію лікарського препарату на основі інгібітора KRAS^{G12C} і лікарського препарату на основі антитіла до PD-1 для лікування солідної пухлини.

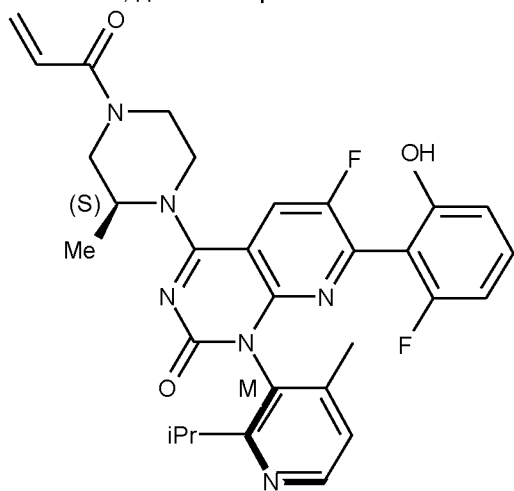
78. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає застосування інгібітора KRAS^{G12C} у комбінації щонайменше з одним додатковим хіміотерапевтичним засобом для виготовлення лікарського препарату для контролю або лікування раку підшлункової залози, раку легені або раку товстої кишки в суб'єкта.

79. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає спосіб за варіантом здійснення 76, де інгібітор KRAS^{G12C} являє собою



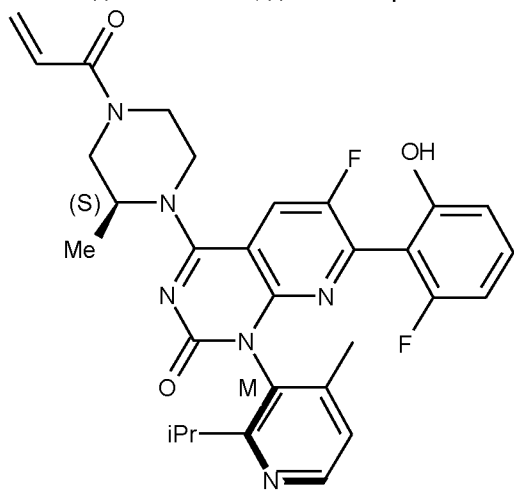
або його фармацевтично прийнятну сіль.

80. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає комбінацію за варіантом здійснення 77, де інгібітор KRAS^{G12C} являє собою



або його фармацевтично прийнятну сіль.

81. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає застосування за варіантом здійснення 78, де інгібітор KRAS^{G12C} являє собою



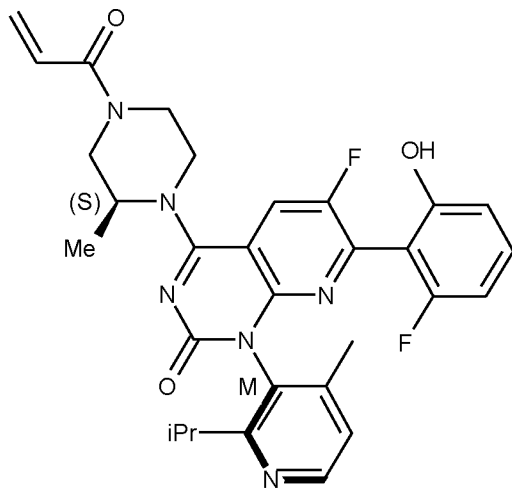
або його фармацевтично прийнятну сіль.

82. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід включає застосування за варіантом здійснення 78, де рак легені являє собою недрібноклітинну карциному легені (NSCLC).

ДРУГИЙ РЯД ВАРІАНТІВ ЗДІЙСНЕННЯ

1. В іншому варіанті здійснення даного винаходу даний винахід стосується способу лікування раку, при цьому спосіб включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітора KRAS^{G12C} і щонайменше одного додаткового фармацевтично активного засобу.

2. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 1, де інгібітор KRAS^{G12C} являє собою



або його фармацевтично прийнятну сіль.

3. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 1, де рак характеризується мутацією KRAS p.G12C.

4. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 1, де рак являє собою рак підшлункової залози, колоректальний рак, рак легені, апендикса, ендометрію або тонкого кишечника.

5. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 4, де рак являє собою рак підшлункової залози.

6. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 4, де рак являє собою колоректальний рак.

7. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 4, де рак являє собою рак легені.

8. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 7, де рак легені являє собою недрібноклітинний рак легені (NSCLC).

9. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 4, де рак являє собою рак апендикса.

10. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 4, де рак являє собою рак ендометрію.

11. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 4, де рак являє собою рак тонкого кишечника.

12. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 1, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою карбоплатин, інгібітор на основі антитіла до PD-1, інгібітор MEK, інгібітор EGFR, інгібітор TOR, інгібітор SHP2, інгібітор PI3K або інгібітор АКТ.

13. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 12, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою карбоплатин.

14. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 12, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор на основі антитіла до PD-1.

15. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 14, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 вибраний з AMG 404, пембролізумабу й ніволумабу.

16. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 15, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою пембролізумаб.

17. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 15, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою AMG 404.

18. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 15, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою ніволумаб.

19. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 12, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор MEK.

20. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 19, де інгібітор MEK являє собою траметиніб, пімасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 або AZD8330.

21. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 20, де інгібітор MEK являє собою траметиніб.

22. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 12, де

23. У додатковому варіанті здійснення передбаченого способу за варіантом здійснення 22, де інгібітор EGFR являє собою афатиніб, ерлотиніб, лапатиніб або цетуксимаб.

25. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 23, де інгібітор EGFR являє собою цетуксимаб.

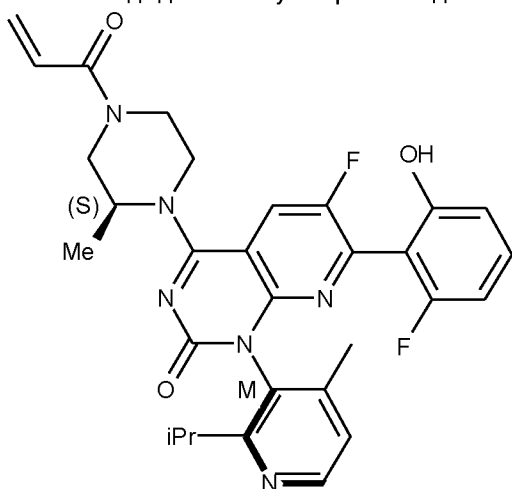
27. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 26, де інгібітор SHP2 являє собою RMC 4550.

29. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 12, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор PI3K.

31. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 30, де інгібітор PI3K являє собою AMG 511.

33. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 12, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор АКТ.

35. У додатковому варіанті здійснення передбачена фармацевтична композиція, що містить



36. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 35, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою карбоплатин, інгібітор на основі антитіла до PD-1, інгібітор MEK, інгібітор EGFR, інгібітор TOR, інгібітор SHP2, інгібітор PI3K або інгібітор AKT.

38. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 36, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор на основі антитіла до PD-1.

40. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 39, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою пембролізумаб.

42. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 39, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою ніволумаб.

43. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 36, де

щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор MEK.

44. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 43, де інгібітор MEK являє собою траметиніб, пімасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 або AZD8330.

45. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 44, де інгібітор MEK являє собою траметиніб.

46. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 36, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор EGFR.

47. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 46, де інгібітор EGFR являє собою афатиніб, ерлотиніб, лапатиніб або цетуксимаб.

48. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 47, де інгібітор EGFR являє собою афатиніб.

49. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 47, де інгібітор EGFR являє собою цетуксимаб.

50. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 36, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор SHP2.

51. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 50, де інгібітор SHP2 являє собою RMC 4550.

52. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 50, де інгібітор SHP2 являє собою RMC 4630.

53. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 36, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор PI3K.

54. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 53, де інгібітор PI3K являє собою AMG 511 або бупарлісіб.

55. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 54, де інгібітор PI3K являє собою AMG 511.

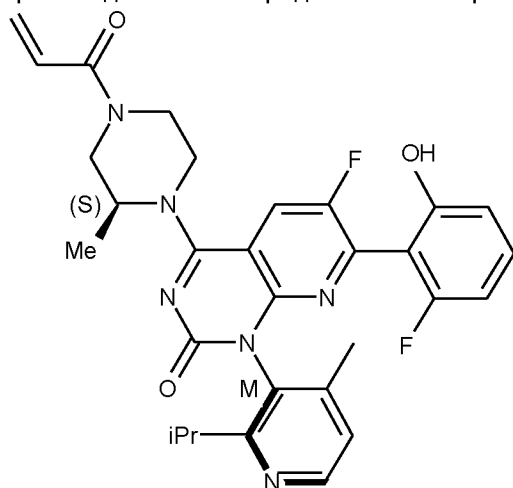
56. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 54, де інгібітор PI3K являє собою бупарлісіб.

57. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 36, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор АКТ.

58. У додатковому варіанті здійснення передбачена композиція за варіантом здійснення 57, де інгібітор АКТ являє собою AZD5363.

59. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір, що містить інгібітор KRAS^{G12C} або його фармацевтично прийнятну сіль і щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб.

60. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 59, де інгібітор



KRAS^{G12C} являє собою сіль.

або його фармацевтично прийнятну

61. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 59, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою карбоплатин, інгібітор на основі антитіла до PD-1, інгібітор MEK, інгібітор EGFR, інгібітор TOR, інгібітор SHP2, інгібітор PI3K або інгібітор АКТ.

62. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 59, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою карбоплатин.

63. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 59, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор на основі антитіла до PD-1.

64. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 63, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 вибраний з AMG 404, пембролізумабу й ніволумабу.

65. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 64, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою пембролізумаб.

66. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 64, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою AMG 404.

67. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 64, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою ніволумаб.

68. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 61, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор MEK.

69. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 68, де інгібітор MEK являє собою траметиніб, пімасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 або AZD8330.

70. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 69, де інгібітор MEK являє собою траметиніб.

71. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 61, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор EGFR.

72. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 61, де інгібітор EGFR являє собою афатиніб, ерлотиніб, лапатиніб або цетуксимаб.

73. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 62, де інгібітор EGFR являє собою афатиніб.

74. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 62, де інгібітор EGFR являє собою цетуксимаб.

75. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 61, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор SHP2.

76. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 75, де інгібітор SHP2 являє собою RMC 4550.

77. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 75, де інгібітор SHP2 являє собою RMC 4630.

78. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 61, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор PI3K.

79. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 78, де інгібітор PI3K являє собою AMG 511 або бупарлісіб.

80. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 79, де інгібітор PI3K являє собою AMG 511.

81. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 79, де інгібітор PI3K являє собою бупарлісіб.

82. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 61, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор АКТ.

83. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 82, де інгібітор АКТ являє собою AZD5363.

84. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 59, де набір призначений для лікування раку.

85. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 84, де рак характеризується мутацією KRAS p.G12C.

86. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 84, де рак являє собою рак підшлункової залози, колоректальний рак, рак легені, апендикса, ендометрію або тонкого кишечника.

87. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 86, де рак являє собою рак підшлункової залози.

88. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 86, де рак являє собою колоректальний рак.

89. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 86, де рак являє собою рак легені.

90. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 89, де рак легені являє собою недрібноклітинний рак легені (NSCLC).

91. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 86, де рак являє собою рак апендикса.

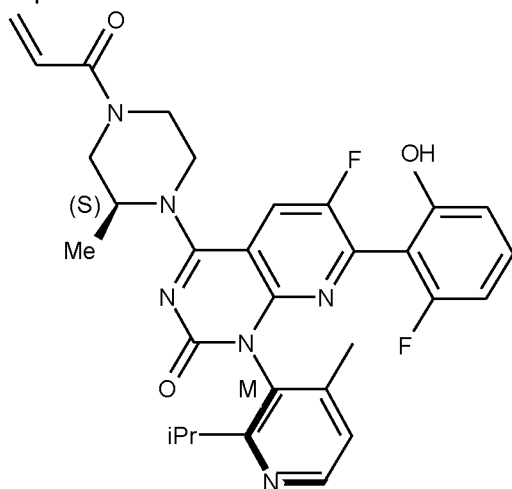
92. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 86, де рак являє собою рак ендометрію.

93. У додатковому варіанті здійснення передбачений набір за варіантом здійснення 86, де рак являє собою рак тонкого кишечника.

94. У додатковому варіанті здійснення передбачене застосування інгібітора KRAS^{G12C} у комбінації

щонайменше з одним додатковим хіміотерапевтичним засобом для виготовлення лікарського препарату для контролю або лікування раку в суб'єкта.

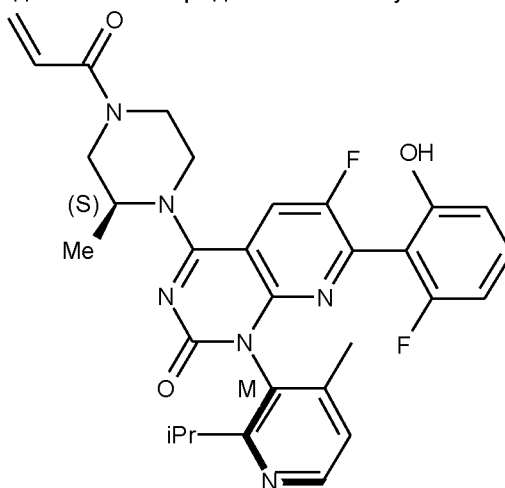
95. У додатковому варіанті здійснення передбачене застосування за варіантом здійснення 94, де інгібітор KRAS^{G12C} являє собою



або його фармацевтично прийнятну сіль.

96. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука, яка являє собою інгібітор KRAS^{G12C}, для застосування в лікуванні раку щонайменше з одним додатковим фармацевтично активним засобом.

97. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 96, де



інгібітор KRAS^{G12C} являє собою прийнятну сіль.

або його фармацевтично

98. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 96, де рак характеризується мутацією KRAS p.G12C.

99. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 96, де рак являє собою рак підшлункової залози, колоректальний рак, рак легені, апендикса, ендометрію або тонкого кишечника.

100. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 99, де рак являє собою рак підшлункової залози.

101. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 99, де рак являє собою колоректальний рак.

102. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 99, де рак являє собою рак легені.

103. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 102, де рак легені являє собою недрібноклітинний рак легені (NSCLC).

104. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 99, де рак являє собою рак апендикса.

105. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 99, де рак являє собою рак ендометрію.

106. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 99, де рак являє собою рак тонкого кишечника.

107. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 96, де

щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою карбоплатин, інгібітор на основі антитіла до PD-1, інгібітор MEK, інгібітор EGFR, інгібітор TOR, інгібітор SHP2, інгібітор PI3K або інгібітор AKT.

108. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 107, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою карбоплатин.

109. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 107, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор на основі антитіла до PD-1.

110. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 109, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 вибраний з AMG 404, пембролізумабу й ніволумабу.

111. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 110, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою пембролізумаб.

112. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 110, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою AMG 404.

113. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 110, де інгібітор на основі антитіла до PD-1 являє собою ніволумаб.

114. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 107, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор MEK.

115. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 114, де інгібітор MEK являє собою траметиніб, пімасертиб, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973 або AZD8330.

116. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 115, де інгібітор MEK являє собою траметиніб.

117. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 107, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор EGFR.

118. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 117, де інгібітор EGFR являє собою афатиніб, ерлотиніб, лапатиніб або цетуксимаб.

119. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 118, де інгібітор EGFR являє собою афатиніб.

120. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 118, де інгібітор EGFR являє собою цетуксимаб.

121. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 107, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор SHP2.

122. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 121, де інгібітор SHP2 являє собою RMC 4550.

123. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 121, де інгібітор SHP2 являє собою RMC 4630.

124. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 107, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор PI3K.

125. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 124, де інгібітор PI3K являє собою AMG 511 або бупарлісіб.

126. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 125, де інгібітор PI3K являє собою AMG 511.

127. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 125, де інгібітор PI3K являє собою бупарлісіб.

128. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 107, де щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб являє собою інгібітор AKT.

129. У додатковому варіанті здійснення передбачена сполука за варіантом здійснення 128, де інгібітор AKT являє собою AZD5363.

130. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 1, де інгібітор KRAS^{G12C} і щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб вводять одночасно.

131. У додатковому варіанті здійснення передбачений спосіб за варіантом здійснення 1, де інгібітор KRAS^{G12C} і щонайменше один додатковий фармацевтично активний засіб вводять окремо.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає застосування комбінації, що включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора PD-1, інгібітора MEK, селективного інгібітора PI3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT. Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає застосування комбінації для лікування раку, при цьому комбінація включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора PD-1, інгібітора MEK, селективного інгібітора PI3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT. Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає спосіб застосування комбінації, що включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора PD-1, інгібітора MEK,

селективного інгібітора Pi3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT, для лікування раку. Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає застосування комбінації для лікування раку, при цьому комбінація включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора PD-1, інгібітора MEK, селективного інгібітора Pi3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT, при цьому застосування включає самостійне введення комбінації.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає спосіб лікування раку, що включає призначення комбінації, яка додатково включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора PD-1, інгібітора MEK, селективного інгібітора Pi3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT. Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає спосіб лікування раку, що передбачає призначення суб'єкту, який цього потребує, комбінації, яка додатково включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора PD-1, інгібітора MEK, селективного інгібітора Pi3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає спосіб лікування раку з використанням комбінації, що включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора PD-1, інгібітора MEK, селективного інгібітора Pi3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT, при цьому такий спосіб додатково включає опис вказаної комбінації у формулярі й приписання пацієнту, який потребує такого лікування раку.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає спосіб застосування комбінації, що включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора PD-1, інгібітора MEK, селективного інгібітора Pi3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT, для лікування раку, при цьому такий спосіб включає придбання вказаної комбінації для самостійного введення пацієнтом, який потребує такого лікування раку.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає спосіб лікування раку, що включає інструктування суб'єкта, який потребує такого лікування, щодо введення комбінації, яка включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора на основі антитіла до PD-1, інгібітора MEK, селективного інгібітора Pi3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає спосіб лікування раку, що включає

- A) призначення,
- B) продаж або рекламу для продажу,
- C) придбання,
- D) інструктування щодо самостійного введення або
- E) уведення

комбінації, описаної в даному документі, при цьому комбінація була схвалена регулювальним органом для лікування раку в суб'єкта, який потребує лікування раку.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу включає спосіб забезпечення комбінації, що включає інгібітор KRAS^{G12C} з іншим терапевтичним засобом, вибраним із хіміотерапевтичного засобу, інгібітора PD-1, інгібітора MEK, селективного інгібітора Pi3K, інгібітора EGFR, інгібітора TOR, інгібітора SHP2 або інгібітора AKT, для лікування раку, при цьому вказаний спосіб передбачає відшкодування витрат лікарю, фармацевту, пацієнту або страховій компанії за продаж вказаної комбінації.

Для ясності термін "інструктування" передбачає включення інформації, схваленої регулювальним органом, для розміщення на етикетці, на додаток до його загальноприйнятого визначення.

СТИСЛИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

На фігурі 1 показано, що AMG 510 у комбінації з карбоплатином підсилює супресію росту пухлини NCI-H358 NSCLC.

На фігурі 2 показано, що AMG 510, об'єднаний з інгібітором MEK PD-325901, зумовлює підвищену ефективність на моделі ксенотрансплантата NSCLC NCI-H358.

На фігурі 3 показано, що AMG 510 пригнічує *in vivo* ріст пухлин CT-26 KRAS p.G12C.

На фігурі 4 показано, що AMG 510, об'єднаний з антитілом до PD-1, зумовлює підвищення рівня виживання та надійні результати лікування на мишачій моделі раку з мутацією KRAS p.G12C.

На фігурі 5 показано, що обробка за допомогою AMG 510 зумовлює посилення інфільтрації CD8+ та CD4+ Т-клітин у пухлини CT-26 G12C-H10.

На фігурі 6 показано, що обробка за допомогою AMG 510 зумовлює підвищення PD-L1-позитивних нейтрофілів у пухлинах CT-26 G12C-H10.

На фігурі 7 показано, що матриця надлишку величини адитивності ідентифікує ділянки синергетичної взаємодії.

На фігурі 8 показана експериментально отримана адитивність на моделі матриць самоперетинання.

На фігурі 9 показано, що AMG 510 синергує як з RMC-4550 (SHP2i), так і з траметинібом (MEKi) із досягненням знищення клітин у лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 10 показано, що відсутність активності окремого засобу з афатинібом або RMC-4550 може сприяти більш слабкому синергізму в лінії клітин MIA PaCa-2.

На фігурі 11 показано, що комбінації в 3D-культурі можуть демонструвати підвищений синергізм.

На фігурі 12 показано, що комбінація AMG 510 X траметиніб діє синергетично в NCI-H358.

На фігурі 13 показаний самоперетин AMG у лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 14 показаний самоперетин траметинібу в лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 15 показано, що комбінація AMG 510 X траметиніб демонструє слабкий синергізм у лінії клітин MIA PaCa-2.

На фігурі 16 показано, що 3D-культура поліпшує синергізм комбінації AMG 510 X траметиніб у MIA PaCa-2.

На фігурі 17 показана комбінація AMG 510 X траметиніб (3D) у лінії клітин NCI-H1373.

На фігурі 18 показано, що комбінація AMG 510 X траметиніб демонструє слабкий синергізм через високу ефективність кожного окремого засобу в CT-26 KRAS p.G12C.

На фігурі 19 показано, що комбінація AMG 510 X PD-325901 демонструє слабкий синергізм у MIA PaCa-2.

На фігурі 20 показано, що комбінація AMG 510 X афатиніб виявляє синергетичну дію в лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 21 показано, що комбінація AMG 510 X афатиніб виявляє слабку синергетичну дію в лінії клітин MIA PaCa-2.

На фігурі 22 показано, що 3D-культура не поліпшує синергізму комбінації AMG 510 X афатиніб у лінії клітин MIA PaCa-2.

На фігурі 23 показана комбінація AMG 510 X афатиніб (3D) у лінії клітин NCI-H1373.

На фігурі 24 показано, що комбінація AMG 510 X афатиніб виявляє помірну синергетичну дію в CT-26 KRAS p.G12C.

На фігурі 25 показано, що комбінація AMG 510 X лапатиніб виявляє синергетичну дію в лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 26 показано, що комбінація AMG X ерлотиніб виявляє помірну синергетичну дію в лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 27 показано, що синергізм комбінації AMG 510 X ерлотиніб не спостерігається в лінії клітин MIA PaCa-2 через відсутність активності ерлотинібу.

На фігурі 28 показано, що синергізм комбінації AMG 510 X цетуксимаб не спостерігається в SW837 через відсутність активності цетуксимабу *in vivo*.

На фігурі 29 показано, що комбінація AMG 510 X RMC-4550 виявляє синергетичну дію в лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 30 показано, що комбінація AMG 510 X RMC-4550 виявляє слабку синергетичну дію в лінії клітин MIA PaCa-2.

На фігурі 31 показано, що комбінація AMG 510 X RMC-4550 виявляє помірну синергетичну дію в CT-26 KRAS p.G12C.

На фігурі 32 показано, що комбінація AMG 510 X AMG 511 виявляє помірну синергетичну дію в лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 33 показано, що комбінація AMG 510 X AMG 511 виявляє слабку синергетичну дію в лінії клітин MIA PaCa-2.

На фігурі 34 показано, що комбінація AMG 510 X AMG 511 виявляє помірну синергетичну дію в CT-26 KRAS p.G12C.

На фігурі 35 показано, що комбінація AMG 510 X бупарлісіб (BKM120) виявляє помірну синергетичну дію в лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 36 показано, що AMG 510 X AZD5363 виявляє слабку синергетичну дію в лінії клітин NCI-H358.

На фігурі 37 показано, що AMG 510 X AZD5363 виявляє слабку синергетичну дію в MIA PaCa-2.

На фігурі 38 показано, що AMG 510 пригнічує передачу сигналу KRAS у CT-26 KRAS p.G12C у 2D-культурі.

На фігурі 39 показано, що клітини CT-26 KRAS p.G12C чутливі до AMG 510 в 3D-культурі.

На фігурі 40а показана рентгенівська співкристалічна структура KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}, зв'язаного з GDP та ARS-1620 (PDB ID: 5V9U).

На фігурі 40b показана рентгенівська співкристалічна структура KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}, зв'язаного з GDP та AMG 510, за роздільної здатності 1,65 Å (PDB ID: ще не призначений).

На фігурі 40с показана біохімічна активність AMG 510 і ARS-1620, що була виміряна в аналізі обміну нуклеотидів, який каталізує SOS1, із очищеними білками KRAS^{G12C/C118A} або KRAS^{C118A}, $n = 4$.

На фігурі 40d показані кінетичні властивості AMG 510 і ARS-1620, визначені за допомогою мас-спектрометрії ($n \geq 2$).

На фігурі 40е показана клітинна активність AMG 510 і ARS-1620 в NCI-H358 і MIA PaCa-2, виміряна за допомогою інгібування фосфорилування ERK1/2 після 2-годинної обробки ($n = 2$).

На фігурі 40f показане інгібування фосфорилування ERK та зайнятість KRAS^{G12C} AMG 510 у клітинах NCI-H358 і MIA PaCa-2 після 2-годинної обробки (n = 3).

На фігурі 40g показана клітинна активність AMG 510 і ARS-1620 в NCI-H358 і MIA PaCa-2, виміряна за допомогою ефектів стосовно життєздатності клітин після 72-годинної обробки (n = 3).

На фігурі 40h показані кінетичні властивості AMG 510 і ARS-1620, визначені за допомогою інгібування фосфорилування ERK (n ≥ 2).

На фігурі 41a показаний ефект стосовно клітинної передачі сигналу в NCI-H358 або MIA PaCa-2 після 4- або 24-годинної обробки, залежний від дози AMG 510.

На фігурі 41b показаний ефект стосовно клітинної передачі сигналу в NCI-H358 або MIA PaCa-2 після обробки 0,1 мкМ AMG 510 у моменти часу до 24 годин.

На фігурі 41c показана клітинна активність AMG 510 на панелі ліній клітин з мутантом KRAS p.G12C і ліній клітин без мутанта KRAS p.G12C, виміряна за допомогою інгібування фосфорилування ERK1/2 після 2-годинної обробки (n ≥ 2).

На фігурі 41d показана клітинна активність AMG 510 на панелі ліній клітин з мутантом KRAS p.G12C і ліній клітин без мутанта KRAS p.G12C, виміряна за допомогою ефектів стосовно життєздатності клітин після 72-годинної обробки.

На фігурі 41e показані криві залежності життєздатності від дози, які є ілюстративними прикладами для щонайменше n = 2 експериментів. Ефект 72-годинної обробки за допомогою AMG 510 стосовно життєздатності клітин в умовах адгерентного моношару або сфероїдної культури (n = 2).

На фігурі 41f показаний аналіз цистеїнового протеому лізатів цілих клітин NCI-H358 після 4-годинної обробки за допомогою 1 мкМ AMG 510 (n = 5).

На фігурах 42a-d показано, що AMG 510 пригнічує фосфорилування ERK1/2 у пухлинах із мутантом KRAS p.G12C *in vivo*. Мишам, що несуть пухлини MIA PaCa-2 T2 (фігури 42a, c, d) або NCI-H358 (фігура 42b), давали однократну дозу або середовища-носія перорально, або AMG 510 перорально (усі інші стовпчики) і відбирали для аналізу через 2 години (фігури 42a, b) або через вказаний час (фігури 42c, d) й оцінювали за рівнями p-ERK, виміряними за допомогою імуноаналізу MSD. Збирали зразки плазми крові й пухлин та аналізували щодо концентрацій AMG 510 (червоні трикутники, чорні незаштриховані кружечки відповідно). Дані наведені як відсоток від контролю порівняно із середовищем-носієм. Дані представляють середнє значення об'єму пухлини ± SEM (n = 3/група). Фігури 42a-d: **** P < 0,0001; * P < 0,05 відповідно до тесту Даннетта.

На фігурі 42e показані результати обробки за допомогою AMG 510 за режимом дозування в ковалентній модифікації KRAS^{G12C} з використанням мас-спектрометрії з кореляцією за інгібуванням p-ERK у мишей, що несуть MIA PaCa-2 T2.

На фігурі 42f показані результати обробки за допомогою AMG 510 за режимом дозування в ковалентній модифікації KRAS^{G12C} з використанням мас-спектрометрії з кореляцією за інгібуванням p-ERK у мишей, що несуть NCI-H358.

На фігурі 42g показані результати обробки за допомогою AMG 510 протягом деякого часу в ковалентній модифікації KRAS^{G12C} з використанням мас-спектрометрії з кореляцією за інгібуванням p-ERK у мишей, що несуть MIA PaCa-2 T2.

На фігурі 43a показано, що мишам із розвиненими пухлинами MIA PaCa-2 T2 KRAS p.G12C вводили дозу або середовища-носія, або AMG 510. AMG 510 селективно інгібує ріст пухлин із мутантом KRAS p.G12C *in vivo*.

На фігурі 43b показано, що мишам із розвиненими пухлинами NCI-H358 KRAS p.G12C вводили дозу або середовища-носія, або AMG 510. AMG 510 селективно інгібує ріст пухлин із мутантом KRAS p.G12C *in vivo*.

На фігурі 43c показано, що мишам із розвиненими пухлинами CT-26 KRAS p.G12C вводили дозу або середовища-носія, або AMG 510. AMG 510 селективно інгібує ріст пухлин із мутантом KRAS p.G12C *in vivo*.

На фігурі 43d показані ефекти росту пухлини на моделі KRAS^{G12C} NSCLC PDX із мишами, обробленими або середовищем-носієм, або AMG 510. AMG 510 селективно інгібує ріст пухлин із мутантом KRAS p.G12C *in vivo*.

На фігурах 43a, b, c і d дані являють собою середнє значення об'єму пухлини ± SEM (n = 10/група). Фігури 43a, b і c: **** P < 0,0001, * P < 0,05 для порівнянь групи, що одержує середовище-носіє, з обробленою групою, відповідно до тесту Даннетта, # P < 0,05 для регресії, що визначається за допомогою парного t-критерію, і **** P < 0,0001 за двофакторним ANOVA з RM.

На фігурі 43e зображені СТ-сканування двох пацієнтів з карциномою легені з KRAS p.G12C, яких лікували за допомогою AMG 510. Ілюстративні зображення до обробки ("вихідний рівень") і після обробки (R_x). Крайній ліворуч: на верхніх панелях зображено верхню ліву частку легені, а на нижніх панелях зображено нижню праву частку легені. Крайній праворуч: на верхній панелі зображено верхню ліву частку легені; на нижній панелі зображено плевру. AMG 510 селективно інгібує ріст пухлин із мутантом KRAS p.G12C *in vivo*.

На фігурі 43f та фігурі 47 показано, що мишам, що несуть пухлини CT-26 KRAS p.G12C, вводили

дозу середовища-носія або AMG 510. Окремі графіки для пухлини CT-26 KRAS p.G12C у мишей, оброблених за допомогою AMG 510 (100 мг/кг).

На фігурі 43g та фігурі 47 показано, що мишам, що несуть пухлини CT-26 KRAS p.G12C, вводили дозу середовища-носія або AMG 510. Окремі графіки для пухлини CT-26 KRAS p.G12C у мишей, оброблених за допомогою AMG 510 (200 мг/кг). Продовження обробки групи, що одержує 100 мг/кг, настановує на думку, що регресія не була стійкою (фіг. 43f), можливо, через неповне інгібування p-ERK (фігура 47a). Тому оцінювали дозу у 200 мг/кг AMG 510, яка зумовила майже повне інгібування p-ERK (фіг. 47a) та зумовила надійні результати лікування у восьми з десяти випадках (фіг. 43g), при цьому рівні AMG 510 у плазмі крові були трохи нижчі, ніж у клітинній IC90 (фігура 47h).

На фігурі 44a показаний AMG 510 у комбінації з карбоплатином на ксенотрансплантатах пухлини NCI-H358.

На фігурі 44b показані бали синергізму для комбінацій AMG 510 із засобами спрямованої дії, розраховані з використанням алгоритму надлишку величини адитивності Loewe і представлені у вигляді теплокарти, при цьому більш високі бали (більш темний червоний колір) позначають більш сильні синергетичні взаємодії.

На фігурі 44c показаний AMG 510 у комбінації з інгібітором MEK (PD-0325901) на ксенотрансплантатах пухлини NCI-H358.

На фігурах 44a та c дані представляють середнє значення об'єму пухлини $\pm$ SEM ($n = 10$ /група). а: *** $P < 0,001$ для порівняння комбінованого лікування з кожним окремим засобом відповідно до тесту Даннетта, # $P < 0,001$ для регресії, що визначається за допомогою парного t-критерію. с: **** $P < 0,001$ для комбінованого лікування порівняно з кожним окремим засобом відповідно до тесту Даннетта, # $P < 0,001$ для регресії, що визначається відповідно до парного t-критерію. Результати для всіх оброблених груп були значущими порівняно з тими, що одержували середовище-носіє (* $P < 0,0001$ відповідно до тесту Даннетта).

На фігурі 45a показаний ріст пухлини CT-26 KRAS p.G12C в окремих мишей, оброблених одним із середовища-носія, AMG 510, антитіла до PD-1 або AMG 510 у комбінації з антитілом до PD-1 ($n = 10$ /група). Лінії із кружечками показують мишей без пухлин.

На фігурі 45b показаний аналіз Каплана-Мейєра для сурогатної кінцевої точки виживаності (розмір пухлини > 800 мм³). **** $P < 0,001$ за критерієм Кокса-Мантеля для контролю із середовищем-носієм; # $P < 0,005$ для комбінації порівняно з AMG 510 або антитілом до PD-1 окремо.

На фігурі 45c показані пухлини CT-26 KRAS p.G12C у мишей, які були протягом чотирьох днів оброблені одним із середовища-носія, AMG 510, антитіла до PD-1 або AMG 510 у комбінації з антитілом до PD-1 або з MEKі та які були імунофенотиповані за допомогою проточної цитометрії ($n = 8$ /група). **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ відповідно до тесту Тьюкі порівняно з контролем із середовищем-носієм; NS = не значуще.

На фігурі 45d показана РНК, яка була виділена з пухлин CT-26 KRAS p.G12C після двох днів обробки ($n = 5$ /група). Експресію генів і бали розраховували за допомогою технології NanoString (див. способи). **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$ відповідно до тесту Тьюкі.

На фігурі 45e показана експресія на клітинній поверхні антигену H-2K^d МНС класу I на клітинах CT-26 KRAS p.G12C після 24-годинної обробки за допомогою AMG 510 за присутності або відсутності інтерферону гамма ("IFN γ "), виміряна за допомогою проточної цитометрії. Рівні секретованого IFN- γ вимірювали за допомогою аналізу ELISpot ($n = 4$ -5/група).

На фігурі 45f показаний ріст окремих пухлин у мишей, яких піддавали лікуванню за допомогою AMG 510, на додачу до того піддавали обробці антитілом до PD-1 та повторній сенсibiliзації клітинами CT-26 KRAS p.G12C, CT-26 або 4T1.

На фігурі 45g показано, що спленоцити відбирали й заражали вказаними клітинами CT-26, CT-26 KRAS p.G12C або 4T1. * $P = 0,0269$ для непарного t-критерію, обчисленого за допомогою порівняння контролю з комбінацією.

На фігурі 45h показано, що обробка за допомогою AMG 510 індукує прозапальне мікрооточення пухлини. Пухлини CT-26 KRAS p.G12C у мишей, оброблених протягом чотирьох днів одним із середовища-носія, AMG 510, антитіла до PD-1, AMG 510 у комбінації з антитілом до PD-1 або з MEKі, були піддані імунофенотипуванню за допомогою імуногістохімії ($n = 5$ /група), імуногістохімічного забарвлення щодо CD3/Ki67. Імунопозитивне забарвлення щодо Ki67 є синім і забарвлює ядра, а імунопозитивне забарвлення щодо CD3 і CD8 є коричневим і забарвлює цитоплазму. Стрілки в h вказують на приклади клітин із подвійною імунопозитивністю щодо CD3 і Ki67.

На фігурі 45i показано, що обробка за допомогою AMG 510 індукує прозапальне мікрооточення пухлини, пухлини CT-26 KRAS p.G12C у мишей, оброблених протягом чотирьох днів одним із середовища-носія, AMG 510, антитіла до PD-1, AMG 510 у комбінації з антитілом до PD-1 або з MEKі, були піддані імунофенотипуванню за допомогою імуногістохімії ($n = 5$ /група), імуногістохімічного забарвлення щодо CD8. Імунопозитивне забарвлення щодо Ki67 є синім і забарвлює ядра, а імунопозитивне забарвлення щодо CD3 і CD8 є коричневим і забарвлює цитоплазму.

На фігурі 46a показана біохімічна активність AMG 510 та його інертного пропіонамідного аналога,

що була виміряна в аналізі обміну нуклеотидів, який каталізує SOS1, із очищеними білками KRAS^{G12C/C118A} або KRAS^{C118A} ($n \geq 2$). На всіх фігурах 46a-е дані представляють середні значення $\pm$ SD для кількості вказаних незалежних повторностей.

На фігурі 46b показані обчислені максимальні швидкості реакції та концентрації, за яких досягається напівмаксимальна швидкість з AMG 510 та ARS-1620.

На фігурі 46c показане інгібування фосфорилування ERK за допомогою RMC-4550 у клітинах NCI-H358 із $t_{1/2}=12,2$ хвилини ($n = 2$).

На фігурі 46d показаний ефект 72-годинної обробки за допомогою AMG 510 на життєздатність клітин в умовах адгерентного моношару або сфероїдної культури в MIA PaCa-2 та NCI-H1373 ($n = 2$).

На фігурі 46e показане визначення періоду напіввиведення KRAS у клітинах MIA PaCa-2 та NCI-H358 шляхом уведення мітки стабільного ізотопу в клітинну культуру за допомогою амінокислот (SILAC).

На фігурі 47a-с показано, що мишей, які несуть пухлини CT-26 KRAS p.G12C, обробляли однократною дозою середовища-носія перорально або вказаними дозами AMG 510 перорально й відбирали для аналізу через 2 години. Рівні p-ERK вимірювали за допомогою імуоаналізу MSD. Збирали зразки плазми крові й пухлин та аналізували щодо концентрацій AMG 510 (червоні трикутники, чорні незаштриховані кружечки відповідно). Дані представлені як відсоток від контролю (POC) порівняно із середовищем-носієм. ****P < 0,0001, *P < 0,05 відповідно до тесту Даннетта порівняно із середовищем-носієм.

На фігурі 47d показано, що обробка за допомогою AMG 510 зумовлює ковалентну модифікацію KRAS^{G12C}, що обернено корелює з інгібуванням p-ERK.

На фігурі 47e показаний ефект AMG 510 стосовно росту пухлини на моделі ксенотрансплантата SW480-1AC.

На фігурі 47f показаний ефект обробки за допомогою AMG 510 стосовно росту пухлини на моделі KRAS^{G12C} SCLC PDX. На фігурах 47e та f показано, що обробку починали, коли пухлини досягали приблизно 200 мм³. ****P < 0,0001 за двофакторним ANOVA з RM.

На фігурі 47g показані рівні AMG 510 у плазмі крові особин із ксенотрансплантатом MIA PaCa-2 T2, NCI-H358.

На фігурі 47h показані рівні AMG 510 у плазмі крові особин із ксенотрансплантатом CT-26 KRAS p.G12C.

На фігурі 47i показані окремі графіки для пухлини CT-26 KRAS p.G12C у мишей, оброблених за допомогою AMG 510 (200 мг/кг), серед голих мишей BALB/c від дня 14 до дня 32.

На фігурі 47j зображені CT-сканування двох пацієнтів із карциномою легені з KRAS p.G12C, яких лікували за допомогою AMG 510. Додаткові ілюстративні сканування пацієнтів до лікування ("вихідний рівень") та після лікування (Rx), раніше описані на фігурі 43d (крайні ліворуч, згори донизу): верхня ліва частка легені, нижня ліва частка легені, лімфатичний вузол, верхня ліва частка легені, верхня ліва частка легені. Крайній праворуч згори донизу: нижня ліва частка легені, нижня ліва частка легені, плевра й надниркова залоза.

На фігурі 47k показаний AMG 510 як окремий засіб або в комбінації з карбоплатином на ксенотрансплантатах пухлини NCI-H358. **** P < 0,0001 відповідно до тесту Даннетта для порівняння з контролем із середовищем-носієм, # P < 0,001 для регресії, що визначається за допомогою парного t-критерію.

На фігурі 48 показані матриці інгібування росту й надлишку величини адитивності Loewe для AMG 510, що вводиться дозою в комбінації із засобами спрямованої дії у вказаній лінії клітин, при цьому більш темними кольорами позначені більш активний лізис клітин (інгібування росту) та сильніша синергетична взаємодія (надлишок Loewe). Наведені максимальна концентрація інгібіторів, які піддають тестуванню, і діапазон доз, охоплений матрицями в кожній комбінації. Окремі гетерологічні комбінації (AxB) оцінювали шляхом порівняння їхніх відповідних балів синергізму з балами їхніх компонентів у комбінаціях із самоперетинами (AxA або BxB). Гетерологічні комбінації вважали синергічними тільки тоді, коли їхній бал синергізму в три рази перевищував бал синергізму будь-якого компонента в самоперетині.

На фігурі 49a показана клітинна активність AMG 510 та інгібітора MEK траметинібу в лінії клітин CT-26 KRAS p.G12C і батьківській лінії клітин CT-26, виміряна за допомогою інгібування фосфорилування ERK1/2 після 2-годинної обробки ($n \geq 2$).

На фігурі 49b показана клітинна активність AMG 510 та інгібітора MEK траметинібу в лінії клітин CT-26 KRAS p.G12C і батьківській лінії клітин CT-26, виміряна за допомогою ефектів щодо життєздатності клітин після 72-годинної обробки в сфероїдній культурі ($n = 2$).

На фігурі 50a показані пухлини CT-26 KRAS p.G12C у мишей, які оброблені протягом чотирьох днів одним із середовища-носія, AMG 510, антитіла до PD-1, AMG 510 плюс антитіло до PD-1 або MEKi та яких імуофенотипували за допомогою проточної цитометрії ($n = 8$ /група).

На фігурі 50b показано, що мишей, які несуть пухлини CT-26 KRAS p.G12C, обробляли однократною дозою середовища-носія перорально (чорний стовпчик) або вказаною дозою MEKi

перорально (синій стовпчик) і відбирали для аналізу через 2 години. Рівні p-ERK вимірювали за допомогою імуноаналізу MSD. Збирали зразки плазми крові й пухлини та аналізували щодо концентрації MEKі (червоний трикутник, чорний незаштрихований кружечок відповідно). Дані представлені як відсоток від контролю (РОС) порівняно із середовищем-носієм.

На фігурі 50с показаний ефект обробки за допомогою MEKі щодо росту пухлини з плином часу, котрий був виміряний у мишей, що несуть пухлину CT-26 KRAS p.G12C. Дані являють собою середнє значення об'єму пухлини $\pm$ SEM (n = 10/група).

На фігурі 50d показані об'єми пухлин CT-26 KRAS p.G12C у мишей, які ці пухлини несуть, що були протягом чотирьох днів оброблені одним із середовища-носія, AMG 510, антитіла до PD-1, AMG 510 плюс антитіло до PD-1 або MEKі. Дані являють собою середнє значення об'єму пухлини $\pm$ SEM (n = 8/група).

На фігурі 50e показана PHK, яка була виділена з пухлин CT-26 KRAS p.G12C через два дні обробки. Експресію генів і бали розраховували за допомогою технології NanoString (n = 5/група).

На фігурі 50f показана експресія на клітинній поверхні антигенів MHC класу I (H-2D^d та H-2L^d) на клітинах CT-26 KRAS p.G12C після 24-годинної обробки за допомогою AMG 510 за присутності або відсутності IFN γ , виміряна за допомогою проточної цитометрії.

На фігурі 50g показані криві зростання у мишей Balb/c із пухлинами або CT-26, або CT-26 KRAS p.G12C.

На фігурі 50h показане кількісне визначення транскрипту CXCL10 або CXCL11, а також білка IP-10, який підлягає секреції, після 24-годинної обробки батьківських клітин CT-26 або CT-26 KRAS p.G12C за допомогою AMG 510 або MEKі.

На фігурі 50i показана експресія на клітинній поверхні антигенів MHC класу I (HLA, H-2D^d та H-2K^d) на клітинах CT-26 KRAS p.G12C після 24-годинної обробки за допомогою SW-1573, після 48-годинної обробки за допомогою MIA PaCa-2 і після 48-годинної обробки за допомогою AMG 510 за присутності або відсутності IFN γ , виміряна за допомогою проточної цитометрії.

На фігурах 50a, b, c та e * P<0,05 відповідно до тесту Тьюкі щодо контролю із середовищем-носієм; NS позначає собою відсутність значущості; *** P<0,001 відповідно до тесту Даннетта порівняно із середовищем-носієм і ****P<0,0001 відповідно до тесту Даннетта порівняно з контролем із середовищем-носієм.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У даному винаході передбачена комбінована терапія, яка включає інгібітор KRAS^{G12C} та один або декілька додаткових фармацевтично активних засобів, зокрема, для лікування видів раку. Даний винахід також стосується фармацевтичних композицій, які містять інгібітор KRAS^{G12C} та один або декілька додаткових фармацевтично активних засобів, для лікування видів раку. Сполуки, розкриті у даному документі, включають усі фармацевтично прийнятні мічені ізотопами сполуки, при цьому один або декілька атомів сполук, розкритих у даному документі, замінені атомами, що мають таке ж атомне число, але атомну масу або масове число, відмінні від атомної маси або масового числа, зазвичай виявлюваних у природі. Приклади ізоотопів, які можуть бути включені в розкриті сполуки, включають ізотопи водню, вуглецю, азоту, кисню, фосфору, фтору, хлору і йоду, такі як 2H, 3H, 11C, 13C, 14C, 13N, 15N, 15O, 17O, 18O, 31P, 32P, 35S, 18F, 36Cl, 123I і 125I відповідно. Такі мічені радіоактивним ізоотопом сполуки можуть застосовуватися для сприяння визначенню або вимірюванню ефективності сполук за допомогою опису, наприклад, місця здійснення або механізму дії або афінності зв'язування з фармакологічно важливим місцем здійснення дії. Деякі мічені ізотопами сполуки за даним винаходом, наприклад сполуки, в які включений радіоактивний ізоотоп, є застосовними в дослідженнях розподілу лікарського засобу та/або субстрату в тканинах. Радіоактивні ізотопи тритій, тобто 3H, і вуглець-14, тобто 14C, є, зокрема, застосовними для даної мети з урахуванням легкості їх введення і готових засобів для їх виявлення.

Заміщення більш важкими ізотопами, такими як дейтерій, тобто 2H, може надавати деякі терапевтичні переваги, що впливають із більш високої стійкості до інактивації в процесі метаболізму, наприклад збільшений період напіввиведення in vivo або знижені вимоги до дози, та, отже, є більш переважним за деяких обставин.

Заміщення позитронно-активними ізотопами, такими як 11C, 18F, 15O і 13N, може застосовуватися в дослідженнях із використанням позитронно-емісійної топографії (PET) для визначення ступеня зайнятості рецептора субстратом. Мічені ізотопами сполуки зі структурою (I), як правило, можуть бути одержані за допомогою традиційних методик, відомих фахівцям у даній галузі, або за допомогою способів, аналогічних способам, описаним у розділах "Препарати" і "Приклади", як викладено нижче, із застосуванням відповідного міченого ізоотопом реагенту замість неміченого реагенту, використовуваного раніше.

Мічені ізотопами сполуки, розкриті у даному документі, як правило, можуть бути одержані за допомогою традиційних методик, відомих фахівцям у даній галузі, або за допомогою способів, аналогічних способам, описаним у прикладах і схемах, що додаються, із застосуванням відповідного міченого ізоотопом реагенту замість неміченого реагенту, використовуваного раніше.

Деякі зі сполук, розкритих у даному документі, можуть існувати у вигляді стереоізомерів (тобто ізомерів, які відрізняються лише просторовим розташуванням атомів), включаючи оптичні ізомери і конформаційні ізомери (або конформери). Сполуки, розкриті у даному документі, включають усі стереоізомери як у вигляді чистих препаратів окремих стереоізомерів, так і у вигляді збагачених препаратів кожного стереоізомеру, і як рацемічні суміші таких стереоізомерів, так і окремі діастереомери й енантіомери, які можуть бути розділені згідно зі способами, які відомі фахівцям у даній галузі. Окрім того, сполуки, розкриті у даному документі, включають усі таутомерні форми сполук.

Деякі зі сполук, розкритих у даному документі, можуть існувати у вигляді атропоізомерів, які є конформаційними стереоізомерами, що виникають, коли обертання довкола одинарного зв'язку в молекулі перешкоджається або сильно сповільнюється в результаті стеричних взаємодій з іншими частинами молекули. Сполуки, розкриті у даному документі, включають усі атропоізомери як у вигляді чистих препаратів окремих атропоізомерів, так і у вигляді збагачених препаратів кожного атропоізомеру або неспецифічну суміш кожного атропоізомеру. У тих випадках, коли обертальний бар'єр довкола одинарного зв'язку досить високий, і взаємоперетворення між конформаціями є достатньо повільним, то можуть допускатися розділення і виділення ізомерних видів молекул. Поділ та виділення ізомерних видів молекул відповідно позначається добре відомими й загальноприйнятими символами "M" або "P".

В іншому варіанті здійснення такі сполуки можуть використовуватися як проміжні сполуки в способі одержання сполук у даній заявці.

В іншому варіанті здійснення такі сполуки можуть перебувати у формі фармацевтично прийнятної солі й у фармацевтичному складі з фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною.

Також у даному документі передбачені фармацевтичні композиції, які містять сполуку, розкриту в даному документі, разом із фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною, такою як, наприклад, розріджувач або носій. Сполуки та фармацевтичні композиції, придатні для застосування у даному винаході, передбачають такі, де сполука може бути введена в ефективній кількості для досягнення свого призначення. Введення сполуки описане більш докладно нижче.

В іншому варіанті здійснення такі сполуки можуть використовуватися як проміжні сполуки в способі одержання сполук у даній заявці.

В іншому варіанті здійснення такі сполуки можуть перебувати у формі фармацевтично прийнятної солі й у фармацевтичному складі з фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною.

Також у даному документі передбачені фармацевтичні композиції, які містять сполуку, розкриту в даному документі, разом із фармацевтично прийнятною допоміжною речовиною, такою як, наприклад, розріджувач або носій. Сполуки та фармацевтичні композиції, придатні для застосування у даному винаході, передбачають такі, де сполука може бути введена в ефективній кількості для досягнення свого призначення. Введення сполуки описане більш докладно нижче.

Придатні фармацевтичні складки можуть бути визначені фахівцем у даній галузі техніки залежно від шляху введення та необхідної дози. Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1435-712 (18th ed., Mack Publishing Co, Істон, Пенсильванія, 1990 р.). Складки можуть впливати на фізичний стан, стабільність, швидкість *in vivo* вивільнення та швидкість *in vivo* виведення введених засобів. Залежно від шляху введення придатна доза може бути розрахована відповідно до ваги тіла, площі поверхні тіла або розміру органів. Фахівці в даній галузі техніки зазвичай проводять подальше уточнення розрахунків, необхідних для визначення відповідної лікувальної дози, без зайвих експериментів, особливо з урахуванням інформації про дозу та аналізів, розкритих у даному документі, а також фармакокінетичних даних, які можна одержати в клінічних випробуваннях на тваринах або людях.

Вирази "фармацевтично прийнятний" або "фармакологічно прийнятний" означають молекулярні речовини та композиції, які не спричиняють побічних, алергічних або інших несприятливих реакцій під час введення тварині або людині. Застосовуваний у даному документі термін "фармацевтично прийнятний" включає всі можливі розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні та протигрибкові засоби, ізотонічні засоби та засоби, що сповільнюють абсорбцію, тощо. Застосування таких допоміжних речовин для фармацевтично активних речовин є загальновідомим у рівні техніки. За винятком випадків, коли будь-які традиційні середовища або засіб несумісні з терапевтичними композиціями, передбачається їх застосування в терапевтичних композиціях. Додаткові активні інгредієнти також можуть бути включені в композиції. В ілюстративних варіантах здійснення склад може містити суху кукурудзяну патоку, високоолеїнову сафлорову олію, кокосову олію, соєву олію, L-лейцин, трьохосновний фосфат кальцію, L-тирозин, L-пролін, L-лізину ацетат, DATEM (емульгатор), L-глутамін, L-валін, двохосновний фосфат калію, L-ізолейцин, L-аргінін, L-аланін, гліцин, L-аспарагіну моногідрат, L-серин, цитрат калію, L-треонін, цитрат натрію, хлорид магнію, L-гістидин, L-метіонін, аскорбінову кислоту, карбонат кальцію, L-глутамінову кислоту, L-цистину дигідрохлорид, L-триптофан, L-аспарагінову кислоту, холінхлорид, таурин, м-інозит, сульфат двовалентного заліза, аскорбілпальмітат, сульфат цинку, L-карнітин, альфа-токоферилацетат, хлорид натрію, ніацинамід,

змішані токофероли, пантотенат кальцію, сульфат двовалентної міді, тіамінхлориду гідрохлорид, вітаміну А пальмітат, сульфат марганцю, рибофлавін, піридоксину гідрохлорид, фолієву кислоту, бета-каротин, йодид калію, філохінон, біотин, селенат натрію, хлорид хрому, молібдат натрію, вітамін D3 та ціанокобаламін.

Сполука може бути присутньою у фармацевтичній композиції у вигляді фармацевтично прийнятної солі. Використовуваний у даному документі вираз "фармацевтично прийнятні солі" включає, наприклад, солі приєднання основи та солі приєднання кислоти.

Фармацевтично прийнятні солі приєднання основи можуть бути утворені за допомогою металів або амінів, таких як лужні та лужноземельні метали або органічні аміни. Фармацевтично прийнятні солі сполук також можуть бути одержані за допомогою фармацевтично прийнятного катіону. Придатні фармацевтично прийнятні катіони є загальновідомими фахівцям у даній галузі техніки та включають катіони лужного металу, лужноземельного металу, амонію та катіони четвертинного амонію. Також можливим є застосування карбонатів або гідрокарбонатів. Приклади металів, застосовуваних як катіони, являють собою натрій, калій, магній, амоній, кальцій або тривалентне залізо тощо. Приклади придатних амінів включають ізопропіламін, триметиламін, гістидин, N,N'-добензилетилендіамін, хлорпрокаїн, холін, діетаноламін, дициклогексиламін, етилендіамін, N-метилглюкамін та прокаїн.

Фармацевтично прийнятні солі приєднання кислоти включають солі неорганічних або органічних кислот. Приклади придатних солей приєднання кислоти включають гідрохлориди, формиати, ацетати, цитрати, саліцилати, нітрати, фосфати. Інші придатні фармацевтично прийнятні солі є загальновідомими фахівцям у даній галузі техніки та включають, наприклад, солі, утворені за допомогою мурашиної, оцтової, лимонної, щавлевої, винної або мигдальної кислот, за допомогою хлористоводневої кислоти, бромистоводневої кислоти, сірчаної кислоти або фосфорної кислоти; за допомогою органічних карбонових, сульфонових, сульфо- або фосфокислот або N-заміщених сульфамінових кислот, наприклад, оцтової кислоти, трифтороцтової кислоти (TFA), пропіонової кислоти, гліколевої кислоти, бурштинової кислоти, малеїнової кислоти, гідроксималеїнової кислоти, метилмалеїнової кислоти, фумарової кислоти, яблучної кислоти, винної кислоти, молочної кислоти, щавлевої кислоти, глюконової кислоти, глюкарової кислоти, глюкуронової кислоти, лимонної кислоти, бензойної кислоти, коричної кислоти, мигдальної кислоти, саліцилової кислоти, 4-аміносаліцилової кислоти, 2-феноксibenзойної кислоти, 2-ацетоксibenзойної кислоти, ембонової кислоти, нікотинової кислоти або ізонікотинової кислоти та за допомогою амінокислот, таких як 20 альфа-амінокислот, залучених у синтез білків у природі, наприклад, глутамінова кислота або аспарагінова кислота, а також за допомогою фенілоцтової кислоти, метансульфонової кислоти, етансульфонової кислоти, 2-гідроксietансульфонової кислоти, етан-1,2-дисульфонової кислоти, бензолсульфонової кислоти, 4-метилбензолсульфонової кислоти, нафталін-2-сульфонової кислоти, нафталін-1,5-дисульфонової кислоти, 2- або 3-фосфогліцерату, глюкозо-6-фосфату, N-циклогексилсульфамінової кислоти (з утворенням цикламатів) або за допомогою інших кислотних органічних сполук, таких як аскорбінова кислота.

Фармацевтичні композиції, що містять сполуки, розкриті в даному документі, можуть бути виготовлені традиційним способом, наприклад, за допомогою способів традиційного змішування, розчинення, гранулювання, виготовлення драже, розтирання, емульгування, інкапсуляції, захоплення або ліофілізації. Належний склад залежить від вибраного шляху введення.

Придатні композиції для перорального введення можуть бути легко складені шляхом об'єднання сполуки, розкритої в даному документі, із фармацевтично прийнятними допоміжними речовинами, такими як носії, загальновідомі у рівні техніки. Такі допоміжні речовини та носії забезпечують можливість складання сполук за даним винаходом у вигляді таблеток, пігулок, драже, капсул, рідин, гелів, сиропів, зависей, суспензій тощо для перорального прийому пацієнтом, який підлягає лікуванню. Фармацевтичні препарати для перорального застосування можуть бути одержані шляхом додавання до сполуки, розкритої в даному документі, твердої допоміжної речовини, необов'язково подрібнення одержаної суміші та обробки суміші гранул після додавання за необхідності придатних допоміжних засобів з одержанням таблеток або ядер драже. Придатні допоміжні речовини включають, наприклад, наповнювачі та целюлозні препарати. За необхідності можна додавати речовини для поліпшення розпадання таблеток. Фармацевтично прийнятні інгредієнти є загальновідомими для різних типів складів і можуть являти собою, наприклад, зв'язувальні речовини (наприклад, природні або синтетичні полімери), змашувальні речовини, поверхнево-активні речовини, підсолоджувачі та ароматизатори, матеріали для нанесення покриття, консерванти, барвники, загусники, допоміжні речовини, протимікробні засоби, антиоксиданти та носії для різних типів складів.

Якщо терапевтично ефективну кількість сполуки, розкритої в даному документі, вводять перорально, то композиція, як правило, представлена у формі твердого складу (наприклад, таблетки, капсули, пігулки, порошку або пастилки) або рідкого складу (наприклад, водної суспензії, розчину, настойки або сиропу).

У випадку введення у формі таблетки композиція може додатково містити функціональну тверду речовину та/або твердий носій, такий як желатин або допоміжний засіб. Таблетка, капсула та порошок

можуть містити від приблизно 1 до приблизно 95 % сполуки та переважно від приблизно 15 до приблизно 90 % сполуки.

У випадку введення у формі рідини або суспензії можна додавати функціональну рідину та/або рідкий носій, такий як вода, вуглеводневий носій або масла тваринного чи рослинного походження. Рідка форма композиції може додатково містити фізіологічний сольовий розчин, розчини цукрових спиртів, розчини декстрази чи інших сахаридів або гліколі. У випадку введення у формі рідини або суспензії композиція може містити від приблизно 0,5 до приблизно 90 % за вагою сполуки, розкритої в даному документі, і переважно від приблизно 1 до приблизно 50 % сполуки, розкритої в даному документі. В одному варіанті здійснення передбачено, що рідкий носій є неводним або по суті неводним. Композиція, призначена для введення у формі рідини, може постачатися у вигляді швидко розчинного твердого складу для розчинення або суспензії безпосередньо перед введенням.

Якщо терапевтично ефективну кількість сполуки, розкритої в даному документі, вводять шляхом внутрішньовенної, шкірної або підшкірної ін'єкції, композиція представлена у формі апірогенного прийнятного для парентерального введення водного розчину. Одержання таких прийнятних для парентерального введення розчинів, що мають відповідні рН, ізотонічність, стабільність тощо, є в межах кваліфікації фахівця в даній галузі техніки. Переважна композиція для внутрішньовенної, шкірної або підшкірної ін'єкції зазвичай містить додатково до сполуки, розкритої в даному документі, ізотонічне середовище-носіє. Такі композиції можуть бути одержані для введення у вигляді розчинів вільної основи або фармакологічно прийнятних солей у воді, відповідним чином змішаних із поверхнево-активною речовиною, такою як гідроксипропілцелюлоза. Дисперсії також можна одержувати в гліцерині, в рідких поліетиленгліколях та їх сумішах, а також у маслах. За звичайних умов зберігання та застосування такі препарати можуть необов'язково містити консервант для запобігання росту мікроорганізмів.

Ін'єкційні композиції можуть включати стерильні водні розчини, суспензії або дисперсії та стерильні порошки для нагального одержання стерильних ін'єкційних розчинів, суспензій або дисперсій. У всіх варіантах здійснення форма повинна бути стерильною та повинна бути такою текучою, щоб її можна було легко вводити шприцом. Вона повинна бути стійкою за умов виготовлення і зберігання та повинна протистояти забруднювальній дії мікроорганізмів, таких як бактерії та гриби, внаслідок необов'язкового включення консерванту. Носій може являти собою розчинник або дисперсійне середовище, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь та рідкий поліетиленгліколь тощо), їх придатні суміші, а також рослинні олії. В одному варіанті здійснення передбачено, що носій є не водним або по суті не водним. Належна плинність може підтримуватися, наприклад, шляхом застосування покриття, такого як лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру частинок сполуки у варіанті здійснення у вигляді дисперсії та шляхом застосування поверхнево-активних речовин. Запобігання впливу мікроорганізмів можна забезпечувати різними антибактеріальними й протигрибковими засобами, наприклад, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбіною кислотою, тіомерсалом тощо. У багатьох варіантах здійснення буде переважним включення ізотонічних засобів, наприклад, цукрів або хлориду натрію. Пролонговану абсорбцію ін'єкційних композицій можна забезпечувати шляхом застосування в композиціях засобів, що сповільнюють абсорбцію, наприклад, моностеарату алюмінію та желатину.

Стерильні ін'єкційні розчини одержують шляхом включення активних сполук у необхідній кількості у відповідний розчинник з різними іншими інгредієнтами, переліченими вище, із подальшою стерилізацією шляхом фільтрації. Зазвичай дисперсії одержують шляхом включення різних стерилізованих активних інгредієнтів у стерильне середовище-носіє, яке містить основне дисперсійне середовище та інші необхідні інгредієнти з перелічених вище. У варіанті здійснення, що являє собою стерильні порошки, призначені для одержання стерильних ін'єкційних розчинів, переважні способи одержання являють собою методики вакуумного висушування та сублімаційного висушування, які забезпечують одержання порошку активного інгредієнта плюс будь-якого додаткового необхідного інгредієнта з його попередньо стерильно відфільтрованого розчину.

Також можна одержувати склади з повільним вивільненням або уповільненим вивільненням для досягнення контрольованого вивільнення активної сполуки в контакт з рідинами організму в шлунково-кишковому тракті та для забезпечення по суті постійного та ефективного рівня активної сполуки в плазмі крові. Наприклад, вивільнення може контролюватися одним або декількома з розчинення, дифузії та іонного обміну. Крім того, підхід із повільним вивільненням може підсилювати абсорбцію через насичувані або обмежувальні шляхи у шлунково-кишковому тракті. Наприклад, для даної мети сполука може бути вбудована в полімерну матрицю із полімеру, що біологічно розкладається, водорозчинного полімеру або суміші обох і необов'язково придатних поверхнево-активних речовин. У даному контексті вбудовування може означати включення мікрочастинок у матрицю полімерів. Склади з контрольованим вивільненням також одержують шляхом інкапсуляції диспергованих мікрочастинок або емульгованих мікрокрапель за допомогою відомих технологій дисперсійного або емульсійного покриття.

У випадку введення шляхом інгаляції сполуки за даним винаходом зручно доставляти у формі

подачі розпилюваного аерозолю з упаковок під тиском або за допомогою небулайзера з використанням придатного пропеленту. У варіанті здійснення аерозолю під тиском одиниця дозування може бути визначена шляхом забезпечення клапана для доставки відміряної кількості. Для застосування в інгаляторі або інсуфляторі можуть бути складені капсули та картриджі, наприклад, із желатину, що містять порошкову суміш сполуки та придатної порошкової основи, такої як лактоза або крохмаль.

Сполуки, розкриті в даному документі, можуть бути складені для парентерального введення шляхом ін'єкції (наприклад, шляхом болюсної ін'єкції або безперервної інфузії). Склади для ін'єкції можуть бути представлені в стандартній лікарській формі (наприклад, в ампулах або в багатодозових контейнерах) із доданим консервантом. Композиції можуть набувати форм, таких як суспензії, розчини або емульсії в масляних або водних середовищах-носіях, і можуть містити допоміжні засоби для складання, такі як суспендувальні, стабілізувальні та/або диспергувальні засоби.

Фармацевтичні склади, призначені для парентерального введення, включають водні розчини сполук у водорозчинній формі. Крім того, суспензії сполук можуть бути одержані у вигляді відповідних масляних ін'єкційних суспензій. Придатні ліпофільні розчинники або середовища-носії включають жирні масла або синтетичні естери жирної кислоти. Водні ін'єкційні суспензії можуть містити речовини, які підвищують в'язкість суспензії. Необов'язково суспензія також може містити придатні стабілізатори або засоби, які підвищують розчинність сполук і забезпечують одержання висококонцентрованих розчинів. Альтернативно композиція за даним винаходом може бути представлена у формі порошку, призначеного для розбавлення придатним середовищем-носієм (наприклад, стерильною апірогенною водою) перед застосуванням.

Сполуки, розкриті в даному документі, також можуть бути складені в композиції для ректального введення, такі як супозиторії або утримувальні клізми (наприклад, такі, що містять традиційні супозиторні основи). На додаток до складів, описаних раніше, сполуки також можуть бути складені у вигляді депо-препарату. Такі склади тривалої дії можна вводити шляхом імплантації (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або шляхом внутрішньом'язової ін'єкції. Так, наприклад, сполуки можуть бути складені із застосуванням придатних полімерних або гідрофобних матеріалів (наприклад, у вигляді емульсії в прийнятному маслі) або іонообмінних смол або у вигляді помірно розчинних похідних, наприклад, у вигляді помірно розчинної солі.

Зокрема, сполуку, розкриту в даному документі, можна вводити перорально, букально або сублінгвально у формі таблеток, що містять допоміжні речовини, такі як крохмаль або лактоза, або в капсулах або вагінальних супозиторіях, або окремо, або в суміші з допоміжними речовинами, або у формі настоек або суспензій, що містять ароматизатори або барвники. Такі рідкі препарати можуть бути одержані із застосуванням фармацевтично прийнятних добавок, таких як суспендувальні засоби. Сполуку також можна вводити парентерально, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно або інтракоронарно. Для парентерального введення сполуку найкраще застосовувати у формі стерильного водного розчину, який може містити інші речовини, наприклад, солі або цукрові спирти, такі як маніт або глюкоза, для надання розчину ізотонічності з кров'ю.

Для ветеринарного застосування сполуку, розкриту в даному документі, вводять у вигляді придатного прийнятного складу відповідно до звичайної ветеринарної практики. Ветеринарний лікар може легко визначити режим дозування та шлях введення, який є найбільш відповідним для конкретної тварини.

У деяких варіантах здійснення всі необхідні компоненти для лікування порушення, пов'язаного з KRAS, із застосуванням сполуки, розкритої в даному документі, або окремо, або в комбінації з іншим засобом, або для втручання, традиційно виконуваного для лікування такого захворювання, можуть бути упаковані в набір. Конкретно, у даному винаході передбачений набір для застосування у разі терапевтичного втручання під час захворювання, що містить упакований комплект лікарських препаратів, які включають сполуку, розкриту в даному документі, а також буфери та інші компоненти, призначені для одержання форм вказаних лікарських препаратів з можливістю доставки, та/або пристрої для доставки таких лікарських препаратів, та/або будь-які засоби, які застосовують у комбінованій терапії зі сполукою, розкритою у даному документі, та/або інструкції для лікування захворювання, що знаходяться в упаковці з лікарськими препаратами. Інструкції можуть бути зафіксовані на будь-якому матеріальному носії, такому як друкований папір або зчитуваний комп'ютером магнітний або оптичний носій, або інструкції можуть надаватися у вигляді посилання на дистанційне комп'ютерне джерело даних, таке як сторінка всесвітньої комп'ютерної мережі, доступна через Інтернет.

"Терапевтично ефективна кількість" означає кількість, ефективну для лікування або попередження розвитку або для послаблення наявних симптомів у суб'єкта, лікування якого здійснюють. Визначення ефективних кількостей перебуває в межах компетенції фахівців у даній галузі техніки, особливо з огляду на докладне розкриття, представлене в даному документі. Зазвичай "терапевтично ефективна доза" означає таку кількість сполуки, яка забезпечує досягнення необхідного ефекту. Наприклад, в одному переважному варіанті здійснення терапевтично ефективна кількість сполуки, розкритої в

даному документі, знижує активність KRAS на щонайменше 5 % порівняно з контролем, на щонайменше 10 %, щонайменше 15 %, щонайменше 20 %, щонайменше 25 %, щонайменше 30 %, щонайменше 35 %, щонайменше 40 %, щонайменше 45 %, щонайменше 50 %, щонайменше 55 %, щонайменше 60 %, щонайменше 65 %, щонайменше 70 %, щонайменше 75 %, щонайменше 80 %, щонайменше 85 % або на щонайменше 90 %.

Кількість введеної сполуки може залежати від суб'єкта, лікування якого здійснюють, від віку, стану здоров'я, статі та ваги суб'єкта, виду одночасного лікування (якщо воно застосовується), тяжкості захворювання, характеру необхідного ефекту, способу і частоти лікування та рішення лікаря, що здійснює лікування. Частота введення доз також може залежати від фармакодинамічних ефектів, пов'язаних із тиском кисню в артеріальній крові. Однак найбільш переважна доза може бути адаптована щодо окремого суб'єкта, як це зрозуміло та може бути визначено фахівцем у даній галузі техніки без зайвих експериментів. Зазвичай це передбачає коригування стандартної дози (наприклад, зниження дози, якщо пацієнт має низьку вагу тіла).

