



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.18

(21) Номер заявки
202091375

(22) Дата подачи заявки
2018.12.19

(51) Int. Cl. *A61K 47/62* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

(54) **БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К EphA2**

(31) 1721259.8; 1804102.0; 1818603.1
(32) 2017.12.19; 2018.03.14; 2018.11.14

(33) GB

(43) 2021.07.06

(86) PCT/GB2018/053675

(87) WO 2019/122860 2019.06.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Чэнь Люхун, Хаксли Филип, Паван
Сильвия, Ван Ритсотен Катерине (GB)

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

(56) YAN SHI ET AL.: "One-Bead-Two-Compound Thioether Bridged Macrocyclic [gamma]-AApeptide Screening Library against EphA2", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 60, no. 22, 14 November 2017 (2017-11-14), pages 9290-9298, XP055564691, US ISSN: 0022-2623, DOI:10.1021/acs.jmedchem.7b01280 abstract

BAINAN WU ET AL.: "Design and Characterization of Novel EphA2 Agonists for Targeted Delivery of Chemotherapy to Cancer Cells", CHEMISTRY AND BIOLOGY, vol. 22, no. 7, 1 July 2015 (2015-07-01), pages 876-887,

XP055564697, GB ISSN: 1074-5521, DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.06.011 abstract

SHIYU CHEN ET AL.: "Peptide Ligands Stabilized by Small Molecules", ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 53, no. 6, 3 February 2014 (2014-02-03), pages 1602-1606, XP055356354, DE ISSN: 1433-7851, DOI: 10.1002/anie.201309459

HEINIS CHRISTIAN ET AL.: "Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, BASINGSTOKE, vol. 5, no. 7, 31 May 2009 (2009-05-31), pages 502-507, XP002588858, ISSN: 1552-4450, DOI: 10.1038/NCHEMBIO.184 abstract

Gavin Bennett: "Abstract 5855: Bicycle Drug Conjugates targeting EphA2 for the treatment of solid tumors: Discovery and selection of BT5528 | Cancer Research", 14 April 2018 (2018-04-14), XP055564144, Retrieved from the Internet: URL:<http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/13/Supplement/5855> [retrieved on 2019-03-04], the whole document

WO-A1-2017191460

SAYANTAN MITRA ET AL.: "Structure-Activity Relationship Analysis of Peptides Targeting the EphA2 Receptor", BIOCHEMISTRY, vol. 49, no. 31, 10 August 2010 (2010-08-10), pages 6687-6695, XP055564687, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi1006223

(57) Настоящее изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связываются с неароматическими молекулярными каркасами таким образом, что между точками присоединения к каркасу размещаются две или более пептидных петель. В частности, в изобретении описываются пептиды, которые проявляют высокую аффинность связывания с Eph-рецептор A2 тирозинкиназы (EphA2). Изобретение также включает конъюгаты лекарственных средств, содержащие указанные пептиды, конъюгированные с одной или более эффекторными и/или функциональными группами, фармацевтические композиции, содержащие указанные пептидные лиганды и конъюгаты лекарственных средств, и применение указанных пептидных лигандов и конъюгатов лекарственных средств с целью предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль).

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связываются с неароматическими молекулярными каркасами таким образом, что между точками присоединения к каркасу размещаются две или более пептидных петель. В частности, в изобретении описываются пептиды, которые с высокой аффинностью связывают Eph-рецептор A2 тирозинкиназы (EphA2). Изобретение также относится к конъюгатам лекарственных средств, включающим указанные пептиды, конъюгированные с одной или более эффекторными и/или функциональными группами, к фармацевтическим композициям, включающим указанные пептидные лиганды и конъюгаты лекарственных средств, и к применению указанных пептидных лигандов и конъюгатов лекарственных средств для предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль).