Хоча індивідуальні потреби варіюються, визначення оптимальних діапазонів ефективних кількостей сполуки знаходиться в межах кваліфікації фахівців у даній галузі техніки. Для введення людині під час радикального або профілактичного лікування станів і порушень, ідентифікованих у даному документі, наприклад, типові дози сполук за даним винаходом можуть становити від приблизно 0,05 мг/кг/доба до приблизно 50 мг/кг/доба, наприклад, щонайменше 0,05 мг/кг, щонайменше 0,08 мг/кг, щонайменше 0,1 мг/кг, щонайменше 0,2 мг/кг, щонайменше 0,3 мг/кг, щонайменше 0,4 мг/кг або щонайменше 0,5 мг/кг і переважно 50 мг/кг або менше, 40 мг/кг або менше, 30 мг/кг або менше, 20 мг/кг або менше або 10 мг/кг або менше, що може становити, наприклад, від приблизно 2,5 мг/доба (0,5 мг/кг x 5 кг) до приблизно 5000 мг/доба (50 мг/кг x 100 кг). Наприклад, дози сполук можуть становити від приблизно 0,1 мг/кг/доба до приблизно 50 мг/кг/доба, від приблизно 0,05 мг/кг/доба до приблизно 10 мг/кг/доба, від приблизно 0,05 мг/кг/доба до приблизно 5 мг/кг/доба, від приблизно 0,05 мг/кг/доба до приблизно 3 мг/кг/доба, від приблизно 0,07 мг/кг/доба до приблизно 3 мг/кг/доба, від приблизно 0,09 мг/кг/доба до приблизно 3 мг/кг/доба, від приблизно 0,05 мг/кг/доба до приблизно 0,1 мг/кг/доба, від приблизно 0,1 мг/кг/доба до приблизно 1 мг/кг/доба, від приблизно 1 мг/кг/доба до приблизно 10 мг/кг/доба, від приблизно 1 мг/кг/доба до приблизно 5 мг/кг/доба, від приблизно 1 мг/кг/доба до приблизно 3 мг/кг/доба, від приблизно 1 мг/доба до приблизно 1000 мг/доба, від приблизно 20 мг/доба до приблизно 750 мг/доба, від приблизно 3 мг/доба до приблизно 500 мг/доба, від приблизно 5 мг/доба до приблизно 250 мг/доба, від приблизно 10 мг/доба до приблизно 100 мг/доба, від приблизно 3 мг/доба до приблизно 10 мг/доба або від приблизно 100 мг/доба до приблизно 250 мг/доба. Такі дози можуть бути введені в однократній дозі, або вони можуть бути поділені на кілька доз.

СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРІВ KRAS^{G12C}

У даному винаході передбачений спосіб інгібування RAS-опосередкованої сигнальної системи клітини, що передбачає приведення клітини в контакт із ефективною кількістю однієї або декількох сполук, розкритих у даному документі. Інгібування RAS-опосередкованої передачі сигналу може бути оцінене та продемонстроване великою кількістю способів, відомих із рівня техніки. Необмежувальні приклади включають демонстрацію (a) зниження GTPазної активності RAS; (b) зниження афінності зв'язування GTP або підвищення афінності зв'язування GDP; (c) підвищення Koff GTP або зниження Koff GDP; (d) зниження рівнів молекул, що опосередковують передачу сигналу, розташованих нижче у шляху RAS, наприклад, зниження рівнів pMEK, pERK або pAKT та/або (e) зниження ступеня зв'язування комплексу RAS з розташованими нижче в шляху сигнальними молекулами, у тому числі без обмеження Raf. Набори та комерційно доступні аналізи можуть бути використані для визначення одного або декількох з вищевказаних.

У даному винаході також передбачені способи застосування сполук або фармацевтичних композицій за даним винаходом для лікування хворобливих станів, у тому числі без обмеження станів, пов'язаних з мутацією G12C KRAS, HRAS або NRAS (наприклад, раку).

У деяких варіантах здійснення передбачений спосіб лікування раку, при цьому спосіб передбачає введення ефективної кількості будь-якої з вищевказаних фармацевтичних композицій, що містять сполуку, розкриту в даному документі, суб'єкту, який цього потребує. У деяких варіантах здійснення рак опосередкований мутацією G12C KRAS, HRAS або NRAS. У різних варіантах здійснення рак являє собою рак підшлункової залози, колоректальний рак або рак легені. У деяких варіантах здійснення рак являє собою рак жовчного міхура, рак щитоподібної залози та рак жовчних проток.

У деяких варіантах здійснення у даному винаході передбачений спосіб лікування порушення у суб'єкта, який цього потребує, при цьому вказаний спосіб передбачає визначення того, чи є в суб'єкта мутація G12C KRAS, HRAS або NRAS, і, якщо в суб'єкта визначена наявність мутації G12C KRAS, HRAS або NRAS, то введення суб'єкту терапевтично ефективної дози щонайменше однієї сполуки, розкритої в даному документі, або її фармацевтично прийнятної солі.

Розкриті сполуки інгібують незалежний від якірних білків ріст клітин і, отже, мають потенціал до інгібування метастазів пухлин. Відповідно, в іншому варіанті здійснення у даному винаході

передбачений спосіб інгібування метастазів пухлин, причому спосіб передбачає введення ефективної кількості сполуки, розкритої в даному документі.

Мутації G12C KRAS, HRAS або NRAS також були ідентифіковані у разі гемобластозів (наприклад, видів раку, які впливають на кров, кістковий мозок та/або лімфатичні вузли). Відповідно, деякі варіанти здійснення спрямовані на введення розкритих сполук (наприклад, у формі фармацевтичної композиції) пацієнту, що потребує лікування гемобластозу. Такі форми раку включають без обмеження лейкози та лімфоми. Наприклад, розкриті в даному документі сполуки можуть застосовуватись для лікування захворювань, таких як гострий лімфобластний лейкоз (ALL), гострий мієлогенний лейкоз (AML), хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL), лімфома з малих лімфоцитів (SLL), хронічний мієлолейкоз (CML), гострий моноцитарний лейкоз (AMoL) та/або інші види лейкозу. В інших варіантах здійснення сполуки є придатними для лікування лімфом, таких як усі підтипи лімфоми Ходжкіна або неходжкінських лімфом. У різних варіантах здійснення сполуки є придатними для лікування злоякісних новоутворень із плазматичних клітин, таких як множинна мієлома, лімфома із клітин мантийної зони й макроглобулінемія Вальденстрьома.

Визначення того, чи передбачає пухлина або рак мутацію G12C KRAS, HRAS або NRAS, може бути виконане шляхом оцінки нуклеотидної послідовності, що кодує білок KRAS, HRAS або NRAS, шляхом оцінки амінокислотної послідовності білка KRAS, HRAS або NRAS або шляхом оцінки характеристик передбачуваного мутантного білка KRAS, HRAS або NRAS. Послідовність дикого типу KRAS, HRAS або NRAS людини відома в рівні техніки (наприклад, № доступу NP203524).

Способи виявлення мутації в нуклеотидній послідовності KRAS, HRAS або NRAS відомі фахівцям у даній галузі техніки. Такі способи включають без обмеження аналізи, у яких використовується полімеразна ланцюгова реакція-поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів (PCR-RFLP), аналізи, у яких використовується полімеразна ланцюгова реакція-одноланцюговий конформаційний поліморфізм (PCR-SSCP), аналізи, в яких використовується ПЛР у режимі реального часу, секвенування продуктів ПЛР, аналізи, у яких використовується проведена щодо мутантного алеля специфічна ПЛР-ампліфікація (MASA), пряме секвенування, реакції подовження праймера, електрофорез, лігування олігонуклеотидних зондів, гібридизаційні аналізи, аналізи TaqMan, SNP-генотипування, аналізи плавлення з високою роздільною здатністю та мікроматричні аналізи. У деяких варіантах здійснення зразки оцінюють щодо мутацій G12C KRAS, HRAS або NRAS за допомогою ПЛР у режимі реального часу. Під час ПЛР у режимі реального часу застосовують флуоресцентні зонди, специфічні щодо мутацій G12C KRAS, HRAS або NRAS. Коли присутня мутація, зонд зв'язується, та виявляється флуоресценція. У деяких варіантах здійснення мутацію G12C KRAS, HRAS або NRAS ідентифікують із застосуванням способу прямого секвенування специфічних ділянок (наприклад, екзон 2 та/або екзон 3) у гені KRAS, HRAS або NRAS. Дана методика дозволить ідентифікувати всі можливі мутації у секвенованій ділянці.

Способи виявлення мутації в білку KRAS, HRAS або NRAS відомі фахівцям у даній галузі техніки. Такі способи включають без обмеження виявлення мутантних KRAS, HRAS або NRAS із застосуванням зв'язувального засобу (наприклад, антитіла), специфічного щодо мутантного білка, електрофорез білків і вестерн-блотинг, а також пряме секвенування пептиду.

У способах визначення того, чи передбачає пухлина або рак мутацію G12C KRAS, HRAS або NRAS, може застосовуватись ряд зразків. У деяких варіантах здійснення зразок відбирають у суб'єкта, що має пухлину або рак. У деяких варіантах здійснення зразок являє собою свіжий зразок пухлини/раку. У деяких варіантах здійснення зразок являє собою заморожений зразок пухлини/раку. У деяких варіантах здійснення зразок являє собою фіксований у формаліні зразок, залитий у парафін. У деяких варіантах здійснення зразок являє собою зразок пухлинних клітин, що циркулюють (СТС). У деяких варіантах здійснення зразок переробляється на клітинний лізат. У деяких варіантах здійснення зразок переробляється на ДНК або РНК.

Даний винахід також стосується способу лікування гіперпроліферативного порушення у ссавця, який передбачає введення вказаному ссавцю терапевтично ефективної кількості сполуки, розкритої в даному документі, або її фармацевтично прийнятної солі. У деяких варіантах здійснення вказаний спосіб стосується лікування суб'єкта, який страждає на рак, такий як гострий мієлоїдний лейкоз, рак у підлітків, карцинома надниркової залози в дитячому віці, види раку, пов'язані зі СНІДом (наприклад, лімфома та саркома Капоші), рак анального каналу, рак апендикса, види астроцитом, атипічний тератоїд, базально-клітинна карцинома, рак жовчних проток, рак сечового міхура, рак кістки, гліома стовбура головного мозку, пухлина головного мозку, рак молочної залози, бронхіальні пухлини, лімфома Беркітта, карциноїдна пухлина, атипічний тератоїд, ембріональні пухлини, ембріонально-клітинна пухлина, первинна лімфома, рак шийки матки, види раку в дитячому віці, хордома, пухлини серця, хронічний лімфоцитарний лейкоз (CLL), хронічний мієлолейкоз (CML), хронічні мієлопроліферативні порушення, рак товстого кишечника, колоректальний рак, краніофарингіома, шкірна Т-клітинна лімфома, позапечінкова протокова карцинома in situ (DCIS), ембріональні пухлини, рак CNS, рак ендометрію, епіндиміома, рак стравоходу, естезіонейробластома, саркома Юінга, позачерпна ембріонально-клітинна пухлина, позагонадна ембріонально-клітинна пухлина, рак ока,

фіброзна гістіоцитома кістки, рак жовчного міхура, шлунковий рак, карциноїдна пухлина ШКТ, шлунково-кишкові стромальні пухлини (GIST), ембріонально-клітинна пухлина, гестаційна трофобластична пухлина, волосатоклітинний лейкоз, рак голови та шиї, рак серця, рак печінки, лімфома Ходжкіна, гіпофарингеальний рак, внутрішньоочна меланома, пухлини острівців підшлункової залози, нейроендокринні пухлини підшлункової залози, рак нирки, рак гортані, рак губи і ротової порожнини, рак печінки, лобулярна карцинома *in situ* (LCIS), рак легені, лімфома, метастатичний плоскоклітинний рак шиї із прихованим первинним захворюванням, серединна карцинома, рак ротової порожнини, синдроми множинних ендокринних неоплазій, множинна міелома/неоплазія плазматичних клітин, фунгоїдний мікоз, мієлодиспластичні синдроми, мієлодиспластичні/мієлопроліферативні неоплазії, множинна міелома, карцинома із клітин Меркеля, злоякісна мезотеліома, злоякісна фіброзна гістіоцитома кістки й остеосаркома, рак порожнини носа й навколоносових пазух, рак носоглотки, нейробластома, неходжкінська лімфома, недрібноклітинний рак легені (NSCLC), рак порожнини рота, рак губ і ротової порожнини, рак ротоглотки, рак яєчників, рак підшлункової залози, папіломатоз, парагангліома, рак навколоносових пазух і порожнини носа, рак навколощитоподібної залози, рак полового члена, рак глотки, плевропульмональна бластома, первинна лімфома центральної нервової системи (ЦНС), рак передміхурової залози, рак прямої кишки, перехідно-клітинний рак, ретинобластома, рабдіоміосаркома, рак слинної залози, рак шкіри, рак шлунка (шлунковий рак), дрібноклітинний рак легені, рак тонкого кишечника, саркома м'яких тканин, Т-клітинна лімфома, рак яєчка, рак горла, тимомома й рак виличкової залози, рак щитоподібної залози, перехідно-клітинний рак ниркової балії й сечоводу, трофобластична пухлина, незвичайні види раку в дітей, рак сечівника, саркома матки, рак піхви, рак вульви або вірус-індукований рак. У деяких варіантах здійснення вказаний спосіб стосується лікування неракового гіперпроліферативного порушення, такого як доброякісна гіперплазія шкіри (наприклад, псоріаз), рестеноз або порушення, пов'язане з передміхуровою залозою (наприклад, доброякісна гіпертрофія передміхурової залози (BPH)).

У деяких варіантах здійснення способи лікування спрямовані на лікування видів раку легень, при цьому способи передбачають введення ефективної кількості будь-якої з вищеописаних сполук (або фармацевтичної композиції, що їх містить) суб'єкту, який цього потребує. У деяких варіантах здійснення рак легені являє собою недрібноклітинну карциному легені (NSCLC), наприклад, аденокарциному, плоскоклітинну карциному легені або великоклітинну карциному легені. У деяких варіантах здійснення рак легені являє собою дрібноклітинну карциному легені. Інші види раку легені, які можна лікувати за допомогою розкритих сполук, включають без обмеження залозисті пухлини, карциноїдні пухлини та недиференційовані види карцином.

У даному винаході додатково передбачені способи модулювання активності G12C-мутантного білка KRAS, HRAS або NRAS, здійснювані шляхом приведення білка в контакт із ефективною кількістю сполуки за даним винаходом. Модуляція може являти собою інгібування або активування активності білка. У деяких варіантах здійснення в даному винаході передбачені способи інгібування активності білка, здійснювані шляхом приведення G12C-мутантного білка KRAS, HRAS або NRAS у контакт з ефективною кількістю сполуки за даним винаходом у розчині. У деяких варіантах здійснення в даному винаході передбачені способи інгібування активності G12C-мутантного білка KRAS, HRAS або NRAS, здійснювані шляхом приведення у контакт клітини, тканини або органа, які експресують білок, що становить інтерес. У деяких варіантах здійснення у даному винаході передбачені способи інгібування активності білка у суб'єкта, у тому числі без обмеження у гризунів і ссавців (наприклад, людини), здійснювані шляхом уведення суб'єкту ефективної кількості сполуки за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення відсоток модуляції перевищує 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 %. У деяких варіантах здійснення відсоток інгібування перевищує 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % або 90 %.

У деяких варіантах здійснення у даному винаході передбачені способи інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у клітині, здійснювані шляхом приведення вказаної клітини в контакт зі сполукою за даним винаходом у кількості, достатній для інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у вказаній клітині. У деяких варіантах здійснення у даному винаході передбачені способи інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у тканині, здійснювані шляхом приведення вказаної тканини в контакт зі сполукою за даним винаходом у кількості, достатній для інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у вказаній тканині. У деяких варіантах здійснення у даному винаході передбачені способи інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS в організмі, здійснювані шляхом приведення вказаного організму в контакт зі сполукою за даним винаходом у кількості, достатній для інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у вказаному організмі. У деяких варіантах здійснення у даному винаході передбачені способи інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у тварини, здійснювані шляхом приведення вказаної тварини в контакт зі сполукою за даним винаходом у кількості, достатній для інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у вказаної тварини. У деяких варіантах здійснення у даному винаході передбачені способи інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у ссавця, здійснювані шляхом приведення

вказаного ссавця в контакт зі сполукою за даним винаходом у кількості, достатній для інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у вказаного ссавця. У деяких варіантах здійснення у даному винаході передбачені способи інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у людини, здійснювані шляхом приведення вказаної людини у контакт зі сполукою за даним винаходом у кількості, достатній для інгібування активності G12C KRAS, HRAS або NRAS у вказаної людини. У даному винаході передбачені способи лікування захворювання, опосередкованого активністю G12C KRAS, HRAS або NRAS у суб'єкта, який потребує такого лікування.

Комбінована терапія

У даному винаході також передбачені способи здійснення варіантів комбінованої терапії, в яких застосовуються засіб, про який відомо, що він модулює інші шляхи, або інші компоненти того ж шляху, або навіть набори цільових ферментів, що перекриваються, у комбінації зі сполукою за даним винаходом або її фармацевтично прийнятною сіллю. В одному аспекті така терапія включає без обмеження комбінацію однієї або декількох сполук за даним винаходом з хіміотерапевтичними засобами, терапевтичними антитілами та променевою терапією, призначену для забезпечення синергетичного або адитивного терапевтичного ефекту.

На сьогодні в рівні техніки відомі численні хіміотерапевтичні речовини, та вони можуть застосовуватися в комбінації зі сполуками за даним винаходом. Сполуки або фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть бути використані в комбінації щонайменше з одним або декількома хіміотерапевтичними засобами. У деяких варіантах здійснення хіміотерапевтична речовина вибрана із групи, що складається з інгібіторів мітозу, алкілувальних засобів, антиметаболітів, інтеркалювальних антибіотиків, інгібіторів фактора росту, інгібіторів клітинного циклу, ферментів, інгібіторів топоізомерази, модифікаторів біологічної відповіді, антигормонів, інгібіторів ангіогенезу та антиандрогенів. Необмежувальними прикладами є хіміотерапевтичні засоби, цитотоксичні засоби та непептидні дрібні молекули, такі як Gleeevec® (імаїнібу мезилат), Kyprolis® (карфілзоміб), Velcade® (бортезоміб), Casodex (бікалутамід), Iressa® (гефітініб), Venclexta™ (венетоклас) та Adriamycin™ (докорубіцин), а також носій хіміотерапевтичних засобів. Необмежувальні приклади хіміотерапевтичних засобів включають алкілувальні засоби, такі як тіотепа і циклофосфамід (Cytoxan™); алкілсульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан та піпосульфан; азиридили, такі як бензодопа, карбоквон, метуредопа та уредопа; етиленіміни та метиламеламіни, у тому числі альтретамін, триетиленмеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід та триметилоломеламін; азотисті іприти, такі як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорциклофосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, мехлоретаміну оксиду гідрохлорид, мелфалан, новембіхін, фенестерин, преднімустин, трофосфамід, урациловий іприт; нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, німустин, ранімустин; антибіотики, такі як аклациноміцини, актиноміцин, антраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, каліхемицин, карабіцин, карміноміцин, карцинофілін, Casodex™, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубіцин, епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, мікофенолова кислота, ногаламіцин, олівоміцини, пепломіцин, потфіроміцин, пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімекс, циностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринів, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідинів, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дідеоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолону пропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; інгібітори синтезу гормонів кори наднирників, такі як аміноглютетимід, мітотан, трилостан; компенсатори фолієвої кислоти, такі як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфаміду глікозид; амінолевулінову кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едотраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; елфомітин; еліптинію ацетат; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовину; лентинан; лонідамін; мітогуазон; мітоксантрон; мопідамол; нітракрин; пентостатин; фенамет; пірарубіцин; подофілінову кислоту; 2-етилгідрозид; прокарбазин; PSK; разоксан; сизофіран; спірогерманій; тенуазонову кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриетиламін; уретан; віндезин; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид ("Ara-C"); циклофосфамід; тіотепа; таксани, наприклад паклітаксел та доцетаксел; ретиноєву кислоту; еспераміцини; капецитабін та фармацевтично прийнятні солі, кислоти або похідні будь-якого з наведених вище.

Також як придатні хіміотерапевтичні речовини, що поліпшують стан клітин, включені антигормональні засоби, які виконують функцію регулювання або інгібування дії гормонів на пухлини, такі як антиестрогени, в тому числі, наприклад, тамоксифен (Nolvadex™), ралоксифен, 4(5)-імідазоли, що інгібують ароматазу, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон і тореміфен (фарестон); а також антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід та гозерелін; хлорамбуцил; гемцитабін; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин та карбоплатин; вінбластин; платина; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоміцин С; мітоксантрон; вінкрисдин; вінорелбін; навелбін; новантрон; теніпозид; дауноміцин; аміноптерин;

кселода; ібандронат; камптотецин-11 (CPT-11); інгібітор топоізомерази RFS 2000; диформетилорнітин (DMFO).

За необхідності сполуки або фармацевтичну композицію за даним винаходом можна застосовувати в комбінації із загально призначуваними протипухлинними лікарськими засобами, такими як Herceptin®, Avastin®, Erbitux®, Rituxan®, Taxol®, Arimidex®, Taxotere®, ABVD, авіцин, абаговомаб, акридину карбоксамід, адекватумаб, 17-N-аліламіно-17-деметоксигелданамицин, альфарадин, альвоцидид, 3-амінопіридин-2-карбоксальдегід тіосемікарбазон, амонафід, антрацендіон, імунотоксини до CD22, протипухлинні, антитуморигенні трави, апазиквон, атипримод, азатіопрін, белотекан, бендамустин, BIBW 2992, бірикодар, бросталіцин, бріостатин, бутіонінсульфоксимін, CBV (хіміотерапія), калікулін, неспецифічні протипухлинні засоби клітинного циклу, дихлороцтова кислота, дискодермолід, ельзамітруцин, еноцитабін, епотилон, ерибулін, еверолімус, ексатекан, ексисулід, феругінол, фородезин, фосфестрол, режим хіміотерапії ICE, IT-101, імексон, іміквімод, індокарбазол, ірофулвен, ланіквідар, ларотаксел, леналідомід, локантон, луротекан, мафосфамід, мітозомолід, нафоксидин, надаплатин, олапариб, ортатаксел, PAC-1, екстракт азиміні, піксантрон, інгібітор протеасоми, ребекаміцин, резиквімод, рубітекан, SN-38, саліноспорамід А, сапацитабін, Stanford V, свайнсонін, талапорфін, тариквідар, тегафур-урацил, темодар, тесетаксел, триплатини тетранітрат, трис(2-хлоретил)амін, троксацитабін, урамустин, вадимезан, вінфлунін, ZD6126 або зосуквідар.

Даний винахід додатково стосується способу застосування сполук або фармацевтичних композицій, передбачених у даному документі, у комбінації із променевою терапією для інгібування аномального росту клітин або лікування гіперпроліферативного порушення у ссавця. Методики застосування променевої терапії відомі з рівня техніки, і дані методики можна застосовувати в комбінованій терапії, описаній у даному документі. Введення сполуки за даним винаходом у даній комбінованій терапії може бути визначене, як описано в даному документі.

Променеву терапію можна застосовувати шляхом одного з декількох способів або комбінації способів, включаючи без обмеження зовнішню променеву терапію, внутрішню променеву терапію, променеву терапію, забезпечувану імплантатом, стереотактичну радіохірургію, системну променеву терапію, радіотерапію та постійну або тимчасову внутрішньотканинну брахітерапію. Використовуваний у даному документі термін "брахітерапія" означає променеву терапію, здійснювану за допомогою просторово обмеженого радіоактивного матеріалу, що вводиться в організм у пухлину, або біля пухлини, або в інше місце тканини, що набула проліферативних властивостей унаслідок захворювання. Термін без обмеження призначений для включення впливу радіоактивних ізотопів (наприклад, At-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32 і радіоактивних ізотопів Lu). Придатні джерела випромінювання для застосування як засобу, що поліпшує стан клітин, за даним винаходом включають як тверді речовини, так і рідини. Як необмежувальний приклад джерелом випромінювання може бути радіонуклід, такий як I-125, I-131, Yb-169, Ir-192 як тверде джерело, I-125 як тверде джерело, або інші радіонукліди, які випромінюють фотони, бета-частинки, гамма-випромінювання або інші промені, що виявляють терапевтичну дію. Радіоактивний матеріал також може являти собою текуче середовище, одержане з будь-якого розчину радіонукліду(радіонуклідів), наприклад, з розчину I-125 або I-131, або радіоактивне текуче середовище може бути одержане з використанням зависі придатного текучого середовища, що містить невеликі частки твердих радіонуклідів, таких як Au-198, Y-90. До того ж радіонуклід(радіонукліди) може(можуть) бути включений(включені) до складу гелю або радіоактивних мікросфер.

Сполуки або фармацевтичні композиції за даним винаходом можна застосовувати в комбінації з кількістю однієї або декількох речовин, вибраних із хіміотерапевтичних засобів, антиангіогенних засобів, інгібіторів передачі сигналу, антипроліферативних засобів, інгібіторів гліколізу або інгібіторів аутофагії.

Антиангіогенні засоби, такі як інгібітори MMP-2 (матричної металопротеїнази 2), інгібітори MMP-9 (матричної металопротеїнази 9) та інгібітори COX-11 (циклооксигенази 11), можна застосовувати в комбінації зі сполукою за даним винаходом та фармацевтичними композиціями, описаними в даному документі. Антиангіогенні засоби включають, наприклад, рапаміцин, темсіролімус (CCI-779), еверолімус (RAD001), сорафеніб, сунітиніб та бевацизумаб. Приклади придатних інгібіторів COX-II включають алекоксіб, валдекоксіб та рофекоксіб. Приклади застосовуваних інгібіторів матричної металопротеїнази описані у WO 96/33172, WO 96/27583, публікації заявки на європейський патент EP0818442, публікації заявки на європейський патент EP1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, публікації заявки на європейський патент 606046, публікації заявки на європейський патент 931788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO1999007675, публікації заявки на європейський патент EP1786785, публікації заявки на європейський патент № EP1181017, публікації заявки на патент США № US20090012085, публікації заявки на патент США US5863949, публікації заявки на патент США US5861510 та публікації заявки на європейський патент EP0780386, усі з яких включені в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання. Переважними інгібіторами MMP-2 і MMP-9 є такі, що мають невелику

активність інгібування MMP-1 або не мають її. Більш переважними є інгібітори, які селективно інгібують MMP-2 та/або MMP-9 порівняно з іншими матриксними металопротеїназами (тобто MAP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 і MMP-13). Деякими конкретними прикладами інгібіторів MMP, придатних у даному винаході, є AG-3340, RO 32-3555 і RS 13-0830.

Сполуки за даним винаходом також можна застосовувати у варіантах спільної терапії з іншими протираковими засобами, такими як ацеманан, акларубіцин, альдеслейкін, алемтузумаб, алітретиноїн, альтретамін, аміфостин, амінолевулінова кислота, амрубіцин, амсакрин, анагрелід, анастрозол, ANCEP, анцестим, арглабін, триоксид миш'яку, BAM 002 (Novelos), бексаротен, бікалутамід, броксуридин, капецитабін, целмолейкін, цетрорелікс, кладрибін, клотримазол, цитарабіну оксфосфат, DA 3030 (Dong-A), даклізумаб, денілейкіну дифтитокс, деслорелін, дексразоксан, дилазеп, доцетаксел, докозанол, доксеркальциферол, доксифлуридин, доксорубіцин, бромокриптин, кармустин, цитарабін, фторурацил, НІТ-диклофенак, інтерферон альфа, даунорубіцин, доксорубіцин, третиноїн, едельфозин, едреколомаб, ефлорнітин, емітефур, епірубіцин, епоетин бета, етопозиду фосфат, екземестан, екзисулінд, фадрозол, філграстим, фінастерид, флударабіну фосфат, форместан, фотемустин, нітрат галію, гемцитабін, гемтузумаб зогаміцин, комбінація гімерацил/отерацил/тегафур, глікопін, гозерелін, гептаплатин, хоріонічний гонадотропін людини, зародковий альфа-фетопротейн людини, ібандронова кислота, ідарубіцин (іміквімод, інтерферон альфа, інтерферон альфа природний, інтерферон альфа-2, інтерферон альфа-2а, інтерферон альфа-2b, інтерферон альфа-N1, інтерферон альфа-n3, інтерферон альфакон-1, інтерферон альфа, природний інтерферон бета, інтерферон бета-1а, інтерферон бета-1b, інтерферон гамма, природний інтерферон гамма-1а, інтерферон гамма-1b, інтерлейкін-1 бета, йобенгуан, іринотекан, ірсогладин, ланреотид, LC 9018 (Yakult), лефлуномід, ленограстим, лентинану сульфат, летрозол, лейкоцитарний альфа-інтерферон, лейпрорелін, левамизол + фторурацил, ліарозол, лобоплатин, лонідамін, ловастатин, мазопрокол, меларсопрол, метоклопрамід, міфепристон, мілтефозин, міримостим, некомплементарна дволанцюгова РНК, мітогуазон, мітолактол, мітоксантрон, молграмостим, нафарелін, налоксон + пентазоцин, нартограстим, недаплатин, нілутамід, носкапін, новий еритропоез-стимулювальний білок, октреотид NSC 631570, опрелвекін, озатерон, оксаліплатин, паклітаксел, памідророва кислота, пегаспаргаза, пегінтерферон-альфа-2b, натрію пентозану полісульфат, пентостатин, піцибаніл, пірарубіцин, антитимоцитарні поліклональні антитіла кролика, поліетиленгліколь інтерферон-альфа-2а, порфімер натрію, ралоксифен, ралтитрексед, разбуриказа, ренію Re 186 етидронат, RII ретинамід, ритуксимаб, ромуртид, самарію (153 Sm) лексидроном, сарграмостим, сизофіран, собузоксан, сонермін, стронцію-89 хлорид, сурамін, тазонермін, тазаротен, тегафур, темопорфін, темозоломід, теніпозид, тетрахлордекаоксид, талідомід, тимальфазин, тиротропін альфа, топотекан, тореміфен, тозитумомаб-йод 131, трастузумаб, треосульфат, третиноїн, трилостан, триметрексед, трипторелін, фактор некрозу пухлини альфа, природний, убенімекс, вакцина від раку сечового міхура, вакцина Маруями, вакцина на основі лізату меланому, валрубіцин, вертепорфін, вінорелбін, вірулізин, зиностатин стималамер або золедронова кислота; абарелікс; AE 941 (Aeterna), амбамустин, антисенсовий олігонуклеотид, bcl-2 (Genta), APC 8015 (Dendreon), цетуксимаб, децитабін, дексаміноглутетамід, діазиквон, EL 532 (Elan), EM 800 (Endorecherche), енілурацил, етанідазол, фенретинід, філграстим SD01 (Amgen), фулвестрант, галоцитабін, гастрин17 імуноген, HLA-B7 для генної терапії (Vical), гранулоцитний макрофаговий колонієстимулювальний фактор, гістаміну дигідрохлорид, ібритумомаб тіуксетан, іломастат, IM 862 (Cytran), інтерлейкін-2, іпроксифен, LDI 200 (Milkhaus), леридистим, лінтузумаб, моноклональне антитіло CA 125 (Biomira), протиракові моноклональні антитіла (Japan Pharmaceutical Development), моноклональні антитіла HER-2 і Fc (Medarex), ідіотипічне моноклональне антитіло 105AD7 (CRC Technology), ідіотипічне моноклональне антитіло CEA (Trilex), моноклональне антитіло LYM-1-йод 131 (Techniclone), моноклональне антитіло до поліморфного епітеліального муцину, мічене ітрієм 90 (Antisoma), маримастат, меногарил, мітумомаб, мотексафін гадоліній, MX 6 (Galderma), неларабін, нолатрексед, білок Р 30, пегвізомант, пеметрексед, порфіроміцин, приномастат, RL 0903 (Shire), рубітекан, сатраплатин, фенілацетат натрію, спарфозинова кислота, SRL 172 (SR Pharma), SU 5416 (SUGEN), TA 077 (Tanabe), тетратіомолібдат, талібластин, тромбopoетин, етилетіопурпурин олова, тирапазамін, протиракова вакцина (Biomira), протимеланомна вакцина (Нью-Йоркський університет), протимеланомна вакцина (інститут Слоуна-Кетерінга), вакцина на основі онколізату меланому (Нью-Йоркський медичний коледж), вакцина на основі лізатів клітин вірусної меланому (Королівська лікарня Ньюкасла) або валсподар.

Сполуки за даним винаходом можна додатково застосовувати з інгібіторами VEGFR. Інші сполуки, описані в наступних патентах і заявках на патенти, можна застосовувати в комбінованій терапії: US 6258812, US 2003/0105091, WO 01/37820, US 6235764, WO 01/32651, US 6630500, US 6515004, US 6713485, US 5521184, US 5770599, US 5747498, WO 02/68406, WO 02/66470, WO 02/55501, WO 04/05279, WO 04/07481, WO 04/07458, WO 04/09784, WO 02/59110, WO 99/45009, WO 00/59509, WO 99/61422, US 5990141, WO 00/12089 та WO 00/02871.

У деяких варіантах здійснення комбінація передбачає композицію за даним винаходом у комбінації із щонайменше одним антиангіогенним засобом. До таких засобів належать без обмеження одержані *in vitro* синтетичним шляхом хімічні композиції, антитіла, антигензв'язувальні ділянки, радіонукліди, а також їх комбінації та кон'югати. Засіб може являти собою агоніст, антагоніст, алостеричний модулятор, токсин або, більш широко, може здійснювати інгібіторний або стимулювальний ефект на свою мішень (наприклад, активацію або інгібування рецептора або ферменту) і у такий спосіб сприяє загибелі клітин або зупиняє клітинний ріст.

Разом антитіла утворюють родину білків плазми крові, відомих як імуноглобуліни, і містять домени імуноглобулінів. (Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 4th ed., Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, 1999). Використовуваний у даному документі термін "антитіло" стосується білка в традиційному форматі імуноглобуліну, що містить важкі та легкі ланцюги та містить варіабельні й константні ділянки. Наприклад, антитіло може являти собою IgG, який має "Y-подібну" структуру із двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, при цьому кожна пара має один "легкий" (зазвичай має молекулярну масу, яка становить приблизно 25 кДа) та один "важкий" ланцюг (зазвичай має молекулярну масу, яка становить приблизно 50-70 кДа). Антитіло має варіабельну ділянку та константну ділянку. У форматах IgG варіабельна ділянка зазвичай містить приблизно 100-110 або більше амінокислот, містить три ділянки, що визначають комплементарність (CDR), несе основну відповідальність за розпізнавання антигену й суттєво варіюється серед інших антитіл, які зв'язуються з різними антигенами. Константна ділянка дає можливість антитілу рекрутувати клітини і молекули імунної системи. Варіабельна ділянка складається з N-кінцевих ділянок кожного легкого ланцюга та важкого ланцюга, тоді як константна ділянка складається з C-кінцевих частин кожного з важких і легких ланцюгів. (Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

Загальна структура та властивості CDR антитіл були описані в рівні техніки. Коротко кажучи, в основі антитіла CDR перебувають у межах каркасної ділянки у варіабельній ділянці важкого та легкого ланцюгів, де вони складають ділянки, які, як правило, відповідають за зв'язування та розпізнавання антигену. Як правило, варіабельна ділянка містить щонайменше три CDR важкого або легкого ланцюгів (Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; див. також Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342: 877-883) у межах каркасної ділянки (позначеної як каркасні ділянки 1-4, FR1, FR2, FR3 і FR4, згідно з Kabat et al., 1991; див. також Chothia and Lesk, 1987, вище).

Антитіла можуть містити будь-яку константну ділянку, відому з рівня техніки. Легкі ланцюги людини класифікують як легкі каппа- та лямбда-ланцюги. Важкі ланцюги класифікують як мю-, дельта-, гамма-, альфа- або епсилон-ланцюги, і вони визначають ізотип антитіла як IgM, IgD, IgG, IgA та IgE відповідно. IgG має кілька підкласів, у тому числі без обмеження IgG1, IgG2, IgG3 та IgG4. IgM має підкласи, у тому числі без обмеження IgM1 та IgM2. Варіанти здійснення даного винаходу включають усі такі класи або ізотипи антитіл. Константна ділянка легкого ланцюга може являти собою, наприклад, константну ділянку легкого ланцюга каппа- або лямбда-типу, наприклад константну ділянку легкого ланцюга каппа- або лямбда-типу людини. Константна ділянка важкого ланцюга може являти собою, наприклад, константні ділянки важкого ланцюга альфа-, дельта-, епсилон-, гамма- або мю-типу, наприклад константну ділянку важкого ланцюга альфа-, дельта-, епсилон-, гамма- або мю-типу людини. Відповідно, в ілюстративних варіантах здійснення антитіло являє собою антитіло ізотипу IgA, IgD, IgE, IgG або IgM, у тому числі будь-яке з IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.

Антитіло може являти собою моноклональне антитіло або поліклональне антитіло. У деяких варіантах здійснення антитіло містить послідовність, яка є суттєво подібною до антитіла, що зустрічається в природі, яке продукується ссавцем, наприклад мишею, кроликом, козою, конем, куркою, хом'яком, людиною тощо. Щодо цього антитіло можна розглядати як антитіло ссавця, наприклад антитіло миші, антитіло кролика, антитіло кози, антитіло коня, антитіло курки, антитіло хом'яка, антитіло людини тощо. У певних аспектах антитіло являє собою антитіло людини. У певних аспектах антитіло являє собою химерне антитіло або гуманізоване антитіло. Термін "химерне антитіло" стосується антитіла, що містить домени із двох або більше різних антитіл. Химерне антитіло може, наприклад, містити константні домени від одного виду та варіабельні домени від другого або у більш загальному випадку може містити ділянки амінокислотної послідовності від щонайменше двох видів. Химерне антитіло також може містити домени двох або більше різних антитіл від того самого виду. Термін "гуманізоване" у разі використання щодо антитіл стосується антитіл, що мають щонайменше ділянки CDR із джерела, відмінного від людини, які сконструйовані в такий спосіб, щоб вони мали структуру й імунологічну функцію, більш подібні до таких у справжніх антитіл людини, ніж в антитіл із вихідного джерела. Наприклад, гуманізація може включати прищеплення CDR з антитіла, відмінного від антитіла людини, такого як антитіло миші, на антитіло людини. Гуманізація також може включати селективні амінокислотні заміни для одержання послідовності, відмінної від послідовності людини, більш схожої з послідовністю людини.

Антитіло можна розщеплювати на фрагменти за допомогою ферментів, таких як, наприклад, папаїн і пепсин. Папаїн розщеплює антитіло з утворенням двох Fab-фрагментів та одного Fc-фрагмента. Пепсин розщеплює антитіло з утворенням F(ab')₂-фрагмента та pFc'-фрагмента. Використовуваний у даному документі термін "антигензв'язувальний фрагмент антитіла" стосується частини молекули антитіла, яка здатна до зв'язування антигену антитіла й також відома як "антигензв'язувальний фрагмент" або "антигензв'язувальна частина". В ілюстративних прикладах антигензв'язувальний фрагмент антитіла являє собою Fab-фрагмент або F(ab')₂-фрагмент.

Архітектуру антитіл використовували для створення зростаючого спектра альтернативних форматів, який охоплює діапазон молекулярних мас щонайменше приблизно 12-150 кДа та характеризується діапазоном валентності (n) від мономерних (n = 1), до димерних (n = 2), до тримерних (n = 3), до тетрамерних (n = 4) і потенційно вищого порядку; такі альтернативні формати в даному документі називаються "білковими продуктами на основі антитіл". Білкові продукти на основі антитіл включають білкові продукти на основі структури повного антитіла й білкові продукти, які імітують фрагменти антитіла, що зберігають повну антигензв'язувальну здатність, наприклад scFv, Fab і VHH/VN (обговорювані нижче). Найменшим антигензв'язувальним фрагментом антитіла, який зберігає свою повну антигензв'язувальну ділянку, є Fv-фрагмент, який повністю складається з варіабельних (V) ділянок. Розчинний гнучкий амінокислотний пептидний лінкер використовують для з'єднання V-ділянок у scFv-фрагмент (одноланцюговий варіабельний фрагмент) для стабілізації молекули або до V-ділянок додають константні (C) домени з одержанням Fab-фрагмента [антигензв'язувального фрагмента]. Як scFv-, так і Fab-фрагменти можуть бути легко одержані в клітинах-хазяїнах, наприклад прокаріотичних клітинах-хазяїнах. Інші білкові продукти на основі антитіл включають scFv, стабілізований дисульфідними зв'язками (ds-scFv), одноланцюговий Fab (scFab), а також ди- і мультимерні формати антитіл, такі як діа-, триа- та тетратіла, або мініантитіла (miniAb), які включають різні формати, що складаються із scFv, зв'язаних з олігомеризаційними доменами. Найменші фрагменти являють собою VHH/VN з важкого ланцюга Ab верблюда, а також однодоменні Ab (sdAb). Структурним елементом, який найчастіше використовується для створення нових форматів антитіла, є фрагмент антитіла, що являє собою одноланцюговий варіабельний (V) домен (scFv), який містить V-домени з важкого та легкого ланцюгів (домени VH і VL), зв'язані за допомогою пептидного лінкера з ~15 амінокислотних залишків. Пептитіло або продукт злиття пептид-Fc являє собою ще один білковий продукт на основі антитіла. Структура пептитіла складається з біологічно активного пептиду, прищепленого на Fc-домени. Пептитіла добре описані в рівні техніки. Див., наприклад, Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012).

Інші білкові продукти на основі антитіл включають одноланцюгове антитіло (SCA); діатіло; триатіло; тетратіло; біспецифічні або триспецифічні антитіла тощо. Біспецифічні антитіла можна розділити на п'ять основних класів: BslgG, прикріплені IgG, фрагменти BsAb, біспецифічні злиті білки та кон'югати BsAb. Див., наприклад, Spiess et al., Molecular Immunology 67(2) Part A: 97-106 (2015).

Ілюстративні антиангіогенні засоби включають ERBITUX™ (IMC-C225), засоби, що інгібують KDR (рецептор домену кінази) (наприклад, антитіла та антигензв'язувальні ділянки, які специфічно зв'язуються з рецептором домену кінази), засоби, що являють собою антитіла до VEGF (наприклад, антитіла або антигензв'язувальні ділянки, які специфічно зв'язуються з VEGF, або розчинні рецептори VEGF або їхня лігандзв'язувальна ділянка), такі як AVASTIN™ або VEGF-TRAP™, і засобів, що являють собою антитіла до рецептора VEGF (наприклад, антитіла або антигензв'язувальні ділянки, які специфічно зв'язуються з ним), засоби, що інгібують EGFR (наприклад, антитіла або антигензв'язувальні ділянки, які специфічно зв'язуються з ним), такі як Vectibix (панітумумаб), IRESSA™ (гефітініб), TARCEVA™ (ерлотиніб), засоби, що являють собою антитіла до Ang1 і Ang2 (наприклад, антитіла або антигензв'язувальні ділянки, які специфічно зв'язуються з ним або з їхніми рецепторами, наприклад, Tie2/Тек), а також інгібувальні засоби, що являють собою антитіла до Tie2-кінази (наприклад, антитіла або антигензв'язувальні ділянки, які специфічно зв'язуються з нею). Фармацевтичні композиції за даним винаходом також можуть містити один або декілька засобів (наприклад, антитіла, антигензв'язувальні ділянки або розчинні рецептори), які специфічно зв'язуються та інгібують активність факторів росту, таких як антагоністи фактора росту гепатоцитів (HGF, також відомого як фактор розсіювання) та антитіла або антигензв'язувальні ділянки, які специфічно зв'язуються з його рецептором "c-met".

Інші антиангіогенні засоби включають кампат, IL-8, B-FGF, антагоністи Tek (Ceretti et al., публікація заявки на патент США № 2003/0162712, патент США № 6413932), засоби, що являють собою антитіла до TWEAK (наприклад, антитіла, що специфічно зв'язуються, або антигензв'язувальні ділянки, або антагоністи розчинного рецептора TWEAK, див. Wiley, патент США № 6727225), домен дезінтегрину ADAM як антагоніст зв'язування інтегрину з його лігандами (Fanslow et al., публікація заявки на патент США № 2002/0042368), антитіла до еph-рецептора та/або антитіла до ефрину, або антигензв'язувальні ділянки, що специфічно зв'язуються (патенти США №№ 5981245, 5728813, 5969110, 6596852, 6232447, 6057124 та члени їхньої патентної родини), та антагоністи, які являють собою антитіла до PDGF-BB (наприклад, антитіла або антигензв'язувальні ділянки, що специфічно

зв'язуються), а також антитіла або антигензв'язувальні ділянки, що специфічно зв'язуються з PDGF-ВВ-лігандами, і засоби, які являють собою інгібітори PDGFR-кінази (наприклад, антитіла або антигензв'язувальні ділянки, що специфічно зв'язуються з нею).

Додаткові антиангіогенні/протиопухлинні засоби включають: SD-7784 (Pfizer, США); циленгітид (Merck KGaA, Німеччина, EPO 770622); пегаптаніб октанатрію (Gilead Sciences, США); альфафастатин (BioActa, Велика Британія); M-PGA (Celgene, США, US 5712291); іломастат (Arriva, США, US 5892112); емаксаніб (Pfizer, США, US 5792783); ваталаніб (Novartis, Швейцарія); 2-метоксиестрадіол (EntreMed, США); TLC ELL-12 (Elan, Ірландія); анекортав-ацетат (Alcon, США); моноклональне антитіло альфа-D148 (Amgen, США); CEP-7055 (Cephalon, США); моноклональне антитіло до Vn (Crucell, Нідерланди) DAC:антиангіоген (ConjuChem, Канада); ангіоцидин (InKine Pharmaceutical, США); KM-2550 (Kyowa Hakko, Японія); SU-0879 (Pfizer, США); CGP-79787 (Novartis, Швейцарія, EP 970070); технологія ARGENT (Ariad, США); YIGSR-Stealth (Johnson & Johnson, США); фрагмент фібриногену-E (BioActa, Велика Британія); інгібітор ангіогенезу (Trigen, Велика Британія); TBC-1635 (Encysive Pharmaceuticals, США); SC-236 (Pfizer, США); ABT-567 (Abbott, США); метастатин (EntreMed, США); інгібітор ангіогенезу (Triper, Швеція); маспін (Sosei, Японія); 2-метоксиестрадіол (Oncology Sciences Corporation, США); ER-68203-00 (IVAX, США); бенефін (Lane Labs, США); Tz-93 (Tsumura, Японія); TAN-1120 (Takeda, Японія); FR-111142 (Fujisawa, Японія, JP 02233610); тромбоцитарний фактор 4 (RepliGen, США, EP 407122); антагоніст фактора росту судинного ендотелію (Borean, Данія); бевацизумаб (pINN), (Genentech, США); інгібітори ангіогенезу (SUGEN, США); XL 784 (Exelixis, США); XL 647 (Exelixis, США); моноклональне антитіло, альфа5бета3 інтегрин другого покоління (Applied Molecular Evolution, США, та MedImmune, США); засіб для генної терапії ретинопатії (Oxford BioMedica, Велика Британія); ензастаурину гідрохлорид (USAN), (Lilly, США); CEP 7055 (Cephalon, США, та Sanofi-Synthelabo, Франція); BC 1 (Генуезький інститут дослідження раку, Італія); інгібітор ангіогенезу (Alchemia, Австралія); антагоніст VEGF (Regeneron, США); антиангіогенні препарати на основі rBPI 21 та BPI (ХОМА, США); PI 88 (Progen, Австралія); циленгітид (pINN), (Merck KGaA, Німеччина; Мюнхенський технічний університет, Німеччина, Scripps Clinic and Research Foundation, США); цетуксимаб (INN), (Aventis, Франція); AVE 8062 (Ajinomoto, Японія); AS 1404 (Лабораторія дослідження раку, Нова Зеландія); SG 292 (Telios, США); ендостатин (Бостонська дитяча лікарня, США); ATN 161 (Attenuon, США); ангіостатин (Бостонська дитяча лікарня, США); 2-метоксиестрадіол (Бостонська дитяча лікарня, США); ZD 6474 (AstraZeneca, Велика Британія); ZD 6126 (Angiogene Pharmaceuticals, Велика Британія); PPI 2458 (Praecis, США); AZD 9935 (AstraZeneca, Велика Британія); AZD 2171 (AstraZeneca, Велика Британія); ваталаніб (pINN), (Novartis, Швейцарія, та Schering AG, Німеччина); інгібітори шляху тканинного фактора (EntreMed, США); пегаптаніб (Pinn), (Gilead Sciences, США); ксанторизол (Університет Йонсе, Південна Корея); генноінженерна вакцина, VEGF-2 (Scripps Clinic and Research Foundation, США); SPV5.2 (Supratek, Канада); SDX 103 (Каліфорнійський університет в Сан-Дієго, США); PX 478 (ProIX, США); метастатин (EntreMed, США); тропонін I (Гарвардський університет, США); SU 6668 (SUGEN, США); OXI 4503 (OXIGENE, США); о-гуанідини (Dimensional Pharmaceuticals, США); мотупорамін С (Університет Британської Колумбії, Канада); CDP 791 (Celltech Group, Велика Британія); атипримод (pINN), (GlaxoSmithKline, Велика Британія); E 7820 (Eisai, Японія); CYC 381 (Гарвардський університет, США); AE 941 (Aeterna, Канада); вакцина від ангіогенезу (EntreMed, США); інгібітор активатора плазміногену урокінази (Dendreon, США); оглуфанід (pINN), (Melmotte, США); інгібітори HIF-1-альфа (Xenova, Велика Британія); CEP 5214 (Cephalon, США); BAY RES 2622 (Bayer, Німеччина); ангіоцидин (InKine, США); A6 (Angstrom, США); KR 31372 (Корейський дослідницький інститут хімічної технології, Південна Корея); GW 2286 (GlaxoSmithKline, Велика Британія); EHT 0101 (ExonHit, Франція); CP 868596 (Pfizer, США); CP 564959 (OSI, США); CP 547632 (Pfizer, США); 786034 (GlaxoSmithKline, Велика Британія); KRN 633 (Kirin Brewery, Японія); система внутрішньочної доставки лікарських засобів, 2-метоксиестрадіол (EntreMed, США); ангінекс (Маастрихтський університет, Нідерланди, та Мінесотський університет, США); ABT 510 (Abbott, США); AAL 993 (Novartis, Швейцарія); VEGI (ProteomTech, США); інгібітори фактора некрозу пухлини альфа (Національний інститут старіння, США); SU 11248 (Pfizer, США, і SUGEN, США); ABT 518 (Abbott, США); YH16 (Yantai Rongchang, Китай); S-3APG (Бостонська дитяча лікарня, США, та EntreMed, США); моноклональне антитіло, KDR (ImClone Systems, США); моноклональне антитіло, альфа5бета1 (Protein Design, США); інгібітор кінази KDR (Celltech Group, Велика Британія, та Johnson & Johnson, США); GFB 116 (Південно-Флоридський університет, США, та Ельський університет, США); CS 706 (Sankyo, Японія); проліки комбретастатиноу A4 (Університет штату Аризона, США); хондроїтиназа AC (IBEX, Канада); BAY RES 2690 (Bayer, Німеччина); AGM 1470 (Гарвардський університет, США, Takeda, Японія, і TAP, США); AG 13925 (Agouron, США); тетратіомолібдат (Мічиганський університет, США); GCS 100 (Університет Вейна, США), CV 247 (Ivy Medical, Велика Британія); CKD 732 (Chong Kun Dang, Південна Корея); моноклональне антитіло, фактор росту судинного ендотелію (Xenova, Велика Британія); ірсогладин (INN), (Nippon Shinyaku, Японія); RG 13577 (Aventis, Франція); WX 360 (Wilex, Німеччина); скваламін (pINN), (Genaera, США); RPI 4610 (Sirna, США); засіб терапії раку (Marinova, Австралія); інгібітори гепаранази (InSight, Ізраїль); KL 3106 (Kolon, Південна Корея);

хонокіол (Університет Еморі, США); ZK CDK (Schering AG, Німеччина); ZK Angio (Schering AG, Німеччина); ZK 229561 (Novartis, Швейцарія, і Schering AG, Німеччина); XMP 300 (XOMA, США); VGA 1102 (Taisho, Японія); модулятори рецепторів VEGF (Pharmascorpeia, США); антагоністи VE-кадгерину-2 (ImClone Systems, США); вазостатин (Національний інститут здоров'я, США); вакцина Flk-1 (ImClone Systems, США); TZ 93 (Tsumura, Японія); тумстатин (Beth Israel Hospital, США); вкорочений розчинний FLT 1 (рецептор 1 фактора росту судинного ендотелію), (Merck & Co, США); ліганди Tie-2 (Regeneron, США) та інгібітор тромбоспондину 1 (Allegheny Health, Education and Research Foundation, США).

Інгібітори автофагії включають без обмеження хлорохін, 3-метиладенін, гідроксихлорохін (Plaquenil™), бафіломіцин A1, 5-аміно-4-імідазолкарбоксамідрибозид (AICAR), окарікову кислоту, токсини водоростей, що пригнічують автофагію та які інгібують протеїнфосфатази типу 2A або типу 1, аналоги cAMP та лікарські засоби, які підвищують рівні cAMP, такі як аденозин, LY204002, N6-меркаптопуририбозид та вінбластин. Крім того, також можна застосовувати антисенсову siRNA або siRNA, яка інгібує експресію білків, у тому числі без обмеження ATG5 (які залучені в автофагію).

Додаткові фармацевтично активні сполуки/засоби, які можна застосовувати в лікуванні видів раку та які можна застосовувати в комбінації з однією або декількома сполуками за даним винаходом включають: епоетин-альфа, дарбепоетин-альфа, панітумумаб, пегфілграстим, паліфермін, філграстим, деносумаб, анцестим, AMG 102, AMG 176, AMG 386, AMG 479, AMG 655, AMG 745, AMG 951 та AMG 706 або їхню фармацевтично прийнятну сіль.

У деяких варіантах здійснення композицію, представлену в даному документі, вводять разом із хіміотерапевтичним засобом. Придатні хіміотерапевтичні засоби можуть включати природні продукти, такі як алкалоїди барвінка (наприклад, вінбластин, вінкрестин та вінорелбін), паклітаксел, епідиподофілотоксини (наприклад, етопозид та теніпозид), антибіотики (наприклад, дактиноміцин (актиноміцин D), даунорубіцин, доксорубіцин та ідарубіцин), антрацикліни, мітоксантрон, блеоміцини, плікаміцин (мітраміцин), мітоміцин, ферменти (наприклад, L-аспарагіназа, яка системно метаболізує L-аспарагін та забирає його з клітин, які не мають здатності синтезувати власний аспарагін), антитромбоцитарні засоби, антипроліферативні/антимітотичні алкілувальні засоби, такі як азотисті іприти (наприклад, мехлоретамін, циклофосфамід та аналоги, мелфалан та хлорамбуцил), етиленіміни та метилмеламіни (наприклад, гексаметилмеламін та тіотепа), інгібітори CDK (наприклад, селіцикліб, UCN-01, P1446A-05, PD-0332991, динацикліб, P27-00, AT-7519, RGB286638 і SCH727965), алкілсульфонати (наприклад, бусульфан), нітрозосечовини (наприклад, кармустин (BCNU) та аналоги, а також стрептозоцин), тразенес-дакарбазинін (DTIC), антипроліферативні/антимітотичні антиметаболіти, такі як аналоги фолієвої кислоти (наприклад, метотрексат), піримідинові аналоги (наприклад, фторурацил, флоксуридин і цитарабін), пуринові аналоги та споріднені інгібітори (наприклад, меркаптопурин, тіогуанін, пентостатин і 2-хлордезоксиаденозин), інгібітори ароматази (наприклад, анастрозол, екземестан і летрозол) та координаційні комплекси платини (наприклад, цисплатин і карбоплатин), прокарбазин, гідроксисечовина, мітотан, аміноглутетимід, інгібітори гістондеацетилази (HDAC) (наприклад, трихостатин, бутират натрію, апіцидан, субероїланілідгідроамінова кислота, вориносат, LBH 589, ромідепсин, ACY-1215 і панобіносат), інгібітори mTog (наприклад, темсиролімус, еверолімус, ридафоролімус і сиролімус), інгібітори KSP(Eg5) (наприклад, Aggr 520), засоби, що зв'язуються з ДНК (наприклад, Zalypsis), інгібітор PI3K дельта (наприклад, GS-1101 і TGR-1202), інгібітор PI3K дельта та гамма (наприклад, CAL-130), інгібітор мультикінази (наприклад, TG02 і сорафеніб), гормони (наприклад, естроген) та агоністи гормонів, такі як агоністи рилізінг-фактора лютеїнізувального гормону (LHRH) (наприклад, гозерелін, лейпролід і трипторелін), BAFF-нейтралізуювальне антитіло (наприклад, LY2127399), інгібітори IKK, інгібітори p38MAPK, антитіла до IL-6 (наприклад, CNTO328), інгібітори теломерази (наприклад, GRN 163L), інгібітори авроракінази (наприклад, MLN8237), моноклональні антитіла поверхні клітин (наприклад, антитіла до CD38 (HUMAX-CD38), антитіла до CS1 (наприклад, елотузумаб), інгібітори HSP90 (наприклад, 17 AAG і KOS 953), інгібітори P13K/Akt (наприклад, перифозин), інгібітор Akt (наприклад, GSK-2141795), інгібітори PKC (наприклад, ензастаурин), різновиди FTI (наприклад, Zarnestra™), антитіла до CD138 (наприклад, BT062), інгібітор специфічної кінази Torg1/2 (наприклад, INK128), інгібітор кінази (наприклад, GS-1101), ER/UPR таргетинговий засіб (наприклад, MKC-3946), інгібітор cFMS (наприклад, ARRY-382), інгібітор JAK1/2 (наприклад, CYT387), інгібітор PARP (наприклад, олапариб і веліпариб (ABT-888)), антагоніст BCL-2. Інші хіміотерапевтичні засоби можуть включати мехлоретамін, камптотецин, іфосфамід, тамоксифен, ралоксифен, гемцитабін, навелбін, сорафеніб або будь-який аналог або похідний варіант вищевказаних.

Сполуки за даним винаходом також можна застосовувати в комбінації із променевою терапією, гормональною терапією, хірургією та імунотерапією, при цьому такі види терапії широко відомі фахівцям у даній галузі техніки.

У деяких варіантах здійснення фармацевтичну композицію, представлену в даному документі, вводять спільно зі стероїдом. Придатні стероїди можуть включати без обмеження 21-ацетоксипрегненолон, алклометазон, алгестон, амцинонід, беклометазон, бетаметазон, будесонід, хлорпреднізон, клобетазол, клокортолон, клопреднол, кортикостерон, кортизон, кортивазол,

дефлазакорт, десонід, дезоксиметазон, дексаметазон, дифлоразон, дифлукортолон, дифупреднат, еноксолон, флуазакорт, флуклоронід, флуметазон, флунізолід, флуоцинолон ацетонід, флуоцинонід, флуокортин бутил, флуокортолон, флуорометолон, флуперолону ацетат, флупреднідену ацетат, флупреднізолон, флурандренонід, флутиказону пропіонат, формокортал, галцинонід, галобетазолу пропіонат, галометазон, гідрокортизон, лотепреднол етабонат, мазипредон, медризон, мепреднізон, метилпреднізолон, мометазону фуруат, параметазон, преднікарбат, преднізолон, преднізолон-25-діетиламін-ацетат, преднізолон натрію фосфат, преднізон, преднівал, предніліден, римексолон, тиксокортол, триамцинолон, триамцинолон ацетонід, триамцинолон бенетонід, триамцинолон гексацетонід, а також їхні солі та/або похідні. У конкретному варіанті здійснення сполуки за даним винаходом також можна застосовувати в комбінації з додатковими фармацевтично активними засобами, які лікують нудоту. Приклади засобів, які можна застосовувати для лікування нудоти, включають дронабінол, гранісетрон, метоклопрамід, ондансетрон та прохлорперазин або їхню фармацевтично прийнятну сіль.

Інгібітори KRAS^{G12C} за даним винаходом можуть бути використані в комбінації з інгібіторами кінази Аутога, такими як ті, що були виявлені та містяться в опублікованій РСТ заявці WO2011/031842. Конкретною сполукою є AMG 900 (приклад 1 з WO2011/031842, включеної в даний документ за допомогою посилання для всіх цілей).

Інгібітори KRAS^{G12C} за даним винаходом можуть бути використані в комбінації з інгібіторами шляху MAP-кінази. Інгібітори BRAF, інгібітори усіх типів RAF та інгібітори MEK являють собою приклади білків у шляху MAP-кінази, які можуть бути інгібовані, та інгібіторів таких білків, використовуваних у комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C}. Існують три основні ізоформи RAF: ARAF, BRAF і CRAF. Інгібітор усіх типів RAF демонструє інгібіторну активність щодо більш ніж однієї ізоформи RAF. І навпаки, інгібітор BRAF демонструє більш високу інгібіторну активність (або селективність) щодо BRAF, аніж до інших білків RAF.

Сполуки за даним винаходом також можуть бути застосовані в комбінації з додатковими фармацевтично активними сполуками, які порушують або інгібують сигнальні шляхи RAS-RAF-ERK або PI3K-AKT-TOR. В інших подібних комбінаціях додатковою фармацевтично активною сполукою є антагоніст PD-1 та PD-L1. Сполуки або фармацевтичні композиції за даним винаходом також можна застосовувати у комбінації з певною кількістю речовини або декількох речовин, вибраних з інгібіторів EGFR, інгібіторів MEK, інгібіторів PI3K, інгібіторів AKT, інгібіторів TOR, інгібіторів Mcl-1, інгібіторів BCL-2, інгібіторів SHP2, інгібіторів протеасом та імунних терапевтичних засобів, включно з моноклональними антитілами, імуномодуляторними імідями (IMiD), засобами, що являють собою антитіла до PD-1 (або альтернативно інгібітор PD-1), антитіла до PDL-1, антитіла до CTLA4, антитіла до LAG1 та антитіла до OX40, агоністи G1TR, клітини CAR-T і різновиди BiTE.

Інгібітори EGFR включають без обмеження низькомолекулярні антагоністи, інгібітори на основі антитіл або специфічний антисенсовий нуклеотид чи siRNA. Інгібітори EGFR, які можуть бути використані в комбінаціях за даним винаходом, включають без обмеження афатиніб (торговельна марка Gilotrif®, комерційно доступний від компанії Boehringer Ingelheim), ерлотиніб (торговельна марка Tarceva®, комерційно доступний від компанії Genetech/Astellas) і лапатиніб (торговельна марка Tykerb®, комерційно доступний від компанії Novartis). Інгібітори KRAS^{G12C} також можна застосовувати в комбінації з антитілами до EGFR у даному винаході. Антитіла до EGFR, які можна застосовувати в комбінаціях по даному винаходу, включають без обмеження цетуксимаб (торговельна марка Erbitux® від компанії Lilly). Застосовні інгібітори EGFR на основі антитіл включають панітумумаб (Vectibix), залутумумаб, німотузумаб і матузумаб.

Необмежувальні приклади низькомолекулярних інгібіторів EGFR включають будь-який з інгібіторів EGFR, описаних у наступних патентних публікаціях, і всі фармацевтично прийнятні солі та сольвати вказаних інгібіторів EGFR: заявка на європейський патент EP 520722, опублікована 30 грудня 1992 р.; заявка на європейський патент EP 566226, опублікована 20 жовтня 1993 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 96/33980, опублікована 31 жовтня 1996 р.; патент США № 5747498, виданий 5 травня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 96/30347, опублікована 3 жовтня 1996 р.; заявка на європейський патент EP 787772, опублікована 6 серпня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/30034, опублікована 21 серпня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/30044, опублікована 21 серпня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/38994, опублікована 23 жовтня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/49688, опублікована 31 грудня 1997 р.; заявка на європейський патент EP 837063, опублікована 22 квітня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 98/02434, опублікована 22 січня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/38983, опублікована 23 жовтня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 95/19774, опублікована 27 липня 1995 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 95/19970, опублікована 27 липня 1995 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/13771, опублікована 17 квітня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 98/02437, опублікована 22 січня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ

міжнародної заявки WO 98/02438, опублікована 22 січня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/32881, опублікована 12 вересня 1997 р.; заявка на патент Німеччини DE 19629652, опублікована 29 січня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 98/33798, опублікована 6 серпня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/32880, опублікована 12 вересня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/32880, опублікована 12 вересня 1997 р.; заявка на європейський патент EP 682027, опублікована 15 листопада 1995 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/02266, опублікована 23 січня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/27199, опублікована 31 липня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 98/07726, опублікована 26 лютого 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/34895, опублікована 25 вересня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 96/31510, опублікована 10 жовтня 1996 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 98/14449, опублікована 9 квітня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 98/14450, опублікована 9 квітня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 98/14451, опублікована 9 квітня 1998 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 95/09847, опублікована 13 квітня 1995 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 97/19065, опублікована 29 травня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 98/17662, опублікована 30 квітня, 1998 р.; патент США № 5789427, виданий 4 серпня 1998 р.; патент США № 5650415, виданий 22 липня 1997 р.; патент США № 5656643, виданий 12 серпня 1997 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 99/35146, опублікована 15 липня 1999 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 99/35132, опублікована 15 липня 1999 р.; публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 99/07701, опублікована 18 лютого 1999 р.; і публікація поданої згідно з РСТ міжнародної заявки WO 92/20642, опублікована 26 листопада 1992 р. Додаткові необмежувальні приклади низькомолекулярних інгібіторів EGFR включають будь-який з інгібіторів EGFR, описаний в Traxler, P., 1998, Exp. Opin. Ther. Patents 8(12):1599-1625.

Інгібітори EGFR на основі антитіл включають будь-яке антитіло до EGFR або фрагмент антитіла, які можуть частково або повністю блокувати активацію EGFR за допомогою його природного ліганду. Необмежувальні приклади інгібіторів EGFR на основі антитіл включають такі, описані в Modjtahedi, H., et al., 1993, Br. J. Cancer 67:247-253; Teramoto, T., et al., 1996, Cancer 77:639-645; Goldstein et al., 1995, Clin. Cancer Res. 1:1311-1318; Huang, S. M., et al., 1999, Cancer Res. 59:1236-1243. Отже, інгібітор EGFR може являти собою моноклональне антитіло Mab E7.6.3 (Yang, 1999 вище) або Mab C225 (№ доступу ATCC HB-8508), або антитіло, або фрагмент антитіла, що характеризуються специфічністю зв'язування з ним.

Інгібітори KRAS^{G12C} за даним винаходом можуть бути використані в комбінації з інгібіторами MEK, такими як ті, що були виявлені та містяться в опублікованій РСТ заявці WO2002/006213. Конкретною сполукою є N-(((2R)-2,3-дигідроксипропіл)окси)-3,4-дифтор-2-((2-фтор-4-йодфеніл)аміно)бензамід, також відомий як AMG 1009089 або 1009089 (приклад 39).

Інгібітори KRAS^{G12C} за даним винаходом можна застосовувати в комбінації з інгібіторами BRAF, такими як ті, що були виявлені та містяться в опублікованій РСТ заявці WO2008/153947. Конкретною сполукою є AMG 2112819 (також відомий як 2112819) (приклад 56). Іншим конкретним інгібітором BRAF, який можна застосовувати в комбінаціях за даним винаходом, є дабрафеніб. Іншим інгібітором BRAF, який можна застосовувати в комбінаціях за даним винаходом, є вемурафеніб.

Інгібітори всіх типів RAF також можна застосовувати разом з інгібіторами KRAS^{G12C} у комбінаціях за даним винаходом. Конкретний інгібітор усіх типів RAF включає RAF265 та MLN-2480.

Інгібітори KRAS^{G12C} за даним винаходом можна застосовувати в комбінації з інгібіторами MEK. Конкретні інгібітори MEK, які можна застосовувати в комбінаціях за даним винаходом, включають PD-325901, траметиніб, пімасертиб, MEK162 [також відомий як бініметиніб], TAK-733, GDC-0973 і AZD8330. Конкретний інгібітор MEK, який можна застосовувати разом з інгібітором KRAS^{G12C} у комбінаціях за даним винаходом, являє собою траметиніб (торговельна марка Mekinist®, комерційно доступний від компанії Novartis Pharmaceuticals Corp.). Інший конкретний інгібітор MEK являє собою N-(((2R)-2,3-дигідроксипропіл)окси)-3,4-дифтор-2-((2-фтор-4-йодфеніл)аміно)бензамід, також відомий як AMG 1009089, 1009089 або PD-325901. Інший конкретний інгібітор MEK, який можна застосовувати в комбінаціях за даним винаходом, включає кобіметиніб.

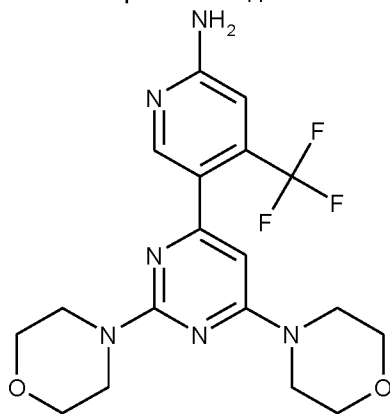
Інгібітори MEK включають без обмеження CI-1040, AZD6244, PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119, ARRY-142886 та ARRY-438162.

В іншому аспекті даний винахід стосується застосування сполуки за даним винаходом в комбінації з одним або декількома фармацевтичними засобами, які є інгібіторами білка в шляху фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K). Приклади білків у шляху PI3K включають PI3K, mTOR та PKB (також відомий як Akt або AKT). Білок PI3K існує у декількох ізоформах, включно із α , β , δ або γ . Передбачається, що інгібітор PI3K, який може бути використаний у даному винаході, може бути селективним щодо однієї або декількох ізоформ. Як "селективні" передбачаються сполуки, що інгібують одну або декілька ізоформ більшою мірою, ніж інші ізоформи. Селективність являє собою

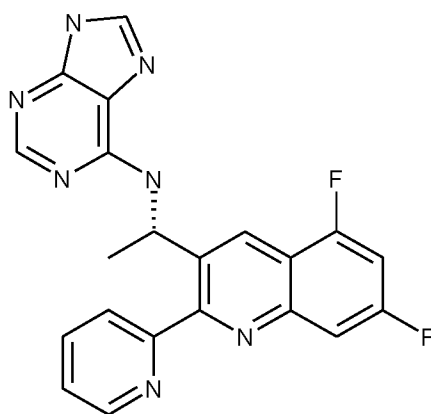
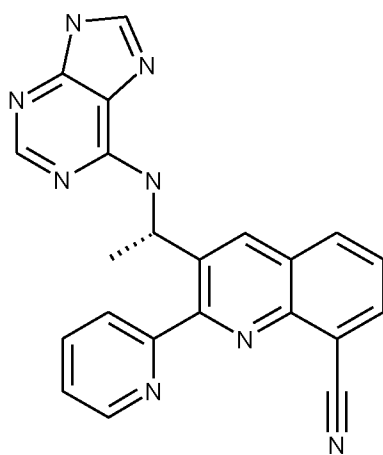
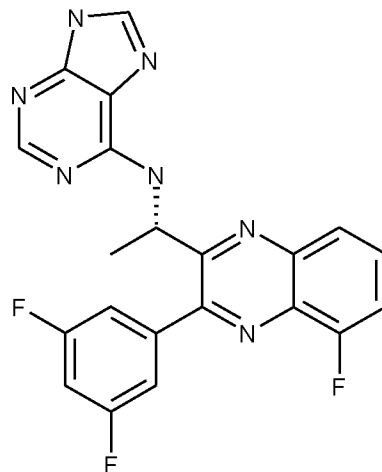
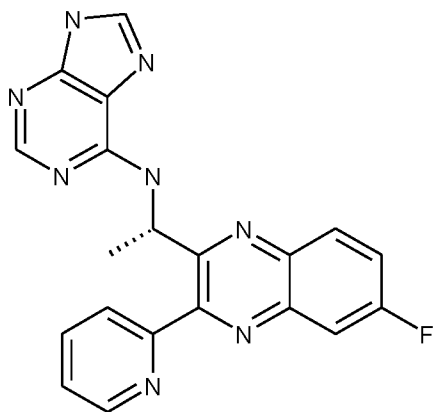
концепцію, добре відому фахівцям у даній галузі, і її можна виміряти за допомогою добре відомих аналізів *in vitro* або аналізів, які базуються на клітинній активності. Переважна селективність передбачає селективність, яка більш ніж у 2 рази, переважно в 10 разів або більш переважно в 100 разів більша стосовно однієї або декількох ізоформ, ніж інших ізоформ. В одному аспекті інгібітори PI3K, які можуть бути використані в комбінації зі сполуками за даним винаходом, є селективними інгібіторами PI3K α . В іншому аспекті сполука являє собою селективний інгібітор PI3K β . У ще одному аспекті сполука являє собою селективний інгібітор PI3K β .

Приклади інгібіторів PI3K, які можна застосовувати в комбінації з однією або декількома сполуками за даним винаходом, включають ті, що розкриті в наступних документах: опублікована РСТ заявка № WO2010/151791, опублікована РСТ заявка № WO2010/151737, опублікована РСТ заявка № WO2010/151735, опублікована РСТ заявка № WO2010/151740, опублікована РСТ заявка № WO2008/118455, опублікована РСТ заявка № WO2008/118454, опублікована РСТ заявка № WO2008/118468, опублікована заявка на патент США № US20100331293, опублікована заявка на патент США № US20100331306, опублікована заявка на патент США № US20090023761, опублікована заявка на патент США № US20090030002, опублікована заявка на патент США № US20090137581, опублікована заявка на патент США № US2009/0054405, опублікована заявка на патент США № US2009/0163489, опублікована заявка на патент США № US2010/0273764, опублікована заявка на патент США № US2011/0092504 або опублікована РСТ заявка № WO2010/108074. Інгібітори PI3K включають без обмеження вортманін, 17-гідроксивортманінові аналоги, описані в WO 06/044453, 4-[2-(1H-індазол-4-іл)-6-[[4-(метилсульфоніл)піперазин-1-іл]метил]тієно[3,2-d]піримідин-4-іл]морфолін (також відомий як GDC 0941 та описаний у публікаціях згідно з РСТ №№ WO 09/036082 та WO 09/055730), 2-метил-2-[4-[3-метил-2-оксо-8-(хінолін-3-іл)-2,3-дигідроімідазо[4,5-c]хінолін-1-іл]феніл]пропіонітрил (також відомий як BEZ 235 або NVP-BEZ 235 та описаний у публікації згідно з РСТ № WO 06/122806), (S)-1-(4-((2-(2-амінопіримідин-5-іл)-7-метил-4-морфолінотієно[3,2-d]піримідин-6-іл)метил)піперазин-1-іл)-2-гідроксипропан-1-он (описаний у публікації згідно з РСТ № WO 2008/070740), LY294002 (2-(4-морфолініл)-8-феніл-4H-1-бензопіран-4-он, доступний від Axon Medchem), PI 103 гідрохлорид (3-[4-(4-морфолініл)піридо-[3',2':4,5]фуоро[3,2-d]піримідин-2-іл]фенолу гідрохлорид, доступний від Axon Medchem), PIK 75 (N'-[(1E)-(6-бромімідазо[1,2-a]піридин-3-іл)метиле]-N,2-диметил-5-нітробензолсульфоновідрозиду гідрохлорид, доступний від Axon Medchem), PIK 90 (N-(7,8-диметокси-2,3-дигідроімідазо[1,2-c]хіназолін-5-іл)нікотинамід, доступний від Axon Medchem), GDC-0941 біс-мезилат (2-(1H-індазол-4-іл)-6-(4-метансульфонілпіперазин-1-ілметил)-4-морфолін-4-ілтієно[3,2-d]піримідину біс-мезилат, доступний від Axon Medchem), AS-252424 (5-[1-[5-(4-фтор-2-гідроксифеніл)-фуран-2-іл]мет-(Z)-иліден]тіазолідин-2,4-діон, доступний від Axon Medchem) та TGX-221 (7-метил-2-(4-морфолініл)-9-[1-(феніламіно)етил]-4H-піридо-[1,2-a]піримідин-4-он, доступний від Axon Medchem), XL-765 і XL-147. Інші інгібітори PI3K включають деметоксивіридин, перифосин, CAL101, PX-866, BEZ235, SF1126, INK1117, IPI-145, BKM120, XL147, XL765, паломід 529, GSK1059615, ZSTK474, PWT33597, IC87114, TG100-115, CAL263, PI-103, GNE-477, CUDC-907 і AEZS-136.

Переважні інгібітори PI3K для застосування в комбінації зі сполукою за даним винаходом

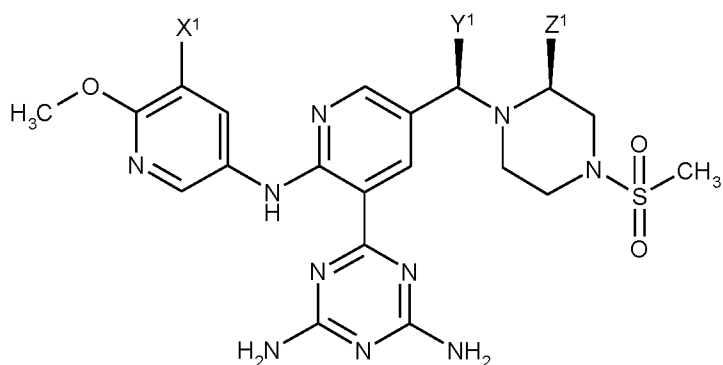


включають , також відомий як бупарлісіб, досліджувану дрібну молекулу від компанії Novartis Pharmaceuticals,



прийнятну сіль.

Також переважною є сполука наведеної нижче формули IIa або її фармацевтично прийнятна сіль,



IIa

де X^1 являє собою фтор або водень, Y^1 являє собою водень або метил і Z^1 являє собою водень або метил. Конкретний інгібітор PI3K, який можна застосовувати в комбінаціях за даним винаходом, являє собою AMG 511 (також відомий як AMG 2539965 або 2539965), який представлено в прикладі 148 з опублікованої РСТ заявки WO2010/126895.

Інші інгібітори PI3K, які можна застосовувати в комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C} у комбінаціях за даним винаходом, включають інгібітори всіх типів PI3K, такі як BKM120 і GDC-0941, селективні інгібітори PI3K α , такі як BYL719, і селективні інгібітори PI3K β , такі як GSK-2636771.

Відомі сполуки, які інгібують як PI3K, так і mTOR (подвійні інгібітори). У ще одному аспекті в даному винаході передбачене застосування подвійних PI3K та інгібіторів mTOR для застосування в комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C}. Прикладом конкретного подвійного інгібітора є GDC-0980.

Інгібітори KRAS^{G12C} також можна застосовувати в комбінації з інгібіторами SHP2 у даному винаході. Інгібітори SHP2, які можна застосовувати в комбінаціях за даним винаходом, включають без обмеження SHP099 і RMC-4550 або RMC-4630 від компанії Revolutions Medicines у Редвуд-Сіті, Каліфорнія.

mTOR є білком шляху PI3K. Іншим аспектом даного винаходу є застосування інгібітора mTOR у комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C}. Інгібітори mTOR, які можна застосовувати в комбінації із сполукою за даним винаходом, включають такі, що розкриті в наступних документах: опублікована РСТ заявка № WO2010/132598 і опублікована РСТ заявка № WO2010/096314. Інгібітори mTOR, які у комбінаціях за даним винаходом можна застосовувати в комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C}, включають AZD2014 та MLN0128.

Інгібітори TOR включають без обмеження AP-23573, CCI-779, еверолімус, RAD-001, рапаміцин, темсиролімус, АТР-конкурентні інгібітори TORC1/TORC2, включаючи PI-103, PP242, PP30 і Torin 1. Інші інгібітори TOR в енхансері FKBP12; рапаміцини та їхні похідні, у тому числі: CCI-779 (темсиролімус), RAD001 (еверолімус; WO 9409010) та AP23573; рапалоги, наприклад, розкриті в WO 98/02441 і WO 01/14387, наприклад, AP23573, AP23464 або AP23841; 40-(2-гідроксиетил)рапаміцин, 40-[3-гідрокси(гідроксиметил)метилпропаноат]рапаміцин (також називаний CC1779), 40-епі(тетразоліт)рапаміцин (також називаний АВТ578), 32-деоксорапаміцин, 16-пентинілокси-32(S)-дигідрорапаміцин та інші похідні, розкриті в WO 05005434; похідні, розкриті в патенті США № 5258389, WO 94/090101, WO 92/05179, в патенті США № 5118677, у патенті США № 5118678, у патенті США № 5100883, у патенті США № 5151413, у патенті США № 5120842, WO 93/111130, WO 94/02136, WO 94/02485, WO 95/14023, WO 94/02136, WO 95/16691, WO 96/41807, WO 96/41807 і в патенті США № 5256790; фосфоровмісні рапаміцинові похідні (наприклад, WO 05016252); 4Н-1-бензопіран-4-онові похідні (наприклад, попередня заявка на патент США № 60/528340).

РКВ (АКТ) також є білком шляху PI3K. Іншим аспектом даного винаходу є застосування інгібітора АКТ у комбінації з інгібітором KRAS^{G12C}. Інгібітори АКТ, які можна застосовувати в комбінації із сполукою за даним винаходом, включають такі, що розкриті в наступних документах: патент США № 7354944, патент США № 7700636, патент США № 7919514, патент США № 7514566, публікація заявки на патент США № US 2009/0270445 А1, патент США № 7919504, патент США № 7897619 або опублікована РСТ заявка № WO 2010/083246 А1. Конкретні інгібітори АКТ, які у комбінаціях за даним винаходом можна застосовувати в комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C}, включають МК-2206, GDC-0068 і AZD5363.

Інгібітори АКТ включають без обмеження Akt-1-1 (інгібує Akt1) (Barnett et al. (2005) Biochem. J., 385 (Pt. 2), 399-408); Akt-1-1,2 (інгібує Akt1 і 2) (Barnett et al. (2005) Biochem. J. 385 (Pt. 2), 399-408); API-59CJ-Ome (наприклад, Jin et al. (2004) Br. J. Cancer 91, 1808-12); 1-Н-імідазо[4,5-с]піридинілові сполуки (наприклад, WO 05011700); індол-3-карбінол та його похідні (наприклад, патент США № 6656963; Sarkar and Li (2004) J Nutr. 134(12 Suppl), 3493S-3498S); перифосин (наприклад, заважає мембранній локалізації Akt; Dasmahapatra et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10(15), 5242-52, 2004); етер фосфатидилінозитолу, ліпідні аналоги (наприклад, Gills and Dennis (2004) Expert. Opin. Investig. Drugs 13, 787-97) і трицирибін (TCN, або API-2, або NCI, ідентифікатор: NSC 154020; Yang et al. (2004) Cancer Res. 64, 4394-9).

Інгібітори MCL-1 включають без обмеження AMG-176, MIK665 і S63845. Білок мієлоїдноклітинного лейкозу-1 (MCL-1) є одним із ключових антиапоптотичних представників родини білків В-клітинної лімфоми-2 (BCL-2). Надекспресія MCL-1 була тісно пов'язана із прогресуванням пухлини, а також зі стійкістю не тільки до традиційних хіміотерапевтичних засобів, але також і до терапевтичних засобів спрямованої дії, включно з інгібіторами BCL-2, такими як АВТ-263.

Інгібітори протеасом включають без обмеження Kyprolis®(карфілзоміб), Velcade®(бортезоміб) та опрозоміб.

Імунні терапевтичні препарати включають без обмеження засоби, що являють собою антитіла до PD-1, засоби, що являють собою антитіла до PDL-1, засоби, що являють собою антитіла до CTLA-4, засоби, що являють собою антитіла до LAG1, і засоби, що являють собою антитіла до OX40.

Моноклональні антитіла включають без обмеження Darzalex® (даратумумаб), Herceptin® (трастизумаб), Avastin® (бевацизумаб), Rituxan® (ритуксимаб), Lucentis® (ранібізумаб) та Eylea® (афліберцепт).

Імуномодуючі засоби (IMiD) являють собою клас імуномодуючих лікарських засобів (лікарських засобів, які регулюють імунні відповіді), що містять імідну групу. Клас IMiD включає талідомід та його аналоги (леналідомід, помалідомід та апреміласт).

Інгібітори на основі антитіла до PD-1, у тому числі без обмеження антитіла, включають без обмеження пембролізумаб (Keytruda®) і ніволумаб (Opdivo®). Ілюстративні антитіла до PD-1 і способи їх застосування описані Goldberg et al., Blood 110(1):186-192 (2007), Thompson et al., Clin. Cancer Res. 13(6):1757-1761 (2007) і Korman et al., міжнародна заявка № РСТ/JP2006/309606 (публікація № WO 2006/121168 А1), кожний з яких прямо включений за допомогою посилання в даному документі. Включають: Yervoy™ (іпіліліумаб) або тремеліліумаб (до CTLA-4), галіксимаб (до B7.1), BMS-936558 (до PD-1), МК-3475 (до PD-1), AMP224 (до B7DC), BMS-936559 (до B7-H1), MPDL3280A (до B7-H1), MEDI-570 (до ICOS), AMG557 (до B7H2), MGA271 (до B7H3), IMP321 (до LAG-3), BMS-663513 (до CD137), PF-05082566 (до CD137), CDX-1127 (до CD27), антитіла до OX40 (Providence Health Services),

huMAbOX40L (до OX40L), атацицепт (до TACI), CP-870893 (до CD40), лукатумумаб (до CD40), дацетузумаб (до CD40), муромонаб-CD3 (до CD3), іпілумаб (до CTLA-4). Імунні терапевтичні препарати також включають генетично сконструйовані Т-клітини (наприклад, клітини CAR-T) і біспецифічні антитіла (наприклад, BiTE).

У конкретному варіанті здійснення сполуки за даним винаходом застосовують у комбінації з антитілом до PD-1, таким як AMG 404. У певному варіанті здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальний фрагмент антитіла) містить 1, 2, 3, 4, 5 або всі 6 амінокислотних послідовностей з CDR під SEQ ID NO: 1-6 (що представляють HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 і LC CDR3, у цьому порядку). У певних варіантах здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальний фрагмент антитіла) містить усі 6 з амінокислотних послідовностей CDR під SEQ ID NO: 1-6. В інших варіантах здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальний фрагмент антитіла) містить (а) амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга під SEQ ID NO: 7 або послідовність, варіантну стосовно неї, яка відрізняється тільки однією або двома амінокислотами або яка характеризується щонайменше або приблизно 70 % ідентичністю послідовності, або (b) амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга під SEQ ID NO: 8 або послідовність, варіантну стосовно неї, яка відрізняється тільки однією або двома амінокислотами або яка характеризується щонайменше або приблизно 70 % ідентичністю послідовності. В ілюстративному варіанті здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальний фрагмент антитіла) містить амінокислотну послідовність варіабельної ділянки важкого ланцюга під SEQ ID NO: 7 та амінокислотну послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга під SEQ ID NO: 8. В інших варіантах здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальний фрагмент антитіла) містить (а) амінокислотну послідовність важкого ланцюга під SEQ ID NO: 9 або послідовність, варіантну стосовно неї, яка відрізняється тільки однією або двома амінокислотами або яка характеризується щонайменше або приблизно 70 % ідентичністю послідовності, або (b) амінокислотну послідовність легкого ланцюга під SEQ ID NO: 10 або послідовність, варіантну стосовно неї, яка відрізняється тільки однією або двома амінокислотами або яка характеризується щонайменше або приблизно 70 % ідентичністю послідовності. В ілюстративному варіанті здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальний фрагмент антитіла) містить амінокислотну послідовність важкого ланцюга під SEQ ID NO: 9 та амінокислотну послідовність легкого ланцюга під SEQ ID NO: 10.

У даному винаході додатково передбачені послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальну частину). В ілюстративних аспектах антитіло містить 1, 2, 3, 4, 5 або всі 6 CDR, які кодує (кодують) нуклеїнова (нуклеїнові) кислота (кислоти) під SEQ ID NO: 11-16 (що представляють HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 і LC CDR3, у цьому порядку). В іншому ілюстративному аспекті антитіло містить усі 6 CDR, які кодують нуклеїнові кислоти під SEQ ID NO: 11-16. У деяких варіантах здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальна частина) містить (а) варіабельну ділянку важкого ланцюга, яку кодує послідовність під SEQ ID NO: 17, або послідовність, варіантну стосовно неї, яка відрізняється тільки 1, 2, 3, 4, 5 або 6 нуклеїновими кислотами або яка характеризується щонайменше або приблизно 70 %, 85 %, 90 % або 95 % ідентичністю послідовності, або (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, яку кодує послідовність під SEQ ID NO: 18, або послідовність, варіантну стосовно неї, яка відрізняється тільки 1, 2, 3, 4, 5 або 6 нуклеїновими кислотами або яка характеризується щонайменше або приблизно 70 %, 85 %, 90 % або 95 % ідентичністю послідовності. В ілюстративному варіанті здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальна частина) містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яку кодує послідовність під SEQ ID NO: 17, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яку кодує послідовність під SEQ ID NO: 18. В інших варіантах здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальна частина) містить (а) важкий ланцюг антитіла, який кодує послідовність під SEQ ID NO: 19, або послідовність, варіантну стосовно неї, яка відрізняється тільки 1, 2, 3, 4, 5 або 6 нуклеїновими кислотами або яка характеризується щонайменше або приблизно 70 %, 85 %, 90 % або 95 % ідентичністю послідовності, або (b) легкий ланцюг, який кодує послідовність під SEQ ID NO: 20, або послідовність, варіантну стосовно неї, яка відрізняється тільки 1, 2, 3, 4, 5 або 6 нуклеїновими кислотами або яка характеризується щонайменше або приблизно 70 %, 85 %, 90 % або 95 % ідентичністю послідовності. В ілюстративному варіанті здійснення антитіло до PD-1 (або його антигензв'язувальна частина) містить важкий ланцюг, який кодує послідовність під SEQ ID NO: 19, і легкий ланцюг, який кодує послідовність під SEQ ID NO: 20. Клітини CT-26 KRAS p.G12C одержували з мишачої колоректальної лінії T-26 (ATCC) з використанням технології CRISPR для заміщення обох алелів KRAS p.G12D на p.G12C (ThermoFisher Scientific), які кодує послідовність під SEQ ID NO: 21.

SEQ ID NO.	Тип послідовності	Послідовність
1	БЛОК	Ser Tyr Asp Met Ser
2	БЛОК	Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys

3	БЛОК	Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val
4	БЛОК	Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
5	БЛОК	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
6	БЛОК	Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr
7	БЛОК	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
8	БЛОК	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
9	БЛОК	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
10	БЛОК	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
11	ДНК	agctatgaca tgagc
12	ДНК	cttattagtg gtggtggtag tcaaacatac tacgcagaat ccgtgaaggg c
13	ДНК	cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtc

14	ДНК	cgggcgagtc aggggtattag caactggtta gcc
15	ДНК	gctgcatcca gtttgc aaag t
16	ДНК	caacaggctg aaagtttccc tcacact
17	ДНК	gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc tctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgaca tgagctgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggaatg ggtctcactt attagtgtg gtggtagtca aacatactac gcagaatccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gtccccagt ggccactact tctacgctat ggacgtctgg ggccaaggga ccacgggtcac cgtctctca
18	ДНК	gacatccaga tgaccagtc tccatctcc gtgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc atcactgtc gggcgagtc ggtatttagc aactggttag cctggatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctttgct gcattccagtt tgcaaaagggt ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttaccctca ccatcagcag cctgcagcct gaagattttg caacttacta ttgcaacag gctgaaagt tccctcacac ttccggcgga gggaccaagg tggagatcaa a
19	ДНК	atggacatga gggtgccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg cgctgtgagg tgcagctgtt ggagctctgg ggaggcttg tacagcctgg ggggtccctg agactctct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgacatgag ctgggtccgc caggctccag ggaaggggct ggaatgggtc tcactatta gtggtgttg tagtcaaaca tactacgag aatccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaattc caagaacacg ctgtatctgc aatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatt ctgtgcgtcc cccagtggcc actactcta cgctatggac gtctggggcc aagggaccac ggtaccgtc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccgggc tgctctacag tctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag ctggggcacc cagacctaca tctgaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt gagcccaaat ctgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtctctc ctcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctccgg accctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgtg cgaggagcag tacggcagca cgtaccgttg cgtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgaac ggtgtccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatgg cagccggaga acaactaca gaccagcct cccgtgctgg actccgacgg ctctctctc ctctatagca agctaccgt ggacaagagc agggtgcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa
20	ДНК	atggacatga gggtgccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg cgctgtgaca tccagatgac ccagctcca tcttccgtgt ctgcatctgt tggagacaga gtcaccatca ctgtcgggc gagtcagggt attagcaact ggtagcctg gtatcagcag aaaccaggga aagcccctaa gctcctgac ttgtgcat ccagtttgca aagtggggtc ccatcaaggt tcagcggcag tggatctgg acagattca cctcaccat cagcagcctg cagcctgaag attttgaac ttactattgt caacaggctg aaagttccc tcacatttc ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaacga acggtggctg caccatctgt ctctatctc ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtcct gctgaataac ttctatcca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgcccctca atcgggtaac tccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgctgcga agtcacccat cagggcctga gctcggccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagaggtgt
21	БЛОК	Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala

Агоністи G1TR включають без обмеження злиті білки G1TR і антитіла до G1TR (наприклад, бівалентні антитіла до G1TR), такі як злитий білок G1TR, описаний у патенті США № 6111090box.c, в європейському патенті № 090505B1, у патенті США № 8586023, у публікаціях згідно з РСТ №№ WO 2010/003118 і 2011/090754, або антитіло до G1TR, описане, наприклад, у патенті США № 7025962, в європейському патенті № 1947183B1, у патенті США № 7812135, у патенті США № 8388967, у патенті США № 8591886, в європейському патенті № EP 1866339, у публікації згідно з РСТ № WO 2011/028683, у публікації згідно з РСТ № WO 2013/039954, у публікації згідно з РСТ №

WO 2005/007190, у публікації згідно з РСТ № WO 2007/133822, у публікації згідно з РСТ № WO 2005/055808, у публікації згідно з РСТ № WO 99/40196, у публікації згідно з РСТ № WO 2001/03720, у публікації згідно з РСТ № WO 99/20758, у публікації згідно з РСТ № WO 2006/083289, у публікації згідно з РСТ № WO 2005/115451, у патенті США № 7618632 і у публікації згідно з РСТ № WO 2011/051726.

Інгібітори KRAS^{G12C} також можна застосовувати в комбінації з інгібіторами CDK4 і/або 6 у даному винаході. Інгібітори CDK 4 і/або 6, які можуть бути використані в комбінаціях за даним винаходом, включають без обмеження розкриті в наступних документах: опублікована РСТ заявка № WO 2009/085185 або публікація заявки на патент США № US2011/0097305.

Інші сполуки, які можна застосовувати в комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C} у комбінаціях за даним винаходом, включають сполуки, які інгібують білки, що є частиною вродженого шляху апоптозу. Приклади таких сполук включають без обмеження інгібітори Bcl2/BclxL, такі як навітоклакс, та інгібітори Bcl2, такі як ABT-199.

Інші сполуки, які можна застосовувати в комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C} у комбінаціях за даним винаходом, включають інгібітори BCR-ABL, такі як без обмеження дасатиніб, та інгібітори HDAC, такі як панобінонат.

Інші сполуки, які у комбінаціях за даним винаходом можуть бути використані в комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C}, включають засоби на основі платини, такі як цисплатин, карбоплатин і оксаліплатин; інгібітори топоізомерази II, зазвичай із класу антрацикліну, такі як доксорубіцин, даунорубіцин, ідарубіцин, епірубіцин, пегільований ліпосомний доксорубіцин гідрохлорид, міоцет та етопозид; інгібітори топоізомерази I, такі як іринотекан (CPT-11); засоби, що алкілюють ДНК, такі як темозоломід; і нуклеозидні аналоги, такі як цитарабін та децитабін.

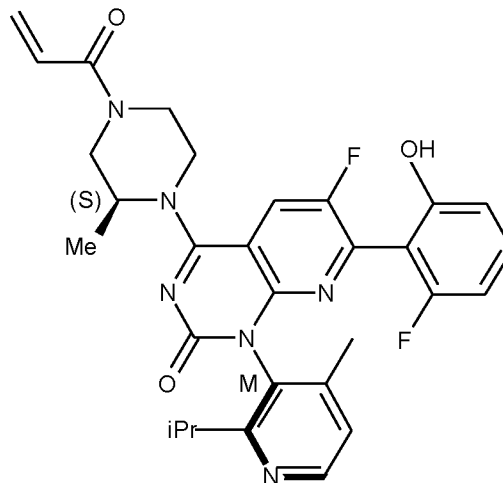
Інші сполуки, які у комбінаціях за даним винаходом можуть бути використані в комбінації з інгібіторами KRAS^{G12C}, включають інгібітори рецепторної та нереперторної кінзи, включно з інгібіторами тирозинкінази. Приклад таких сполук охоплює іматиніб, дасатиніб, понатиніб, босутиніб, нілотиніб, квізартиніб, мідостаурин, ерлотиніб та папатиніб.

Сполуки, описані в даному документі, можна застосовувати в комбінації із засобами, розкритими в даному документі, або з іншими придатними засобами, залежно від стану, лікування якого здійснюють. Отже, у деяких варіантах здійснення одну або декілька сполук за даним винаходом будуть вводити разом з іншими засобами, описаними вище. У разі застосування у комбінованій терапії сполуки, описані в даному документі, вводять одночасно або роздільно із другим засобом. Дане введення в комбінації може включати одночасне введення двох засобів в одній і тій самій лікарській формі, одночасне введення в окремих лікарських формах і роздільне введення. Тобто сполука, описана в даному документі, і будь-який із засобів, описаних вище, можуть бути складені разом у тій самій лікарській формі та введені одночасно. Альтернативно сполуку за даним винаходом та будь-який із засобів, описаних вище, можна вводити одночасно, при цьому обидва засоби присутні в окремих складах. В іншому альтернативному варіанті після введення сполуки за даним винаходом може відразу відбуватися введення будь-якого із засобів, описаних вище, або навпаки. У деяких варіантах здійснення протоколу роздільного введення сполука за даним винаходом і будь-який із засобів, описаних вище, вводять із інтервалом у кілька хвилин, або з інтервалом у декілька годин, або з інтервалом у декілька днів.

Оскільки в одному аспекті даного винаходу передбачене лікування захворювання/станів за допомогою комбінації фармацевтично активних сполук, які можна вводити роздільно, даний винахід додатково стосується об'єднання окремих фармацевтичних композицій у формі набору. Набір містить дві окремі фармацевтичні композиції: сполуку за даним винаходом і другу фармацевтичну сполуку. Набір містить контейнер для утримання окремих композицій, такий як розділений на частини флакон або пакет із фольги, розділений на частини. Додаткові приклади контейнерів включають шприци, коробки та м'які резервуари. У деяких варіантах здійснення набір містить інструкції із застосування окремих компонентів. Форма набору є особливо переважною, якщо окремі компоненти переважно вводять у різних лікарських формах (наприклад, перорально та парентерально), вводять із різними інтервалами між введенням лікарського засобу, або якщо вибір дози окремих компонентів комбінації буде визначатися фахівцем у галузі охорони здоров'я, який призначає лікування.

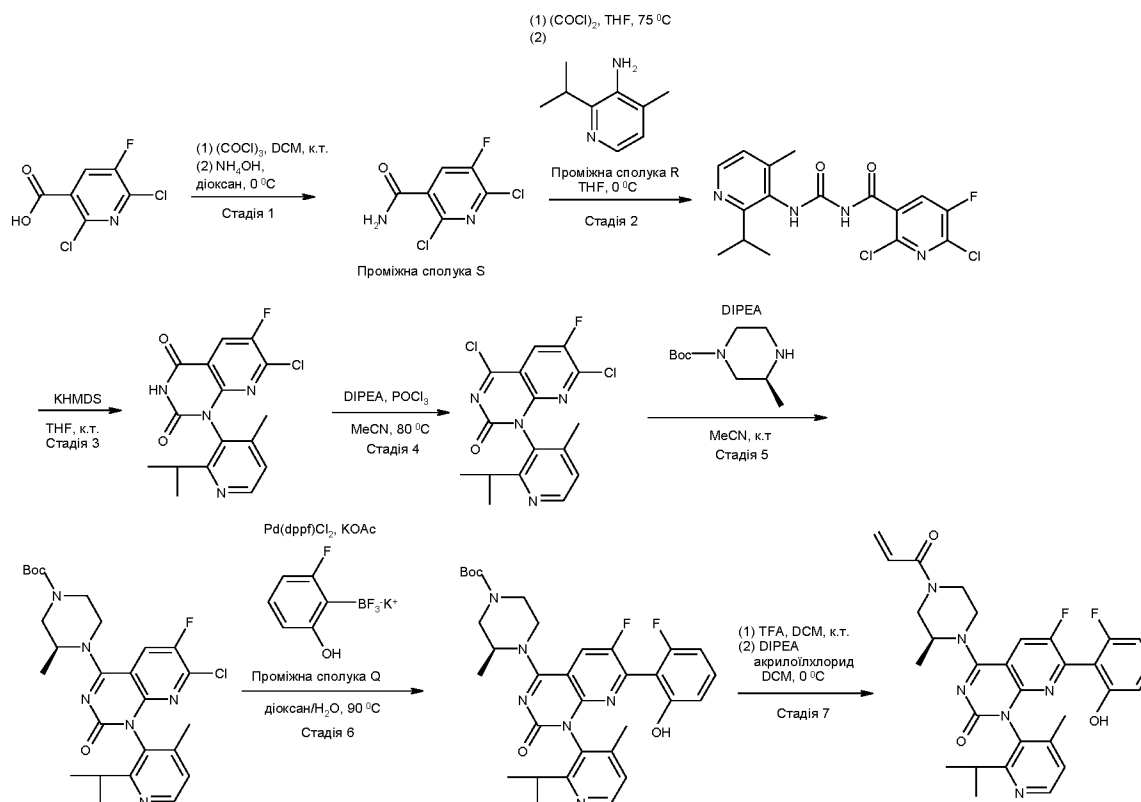
СИНТЕЗ AMG 510

Інгібітори KRAS^{G12C} за даним винаходом включають розкриті в опублікованій РСТ заявці



WO 2018/119183. Синтез AMG 510, що має структуру , викладений в U.S.S.N. 15/984855, яка подана 21 травня 2018 року, в якій заявляється пріоритет і перевага попередньої заявки № 62/509629, поданої 22 травня 2017 року, як описано нижче.

6-Фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(4-метил-2-(2-пропаніл)-3-піридиніл)-4-((2S)-2-метил-4-(2-пропеноїл)-1-піперазиніл)піридо[2,3-d]піримідин-2(1H)-он одержували з використанням наступного способу, у якому кінцевий продукт відокремлювали для виділення М-атропоізомеру.



Стадія 1. 2,6-Дихлор-5-фторнікотинамід (проміжна сполука S). До суміші 2,6-дихлор-5-фторнікотинової кислоти (4,0 г, 19,1 ммоль, AstaTech Inc., Брістоль, Пенсильванія, США) у дихлорометані (48 мл) додавали оксалілхлорид (2 М розчин у DCM, 11,9 мл, 23,8 ммоль) з наступним додаванням каталітичної кількості DMF (0,05 мл). Реакційну суміш перемішували за кімнатної температури протягом ночі, а потім концентрували. Залишок розчиняли в 1,4-діоксані (48 мл) та охолоджували до 0 °С. Повільно додавали розчин гідроксиду амонію (основа 28,0-30 % NH₃, 3,6 мл, 28,6 ммоль) за допомогою шприца. Одержану суміш перемішували за 0 °С протягом 30 хв., а потім концентрували. Залишок розбавляли за допомогою суміші 1:1 EtOAc/гептан та струшували протягом 5 хв., потім фільтрували. Відфільтровані тверді речовини відкидали та вихідний розчин, що залишився, частково концентрували до половини об'єму та фільтрували. Відфільтровані тверді речовини промивали за допомогою гептану та висушували в печі зі зниженим тиском (45 °С) упродовж всієї ночі з одержанням 2,6-дихлор-5-фторнікотинаміду. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 8,23 (d, J = 7,9 Гц, 1 H) 8,09 (br s, 1

H) 7,93 (br s, 1 H). маса/заряд (ESI, +ve ion): 210,9 (M+H)⁺.

Стадія 2. 2,6-Дихлор-5-фтор-N-((2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)карбамоїл)нікотинамід. До охолодженої льодом зависі 2,6-дихлор-5-фторнікотинаміду (проміжна сполука S, 5,0 г, 23,9 ммоль) у THF (20 мл) повільно додавали оксалілхлорид (2 М розчин у DCM, 14,4 мл, 28,8 ммоль) за допомогою шприца. Одержану суміш нагрівали за 75 °С протягом 1 год., потім нагрівання зупиняли та реакційну суміш концентрували до половини об'єму. Після охолодження до 0 °С додавали THF (20 мл) із наступним додаванням краплинами розчину 2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-аміну (проміжна сполука R, 3,59 г, 23,92 ммоль) у THF (10 мл) за допомогою канюлі. Одержану суміш перемішували за 0 °С протягом 1 год., а потім гасили за допомогою суміші 1:1 сольового розчину та насиченого водного розчину хлориду амонію. Суміш екстрагували за допомогою EtOAc (3x) й об'єднані органічні шари висушували над безводним сульфатом натрію та концентрували із одержанням 2,6-дихлор-5-фтор-N-((2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)карбамоїл)нікотинаміду. Цей матеріал застосовували на наступній стадії без додаткового очищення. Маса/заряд (ESI, +ve ion): 385,1 (M+H)⁺.

Стадія 3. 7-Хлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)піrido[2,3-d]піримідин-2,4-(1H,3H)-діон. До охолодженого льодом розчину 2,6-дихлор-5-фтор-N-((2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)карбамоїл)нікотинаміду (9,2 г, 24,0 ммоль) у THF (40 мл) повільно додавали KHMDS (1 М розчин у THF, 50,2 мл, 50,2 ммоль) за допомогою шприца. Льодяну баню видаляли та одержану суміш перемішували протягом 40 хв. за кімнатної температури. Реакційну суміш гасили за допомогою насиченого водного розчину хлориду амонію та екстрагували за допомогою EtOAc (3x). Об'єднані органічні шари висушували над безводним сульфатом натрію й концентрували. Залишок очищали за допомогою хроматографії на силікагелі (елюент: 0-50 % 3:1 EtOAc-EtOH/гептан) з одержанням 7-хлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)піrido[2,3-d]піримідин-2,4-(1H,3H)діону. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 12,27 (br s, 1H), 8,48-8,55 (m, 2 H), 7,29 (d, J = 4,8 Гц, 1 H), 2,87 (quin, J = 6,6 Гц, 1 H), 1,99-2,06 (m, 3 H), 1,09 (d, J = 6,6 Гц, 3 H), 1,01 (d, J = 6,6 Гц, 3 H). ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-d₆) δ: -126,90 (s, 1 F). маса/заряд (ESI, +ve ion): 349,1 (M+H)⁺.

Стадія 4. 4,7-Дихлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)піrido[2,3-d]піримідин-2(1H)-он. До розчину 7-хлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)піrido[2,3-d]піримідин-2,4-(1H,3H)діону (4,7 г, 13,5 ммоль) і DIPEA (3,5 мл, 20,2 ммоль) в ацетонітрилі (20 мл) краплинами додавали оксихлорид фосфору (1,63 мл, 17,5 ммоль) за допомогою шприца. Одержану суміш нагрівали за 80 °С протягом 1 год., а потім охолоджували до кімнатної температури та концентрували з одержанням 4,7-дихлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)піrido[2,3-d]піримідин-2(1H)-ону. Цей матеріал застосовували на наступній стадії без додаткового очищення. Маса/заряд (ESI, +ve ion): 367,1 (M+H)⁺.

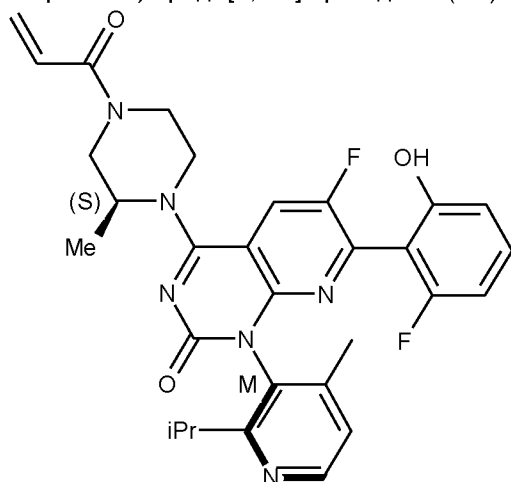
Стадія 5. (S)-трет-Бутил-4-(7-хлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл)-3-метилпіперазин-1-карбоксилат. До охолодженого льодом розчину 4,7-дихлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)піrido[2,3-d]піримідин-2(1H)-ону (13,5 ммоль) в ацетонітрилі (20 мл) додавали DIPEA (7,1 мл, 40,3 ммоль) із наступним додаванням (S)-4-N-Вос-2-метилпіперазину (3,23 г, 16,1 ммоль, Combi-Blocks, Inc., Сан-Дієго, Каліфорнія, США). Одержану суміш нагрівали до кімнатної температури та перемішували протягом 1 год., потім розбавляли за допомогою холодного насиченого водного розчину бікарбонату натрію (200 мл) та EtOAc (300 мл). Суміш перемішували протягом додаткових 5 хв., шари розділяли та водний шар екстрагували за допомогою додаткової кількості EtOAc (1x). Об'єднані органічні шари висушували над безводним сульфатом натрію й концентрували. Залишок очищали за допомогою хроматографії на силікагелі (елюент: 0-50 % EtOAc/гептан) з одержанням (S)-трет-бутил-4-(7-хлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл)-3-метилпіперазин-1-карбоксилату. Маса/заряд (ESI, +ve ion): 531,2 (M+H)⁺.

Стадія 6. (3S)-трет-Бутил-4-(6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл)-3-метилпіперазин-1-карбоксилат. Суміш (S)-трет-бутил-4-(7-хлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл)-3-метилпіперазин-1-карбоксилату (4,3 г, 8,1 ммоль), трифтор(2-фтор-6-гідроксифеніл)борату калію (проміжна сполука Q, 2,9 г, 10,5 ммоль), ацетату калію (3,2 г, 32,4 ммоль) та [1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладію(II), комплексу з дихлорометаном (661 мг, 0,81 ммоль) в 1,4-діоксані (80 мл) дегазували за допомогою азоту протягом 1 хв. Додавали дезоксигеновану воду (14 мл) та одержану суміш нагрівали за 90 °С протягом 1 год. Забезпечували охолодження реакційної суміші до кімнатної температури, гасили її за допомогою напівнасиченого водного розчину бікарбонату натрію та екстрагували за допомогою EtOAc (2x) та DCM (1x). Об'єднані органічні шари висушували над безводним сульфатом натрію й концентрували. Залишок очищали за допомогою хроматографії на силікагелі (елюент: 0-60 % 3:1 EtOAc-EtOH/гептан) з одержанням (3S)-трет-бутил-4-(6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл)-3-метилпіперазин-1-карбоксилату. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 10,19 (br s, 1 H), 8,38 (d, J = 5,0 Гц, 1 H), 8,26 (dd, J = 12,5, 9,2 Гц, 1 H), 7,23-7,28 (m, 1 H), 7,18 (d, J = 5,0 Гц, 1 H), 6,72 (d, J = 8,0 Гц, 1 H), 6,68 (t, J = 8,9 Гц, 1 H), 4,77-4,98 (m, 1 H), 4,24 (br t, J = 14,2 Гц, 1 H), 3,93-4,08 (m, 1 H), 3,84 (br d, J=12,9 Гц, 1 H), 3,52-3,75 (m, 1 H), 3,07-3,28 (m, 1 H), 2,62-2,74 (m, 1 H), 1,86-1,93 (m, 3 H), 1,43-1,48 (m,

9 H), 1,35 (dd, J = 10,8, 6,8 Гц, 3 H), 1,26-1,32 (m, 1 H), 1,07 (dd, J = 6,6, 1,7 Гц, 3 H), 0,93 (dd, J = 6,6, 2,1 Гц, 3 H). ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-d₆) δ: -115,65 (s, 1 F), -128,62 (s, 1 F). маса/заряд (ESI, +ve іон): 607,3 (M+H)⁺.

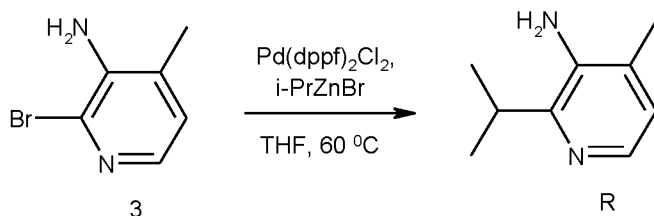
Стадія 7. 6-Фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(4-метил-2-(2-пропаніл)-3-піридиніл)-4-((2S)-2-метил-4-(2-пропеніл)-1-піперазиніл)піrido[2,3-d]піримідин-2(1H)-он. Трифтороцтову кислоту (25 мл, 324 ммоль) додавали до розчину (3S)-трет-бутил-4-(6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл)-3-метилпіперазин-1-карбоксилату (6,3 г, 10,4 ммоль) у DCM (30 мл). Одержану суміш перемішували за кімнатної температури протягом 1 год., а потім концентрували. Залишок розчиняли в DCM (30 мл), прохолоджували до 0 °C і послідовно обробляли за допомогою DIPEA (7,3 мл, 41,7 ммоль) і розчину акрилоїлхлориду (0,849 мл, 10,4 ммоль) у DCM (3 мл; додавали краплями за допомогою шприца). Реакційну суміш перемішували за 0 °C протягом 10 хв., потім гасили за допомогою напівнасиченого водного розчину бікарбонату натрію й екстрагували за допомогою DCM (2х). Об'єднані органічні шари висушували над безводним сульфатом натрію й концентрували. Хроматографічне очищення залишку (силікагель, елюент: 0-100 % EtOAc-EtOH (3:1)/гептан) з наступним хіральним розділенням із використанням високоефективної рідинної хроматографії (Chiralpak IC, 30 × 250 мм, 5 мкм, 55 % MeOH/CO₂, 120 мл/хв., 102 бари; збирали сполуку першого елюйованого піка) забезпечувало отримання AMG 510 (2,25 г, вихід 43 %). 6-Фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(4-метил-2-(2-пропаніл)-3-піридиніл)-4-((2S)-2-метил-4-(2-пропеніл)-1-піперазиніл)піrido[2,3-d]піримідин-2(1H)-он. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 10,20 (s, 1 H), 8,39 (d, J = 4,8 Гц, 1 H), 8,24-8,34 (m, 1 H), 7,23-7,32 (m, 1 H), 7,19 (d, J = 5,0 Гц, 1 H), 6,87 (td, J = 16,3, 11,0 Гц, 1 H), 6,74 (d, J = 8,6 Гц, 1 H), 6,69 (t, J = 8,6 Гц, 1 H), 6,21 (br d, J = 16,2 Гц, 1 H), 5,74-5,80 (m, 1 H), 4,91 (br s, 1 H), 4,23-4,45 (m, 2 H), 3,97-4,21 (m, 1 H), 3,44-3,79 (m, 2 H), 3,11-3,31 (m, 1 H), 2,67-2,77 (m, 1 H), 1,91 (s, 3 H), 1,35 (d, J = 6,8 Гц, 3 H), 1,08 (d, J = 6,6 Гц, 3 H), 0,94 (d, J = 6,8 Гц, 3 H). ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-d₆) δ ppm -115,64 (s, 1 F), -128,63 (s, 1 F). маса/заряд (ESI, +ve іон): 561,2 (M+H)⁺.

AMG 510, як зазначено в даному документі, являє собою М-атропоізомер 6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(4-метил-2-(2-пропаніл)-3-піридиніл)-4-((2S)-2-метил-4-(2-пропеніл)-1-піперазиніл)піrido[2,3-d]піримідин-2(1H)-ону, що характеризується формулою



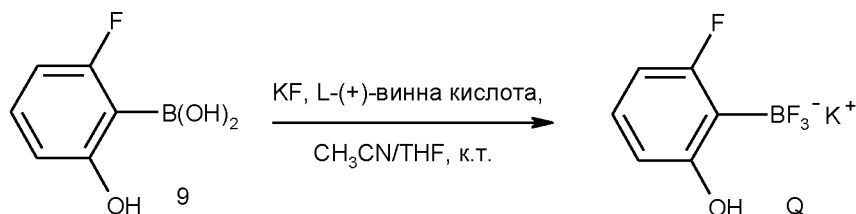
, або його фармацевтично прийнятну сіль.

Синтез проміжних сполук



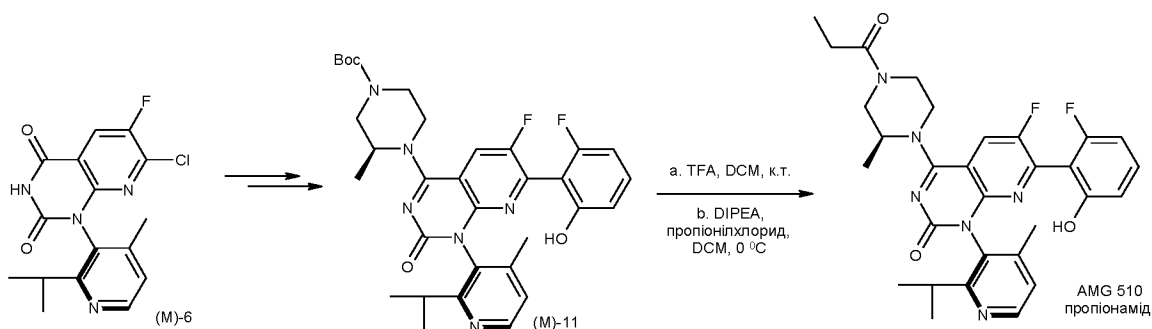
2-Ізопропіл-4-метилпіридин-3-амін (R). Додавали комплекс [1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладію(II) з дихлорометаном (79 мг, 0,10 ммоль) у суспензію 3-аміно-2-бром-4-піколіну (3; 360 мг, 1,9 ммоль, Combi-Blocks, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) у THF (4 мл) та отриману суміш продували аргоном упродовж 2 хв. Додавали 2-пропілцинк бромід (0,5 М розчин у THF, 5,40 мл, 2,7 ммоль) та отриманий розчин нагрівали за 60 °C протягом 17 год., потім залишали для охолодження до кімнатної температури. Додавали воду (10 мл) і 1 н. водний розчин NaOH (20 мл) та отриману суміш екстрагували за допомогою EtOAc (2х). Об'єднані органічні шари висушували над

безводним сульфатом натрію й концентрували in vacuo. Хроматографічне очищення залишку (силікагель, елюент: 0-15 % MeOH/DCM) забезпечувало R (284 мг, вихід 98 %). ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 7,66 р.р.м. (d, J = 4,6 Гц, 1H), 6,78 (d, J = 4,8 Гц, 1H), 4,72 (br s, 2H), 3,14-3,25 (m, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,14 (d, J = 6,8 Гц, 6H); маса/заряд (ESI, +ve іон): 151,1 (M+H)⁺.



(2-Фтор-6-гідроксифеніл)калію трифторборат (Q). Розчин фториду калію (44,7 г, 770 ммоль) у воді (75 мл) додавали до суспензії (2-фтор-6-гідроксифеніл)боронової кислоти (9; 30 г, 192 ммоль, Combi-Blocks, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) в ацетонітрилі (750 мл). Через 2 хв. перемішування додавали протягом 10 хв. розчин L-(+)-винної кислоти (72,2 г, 481 ммоль) у THF (375 мл). Отриману суміш механічно перемішували протягом 1 год. Суспендовану тверду речовину видаляли фільтрацією та промивали невеликою кількістю THF. Потім об'єднаний фільтрат частково концентрували in vacuo до початку осадження твердих речовин. Фільтрат охолоджували до -20 °C і перемішували протягом 16 год., потім повільно нагрівали до температури навколишнього середовища. Додавали 2-пропанол (20 мл) та осаджені тверді речовини збирали шляхом фільтрації та промивали 2-пропанолом з одержанням 27,5 г твердої речовини. Фільтрат знову частково концентрували (до спостереження осадження), охолоджували до -20 °C і перемішували протягом 20 хв. Додавали додаткову кількість 2-пропанолу та осаджену тверду речовину збирали шляхом фільтрації та промивали 2-пропанолом. Дві партії твердої речовини об'єднували з одержанням Q (34,6 г, вихід 82 %). ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,07 р.р.м. (q, J = 14,7 Гц, 1H), 6,93 (q, J = 7,5 Гц, 1H), 6,30-6,38 (m, 2H).

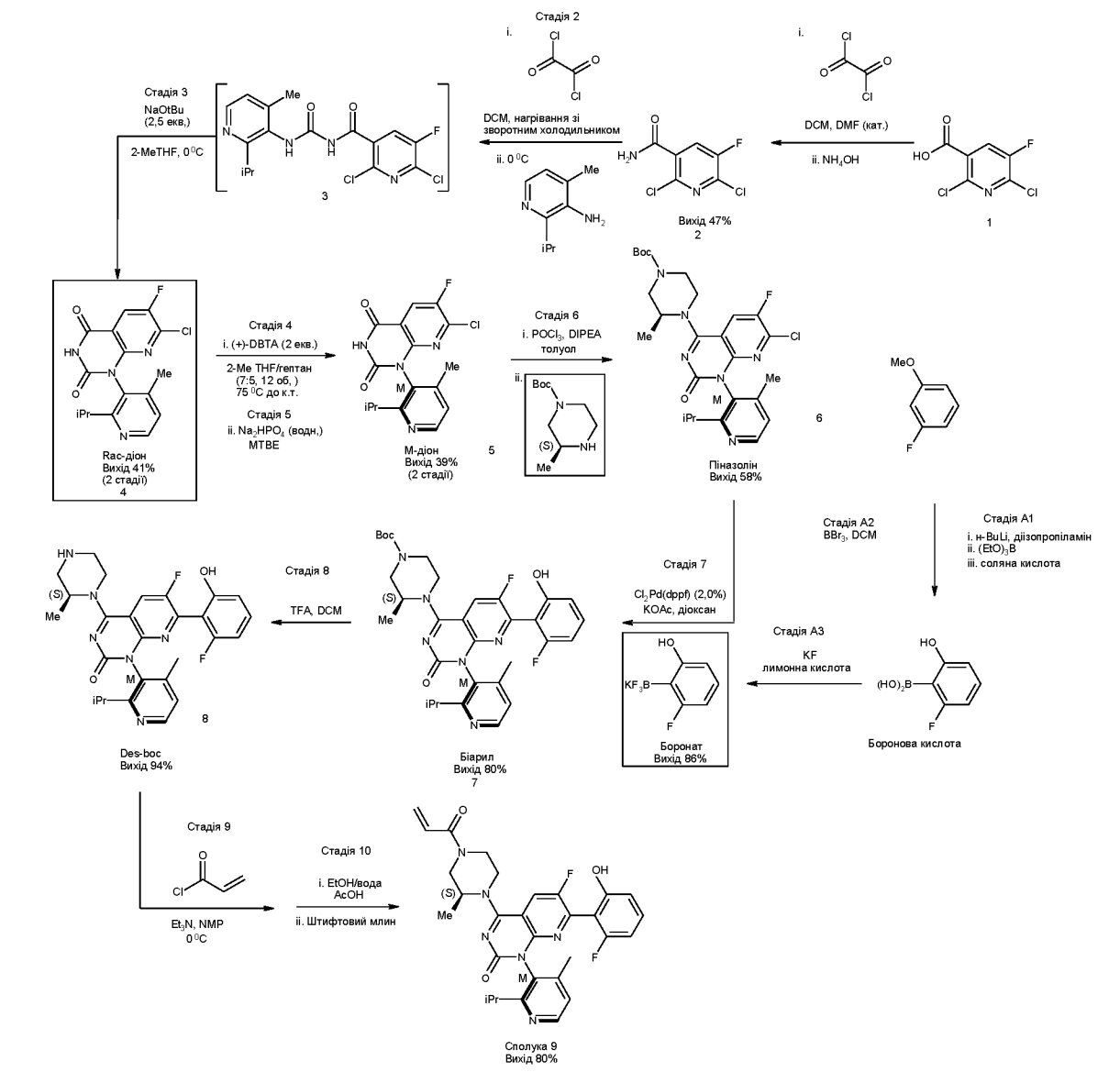
Синтез пропіонаміду AMG 510



(M)-6 та (M)-11. Рацемічну сполуку 6 розділяли за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (Chiralpak AD, 21 × 250 мм, 5 мкм, 40 % MeOH/CO₂, 80 мл/хв., 110 бар; збирали сполуку другого елюйованого піку) з одержанням (M)-6, яку перетворювали на (M)-11 з використанням процедур, що описані в літературі для рацемічних субстратів.

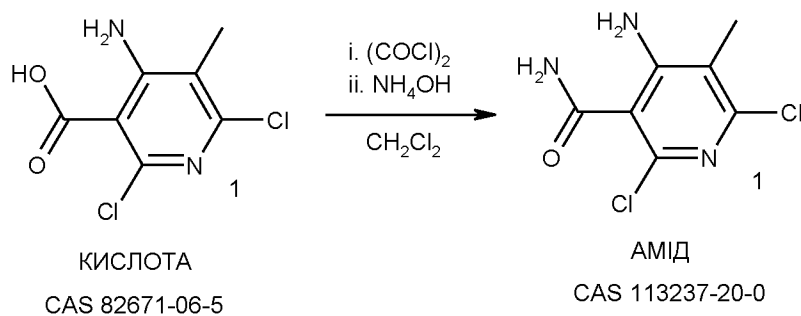
(M)-6-Фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(4-метил-2-(2-пропаніл)-3-піридиніл)-4-((2S)-2-метил-4-пропаноіл-1-піперазиніл)піридо[2,3-d]пиримідин-2(1H)-он (пропіонамід AMG 510). Трифтороцтову кислоту (4,0 мл, 51,9 ммоль) додавали до розчину (M)-11 (0,196 г, 0,323 ммоль) у DCM (5 мл) та отриману суміш перемішували за кімнатної температури протягом 20 хв. Потім суміш концентрували in vacuo та забезпечували поглинання залишку в DCM (10 мл), охолоджували до 0 °C і послідовно обробляли за допомогою DIPEA (0,169 мл, 0,969 ммоль) та пропіонілхлориду (0,016 мл, 0,194 ммоль). Одержану суміш перемішували за 0 °C протягом 10 хв., потім розбавляли насиченим водним розчином бікарбонату натрію та екстрагували за допомогою DCM (2х). Об'єднані екстракти висушували над безводним сульфатом натрію та концентрували in vacuo. Хроматографічне очищення залишку (силікагель, елюент: 0-70 % EtOAc-EtOH (3:1)/гептан) забезпечувало одержання AMG 510 пропіонамід (0,180 г, вихід 99 %). ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 10,20 р.р.м (s, 1H), 8,40 (d, J=5,0 Гц, 1H), 8,27 (br dd, J=15,1, 9,3 Гц, 1H), 7,27 (m, 1H), 7,21 (br d, J=4,8 Гц, 1H), 6,73 (d, J=8,3 Гц, 1H), 6,69 (t, J=8,9 Гц, 1H), 4,87 (br s, 1H), 4,31 (m, 1,5H), 4,21 (br d, J=13,5 Гц, 0,5H), 3,94 (br d, J=12,2 Гц, 0,5H), 3,82 (br d, J=13,3 Гц, 0,5H), 3,62-3,76 (m, 1H), 3,52-3,62 (m, 0,5H), 3,43-3,51 (m, 0,5H), 3,18 (br dd, J=13,3, 3,3 Гц, 0,5H), 3,06 (br t, J=10,7 Гц, 0,5H), 2,73 (br dd, J=10,5, 6,1 Гц, 1H), 2,33-2,48 (m, 2H), 1,91 (s, 3H), 1,29-1,42 (m, 3H), 0,98-1,12 (m, 6H), 0,94 (d, J=6,6 Гц, 3H); маса/заряд (ESI, +ve іон): 563,2 (M+H)⁺.

В альтернативному способі синтезували AMG 510 і відповідні проміжні сполуки описані в попередній заявці на патент США № 62/768802, поданій 16 листопада 2018 року. Альтернативний спосіб передбачає наступні стадії, де розділення гас-діону на стадіях 4 та 5 забезпечує успішне розділення атропоізомерів.



Опис способу

Стадія 1

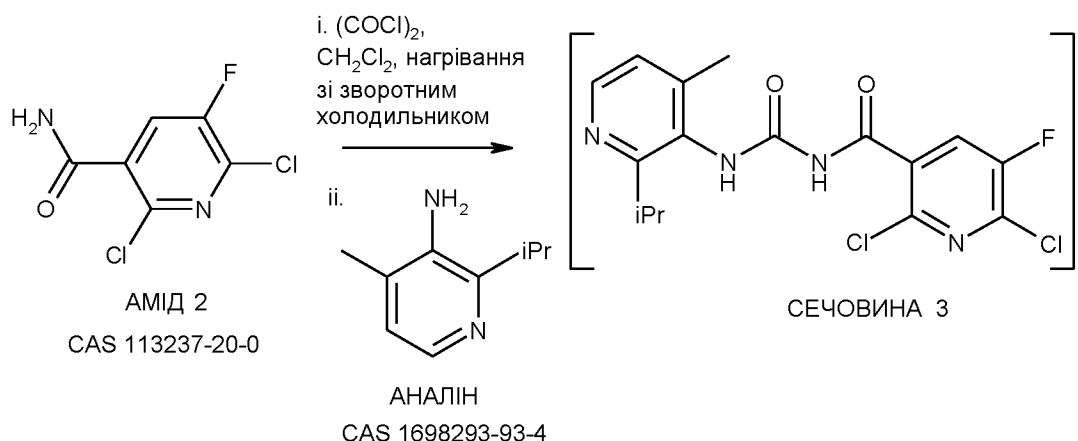


Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єми	Молі	Теоретична кількість
2,6-Дихлор-5-фтор-3-піридинкарбонова кислота	82671-06-5	209,99	1,0 екв.	119,1	25 кг

DCM	74-09-2	84,93	16,51 екв.	2354,9	200 кг
DMF	68-12-2	73,09	0,068 екв.	8,1	592 г (627 мл)
Оксалілхлорид	79-37-8	126,93	1,25 екв.	148,9	18,9 кг
Гідроксид амонію	1336-21-6	35,05	5 екв.	595,5	40,2 л
Вода	7732-18-5	18,02	н. д.	н. д.	261 л

У розчин 2,6-дихлор-5-фтор-3-піридинкарбонової кислоти (сполука 1) (25 кг, 119,1 моль) у дихлорметані (167 кг) та DMF (592 г) додавали оксалілхлорид (18,9 кг, 148,9 моль), підтримуючи при цьому внутрішню температуру на рівні від 15 до 20 °С. Додавали додаткову кількість дихлорметану (33 кг) як рідини для промивання і реакційну суміш перемішували протягом 2 год. Реакційну суміш охолоджували, потім гасили гідроксидом амонію (40,2 л; 595,5 моль), підтримуючи при цьому внутрішню температуру на рівні 0 ± 10 °С. Отриману суспензію перемішували протягом 90 хв., потім продукт збирали за допомогою фільтрації. Відфільтровані тверді речовини промивали деіонізованою водою (3 X 87 л) та висушували з одержанням 2,6-дихлор-5-фторнікотинаміду (сполука 2).

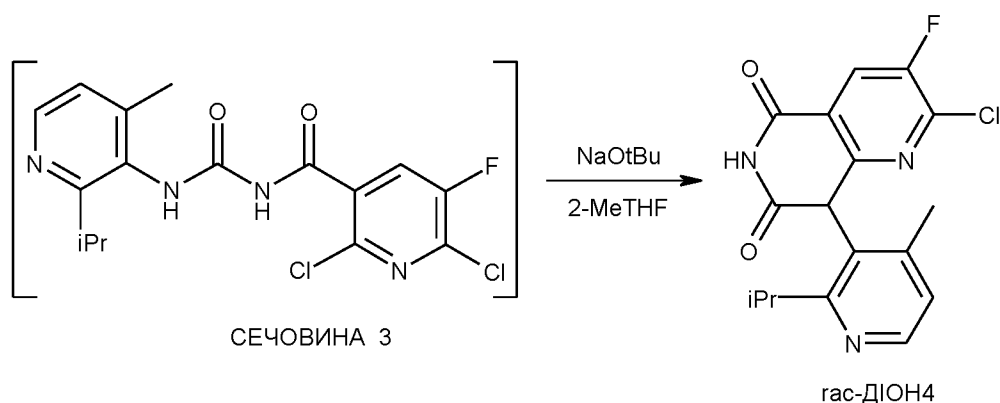
Стадія 2



Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єми	Молі	Теоретична кількість
Амід (2,6-дихлор-5-фторнікотинамід)	113237-20-0	209,99	1,0 екв.	77,8	16,27 кг
Оксалілхлорид	79-37-8	126,93	1,2 екв.	93,8	11,9 кг (7,9 л)
Дихлорметан	75-09-2	84,93	н. д.	н. д.	730,7 кг (551,5 л)
DCM розчин аніліну 2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-амін	1698293-93-4	150,22	1,1 екв.	85,9	12,9 кг (вага аніліну, що вміщується)

У реактор А у розчин 2,6-дихлор-5-фторнікотинаміду (сполука 2) (16,27 кг, 77,8 моль) у дихлорметані (359,5 кг) додавали оксалілхлорид (11,9 кг, 93,8 моль) за підтримки температури на рівні ≤ 25 °С протягом 75 хв. Потім отриманий розчин нагрівали до 40 °С ± 3 °С і витримували протягом 3 год. Розчин дистильовали з використанням вакууму з видаленням дихлорметану доти, доки рівень розчину не виявлявся нижче від мішалки. Потім додавали дихлорметан (300 кг) і суміш охолоджували до 0 ± 5 °С. У чистий сухий реактор (реактор В) додавали 2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-амін (ANILINE) (12,9 кг; 85,9 моль), а потім дихлорметан (102,6 кг). Розчин аніліну азеотропно висушували за допомогою вакуумної дистиляції за підтримки внутрішньої температури на рівні від 20 до 25 °С із заміщенням додатковою кількістю дихлорметану до досягнення висушування розчину відповідно до аналізу KF (межа ≤ 0,05 %). Об'єм розчину дихлорметаном доводили до об'єму приблизно 23 л. Потім у реактор А додавали висушений розчин аніліну за підтримки внутрішньої температури на рівні 0 ± 5 °С протягом усієї процедури додавання. Потім суміш нагрівали до 23 °С і витримували протягом 1 год., розчин остаточно фільтрували у чистий реактор з одержанням 2,6-дихлор-5-фтор-N-((2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)карбамоіл)нікотинаміду (сполука 3) у вигляді розчину в DCM і використовували безпосередньо на наступній стадії.

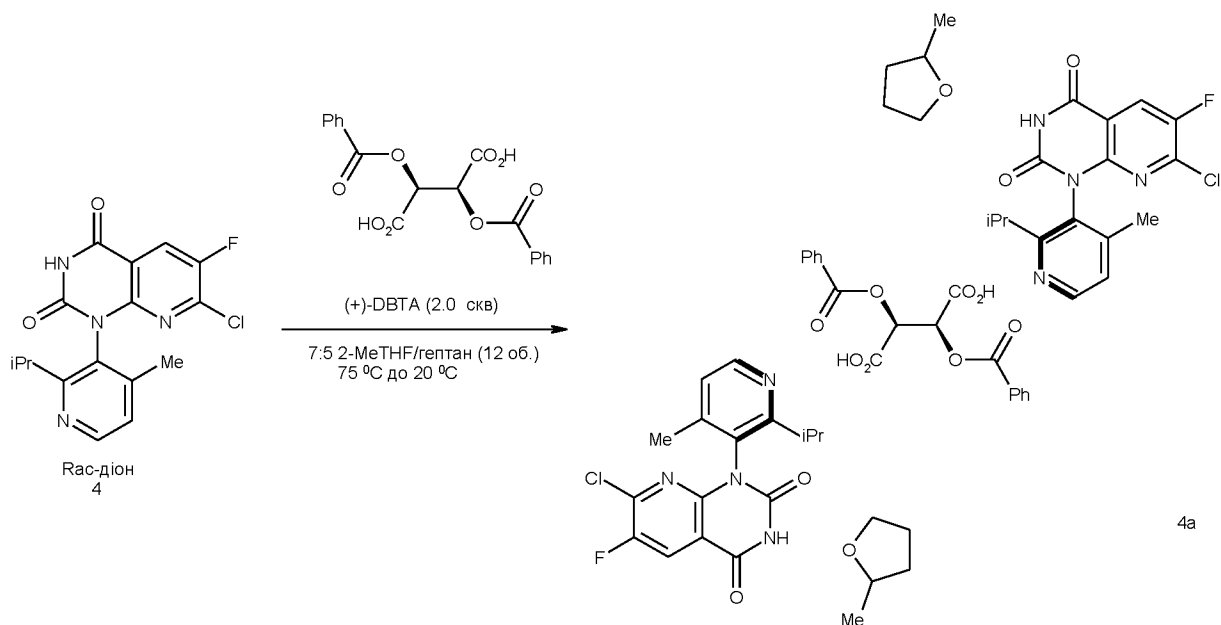
Стадія 3



Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єми	Моля	Теоретична кількість
Сечовина, розчин у DCM 2,6-дихлор-5-фтор-N-[[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]карбамоїл]піридин-3-карбоксамід	н. д.	385,22	1,0 екв.	38,9	208,3 кг (15 кг вміщеної ваги)
2-метилтетрагідрофуран	96-47-9	86,13	н. д.	н. д.	308 кг (358 л)
Трет-бутоксид натрію	865-48-5	96,11	2,0 екв.	97,8	9,4 кг
Хлорид амонію	12125-02-9	53,49	н. д.	430	23,0 кг
Хлороводнева кислота	7467-01-0	36,46	н. д.	41	1,6 кг
Сульфат магнію	7487-88-9	120,37	н. д.	195	23,5 кг
Хлорид натрію	7647-14-5	58,44	н. д.	282	16,5 кг
Гептан	142-82-5	100,21	н. д.	н. д.	94 л
10 % лимонна кислота					75 кг

У розчині 2,6-дихлор-5-фтор-N-[[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]карбамоїл]піридин-3-карбоксаміду в дихлорометані (UREA (сполука 3)) (15 кг вміщеної ваги, 38,9 моль) розчинник заміняли на 2-МеТНФ з використанням вакуумної дистиляції за підтримки внутрішньої температури на рівні 20-25 °С. Об'єм у реакторі доводили до 40 л, а потім завантажували додаткову кількість 2-МеТНФ (105,4 кг). Додавали трет-бутоксид натрію (9,4 кг; 97,8 моль) за підтримки 5-10 °С. Уміст нагрівали до 23 °С і перемішували протягом 3 год. Потім вміст охолоджували до 0-5 °С і додавали хлорид амонію (23,0 кг; 430 моль) у вигляді розчину в 60 л деіонізованої води. Суміш нагрівали до 20 °С і додавали деіонізовану воду (15 л) і додатково витримували протягом 30 хв. Перемішування зупиняли і шари розділяли. Водний шар видаляли і в органічний шар додавали деіонізовану воду (81,7 л). Одержували суміш конц. HCl (1,5 кг) і води (9 л), потім повільно додавали її в реактор доти, доки вимірюване значення рН не досягло 4-5. Шари розділяли і водний шар піддавали зворотній екстракції з використанням 2-МеТНФ (42,2 кг). Два органічні шари об'єднували та промивали 10 % розчином лимонної кислоти (75 кг), а потім сумішшю води (81,7 л) і насиченого NaCl (19,8 кг). Потім органічний шар промивали насиченим бікарбонатом натрію (75 кг), повторюючи у разі потреби, до досягнення цільового рівня рН водного розчину, що становить $\geq 7,0$. Органічний шар знову промивали сольовим розчином (54,7 кг), а потім висушували над сульфатом магнію (5 кг). Суміш фільтрували для видалення сульфату магнію, промиваючи фільтрований шар за допомогою 2-МеТНФ (49,2 кг). Об'єднаний фільтрат та змиви дистилювали з використанням вакууму до об'єму 40 л. Концентрований розчин нагрівали до 55 °С і повільно додавали гептан (10-12 кг) до досягнення точки помутніння. Розчин охолоджували до 23 °С протягом 2 год., потім додавали гептан (27,3 кг) упродовж 2 год. Завись продукту витримували протягом 3 год. за 20-25 °С, потім фільтрували та промивали сумішшю 2-МеТНФ (2,8 кг) і гептану (9 кг). Продукт висушували із використанням азоту та вакууму з одержанням твердого 7-хлор-6-фтор-1-(2-ізопропіл-4-метилпіридин-3-іл)піридо[2,3-d]піримідин-2,4(1H,3H)-діону (rac-діону (сполука 4)).