Уровень техники

Циклические пептиды способны связываться с высоким средством и специфичностью с белками-мишенями и, поэтому, являются перспективным классом молекул для создания терапевтических средств. И в действительности, несколько циклических пептидов уже успешно применяются в клинике, такие как, например, антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противораковое средство октреотид (Driggers et al. (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Высокие характеристики связывания обусловлены относительно большой поверхностью взаимодействия, образованной между пептидом и мишенью, а также пониженной конформационной гибкости циклических структур. Как правило, макроциклы связываются с поверхностями в несколько сотен квадратных ангстрем, например, в случае циклического пептида CXCR4 антагониста CVX15 площадь связывания составляет 400 \AA^2 (Wu et al. (2007), *Science* 330, 1066-71), в случае циклического пептида с мотивом Arg-Gly-Asp связывания с интегрином $\alpha V\beta 3$ -355 \AA^2 (Xiong et al. (2002), *Science* 296 (5565), 151-5) или в случае циклического пептидного ингибитора связывания упаин-1 с активатор плазминогена урокиназного типа - 603 \AA^2 (Zhao et al. (2007), *J Struct Biol* 160 (1), 1-10).

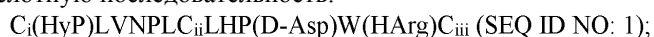
Вследствие циклической конфигурации, пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшим потерям энтропии после связывания с мишенями и обуславливает более высокую аффинность связывания. Пониженная гибкость также приводит к фиксации специфичных к мишени конформаций, что повышает специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект был проиллюстрирован на примере высокоактивного и селективного ингибитора матричной металлопротеиназы 8 (ММР-8), который терял свою селективность в отношении других матричных металлопротеиназ (ММР) в случае раскрытия его кольца (Cherney et al. (1998), *J Med Chem* 41 (11), 1749-51). Благоприятные характеристики связывания, которые достигаются в результате макроциклизации, проявляются в еще большей степени у полициклических пептидов, имеющих более чем одно пептидное кольцо, например, у ванкомицина, низина и актиномицина.

Ранее, различные группы исследователей осуществляли связывание полипептидов, содержащих остаток цистеина, с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem*; Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Meloen с коллегами использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной мимикрии поверхностей белков (Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Методы синтеза представляющих интерес лекарственных соединений, в которых указанные соединения синтезируют путем связывания содержащих цистеин полипептидов с молекулярным каркасом, таким как, например, ТАТА (1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он, описаны в публикации Heinis et al. *Angew Chem, Int Ed.* 2014; 53:1602-1606).

Для генерирования и изображения больших библиотек бициклических пептидов для представляющих интерес мишеней были разработаны основанные на комбинаторных подходах метод фагового дисплея (Heinis et al. (2009), *Nat Chem Biol* 5 (7), 502-7 и WO 2009/098450). Вкратце, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и две области шести рандомизированных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys) отображали на фаге и циклизировали путем ковалентного связывания боковых цепей цистеина с каркасом малой молекулы.

Сущность изобретения

В соответствии с первым аспектом изобретения, предлагается пептидный лиганд, обладающий специфичностью к EphA2, включающий полипептид, содержащий, по меньшей мере, три остатка цистеина, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида, в результате чего образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли на молекулярном каркасе, где пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность:



где HyP представляет собой гидроксипролин, HArg представляет собой гомоаргинин и C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается конъюгат лекарственного средства, включающий определенный выше пептидный лиганд, конъюгированный с одной или более эффективными и/или функциональными группами.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая определенные выше пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается определенные выше пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства для применения для предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль).

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Общая схема, демонстрирующая концепцию приготовления бициклических конъюгатов лекарственных средств (BDC).

Фиг. 2. Графическая зависимость средней величины объема опухоли от времени после начала дозирования BCY6136 мышам с ксенотрансплантатом клеток линии HT1080. Дозы (2, 3 и 5 мг/кг) вводили в дни 0 и 7.

Фиг. 3. Графическая зависимость средней величины объема опухоли от времени после начала дозирования BCY6136 мышам с ксенотрансплантатом клеток линии NCI-H1975. Дозы (1, 2 и 3 мг/кг) вводили в дни 0, 7, 14, 21, 28 и 35.

Фиг. 4. Графическая зависимость средней величины объема опухоли от времени после начала дозирования BCY6136 мышам с ксенотрансплантатом клеток линии MDA-MB-231. Дозы (1, 2 и 3 мг/кг) вводили в дни 0, 7, 14, 21, 28, 35 и 45.

Фиг. 5 и 6. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 (фиг. 5) и ADC (фиг. 6) самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат PC-3.

Фиг. 7. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136, EphA2-ADC или доцетаксела самцам Balb/c бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат PC-3.

Фиг. 8. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат NCI-H1975. Экспериментальные точки представляют среднюю величину объема опухоли в группе.

Фиг. 9 и 10. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 и ADC самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0251. Экспериментальные точки представляют среднюю величину объема опухоли в группе.

Фиг. 11. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0046. Экспериментальные точки представляют среднюю величину объема опухоли в группе.

Фиг. 12. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 или ADC самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0046 в модели NSCLC PDX. Экспериментальные точки представляют среднюю величину объема опухоли в группе.

Фиг. 13-15. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 (фиг. 13), BCY6173 (фиг. 14) и BCY6175 (фиг. 15) самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих LU-01-0046.

Фиг. 16. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 (обозначенного на фиг. 16 как BT5528), BCY8245 или BCY8781 самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0412. Экспериментальные точки представляют среднюю величину объема опухоли в группе.

Фиг. 17. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0486.

Фиг. 18. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат MDA-MB-231-luc. Экспериментальные точки представляют среднюю величину объема опухоли в группе.

Фиг. 19. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих сингенные клетки EMT-6. Дозу в группе 3 и группе 4 изменяли до 5 мг/кг и 3 мг/кг от дня 14.

Фиг. 20. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат NCI-N87.

Фиг. 21. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат SK-OV-3.

Фиг. 22. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат OE21.

Фиг. 23. Объем остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам мышей линии CB17-SCID, несущих ксенотрансплантат MOLP-8.

Фиг. 24-29. Объем остаточной опухоли после введения BCY6173 (фиг. 24), BCY6135 (фиг. 25), BCY6136 (фиг. 26), BCY6174 (фиг. 27), BCY6175 (фиг. 28) и ADC (фиг. 29) самкам бестимусных мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантат HT1080.

В тех случаях, когда на описанных выше фигурах приведены отрезки погрешностей, они представ-

ляют стандартную ошибку среднего значения (SEM).

Подробное описание изобретения

В одном варианте осуществления, пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность:



(BCY6099);

где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин и HyP представляет собой гидроксипролин.

В одном варианте осуществления, молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)-трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

В еще одном варианте осуществления, молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)-трипроп-2-ен-1-он (ТАТА), и пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность:



(BCY6099); и

где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин и HyP представляет собой гидроксипролин.

Если не указано иное, то все используемые в изобретении технические и научные термины имеют значение, которое является общепринятым для обычных специалистов в таких областях, как химия пептидов, культивирование клеток и фаговый дисплей, химия нуклеиновых кислот и биохимия. Стандартные методики, используемые в методах молекулярной биологии, в генетических и биохимических методах, описаны в руководствах Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., полное содержание которых включено в настоящее изобретение путем ссылок на них.

Номенклатура.

Нумерация.

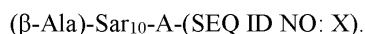
При указании положений аминокислотного остатка в пептидах по изобретению, остатки цистеина (C_i, C_{ii} и C_{iii}) пропускают при нумерации, так как они являются инвариантными, и поэтому, нумерацию аминокислотных остатков в пептидах по изобретению указывают, как показано ниже:



Применительно к целям этого изобретения, предполагается, что все бициклические пептиды циклизируют с 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-оном (ТАТА) с получением структуры тризамещенного 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипропан-1-она. Циклизация с ТАТА происходит на C_i, C_{ii}, и C_{iii}.