Стадія 4



Співкристал м-дїон DBTA

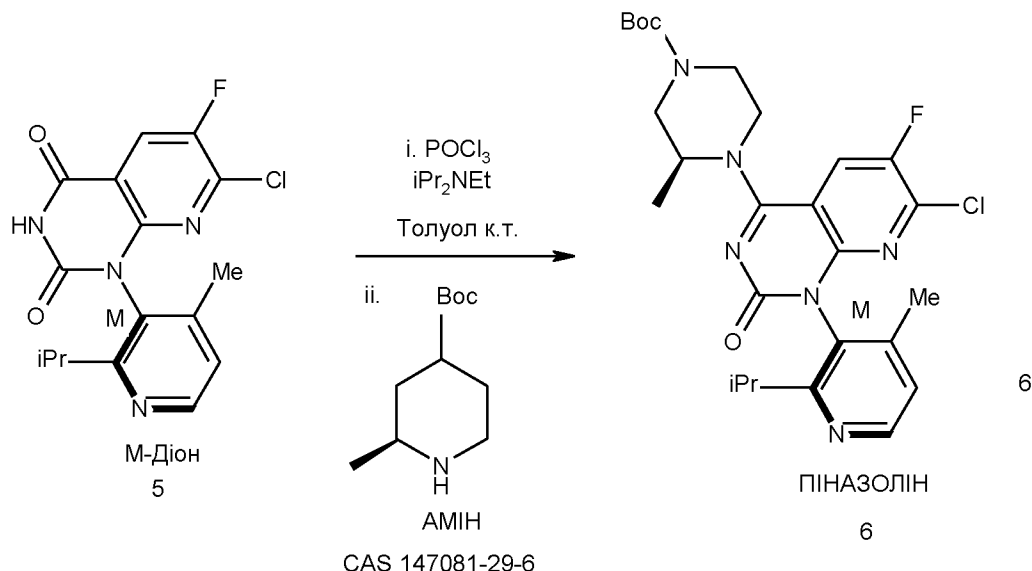
Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єм и	Моля	Теоретична кількість
Рас-дїон	н. д.	348,76	1,0	-	-
(+)-2,3-дїбензоїл-D-винна кислота	17026-42-5	358,30	2,0	-	-
2-Метилтетрагїдрофуран	96-47-9	86,13	7,0	-	-
Гептан	142-82-5	100,21	2,0	-	-
Гептан	142-82-5	100,21	3,0	-	-
2-Метилтетрагїдрофуран	96-47-9	86,13	4,0	-	-
Гептан	142-82-5	100,21	2,0	-	-

У посудину із суспензією сполуки 4 (1,0 екв.) у 2-метилтетрагїдрофурані (7,0 л/кг), що перемішувалася, додавали (+)-2,3-дїбензоїл-D-винну кислоту (2,0 екв.) в атмосфері азоту. 2-МеТНФ є хїральним, але його застосовують як рацемічну суміш. Рїзні енантіомери 2-МеТНФ випадковим чином включені до співкристала. Отриману суспензію нагїрвали до 75 °С і витримували за 75 °С доти, доки не спостерїгали повне розчинення (≤ 30 хв.). Отриманий розчин остаточно фільтрували за 75 °С у другу посудину. В остаточно відфільтрований розчин завантажували н-гептан (2,0 л/кг) за швидкості, яка забезпечувала підтримку внутрішньої температури вище від 65 °С. Потім розчин охолоджували до 60 °С, вводили затравку із кристалів (0,01 кг/кг) і залишали для відстоювання упродовж 30 хвилин. Отриману суспензію охолоджували до 20 °С протягом 4 годин, а потім відбирали зразки для аналізу хїральної чистоти за допомогою HPLC. У суспензію завантажували н-гептан (3,0 л/кг), а потім витримували протягом 4 годин при 20 °С в атмосфері азоту. Суспензію фільтрували й виділені тверді речовини два рази промивали за допомогою розчину (2:1) н-гептану:2-метилтетрагїдрофурану (3,0 л/кг). Матеріал висушували за допомогою азоту й вакууму з одержанням комплексу М-дїон:DBTA: Ме-ТНФ (сполука 4a).

стосовно відповідності як вихідного матеріалу. Одержували 7-хлор-6-фтор-(1М)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]піридо[2,3-д]піримідин-2,4(1Н,3Н)-діон (М-діон), сполуку 5М.

Вищезгаданий спосіб першого покоління успішно масштабували на 200+ кг вихідного матеріалу гас-діону (сполуки 5). У цьому способі затравлювання кристалізації з термодинамічно стабільною кристалічною формою гас-діону (яка проявляє низьку розчинність) може спричинити непридатність партії. На основі наступних досліджень автори даного винаходу виявили, що збільшення еквівалентів DBTA і зниження температури затравлювання шляхом регулювання графіка завантаження гептану підвищує надійність способу. Поліпшений спосіб стійкий стосовно присутності термодинамічно стабільної кристалічної форми гас-діону та забезпечує успішне розділення атропоізомерів. Наступні партії будуть включати поліпшений спосіб для великомасштабного виготовлення.

Стадія 6

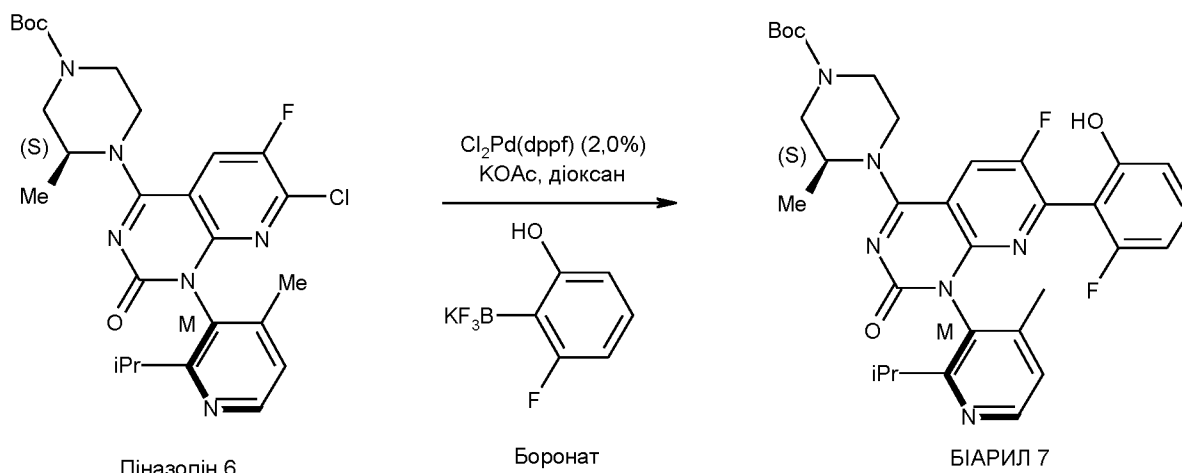


Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єм и	Молі	Теоретична кількість
М-діон	н. д.	348,76	1 екв.	9,8	3,7 кг
Толуол	108-88-3	92,14	н. д.	375	34,6 кг (40 л)
Фосфорилхлорид	10025-87-3	153,33	1,2 екв.	11,7	1,8 кг (1,1 л)
N,N-Діізопропілетиламін	7087-68-5	129,24	3,0 екв.	29,4	3,8 кг (5,1 л)
(s)-1-Бос-3-метилпіперазин	147081-29-6	200,28	1,1 екв.	10,8	2,214 кг
Бікарбонат натрію	144-55-8	84,01	н. д.	н. д.	973 г
Дихлорметан	75-09-2	84,93	н. д.	871	74 кг (55,6 л)
Хлорид натрію	7647-14-5	58,44	н. д.	103	6,0 кг
Етилацетат	141-78-6	88,11	н. д.	288	25,4 кг (28,2 л)

7-Хлор-6-фтор-(1М)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]піридо[2,3-д]піримідин-2,4(1Н,3Н)-діон (М-діон) (3,7 кг; 9,8 моль) об'єднували у реакторі (А) з 10,5 кг толуолу та переганяли в масло для видалення води за підтримки заданої температури 45 °С. Толуол (21 кг) додавали до залишку й суміш перемішували протягом 30 хв. за 40-45 °С. Уміст охолоджували до 22 °С, потім додавали фосфорилхлорид (1,8 кг; 11,7 моль). Суміш охолоджували до 0-5 °С перед додаванням N,N-діізопропілетиламіну (2,5 кг; 19,34 моль) за підтримки температури на рівні < 5 °С. Розчин витримували протягом 3 год. за 22 °С. В окремому реакторі (В) (s)-1-бос-3-метилпіперазин (2,21 кг; 10,8 моль) і N,N-діізопропілетиламін (1,26 кг; 9,75 моль) об'єднували в толуолі (6 кг), а потім завантажували в реактор (А) за підтримки температури на рівні < 25 °С. Реакційну суміш витримували протягом 15 хв. за 22 °С, потім гасили бікарбонатом натрію (973 г) у воді (12,9 л) за підтримки температури на рівні < 25 °С. Суміш перемішували протягом 30 хв., потім додавали DCM (36,8 кг), продовжуючи перемішування протягом 1 год. Забезпечували розділення шарів і нижній органічний шар зливали в реактор (С). Водний шар у реакторі (А) піддавали зворотній екстракції з використанням DCM (18,4 кг) та об'єднані органічні шари промивали сольовим розчином (6,0 кг NaCl; 16,5 кг деіонізованої води). Органічний шар дистильовали за атмосферного тиску, підтримуючи внутрішню температуру на рівні від 45 до 55 °С. DCM у ході дистильації заміняли на розчин для азеотропного сушіння. Після дистильації об'єм розчину доводили до 19 л з використанням DCM. Розчин

оохолоджували до 30 °С та остаточно фільтрували. Фільтрат об'єднували з етилацетатом (8,5 кг), а потім дистильовали за атмосферного тиску до збирання 11-13 кг у резервуарі. У розчин вводили затравку у вигляді 30 г вихідного продукту та витримували протягом 1 год. за 25-30 °С, потім додатково дистильовали за атмосферного тиску за внутрішньої температури 45-55 °С до збору 8,2 кг дистилату. Завись оохолоджували до 22 °С і витримували протягом ночі, потім додатково оохолоджували до 0-5 °С. Продукт збирали шляхом фільтрації та промивали два рази з використанням етилацетату (щоразу по 4,2 кг). Осад на фільтрі висушували за допомогою азоту й вакууму з одержанням трет-бутил-(3S)-4-{7-хлор-6-фтор-(1M)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл}-3-метилпіперазин-1-карбоксилату (сполука 6, піпазолін).

Стадія 7

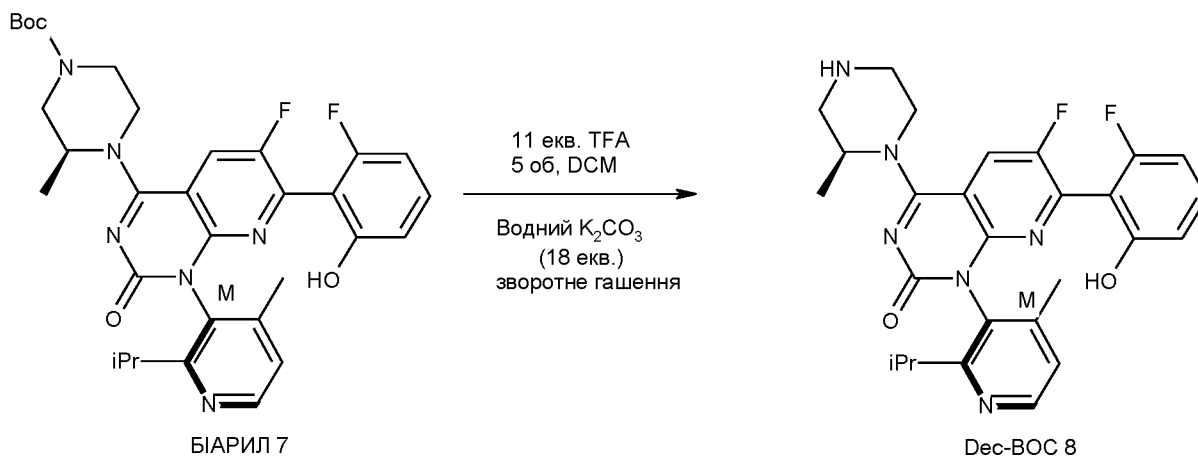


Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єми	Молі	Теоретична кількість
[1,1'-Біс(дифенілфосфіно)фероцен]дихлорпаладій(II)	72287-26-4	731,714	0,020	1,01	0,74 кг
Дихлорметан	75-09-2	84,93	-	н. д.	400 кг
1,4-Діоксан	123-91-1	88,1052	5,0	н. д.	168 кг
Дигідрат динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти	6381-92-6	336,207	1,0	45,2	15,2 кг
Гептан	142-82-5	100,21	-	-	200 кг
Азот	-	-	-	-	у необхідній кількості
Піпазолін	н. д.	531,0	1,0	45,2	24,0 кг
Ацетат калію	127-08-2	98,1417	5,0	225,99	22,2 кг
Трифтор(2-фтор-6-гідроксифеніл)борат калію	н. д.	233,03	1,20	54,24	12,6 кг
2-Пропанол	67-63-0	66,10	-	н. д.	850 кг
Si-тіол	н. д.	н. д.	-	н. д.	13,2 кг
Гідроксид натрію	1310-73-2	40,00	-	-	6,5 кг
Очищена вода класу USP	-	-	-	-	у необхідній кількості

У реактор додавали дегазований діоксан (74,2 кг), трет-бутил-(3S)-4-{7-хлор-6-фтор-(1M)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл}-3-метилпіперазин-1-карбоксилат (сполука 6, піпазолін) (24,0 кг, 45,2 моль), ацетат калію (22,2 кг, 45,2 моль) і (dppf)PdCl₂ (0,74 кг, 1,01 моль). У реакторі створювали інертну атмосферу за допомогою газоподібного азоту. Розчин продували газоподібним азотом до досягнення вмісту кисню, що становив < 500 мг/л. Реакційну суміш нагрівали до 87,5 °С. Розчин трифтор(2-фтор-6-гідроксифеніл)борату калію (12,6 кг,

54,3 моль) у дегазованому діоксані (49,4 кг) і дегазованій воді (14,4 кг) із вмістом кисню < 500 мг/л переносили в реакційну суміш, підтримуючи внутрішню температуру на рівні 82,5 °С ± 7,5 °С. Реакційну суміш доводили до 87,5 °С ± 1,5 °С і перемішували протягом 75 хв. ± 15 хв. Завантажували 1,0 М розчин EDTA (47,3 кг), а потім воду (40,1 кг) у реактор за підтримки внутрішньої температури 85 °С ± 5 °С. Реакційну суміш охолоджували до 20 °С ± 3 °С протягом > 2 год., а потім перемішували протягом > 16 год. Реакційну суміш фільтрували та неочищені тверді речовини промивали водою (3 x 120 кг). Тверді речовини промивали сумішшю гептану (28,8 кг) і 2-пропанолу (33,1 кг), а потім висушували за < 50 °С протягом > 10 год. У чистий реактор завантажували неочищені тверді речовини та дихлорметан (240 кг). Уміст перемішували за 20 °С ± 5 °С протягом > 30 хв. У реактор додавали Si-тіол (144 кг) і дихлорметан (14,9 кг). Реакційну суміш перемішували за 20 °С ± 5 °С протягом 18 год. Реакційну суміш фільтрували та промивали дихлорометаном (84 кг). Розчин дистильовали й розчинник заміняли на 2-пропанол. Реакційну суміш нагрівали до 60 °С ± 3 °С і завантажували гептан (108 кг) за підтримки температури реакційної суміші на рівні 60 °С ± 3 °С. Реакційну суміш перемішували протягом 45 хв., а потім охолоджували та перемішували за 20 °С ± 5 °С протягом 2,5 год. Реакційну суміш фільтрували та промивали сумішшю 50 % об./об. гептан/2-пропанол (61,9 кг). Виділені тверді речовини висушували за < 50 °С протягом > 12 год. з одержанням трет-бутил-(3S)-4-{6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-(1M)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл}-3-метилпіперазин-1-карбоксилату (сполука 7, біарил).

Стадія 8

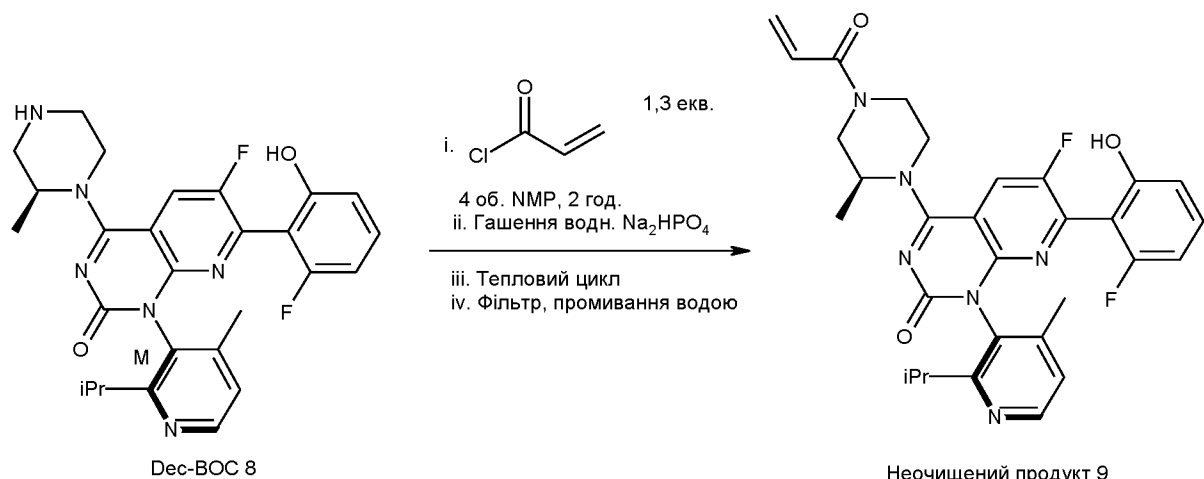


Загальна примітка. Усі еквіваленти та об'єми зазначені щодо біарилу 7.

Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єми	Молі	Теоретична кількість
Біарил 7	н. д.	606,67	1,0 екв.	5,27	2,75 кг
TFA	76-05-1	114,02	11 екв.	49,7	5,67 кг
DCM	74-09-2	84,93	5 об.	н. д.	13,71 л
Метанол	67-56-1	32,04	5 об.	н. д.	13,71 л
Вода	7732-18-5	18,02	20 об.	н. д.	54,8 л
Карбонат калію	584-08-7	138,20	18 екв.	94,91	11,24 кг
DCM	74-09-2	84,93	1 об.	н. д.	2,75 л
Вода	7732-18-5	18,02	10 об.	н. д.	27,5 л
Вода	7732-18-5	18,02	10 об.	н. д.	27,5 л

У реактор додавали трет-бутил-(3S)-4-{6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-(1M)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]-2-оксо-1,2-дигідропіrido[2,3-d]піримідин-4-іл}-3-метилпіперазин-1-карбоксилат (сполука 7, біарил) (2,75 кг, 5,27 моль), DCM (13,7 л) і TFA (5,67 кг, 49,7 моль). Реакційну суміш перемішували протягом 8-16 год. за 20 ± 5 °С. У другий реактор додавали карбонат калію (11,24 кг), воду (54,8 л) та метанол (13,7 л) для утворення гомогенного розчину. Реакційну суміш додавали в розчин карбонату калію протягом 2 год. Суміш перемішували за 20 ± 5 °С протягом ще 12 год. Отриману суспензію фільтрували та промивали водою (2 x 27,5 л). Вологий фільтраційний осад висушували протягом 24 год. з одержанням 6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-4-[(2S)-2-метилпіперазин-1-іл]-(1M)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]піrido[2,3-d]піримідин-2(1H)-ону (сполука 8, DESBOC).

Стадія 9



Загальна примітка. Усі еквіваленти та об'єми зазначені щодо Des-BOC.

Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єми	ммоль	маса	об'єм
Des-BOS	н. д.	506,56	1,0 екв.	308,4	156,25 г	-
Акрилоїлхлорид ¹	814-68-6	90,51	1,3 екв.	401,0	36,29 г	-
NMP N-Метилпіролідінон ²	872-50-4	99,13	4 об.	н. д.	-	625 мл
Вода	7732-18-5	18,02	20 об.	н. д.	3125 г	3125 мл
Na ₂ HPO ₄ ³	7558-79-4	141,96	4 екв.	1233,6	175,12 г	-
Вода	7732-18-5	18,02	20 об.	н. д.	3125 г	3,125 мл

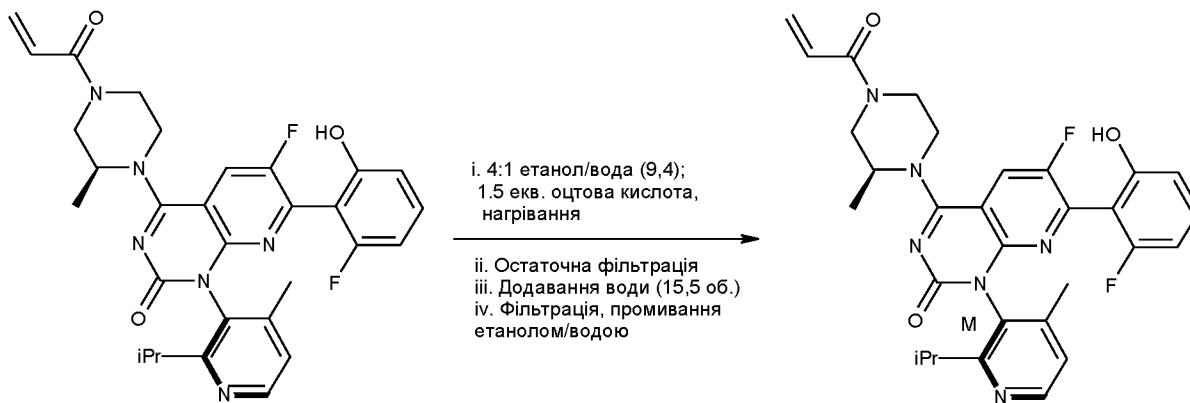
¹Акрилоїл хлорид додавали протягом 7 хв. за даного масштабу. Слід уникати надмірного переохолодження реакційної суміші. Нижчі температури реакційної суміші зумовлюють вповільнення швидкості реакції, що призводить до більш високих рівнів домішки маса/заряд 1066, оскільки вихідний матеріал реагує із продуктом. Ідеальний температурний діапазон становить 22-25 °С.

²Вміст NMP у висушеному осаді на фільтрі зазвичай становить 1-2 ваг. %.

³Гідрофосфат натрію в таблиці представлений на безводній основі. Можна використовувати гідрат, при цьому слід відповідним чином провести регулювання маси, щоб одержати необхідну кількість ммоль.

6-Фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-4-[(2S)-2-метилпіперазин-1-іл]-(1M)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]піридо[2,3-d]піримідин-2(1H)-он (сполука 8, DESBOC) (156,25 г) об'єднували з N-метилпіролідіноном (625 мл) та перемішували за температури навколишнього середовища. В отриманий розчин додавали акрилоїлхлорид (36,29 г; 401,0 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру на рівні < 30 °С. Вміст перемішували протягом 2 год. за 25 °С. В окремому реакторі одержували розчин гідрофосфату натрію (175,1 г; 1234 ммоль) у деіонізованій воді (3,1 л). Потім розчин неочищеного продукту переносили в реактор, що містить розчин гідрофосфату натрію, протягом > 2 год. за 25 °С. Завись нагрівали до 45 °С посеред процедури додавання та після завершення додавання витримували упродовж 2 год. за тієї ж температури. Суміш охолоджували до 25 °С і витримували протягом 4 год. перед збором твердих речовин шляхом вакуумної фільтрації. Тверді речовини двічі промивали водою (щоразу по 1,5 л) і продукт висушували в азоті та під вакуумом із одержанням продукту, що являє собою 6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-(1M)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]-4-[(2S)-2-метил-4-(проп-2-еноїл)піперазин-1-іл]піридо[2,3-d]піримідин-2(1H)-он (неочищена сполука 9).⁴

Стадія 10



Неочищений продукт 9

Сполука 9

Загальна примітка. Усі еквіваленти та об'єми зазначені щодо неочищеної лікарської речовини.

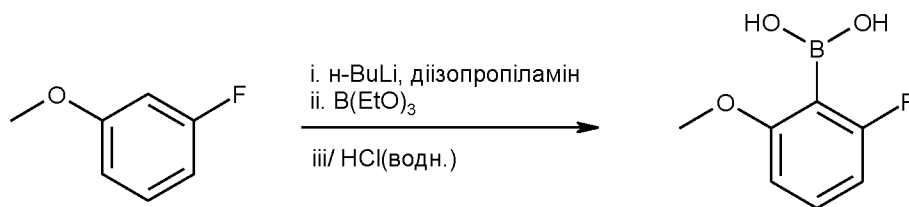
Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єми	ммоль	маса	об'єм
Неочищена сполука 9	н. д.	560,60	1,0 екв.	253,9	142,33 г	-
Етанол (міцність 200)	64-17-5	-	7,5 об.	-	-	1067 мл
Вода за USP	-	18,02	1,9 об.	-	-	270 мл
Оцтова кислота	64-19-7	60,05	1,5 екв.	380,8	22,87 г	21,82 мл
Вода класу WFI	-	18,02	15,5 об.	-	-	2200 мл
Етанол (для промивання)	64-17-5	-	2,5 об.	-	-	356 мл
Вода класу WFI (для промивання)	-	-	5,0 об.	-	-	712 мл
Затравка, яка є сполукою 9 ⁵	-	560,60	0	-	0,3-0,7 г	-

⁴Результати для даної головної партії: 154,06 г виділеної маси, 93 ваг. %, скоректований вихід 82,9 %, 18000 ppm NMP.

⁵Затравка функціонує із максимальною ефективністю у разі зменшення розміру частинок шляхом їх мелення або за допомогою іншого типу механічного подрібнення, за відсутності млинки (ступки/товкачки). Яка із затравок буде фактично використана, залежить від їхньої доступності. Цільова кількість затравки становить 0,25 %-0,5 %.

6-Фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-(1М)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]-4-[(2S)-2-метил-4-(проп-2-еноїл)піперазин-1-іл]піридо[2,3-d]піримідин-2(1H)-он (неочищена сполука 9) (142,33 г; 253,9 ммоль) об'єднували з етанолом (996 мл) та водою (270 мл). Додавали оцтову кислоту (21,8 мл; 380,8 ммоль) і суміш нагрівали до 75 °C із утворенням розчину, який остаточно фільтрували у чистий реактор. Розчин охолоджували до 45 °C, а потім додавали воду (1067 мл) за підтримки внутрішньої температури на рівні > 40 °C. У розчин вводили затравку у вигляді вихідної сполуки 9 та отриману суміш витримували протягом 30 хв. Потім додавали воду (1138 мл) протягом 2 год. Суміш охолоджували до 25 °C і витримували протягом 8 год., після чого збирали тверду речовину шляхом вакуумної фільтрації та промивали з використанням суміші етанолу (355,8 мл) та води (711,6 мл). Тверду речовину висушували із використанням вакууму та азоту із одержанням 6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-(1М)-1-[4-метил-2-(пропан-2-іл)піридин-3-іл]-4-[(2S)-2-метил-4-(проп-2-еноїл)піперазин-1-іл]піридо[2,3-d]піримідин-2(1H)-ону (сполука 9).

Схема реакції і таблиця завантаження для стадії A1



3-фторанізол

(2-фтор-6-метоксифеніл)боронова кислота

Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єми	мол.	Маса (г)	Об'єм (л)
3-Фторанізол	456-49-5	126,13	1,0	1,19	150	0,136
н-Бутиллітій (2,5 М у гексані)	109-72-8	64,06	1,5	1,78	н. д.	0,712
Діізопропіламін	108-18-9	101,19	1,4	1,66	168	0,233
Триетилборат	150-46-9	145,99	2,0	2,38	347,5	0,405
Тетрагідрофуран	109-99-9	72,11	12 об.	н. д.	н. д.	1,8
Хлороводнева кислота (2 н.)	7647-01-0	36,46	10 об.	н. д.	н. д.	1,5
Метил-трет- бутиловий етер	1634-04-4	88,15	12 об.	н. д.	н. д.	1,8
Гептан	142-82-5	100,20	10,5 об.	н. д.	н. д.	1,575

У реактор А завантажували THF (6 об.) та діізопропіламін (1,4 екв.). Отриманий розчин охолоджували до -70°C і повільно додавали н-BuLi (2,5 М у гексані, 1,5 екв.). Після завершення додавання повільно додавали розчин 3-фторанізолу (1,0 екв.) у THF (6 об.) і витримували за -70°C протягом 5 хв. Повільно додавали $\text{B}(\text{EtO})_3$ (2,0 екв.) і витримували за -70°C протягом 10 хв. Реакційну суміш гасили за допомогою 2 н. HCl. Погашену реакційну суміш екстрагували за допомогою MTBE (3 x 4 об.). Об'єднані органічні фази концентрували до 1,5~3 сумарних об'ємів. Гептан додавали краплями (7-9 об.) і суміш охолоджували до $0-10^{\circ}\text{C}$ і перемішували протягом 3 год. Суміш фільтрували та промивали гептаном (1,5 об.). Тверду речовину висушували в азоті за $< 30^{\circ}\text{C}$ із одержанням (2-фтор-6-метоксифеніл)боронової кислоти.

Схема реакції і таблиця завантаження для стадії A2



(2-фтор-6-метоксифеніл)боронова кислота

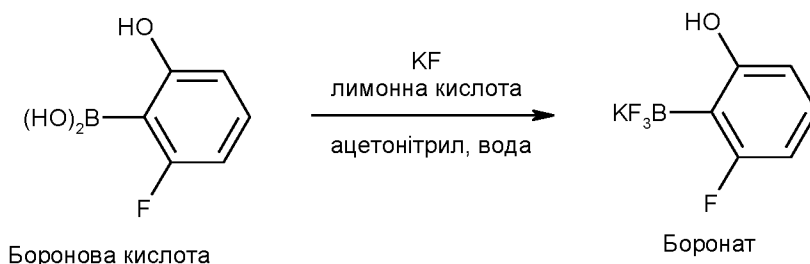
(2-фтор-6-гідроксифеніл)боронова кислота

Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/ об'єми	мол.	Маса (г)	Об'єм (л)
(2-Фтор-6-метоксифеніл)боронова кислота	78495-63-3	169,95	1,0	0,118	20	н. д.
Трибромід бору	10294-33-4	250,52	1,5	0,177	44,2	0,017
Дихлорметан	75-09-2	84,93	4 об.	н. д.	н. д.	0,080
Вода	7732-18-5	18,02	13 об.	н. д.	н. д.	0,26
Метил-трет-бутиловий етер	1634-04-4	88,15	13 об.	н. д.	н. д.	0,26
Гептан	142-82-5	100,20	10 об.	н. д.	н. д.	0,20

У реактор А завантажували дихлорметан (4 об.) та 2-фтор-6-метокси-4-метилфенілборонову кислоту (1 екв.). Реакційну суміш охолоджували до -30°C і по краплях додавали 1,5 BBr_3 (1,5 екв.). Після завершення додавання суміш нагрівали до 25°C та перемішували протягом 2 год. Реакційну суміш гасили в крижаній ($0-5^{\circ}\text{C}$) воді (10 об.). Додавали MTBE (10 об.) і суміш нагрівали до 25°C та перемішували протягом 1-2 год. або до розчинення усіх твердих речовин. Водну фазу відокремлювали

та екстрагували за допомогою МТВЕ (3 об.). Об'єднані органічні екстракти промивали водою (3 об.), а потім концентрували до 1 сумарного об'єму. У суміш додавали гептан (10 об.) та перемішували протягом 2 год. Отриманий продукт виділяли шляхом фільтрації та висушували за < 30 °С із одержанням (2-фтор-6-гідроксифеніл)боронової кислоти.

Схема реакції і таблиця завантаження для стадії А3



Матеріал	№ CAS	MW (г/моль)	Еквіваленти/об'єми	мол.	Маса (кг)	Об'єм (л)
(2-Фтор-6-гідроксифеніл)боронова кислота	1256345-60-4	155,92	1,0	89,79	14,00	н. д.
Моногідрат лимонної кислоти	5949-29-1	210,14	1,64	147,26	30,94	н. д.
Ацетонітрил	75-05-8	41,05	21 об.	н. д.	220,1	294
Фторид калію	7789-23-3	58,10	4,00	359,16	20,87	н. д.
Вода за USP	7732-18-5	18,02	2,0 об.	н. д.	28,00	28,00
Целіт	н. д.	н. д.	н. д.	н. д.	7,00	н. д.
2-Пропанол	67-63-0	60,10	25 об.	н. д.	275	350

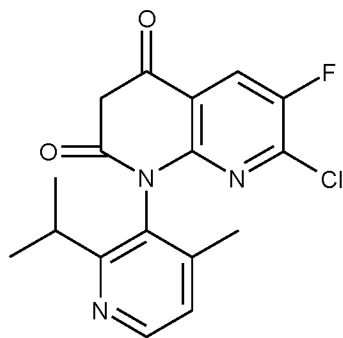
Стадія А3

Фторид калію (21,0 кг; 20,87 моль) об'єднували з водою (28 л) у реакторі (реактор А) і вміст перемішували протягом 30 хв. В окремий реактор (реактор В) завантажували (2-фтор-6-гідроксифеніл)боронову кислоту (14,00 кг, 89,79 моль), а потім ацетонітрил (206,1 кг) та лимонну кислоту (30,94 кг; 147,26 моль) за 25 °С. Вміст реактора А додавали в реактор В за 25 °С та перемішували за цієї температури протягом 10 год. Реакційну суміш фільтрували через шар целіту (7,0 кг) та промивали ацетонітрилом (42 кг). Фільтрат об'єднували з ізопропанолом (56 кг), а потім дистильовали у вакуумі за температури < 35 °С, замінюючи віддистильований об'єм у реакторі ізопропанолом, і повторювали за необхідності до завершення заміни розчинника з ацетонітрилу на ізопропанол. Завись охолоджували до 15 °С і витримували протягом 1 год., потім фільтрували та промивали за допомогою 28 кг ізопропанолу. Залишок на фільтрі висушували, використовуючи вакуум та азот, й упаковували із одержанням сполуки А3.

Розділення М-діону, що являє собою сполуку 5

Хроматографічне розділення проміжної сполуки М-діону

Використовували ряд хіральних хроматографічних методик та способів для виділення М-діону зі сполуки 4. Методики та нерухомі фази добре відомі в рівні техніки та наведені у таблиці 1.



Сполука 4

Таблиця 1

Методика	Нерухома фаза	Рухома фаза	Вихід
SFC	Chiralpak® AD	40 % метанол/60 % CO ₂ *	~95 %
HPLC	Chiralpak® AD	90/10/0,1 етанол/метанол/ триетиламін	~94 %
HPLC	Chiralpak® IG	60/40/0,1 етанол/метанол/ триетиламін	~92 %
Псевдорухомий шар (SMB)	Chiralpak® IC	Ацетонітрил	~ 96 %

^ Вихід визначають як % доступного М-діону, який було екстраговано за необхідної чистоти > 98% ee.

*Таке виділення проводили декілька разів. Для кожної партії матеріалу рухома фаза могла бути дещо модифікованою для пристосування до варіацій у партіях. Додаткові рухомі фази, використовувані для очищення, включали

- 1) 25/75 метанол/CO₂,
- 2) 30/70 метанол/CO₂ і
- 3) 50/50 метанол/CO₂.

Методики SFC, HPLC та SMB добре відомі в рівні техніки та нерухомі фази Chiralpak® комерційно доступні з комерційних джерел, таких як Fisher Scientific і Daicel Corporation.

Однак необхідно розробити більш ефективний спосіб виділення М-діону (сполуки 5).

Класичне розділення

Даний винахід спрямований на розробку застосовного способу класичного розділення для рацемату М/Р-діону (сполуки 4).

Загалом було проведено 100 експериментів зі скринінгу співкристалів та ідентифіковано три потенційні співкристали діону. На підставі найвищого співвідношення значень площ М/Р-діону в залишковій твердій речовині та найнижчого співвідношення значень площ у супернатанті як хіральний реагент для розділення вибирали (+)-2,3-добензоїл-D-винну кислоту (DBTA).

Згідно із результатами 100 експериментів скринінгу співкристалів та 20 додаткових процедур скринінгу розчинників виявили, що 2-МеTHF/н-гептан забезпечує кращий результат щодо розділення, ніж інші системи розчинників. На підставі результатів щодо розчинності співкристала М-діону та співкристала Р-діону в різних співвідношеннях 2-МеTHF та н-гептану як оптимальну композицію розчинника для розділення вибирали 2-МеTHF/н-гептан (1,4:1, об./об.).

Щоб виявити будь-яке можливе перетворення форми на рацемат діону або М/Р-діон під час процесу кристалізації з хіральною розділенням, розчинність у 2-МеTHF/н-гептані (1,4:1, об./об.) співкристала М-діону, співкристала Р-діону, суміші співкристалів М+Р-діону (1:1, мас./мас.), рацемату діону та DBTA визначали за різних температур. Для співкристала М-діону та співкристала Р-діону за різних температур упродовж 7 днів не спостерігали будь-якої зміни форми. Однак рацемат діону типу С одержували після перемішування суміші співкристалів М+Р-діону (1:1, мас./мас.) за різних температур упродовж 7 днів. Рацемат діону типу D (20 і 30 °C) або рацемат діону типу С (40, 50, 60 і 65 °C) спостерігали після перемішування рацемату діону за відповідних температур упродовж 7 днів. Розчинність, що становила ~ 100 мг/мл, спостерігали для DBTA за всіх температур.

Для подальшої оптимізації способу розділення будували потрібну фазову діаграму для співкристала М/Р-діону на основі результатів щодо рівноважної розчинності, а евтектична точка не була отримана, найімовірніше, через те, що рацемат типу С міг кристалізуватися, коли були присутні як співкристал М-діону, так і співкристал Р-діону. Іншу потрібну фазову діаграму для М/Р-діону будували на основі результатів щодо рівноважної розчинності, а евтектична точка не була отримана, найімовірніше, через те, що рацемат діону типу С або типу D міг кристалізуватися, коли були присутні як М-діон, так і Р-діон.

Таким чином, ідентифікували хіральний реагент (DBTA) та систему розчинників ((2-МеTHF/н-гептан (1,4:1, об./об.)) для розділення рацемату діону. Процес дрібномасштабної кристалізації із використанням реагенту для розділення та системи розчинників може забезпечити для М-діону вихід 39 % та чистоту ee 99 %. Крім того, під час експериментів щодо скринінгу спостерігали та дослідили поліморфізм рацемату діону.

Сполуку за даним винаходом також можна застосовувати в комбінації з фармацевтично активними засобами, які лікують нудоту. Приклади засобів, які можна застосовувати для лікування нудоти, включають дронабінол, гранісетрон, метоклопрамід, ондансетрон та прохлорперазин або їхню фармацевтично прийнятну сіль.

Сполуку за даним винаходом також можна застосовувати в комбінації із променевою терапією,

гормональною терапією, хірургією та імунотерапією, при цьому такі види терапії широко відомі фахівцям у даній галузі техніки.

Оскільки в одному аспекті даного винаходу передбачене лікування захворювання/станів за допомогою комбінації фармацевтично активних сполук, які можна вводити роздільно, даний винахід додатково стосується об'єднання окремих фармацевтичних композицій у формі набору. Набір містить дві окремі фармацевтичні композиції: сполуку за даним винаходом і другу фармацевтичну сполуку. Набір містить контейнер для утримання окремих композицій, такий як розділений на частини флакон або пакет із фольги, розділений на частини. Додаткові приклади контейнерів включають шприци, коробки та м'які резервуари. Як правило, набір містить інструкції із застосування окремих компонентів. Форма набору є особливо переважною, якщо окремі компоненти переважно вводять у різних лікарських формах (наприклад, перорально та парентерально), вводять із різними інтервалами між введенням лікарського засобу, або якщо вибір дози окремих компонентів комбінації буде визначатися терапевтом або ветеринаром, який призначає лікування.

Прикладом такого набору є так зване блістерне пакування. Блістерне пакування є добре відомим у пакувальній промисловості та широко застосовується для упакування фармацевтичних стандартних лікарських форм (таблеток, капсул і т. ін.). Блістерне пакування переважно складається із листа порівняно твердого матеріалу, покритого фольгою, переважно із прозорого пластичного матеріалу. Під час процесу упакування в пластиковій фользі формують заглибини. Заглибини відповідають розміру та формі таблеток або капсул, що підлягають упакуванню. Далі таблетки або капсули поміщають у заглибини і листом порівняно твердого матеріалу герметизують пластикову фольгу з того боку, що є протилежним відносно напрямку формування заглибин. У результаті таблетки або капсули виявляються герметично закритими в заглибинах між пластиковою фольгою та листом. Переважно, щоб міцність листа була такою, щоб таблетки або капсули могли бути вийняті із блістерного упакування вручну в разі натискання на заглибину з утворенням отвору в листі на місці заглибини. Далі таблетку або капсулу витягають через зазначений отвір.

Можливо, було б доцільним забезпечення засобу нагадування на наборі, наприклад, у вигляді цифр поруч із таблетками або капсулами, при цьому цифри будуть відповідати дням режиму, у які слід приймати таблетки або капсули, позначені у такий спосіб. Інший приклад такого засобу нагадування являє собою календар, надрукований на картці, наприклад, у такий спосіб: "Перший тиждень, понеділок, вівторок, і так далі. Другий тиждень, понеділок, вівторок, і так далі. Інші варіації засобів нагадування будуть очевидними. "Добова доза" може являти собою одну таблетку або капсулу або кілька пігулок або капсул для приймання певного дня. Також добова доза сполуки за даним винаходом може складатися з однієї таблетки або капсули, тоді як добова доза другої сполуки може складатися з декількох таблеток або капсул, і навпаки. Це повинно відображатися в засобі нагадування та сприяти правильному введенню активних засобів.

В іншому конкретному варіанті здійснення даного винаходу пропонується диспенсер, сконструйований для видачі добових доз окремо в порядку їх передбаченого застосування. Переважно диспенсер обладнаний засобом нагадування, щоб додатково полегшити дотримання пацієнтом режиму. Прикладом такого засобу нагадування є механічний лічильник, який показує кількість відпущених добових доз. Інший приклад такого засобу нагадування являє собою засіб нагадування із живленням від акумулятора у вигляді мікрочипа, з'єднаного з рідкокристалічним екраном або звуковим сигналом нагадування, який, наприклад, зчитує дату приймання попередньої добової дози та/або нагадує про час приймання наступної дози.

Сполуки за даним винаходом та інші фармацевтично активні сполуки, у разі необхідності, можуть бути введені пацієнту або перорально, ректально, парентерально (наприклад, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно), інтрацистернально, інтравагінально, внутрішньочеревинно, інтравезикально, місцево (наприклад, порошки, мазі або краплі), або у вигляді букального або назального спрею. Передбачені всі способи, які застосовують фахівці в даній галузі техніки для введення фармацевтично активного засобу.

Композиції, придатні для парентеральної ін'єкції, можуть передбачати фізіологічно прийнятні стерильні водні або неводні розчини, дисперсії, суспензії або емульсії та стерильні порошки для відновлення в стерильні ін'єкційні розчини або дисперсії. Приклади придатних водних і неводних носіїв, розріджувачів, розчинників або середовищ-носіїв включають воду, етанол, поліолі (пропіленгліколь, поліетиленгліколь, гліцерин тощо), їх придатні суміші, рослинні олії (такі як оливкова олія) та ін'єкційні органічні естери, такі як етилолеат. Належна плинність може підтримуватися, наприклад, шляхом застосування покриття, такого як лецитин, шляхом підтримання необхідного розміру частинок у разі дисперсій і шляхом застосування поверхнево-активних речовин.

Такі композиції також можуть містити допоміжні засоби, такі як консерванти, змочувальні засоби, емульгуювальні засоби та диспергувальні засоби. Забруднення мікроорганізмами може бути попереджене додаванням різних антибактеріальних та протигрибкових засобів, наприклад, парабенів, хлорбутанолу, фенолу, сорбінової кислоти і т. ін. Крім того, може бути бажаним включення засобів для підтримання ізотонічності, наприклад, цукрів, хлориду натрію і т. ін. Пролонгована абсорбція

ін'єкційних фармацевтичних композицій може бути досягнута завдяки використанню засобів, що сповільнюють абсорбцію, наприклад, моностеарату алюмінію та желатину.

Тверді лікарські форми для перорального введення включають капсули, таблетки, порошки та гранули. У таких твердих лікарських формах активна сполука змішана з щонайменше однією звичайною інертною допоміжною речовиною (або носієм), такою як цитрат натрію або гідрофосфат кальцію, або (a) наповнювачами або сухими розріджувачами, такими як види крохмалю, лактоза, сахароза, маніт і кремнієва кислота; (b) зв'язувальними засобами, такими як карбоксиметилцелюлоза, альгірати, желатин, полівінілпіролідон, сахароза й акацієва камедь; (c) зволожувальними засобами, такими як гліцерин; (d) розпушувачами, такими як агар-агар, карбонат кальцію, картопляний або тапіоковий крохмаль, альгінова кислота, деякі складні силікати й карбонат натрію; (e) засобами, що сповільнюють розчинення, такими як парафін; (f) засобами, що прискорюють абсорбцію, такими як сполуки четвертинного амонію; (g) змочувальними засобами, такими як цетиловий спирт і моностеарат гліцерину; (h) адсорбентами, такими як каолін і бентоніт; і (i) змащувальними засобами, такими як тальк, стеарат кальцію, стеарат магнію, тверді поліетиленгліколі, лаурилсульфат натрію або їх суміші. У випадку капсул і таблеток лікарські форми можуть також містити буферні засоби.

Тверді композиції подібного типу також можна використовувати як наповнювачі у м'яких і твердих заповнених желатинових капсулах із застосуванням таких допоміжних речовин, як лактоза або молочний цукор, а також високомолекулярні поліетиленгліколі і т. ін.

Тверді лікарські форми, такі як таблетки, драже, капсули, пігулки та гранули, можуть бути отримані з покриттями та оболонками, такими як ентросолубільні покриття й інші покриття, добре відомі в рівні техніки. Вони також можуть містити засоби, що надають непрозорість, а також можуть являти собою таку композицію, яка вивільняє активну сполуку або сполуки в певній частині кишкового тракту у сповільнений спосіб. Прикладами допоміжних речовин, що забезпечують розчинення у потрібній зоні шлунково-кишкового тракту, які можуть використовуватися, є полімерні речовини та воски. Активна сполука також може бути в мікроінкапсульованій формі, за необхідності, з однією або декількома описаними вище допоміжними речовинами.

Рідкі лікарські форми для перорального введення включають фармацевтично прийнятні емульсії, розчини, суспензії, сиропи та настойки. На додаток до активних сполук, рідка лікарська форма може містити інертні розріджувачі, зазвичай застосовувані в рівні техніки, такі як вода або інші розчинники, солубілізуювальні засоби та емульгатори, такі як етиловий спирт, ізопропіловий спирт, етилкарбонат, етилацетат, бензиловий спирт, бензилбензоат, пропіленгліколь, 1,3-бутиленгліколь, диметилформамід, олії, зокрема бавовняна олія, арахісова олія, кукурудзяна олія, маслинова олія, рицинова олія та кунжутна олія, гліцерин, тетрагідрофурфуриловий спирт, поліетиленгліколі й естери жирної кислоти та сорбітану або суміші зазначених речовин і т. ін.

Крім таких інертних розріджувачів, композиція може включати допоміжні засоби, такі як змочувальні засоби, емульгувальні та суспендувальні засоби, підсолоджувачі, смакові добавки та ароматизатори. Суспензії на додаток до активної сполуки можуть містити суспендувальні засоби, як, наприклад, етоксировані ізостеарилові спирти, поліоксиетиленсорбіт й естери сорбітану, мікрокристалічна целюлоза, метагідроксид алюмінію, бентоніт, агар-агар і трагакант або суміші зазначених речовин і т. ін.

Композиції для ректального введення переважно являють собою супозиторії, які можуть бути отримані шляхом змішування сполук за даним винаходом із придатними допоміжними речовинами або носіями, які не спричиняють подразнення, такими як масло какао, поліетиленгліколь або супозиторний віск, які є твердими за звичайної кімнатної температури, але рідкими за температури тіла й, таким чином, плавляться в прямій кишці або порожнині піхви та вивільняють активний компонент.

Лікарські форми для місцевого введення сполуки за даним винаходом включають мазі, порошки, спреї та інгаляційні форми. Активну сполуку або сполуки змішують у стерильних умовах із фізіологічно прийнятним носієм і будь-якими консервантами, буферами або пропелентами, які можуть бути необхідні. Очні склади, очні мазі, порошки та розчини також передбачені в обсязі даного винаходу.

Сполуки за даним винаходом можна вводити пацієнту з рівнями доз, що перебувають у діапазоні від приблизно 0,1 до приблизно 3000 мг на добу. Для нормальної дорослої людини з масою тіла приблизно 70 кг зазвичай буде достатньо дози в діапазоні від приблизно 0,01 до приблизно 100 мг на кілограм маси тіла. Конкретна доза та діапазон доз, які можна застосовувати, залежать від багатьох факторів, у тому числі потреб пацієнта, ступеня важкості стану або захворювання, що підлягає лікуванню, і фармакологічної активності сполуки, що вводиться. Конкретна доза сполуки за даним винаходом являє собою дозу, схвалену FDA, якщо сполуку було схвалено.

Сполуки за даним винаходом можна вводити у вигляді фармацевтично прийнятних солей, естерів, амідів або проліків. Термін "солі" стосується неорганічних та органічних солей сполук згідно з даним винаходом. Солі можуть бути одержані *in situ* під час кінцевого виділення та очищення сполуки або за допомогою окремого здійснення реакції очищеної сполуки у формі її вільних основи або кислоти з придатними органічними або неорганічними основою або кислотою та виділення одержаної у такий

спосіб солі. Ілюстративні солі включають солі, що являють собою гідробромід, гідрохлорид, сульфат, бісульфат, нітрат, ацетат, оксалат, пальмітат, стеарат, лаурат, борат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глюкогептонат, лактобінат і лаурилсульфонат тощо. Солі можуть включати солі на основі катіонів лужних і лужноземельних металів, таких як натрій, літій, калій, кальцій, магній тощо, а також нетоксичні катіони амонію, четвертинного амонію та аміну, у тому числі без обмеження амонію, тетраметиламонію, тетраетиламонію, метиламіну, диметиламіну, триметиламіну, триетиламіну, етиламіну тощо. Див., наприклад, S. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J Pharm Sci, 66: 1-19 (1977).

Приклади фармацевтично прийнятних естерів сполуки за даним винаходом включають C_1 - C_8 алкілові естери. Прийнятні естери також включають C_5 - C_7 циклоалкілові естери, а також арилалкілові естери, такі як бензил. Зазвичай використовують C_1 - C_4 алкілові естери. Естери сполук за даним винаходом можуть бути отримані згідно зі способами, добре відомими в рівні техніки.

Приклади фармацевтично прийнятних амідів сполуки за даним винаходом включають аміді, отримані з амонію, первинні C_1 - C_8 алкіламіни та вторинні C_1 - C_8 діалкіламіни. У випадку вторинних амінів амін також може мати форму 5- або 6-членної гетероциклоалкільної групи, яка містить щонайменше один атом азоту. Зазвичай використовують аміді, отримані з амонію, первинні C_1 - C_3 алкіламіни та вторинні C_1 - C_2 діалкіламіни. Аміді сполуки за даним винаходом можуть бути отримані згідно зі способами, добре відомими фахівцям у рівні техніки.

Термін "проліки" означає сполуки, які перетворюються *in vivo* з одержанням сполуки за даним винаходом. Перетворення може відбуватися за допомогою різних механізмів, наприклад, за допомогою гідролізу в крові. Обговорення застосування проліків представлено в T. Higuchi and W. Stella, "Prodrugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A.C.S., Symposium Series, і у Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

Для ілюстрації, оскільки сполука згідно із даним винаходом містить функціональну групу карбонової кислоти, проліки можуть містити естер, утворений шляхом заміни атома водню кислотної групи групою, такою як (C_1 - C_8 алкіл, (C_2 - C_{12})алканойлоксиметил, 1-(алканойлокси)етил, що містить від 4 до 9 атомів вуглецю, 1-метил-1-(алканойлокси)етил, що містить від 5 до 10 атомів вуглецю, алкоксикарбонілоксиметил, що містить від 3 до 6 атомів вуглецю, 1-(алкоксикарбонілокси)етил, що містить від 4 до 7 атомів вуглецю, 1-метил-1-(алкоксикарбонілокси)етил, що містить від 5 до 8 атомів вуглецю, N-(алкоксикарбоніл)амінометил, що містить від 3 до 9 атомів вуглецю, 1-(N-(алкоксикарбоніл)амінометил, що містить від 4 до 10 атомів вуглецю, 3-фталідил, 4-кротонолактоніл, гамма-бутиролактон-4-іл, ди-N,N-(C_1 - C_2)алкіламіно(C_2 - C_3)алкіл (такий як β -диметиламіноетил), карбамоїл-(C_1 - C_2)алкіл, N,N-ді(C_1 - C_2)алкілкарбамоїл-(C_1 - C_2)алкіл і піперидино-, піролідино- або морфоліно(C_2 -3)алкіл.

Сполуки за даним винаходом можуть містити асиметричні або хіральні центри і, таки чином, існувати в різних стереоізомерних формах. Передбачається, що всі стереоізомерні форми сполуки, а також їх суміші, у тому числі рацемічні суміші, утворюють частину даного винаходу. Крім того, в даному винаході передбачені всі геометричні та позиційні ізомери. Наприклад, якщо сполука містить подвійний зв'язок, передбачені як цис-, так і транс-форми (позначені як Z та E відповідно), а також їх суміші.

Суміш стереоізомерів, така як діастереомерні суміші, може бути розділена на її окремі стереохімічні компоненти з урахуванням їхніх фізико-хімічних відмінностей за допомогою відомих способів, таких як хроматографія та/або фракційна кристалізація. Енантіомери також можуть бути розділені шляхом перетворення енантіомерної суміші на діастереомерну суміш шляхом здійснення реакції з відповідною оптично активною сполукою (наприклад, спиртом), розділення діастереомерів і перетворення (наприклад, у результаті гідролізу) окремих діастереомерів на відповідні чисті енантіомери. Також деякі сполуки можуть бути атропоізомерами (наприклад, заміщеними біарилами).

Сполуки за даним винаходом можуть існувати в несольватованій, а також сольватованій формах із фармацевтично прийнятними розчинниками, такими як вода (гідрат), етанол тощо. У даному винаході передбачені та охоплені як сольватовані, так і несольватовані форми.

Також можливо, що сполуки за даним винаходом можуть перебувати в різних таутомерних формах. Передбачені всі таутомери сполуки за даним винаходом. Наприклад, усі таутомерні форми тетразольного фрагмента включені в даний винахід. Крім того, наприклад, усі кето-енольні або імін-енамінні форми сполук включені в даний винахід.

Фахівцям у даній галузі техніки буде зрозуміло, що назви та структури сполук, які містяться в даному документі, можуть базуватися на конкретному таутомері сполуки. Хоча можуть застосовуватися назва або структура лише для конкретного таутомера, передбачається, що в даному винаході охоплені всі таутомери, якщо не вказано інше.

Також передбачається, що в даному винаході охоплені сполуки, які синтезовані *in vitro* із застосуванням лабораторних методик, таких як широко відомі фахівцям у галузі хімічного синтезу; або синтезовані із застосуванням методик *in vivo*, наприклад за допомогою метаболізму, ферментації, розщеплення тощо. Також передбачається, що сполуки за даним винаходом можуть бути синтезовані

із застосуванням комбінації методик *in vitro* та *in vivo*.

Даний винахід також включає мічені ізотопами сполуки, ідентичні наведеним у даному документі, за винятком того факту, що один або кілька атомів замінені атомом з атомною масою або масовим числом, відмінними від атомної маси або масового числа, що зазвичай виявляють у природі. Приклади ізотопів, які можуть бути включені в сполуки за даним винаходом, включають ізотопи водню, вуглецю, азоту, кисню, фосфору, фтору та хлору, такі як ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{19}F і ^{36}Cl . В одному аспекті даний винахід стосується сполук, де один або кілька атомів водню замінені атомами дейтерію (^2H).

Сполуки за даним винаходом, які містять вищезгадані ізотопи та/або інші ізотопи інших атомів, входять в обсяг даного винаходу. Деякі мічені ізотопами сполуки за даним винаходом, наприклад, сполуки, у які включені радіоактивні ізотопи, такі як ^3H і ^{14}C , застосовні для аналізів розподілу лікарського засобу та/або субстрату в тканинах. Ізотопи, мічені тритієм, тобто ^3H , та вуглецем-14, тобто ^{14}C , є особливо бажаними через легкість їх одержання і виявлення. Крім того, заміщення більш важкими ізотопами, такими як дейтерій, тобто ^2H , може надавати деякі терапевтичні переваги, що виникають внаслідок більш високої стійкості до інактивації в процесі метаболізму, наприклад, підвищеного періоду напіввиведення *in vivo* або знижених вимог до дозування, і, отже, може бути більш переважним у деяких обставинах. Мічені ізотопами сполуки за даним винаходом здебільшого можуть бути отримані шляхом заміни неміченого ізотопами реагенту легко доступним міченим ізотопами реагентом.

Сполуки за даним винаходом можуть існувати в різних твердих станах, у тому числі кристалічних станах і в аморфному стані. Різні кристалічні стани, що також називаються поліморфами, та аморфні стани сполук за даним винаходом розглядаються як частина даного винаходу.

При синтезі сполук за даним винаходом може вимагатися використання деяких відхідних груп. Термін "відхідні групи" ("LG"), як правило, стосується груп, які можуть бути замінені нуклеофілом. Такі відхідні групи відомі з рівня техніки. Приклади відхідних груп включають без обмеження галогеніди (наприклад, I, Br, F, Cl), сульфонати (наприклад, мезилат, тозилат), сульфіді (наприклад, SCH_3), N-гідроксисукцинімід, N-гідроксибензотриазол і т. ін. Приклади нуклеофілів включають без обмеження аміни, тіоли, спирти, реактиви Гріньяра, аніонні форми (наприклад, алкокси, аміді, карбаніони) і т. ін.

Усі патенти, патентні заявки та інші документи, викладені в даному документі, включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Представлені нижче приклади ілюструють конкретні варіанти здійснення даного винаходу. Такі приклади призначені для ілюстрації і не призначені для обмеження будь-яким чином обсягу формули винаходу.

ПРИКЛАДИ

AMG 510 був розроблений як перорально біодоступний ковалентний інгібітор KRAS^{G12C} із потужною біохімічною та клітинною активністю і високою ефективністю *in vivo*. Аналіз цистеїнового протеому клітин NCI-H358, оброблених AMG 510, показав, що тільки пептид KRAS, котрий містив G12C, був ковалентно модифікований. AMG 510 інгібував обмін нуклеотидів у каталізованій SOS реакції у рекомбінантного мутанта KRAS^{G12C/C118A}, але впливав на KRAS^{C118A}, який є диким типом у положенні 12. У клітинних аналізах AMG 510 ковалентно модифікував KRAS^{G12C} та інгібував передачу сигналу KRAS^{G12C}, що вимірювали за фосфорилуванням ERK1/2 у всіх тестованих лініях клітин, мутантних за KRAS p.G12C, але не інгібував фосфорилування ERK1/2 у лінії клітин з іншими різними мутаціями KRAS. AMG 510 також селективно погіршував життєздатність ліній клітин, мутантних за KRASp.G12C, але не впливав на лінії клітин з іншими мутаціями KRAS. Фармакодинамічні аналізи *in vivo* продемонстрували залежне від дози та часу інгібування передачі сигналу KRAS^{G12C}, що вимірювали за фосфорилуванням ERK1/2 (p-ERK) у ксенотрансплантатах пухлин підшлункової залози людини (MIA PaCa-2 T2) та NSCLC (NCI-H358). Ковалентну модифікацію KRAS^{G12C} за допомогою AMG 510 вимірювали за допомогою мас-спектрометрії та корелювали із інгібуванням p-ERK у пухлинах. Дослідження часової динаміки на мишах, які несуть пухлину, показали, що вплив AMG 510 у плазмі крові досягає пікового значення через 0,5 години після введення дози, за яким із невеликим відставанням іде інгібування p-ERK у пухлинах. AMG 510 значно інгібував ріст ксенотрансплантатів MIA PaCa-2 T2 і NCI-H358 та спричиняв регресію пухлини за більших доз. Обробка ліній KRAS p.G12C ковалентними інгібіторами KRAS^{G12C} підсилювала експресію HLA. Комбіноване лікування за допомогою AMG 510 з інгібіторами інших клітинних сигнальних шляхів продемонструвало докази синергетичних ефектів щодо життєздатності клітин. Комбіноване лікування за допомогою AMG 510 зі стандартним лікуванням карбоплатином продемонструвало посилене інгібування росту пухлини NCI-H358 порівняно з будь-яким окремим засобом. Аналогічним чином AMG 510 у комбінації з інгібітором MEK зумовлював підвищену протипухлинну ефективність порівняно з будь-яким окремим засобом.

Для тестування впливу інгібування KRAS^{G12C} на імунний нагляд *in vivo* створювали нову лінію сингенних пухлинних клітин, яка придатна для тестування AMG 510 у комбінації з терапевтичними

засобами на основі інгібіторів контрольних точок і, таким чином, охарактеризована *in vitro*. У заново розробленій моделі раку з мутантом KRAS-G12C обробка AMG 510 значною мірою інгібувала ріст пухлини й викликала регресію. Дивовижно, але комбінація AMG 510 з інгібітором імунних контрольних точок зумовлювала помітне підвищення загальної виживаності й зумовлювала надійні результати лікування. Імунофенотипування мишачих пухлин KRAS p.G12C виявило значне збільшення інфільтрації Т-клітин після обробки, що дозволяє припустити, що AMG 510 може індукувати мікрооточення пухлини, більш чутливе до інгібування імунних контрольних точок.

Нова сингенна модель пухлини CT-26 KRAS p.G12C

Мишачі клітини CT26 (пухлина товстої кишки № 26) були отримані в 1975 році шляхом впливу на мишей BALB/c N-нітрозоз-N-метилуретану (NMU), що призвело до появи карциноми IV стадії, яка швидко росте, легко імплантується і швидко метастазує. Карцинома товстої кишки CT26, використана в більш ніж 500 опублікованих дослідженнях, є однією з найбільш часто використовуваних ліній клітин під час розробки лікарських засобів. За допомогою цих клітин були вивчені численні цитотоксичні засоби, а також терапевтичні засоби, націлені на певні шляхи передачі сигналу. До того ж, оскільки модель CT26 на мишах BALB/c забезпечує сингенну тест-систему *in vivo*, її часто використовують для розробки й тестування імунотерапевтичних концепцій. BMC Genomics. 2014 Mar 13;15:190. doi: 10.1186/1471-2164-15-190. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma.

Сингенну модель пухлини CT-26 KRAS p.G12C розробляли для проведення комбінованих досліджень із лініями клітин та імунотерапією, як показано в таблиці А і на фігурах 3, 4, 5, 6, 18, 24, 31, 34, 38 і 39. Лінію сингенних пухлинних клітин CT-26 вибирали на підставі того, що вона має мутацію KRAS-G12D, що присутня в батьківській лінії. Присутність мутації KRAS-G12D передбачає, що ріст і виживаність лінії клітин можуть керуватися конститутивною передачею сигналів KRAS (G12D) і потенційно можуть бути чутливі щодо інгібування KRAS. Клітини CT-26 KRAS p.G12C одержували з лінії клітин колоректальної пухлини миші CT-26. Використовували технологію CRISPR, описану в попередньому рівні техніки Liang et al. (Journal of Biotechnology 241 (2017) 136-146), для заміщення обох алелів KRAS p.G12D на KRAS p.G12C з використанням послідовності CTTGTGATGGTTGGAGCTGA (SEQ ID NO: 21). Клон 10 визначали як гомозиготний за алелем KRAS p.G12C за допомогою секвенування наступного покоління (NGS) та ідентифікували як CT-26 KRAS G12C-H10. Цю нову виділену лінію сингенних пухлинних клітин CT-26 KRAS p.G12C, яка забезпечує інгібування передачі сигналу KRAS за допомогою AMG 510, використовували для всіх досліджень CT-26 G12C *in vivo* (див. фігури 3, 4, 5 і 6) і досліджень *in vitro* (див. фігури 18, 24, 31, 34, 38 і 39).

Даний винахід охоплює нову лінію виділених клітин, що містять два алелі KRAS^{G12C}, і спосіб одержання лінії клітин, що містять два алелі KRAS^{G12C}, при цьому спосіб включає:

а) інкубування лінії клітин, що містять два алелі KRAS^{G12D}, із конструкцією CRISPR, яка індукує заміщення нуклеотиду в кожному із двох алелів KRAS у такий спосіб, що утворюються два алелі KRAS^{G12C}, та

б) виділення лінії клітин, що містять два алелі KRAS^{G12C}.

Секвенування наступного покоління (NGS), також відоме як високопродуктивне секвенування, являє собою універсальний термін, використовуваний для опису ряду різних сучасних технологій секвенування, які включають

- секвенування Illumina (Solexa),
- секвенування Roche 454,
- секвенування Ion torrent: Proton/PGM,
- секвенування Solid™.

У даному винаході використовували платформу Ion Torrent™ Personal Genome Machine™, комерційно доступну від компанії Thermo-Fisher Scientific. Ці найновіші технології дозволяють ученим секвенувати ДНК і РНК набагато швидше й дешевше, ніж раніше використовуване секвенування за Сенгером

Дослідження комбінації на клітинах *in vitro*

Лінії клітин купували в Американській колекції типових культур (ATCC), Німецькій колекції мікроорганізмів і культур клітин (DSMZ) та Японської колекції дослідницьких біоресурсів (JCRB). Кожну лінію культивували в рекомендованому для неї живильному середовищі.

Для двокомпонентних комбінацій сполук клітини висівали в 96-лункові або 384-лункові планшети для культивування клітин за початкової щільності, що варіює від 500 до 2500 клітин на лунку.

Через шістнадцять-24 години сполуки додавали в планшети для культивування в матричному форматі, за якого один засіб титрували по осі x, а другий засіб - по осі y.

Для всіх комбінацій, тестованих на будь-якій із представлених ліній клітин, початкову високу концентрацію та

коефіцієнт розведення кожної сполуки вибирали для точного визначення максимуму кривої, мінімуму кривої та нахилу діапазону доз, вибраних для формату скринінгу

комбінації. Набори для люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo® (Promega) використовували для визначення кількості життєздатних клітин.

Люмінесценцію вимірювали за допомогою багатоканального зчитувального обладнання EnVision® (Perkin Elmer) для

кожної лінії клітин у нульовий момент часу (V0) до додавання сполук, а також через 72 години після обробки сполукою. Інгібування росту (GI) розраховували за 200-бальною шкалою відповідно до наступних рівнянь, де V72 являло собою люмінесценцію контролю DMSO через 72 години, а T72 являло собою люмінесценцію обробленого сполукою зразка, якщо $T72 > V0$, то $GI = 100 \times (1 - ((T72 - V0)/(V72 - V0)))$; якщо $T72 < V0$, то $GI = 100 \times (1 - ((T72 - V0)/V0))$. Значення GI, що становлять 0, 100 та 200, представляють неінгібований ріст клітин (тобто контроль DMSO),

зупинку росту клітин і повне знищення клітин відповідно. Сигмоїдальні криві залежності відповіді від дози

будували із використанням 4-параметричної логістичної моделі. Дані аналізували стосовно синергетичних взаємодій з використанням аналітичного програмного забезпечення Chalice™ (Zaliscus), яке генерувало

бали синергізму на основі моделі адитивності Loewe.

Інгібування росту для кожної лунки матриці розраховували, як описано раніше, і дані аналізували стосовно синергетичних взаємодій з використанням аналітичного програмного забезпечення Chalice™ (Zaliscus; Кембридж, Массачусетс), яке генерувало бали синергізму на основі моделі адитивності Loewe (Lehár, J., et al. (2009). "Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity." Nat Biotech 27(7): 659-666) і Rickles, et al. (2012) "Adenosine A2A and Beta-2 Adrenergic Receptor Agonists: Novel Selective and Synergistic Multiple Myeloma Targets Discovered through Systematic Combination Screening" Mol Cancer Therapeutics 11 (7): 1432.

Модель ADD (адитивності) Loewe (як показано на фігурах 7-37) дозволяє кількісно оцінити ефекти комбінацій. Спочатку комбінації ранжували відповідно до надлишкової величини адитивності, що визначається як величина $ADD = \sum C_X, C_Y (I_{data} - I_{Loewe})$, де $I_{Loewe}(C_X, C_Y)$ являє собою інгібування, яке задовольняє умову $(C_X/EC_X) + (C_Y/EC_Y) = 1$, та $EC_{X,Y}$ являють собою ефективні концентрації при I_{Loewe} для кривих окремого засобу. Також використовували "бали синергізму", де бал синергізму $S = \log f_X \log f_Y \sum I_{data} (I_{data} - I_{Loewe})$, підсумований для всіх пар концентрацій, що не є окремим засобом, і де $\log f_{X,Y}$ являє собою натуральний логарифм коефіцієнтів розведення, застосованих для кожного окремого засобу. Це уможливило ефективне обчислення об'єму між вимірюваною поверхнею й поверхнею адитивної відповіді Loewe, зваженого за високим ступенем інгібування й відкоректованого з урахуванням різних факторів розведення. Невизначеність σ_S обчислювали для кожного бала синергізму на підставі вимірюваних похибок для значень I_{data} і поширення стандартної похибки.