Молекулярный формат.

N- или C-концевые удлинения к бициклической сердцевинной последовательности добавляют к левой и правой стороне последовательности через дефис. Например, N-концевой (β-Ala)-Sar₁₀-Ala хвост может обозначаться как:



Инверсионные пептидные последовательности.

В свете публикации Nair et al (2003) *J Immunol* 170(3), 1362-1373, предполагается, что раскрытые в изобретении пептидные последовательности могут также находить применение в их ретро-инверсной форме. Например, последовательность подвергают инверсии (то есть N-конец становится C-концом и наоборот), и их стереохимия аналогично также подвергается инверсии (то есть D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот).

Пептидные лиганды.

Указанный в изобретении пептидный лиганд относится к пептиду, пептидному фрагменту или пептидомиметику, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Обычно, такие пептиды, пептидные фрагменты или пептидомиметики включают пептид, имеющий природные или искусственные аминокислоты, в которых две или более реакционноспособных групп (то есть остатки цистеина) способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, расположенную между указанными реакционноспособными группами, которую называют петлевой последовательностью, так как она образует петлю, когда пептид, пептидный фрагмент или пептидомиметик связывается с каркасом. В данном случае, пептиды, пептидные фрагменты или пептидомиметики включают, по меньшей мере, три остатка цистеина (обозначаемых в изобретении как C_i, C_{ii} и C_{iii}) и образуют, по меньшей мере, две петли на каркасе.

Преимущества пептидных лигандов.

Конкретные бициклические пептиды по настоящему изобретению имеют ряд выгодных свойств, которые позволяют рассматривать их в качестве подходящих подобных лекарствам молекул для инъекционного, ингаляционного, назального, офтальмологического, перорального или местного введения. Та-

кие выгодные свойства включают:

перекрестная реактивность с другими видами. Она является обычным требованием для преclinical оценки фармакодинамики и фармакокинетики;

устойчивость к воздействию протеазы. Бициклические пептидные лиганды должны в большинстве случаев демонстрировать устойчивость к воздействию протеаз плазмы, эпителиальных ("заякоренных на мембране") протеаз, желудочных и кишечных протеаз, протеаз поверхности легких, внутриклеточных протеаз и других подобных протеаз. Устойчивость к воздействию протеазы должна поддерживаться между различными видами, благодаря чему на животных моделях может быть разработан перспективный прототип бициклического пептида и, кроме того, он может быть введен без опасений людям;

требуемый профиль растворимости. Он представляет собой соотношение заряженных и гидрофильных остатков к гидрофобным остаткам и внутренним/межмолекулярным H-связям, которое является важной для приготовления лекарственной формы и для всасывания;

оптимальный период полувыведения из плазмы крови. В зависимости от клинических показаний и схемы лечения, может потребоваться разработка бициклического пептида с коротким или пролонгированным *in vivo* временем экспозиции для проведения лечения либо хронических, либо острых болезненных состояний. Оптимальное время экспозиции будет определяться, с одной стороны, с учетом требования использования пролонгированного времени экспозиции (для максимальной терапевтической эффективности), а с другой стороны, с учетом требования использования короткого времени экспозиции для минимизации токсикологических воздействий, возникающих при использовании пролонгированного воздействия лекарственного средства;

селективность. Конкретные пептидные лиганды по изобретению характеризуются высокой селективностью в отношении других Eph-рецепторов тирозинкиназы, таких как EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphB1, фактора XIIA, карбоангидразы 9 и CD38 (данные по селективности для выбранных пептидных лигандов по изобретению представлены в табл. 11 и 12). Следует также отметить, что выбранные пептидные лиганды по изобретению проявляют перекрестную реактивность с другими видами (например, с мышью и крысой), что позволяет проводить испытания на животных моделях (табл. 3, 7-8, 10 и 12); и