У прикладах показано, що матриці інгібування росту (%) містять консенсусні значення інгібування росту, обчислені за даними люмінесценції з використанням описаних вище формул; матриці моделі ADD інгібування росту (%) містять передбачені значення інгібування росту, що базуються на моделі адитивності Loewe, які отримані зі змодельованих кривих інгібування росту для окремого засобу; і матриці надлишку величини ADD інгібування росту (%) містять значення інгібування росту в надлишку щодо моделі адитивності. Модель адитивності слугує "нульовою гіпотезою" і допускає відсутність синергетичної взаємодії між двома засобами. Будь-яка активність, яку спостерігають після віднімання моделі ADD з матриці залежності відповіді інгібування росту від дози (= надлишок ADD інгібування росту), є показником синергізму.

У наведеній нижче таблиці А показані специфічні in vitro комбінації інгібітора KRAS^{G12C} з одним або декількома додатковими фармацевтично активними засобами для конкретних типів раку. Дані, отримані й узагальнені на фігурах 7-39, показують, що комбінації, представлені в таблиці А, демонструють підвищену протиракову активність порівняно з очікуваною, коли окремі компоненти комбінованої терапії використовуються окремо. Слід зазначити, що величина терапевтичного синергізму, який спостерігають, може варіювати залежно від типу раку, який лікують, і використовуваного засобу.

ТАБЛИЦЯ А

	EGFRi			SHP2i	MEKi	PI3Ki		AKTi	Ab до EGFR
	AMG 510 Афатиніб	AMG 510 Ерлотиніб	AMG 510 Лапатиніб	AMG 510 RMC-4550	AMG 510 Трामетиніб	AMG 510 AMG 511	AMG 510 Бупарлсінб	AMG 510 AZD5363	AMG 510 Цетуксимаб
NCI-H358	22,3	12,4	19,7	25	17	10,5	13,5	4,53	--

(легеня)									
MIA PaCa-2 (підшлункова залоза)	4,7	2,07	--	6,36	3,06	5,53	--	2,67	--
MIA PaCa-2 3D	2,76	--	--	--	7,46	--	--	--	--
NCI- H1373 3D (легеня)	8,7*	--	--	--	11,8	--	--	--	--
CT-26 KRAS p.G12C 3D (товста кишка миші)	10,8*	--	--	11,7*	2,63	10,8	--	--	--
SW837 (товста кишка)	--	--	--	--	--	--	--	--	2,96

Нецільові ефекти за вищих концентрацій, можливо, сприяють підвищенню балів синергізму.

Дослідження комбінації на ксенотрансплантаті пухлини *in vivo*

Дослідження на ксенотрансплантаті пухлини *in vivo* проводили у відповідності з наступними загальними процедурами.

Пухлинні клітини культивували, збирали й підшкірно імплантували в правий бік самиць безтимусних голих мишей. Після досягнення пухлинами приблизно 200 мм³ мишей рандомізували у групи лікування (n=10/група) і починали лікування (у дні, зазначені на графіках). Розміри пухлин та значення маси тіла вимірювали 2-3 рази на тиждень. Об'єм пухлини вимірювали за допомогою електронних штангенциркулів, обчислювали як L x W x H і представляли у мм³. Статистичну значущість спостережуваних відмінностей між кривими росту оцінювали за допомогою дисперсійного аналізу результатів повторних вимірів (RMANOVA) даних логарифмічно трансформованого об'єму пухлини зі скоректованими за Даннеттом багатьма порівняннями показників контрольної групи із групами лікування. У випадку досліджень комбінації проводили RMANOVA із групою обробки комбінації, порівнюючи один до одного з кожною групою обробки окремим засобом.

Матриця на мембранній підкладці BD Matrigel™ являє собою солюбілізований препарат на мембранній підкладці, екстрагований із саркоми миші Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (BD Biosciences, Сан-Хосе, Каліфорнія).

Усі дослідження проводили наосліп.

На фігурах 3, 4, 5 та 6 антитіло до PD-1 миші (клон 29F.1A12) є комерційно доступним від компанії Bio X Cell, Західний Ліван, Нью-Гемпшир.

На фігурах 1, 2, 3, 4, 5 та 6 показані специфічні комбінації інгібітора KRAS^{G12C} *in vivo* з одним або декількома додатковими фармацевтично активними засобами для конкретних типів раку. Дані, отримані й узагальнені на фігурах, показують, що комбінації, представлені на фігурах, демонструють підвищену протиракову активність порівняно з очікуваною, коли окремі компоненти комбінованої терапії використовуються окремо. Слід зазначити, що величина терапевтичного синергізму, який спостерігають, може варіювати залежно від типу раку, котрий лікують, і використовуваного засобу.

На фігурі 4 комбінована обробка за допомогою AMG 510 та антитіла до PD1 (клон 29F.1A12) у моделі сингенної пухлини CT26-KRASG12C спричинила значне підвищення виживаності та зумовила надійне та тривке вилікування у порівнянні з обробкою окремим засобом. Монотерапія AMG 510 або монотерапія антитілом до PD1 зумовила вповільнення росту пухлини в порівнянні з контрольною групою. Кожна обробка за допомогою монотерапії спричиняла повну відповідь 1/10 об'єкта. Комбіноване лікування за допомогою AMG 510 + антитіло до PD1 спричиняло повну відповідь 9/10 суб'єктів. Це вважали надійним вилікуванням, і в цих 9 мишей не залишилося пухлин після припинення обробки (день 43) аж до дня 57, коли дослідження було завершено.

Підвищені зв'язування та ефективність AMG 510

Хоча ARS-1620 підтвердив підхід прямого інгібування KRAS^{G12C}, ідентифікація поліпшених інгібіторів, що підходять для клінічного тестування, виявилася складною. Автори даного винаходу вважають, що серйозною проблемою є недостатня ефективність через невеликий обсяг алостеричної

кишені, зайнятої ARS-1620, що надає обмежені можливості для додаткових взаємодій білок-ліганд. Це було проілюстровано рентгенівською кристалічною структурою ковалентного комплексу KRAS^{G12C}/ARS-1620 (фіг. 40a), у якій водневий зв'язок між ARS-1620 та гістидином 95 (H95) помітно вирізнявся (пунктирна лінія). Проривом стало відкриття того, що жолобок на поверхні, утворений альтернативною орієнтацією H95, може бути зайнятий заміщеними ароматичними кільцями, що посилює взаємодію із KRAS^{G12C}. AMG 510 став кращим кандидатом у кампанії з оптимізації молекул, що зв'язуються із жолобком H95, оскільки він являв собою комбінацію поліпшеної ефективності та сприятливих для розробки властивостей. Рентгенівська співкристалічна структура ковалентного комплексу AMG 510-KRAS^{G12C} (фіг. 40b) підкреслює зв'язування AMG 510 у кишені P2 KRAS. Ізопропіл-метилпіридиновий замісник займає жолобок між Y96, H95 та Q99 і входить у безперервну мережу з 25 ван-дер-ваальсових контактів ліганд-білок, що простягається від головного ланцюга спіралі 2 (H95, Y96) до головного ланцюга гнучкої петлі перемикача II (E62, E63).

Щоб оцінити вплив, який посилені взаємодії виявили відносно ефективності AMG 510, автори даного винаходу використовували два аналізи, у яких використовували рекомбінантний GDP-пов'язаний KRAS^{C118A} або KRAS^{G12C/C118A} з додатковою заміною цистеїну на аланін у залишку 118, щоб уникнути реактивності із цистеїнами, відмінними від C12. У ферментативному аналізі обміну нуклеотидів використовували каталізований SOS1 обмін GDP/GTP для забезпечення зв'язування RAS-зв'язувального домену (RBD) c-RAF з обома версіями KRAS. В 40-хвилинній реакції AMG 510 демонстрував в ~10 разів більшу ефективність (середня IC₅₀ = 0,09 мкМ), аніж ARS-1620 (фіг. 40c). AMG 510 помітно не інгібував KRAS^{C118A} (фіг. 40c), а нереакційноздатний аналог AMG 510 мав мінімальну активність у цих аналізах (фіг. 46a). Кінетичні показники реакції між AMG 510 та GDP-KRAS^{G12C/C118A} в умовах уявного першого порядку вимірювали за допомогою мас-спектрометрії (MS). За допомогою нелінійної апроксимації даних залежності швидкості від концентрації (фіг. 40d) встановили максимальну швидкість реакції $k_{inact} = 0,85 \pm 0,08 \text{ з}^{-1}$ і концентрацію AMG 510 при напівмаксимальній швидкості $K_i = 8,6\text{E-}05 \pm 1,4\text{E-}05 \text{ М}$ з одержанням співвідношення k_{inact}/K_i $9,8\text{E}+03 \pm 1,8\text{E}+03 \text{ М}^{-1}\text{з}^{-1}$. Кінетичні показники реакції між AMG 510 і KRAS^{G12C/C118A} були значно поліпшені в порівнянні з ARS-1620. У порівнянні із клінічними націленими на цистеїн інгібіторами кінази AMG 510 характеризувався значно більшою k_{inact} , що узгоджується з механізмом індукованого KRAS каталізу, який був раніше описаний для ARS-1620. Неспецифічна реактивність AMG 510 з 5 мМ глутатіоном була відносно низькою (AMG 510 $t_{1/2} = 196 \text{ хв.}$) і перебувала в межах діапазону клінічних ковалентних акриламідів.

Інгібування передачі сигналу та росту пухлинних клітин

Клітинну активність AMG 510 оцінювали шляхом виміру базального фосфорилування ERK1/2 (p-ERK) і за допомогою MS для виявлення ковалентної кон'югації (тобто зайнятості) KRAS^{G12C} AMG 510. У двох лініях клітин KRAS p.G12C AMG 510 сильно інгібував p-ERK (IC₅₀ ~0,02 і 0,03 мкМ відповідно) до майже невизначуваних рівнів після 2-годинної обробки і був у 20 разів ефективніше, аніж ARS-1620 (фіг. 40e). Це інгібування точно корелювало із зайнятістю KRAS^{G12C} AMG 510 з майже максимальними рівнями, досягнутими в обох аналізах за ~ 0,2 мкМ (фіг. 40f). AMG 510 також сильно знижував життєздатність клітин в обох лініях (IC₅₀ ~ 0,006 мкМ і 0,009 мкМ, ~ в 40 раз сильніше, аніж ARS-1620) (фіг. 40g).

Клітинні кінетичні показники AMG 510 у двох лініях клітин KRAS p.G12C визначали з використанням залежності інгібування p-ERK від часу та концентрації, що віддзеркалює зайнятість KRAS^{G12C} AMG 510. Швидкість інгібування p-ERK збільшувалася зі збільшенням концентрації AMG 510, при цьому насичення відбувалося при концентраціях вище 3 мкМ. Апроксимації по кривій залежності швидкості від концентрації для AMG 510 та ARS-1620 (фіг. 40h і фіг. 46b) показують, що клітинна кінетична ефективність інгібування KRAS^{G12C} за допомогою AMG 510 була в приблизно 23 рази вище, аніж ARS-1620. Максимальна швидкість інгібування фосфорилування ERK за допомогою AMG 510 ($8,9\text{E-}04 \text{ с}^{-1}$) у приблизно 2 рази вище швидкості гідролізу GTP-KRAS^{G12C}, що лімітує швидкість, запропонованої у нещодавній кінетичній моделі (оцінювана швидкість за інгібуванням EGFR = $4,2 \text{ E-}04 \text{ с}^{-1}$; $t_{1/2} = 27,4 \text{ хв.}$). Щоб забезпечити альтернативну оцінку швидкості гідролізу GTP за допомогою KRAS^{G12C}, використовували інгібітор SHP2 для усунення всієї висхідної передачі сигналу до KRAS. Цей експеримент дав швидкість клітинного гідролізу GTP $9,4\text{E-}04 \text{ з}^{-1}$, ($t_{1/2} = 12,2 \text{ хв.}$; фіг. 46c), що відповідає швидкості, яку спостерігали для AMG 510.

Для більш широкого оцінювання впливу інгібування KRAS^{G12C} на передачу сигналу дві лінії клітин обробляли декількома дозами AMG 510 протягом 4 і 24 годин і проводили вестерн-блотинг для оцінювання багатьох вузлів передачі сигналу (фіг. 41a). Утворення ковалентного аддукту AMG 510 з KRAS^{G12C} виявляли по зміщенню рухливості більш повільно мігруючої смуги KRAS (верхня стрілка). Цей вид молекули, що характеризується зміщенням, накопичувався зі збільшенням часу та дози і відповідав наступному інгібуванню шляху MAPK (тобто p-MEK1/2 і p-ERK1/2) в обох лініях клітин (фіг. 41a, 41b). Інгібування KRAS за допомогою AMG 510 також спричинило нагромадження активного EGFR (p-EGFR Y1068). Інгібування фосфорилування AKT (p-AKT) було очевидним в одній лінії, але зниження фосфорилування рибосомного білка S6 (p-S6) спостерігали через 24 години в обох лініях.

Розщеплення каспази-3 також спостерігали через 24 години, що свідчить про індукцію апоптозу. Під час більш тривалого періоду обробка за допомогою AMG 510 за 0,1 мкМ (фіг. 41b) викликала швидкі (< 2 год.) та стійкі (> 24 год.) ефекти у відношенні MAPK та EGFR, тоді як p-S6 і розщеплення каспазою проявилися через 8-16 годин після обробки в обох лініях.

Для оцінки активності та селективності AMG 510 профілювали в 22 лініях клітин, що несуть або гетерозиготні, або гомозиготні мутації KRAS p.G12C або мутації KRAS, відмінні від p.G12C, а також лінії KRAS дикого типу (WT). Двогодинна обробка за допомогою AMG 510 пригнічувала базисний p-ERK у всіх лініях клітин KRAS p.G12C зі значеннями IC₅₀, що варіюють від 0,010 мкМ до 0,123 мкМ (фіг. 41c і додаткова таблиця 1). AMG 510 не інгібував p-ERK ні в яких відмінних від KRAS p.G12C лініях (IC₅₀ > 10 мкМ; фіг. 41c і додаткова таблиця 1).

В аналізах життєздатності клітин AMG 510 порушував ріст усіх гомозиготних і гетерозиготних ліній клітин KRAS p.G12C, крім SW1573, зі значеннями IC₅₀, що варіюють від 0,004 мкМ до 0,032 мкМ (фіг. 41d і додаткова таблиця 1). Хоча всі лінії KRAS p.G12C демонстрували подібне максимальне інгібування p-ERK, максимальний вплив стосовно життєздатності клітин варіював. Лінії клітин з мутаціями KRAS, відмінними від p.G12C, або з мутаціями в генах, відмінних від KRAS, були нечутливі щодо AMG 510 (IC₅₀ > 7,5 мкМ; фіг. 41d і додаткова таблиця 1). Підгрупу ліній клітин KRAS p.G12C вибирали для оцінки життєздатності в умовах низької адгезії для індукування утворення сфероїдів. Як повідомлялося для інших інгібіторів KRAS^{G12C}, ці умови підвищували чутливість усіх протестованих ліній щодо AMG 510 і зумовлювали 20-кратне збільшення активності та 2,5-кратне збільшення максимального інгібування (фіг. 41e, фіг. 46d і додаткова таблиця 1). SW1573 залишався мінімально чутливим, можливо, через супутню драйверну мутацію, PIK3CA p.K111E.

Для додаткового визначення селективності ковалентної взаємодії AMG 510 з KRAS^{G12C} та ідентифікації інших потенційно "нецільових" білків, які вміщують цистеїн, у клітинах здійснювали профілювання цистеїнового протеому за допомогою MS, як це описано. Після обробки клітин за допомогою DMSO або 1 мкМ AMG 510 (>30-кратна IC₅₀ p-ERK) протягом 4 годин збагачували цистеїновий протеом та ідентифікували пептиди. Серед 6451 унікальних пептидів, які вміщують цистеїн, пептид Cys12 з KRAS^{G12C} був єдиним ідентифікованим пептидом, який відповідав критеріям ковалентної взаємодії з мішенню (фіг. 41f).

AMG 510 інгібує передачу сигналу KRAS in vivo

Ефект пероральної обробки AMG 510 щодо передачі сигналу KRAS^{G12C} оцінювали за допомогою фармакодинамічних (PD) аналізів, які вимірюють p-ERK. У пухлинах людини, що несуть KRAS p.G12C, AMG 510 інгібував p-ERK залежним від дози чином через 2 години після обробки (фіг. 42a, b). Інгібування p-ERK після обробки за допомогою AMG 510 (100 мг/кг) варіювало від 69 % (MIA PaCa-2 T2) до 83 % (NCI-H358) зниження в порівнянні з контролем. Подібні ефекти AMG 510 відносно рівнів p-ERK спостерігали на моделі пухлини миші (фіг. 47a) з використанням сингенної лінії CT-26 KRAS p.G12C, яку створювали з використанням технології CRISPR. Аналізи PD із часом продемонстрували піковий вплив AMG 510 на плазму крові та пухлину через 0,5 години після однократної дози (10 мг/кг), що зумовило максимальне інгібування p-ERK через 2-4 години після обробки і до стійкого значного інгібування упродовж 48 годин (фіг. 42c, 42d). Це узгоджується з відносно тривалим періодом напіввиведення білка KRAS^{G12C} від 20 до 24 годин (фіг. 46e).

Крім того, у паралельних експериментах зайнятість KRAS^{G12C} AMG 510 вимірювали за допомогою MS і вона наближалася до 100 % за максимальної дози (100 мг/кг), що корелює з максимальною супресією p-ERK (фіг. 42e і 42f). Дослідження часової динаміки показали, що часткову зайнятість AMG 510 виявляли за 0,5 години, а зайнятість ~ 100 % спостерігали за 2 години (фіг. 42g).

Селективне стосовно мутанта інгібування пухлини in vivo

AMG 510 оцінювали відносно його здатності інгібувати ріст ксенотрансплантатів пухлини людини KRAS p.G12C і KRAS p.G12V (SW480-1AC) у мишей. AMG 510 значно інгібував ріст пухлин MIA PaCa-2 T2 і NCI-H358 за всіх рівнів доз, при цьому регресію пухлини спостерігали за більш високих доз (фіг. 43a, 43b). Навпаки, обробка за допомогою AMG 510 не впливала на ріст пухлини KRAS p.G12V (фіг. 47b). Рівні AMG 510 у плазмі крові були порівнюваними у всіх моделях (дані не показані). У мишачій моделі пухлини CT-26 KRAS p.G12C, вирощені на імунокомпетентних мишах, AMG 510 зумовлював інгібування росту та регресію пухлини за максимальної дози (фіг. 43c). У двох з 10 мишей (в групі, що одержує по 100 мг/кг) не виявляли пухлини, коли дослідження було припинено в день 29. AMG 510 також значно інгібував ріст людських, отриманих від пацієнтів ксенотрансплантатів (PDX), мутантних за KRAS p.G12C, у мишей (фіг. 43d та фіг. 47c).

Докази клінічної активності

Підвищена активність, висока ефективність і сприятливий фармацевтичний профіль AMG 510 забезпечили його вибір у якості першого інгібітора KRAS^{G12C} для участі в клінічних випробуваннях (Clinical trials.gov NCT03600883). Примітно, що в перших двох когортах пацієнтів обробка за допомогою AMG 510 зумовила об'єктивні часткові відповіді (згідно з RECIST 1.1) у двох пацієнтів з NSCLC KRAS p.G12C (фіг. 43e та фіг. 47d). Обидва пацієнта прогресували на декількох попередніх системних курсах лікування, що включають карбоплатин, пеметрексед та ніволумаб, із

задокументованим прогресуванням захворювання. Перший пацієнт продемонстрував зменшення пухлини на 34 % через 6 тижнів лікування за допомогою AMG 510. Другий респондент показав зменшення пухлини на 67 % всього через 2 тижні лікування за допомогою AMG 510. Ці пацієнти продовжували лікування за допомогою AMG 510 через 6 місяців і 2 місяці відповідно (на момент дати подачі даної попередньої заявки на патент у США). Небажані явища не реєстрували. Ці пацієнти стали першими, хто відповідав на специфічний щодо мутанта інгібітор KRAS, що стало важливою віхою для пацієнтів з пухлинами, мутантними за KRAS p.G12C.

Підвищена ефективність у комбінації

Враховуючи високий рівень розповсюдження KRAS p.G12C у разі аденокарциноми легені на моделі NCI-H358 досліджували комбіноване лікування за допомогою AMG 510 з карбоплатином, стандартним хіміотерапевтичним засобом для лікування раку легені. Лікування будь-яким окремим засобом (AMG 510 або карбоплатином) призводило до значного пригнічення росту пухлини (фіг. 44a). Однак комбіноване лікування за різних доз призвело до значного підвищення протипухлинної ефективності (фіг. 44a і фіг. 47e). Наскільки відомо авторам даного винаходу, це перша демонстрація підвищеної ефективності від комбінації селективного щодо мутанта інгібітора KRAS з хіміотерапевтичним засобом, що забезпечує обґрунтування такого підходу в клінічній практиці.

Клінічно підтверджена стратегія комбінування інгібіторів BRAF і MEK припускає, що комбінації з AMG 510 та іншими інгібіторами сигнальних шляхів MAPK (і AKT) можуть посилювати знищення пухлинних клітин і долати стійкість²⁶. Тому експерименти з комбінацією *in vitro* проводили на декількох лініях клітин KRAS p.G12C з матрицями AMG 510 та інгібіторами кіназ HER, EGFR, SHP2, PI3K, AKT і MEK (фіг. 48). Як показує індукування p-EGFR за допомогою AMG 510 (фіг. 41a), комбінація AMG 510 з декількома засобами призводила до синергічного знищення пухлинних клітин в NCI-H358 (фіг. 44b і фіг. 48). Синергізм був більш обмеженим в інших лініях, але комбінація з MEKi була синергічною в багатьох умовах і посилювалася в умовах сфероїдного росту (фіг. 44b). Значно підвищена протипухлинна активність також спостерігалася *in vivo* з мінімально ефективною дозою AMG 510 у комбінації з MEKi порівняно з будь-яким одним окремим засобом (фіг. 44c). Разом ці дані підтверджують клінічний підхід, що викликає інтерес, комбінування AMG 510 із засобами, націленими на інші вузли шляху MAPK, для пригнічення залишкової або обхідної передачі сигналу, які можуть обмежувати ефективність або викликати стійкість.

Протизапальне мікрооточення пухлини

Блокада осі імунних контрольних точок програмованої клітинної смерті 1/ліганду програмованої смерті 1 (PD-1/PD-L1) клінічно підтверджена й схвалена для певних онкологічних пацієнтів. Активність терапії AMG 510 у комбінації з антитілом до PD-1 оцінювали в імунокомпетентних умовах на моделі CT-26 KRAS p.G12C. Ця лінія залежить від алелю KRAS p.G12C (фіг. 49a, b) і була чутлива щодо AMG 510 (фіг. 43c і фіг. 47a). Як показано раніше (фіг. 43c), AMG 510 призводив до регресії пухлини як єдиний засіб (фіг. 45a). Однак із часом тільки 1 з 10 пухлин залишалася повністю регресивною (фіг. 45a). Монотерапія антитілом до PD-1 призводила до сповільненого росту пухлини й тільки 1 з 10 пухлин проявляла повну регресію. Дивовижно, що комбіноване лікування призвело до повної відповіді в 9 з 10 пацієнтів (фіг. 45a). Лікування припиняли через 43 дні й за мишами продовжували спостереження протягом ще 112 днів. У всіх пацієнтів з повною відповіддю на комбіноване лікування як і раніше не було пухлин, що виявляються, що вказує на те, що комбінація AMG 510 з антитілом до PD-1 призводить до надійного та тривалого виліковування. Під час використання сурогатної кінцевої точки виживаності (об'єм пухлини > 800 мм³) комбіноване лікування призводило до помітного збільшення виживаності порівняно з видами монотерапії (фіг. 45b).

Щоб зрозуміти ефекти лікування щодо композиції імунних клітин у пухлинах, пухлини CT-26 KRAS p.G12C імунофенотипували після лікування. Через 4 дні лікування AMG 510 призводив до помітного збільшення інфільтрації Т-клітин, у першу чергу CD8⁺ Т-клітин (фіг. 45c і фіг. 50a). Підвищену інфільтрацію CD8⁺ Т-клітин також спостерігали в групі, що одержує комбінацію, у першу чергу за рахунок AMG 510, оскільки цього не відбувалося після монотерапії антитілом до PD-1. Як додатковий компаратор інгібітор MEK (MEKi), який блокував передачу сигналів MAPK нижче RAS (фіг. 50b), і призводив до подібного пригнічення росту пухлини CT-26 KRAS p.G12C, як і AMG 510 (фіг. 50c, 50d), не впливає на кількість CD8⁺ Т-клітин (фіг. 45c), які інфільтруються. Обробка за допомогою AMG 510 також призводила до підвищеної інфільтрації макрофагів і дендритних клітин, чого не спостерігали з MEKi (фіг. 45c). Експресія PD-1 на CD8⁺ Т-клітинах помірно збільшувалася за допомогою як AMG 510, так і MEKi (фіг. 44a). РНК цілої пухлини очищували після обробки й оцінювали профілі транскрипції на панелі імунних генів. Усього через 2 дні лікування інгібування KRAS^{G12C} за допомогою AMG 510 забезпечувало індукування протизапального мікрооточення, що характеризується підвищеною передачею сигналу інтерферону, процесингом антигену, цитотоксичною активністю й активністю NK-клітин, а також маркерами стимуляції вродженого імунітету, які були значно вищими порівняно з ефектами, індукованими інгібуванням MEK (фіг. 45d і фіг. 44e). AMG 510 також індукував експресію білків MHC-I на пухлинних клітинах CT-26 KRAS p.G12C (фіг. 45e і фіг. 50f). Ці дані дозволяють припустити, що лікувальні ефекти AMG 510 щодо пухлинних клітин можуть призводити до посилення

Т-клітинного примування й розпізнавання антигену. Для тестування цього, вилікуваним мишам після комбінованого лікування (фіг. 45а) повторно вводили двосторонні пухлини CT-26 KRAS p.G12C і батьківські CT-26 (KRAS p.G12D) або CT-26 KRAS p.G12C, а також неспоріднену модель пухлини молочної залози миші 4T1. Усі пухлини 4T1 (4/4) вирости, але жодна (0/8) з пухлин CT-26 KRAS p.G12C не прижилася (фіг. 45f). Примітно, що всі миші, що одержували батьківські пухлини CT-26, не мали пухлин через 40 днів (фіг. 45f). В окремій контрольній групі необроблених мишей вирости 15 з 15 (100 % випадків) батьківських пухлин CT-26 і CT-26 KRAS p.G12C (фіг. 50g). Спленоцити, зібрані у вилікуваних мишей, стимулювали або пухлинними клітинами CT-26, CT-26 KRAS p.G12C, або 4T1, і рівні IFN- γ , що секретується, вимірювали як маркер пухлиноспецифічного примування й активності Т-клітин. Клітини CT-26 KRAS p.G12C і батьківські клітини CT-26 викликали ~ 3-кратне збільшення кількості IFN- γ , яке не індукувалося клітинами 4T1 (фіг. 45g).

ОБГОВОРЕННЯ

Відкриття нової взаємодії з борозенкою H95 KRAS^{G12C} дозволило помітно підвищити ефективність та ідентифікувати AMG 510, перший у своєму класі інгібітор KRAS^{G12C} для перорального застосування, з доказами клінічної активності в пацієнтів. AMG 510 селективно націлюється на пухлині KRAS p.G12C і комбінується із цитотоксичними засобами спрямованої дії для синергічного знищення пухлинних клітин. Загибель пухлинних клітин, індукована AMG 510, призводила до запального мікрооточення пухлини, яке значною мірою реагувало на інгібування імунних контрольних точок. Комбіноване лікування за допомогою антитіла до PD-1 і MEKі продемонструвало переконливу доклінічну ефективність у декількох звітах, і це було пов'язано з підвищеною Т-клітинною інфільтрацією. У даному дослідженні інфільтрація імунних клітин після селективного інгібування KRAS^{G12C} була значно більш стійкою, ніж інфільтрація, індукована MEKі. На відміну від описаних ефектів неселективних щодо пухлини MEKі, які блокують розмноження й примування Т-клітин, селективне інгібування KRAS^{G12C} за допомогою AMG 510 призводило до посиленого примування Т-клітин. Ці дані підтверджують модель поліпшеного розпізнавання антигену й Т-клітин пам'яті, у якій індукована AMG 510 загибель пухлинних клітин у комбінації з обробкою антитілом до PD-1 призводить до адаптивної імунної відповіді, так що пухлини, що не стосуються p.G12C, розпізнаються й знищуються. Існують достатні докази того, що статус внутрішньопухлинної мутації KRAS може бути гетерогенним як у межах однієї пухлини, так і між первинними й метастатичними ділянками. Узяті разом, дані по даному винаходу дозволяють припустити, що AMG 510 може бути ефективним протипухлинним засобом навіть в умовах, коли експресія KRAS^{G12C} є гетерогенною.

СПОСОБИ

Рекомбінантні білки

Рекомбінантний His-мічений KRAS^{G12C/C118A} людини (1-169), c-RAF GST людини (1-149) і His-мічений KRAS^{C118A} людини (1-169) були експресовані в *Escherichia coli* і очищені з використанням афінної хроматографії й ексклюзійної хроматографії. Рекомбінантний His-мічений SOS1 людини (564-1049, оптимізований за кодоном комах) був експресований в *Trichoplusia ni* і очищений з використанням афінної хроматографії; після видалення His-мітки він був додатково очищений за допомогою ексклюзійної хроматографії. Конструкцію мутанта із заміною цистеїну в легкому ланцюзі використовували для досліджень співкристалізації на основі роботи Ostrem et al¹⁵. Рекомбінантний His-мічений KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S} людини (1-169) був експресований в *E. coli* і очищений з використанням афінної хроматографії, іонообмінної хроматографії й ексклюзійної хроматографії з видаленням His-мітки для кристалізації.

Сполуки та антитіла

ARS-1620, PD-0325901, траметиніб, афатиніб, ерлотиніб, RMC-4550 і AZD5363 одержували з комерційних джерел. AMG 511 синтезували самостійно. Синтез AMG 510 і його нереакційноздатного пропіонамиду описаний у даному документі. Вихідні розчини AMG 510 і всіх інших інгібіторів, використовуваних для експериментів *in vitro*, одержували у вигляді 10 мМ розчинів в 100 % диметилсульфоксиді (DMSO). Для досліджень *in vivo* AMG 510 і MEKі (PD-0325901) складали в 2 % НРМС, 1 % Tween 80 і вводили через шлунок зонд щодня в дозі 10 мг/кг. Вихідний розчин карбоплатину в дозі 10 мг/мл додатково розбавляли до 5 мг/мл або 3 мг/мл в 1 % PBS і вводили за допомогою внутрішньоочеревинної ін'єкції (IP) один раз на тиждень. Клон 29F.1A12 антитіла пацюка до PD1 миші химеризували із вмістом кістяка мишачого IgG1. Крім того, вводили мовчазну мутацію Fc-рецептора N297G в ділянку важкого ланцюга IgG для зниження ефекторної функції. Антитіло 29F.1A12 до PD-1 розбавляли в 1X PBS до концентрації 500 мкг/мл і вводили один раз кожні 3 дні, всього 3 IP ін'єкції. Усі антитіла, використовувані для вестерн-блотингу, купували в компанії Cell Signaling, за винятком антитіл до RAS (Abcam), антитіл до фосфо-ERK1/2 (ThermoFisher Scientific) і антитіл до бета-актин-HRP (Sigma).

Лінії клітин

Усі лінії клітин купували в Американській колекції типових культур (ATCC), за винятком KM12 і NCI-H3122, які одержували з Національного інституту раку. Лінії клітин аутентифікували за допомогою профілювання з коротким тандемним повтором (STR). Для поліпшення кінетичних показників росту *in*

vivo одержували клітини MIA PaCa-2 T2 і SW480-1AC шляхом пасування клітин MIA PaCa-2 і SW480 відповідно мишам. Клітини CT-26 KRAS p.G12C одержували з мишачої колоректальної лінії CT-26 (ATCC) з використанням технології CRISPR для заміщення обох алелів KRAS p.G12D на p.G12C (ThermoFisher Scientific). Клон H10 визначали як гомозиготний за алелем KRAS p.G12C, ідентифікували як CT-26 KRAS p.G12C-H10 і позначали як CT-26 KRAS p.G12C. Усі лінії клітин культивували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки й 1x пеніцилін/стрептоміцин/ L-глутамін за 37 °C, 5 % CO₂ у зволоженому інкубаторі.

Рентгенівська кристалографія

Очищений немічений KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S} ("KRAS") в 20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl концентрували до 40 мг/мл і додавали до дворазового молярного надлишку твердої сполуки AMG 510, розчиненої в DMSO. Зразок білкового комплексу поміщали на орбітальний шейкер за к. т. на 16 годин, а потім піддавали центрифужній фільтрації. Співкристалізацію проводили з використанням способу дифузії парів у сидячій краплі. Змішували зразок білкового комплексу "KRAS"-AMG 510 і буфер для кристалізації (1 mM MgCl₂, 0,1 M MES, pH 6,5, 30 % вага/об. поліетиленгліколю 4000). Сплюснуті стрижнеподібні кристали з'являлися за одну добу за 20 °C.

Кристал урівноважували в буфері для кристалізації як криопротекторі перед заморожуванням у рідкому азоті. Набір даних збирали на кремнієвому піксельному детекторі Pilatus 6M в Advanced Light Source Beamline 5.0.1 за довжини хвилі 0,97741 Å і температури 100 K. Дані інтегрували й масштабували за допомогою HKL2000. Кристали належать до орторомбічної просторової групи P2₁2₁2₁ з параметрами елементарної комірки a = 40,9 Å, b = 58,4 Å, c = 65,9 Å, α = 90°, β = 90°, γ = 90° (див. додаткову таблицю 2). Структуру визначали шляхом молекулярного заміщення з використанням MolRep зі структурою Apo KRAS як моделлю пошуку. В асиметричній одиниці міститься одна молекула білка. Структуру уточнювали з використанням Refmac5, а побудову моделі здійснювали за допомогою графічної програми Coot. Ліганд одержували з використанням PRODRG. Структуру KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}, пов'язану з GDP і AMG 510, уточнювали до 1,65 Å, при цьому значення R-фактора становило 18,1 %, і R_{free} 21,5 %. Статистичні характеристики за картою Рамачандрана були на 98,2 % сприятливими, 1,8 % допустимими, без яких-небудь відхилень. Амінокислотні залишки 105-107 були недозволеними в кристалічній структурі. Атомні координати й структурні фактори будуть поміщені в банк даних білків (ID-код PDB: ще не присвоєний).

Аналіз обміну зв'язаних нуклеотидів.

Інгібування активності обміну нуклеотидів KRAS^{G12C/C118A} або KRAS^{C118A}, що каталізується SOS1, вимірювали з використанням технології Alpha (гомогенного аналізу посилення люмінесценції під час зближення). 20 нМ зв'язаного з GDP людського білка KRAS^{G12C/C118A} або KRAS^{C118A} інкубували із дворазовим серійно розведеним AMG 510 або DMSO протягом 5 хвилин за кімнатної температури (к. т.) у реакційному буфері (25 mM HEPES, pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 0,01 % Triton X-100). Для всіх наступних стадій до реакційного буфера додавали DTT до кінцевої концентрації 1 mM. Потім GTP і SOS-1 додавали в реакційний буфер з DTT за кінцевих концентрацій 1,25 mM або 500 нМ відповідно й інкубували за к. т. протягом 30 хвилин. Нарешті, додавали c-RAF RBD (кінцева концентрація 50 нМ), донорні гранули глутатіону Alpha (PerkinElmer; кінцева концентрація 20 мкг/мл) та акцепторні гранули хелату нікелю AlphaLISA® (PerkinElmer; кінцева концентрація 20 мкг/мл), всі розведені в реакційному буфері з DTT. Реакційну суміш інкубували за к. т. протягом 5 хв., а потім планшети зчитували на багатоканальному ридері EnVision® з використанням протоколу AlphaScreen. Сигнал люмінесценції вимірювали за 570 нм через 180 мс після збудження за 680 нм. Інтенсивність сигналу відповідала асоціації c-RAF RBD з KRAS^{G12C/C118A} або KRAS^{C118A}, зв'язаним з GTP, і була нормалізована до контролю DMSO.

Аналізи фосфорилювання ERK1/2

Для клітинних аналізів висівали по 2,5E + 04 клітин на лунку в 96-лункові планшети й інкубували за 37 °C, 5 % CO₂ протягом ночі. Наступного дня до клітин додавали 3-кратно серійно розбавлену сполуку або DMSO і планшети інкубували за 37 °C, 5 % CO₂ протягом 2 годин. Після обробки клітини промивали крижаним PBS і лізували в буфері для лізису RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 % Igepal; 0,5 % дезоксихолату натрію; 150 mM NaCl; 0,1 % додецилсульфату натрію), що містить протеазу й інгібітори фосфатази. Рівні базисного фосфорилювання ERK1/2 вимірювали в оброблених клітинних лізатах з використанням наборів phospho-ERK1/2 Whole Cell Lysate (Meso Scale Discovery) згідно з протоколом виробника. Інтенсивність сигналу відповідала рівням фосфо-ERK1/2 і була нормалізована до контролю DMSO.

Для лізатів пухлинних клітин з фармакодинамічних аналізів in vivo 50 мкг загального білка на зразок аналізували з використанням наборів Phospho-ERK1/2 та Total ERK1/2 Whole Cell Lysate (Meso Scale Discovery) згідно з протоколом виробника. Сигнал фосфо-ERK1/2 нормалізували за сигналом загального ERK1/2 для даного зразка й розраховували % інгібування фосфорилювання ERK щодо оброблюваної середовищем-носієм групи.

Аналізи життєздатності клітин

Для аналізу життєздатності адгерентних клітин висівали по 0,5-1,0E + 03 клітин на лунку в 384-

лункові планшети (або по $2,5-4,0E + 04$ клітин на лунку в 96-лункові планшети) та інкубували за 37°C , 5 % CO_2 протягом ночі. Наступного дня до клітин додавали серійно розбавлену сполуку або DMSO і планшети інкубували за 37°C , 5 % CO_2 протягом 72 годин. Життєздатність клітин вимірювали з використанням набору Luminescent Cell Viability Assay Celltiter-Glo® (Promega) згідно з протоколом виробника. Сигнал люмінесценції оброблених зразків нормалізували за контролем DMSO.

Для аналізів життєздатності сфероїдних клітин висівали по $2,5-4,0E + 04$ клітин на лунку в 96-лункові мікропланшети для сфероїдної культури й інкубували за 37°C , 5 % CO_2 протягом 24 годин. Застосовували ту ж процедуру, що й описана вище, за винятком того, що життєздатність вимірювали з використанням набору CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega) згідно з протоколом виробника.

Дослідження синергічної комбінації

Комбіновані експерименти для оцінки синергічних взаємодій AMG 510 з іншими інгібіторами *in vitro* проводили як описано раніше (Saiki, A. Y. et al. MDM2 antagonists synergize broadly and robustly with compounds targeting fundamental oncogenic signaling pathways. *Oncotarget* 5, 2030-2043, doi:10.18632/oncotarget.1918 (2014)).

Кінетичні аналізи

Утворення ковалентних аддуктів інгібітор-KRAS^{G12C} вимірювали з використанням MS як описано раніше⁴⁴. Значення щодо % зв'язування для різних концентрацій інгібітора за різних значень часу інкубації підганяли до експоненційного рівняння з одержанням значень K_{obs} для кожної тестованої концентрації з використанням Prism (програме забезпечення GraphPad). Потім одержані значення K_{obs} перераховували залежно від концентрації інгібітора з одержанням значень K_{inact} і K_i .

Для визначення кінетичних значень утворення ковалентного аддукту інгібітор-KRAS^{G12C} у клітинах вимірювали рівні базисного фосфорилування ERK1/2 після обробки різними концентраціями інгібітора за різних значень часу інкубації точно так, як описано вище, і значення % активності використовували для кінетичних розрахунків.

Цистеїновий протеомний аналіз

Клітини NCI-H358 недрібноклітинного раку легені людини висівали на планшет за $2,0E + 06$ клітин/10 см та інкубували за 37°C , 5 % CO_2 протягом ночі. Наступного дня клітини обробляли за допомогою 1 мкМ AMG 510 або DMSO ($n = 5$) та інкубували за 37°C , 5 % CO_2 протягом 4 годин. Після обробки клітини промивали крижаним PBS, що містить інгібітори протеаз, а потім видалляли із планшетів. Осади миттєво заморожених клітин обробляли в IQ Proteomics, LLC за допомогою мас-спектрометрії (MS) згідно з їхнім протоколом, описаним Patricelli et al. Коротко, осад клітин лізували й обробляли 100 мкМ дестіобіотиніодацетамідом для мічення залишків цистеїну, які не прореагували та залишилися, підданих впливу розчинника. Після розщеплення трипсином суміш пептидів, одержану з кожного зразка, мітили реагентами ізобаричної мітки TMT-10 plex (Tandem Mass Tag) (ThermoFisher Scientific). Після мічення зразки змішували перед збагаченням дестіобіотинільованими пептидами з використанням стрептавідин-агарози високої ємності. Збагачені пептиди аналізували за допомогою нано-LC-MS з використанням тригодинного градієнта й способу MS3 на основі синхронного вибору попередників (SPS) на мас-спектрометрі Orbitrap Lumos (ThermoFisher Scientific). Ідентифікацію дестіобіотинільованих пептидів здійснювали за допомогою пошуку в базі даних за допомогою спеціалізованого інформаційного конвеєра, розробленого в лабораторії Gygi у Гарвардській медичній школі, який використовує SEQUEST. Усі спектри порівнювали з базою даних послідовностей білків Human Uniprot (2018), до якої була додана послідовність мутантного білка KRAS^{G12C} і загальні контамінанти. Пептиди й білки фільтрували до 1 % частки хибнопозитивних результатів (FDR) і тільки ті пептиди, які відповідали критерію мінімального співвідношення сигналу до шуму 200 і чистоти виділення більше 50 %, використовували для кількісного аналізу. Всю обробку даних для статистичного аналізу проводили в Microsoft Excel з використанням нормалізованих пікових кількісних показників цистеїнвмісних пептидів. $\log_2$ -кратні зміни розраховували між зразками груп, що одержують контроль DMSO, і груп, оброблених за допомогою AMG 510. Проводили двосторонній t-тест для кожного пептиду для оцінювання статистичної значущості різниці між зразками груп, що зазнають обробки, і груп з одержанням контролю DMSO, за умови рівної дисперсії. Будували діаграму volcano, що показує негативні P-значення $\log_{10}$, нанесені навпроти $\log_2$ -кратних змін для кожного дестіобіотинільованого цистеїнвмісного пептиду. Пептиди, які демонстрували зниження кількісних показників в $\log_2$ разів більше 2 і P-значення менше 0,0001, позначали як ковалентні мішені для AMG 510 ($n = 5$ біологічних повторностей).

Дослідження на тваринах

Усі експериментальні процедури на тваринах проводили відповідно до рекомендацій Комітету з догляду й використання тварин Amgen і Асоціації з оцінювання й акредитації стандартів догляду за лабораторними тваринами. У всіх дослідженнях використовували самок безтимусних голих мишей або самок Balb/c віком від 4 до 7 тижнів (Charles River Laboratories). Безтимусних голих мишей утримували по п'ять на кожну клітку з фільтром у стерильному приміщенні, а мишей Balb/c утримували по п'ять у клітці з фільтром у нестерильному приміщенні в кімнаті з контрольованим середовищем (температура $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, відносна вологість $50 \pm 20\%$) за 12-годинного циклу світло/темрява. Мишей

годували комерційним кормом для гризунів.

Аналіз експресії гена

Загальну РНК очищували за допомогою наборів RNeasy Mini (QIAGEN) з пухлин CT-26 KRAS p.G12C з обробкою середовищем-носієм перорально, AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) або MEKi перорально (PD-0325901, 10 мг/кг QD) протягом двох днів (n = 5/група). Визначали кількість РНК за допомогою DropSense 96 (PerkinElmer Inc). 300 нг РНК аналізували на nCounter™ (NanoString Technologies) з панеллю імунного профілювання щодо всіх видів раку миші, що містить 750 генів-мішеней, 20 генів "домашнього господарства", 8 внутрішніх негативних контролів і 6 внутрішніх позитивних контролів. Неопрацьовані дані перевіряли на якість, нормалізували й аналізували за допомогою програмного забезпечення nSolver (NanoString Technologies). Неопрацьовані дані перетворювали в $\log_2$ і виконували статистичні аналізи. Бали шляху (бал інтерферону, бал процесування антигену, бал МНС, бал TLR і бал функції Т-клітин) і бали профілювання клітин (бал NK-клітин, бал цитотоксичних клітин і бал CD45) одержували за допомогою nSolver Advanced Analysis (NanoString Technologies).

Див. додаткову таблицю 3А, таблицю 3В, таблицю 3С, таблицю 3D і таблицю 3Е для одержання докладного переліку генів, включених у кожний бал, і р-значень, використовуваних для розрахунків балів шляху й профілювання клітин.

Фармакодинамічний аналіз пухлини

Ефект AMG 510 щодо фосфорилування ERK1/2 оцінювали на мишах, що несуть пухлину MIA PaCa-2 T2, NCI-H358 і CT-26 KRAS p.G12C. Пухлинні клітини MIA PaCa-2 T2 або NCI-H358 ($5,0E + 06$ клітин) вводили за допомогою підшкірної ін'єкції в бік самок безтимусних голих мишей у співвідношенні клітин до матригелю 2:1 (BD Bioscience, Сан-Хосе, Каліфорнія, США). Мишам вводили однократну пероральну дозу або середовища-носія, або AMG 510 (0,3, 1, 3, 10, 30 і 100 мг/кг), коли середній розмір пухлини досягав $\sim 300\text{--}600\text{ мм}^3$ (n = 3/група), і збирали через 2 години. Однократну пероральну дозу AMG 510 (10 мг/кг) використовували для досліджень тимчасової динаміки. Самкам мишей Balb/c вводили за допомогою підшкірної ін'єкції клітини пухлини CT-26 KRAS p.G12C ($3,0E + 05$ клітин). Мишей рандомізували на групи (n = 3/група), коли середній об'єм пухлини становив 486 мм^3 , вводили однократну пероральну дозу або середовища-носія, або AMG 510 (3, 10, 30 або 100 мг/кг), або MEKi (PD-0325901, 10 мг/кг) і збирали через 2 години. У всіх дослідженнях аналізували плазму крові й пухлину для визначення концентрацій тестованого виробу. Зразки пухлин також збирали в зазначені моменти часу, миттєво заморожували в рідкому азоті й обробляли для біоаналізу або подрібнювали з використанням cryoPREP® Dry Impactor (Covaris). Подрібнені зразки ресуспендували в буфері для лізису RIPA, що містить інгібітори протеази та фосфатази, і гомогенізували. Потім очищені лізати аналізували щодо рівнів фосфорилування ERK1/2, як описано вище, і щодо ковалентної модифікації KRAS^{G12C} за допомогою MS.

Ксенотрансплантат і сингенні дослідження

Клітини MIA PaCa-2 T2, NCI-H358 або SW480-1AC ($5,0E + 06$ клітин з матригелем у співвідношенні 2:1) вводили за допомогою підшкірної ін'єкції в бік самок безтимусних голих мишей (n = 10/група). Лікування починали, коли пухлини прижилися та їх об'єм становив приблизно 170 мм^3 для досліджень MIA PaCa-2 T2 і NCI-H358 або приблизно 200 мм^3 для моделі SW480-1AC. У дослідженнях залежності відповіді від дози миші одержували або середовище-носіє перорально (QD), або AMG 510 перорально (3, 10, 30 і 100 мг/кг QD). У дослідженні комбінації NCI-H358 з AMG 510 і карбоплатином мишей рандомізували на 8 груп (n = 10/група) і вводили одне з середовища-носія перорально (QD) + PBS внутрішньочеревинно (1х/тиждень); AMG 510 перорально (10 або 30 мг/кг QD) + PBS внутрішньочеревинно (1х/тиждень); середовища-носія перорально (QD) + карбоплатин (50 або 100 мг/кг) внутрішньочеревинно (1х/тиждень); AMG 510 перорально (10 або 30 мг/кг QD) + карбоплатин (50 або 100 мг/кг) внутрішньочеревинно (1х/тиждень). Для дослідження комбінації з AMG 510 і MEKi мишей рандомізували на 4 групи n = 10/група й вводили одне з середовища-носія перорально (QD); AMG 510 перорально (10 мг/кг QD); MEKi перорально (1 мг/кг QD); AMG 510 перорально (10 мг/кг QD) + MEKi перорально (1 мг/кг QD). Для сингенних досліджень клітини CT-26 KRAS p.G12C ($3,0E + 05$ клітин) вводили за допомогою підшкірної ін'єкції в бік самок мишей Balb/c. Лікування починали, коли пухлини прижилися та їх об'єм становив приблизно 170 мм^3 для досліджень залежності відповіді від дози й приблизно 130 мм^3 для дослідження комбінації, n = 10/група; за винятком дослідження залежності відповіді від дози MEKi, де n = 8/група. У дослідженнях залежності відповіді від дози миші одержували або середовище-носіє перорально (QD), AMG 510 перорально (3, 10, 30 і 100 мг/кг QD), або MEKi (PD-0325901) перорально (1, 3 або 10 мг/кг QD). У дослідженні комбінації мишей рандомізували на 4 групи n = 10/група та вводили одне із середовища-носія перорально (QD) + PBS внутрішньочеревинно (Q3Dx3); AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) + PBS внутрішньочеревинно (Q3Dx3); середовища-носія перорально (QD) + антитіло до PD-1 (29F,1A12; 100 мкг/доза, Q3Dx3) внутрішньочеревинно; AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) + антитіло до PD-1 (29F,1A12; 100 мкг/доза, Q3Dx3) внутрішньочеревинно з 15 дня до 43 дня. Дослідження комбінованого лікування проводили в сліпом режимі. Розміри пухлини оцінювали два рази в тиждень за допомогою

електронного цифрового штангенциркуля Pro-Max (Japan Micrometer Mfg. Co. LTD), об'єм пухлини обчислювали з використанням формули: довжина x ширина x висота, і виражали в мм³. На моделях PDX KRAS p.G12C легені мишам підшкірно імплантували фрагменти пухлини вагою ~70 мг. Мишей рандомізували, коли об'єми пухлини становили приблизно 160-200 мм³, і вводили або середовище-носії перорально (QD), або AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) через день після рандомізації. Розміри пухлини знімали два рази в тиждень із використанням формули: ширина² x довжина x 0,52 і виражали в мм³. Дані виражені як середнє значення $\pm$ SEM.

Виявлення кон'югата AMG 510-KRAS^{G12C}

Антитіло до RAS людини (антитіло до RAS) отримували шляхом придбання в компанії Abcam і біотинілювали за допомогою EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (ThermoFisher Scientific), використовуючи протокол, описаний виробником. Залишковий біотин видаляли, одержане антитіло до RAS з біотином завантажували в гранули Dynabeads® Myone™ Streptavidin C1 (ThermoFisher Scientific) у співвідношенні 1:1 на одну годину за к. т. зі струшуванням. Лізати з оброблених *in vitro* клітин або оброблених *in vivo* клітин пухлини, описаних раніше, інкубували із гранулами біотинільованого антитіла до RAS протягом 3 годин за к. т. зі струшуванням. Гранули промивали за допомогою PBST (3x) з використанням магніту, потім за допомогою PBS (1x), а потім за допомогою води (1x). Зразки елюювали із гранул з використанням 2 % водної мурашиної кислоти/10 % водного ацетонітрилу, а потім інкубували за к. т. зі струшуванням протягом 10 хвилин. Супернатант переносили в 96-лунковий планшет і висушували. Зразки ресуспендували в буфері для денатурації (10 mM TCEP, 8 M сечовина) та інкубували за 65 °C зі струшуванням протягом 15 хвилин. Додавали йодацетамід (40 mM) та інкубували за 37 °C протягом 30 хвилин, захищаючи від світла. Додавали 50 mM NH₄HCO₃ і трипсин (0,01 мкг/мл) і зразки розщеплювали протягом ночі за 37 °C протягом ~16-20 годин, потім остаточно гасили мурашиною кислотою з одержанням кінцевої концентрації 1 % (об.:об.). Потім зразки аналізували за допомогою рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (LC-MS/MS) із застосуванням моніторингу множинних реакцій (MRM) у режимі позитивної іонізації з використанням 6500 QTRAP (AB SCIEX), з'єданого з Acquity UPLC (Waters). Зразки вводили в колонку Acquity UPLC BEH C8 1,7 мкм, 2,1 x 100 мм (Waters). Рухомі фази складалися з рухомої фази А (вода + 0,1 % мурашина кислота) та рухомої фази В (ацетонітрil + 0,1 % мурашина кислота). Градієнт LC являв собою 5-50 % В за 5 хвилин, 50-95 % В за 0,5 хвилини та 95 % В за 1 хвилину. Здійснювали моніторинг наступних пептидів KRAS^{G12C} LVVVGAC(CAM)GVGK (529,8 → 846,3) і модифікованого AMG 510 KRAS^{G12C} AMG 510-LVVVGAC(CAM)GVGK (521,4 → 675,2). Зайнятість обчислювали як відсоток модифікованого AMG 510 пептиду KRAS^{G12C}, нормалізованого за сумою немодифікованого й модифікованого пептиду KRAS^{G12C}.

Проточна цитометрія

Для аналізу *in vitro* ефекту AMG 510 щодо експресії антигену MHC класу I висівали клітини CT-26 KRAS p.G12C (5,0E+04 клітин/лунка) в 96-лунковий планшет та обробляли трикратним серійним розведенням AMG 510 за відсутності або в присутності IFN γ за кінцевої концентрації 25 або 250 пг/мл. Планшети інкубували за 37 °C, 5 % CO₂ протягом 24 годин. Клітини без допомоги ферменту від'єднували від лунок, промивали буфером для забарвлення (PBS/0,5 % BSA), а потім інкубували з PE-кон'югованими антитілами H-2D^d, H-2K^d або H-2L^d (Biolegend) протягом 30 хвилин на льоду. Після промивання клітини ресуспендували в буфері для забарвлення, що містить SYTOX Blue Dead Cell Stain (Life Technologies), а потім аналізували за допомогою проточної цитометрії. Збір даних і аналіз здійснювали на проточному цитометрі BD LSRFortessa з використанням програмного забезпечення BD FACSDiva.

Для досліджень *in vivo* клітини CT-26 KRAS p.G12C імплантували самкам мишей Balb/c віком приблизно 6 тижнів. У день 22 після імплантації мишей рандомізували в когорті, що одержує чотириденне введення дози, що складається з 5 груп по n = 8/група, що одержували одне із середовища-носія перорально (QD) + PBS внутрішньочеревинно (Q3Dx2); AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) + PBS внутрішньочеревинно (Q3Dx2); середовища-носія перорально (QD) + антитіло до PD-1 (29F,1A12; 100 мкг/доза, Q3Dx2) внутрішньочеревинно; AMG 510 перорально (100 мг/кг QD) + антитіло до PD-1 (29F,1A12; 100 мкг/доза, Q3Dx2) внутрішньочеревинно або MEKі перорально (10 мг/кг, QD) + PBS внутрішньочеревинно (Q3Dx2) протягом 4 днів. Після чотирьох днів введення дози пухлини збирали й відокремлювали від навколишньої фасції, зважували, механічно подрібнювали та поміщали в Liberase TL (0,2 мг/мл, Roche) і ДНКазу I (20 мкг/мл, Ambion). Потім пухлини, що перебувають у розчині, механічно гомогенізували з використанням м'якого дисоціатора MACS (Miltenyi Biotec) та інкубували за 37 °C протягом 15 хвилин на струшувачі пробірок MACSmix (Miltenyi Biotec). Потім клітини обробляли за допомогою 0,02 % EDTA (Sigma) і термоактивованим FBS (ThermoFisher Scientific) і пропускали через фільтр із розміром пор 70 мкм для видалення грудок. Потім клітини центрифугували, супернатант видаляли, а клітинний осад потім ресуспендували в LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain (ThermoFisher Scientific) протягом 30 хвилин. Потім проводили забарвлення клітинної поверхні зазначеними антитілами (додаткова таблиця 4) перед фіксацією й пермеабілізацією клітин (Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, ebiosciences) для

внутрішньоклітинного забарвлення. Додавали Countbright™ Absolute Counting Beads (ThermoFisher Scientific) у кожну лунку для зразків, щоб забезпечити підрахунок клітин перед аналізом на проточному цитометрі LSR II (BD Biosciences). Усі аналізи проводили за допомогою програмного забезпечення Flowjo v10 (Flowjo). Абсолютну кількість клітин визначали шляхом нормалізації кількості клітин до зареєстрованих гранул, діленої на обсяг проаналізованої аліквоти пухлини й масу пухлини.

Імуноферментні спот-аналізи (Elispot)

Антигенспецифічну Т-клітинну відповідь оцінювали з використанням аналізу ELISpot IFN- γ (Cellular Technology Ltd.). Спленоцити збирали ($n = 4\text{-}5/\text{група}$) і використовували в аналізі ELISpot цільних клітин. Коротко, $2,5\text{E}+05$ спленоцитів змішували з $2,5\text{E}+04$ пухлинними клітинами CT-26, CT-26 KRAS p.G12C або 4T1 та інкубували за 37°C протягом 20 годин. Використовували аналізатор CTLS6 Fluorospot (Cellular Technology Ltd.) для підрахунку плям.

Статистичний аналіз

Фармакодинамічні експерименти аналізували за допомогою однофакторного ANOVA з наступним апостеріорним критерієм Даннетта. Для досліджень ефективності проводили дисперсійний аналіз повторних вимірів (RMANOVA) з наступним апостеріорним критерієм Даннетта з використанням GraphPad Prism 7.04. Регресійний аналіз проводили за допомогою парного t-критерію. Статистичний аналіз виживаності визначали за допомогою оцінки Каплана-Мейєра з логарифмічним рангом Мантела-Кокса для порівняння кривих з використанням GraphPad Prism 7.04. Дані проточної цитометрії аналізували за допомогою двофакторного ANOVA для множинних порівнянь із наступним апостеріорним тестом Тьюкі. Дані NanoString аналізували за допомогою однофакторного ANOVA для множинних порівнянь із наступним апостеріорним тестом Тьюкі. Порівняння даних ELISpot проводили за допомогою непарного t-критерію з використанням GraphPad Prism.

Біоаналітичні способи LC-MS/MS для AMG 510

Гомогенати пухлинної тканини одержували шляхом додавання води до тканини (4:1 мол:г) з використанням гранул з карбиду вольфраму в TissueLyzer (Qiagen). До 20 мкл зразка (гомогенату плазми крові або пухлинної тканини) додавали 100 мкл ацетонітрилу, що містить IS (200 нг/мл толбутаміду), зразок перемішували вихровим способом протягом 10 хв., центрифугували за 3500 g протягом 10 хв. і збирали 90 мкл супернатанту. До зібраного супернатанту додавали 100 мкл води (що містить 0,1 % мурашиної кислоти) і 5 мкл одержаного розчину вводили в систему LC-MS/MS. Хроматографічного розділення досягали з використанням Phenomenex Kinetex C18 50 x 2,1 мм, 2,7 мкм, підтримуваного за 50°C , з використанням 0,1 % мурашиної кислоти в H_2O (рухома фаза А) і 0,1 % мурашиної кислоти в ацетонітрилі (рухома фаза В). Градієнт хроматографії був наступним: ізократичний від 0 хв. до 0,1 хв. з 10 % рухомої фази В, лінійне збільшення від 0,1 до 0,85 хв. до 95 % рухомої фази В, ізократична затримка від 0,85 до 1,10 хв. з 95 % рухомої фази В, лінійне зменшення від 1,10 до 1,11 хв. до 10 % рухомої фази В, ізократична затримка від 1,11 до 1,40 хв. з 10 % рухомої фази В. Для аналізу зазвичай використовували мас-спектрометр API 4000 і запускали в режимі визначення позитивних іонів ESI після MS/MS переходу $561,179 > 134,100$ (AMG 510) і $271,100 > 134,100$ (толбутамід). Площі піків інтегрували за допомогою Analyst® (Sciex). Після інтегрування площ піків дані експортували в Watson LIMS™ (ThermoFisher Scientific) і концентрації визначали за допомогою зваженої ($1/x^2$) лінійної регресії співвідношень площ піків (площа піка AMG 510/площа піка IS) порівняно з номінальними концентраціями каліброваних стандартів плазми крові. Діапазон калібрування для AMG 510 у плазмі крові становив від 1,0 до 10000 нг/мл (LLOQ 1,0 нг/мл). Діапазон калібрування для AMG 510 у гомогенаті пухлинної тканини становив від 5,0 до 50000 нг/мл (LLOQ 5,0 нг/мл).

Уведення мітки стабільного ізотопу із використанням амінокислот в культурі клітин (SILAC)

Легке середовище (LM) одержували шляхом додавання наступних компонентів до кінцевого обсягу 1 л: 100 мл діалізованого FBS, 10,4 г порошкоподібного середовища RPMI-1640, 2 г бікарбонату натрію, 200 мг L-аргініну, 48 мг L-лізину, 100 мг L-лейцину та 1x Pen-Strep, які фільтрували за допомогою фільтруючої системи з розміром пор 0,22 мкм. Важке середовище (HM) одержували таким самим чином, як і LM, але 100 мг [$^{13}\text{C}_6$]-L-лейцину (Cambridge Isotope Laboratories) заміняли на L-лейцин, що не був збагачений ізотопом. Клітини MIA PaCa-2 і NCI-H358 висівали ($3\text{E}+05$ клітин) у колби T75 з LM, LM змінювали щоденно. Через 48 годин клітини промивали за допомогою 1x PBS і середовище заміняли на HM, HM змінювали щоденно упродовж 4 днів. У день 6 клітини промивали за допомогою 1x PBS і середовище заміняли на LM, LM змінювали щоденно. Починаючи від дня 6 зразки MIA PaCa-2 збирали через 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 48 і 72 години. Починаючи від дня 6 зразки NCI-H358 збирали через 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 і 96 годин. Окремі колби T75, котрі були отримані у трьох повторностях, збирали в кожний момент часу та обробляли для одержання лізатів.

Збір зразка SILAC і одержання білка лізату

Колби T75 промивали за допомогою 1x PBS, обробляли трипсином та інкубували протягом 2 хв. із наступним додаванням крижаного PBS, що містить 10 % діалізованого FBS. Клітини добре перемішували та збирали з наступним підрахунком клітин з використанням Vi-CELL XR. Клітини, що залишилися, центрифугували та промивали крижаним PBS (без Mg^{+2} , без Ca^{+2}). Клітини знову

центрифугували, PBS видаляли і клітини лізували в невеликому об'ємі крижаного RIPA, що містить інгібітори фосфатази (PhosSTOP, Roche) і протеази (cOmplete EDTA-free, Roche). Отримані лізати перемішували на вортексі, поміщали на лід на 10 хвилин, центрифугували для видалення нерозчинного дебрису, а потім зберігали за -80 °C до подальшої обробки.

Визначення цільового періоду напіввиведення KRAS^{G12C} за допомогою SILAC

Антитіло до RAS людини (антитіло до RAS) отримували шляхом придбання в компанії Abcam і біотинілювали за допомогою EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (ThermoFisher Scientific), використовуючи протокол, описаний виробником. Залишковий біотин видаляли, отримане антитіло до RAS з біотином завантажували в гранули Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (ThermoFisher Scientific) протягом 1,5 год. за к. т., струшуючи. Клітинний лізат (описаний вище) інкубували із гранулами біотинілюваного антитіла до RAS упродовж 2 годин за к. т., струшуючи. Гранули промивали за допомогою PBST (3x) з використанням магніту, потім за допомогою PBS (1x). Зразки піддавали елюванню з гранул з використанням 3 % водної мурашиної кислоти/30 % водного ACN з наступною інкубацією за к. т. зі струшуванням упродовж 10 хв. Супернатанти переносили до 96-лункового планшета і висушували. Зразки ресуспендували в буфері для денатурації (10 mM TCEP, 8 M сечовина) та інкубували за 37 °C упродовж 1 год. з використанням водяної бані. Додавали йодацетамід (40 mM) та інкубували за 25 °C упродовж 1 год., захищаючи від світла. Додавали 50 mM NH₄HCO₃ та трипсин (0,1 мкг/мкл) і зразки розщеплювали за 37 °C упродовж 24 годин, потім остаточно гасили мурашиною кислотою з одержанням кінцевої концентрації 1 % (об.:об.). Зразки концентрували до приблизно 80 мкл перед аналізом з використанням мас-спектрометрії. Зразки аналізували за допомогою рідинної хроматографії у тандемі з мас-спектрометрією (LC-MS/MS) із застосуванням моніторингу множинних реакцій (MRM) у режимі позитивної іонізації з використанням 6500 QTRAP (AB SCIEX), поєднаного з Acquity UPLC (Waters). Зразки вводили в колонку Acquity UPLC BEH C8 1,7мкм, 2,1 x 100 мм (Waters). Рухомі фази складалися з рухомої фази А (вода + 0,1 % мурашина кислота) та рухомої фази В (ацетонітрил + 0,1 % мурашина кислота). Градієнт LC являв собою 5-50 % В за 5 хвилин, 50-95 % В за 0,5 хвилини та 95 % В за 1 хвилину. Наступні пептиди для KRAS^{G12C} (LVVVGAC(CAM)GVGK (529,8 → 846,3) і 13C-LVVVGAC(CAM)GVGK (532,8 → 846,3)) і RAS WT (LVVVGAGGVGK (478,3 → 743,2) і 13C-LVVVGAGGVGK (481,3 → 743,2)) використовували для моніторингу переходу від важких ізотопів до легких ізотопів під час уведення мітки. Відносний ізотопний склад (RIA) визначали з використанням наступної формули:

$$RIA = \frac{A_{\text{важкий}}}{A_{\text{легкий}} + A_{\text{важкий}}}$$

Визначення за допомогою SILAC періоду напіввиведення KRAS^{G12C}

Задля того, аби врахувати вплив росту клітин на визначення періоду напіввиведення білка, кількість клітин і дана RIA, пов'язані з кожним моментом часу, одночасно підлаштовували до серії рівнянь для визначення періоду напіввиведення KRAS^{G12C} у клітинах MIA PaCa-2 та NCI-H358. Використовували наступні рівняння:

Рівняння першого порядку для пептиду важкого ланцюга:

$$\frac{dHv}{dt} = -k_{\text{dec}}Hv$$

Рівняння першого порядку для пептиду легкого ланцюга:

$$\frac{dIt}{dt} = k_{\text{dec}}(Hv_0 + It_0) - k_{\text{dec}}It + \frac{\text{клітина}_{\text{new}}}{\text{клітина}_{(0)}} (Hv_0 + It_0)k_{\text{dec}} - k_{\text{dec}} \frac{\text{клітина}_{\text{new}}}{\text{клітина}_{(0)}} It$$

Рівняння першого порядку для росту клітин:

$$\frac{d\text{клітина}_{\text{new}}}{dt} = -k_{\text{dil}}(\text{клітина}_{(0)} + \text{клітина}_{\text{new}})$$

Додаткові рівняння:

$$k_{\text{syn}} = k_{\text{dec}}(Hv_0 + It_0)$$

$$\text{Період напіввиведення} = \frac{0,693}{k_{\text{dec}}}$$

Час 0 визначається як час, коли НМ замінювали на LM, Hv являє собою концентрацію пептиду важкого ланцюга, It являє собою концентрацію пептиду легкого ланцюга, клітина_{new} являє собою число нових клітин, k_{dec} являє собою константу швидкості першого порядку для розкладання, k_{syn} являє собою константу швидкості нульового порядку для синтезу, k_{dil} являє собою константу швидкості першого порядку для росту клітин, клітина₍₀₎ являє собою число клітин у момент часу 0, Hv₍₀₎ являє собою концентрацію пептиду важкого ланцюга в момент часу 0, It₍₀₎ являє собою концентрацію пептиду легкого ланцюга в момент часу 0. Використовували ступінчастий підхід для моделювання, при цьому на першій стадії k_{dil} оцінювали за числом клітин, а на другій стадії k_{dec} оцінювали із використанням наведених вище рівнянь.

k_{dil} оцінювали шляхом кількісного визначення числа клітин після заміни на LM і застосування

наступного рівняння: $A = A_0 e^{-k_{\text{дт}} t}$, де A і A_0 являють собою число клітин у момент часу t і 0 відповідно.

Додаткова таблиця 1

Дані клітинного аналізу

Мутація	Лінія клітин	Тканина походження	IC ₅₀ базисного p-ERK1/2 (мкМ)	Життєздатність клітин IC ₅₀ (мкМ)	Життєздатність сфероїдних клітин IC ₅₀ (мкМ)
KRAS p.G12C гомозиготна	MIA PaCa-2	Підшлункова залоза	0,036±0,002	0,005±0,001	0,001±0,001
	NCI-H1373	Легеня	0,010±0,0001	0,020±0,006	0,005±0,002
	NCI-H2030	Легеня	0,040±0,020	0,006±0,003	н. в.
	NCI-H2122	Легеня	0,123±0,006	0,032±0,005	0,009±0,002
	SW1463	Товстий кишечник	0,033±0,004	0,015±0,007	н. в.
	SW1573	Легеня	0,027±0,001	> 7,5	>10
	UM-UC-3	Сечовий міхур	0,029±0,016	0,005±0,001	н. в.
KRAS p.G12C гетерозиготна	Calu-1	Легеня	0,013±0,004	0,004±0,001	н. в.
	NCI-H1792	Легеня	0,045±0,023	0,011±0,008	н. в.
	NCI-H23	Легеня	0,090±0,017	0,006±0,001	н. в.
	NCI-H358	Легеня	0,035±0,003	0,004±0,001	0,003±0,002
	SW837	Товстий кишечник	0,018±0,002	0,009±0,006	н. в.
KRAS p.G12D гомозиготна	AsPC-1	Підшлункова залоза	> 10	> 7,5	н. в.
KRAS p.G12D гетерозиготна	A-427	Легеня	> 10	> 7,5	н. в.
	LS 174T	Товстий кишечник	> 10	> 7,5	н. в.
KRAS p.G12V гомозиготна	SW480	Товстий кишечник	> 10	> 7,5	н. в.
KRAS p.G12S гомозиготна	A549	Легеня	> 10	> 7,5	н. в.
KRAS p.G13C гетерозиготна	NCI-H1355	Легеня	> 10	> 7,5	н. в.
KRAS WT EGFR p.E746_A750del	HCC-827	Легеня	> 10	> 7,5	н. в.
KRAS WT Злиття EML4-ALK	NCI-H1322	Легеня	> 10	> 7,5	н. в.
KRAS WT Злиття TPM3-NTRK	KM12	Товстий кишечник	> 10	> 7,5	н. в.
KRAS WT BRAF p.V600E	COLO-205	Товстий кишечник	> 10	> 7,5	н. в.

Пояснення мутацій одержували з Каталогу соматичних мутацій при раку (COSMIC)¹ або Misale et al. 2019². Середні значення IC₅₀ для аналізів базисного фосфорилювання ERK1/2 і життєздатності клітин одержували щонайменше в n = 2 експериментах. ND = не визначене.

Додаткова таблиця 2

Збір даних і уточнення статистичних характеристик (молекулярного заміщення)

	KRAS ^{G12C/C51S/C80L/C118S} AMG 510	
Збір даних		
Просторова група	P 21 21 21	

Розміри клітин		
a, b, c (Å)	40,87, 58,42, 65,89	
α, β, γ (°)	90, 90, 90	
Роздільна здатність (Å)	30,0-1,65 (1,71-1,65)	
R_{sym}	0,162 (0,521)	
$I / \sigma I$	6,9 (2,5)	
Завершеність (%)	97,0 (96,3)	
Надмірність	4,4 (4,2)	
Уточнення		
Роздільна здатність (Å)	30,00-1,65	
Число віддзеркалень	18077	
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0,1809/0,2152	
Число атомів	1613	
Білок	1336	
Ліганд/іон	70	
Вода	207	
В-фактори	24,8	
Білок	24,3	
Ліганд/іон	24,1	
Вода	34,1	
Середньоквадратичні відхилення		
Довжини зв'язків (Å)	0,005	
Кути зв'язків (°)	1,08	

Для цієї структури збирали один набір даних по кристалу.

*Значення в дужках стосуються оболонки з найвищою роздільною здатністю.

Додаткова таблиця 3

Аналіз для оцінки шляху генної експресії
Додаткова таблиця 3А

Гени, які залучені у обчислення оцінки шляху функції Т-клітин	Р-значення	Гени, які залучені у обчислення оцінки шляху функції Т-клітин	Р-значення
STAT1	1,72E-09	LCP1	1,20E-04
H2-T23	2,70E-09	IKZF2	1,46E-04
ADA	5,22E-09	SOCS1	1,63E-04
EGR1	7,09E-09	TCF7	2,02E-04
TGFB3	1,22E-08	CEBPB	2,26E-04
TLR6	1,24E-08	IL1R1	5,42E-04
ITGA1	1,40E-08	JAK3	6,60E-04
THY1	1,65E-08	PVRL2	6,90E-04
NFATC2	2,31E-08	CD1D1	8,57E-04
H2-AB1	3,62E-08	CD274	8,63E-04
H2-AA	4,93E-08	ICOS	9,52E-04
CTSH	5,80E-08	TNFSF13B	9,63E-04
CD48	6,78E-08	IL4RA	1,02E-03
ITGAL	6,82E-08	STAT4	1,07E-03
CD74	7,35E-08	FAS	1,09E-03
ITGAM	8,78E-08	LGALS3	1,18E-03
IL2RG	8,97E-08	IL13RA1	1,28E-03
H2-DMA	1,33E-07	IFNG	1,29E-03
CD83	1,41E-07	FASL	1,39E-03
TNFRSF14	1,48E-07	IRF4	1,47E-03
MAF	1,60E-07	TRAF6	1,63E-03
CD247	1,66E-07	CD2	1,65E-03
PTPRC	1,70E-07	TIGIT	1,65E-03

TAP1	2,32E-07	TLR4	1,69E-03
CD3G	2,80E-07	CD47	2,26E-03
MILL2	3,39E-07	VEGFA	2,31E-03
CD27	3,64E-07	PDCD1LG2	2,47E-03
LCK	4,04E-07	BCL6	2,48E-03
CD3E	4,62E-07	IL12RB1	3,49E-03
SPP1	5,19E-07	RORA	3,60E-03
IKZF1	5,24E-07	NFKB1	3,96E-03
CCR2	7,34E-07	CXCL12	4,63E-03
ZAP70	7,73E-07	RIPK2	4,83E-03
NFATC1	8,07E-07	GFI1	4,88E-03
LAG3	8,54E-07	IL15	5,01E-03
IRF1	8,95E-07	IL12B	5,09E-03
SYK	9,31E-07	IL2RA	5,56E-03
IRF8	1,17E-06	CD276	6,24E-03
PSMB10	1,17E-06	BTLA	6,27E-03
XCL1	1,36E-06	FOXP3	6,70E-03
PVR	1,54E-06	ANXA1	7,25E-03
CXCR3	1,54E-06	SOCS3	7,29E-03
CD3D	1,56E-06	CD40	7,52E-03
IL18R1	1,93E-06	CD80	1,21E-02
EOMES	1,95E-06	MAPK1	1,22E-02
PSEN2	2,40E-06	MAP3K7	1,43E-02
CCL5	3,67E-06	TRP53	1,46E-02
IFNAR1	3,85E-06	TRAF2	1,59E-02
JAK1	4,90E-06	IL12RB2	1,78E-02
CXCR4	4,94E-06	NOS2	1,79E-02
CARD11	6,83E-06	TGFB1	2,02E-02
ICAM1	6,84E-06	JAK2	2,46E-02
FCGR4	6,94E-06	SPN	2,48E-02
IL1B	7,10E-06	YY1	2,53E-02
CCL2	7,33E-06	STAT6	2,90E-02
CMA1	7,69E-06	CCL3	2,97E-02
H2-K1	9,48E-06	MAPK8	3,73E-02
VCAM1	1,03E-05	IL7R	5,28E-02
IL6ST	1,16E-05	TNFSF11	5,45E-02
BCL2	1,21E-05	CCND3	6,50E-02
ICOSL	1,35E-05	TNF	1,23E-01
TYK2	1,57E-05	CSF2	1,54E-01
ITGB2	1,62E-05	RELB	1,55E-01
CD86	1,68E-05	CCL11	1,73E-01
IL18RAP	1,72E-05	SELL	1,91E-01
CCR5	1,74E-05	ITGAX	2,11E-01
ITK	1,84E-05	CCR7	2,17E-01
ITCH	1,94E-05	TNFRSF4	2,31E-01
IL18	2,01E-05	RPS6	2,43E-01
CD8A	2,41E-05	HAVCR2	3,03E-01
REL	2,69E-05	TNFSF18	3,43E-01
CD8B1	3,06E-05	FLT3	3,64E-01
CD5	3,39E-05	GZMB	3,89E-01
H2-D1	3,80E-05	FUT7	4,36E-01
STAT5B	3,93E-05	IDO1	4,69E-01
PDCD1	5,10E-05	CASP3	4,78E-01
CCL7	5,31E-05	CCR6	5,02E-01
CREBBP	5,39E-05	TMED1	5,07E-01
H2-M3	5,67E-05	BCL10	5,21E-01
CD4	5,83E-05	CXCL13	6,89E-01
TBX21	7,14E-05	CD28	7,48E-01
PSEN1	7,20E-05	TNFSF14	7,51E-01

GATA3	7,48E-05	CTLA4	7,97E-01
POU2F2	7,52E-05	CD40LG	8,17E-01
TXK	8,94E-05	IL7	8,86E-01
DPP4	9,70E-05	RORC	1,00E+00

Додаткова таблиця 3В

Гени, які залучені у обчислення оцінки шляху інтерферону	P-значення	Гени, які залучені у обчислення оцінки шляху інтерферону	P-значення
GBP5	7,49E-09	DDX58	1,73E-05
IFIT3	2,66E-08	IFIT2	5,17E-05
H2-AB1	3,62E-08	TBK1	5,83E-05
H2-AA	4,93E-08	IFI35	7,52E-05
IFI44L	8,05E-08	SH2D1B1	4,08E-04
IFNAR2	1,13E-07	IFITM2	5,30E-04
IRGM2	1,18E-07	IFI27	6,90E-04
CIITA	1,68E-07	ULBP1	9,81E-04
CD3E	4,62E-07	TMEM173	1,10E-03
IFNGR1	5,77E-07	H60A	2,91E-03
IFIH1	7,59E-07	IFIT1	3,52E-03
IRF8	1,17E-06	IL12RB2	1,78E-02
IRF7	1,19E-06	NOS2	1,79E-02
NLRC5	1,46E-06	RUNX3	9,02E-02
EOMES	1,95E-06	CCR7	2,17E-01
IFNAR1	3,85E-06	FADD	2,37E-01
CXCL16	6,82E-06	IFITM1	6,10E-01
IFI44	8,06E-06	MAVS	8,59E-01

Додаткова таблиця 3С

Гени, які залучені у обчислення оцінки шляху МНС	P-значення
H2-T23	2,70E-09
KLRK1	3,47E-08
H2-AB1	3,62E-08
H2-EB1	4,45E-08
H2-AA	4,93E-08
CTSH	5,80E-08
CD74	7,35E-08
MR1	9,98E-08
H2-DMA	1,33E-07
CIITA	1,68E-07
TAP1	2,32E-07
FCER1G	2,41E-07
LAG3	8,54E-07
CD160	1,02E-06
FCGR3	1,13E-06
NLRC5	1,46E-06
FCGR1	1,50E-06
TAPBP	1,53E-06
H2-K1	9,48E-06
H2-D1	3,80E-05
TAP2	4,89E-05
PML	5,37E-05
H2-M3	5,67E-05
FCGR2B	6,05E-05
H2-DMB1	1,80E-04
CD1D1	8,57E-04

H2-DMB2	1,17E-02
H2-Q2	4,41E-02
H2-OB	1,92E-01
CD40LG	8,17E-01

Додаткова таблиця 3D

Гени, які залучені у обчислення оцінки шляху процесингу антигену	P-значення
H2-T23	2,70E-09
H2-AB1	3,62E-08
H2-EB1	4,45E-08
H2-AA	4,93E-08
H2-EA-P	4,94E-08
NOD1	4,97E-08
CD74	7,35E-08
MR1	9,98E-08
H2-DMA	1,33E-07
PSMB8	2,03E-07
TAP1	2,32E-07
FCER1G	2,41E-07
FCGR3	1,13E-06
FCGR1	1,50E-06
TAPBP	1,53E-06
PSMB9	2,02E-06
SLC11A1	2,53E-06
ICAM1	6,84E-06
H2-K1	9,48E-06
H2-D1	3,80E-05
TAP2	4,89E-05
H2-M3	5,67E-05
FCGR2B	6,05E-05
H2-DMB1	1,80E-04
CD1D1	8,57E-04
H2-DMB2	1,17E-02
H2-Q2	4,41E-02
RELB	1,55E-01
H2-OB	1,92E-01
CCR7	2,17E-01
NOD2	2,69E-01

Додаткова таблиця 3E

Гени, які залучені у обчислення оцінки шляху TLR	P-значення
TLR6	1,24E-08
TICAM2	1,88E-08
TLR7	4,46E-08
TLR8	9,04E-08
TLR9	1,23E-07
TLR1	2,11E-07
TLR2	3,63E-06
CD86	1,68E-05
TLR3	2,63E-05
TBK1	5,83E-05
IRAK2	1,44E-04
PRKCE	3,72E-04
TICAM1	8,09E-04
IRF4	1,47E-03

TRAF6	1,63E-03
TLR4	1,69E-03
TLR5	1,90E-03
MYD88	4,49E-03
GFI1	4,88E-03
MAP3K7	1,43E-02
IRF3	3,71E-02
MAPKAPK2	1,16E-01
IRAK1	1,39E-01
NFKBIA	1,62E-01
TRAF3	6,07E-01
TIRAP	9,18E-01

Додаткова таблиця 4

Антитіла для проточної цитометрії

Антитіло	Клон	№ за каталогом	Постачальник
Антитіло BUV737 пацюка до CD4 миші	RM4-5	564933	BD Biosciences
Антитіло BV421 пацюка до CD8a миші	53-6,7	563898	BD Biosciences
Антитіло BV510 пацюка до CD11b	M1/70	562950	BD Biosciences
Антитіло BUV737 пацюка до CD11b	M1/70	564443	BD Biosciences
Антитіло BV421 хом'яка до CD11c миші	HL3	562782	BD Biosciences
Антитіло BV700 пацюка до CD19 миші	1D3	566411	BD Biosciences
Антитіло FITC пацюка до CD24 миші	M1/69	11-0242-81	ThermoFisher Scientific
Антитіло BV650 пацюка до CD25 миші	PC61	564021	BD Biosciences
Антитіло BV786 миші до CD45.2 миші	104	563686	BD Biosciences
Антитіло APC/Cy7 пацюка до CD90.2 миші	30-H12	105328	BioLegend
Антитіло APC хом'яка до CD103 миші	2E7	17-1031-80	ThermoFisher Scientific
Антитіло PE пацюка до CD274 миші	MIH5	558091	BD Biosciences
Антитіло PE хом'яка до CD279 (PD-1) миші	J43	12-9985-82	ThermoFisher Scientific
Антитіло FITC пацюка до CD335 (NKp46) миші	29A1,4	560756	BD Biosciences
Антитіло BV650 пацюка до F4/80 миші	BM8	123149	BioLegend
Антитіло APC пацюка до FOXP3 миші	FJK-16s	17-5773	ThermoFisher Scientific
Антитіло BV711 пацюка до Ly-6C миші	HK1,4	128037	BioLegend
Антитіло APC-H7 пацюка до Ly-6G миші	1A8	565369	BD Biosciences
Антитіло BV510 пацюка до I-A/I-E (MHCII) миші	M5/114,15,2	107635	BioLegend
Антитіло BV711 хом'яка до TCR β-ланцюга миші	H57-597	563135	BD Biosciences

Даний винахід описаний із використанням переважних варіантів здійснення. Проте варто розуміти, що даний винахід не обмежений розкритими варіантами здійснення. Зрозуміло, що, враховуючи опис варіантів здійснення даного винаходу, приведених у даному документі, фахівець у даній галузі може виконати різні модифікації. Такі модифікації охоплюються формулою винаходу, наведеною нижче.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Amgen Inc.
LIPFORD, James Russell
CANON, Jude Robert
SAIKI, Anne Y.
REX, Karen Louise

<120> КОМБІНОВАНА ТЕРАПІЯ, ЩО ВКЛЮЧАЄ ІНГІБІТОР KRASG12C ТА ОДИН АБО ДЕКІЛЬКА ДОДАТКОВИХ ФАРМАЦЕВТИЧНО АКТИВНИХ ЗАСОБІВ, ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ВИДІВ РАКУ

<130> A-2326-WO-РСТ

<150> 62/769,355

<151> 2018-11-19

<150> 62/821,376

<151> 2019-03-20

<150> 62/865,819

<151> 2019-06-24

<160> 21

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 1

Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 2

Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 3

<211> 11

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 3

Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 6

Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr

1 5

<210> 7

<211> 120

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 107

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 472

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 9

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

50

55

60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
85 90 95

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
100 105 110

Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala
115 120 125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
145 150 155 160

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
180 185 190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
195 200 205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
210 215 220

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
225 230 235 240

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
245 250 255

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
275 280 285

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln
305 310 315 320

Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
340 345 350

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
420 425 430

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 10

<211> 236

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний пептид

<400> 10

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 11

<211> 15

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний полінуклеотид

<400> 11

agctatgaca tgagc

15

<210> 12

<211> 51

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний полінуклеотид

<400> 12

cttattagtg gtggtgtag tcaaacatac tacgcagaat ccgtgaaggg c

51

<210> 13

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний полінуклеотид

<400> 13

cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtc 33

<210> 14

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний полінуклеотид

<400> 14

cgggcgagtc aggggtattag caactgggta gcc 33

<210> 15

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний полінуклеотид

<400> 15

gctgcatcca gtttgcaaag t 21

<210> 16

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний полінуклеотид

<400> 16

<210> 17

<211> 360

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний полінуклеотид

<400> 17

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgaca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctggaatg ggtctcactt attagtgggt gtggtagtca aacatactac 180

gcagaatccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gtccccagct 300

ggccactact tctacgtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 18

<211> 321

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний полінуклеотид

<400> 18

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttgaga cagagtcacc 60

atcacttgct gggcgagtca gggatttagc aactggttag cctggatatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctgaaagtt tccctcacac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321
<210> 19	
<211> 1416	
<212> ДНК	
<213> Штучна послідовність	
<220>	
<223> Синтетичний полінуклеотид	
<400> 19	
atggacatga ggggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg	60
cgctgtgagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg	120
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgacatgag ctgggtccgc	180
caggctccag ggaaggggct ggaatgggtc tcacttatta gtggtggtgg tagtcaaaca	240
tactacgcag aatccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg	300
ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatatatt ctgtgcgtcc	360
cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc	420
tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc	480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgtcctacag	600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc	660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagaaagtt	720
gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	780

gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg	840
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgtg cgaggagcag	960
tacggcagca cgtaccgttg cgtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	1020
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgtccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	1080
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	1140
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct	1260
cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc	1320
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	1380
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa	1416

<210> 20

<211> 708

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетичний полінуклеотид

<400> 20

atggacatga ggggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg	60
cgctgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcttccgtgt ctgcatctgt tggagacaga	120
gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcaact ggtagcctg gtatcagcag	180
aaaccagga aagcccctaa gctcctgatc tttgtgcat ccagtttgca aagtggggtc	240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ccctcacat cagcagcctg	300

cagcctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggctg aaagtttccc tcacactttc	360
ggcggaggga ccaagggtgga gatcaaacga acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc	420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac	540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	660
cagggcctga gctcgcccggt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt	708

<210> 21

<211> 20

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Молекула CRISPR

<400> 21

Cys	Thr	Thr	Gly	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Ala	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Gly	Ala
			20

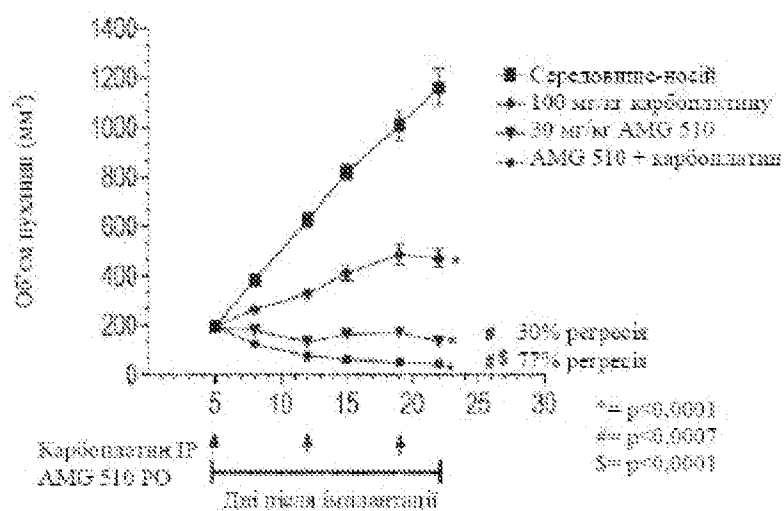


Fig. 1A

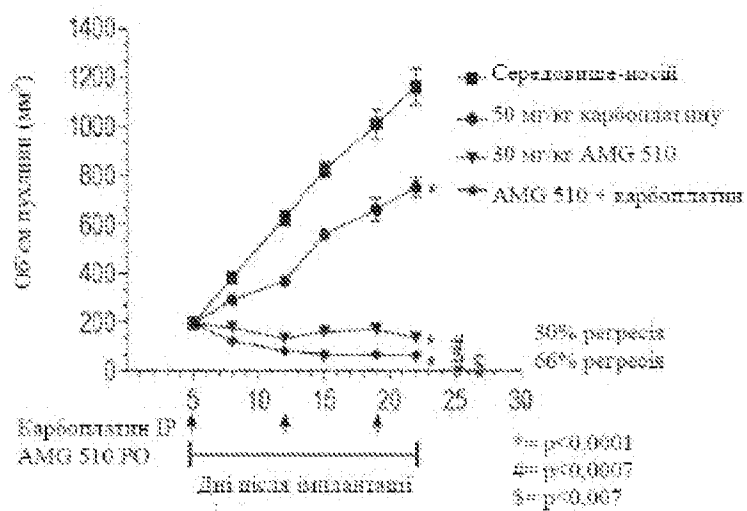
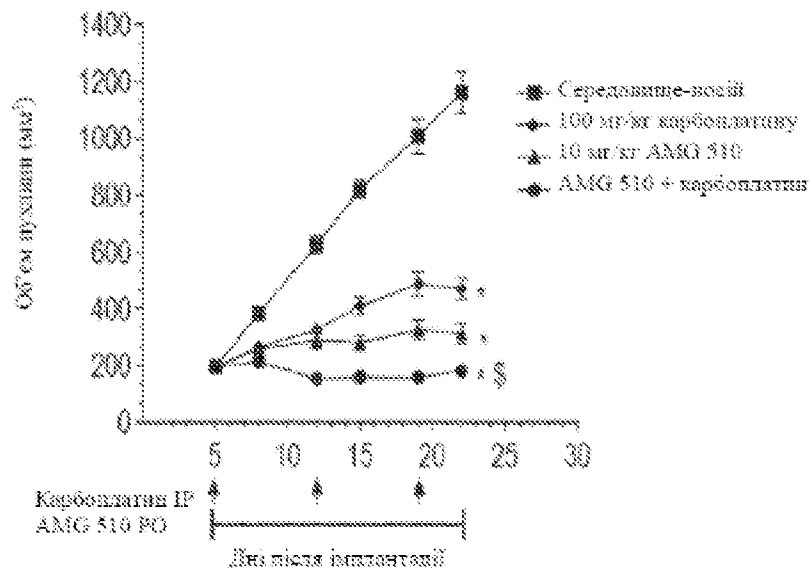
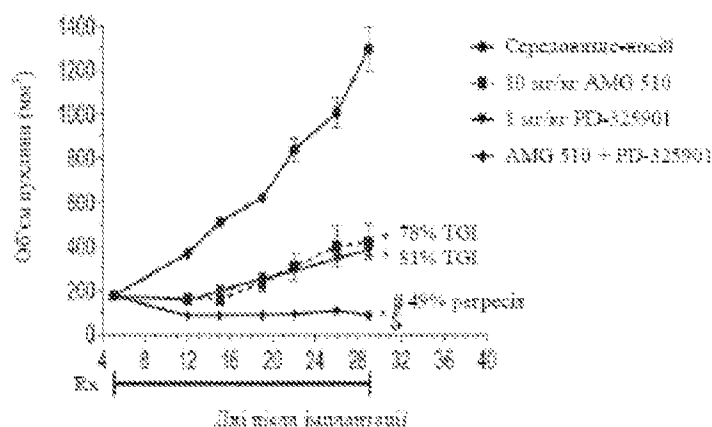


Fig. 1B



§ = $p < 0.002$ для комбінації порівняно із групою введення 10 мг/кг АМГ 510 або 100 мг/кг карбоплатину
 * = $p < 0.0001$ за LME з наступним апостеріорним аналізом Данкетта порівняно із середовищем-носієм

Фиг. 1C



* $p < 0.0001$ за апостеріорним аналізом Данкетта порівняно із середовищем-носієм
 § $p < 0.0001$ для регресії, що виконується за допомогою критерію ТГН, проміщення росту пухлини
 Введення доз АМГ 510 та РД-125901
 РД, QD
 ТГН, проміщення росту пухлини
 § $p < 0.0002$ для комбінації порівняно з будь-якою окремою комбінацією

Фиг. 2A

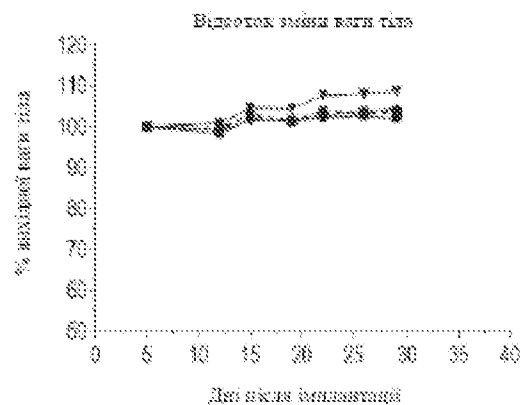
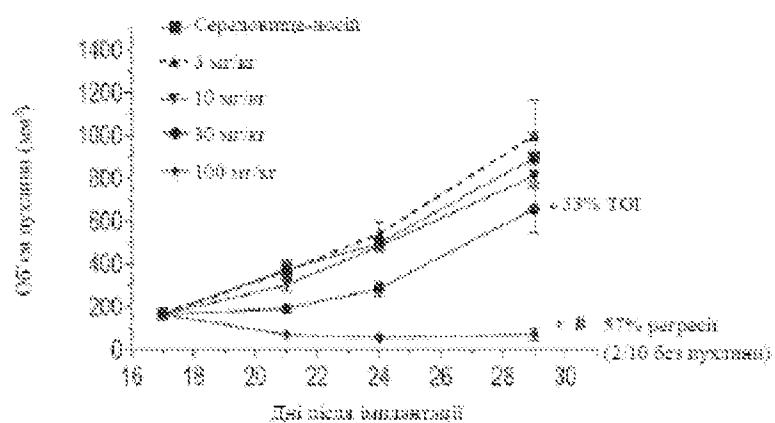


Fig. 2B



* $p < 0.05$ за двостороннім аналізом Даннелла порівняно із середньзначенням

† $p < 0.05$ для регресії пухлини, що визначається за допомогою критерію t-критерію.

Доза AMG 510 вказана PO, QD
TGI: пригнічення росту пухлини

Fig. 3

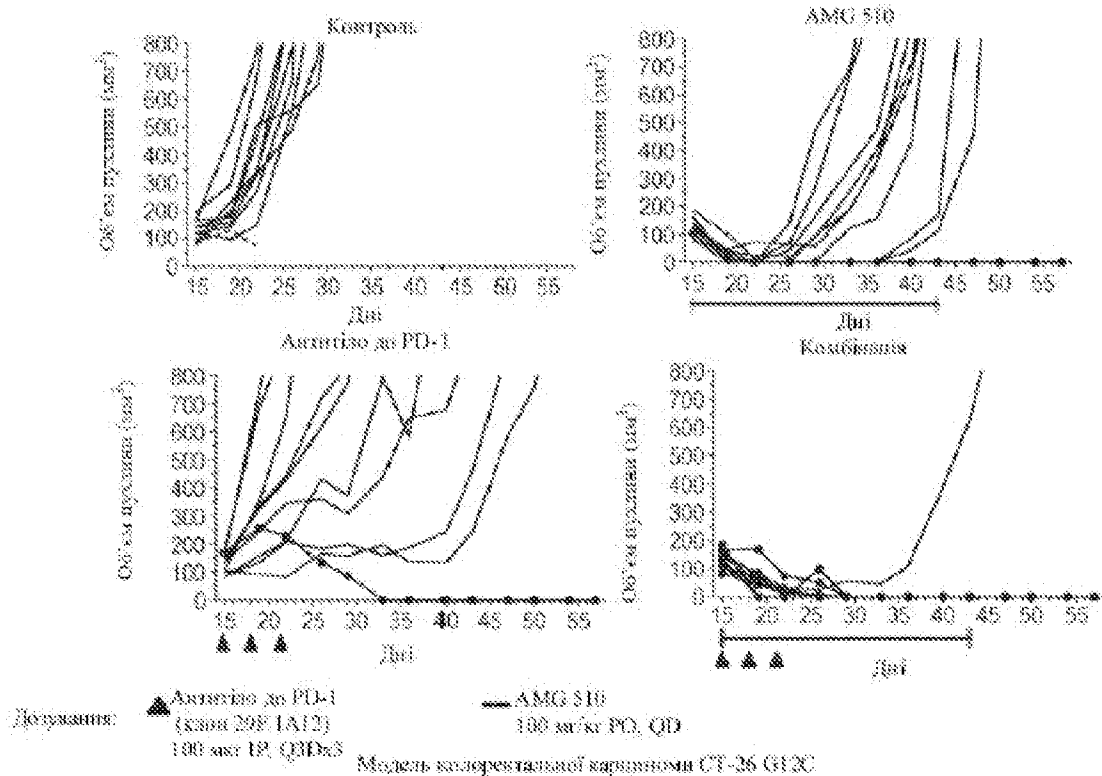
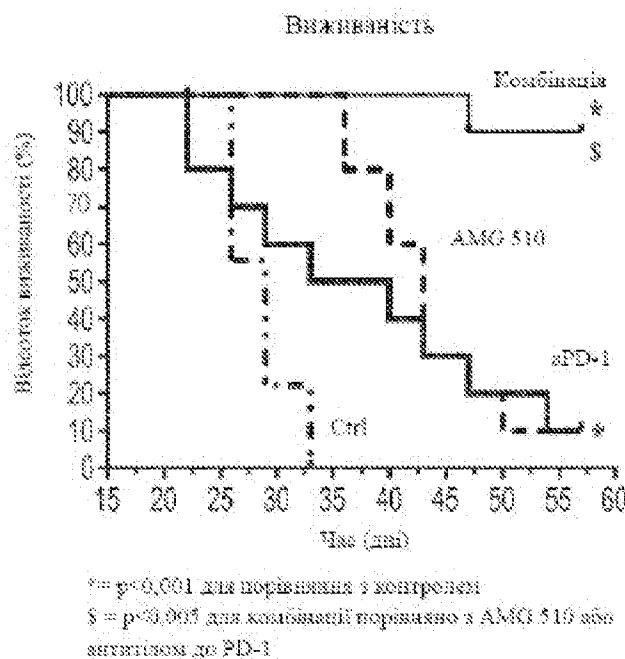


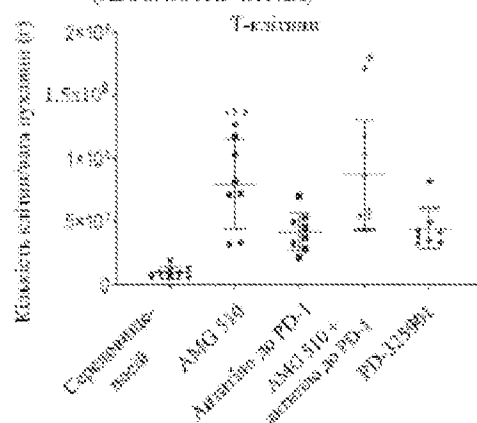
Fig. 4A



Високивість являє собою сурегатну кінецьку точку, що визначається як час до досягнення розміру пухлини, що становить $> 800 \text{ мм}^3$

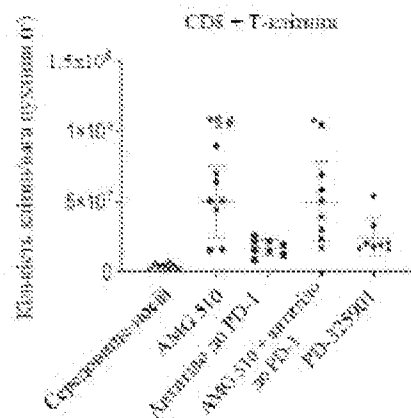
Fig. 4B

ОБРОБКА ЗА ДОПОМОГОЮ AMG 510 УМОВЛЮЄ ПОСИЛЕННЯ
ІНФІЛЬТРАЦІЇ CD8⁺ ТА CD4⁺ Т-КЛІТИН У ПУХЛИНАХ СТ-28 Q12C-H10
(АБСОЛЮТНІ ЧИСЛА)



* $p < 0.05$ для порівняння з групою обробки середовищем-носієм за двофакторним ANOVA з наступним апостеріорним аналізом Тьюкі
 $\S$ $p < 0.05$ для AMG 510 порівняно з антигеном до PD-1 за парним t-критерієм
 $\&$ $p < 0.05$ для AMG 510 порівняно з PD-L1-9901 за парним t-критерієм

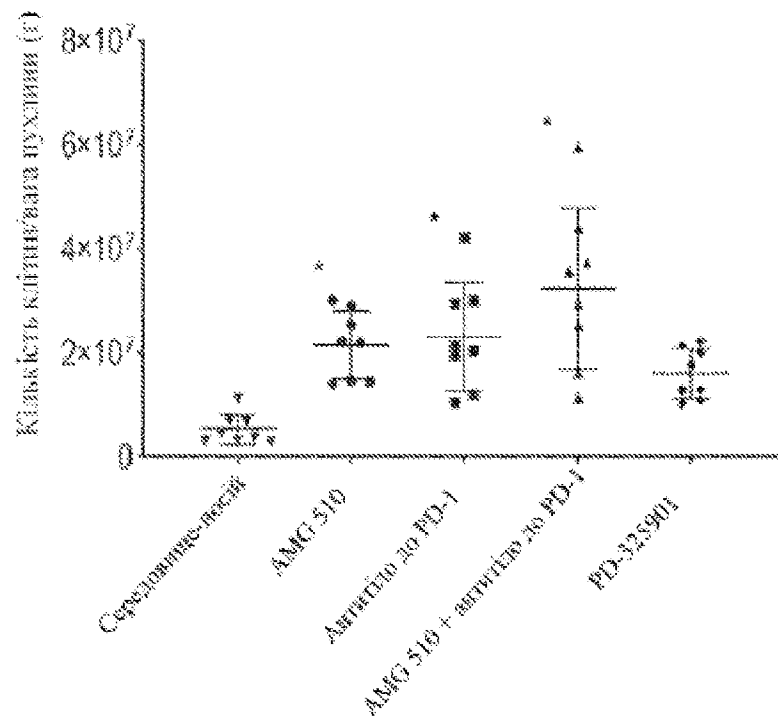
Фіг. 5A



* $p < 0.0005$ для порівняння з контролем, який одержав середовище-носії, за двофакторним ANOVA з наступним апостеріорним аналізом Тьюкі
 $\S$ $p < 0.05$ для AMG 510 порівняно з антигеном до PD-1
 $\&$ $p < 0.05$ для AMG 510 порівняно з PD-L1-9901

Фіг. 5B

ОБРОБКА ЗА ДОПОМОГОЮ АМО 510 ЗУМОВЛЮЄ ПОСИЛЕННЯ
ІНФІЛЬТРАЦІЇ CD8+ ТА CD4+ Т-КЛІТИН У ПУХЛИНАХ CT-26
G12C-H10
(АБСОЛЮТНІ ЧИСЛА)
CD4+ Т-клітини

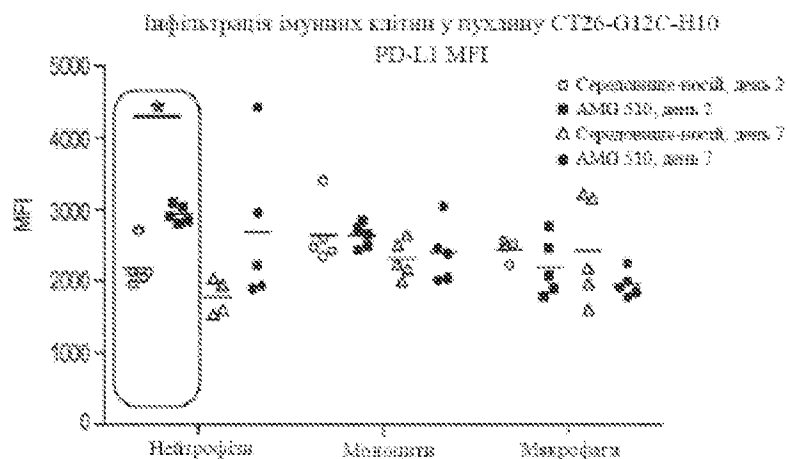


* = $p < 0.05$ для порівняння з групою середовища-носія за двофакторним ANOVA з наступним апостеріорним аналізом Тьюкі

Fig. 5C



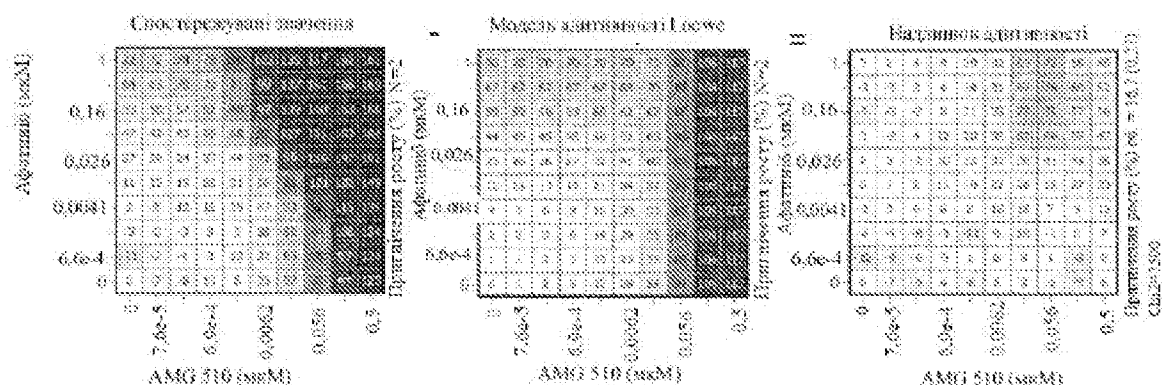
Fig. 6A



AMG 510 (30 мг/кг) або контроль із середовища-носієм вводили протягом 2 або 7 днів та пухлини збирали для імунофлуоресценції

* $p < 0.01$ за парним t-критерієм

Фіг. 6В



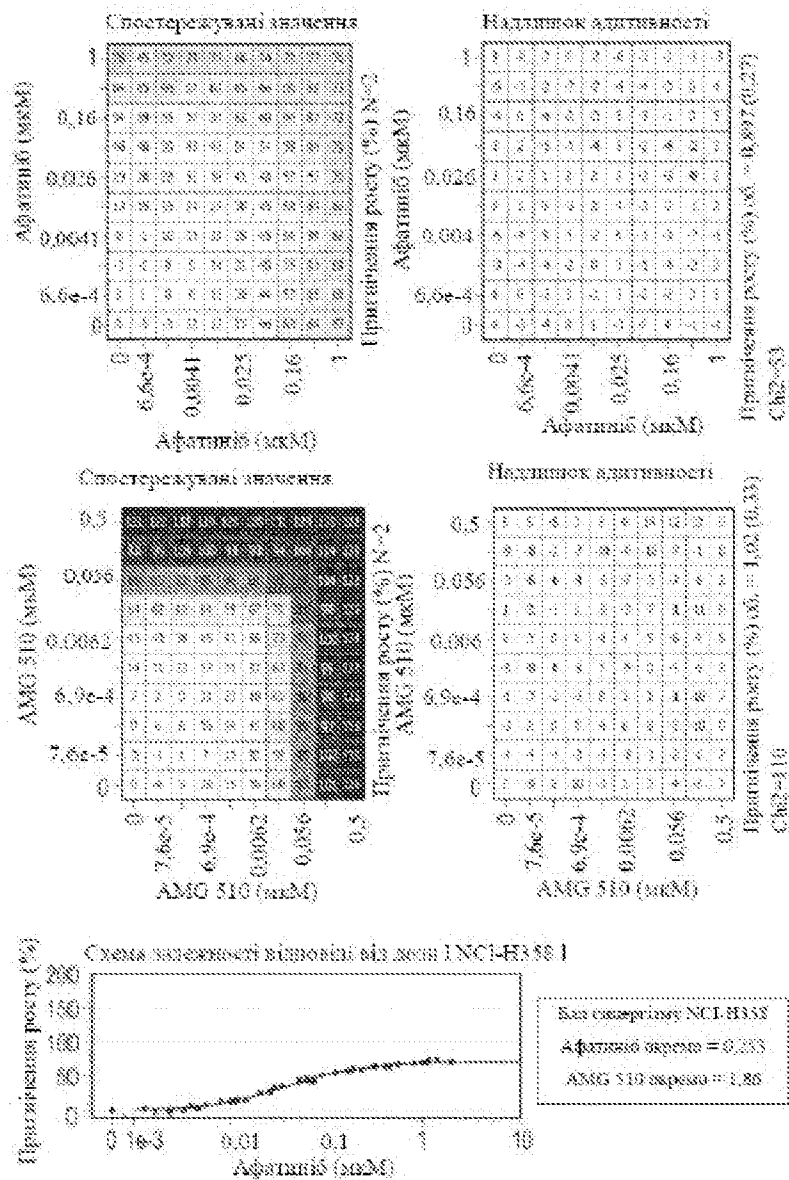
Віднесені відношення активності = $\frac{\text{спостережувані значення} - \text{активність Loewe}}{\text{Баз. синергізм}}$

Баз. синергізм = значення значення наданого контролю

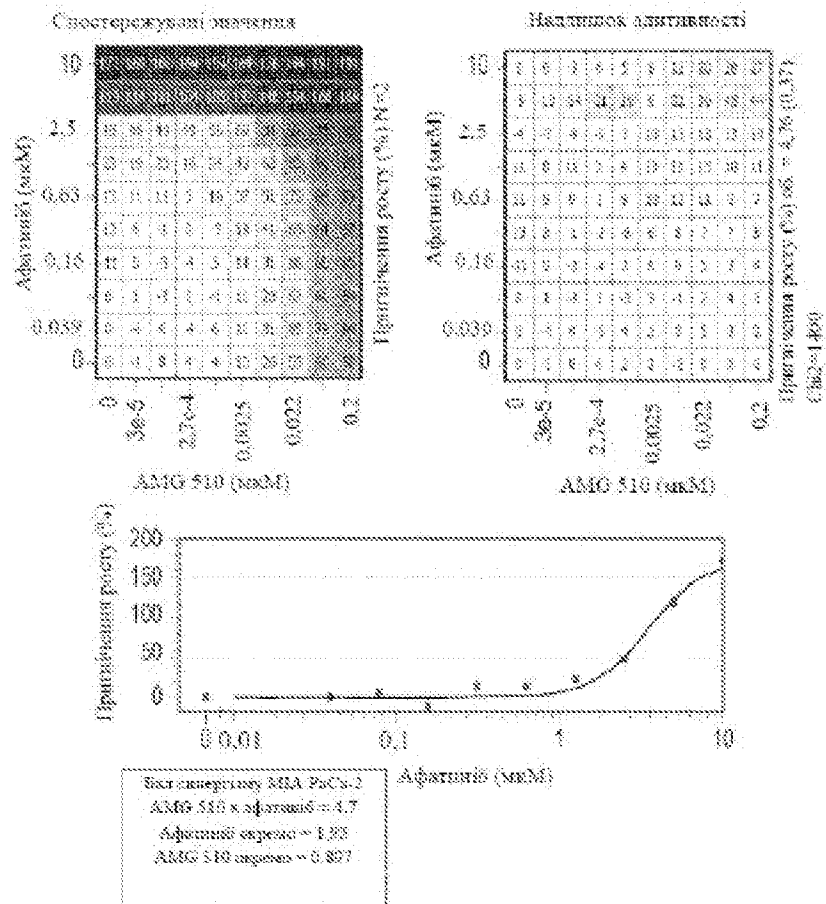
- Визначення синергічних взаємодій за високим рівнем активності
- Видалення негативних значень у разі відсутності ефекту
- Нормалізація коефіцієнтів розбіжності в експерименті

963-11158
AMG 510 з афетоміб
Експ. концентрація = 22.3

Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 10А

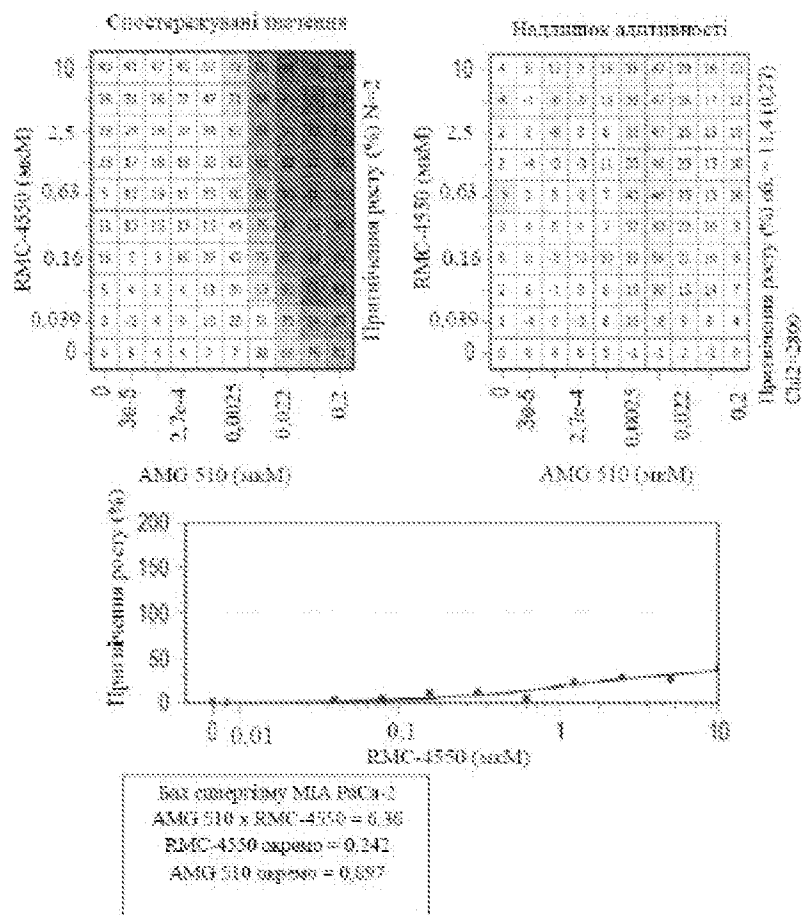


Fig. 10B

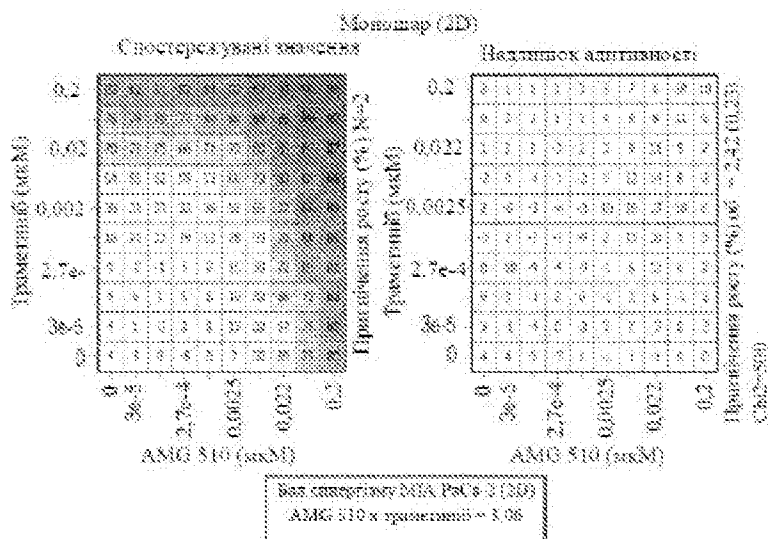
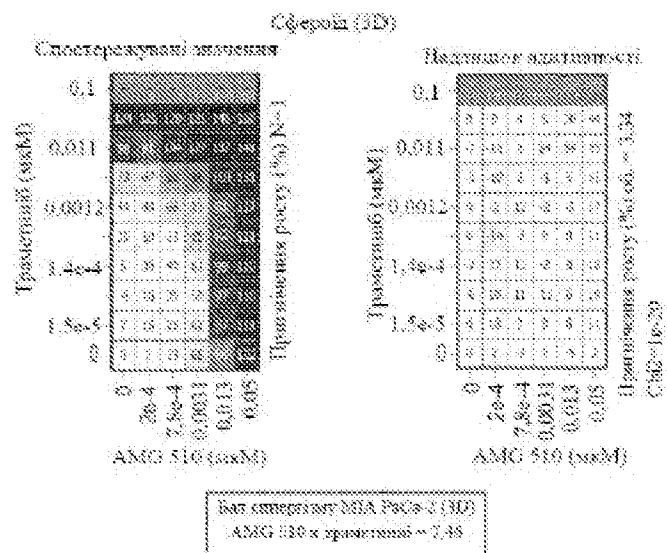
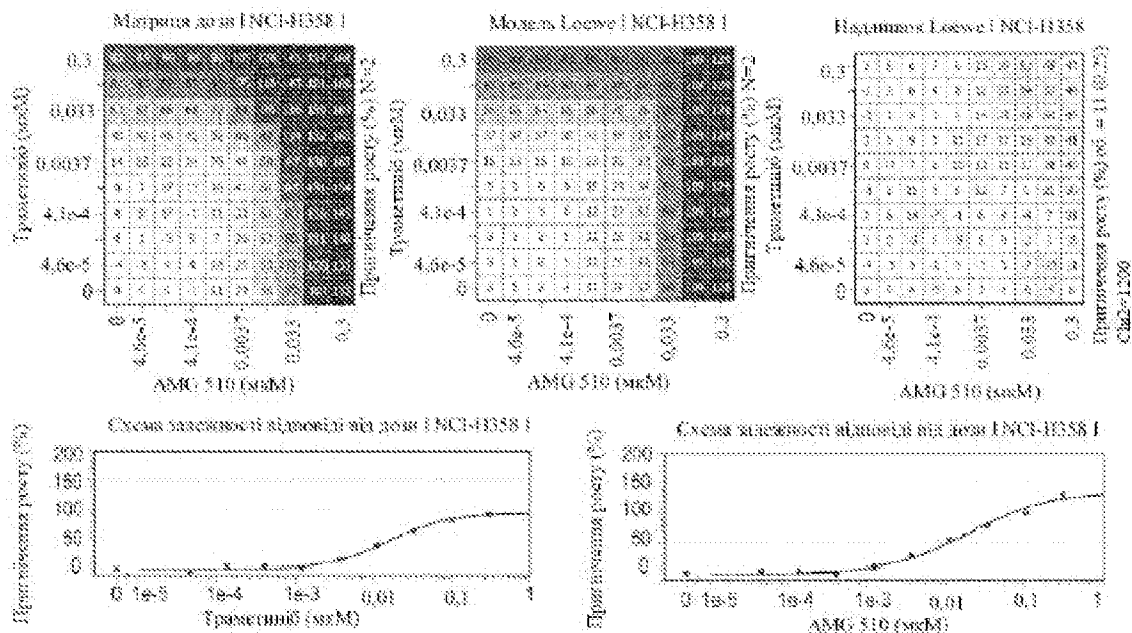


Fig. 11A



Фиг. 11В



Баз. експеримент = 17

Фиг. 12

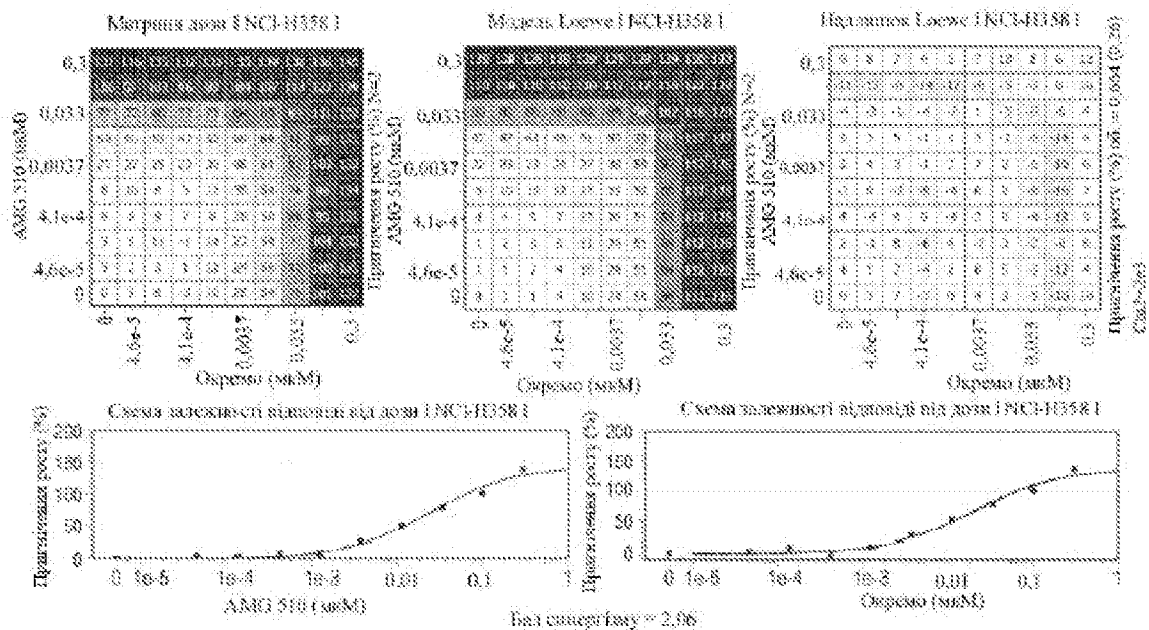


Fig. 13

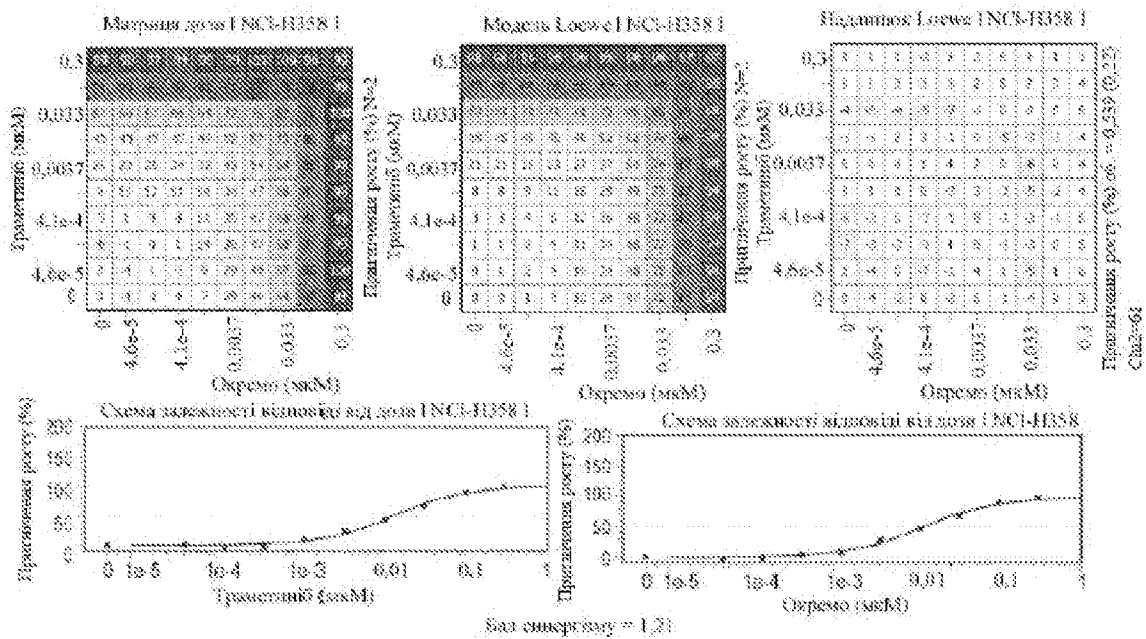
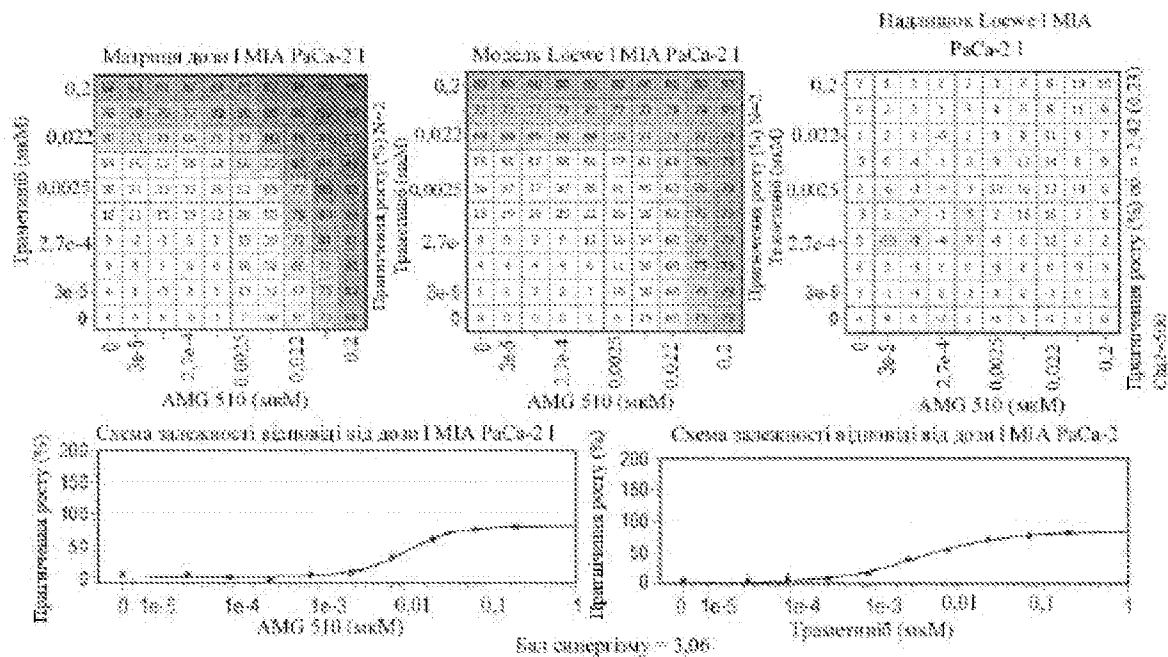
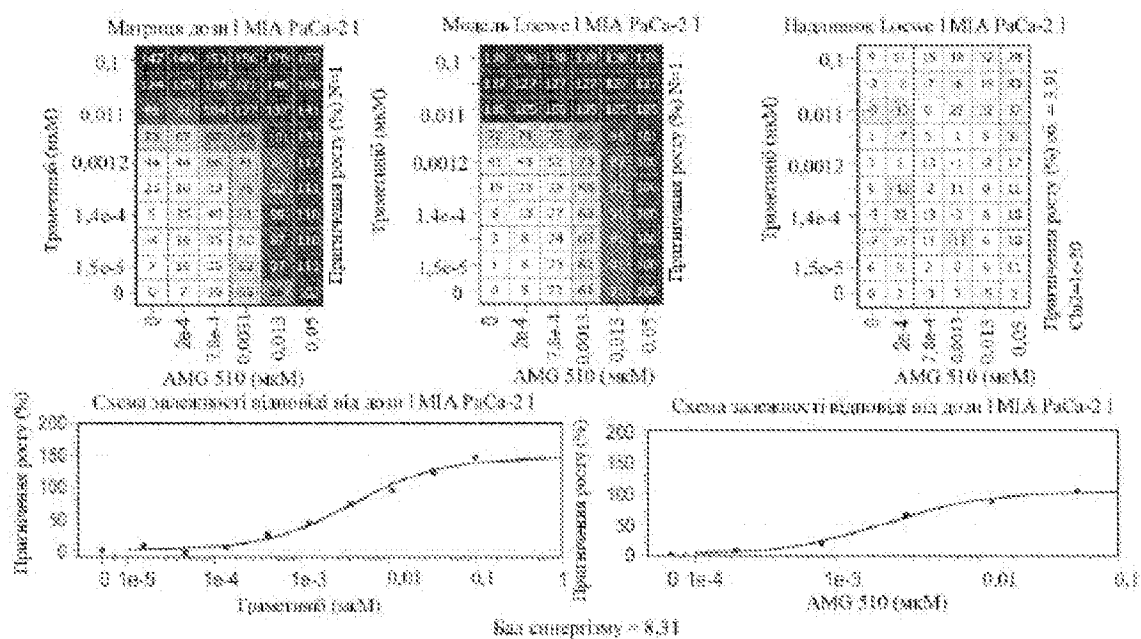


Fig. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

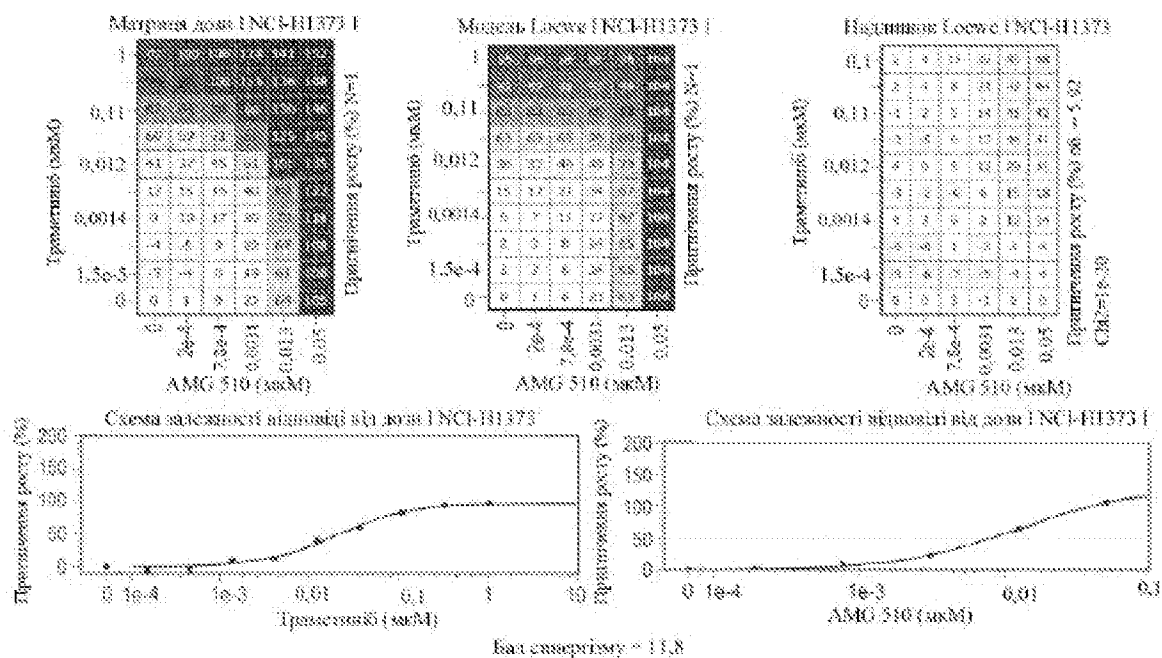


Fig. 17

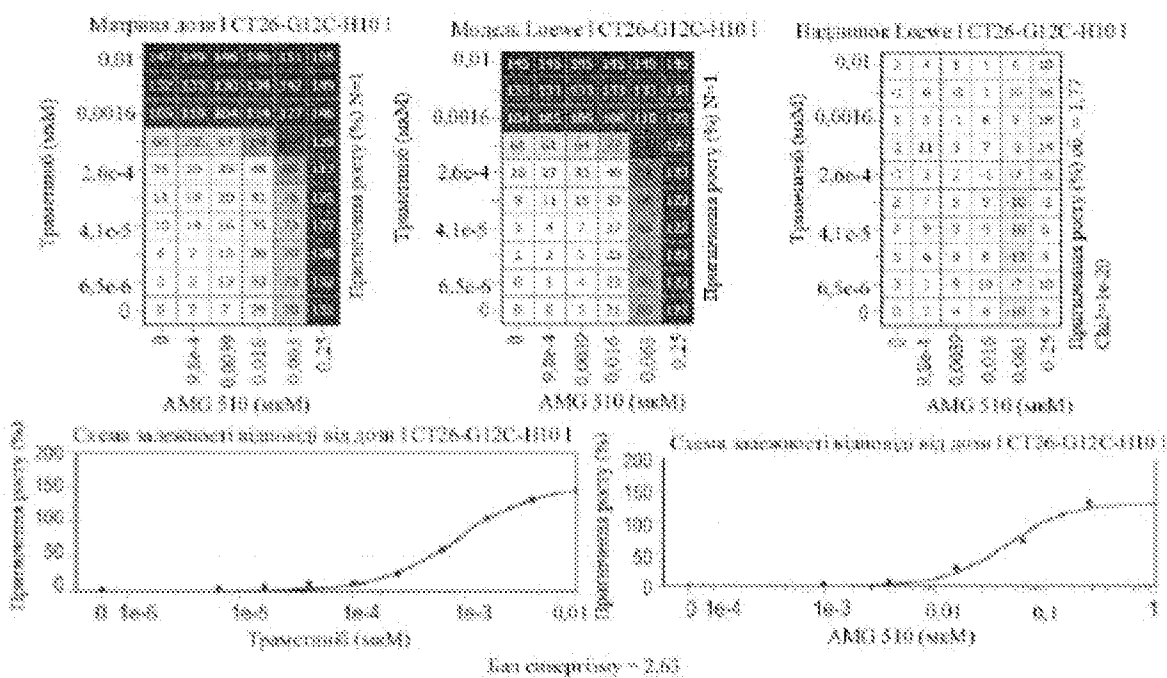


Fig. 18

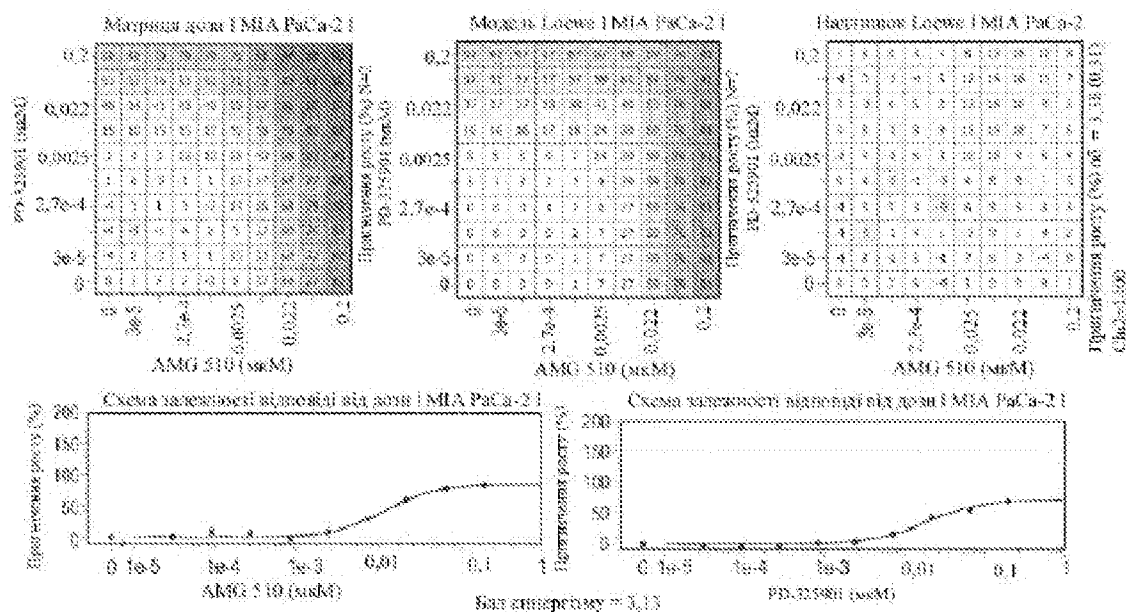


Fig. 19

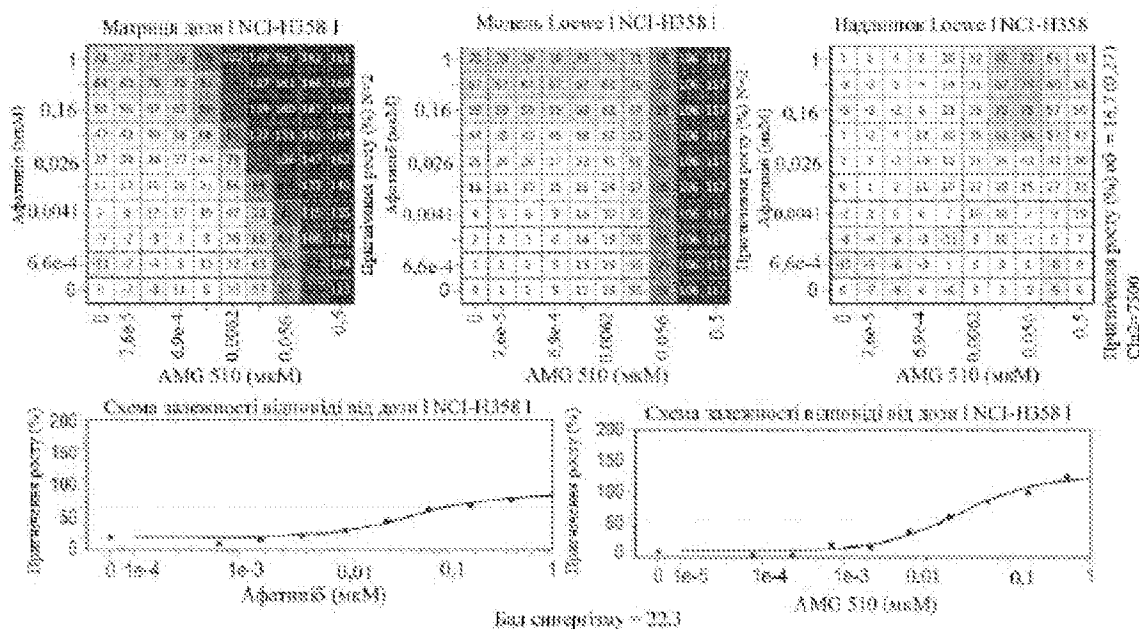
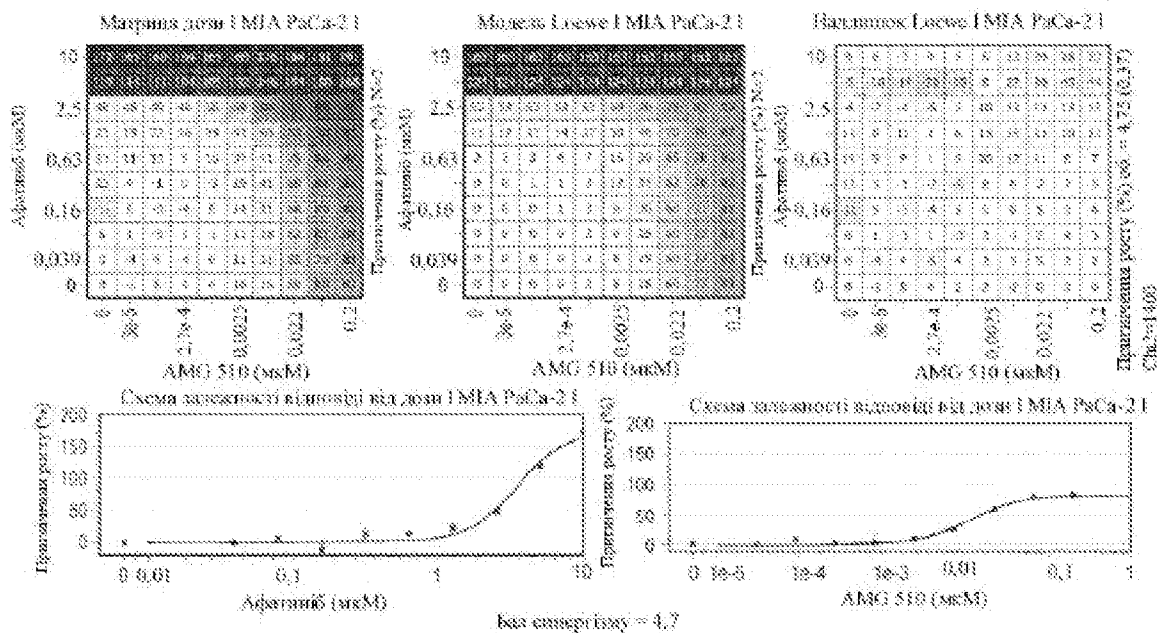
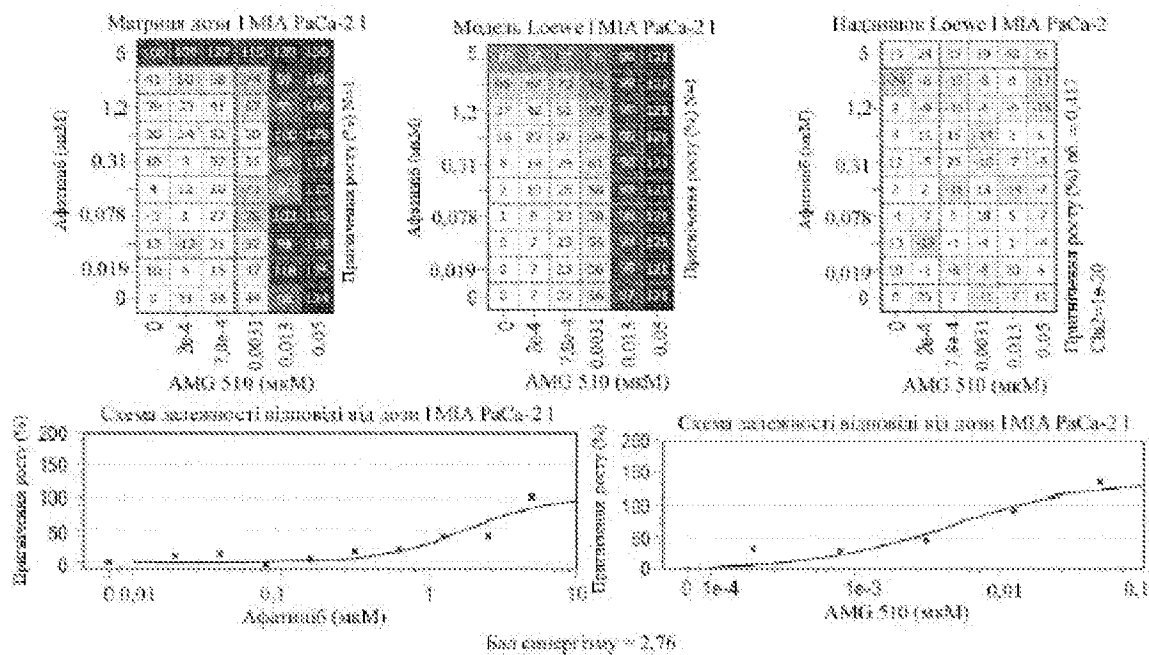