безопасность. Сообщалось о случаях кровотечения при проведении преclinical исследований *in vivo* на моделях и при проведении клинических испытаний с использованием конъюгатов антитела EphA2. Например, было прекращено в фазе 1 открытое исследование препарата MEDI-547 вследствие случаев кровотечения и коагуляции, которые наблюдались у 5 из 6 пациентов (Annunziata et al, Invest New Drugs (2013) 31:77-84). Наблюдаемые случаи кровотечения у пациентов находились в соответствии с воздействиями на систему коагуляции, наблюдаемыми при проведении преclinical исследований на крысах и обезьянах: повышение активированного частичного тромбопластинового времени и увеличение продуктов деградации фибриногена/фибрина (Annunziata et al IBID). Как сообщалось, наблюдались случаи явно выраженных кровотечений при проведении токсикологических исследований на обезьянах (Annunziata et al, IBID). Взятые в совокупности, эти результаты позволяют сделать вывод, что MEDI-547 вызывает диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (DIC) как у видов животных при проведении преclinical исследований, так и у пациентов. Описанные в изобретении бициклические конъюгаты лекарственных средств (BDC) имеют короткие периоды полувыведения *in vivo* (< 30 мин) и, вследствие этого, маловероятно, что они будут вызывать диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (DIC) у пациентов. Приведенные в изобретении результаты (смотрите данные исследований биологической активности разделы 5 и 6 и табл. 15) показывают, что выбранные бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению не влияют на параметры свертывания крови и не вызывают случаев кровотечения при проведении преclinical исследований.

Фармацевтически приемлемые соли.

Следует иметь в виду, что солевые формы включены в объем этого изобретения, и ссылки на пептидные лиганды относятся и к солевым формам указанных лигандов.

Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит фрагмент с основными или кислотными свойствами, традиционными химическими методами, такими как методы, описанные в монографии *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Обычно, такие соли могут быть приготовлены путем взаимодействия форм свободной кислоты или свободного основания этих соединений с соответствующим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе, или в смеси и того и другого.

Соли присоединения кислоты (моно- или дисоли) могут быть образованы с широким разнообразием кислот, как неорганических, так и органических. Примеры солей добавления кислоты включают моно- или дисоли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацет-амидобензойной, бутановой, (+)-камфорной, камфорсульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, му-

равьиной, фумаровой, галактаровой, гентизиновой, глюкогоптоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галогенводородных кислот (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, (\pm)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (\pm)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, пмаовой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминсалициловой, себаценовой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных с уксусной, хлористоводородной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, серной, метансульфоновой (мезилатом), этансульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислотами. Одна конкретная соль представляет собой гидрохлоридную соль. Другая конкретная соль представляет собой ацетатную соль.

Если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например, $-\text{COOH}$ может представлять собой $-\text{COO}^-$), то тогда соль может быть образована с органическим или неорганическим основанием, генерирующим подходящий катион. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но этим не ограничивая, катионы щелочных металлов, такие как Li^+ , Na^+ и K^+ , катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{3+} или Zn^{2+} . Примеры подходящих органических катионов включают, но этим не ограничивая, ион аммония (то есть, NH_4^+) и ионы замещенного аммония (например, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих ионов замещенного аммония являются ионы, образованные из метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером обычного иона четвертичного аммония является $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Когда пептиды по изобретению содержат аминную функциональность, они могут образовывать четвертичные аммониевые соли, например, путем взаимодействия с алкилирующим реагентом в соответствии с методами, которые хорошо известны специалистам. Такие соединения четвертичного аммония включены в объем пептидов по изобретению.

Изотопные варианты.