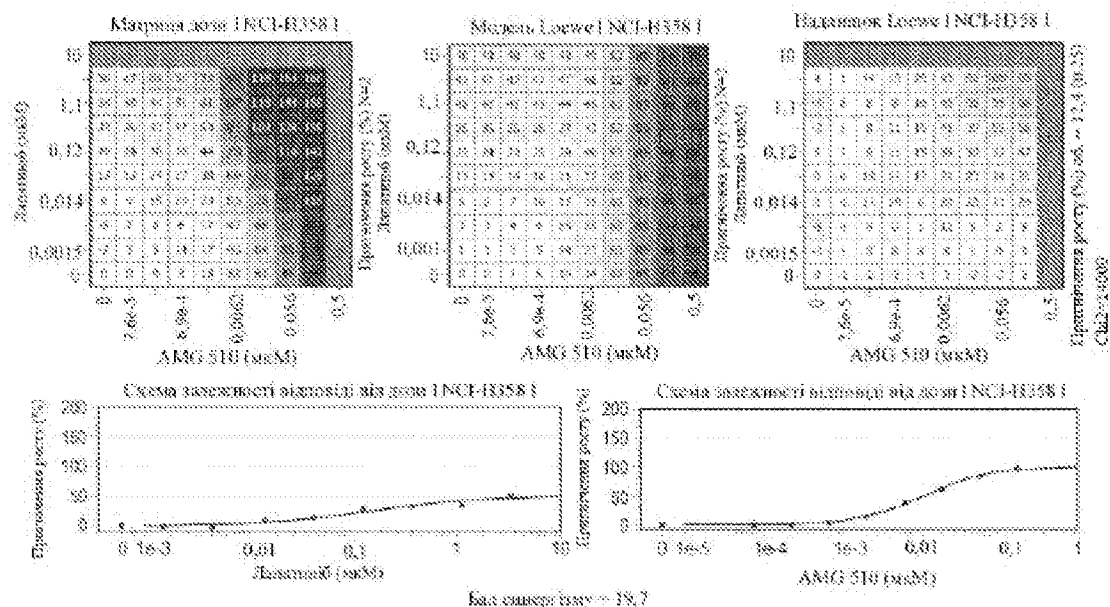
Fig. 20



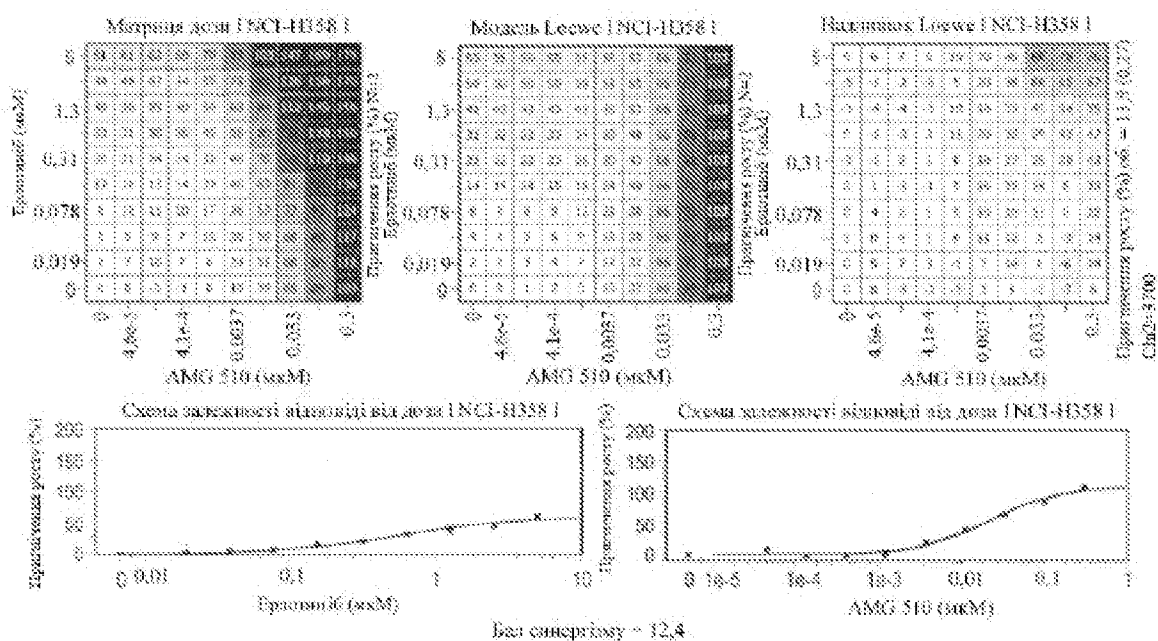
Фіг. 21



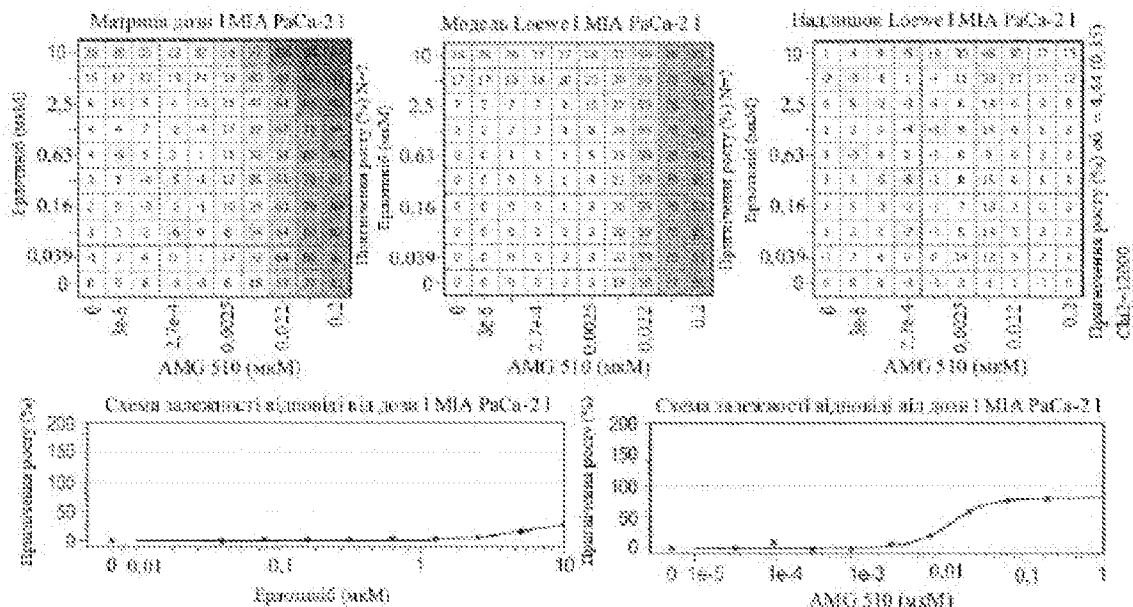
Фіг. 22



Фіг. 25

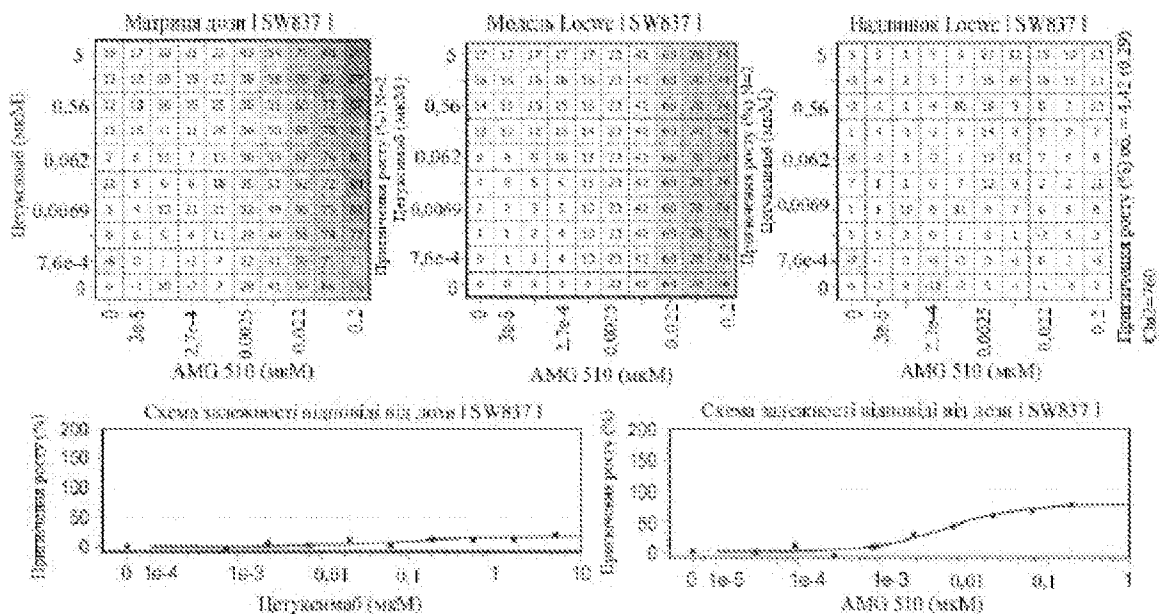


Фіг. 26



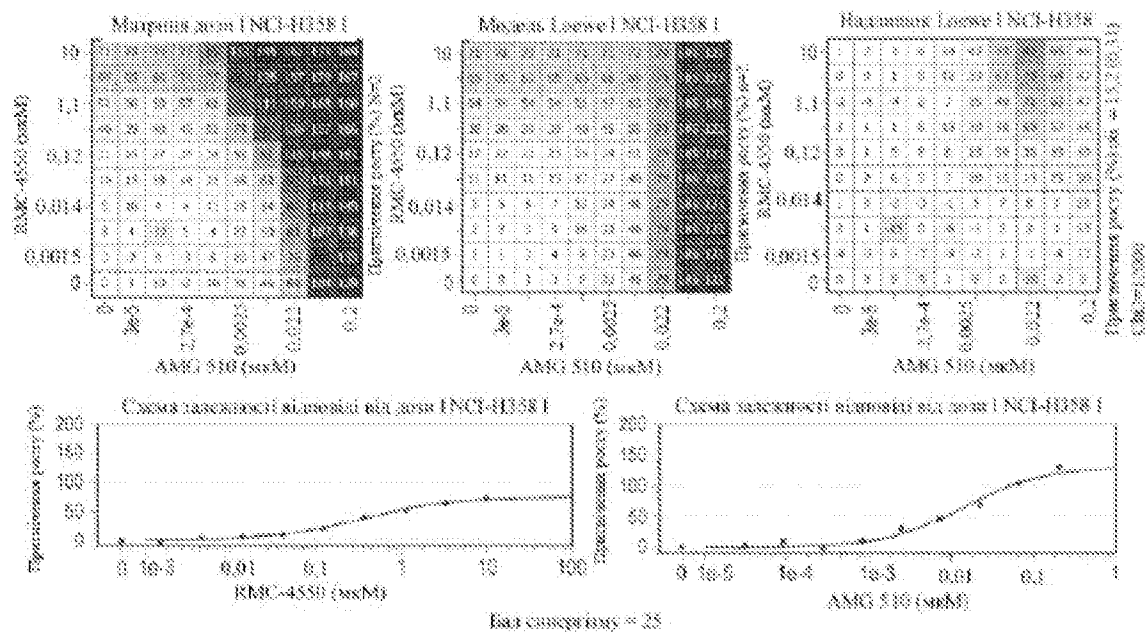
Базисний рівень = 2.07

Фиг. 27

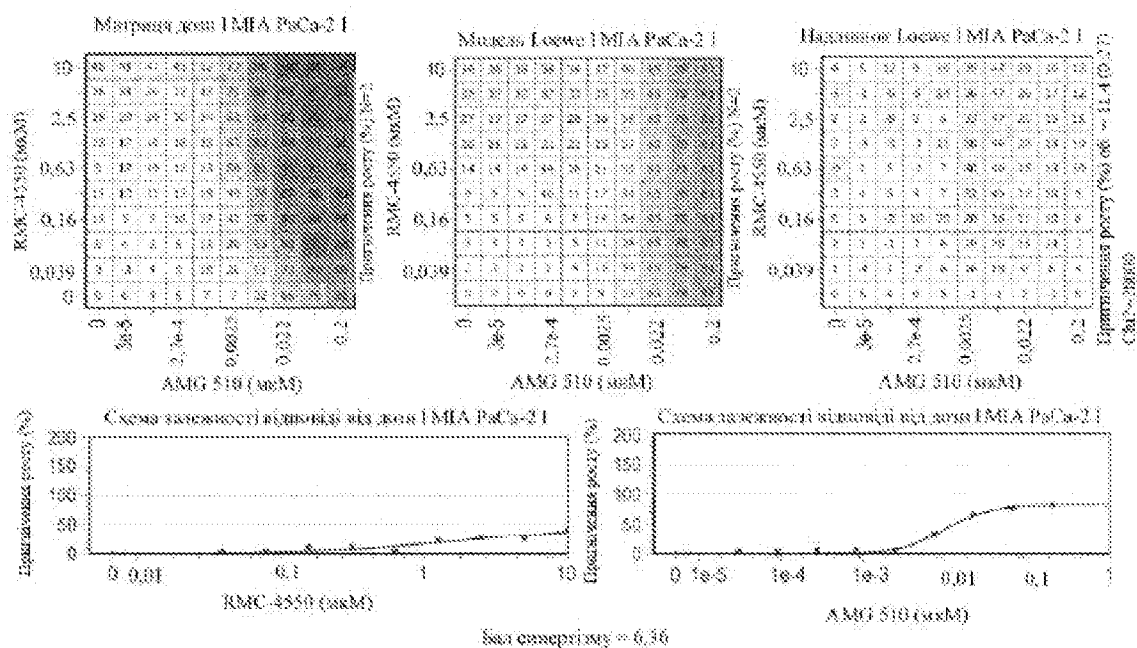


Базисний рівень = 2.96

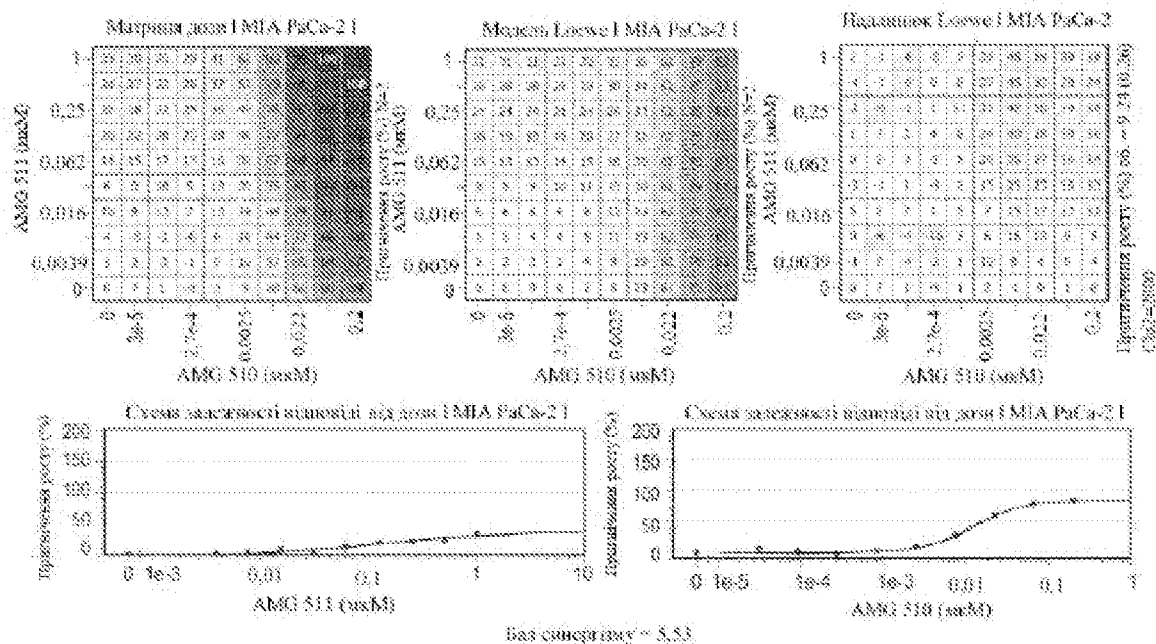
Фиг. 28



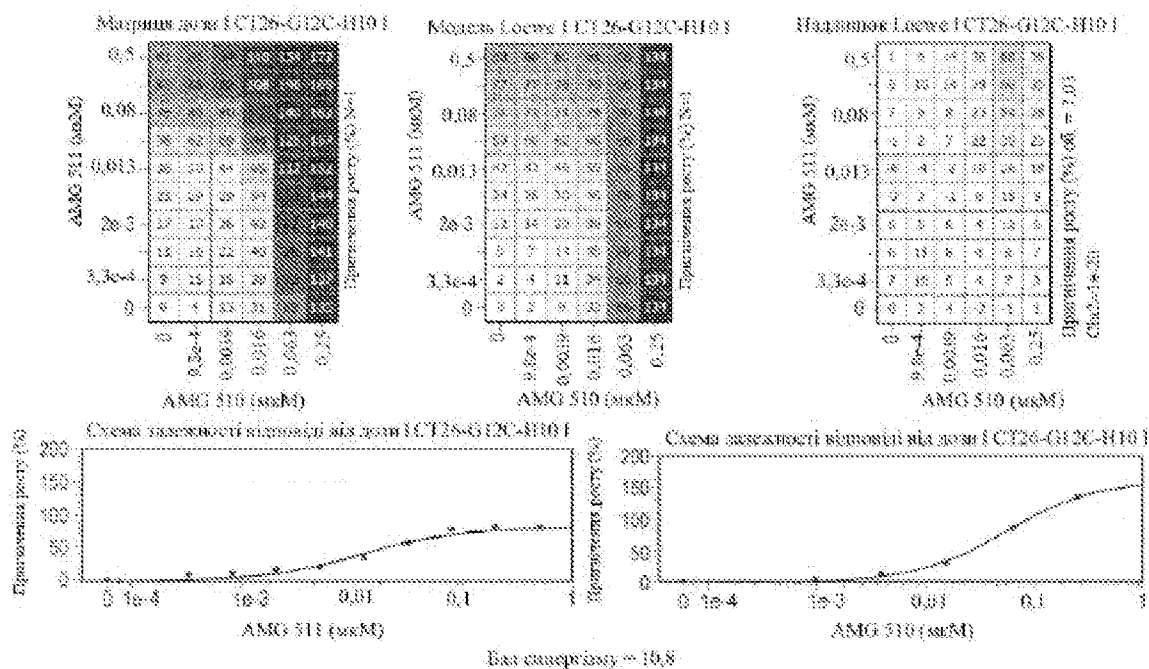
Фіг. 29



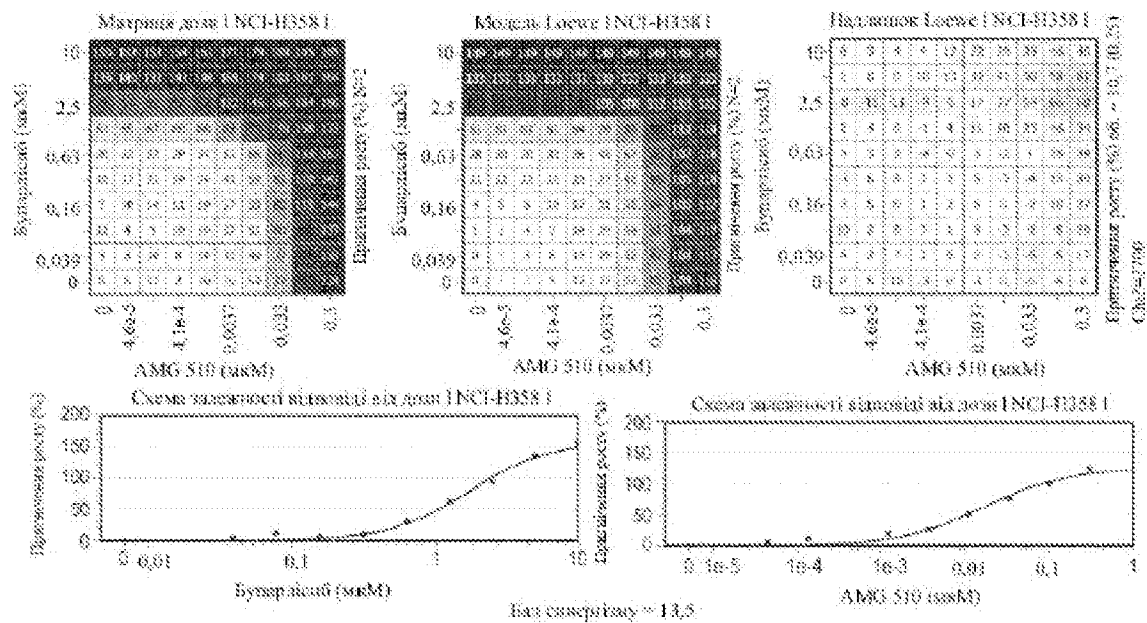
Фіг. 30



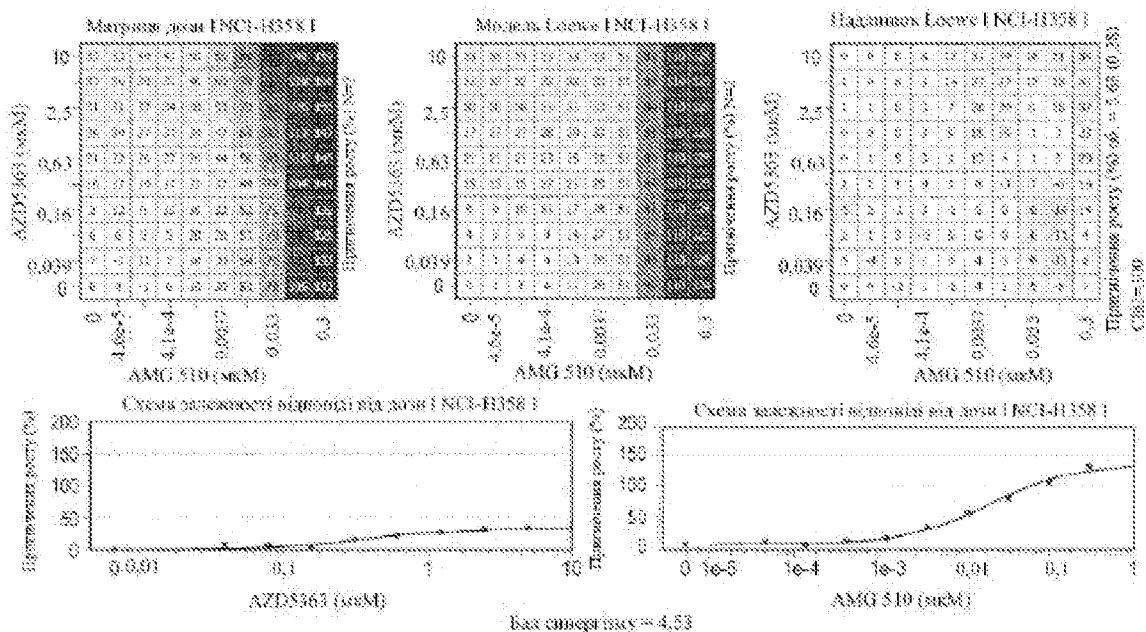
Фиг. 33



Фиг. 34



Фіг. 35



Фіг. 36

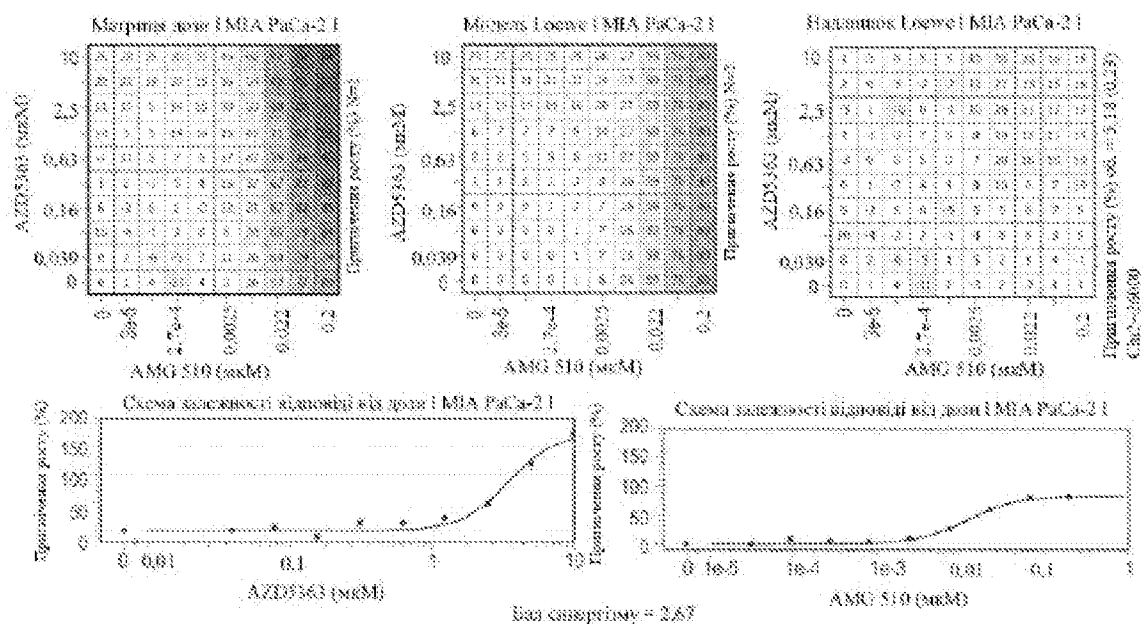


Fig. 37

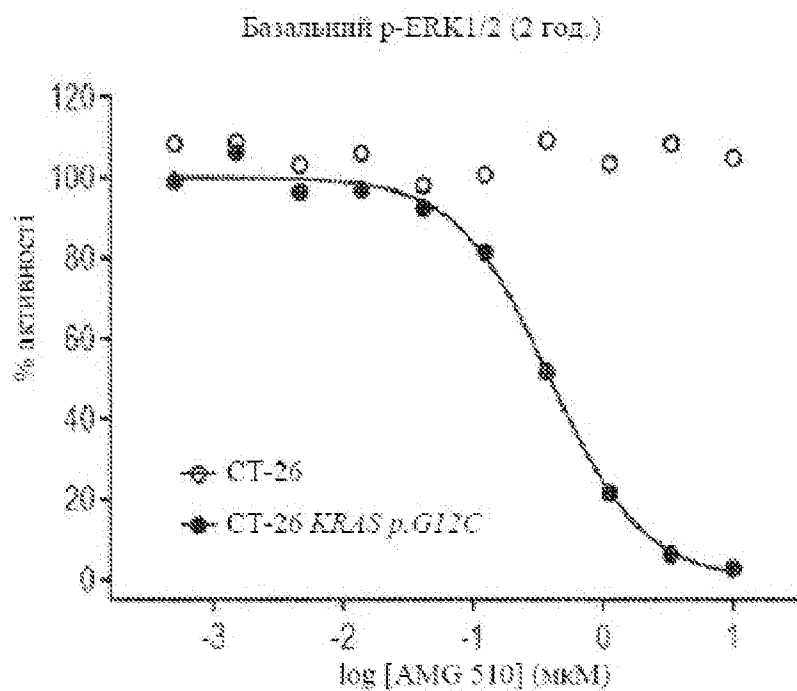


Fig. 38

Життєздатність 2D (72 год.)

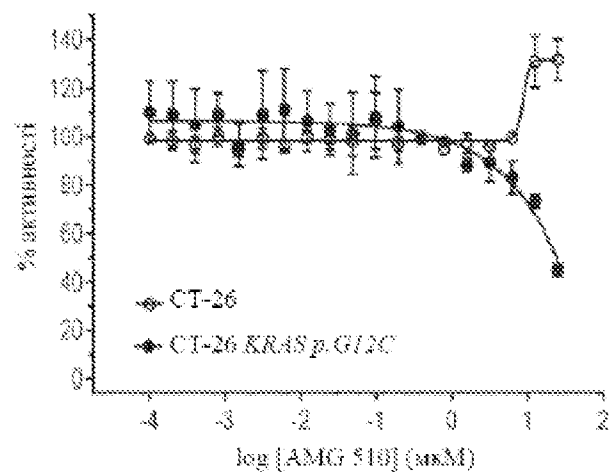


Fig. 39A

Життєздатність сфероїда 3D (72 год.)

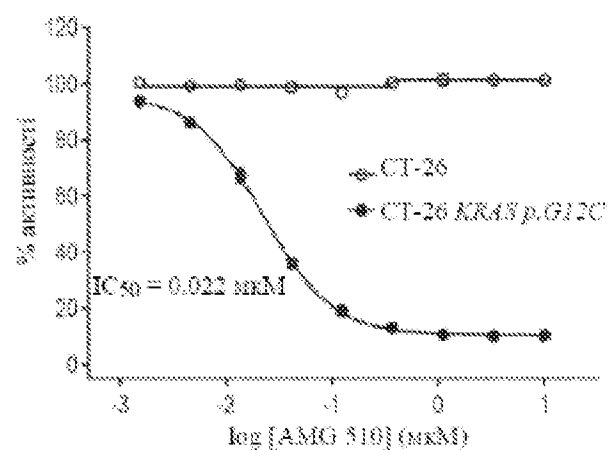


Fig. 39B

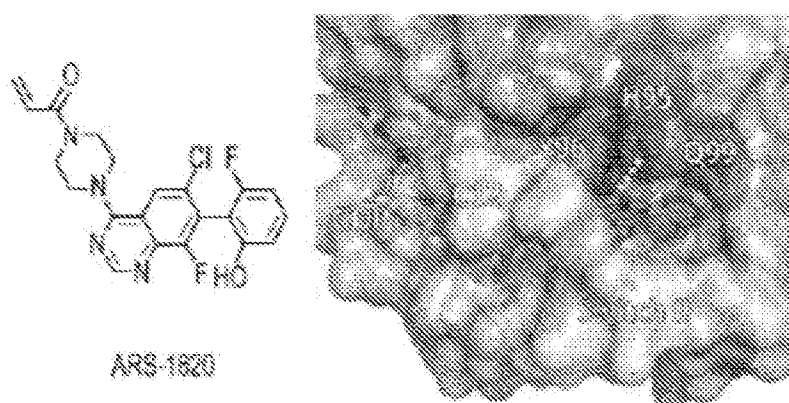


Fig. 40A

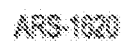


Fig. 40B



Fig. 40C

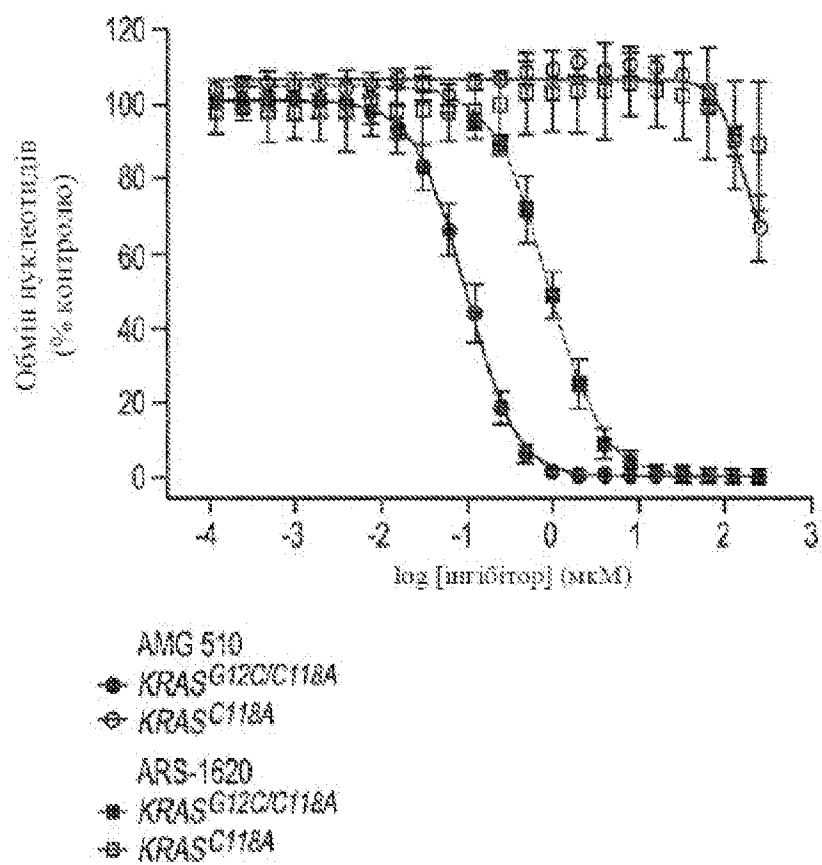


Fig. 40C

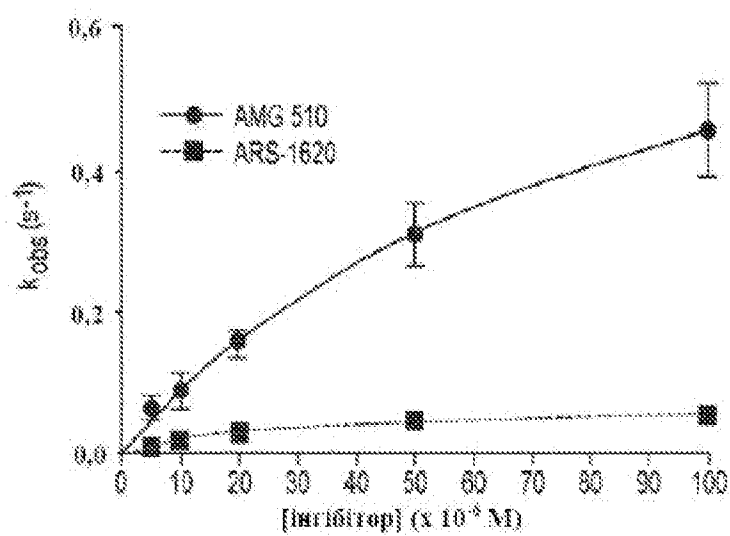


Fig. 40D

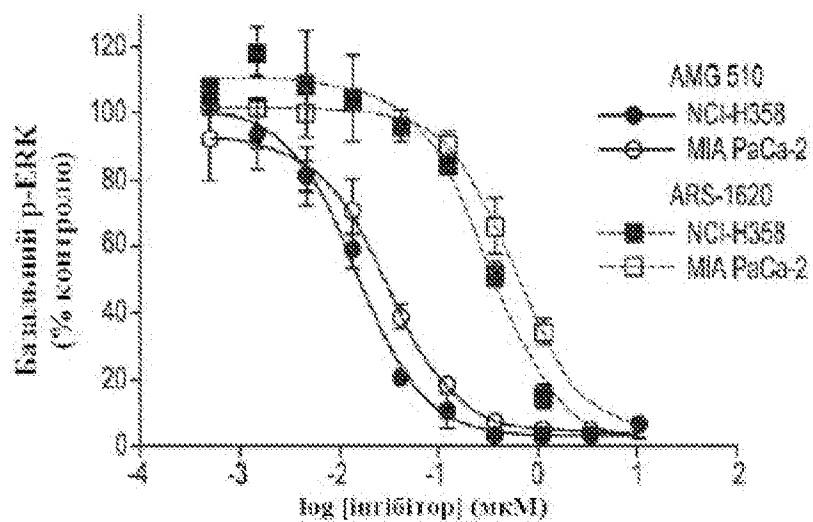


Fig. 40E

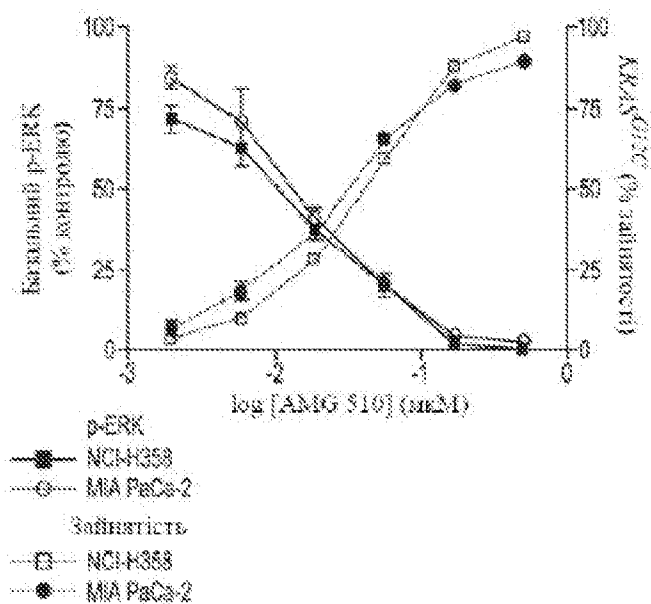
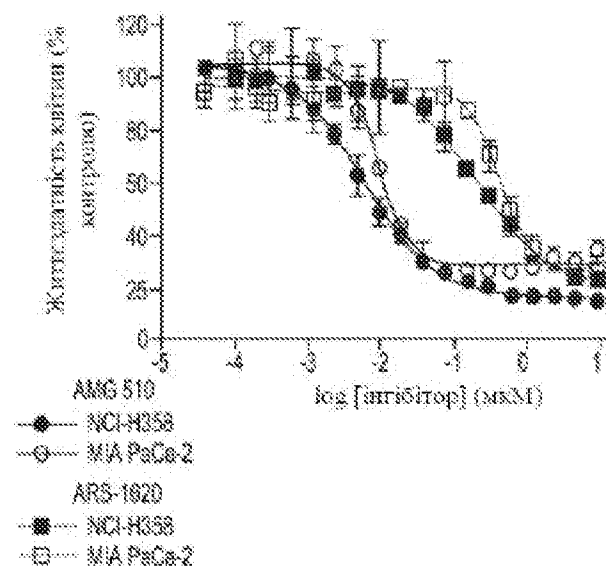
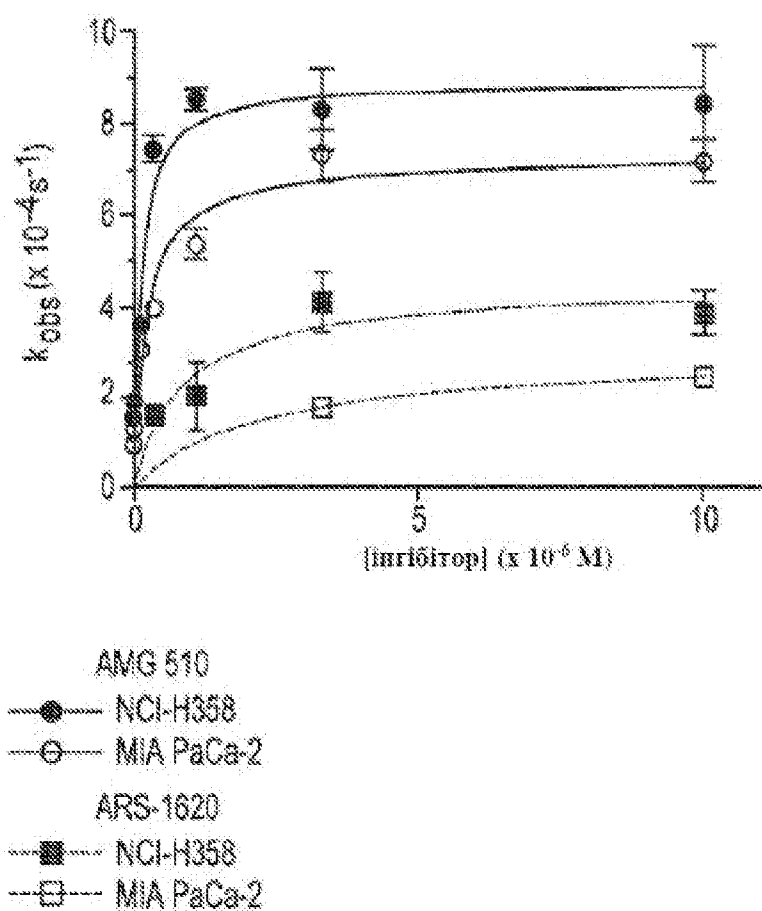


Fig. 40F



Фиг. 40G



Фиг. 40H

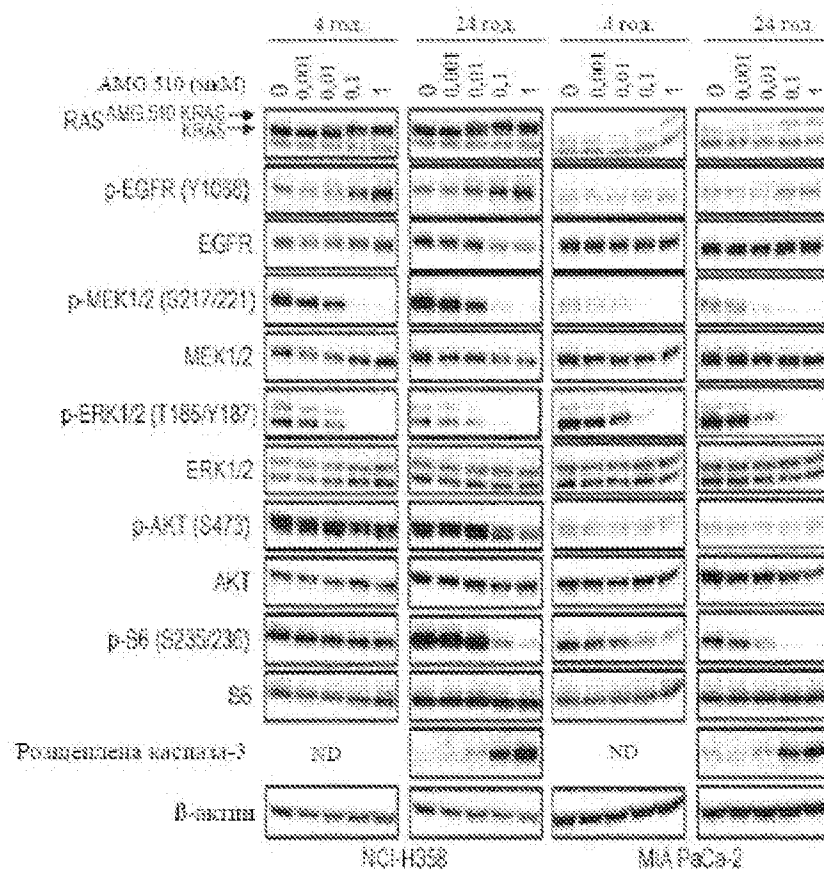
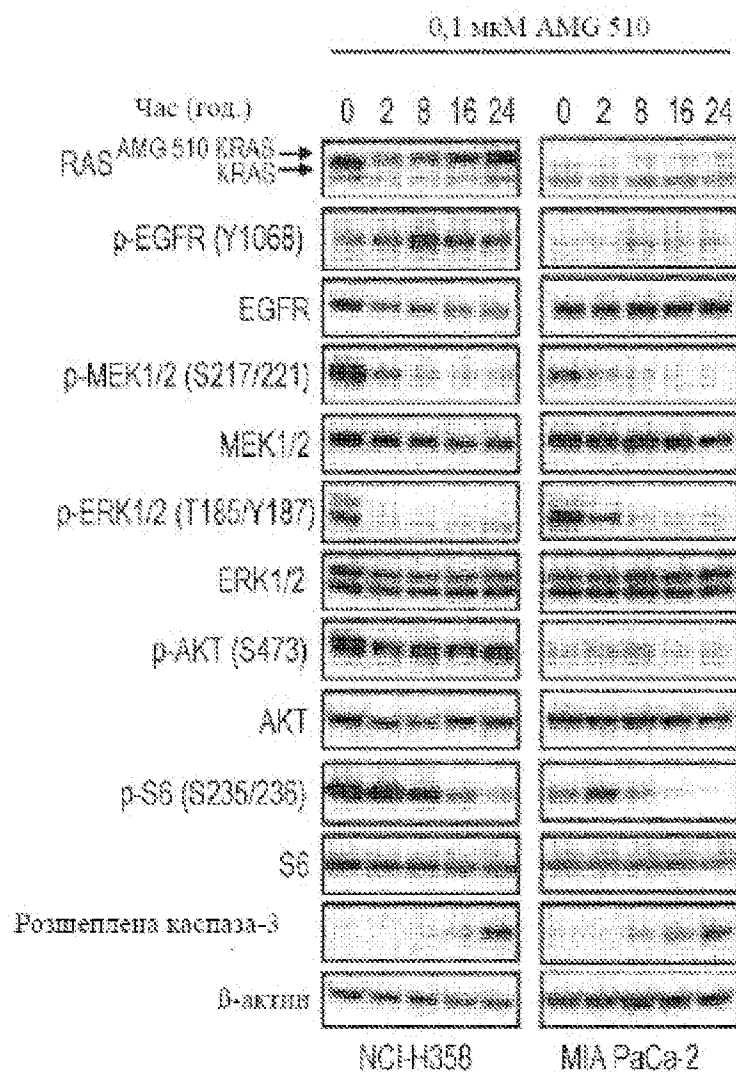
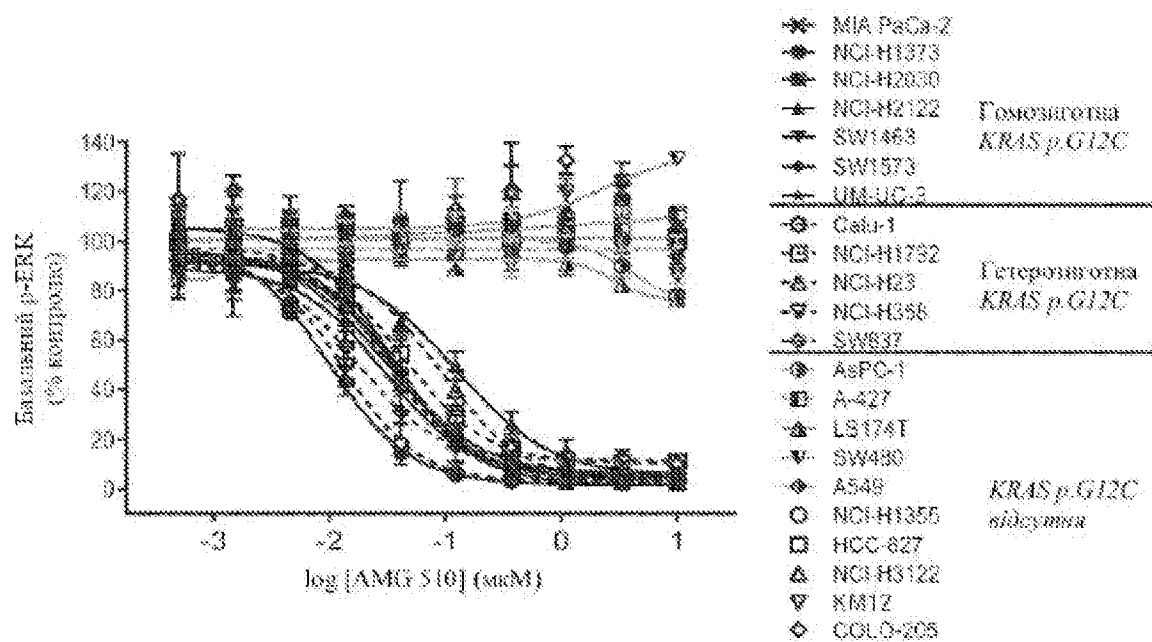


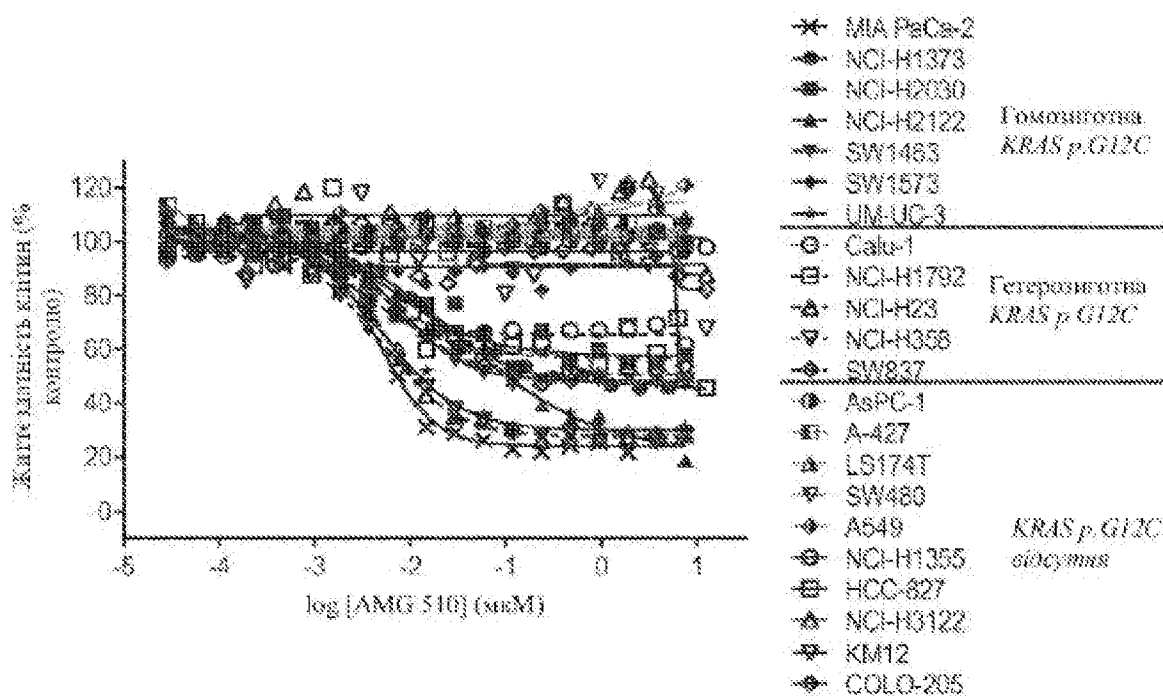
Fig. 41A



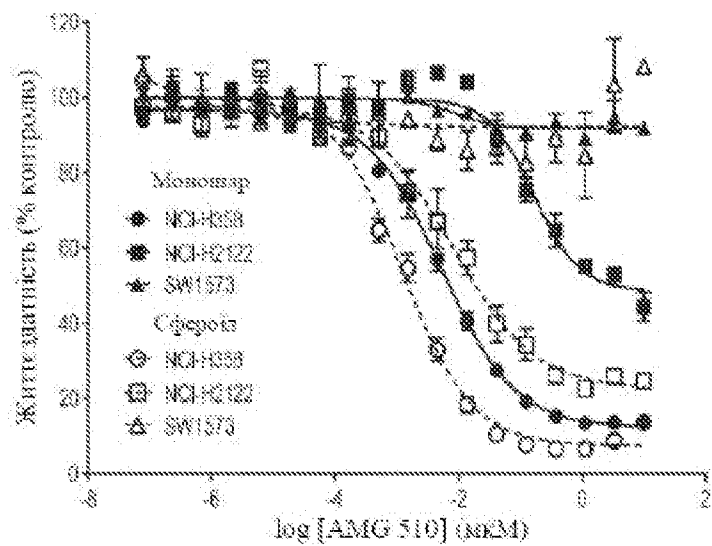
Фиг. 41B



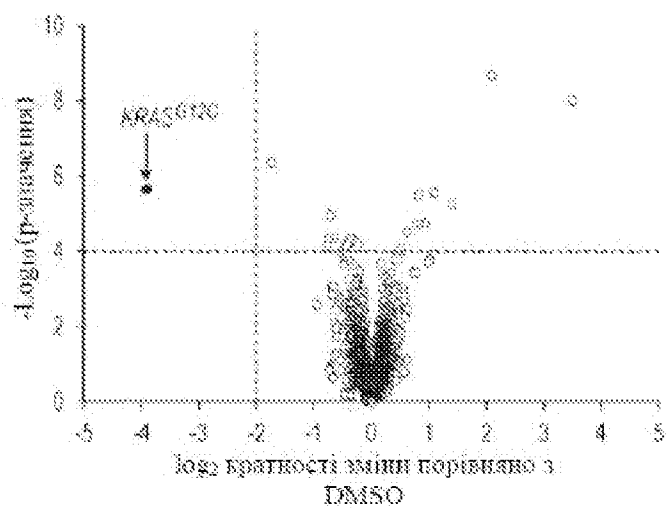
Фіг. 41C



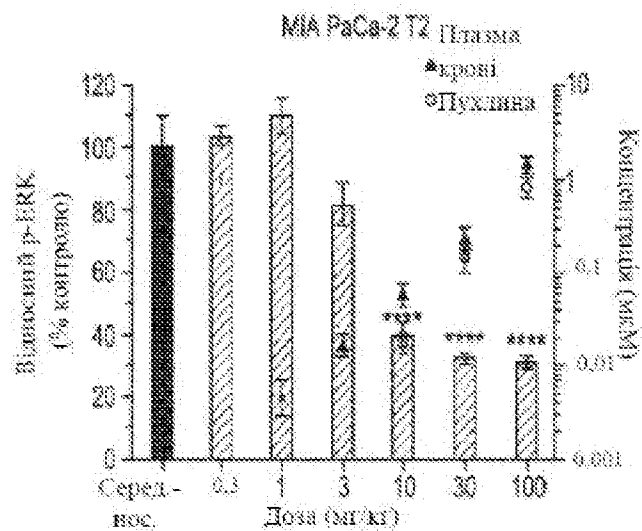
Фіг. 41D



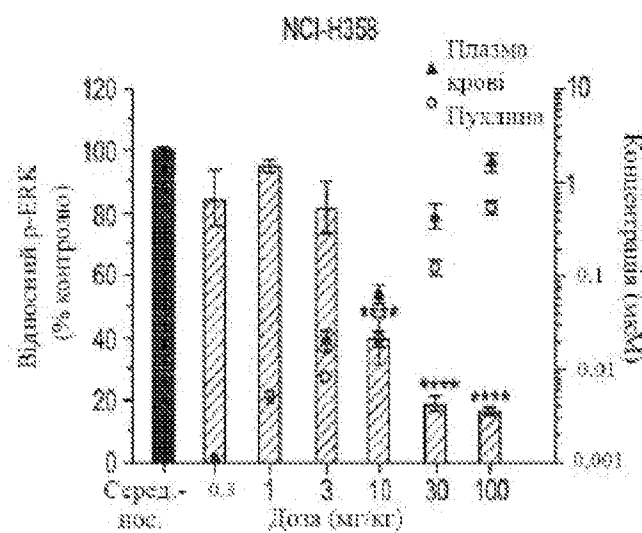
Фиг. 41E



Фиг. 41F



Фіг. 42А



Фіг. 42В

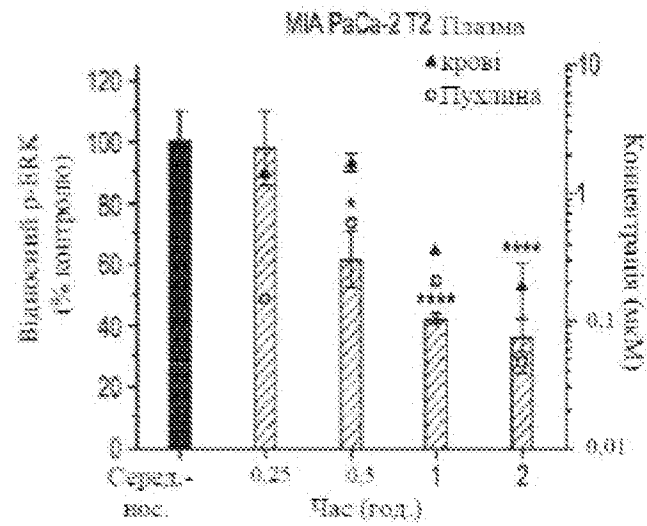


Fig. 42C

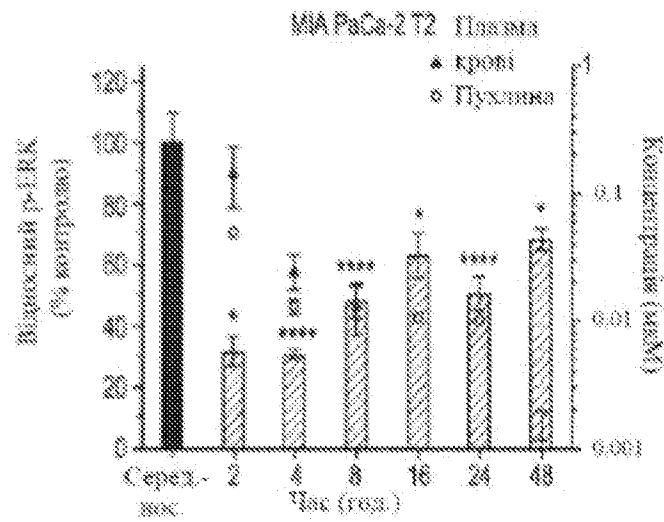


Fig. 42D

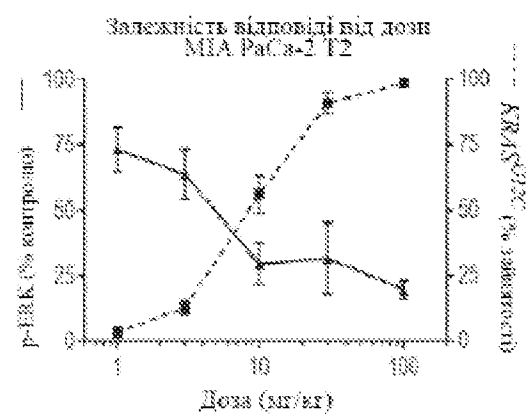


Fig. 42E

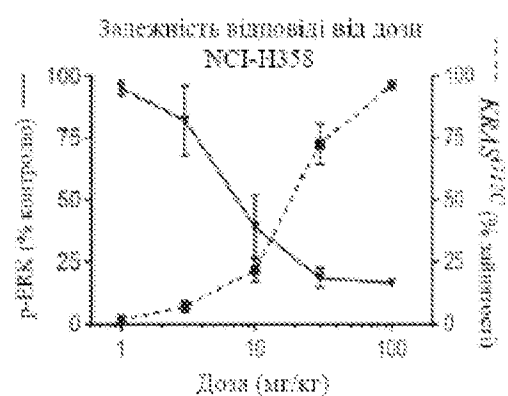


Fig. 42F

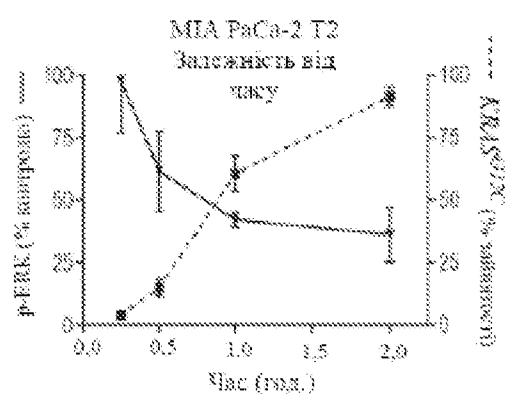


Fig. 42G

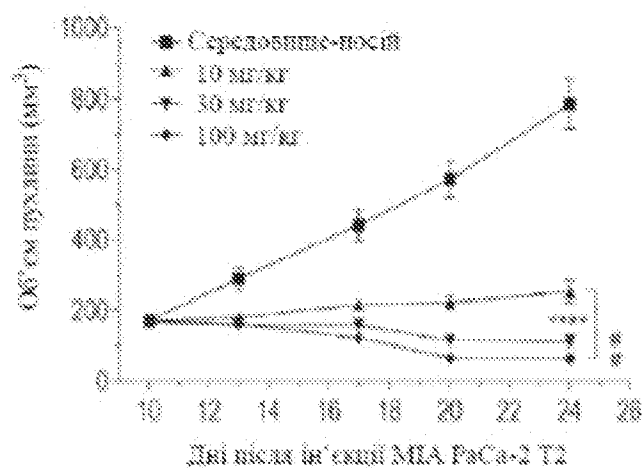
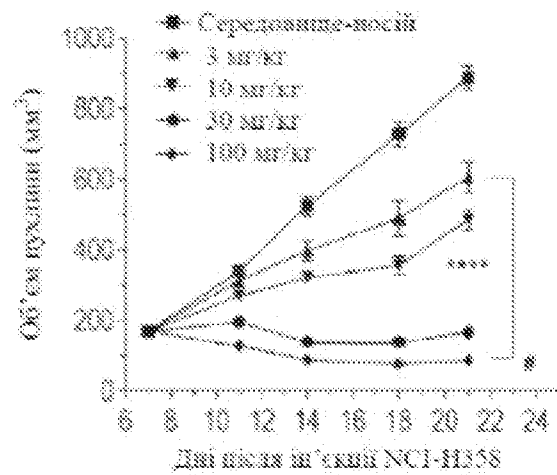
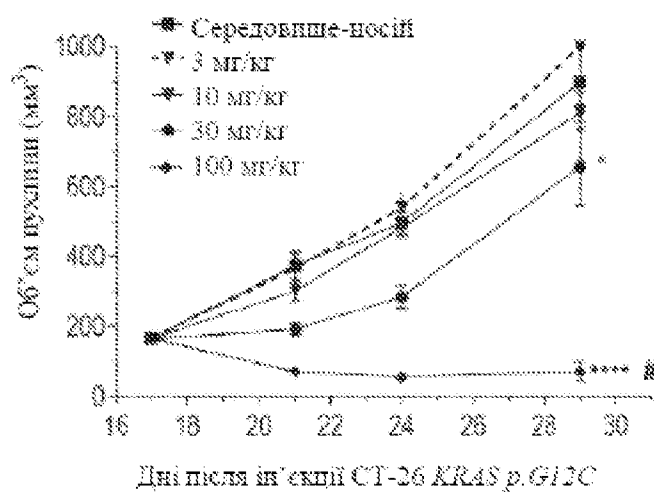


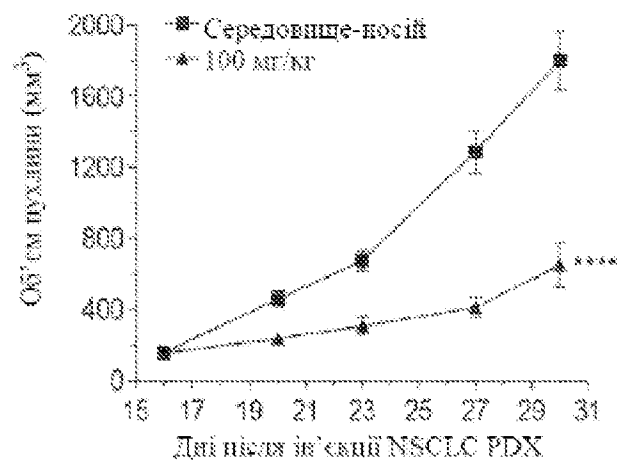
Fig. 43A



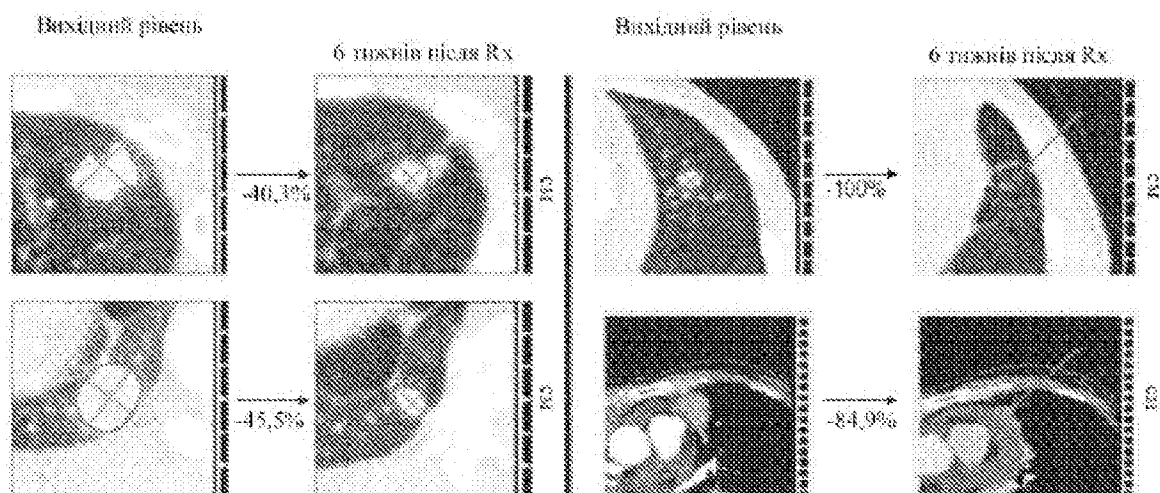
Фіг. 43В



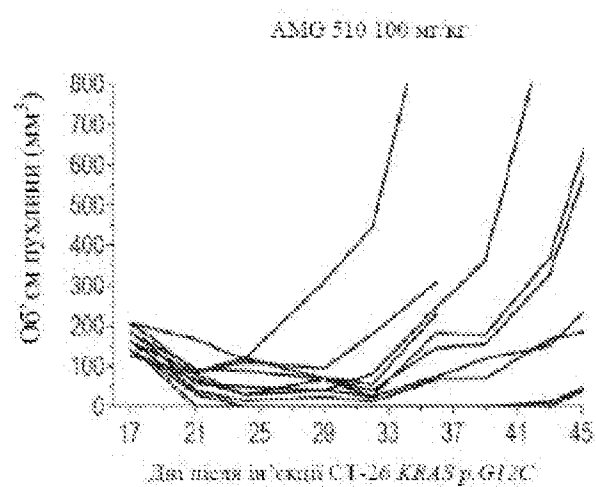
Фіг. 43С



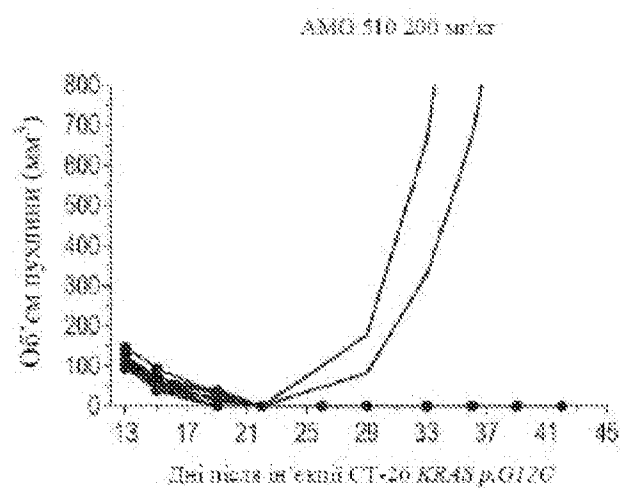
Фіг. 43D



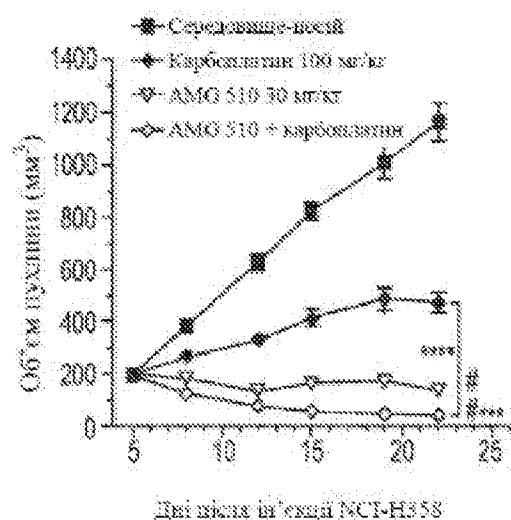
Фиг. 43Е



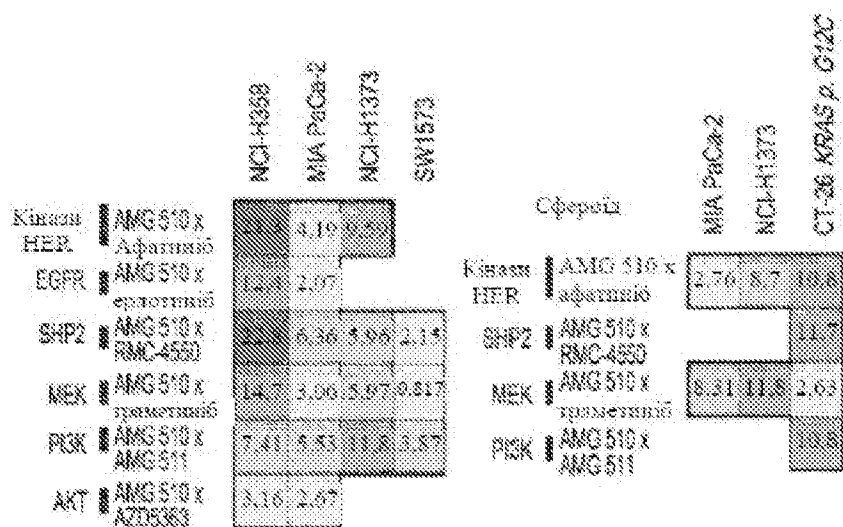
Фиг. 43F



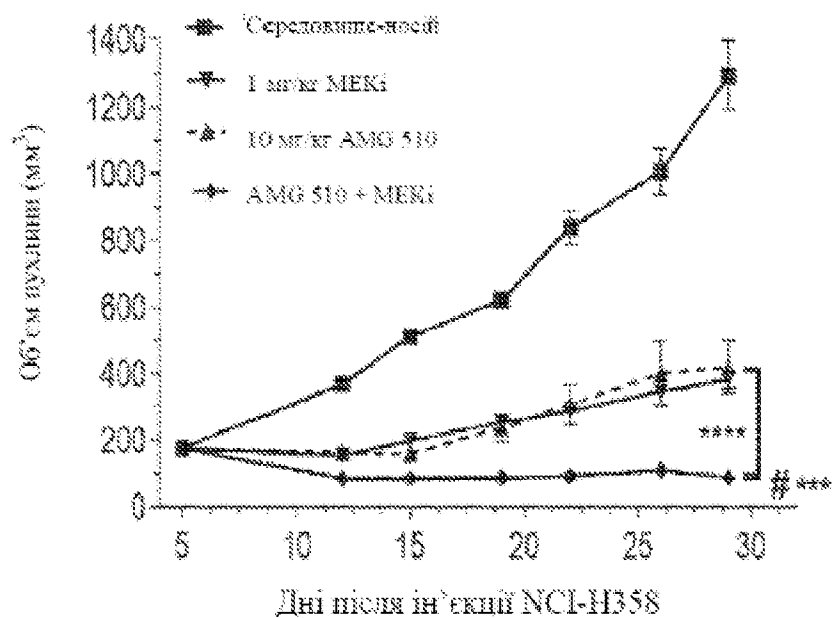
Фиг. 43G



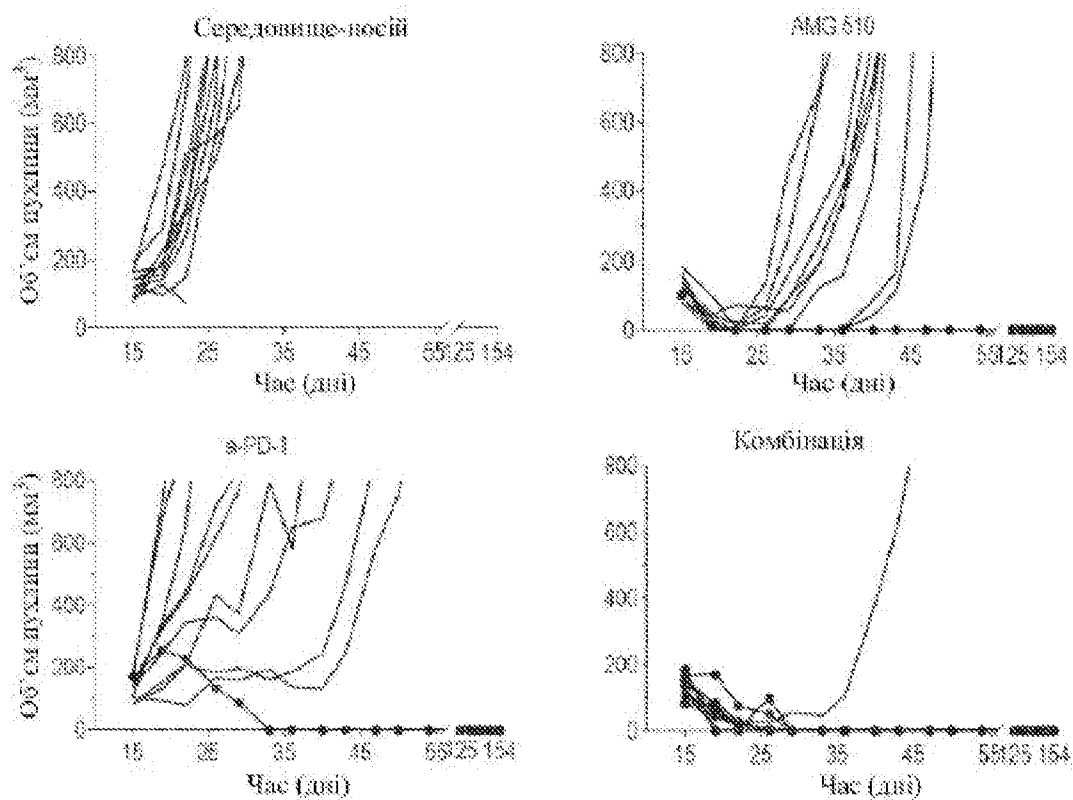
Фіг. 44А



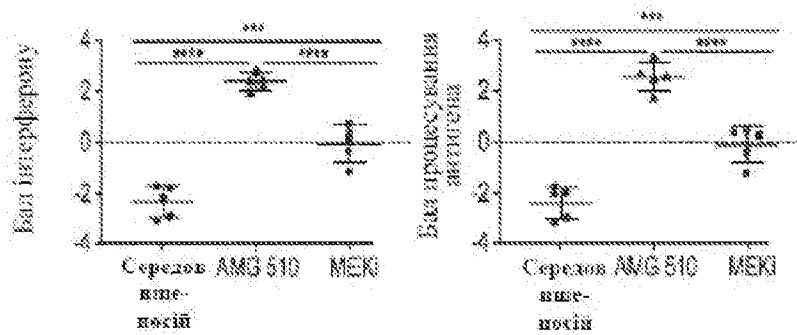
Фіг. 44В



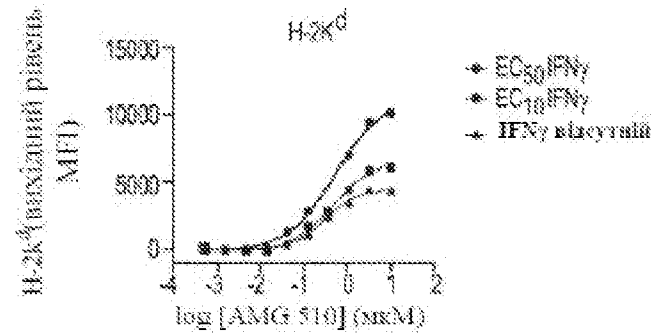
Фіг. 44С



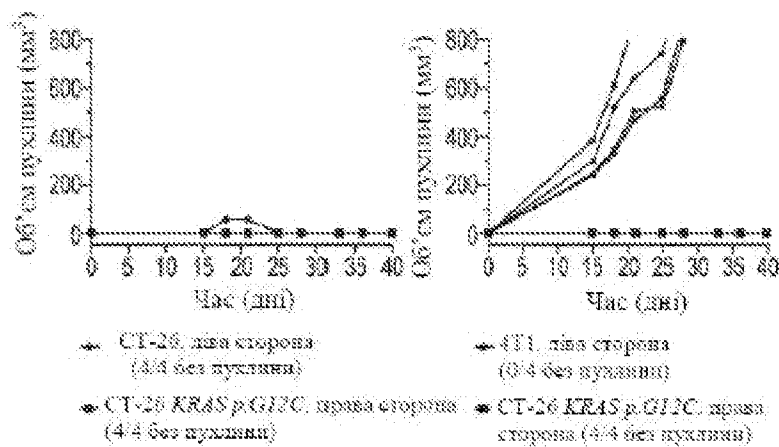
Фіг. 45А



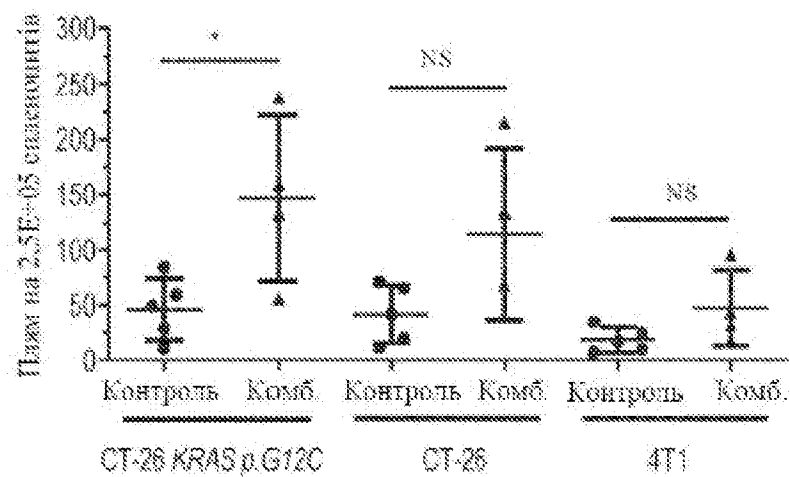
Фіг. 45D



Фіг. 45E



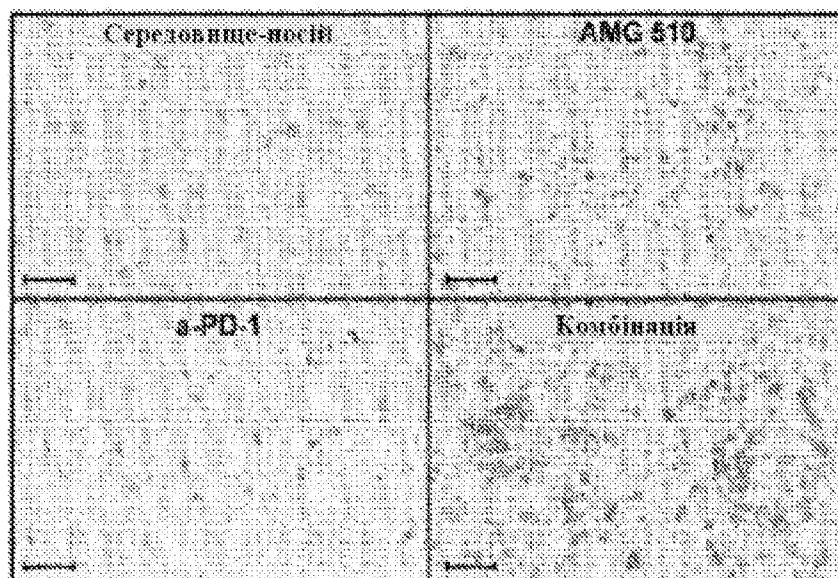
Фіг. 45F



Фіг. 45G



Фіг. 45H



Фіг. 45I

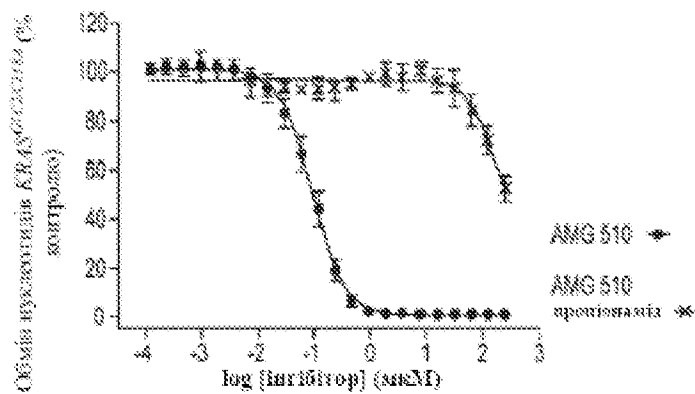


Fig. 46A

		Max kinetic rate	Ki of β in	Max kinetic rate of β in
		(s ⁻¹)	(M)	(M ⁻¹ s ⁻¹)
Mass spectrometry	AMG 510	$8.5E-01 \pm 7.8E-02$	$8.6E-05 \pm 1.4E-05$	$9.8E+03 \pm 1.8E+03$
	ARS-1620	$7.3E-01 \pm 2.6E-03$	$3.1E-05 \pm 3.1E-06$	$2.4E+03$
MAPKCa-2	AMG 510	$7.3E-04 \pm 3.6E-05$	$1.5E-07 \pm 6.2E-09$	$3.8E+03 \pm 7.1E+01$
	ARS-1620	$3.1E-04 \pm 2.1E-05$	$2.4E-06 \pm 6.6E-07$	$1.3E+02 \pm 2.7E+01$
NCH368	AMG 510	$8.9E-04 \pm 7.4E-05$	$1.3E-07 \pm 1.5E-08$	$7.1E+03 \pm 1.4E+03$
	ARS-1620	$4.6E-04 \pm 3.7E-05$	$1.1E-06 \pm 4.9E-07$	$4.8E+02 \pm 2.7E+02$

Fig. 46B

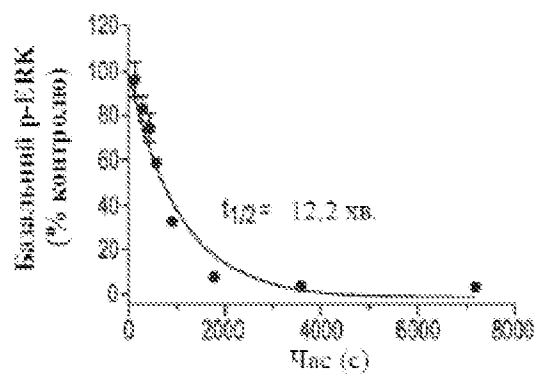


Fig. 46C

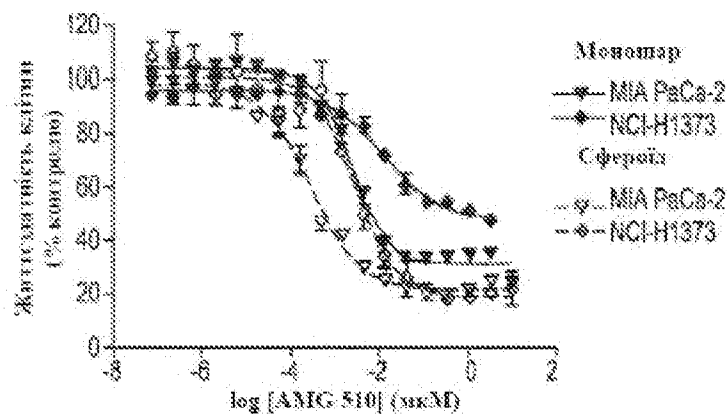
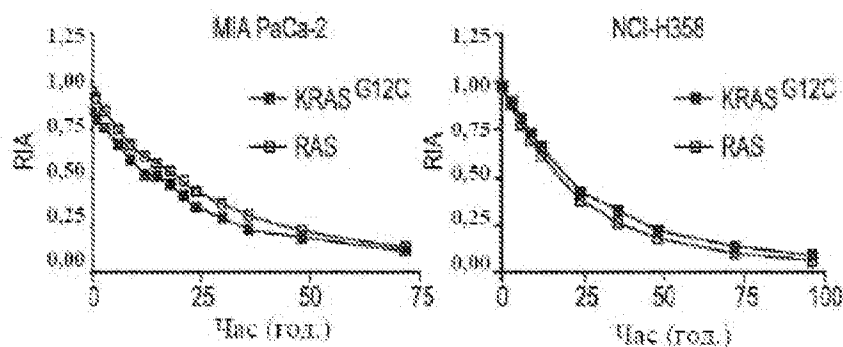


Fig. 46D



Клітина	Тривалість аналізу (год.)	Час подвоєння клітин (год.)	Без поправки кд		З поправкою кд		
			k_{dec} (год. ⁻¹)	Період напівжиття λ KRAS ^{G12C} (год.)	k_{dl} (год. ⁻¹)	k_{dec} (год. ⁻¹)	Період напівжиття λ KRAS ^{G12C} (год.)
MIA PaCa-2	72	24	0,042	17	0,096	0,035	20
NCI-H358	96	36	0,037	19	0,010	0,029	24

Fig. 46E

CT-28 KRAS p. G12C

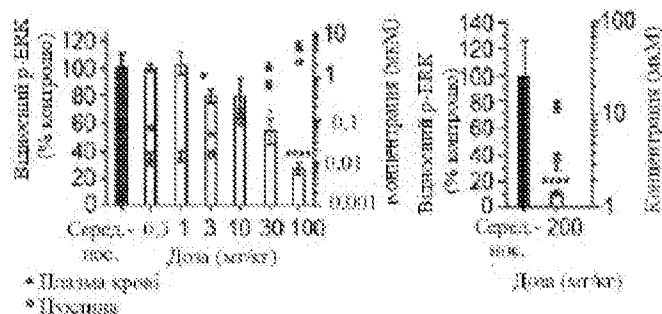
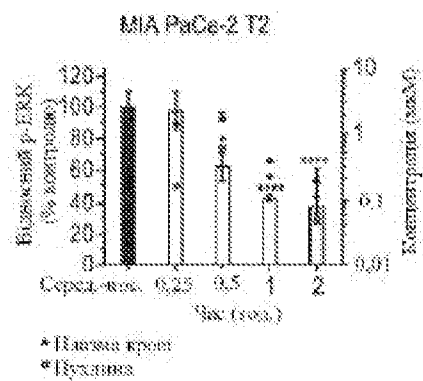
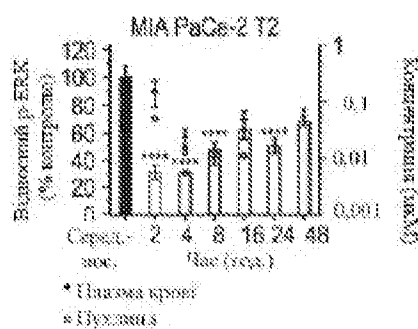


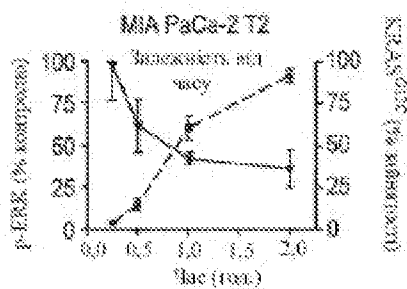
Fig. 47A



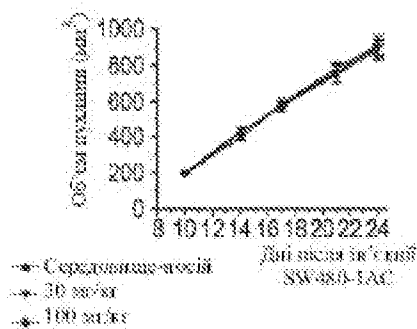
Фиг. 47В



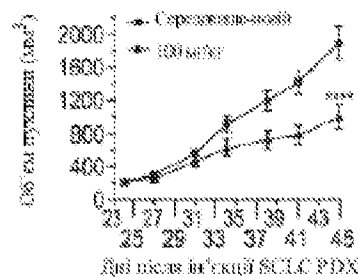
Фиг. 47С



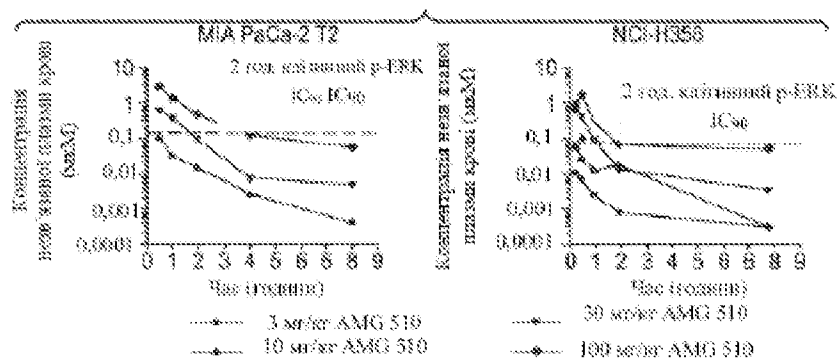
Фиг. 47D



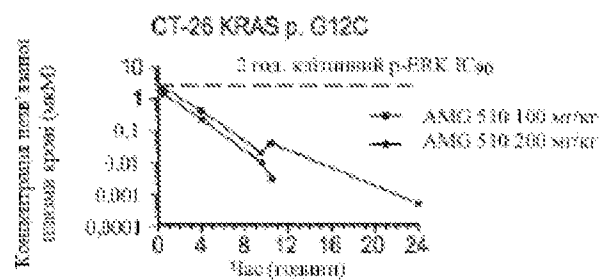
Фиг. 47Е



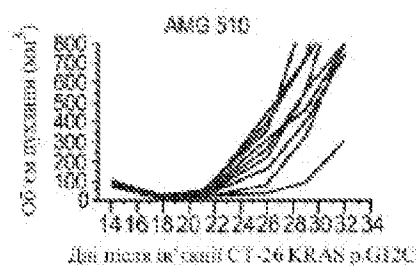
Фиг. 47F



Фиг. 47G

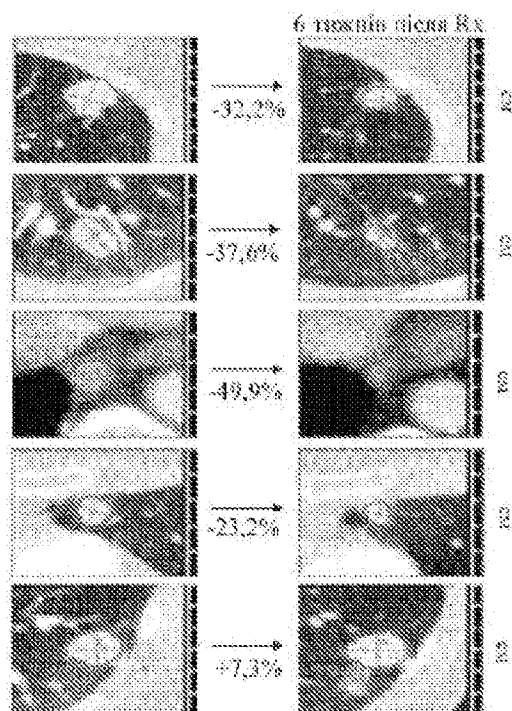


Фиг. 47H

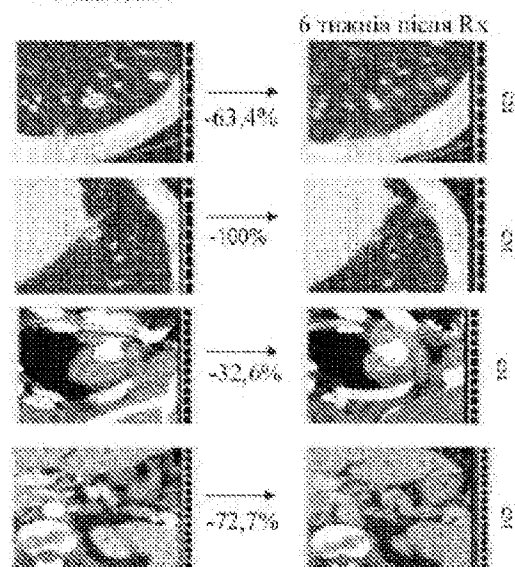


Фиг. 47I

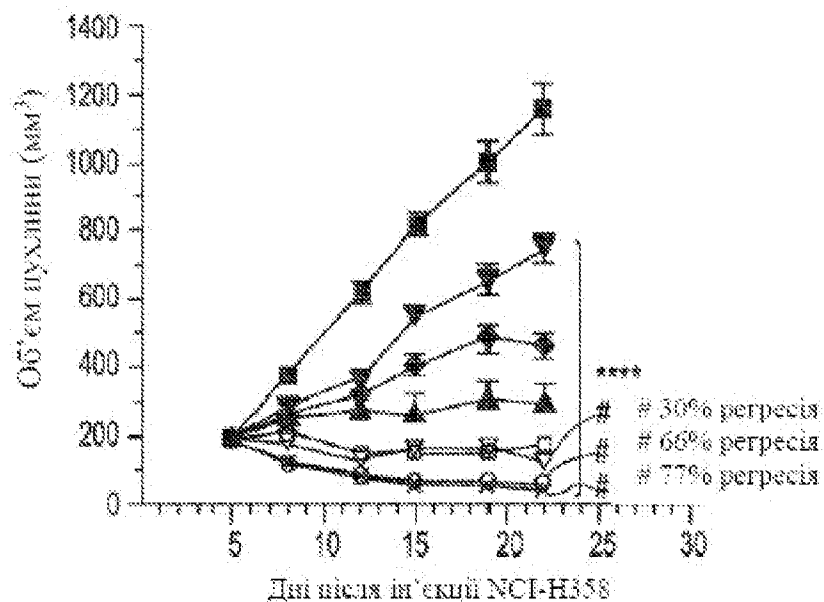
Вихідні дані



Вихідні дані

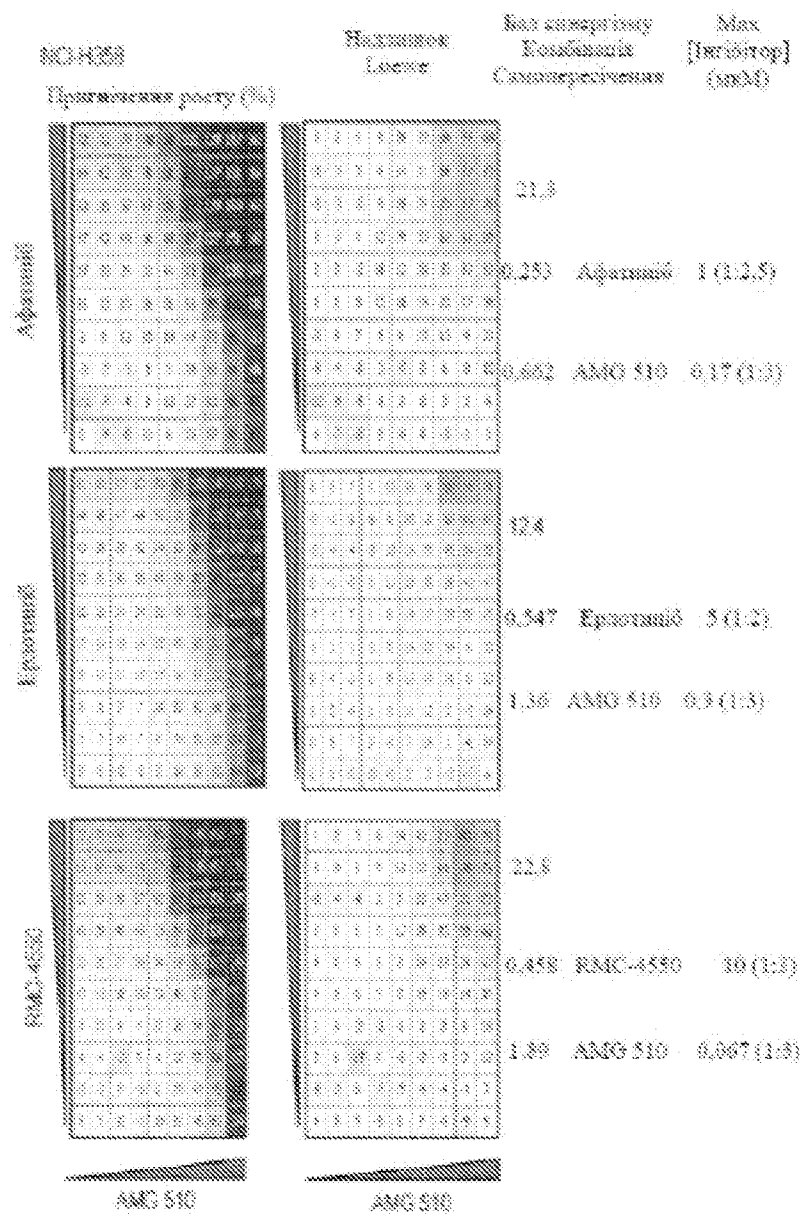


Фіг. 47J

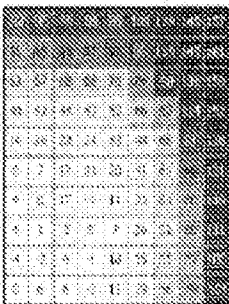
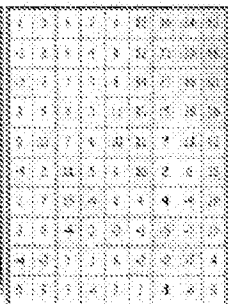
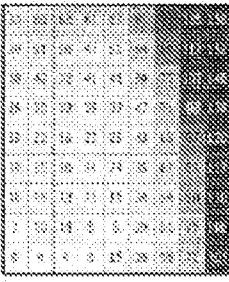
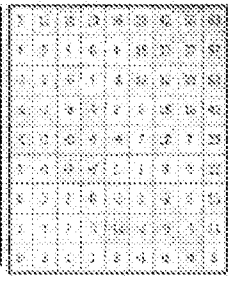
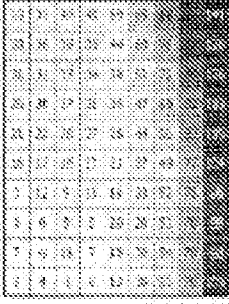
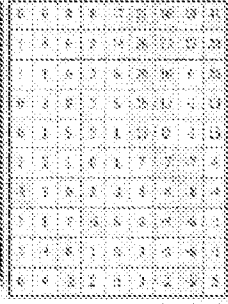


- Середовище-носій
- ▲ 10 мг/кг AMG 510
- ▼ 30 мг/кг AMG 510
- ◆ 50 мг/кг карбоплатину
- ◆ 100 мг/кг карбоплатину
- 10 мг/кг AMG 510 + 100 мг/кг карбоплатину
- × 30 мг/кг AMG 510 + 100 мг/кг карбоплатину
- 30 мг/кг AMG 510 + 50 мг/кг карбоплатину

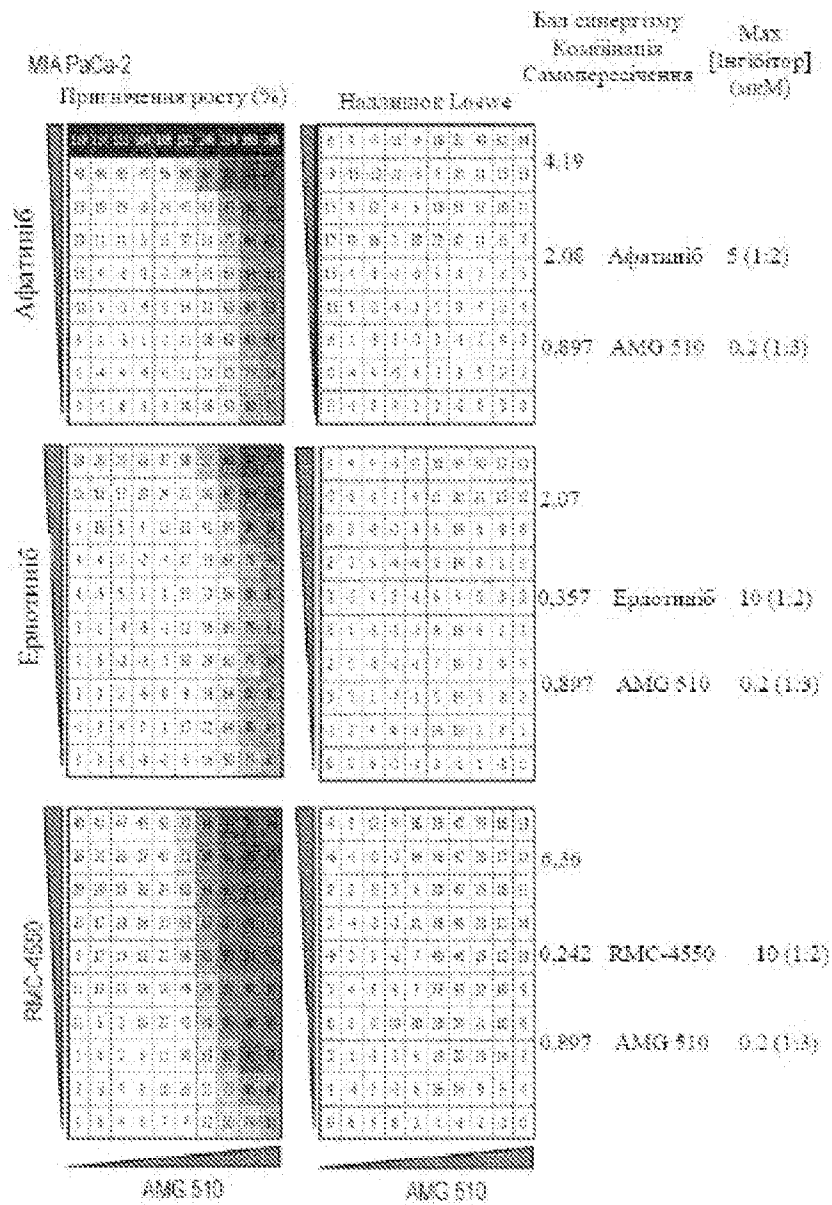
Fig. 47K



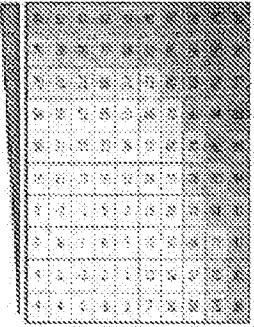
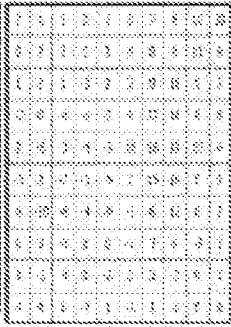
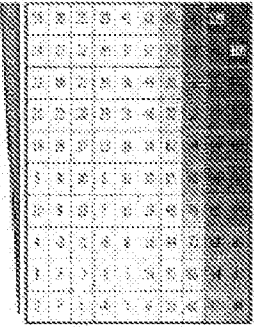
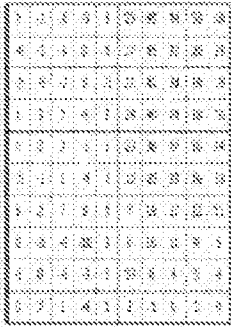
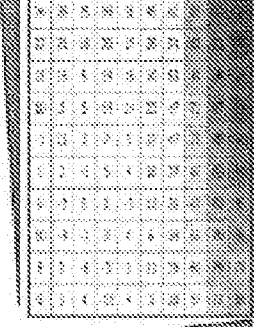
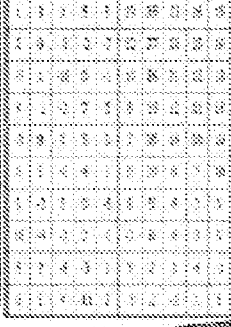
Фіг. 48А

NC44358		Баз. ефективність Комбінації Симплексів	Мак. [інгібітор] (μM)
Пригнічення росту (%)		Назвамись Log ₁₀	
Триметиніб			14,7
			1,21 Триметиніб 0,3 (1:3)
			1,63 AMG 510 0,1 (1:3)
AMG 511			7,41
			0,526 AMG 511 5 (1:2)
			1,69 AMG 510 0,067 (1:3)
AZD5363			3,16
			0,069 AZD5363 10 (1:2)
			1,63 AMG 510 0,1 (1:3)
AMG 510		AMG 510	

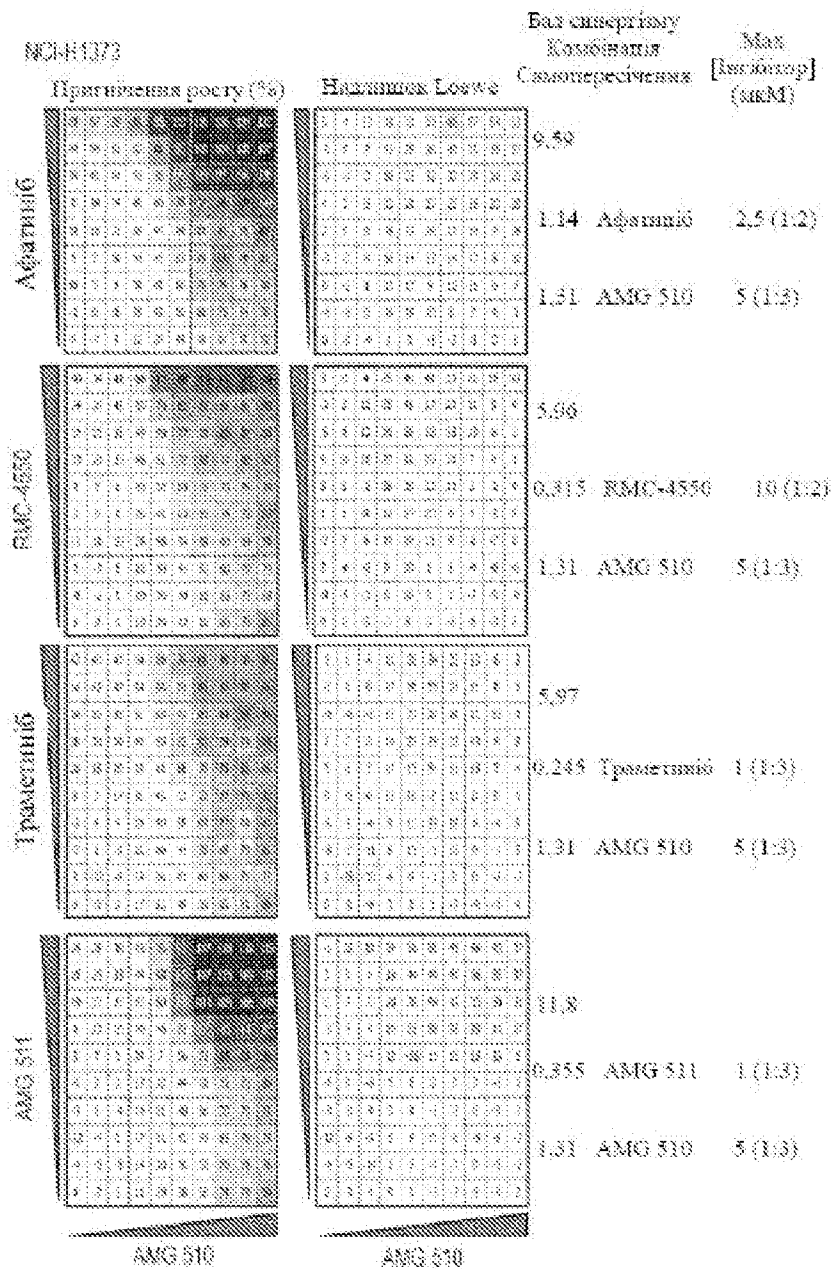
Фиг. 48В



Фіг. 48С

МА РаСа-2		Базисна матриця Комбінація Самодіагностика		Max [Інгібітор] (секМ)
Прогнозування росту (%)		Нахилений Лоува		
Траметинід			3,06	
			ND	Траметинід 0,2 (1:3)
			0,897	AMG 510 0,2 (1:3)
AMG 511			3,53	
			0,193	AMG 511 1 (1:2)
			0,897	AMG 510 0,2 (1:3)
AZD5363			2,67	
			0,128	AZD5363 10 (1:2)
			0,897	AMG 510 0,2 (1:3)

Фиг. 48D



Фір. 48Е

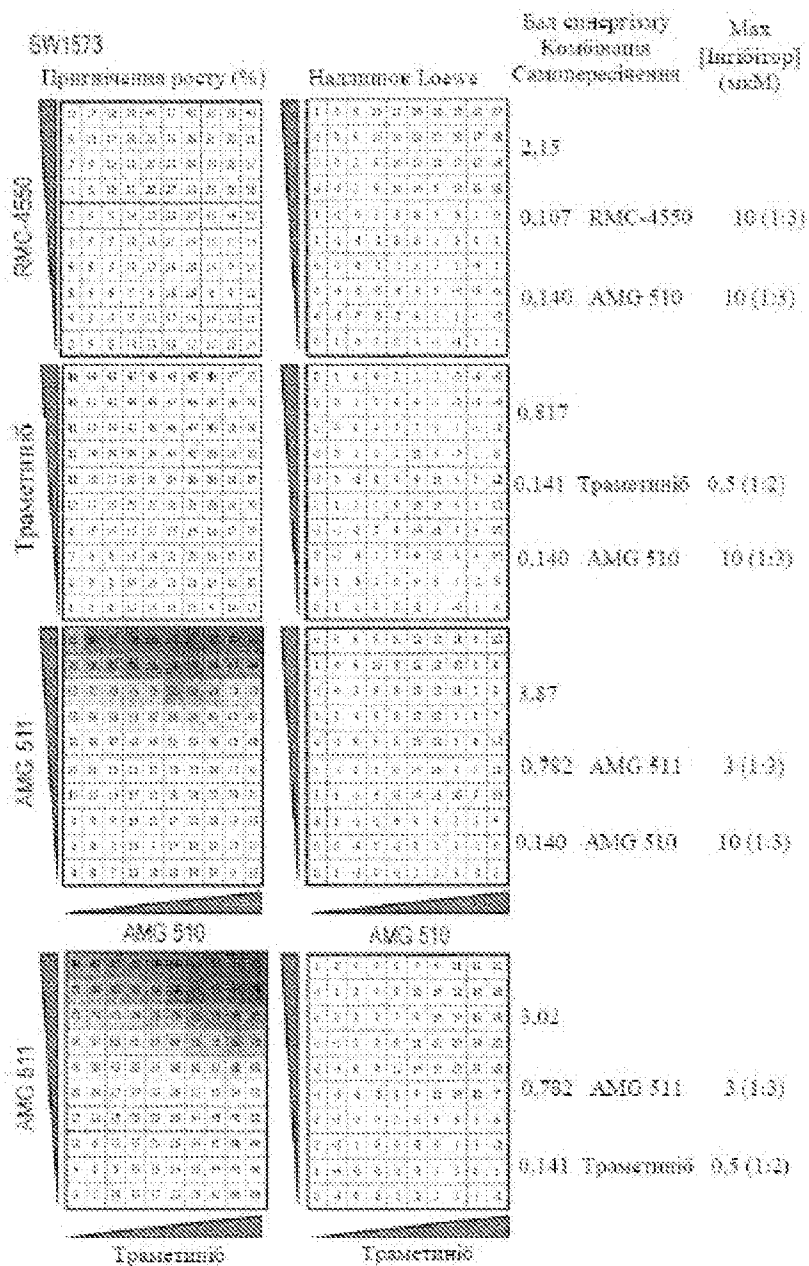
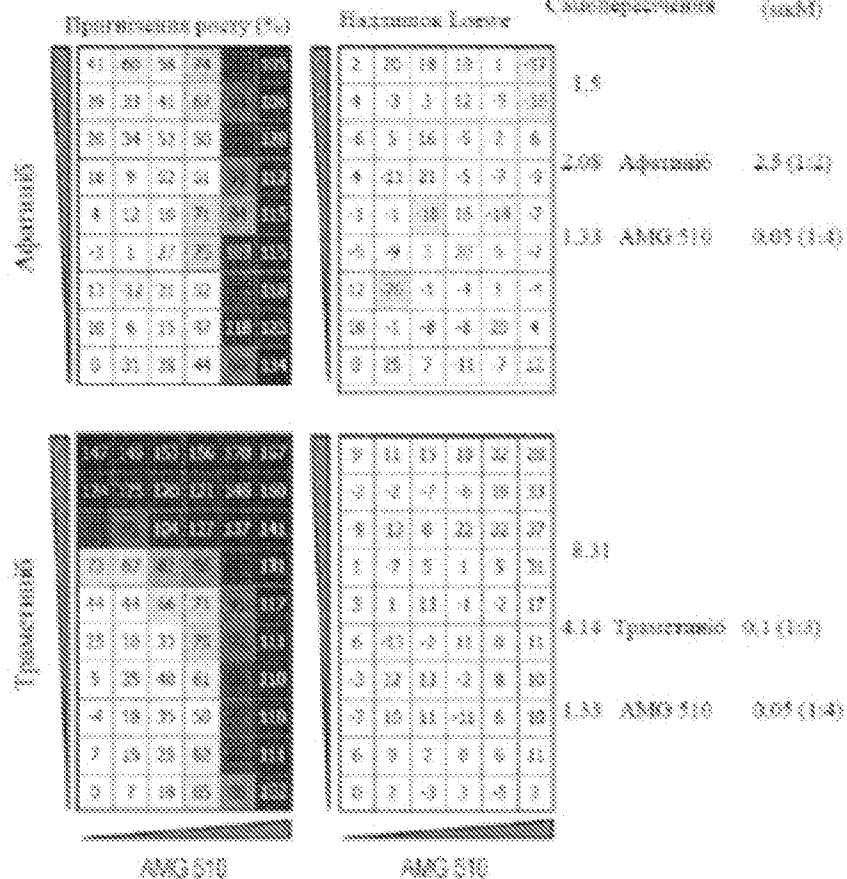


Fig. 48F

Сфера MIA PbCa-2

Бал. співвідношення
Коефіцієнт
Самоперіщення

Max
[Інтенсив]
(uM)



Фиг. 48G

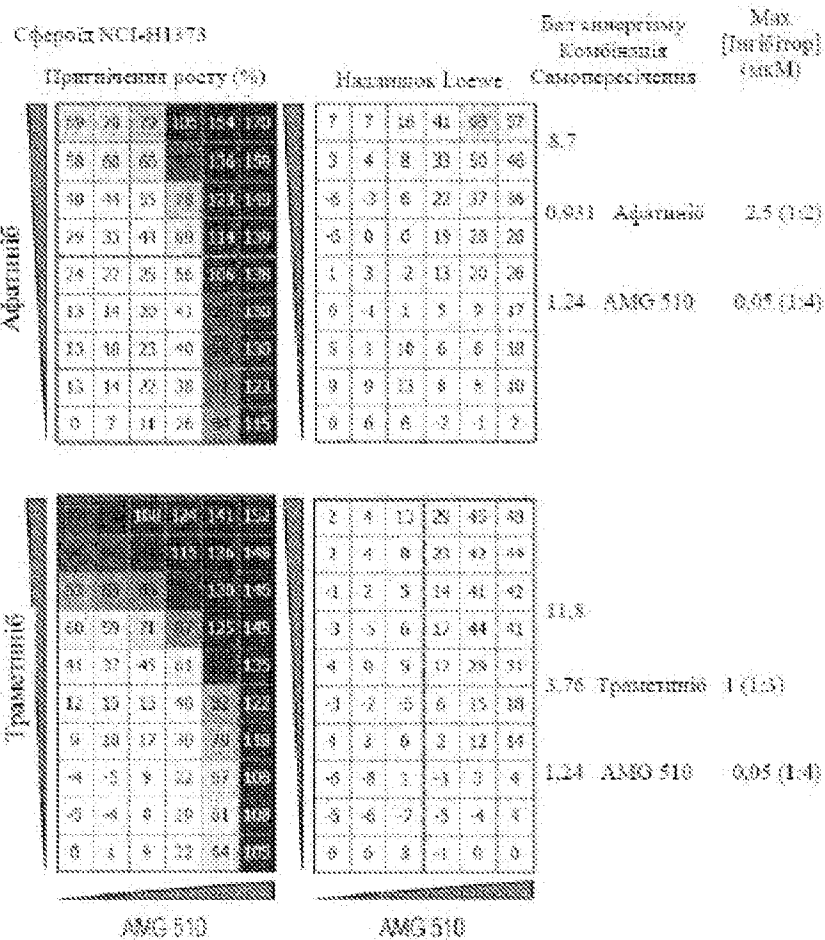


Fig. 48H

Сфера CT26 KRAS p. G12C		Вих сирегізму Колоніальна Самопересівання		Max [Інгібітор] (μM)
Пригнічення росту (%)		Низининок Loswe		
Афатиніб	61 31 25 100 100 100	8 10 28 35 100 100	10,8	
	53 33 23 100 100 100	4 1 21 48 82 92		
	28 31 18 100 100 100	11 6 14 38 100 100		
	13 24 22 80 110 110	1 7 7 18 20 15		
	14 15 20 80 110 110	0 2 3 14 11 2		
	18 18 20 80 110 110	8 7 7 7 7 3		
	5 17 22 80 110 110	8 18 8 8 7 2		
	5 11 22 80 110 110	0 7 13 3 5 8		
	0 6 20 80 110 110	0 6 7 1 3 8		
	0 1 7 20 110 110	0 6 8 0 0 0		
RMC-4550	13 26 40 100 100 100	1 7 29 52 77 88	11,7	
	18 24 41 100 100 100	0 6 28 48 67 74		
	17 27 37 100 100 100	0 5 17 17 82 100		
	16 21 32 80 100 100	1 4 10 24 48 54		
	13 18 24 80 110 110	1 1 2 21 25 31		
	11 11 23 80 100 100	1 2 6 18 22 22		
	5 6 12 40 110 110	0 4 3 8 10 10		
	4 11 20 40 110 110	1 1 6 5 11 10		
	0 11 22 80 110 110	0 1 10 3 5 9		
	0 2 24 24 110 110	0 1 1 1 8 9		
Траметиніб	10 10 14 100 100 100	0 4 1 3 6 10	2,63	
	10 10 10 100 100 100	1 0 13 2 10 10		
	10 10 10 100 100 100	1 0 14 0 9 13		
	10 10 10 100 100 100	0 10 8 7 6 14		
	10 10 10 100 100 100	0 8 2 1 12 6		
	11 10 20 41 70 11	0 7 5 3 10 1		
	10 14 16 35 70 100	0 8 3 8 10 6		
	0 6 12 40 70 100	0 6 3 8 13 4		
	0 6 13 30 70 100	0 1 9 10 7 10		
	0 6 7 20 70 100	0 2 4 5 10 0		
AMG 510	11 10 10 100 100 100	1 0 11 10 10 10	10,8	
	10 10 10 100 100 100	0 10 11 10 10 10		
	10 10 10 100 100 100	0 9 8 11 10 10		
	10 10 10 100 100 100	1 2 7 12 10 10		
	10 10 10 100 100 100	0 1 2 10 10 10		
	10 10 10 100 100 100	0 9 8 8 10 9		
	10 10 10 100 100 100	0 9 8 8 10 9		
	11 10 10 100 100 100	0 10 8 4 9 7		
	0 10 10 100 100 100	0 10 8 4 9 7		
	0 4 10 10 100 100	0 2 4 10 1 1		

Фір. 481

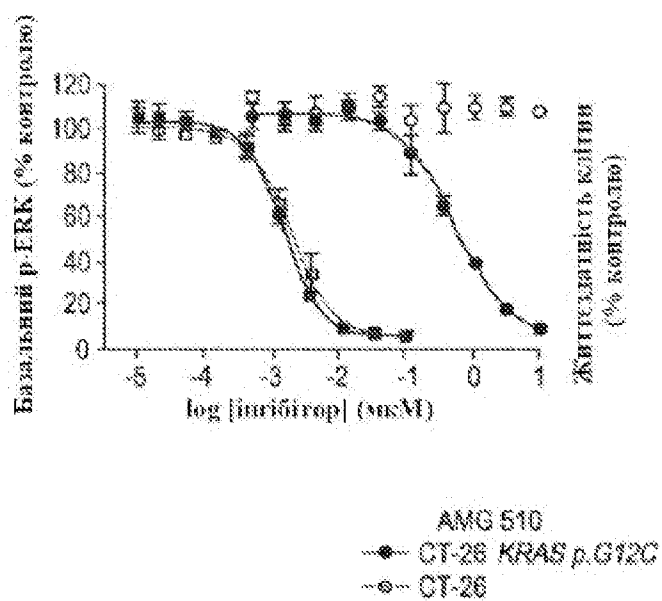


Fig. 49A

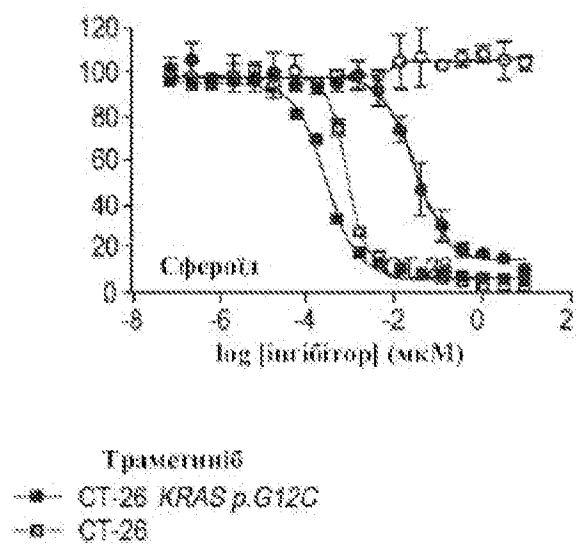
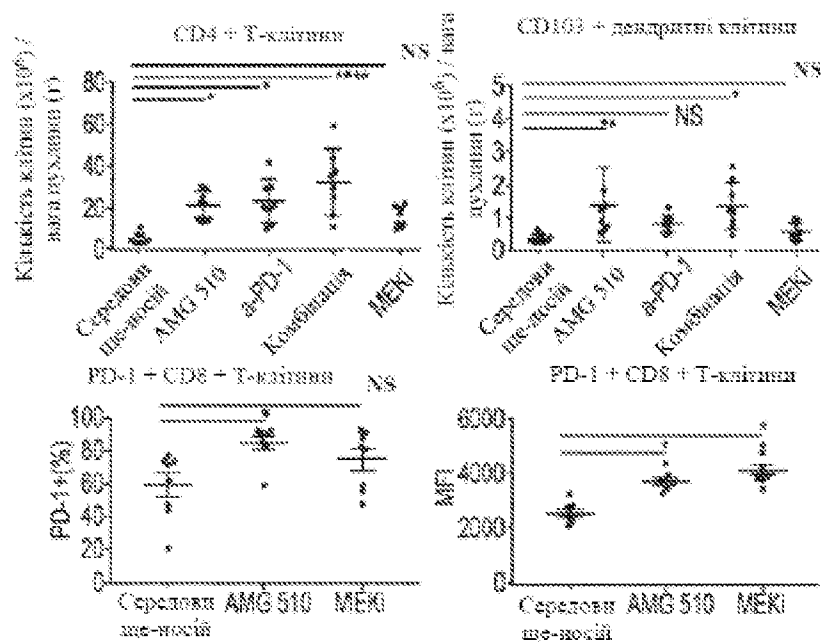
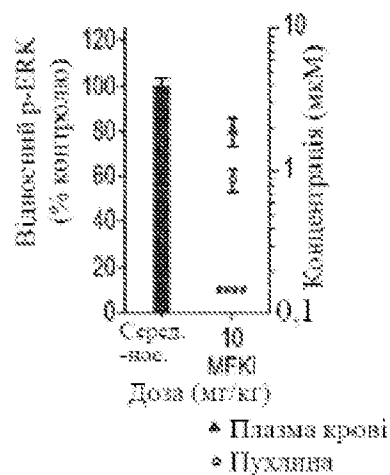


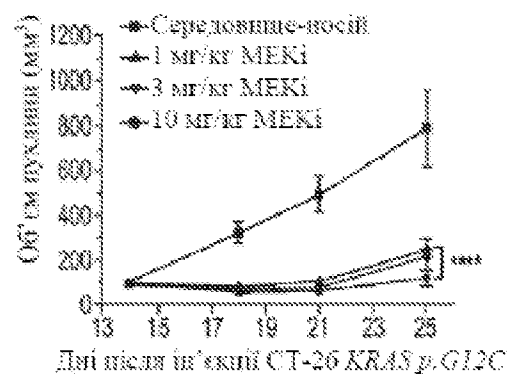
Fig. 49B



Фіг. 50А



Фіг. 50В



Фіг. 50С

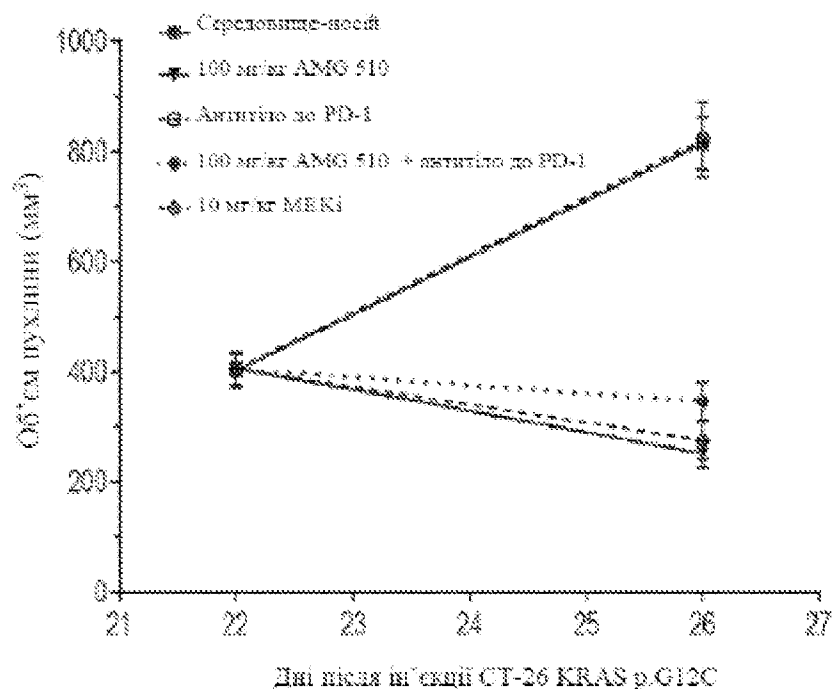


Fig. 50D

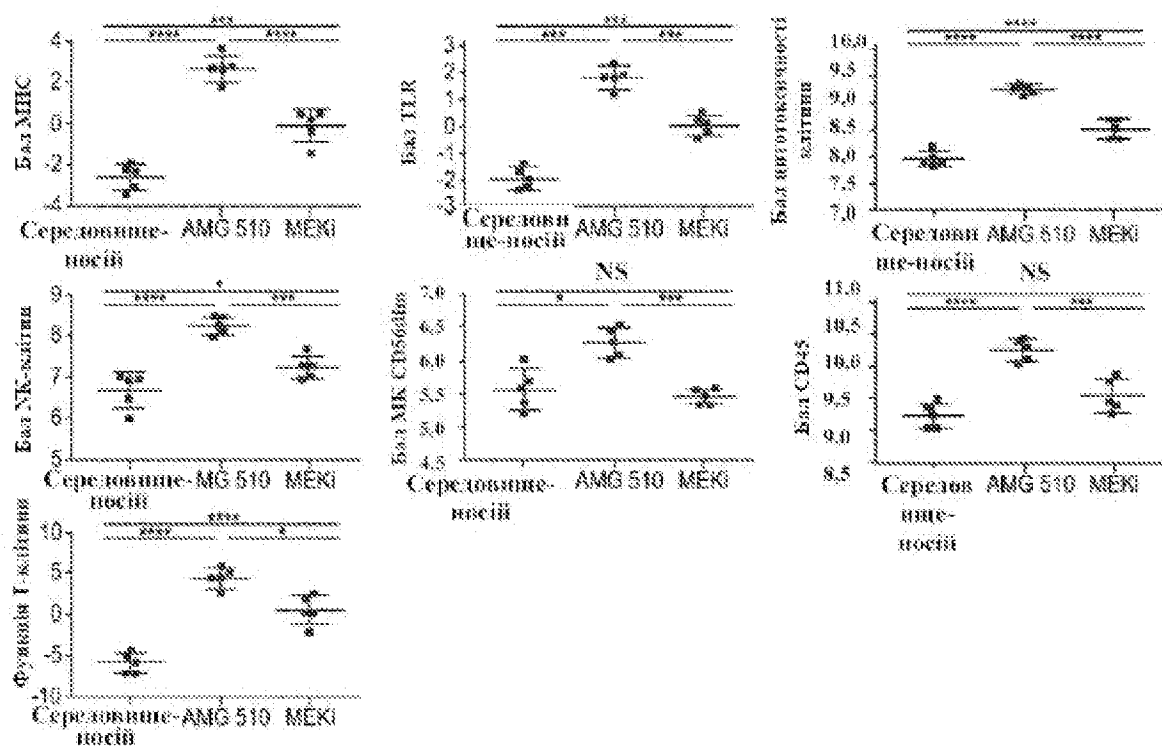
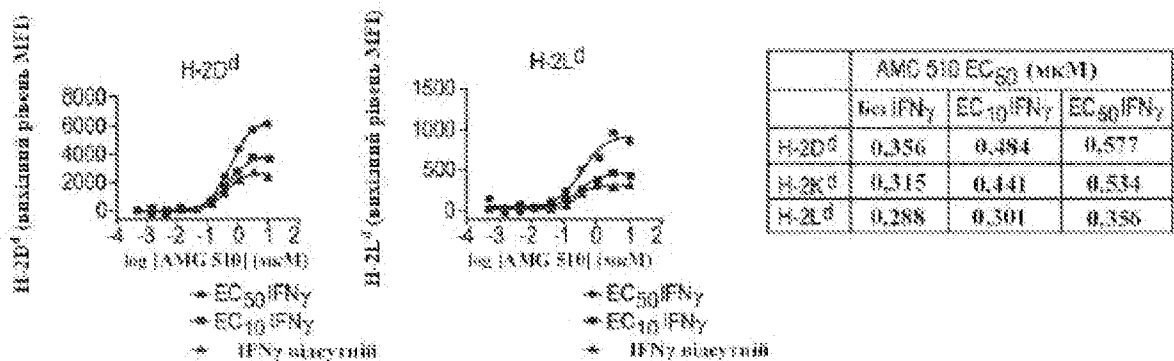
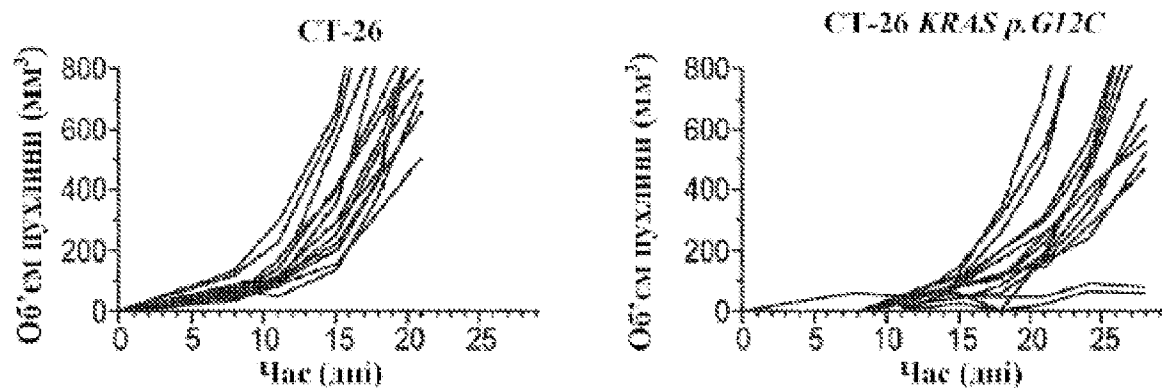


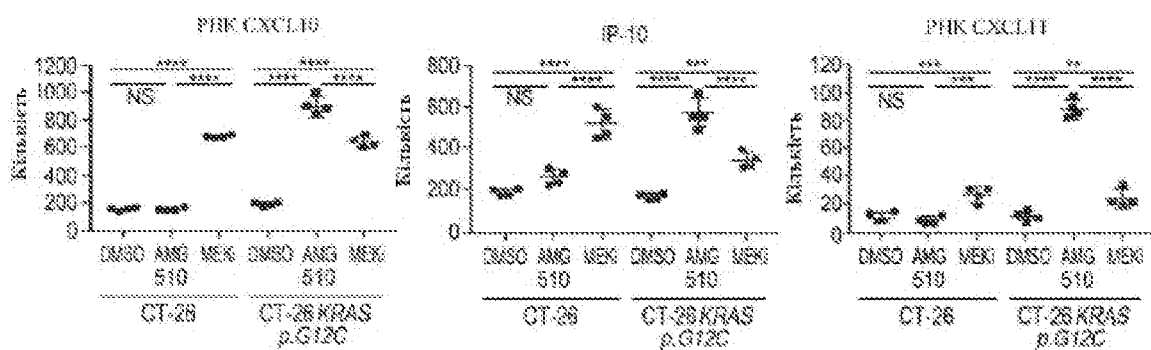
Fig. 50E



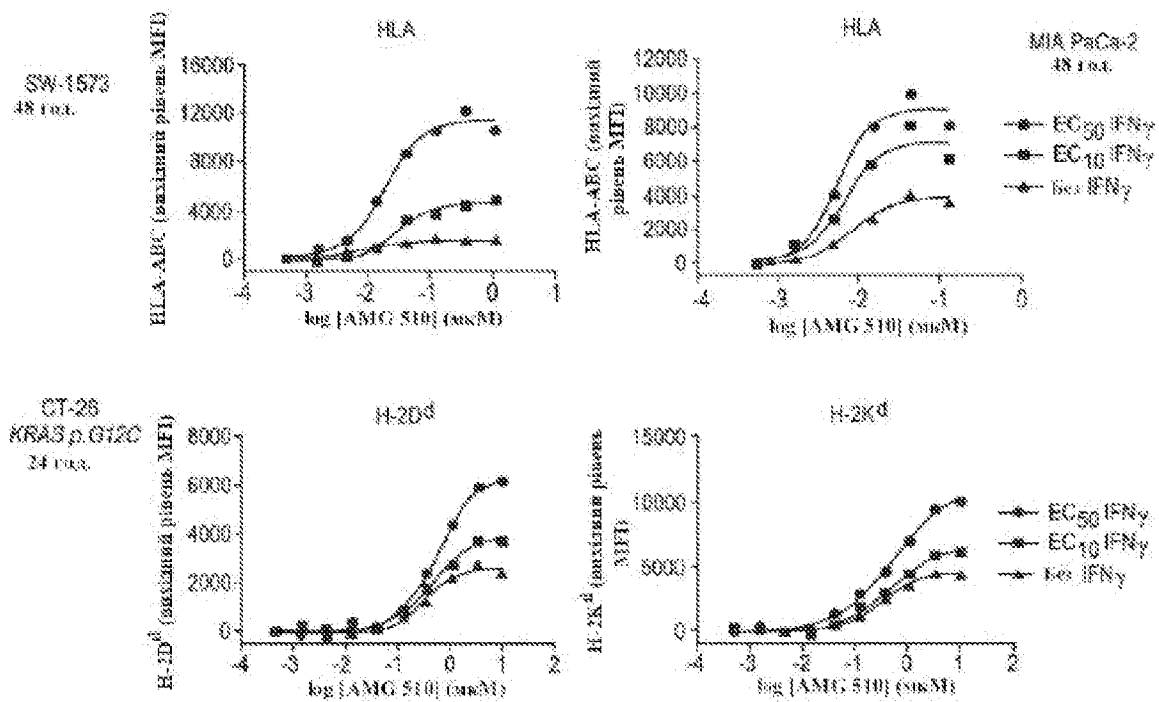
Фиг. 50F



Фиг. 50G



Фиг. 50H



Фиг. 50f

The present invention provides combination therapy that includes an KRAS^{G12C} inhibitor, such as (see Formula), or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and one or more additional pharmaceutically active agents, particularly for the treatment of cancers. The invention also relates to pharmaceutical compositions that contain an KRAS^{G12C} inhibitor and one or more additional pharmaceutically active agents for the treatment of cancers.

1. Спосіб лікування раку, опосередкованого мутацією KRAS^{G12C}, у пацієнта, причому спосіб включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості (1M)-6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(4-метил-2-(2-пропаніл)-3-піридиніл)-4-((2S)-2-метил-4-(2-пропеноїл)-1-піперазиніл)піридо[2,3-d]піримідин-2(1H)-ону і терапевтично ефективної кількості карбоплатину, де рак являє собою недрібноклітинний рак легені, рак тонкого кишечника, рак апендикса, колоректальний рак, рак ендометрія, рак підшлункової залози, рак шкіри, рак шлунка, рак носової порожнини або рак жовчних проток.
2. Спосіб за п. 1, де рак являє собою рак підшлункової залози.
3. Спосіб за п. 1, де рак являє собою колоректальний рак.
4. Спосіб за п. 1, де рак являє собою недрібноклітинний рак легені.
5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, де пацієнтом є доросла людина.
6. Спосіб за будь-яким із пп. 1-5, де сполуку і карбоплатин вводять одночасно або роздільно.
7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, де сполуку вводять у вигляді вільної основи.

Винахід стосується способу лікування раку, опосередкованого мутацією KRAS^{G12C}, у пацієнта, причому спосіб включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості (1M)-6-фтор-7-(2-фтор-6-гідроксифеніл)-1-(4-метил-2-(2-пропаніл)-3-піридиніл)-4-((2S)-2-метил-4-(2-пропеноїл)-1-піперазиніл)піридо[2,3-d]піримідин-2(1H)-ону і терапевтично ефективної кількості карбоплатину, де рак являє собою недрібноклітинний рак легені, рак тонкого кишечника, рак апендикса, колоректальний рак, рак ендометрія, рак підшлункової залози, рак шкіри, рак шлунка, рак носової порожнини або рак жовчних проток.