Настоящее изобретение включает все фармацевтически приемлемые меченые изотопом (радиоактивным изотопом) пептидные лиганды по изобретению, в которых один или более атомов заменены на атомы, имеющие один и тот же атомный номер, но атомную массу или массовое число, отличающиеся от атомной массы или массового числа, обычно обнаруживаемых в природе, и пептидные лиганды по изобретению, к которым присоединены группы, образующие хелаты с металлами, (называемые "эффекторными"), которые способны удерживать соответствующие изотопы (радиоактивные изотопы), и пептидные лиганды по изобретению, в которых конкретные функциональные группы ковалентно заменены на соответствующие изотопы (радиоактивные изотопы) или меченые изотопом функциональные группы.

Примеры изотопов, применяемых для введения в пептидные лиганды по изобретению, включают изотопы водорода, такие как ^2H (D) и ^3H (T), углерода, такие как ^{11}C , ^{13}C и ^{14}C , хлора, такой как ^{36}Cl , фтора, такой как ^{18}F , йода, такие как ^{123}I , ^{125}I и ^{131}I , азота, такие как ^{13}N и ^{15}N , кислорода, такие как ^{15}O , ^{17}O и ^{18}O , фосфора, такой как ^{32}P , серы, такой как ^{35}S , меди, такой как ^{64}Cu , галлия, такие как ^{67}Ga или ^{68}Ga , иттрия, такой как ^{90}Y , и лютеция, такой как ^{177}Lu , и висмута, такой как ^{213}Bi .

Конкретные меченые изотопом пептидные лиганды по изобретению, например, пептидные лиганды, в которые введен радиоактивный изотоп, применяют при исследовании распределения лекарственного средства и/или субстрата в ткани и для клинической оценки присутствия и/или отсутствия EphA2-мишени в пораженных тканях. Кроме того, пептидные лиганды по изобретению могут иметь важные с точки зрения диагностики свойства, благодаря которым они могут применяться для обнаружения или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В методах обнаружения или идентификации могут применяться соединения, которые помечены с помощью реагентов для введения метки, таких как радиоактивные изотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин and люцифераза), и другие подобные. Для этой цели особенно подходят радиоактивные изотопы тритий, то есть ^3H (T), и углерод-14, то есть ^{14}C , с точки зрения легкости их введения и доступности средств для их детекции.

Замена на более тяжелые изотопы, такие как дейтерий, то есть ^2H (D), может давать определенные положительные терапевтические эффекты, обусловленные более высокой устойчивостью к инактивации в процессе метаболизма, например, увеличение *in vivo* периода полувыведения или снижение уровня

требуемых доз, и, следовательно, может быть предпочтительным при некоторых обстоятельствах.

Замена на позитронно-активные изотопы, такие как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может быть использована при исследованиях методом позитронной эмиссионной томографии (PET) с целью определения степени заполнения мишени.

Меченые изотопом соединения пептидных лигандов по изобретению могут быть приготовлены, как правило, традиционными методами, известными специалистам в данной области, или методами, аналогичными методам, описанным в примерах изобретения, путем использования соответствующего меченого изотопом реагента вместо ранее используемого немеченого изотопом реагента.

Неароматический молекулярный каркас.

Используемый в изобретении термин "неароматический молекулярный каркас" относится к любому определенному выше молекулярному каркасу, который не содержит ароматической (то есть ненасыщенной) карбоциклической или гетероциклической кольцевой системы.

Подходящие примеры неароматических молекулярных каркасов описаны в публикации Heinis et al (2014) *Angewandte Chemie, International Edition* 53(6) 1602-1606.

Как отмечается в упомянутых выше документах, молекулярный каркас может представлять собой малую молекулу, такую как малая органическая молекула.

В одном варианте осуществления, молекулярный каркас может представлять собой макромолекулу. В одном варианте осуществления, молекулярный каркас представляет собой макромолекулу, состоящую из аминокислот, нуклеотидов или углеводов.

В одном варианте осуществления, молекулярный каркас включает реакционноспособные группы, которые способны взаимодействовать с функциональной группой (группами) полипептида с образованием ковалентных связей.

Молекулярный каркас может включать химические группы, которые образуют связь с пептидом, такие как амины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, нитрилы, карбоновые кислоты, сложные эфиры, алкены, алкины, азиды, ангидриды, сукцинимиды, малеимиды, алкилгалогениды и ацилгалогениды.

Примером α ненасыщенного карбонилсодержащего соединения является 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (*Angewandte Chemie, International Edition* (2014), 53(6), 1602-1606).

Эффекторные и функциональные группы.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается конъюгат лекарственного средства, включающий определенный выше пептидный лиганд, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами.

Эффекторные и/или функциональные группы могут быть присоединены, например, к N- и/или C-концам полипептида, к аминокислоте в полипептиде или к молекулярному каркасу.

Подходящие эффекторные группы включают антитела и их части или фрагменты. Например, эффекторная группа может включать константную область легкой цепи антитела (CL), домен CH1 тяжелой цепи антитела, домен CH2 тяжелой цепи антитела, домен CH3 тяжелой цепи антитела или любую их комбинацию, помимо одного или более доменов константной области. Эффекторная группа может также включать шарнирную область антитела (такую область обычно обнаруживают между доменами CH1 и CH2 в молекуле IgG).

В еще одном варианте осуществления этого аспекта изобретения, эффекторная группа по настоящему изобретению представляет собой Fc область молекулы IgG. Предпочтительно, чтобы пептидный лиганд-эффекторная группа по настоящему изобретению включал или состоял из слитой конструкции пептидный лиганд-Fc, имеющей $t_{1/2}$ период полувыведения один день или более, два дня или более, 3 дня или более, 4 дня или более, 5 дней или более, 6 дней или более или 7 дней или более. Более предпочтительно, чтобы пептидный лиганд по настоящему изобретению включал или состоял из слитой конструкции пептидный лиганд-Fc, имеющей $t_{1/2}$ период полувыведения один день или более.

Функциональные группы включают, как правило, связывающие группы, лекарственные средства, реакционноспособные группы для присоединения других структурных фрагментов, функциональные группы, которые способствуют захвату макроциклических пептидов клетками, и другие подобные группы.

Способность пептидов проникать в клетки позволяет пептидам быть эффективными в отношении внутриклеточных мишеней. Мишени, доступ пептидов к которым обеспечивается способностью пептидов проникать в клетки, включают факторы транскрипции, внутриклеточные сигнальные молекулы, такие как тирозинкиназы, и молекулы, принимающие участие в апоптозном сигнальном пути. Функциональные группы, которые способны проникать в клетки, включают пептиды или химические группы, которые были добавлены либо к пептиду, либо к молекулярному каркасу. Пептиды, такие как пептиды, полученные из VP22, HIV-Tat, гомеобокса белка дрозофилы (локус *Antennapedia*), описаны, например в публикациях Chen and Harrison, *Biochemical Society Transactions* (2007) Volume 35, part 4, p821; Gupta et al. in *Advanced Drug Discovery Reviews* (2004) Volume 57 9637. Примеры коротких пептидов, которые, как было показано, являются эффективными при транслокации через клеточные цитоплазматические

мембраны, включают пептид пенетратина из белка дрозофилы локуса *Antennapedia* с длиной 16 аминокислот (Derossi et al (1994) *J Biol. Chem.* Volume 269 p10444), "модель амфипатического пептида" с длиной 18 аминокислот (Oehlke et al (1998) *Biochim Biophys Acts* Volume 1414 p127) и обогащенные аргинином области белка ТАТ вируса иммунодефицита человека (HIV). Непептидные подходы включают применение имитаторов малых молекул или кальциевых каналов, управляемых вторичным мессенджером (SMOC), которые могут быть легко присоединены к биомолекулам (Okuyama et al (2007) *Nature Methods* Volume 4 p153). Другие химические стратегии добавления к молекулам групп гуанидиния также усиливают проникновение в клетки (Elson-Scwab et al (2007) *J Biol Chem* Volume 282 p13585). Молекулы с низкой молекулярной массой, такие как стероиды, могут быть добавлены к молекулярному каркасу для усиления усвоения в клетках.

Один класс функциональных групп, которые могут быть присоединены к пептидным лигандам, антитела и их связывающие фрагменты, такие как Fab, Fv, или однодоменные фрагменты. В частности, могут быть использованы антитела, которые связываются с белками, способные увеличивать период полувыведения пептидного лиганда *in vivo*.

В одном варианте осуществления, пептидный лиганд-эффекторная группа по изобретению имеет $t\beta$ период полувыведения, выбранный из группы, состоящей из 12 часов или более, 24 часов или более, 2 дней или более, 3 дней или более, 4 дней или более, 5 дней или более, 6 дней или более, 7 дней или более, 8 дней или более, 9 дней или более, 10 дней или более, 11 дней или более, 12 дней или более, 13 дней или более, 14 дней или более, 15 дней или более или 20 дней или более. Предпочтительно, чтобы пептидный лиганд-эффекторная группа или композиция по изобретению имела $t\beta$ в диапазоне от 12 до 60 часов. В еще одном варианте осуществления, $t\beta$ период полувыведения составляет один день или более. В еще одном варианте осуществления, $t\beta$ период полувыведения составляет от 12 до 26 часов.

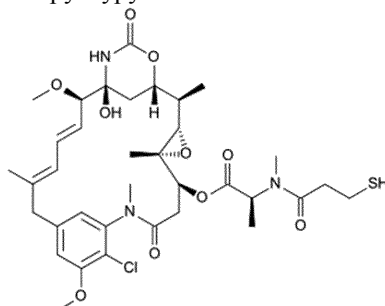
В одном конкретном варианте осуществления изобретения, функциональную группу выбирают из реагента, образующего хелат с металлом, который применяют для комплексообразования с радиоактивными изотопами металлов медицинского назначения.

Возможные эффекторные группы также включают ферменты, например, такие как карбоксипептидаза G2, для применения в антитело-опосредованной терапии с использованием фермента и пролекарства (ADEPT), в которой антитела заменяют на пептидный лиганд.

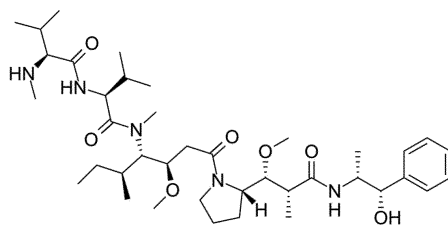
В одном конкретном варианте осуществления изобретения, функциональную группу выбирают из лекарственного средства, такого как цитотоксическое средство для противораковой терапии. Подходящие примеры включают алкилирующие агенты, такие как цисплатин и карбоплатин, а также оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, ифосфамид; антимиетаболиты, в том числе аналоги пурина, азатиоприн и меркаптопурин или аналоги пиримидина; растительные алкалоиды и терпеноиды, в том числе алкалоиды барвинка, такие как винкристин, винбластин, винорелбин и виндезин; подофиллотоксин и его производные этопозид и тенипозид; таксаны, включая паклитаксел, ранее известный как таксол; ингибиторы топоизомеразы, в том числе камптотецины; иринотекан и топотекан, и ингибиторы типа II, в том числе амсакрин, этопозид, этопозид фосфат и тенипозид. Другие средства могут включать противоопухолевые антибиотики, которые включают иммунодепрессант дактиномицин (который используется при трансплантациях почки), доксорубин, эпирубицин, блеомицин, калихеамицины, и другие средства.

В еще одном конкретном варианте осуществления изобретения, цитотоксическое средство выбирают из майтанзиноидов (таких как DM1) или монометил ауристатинов (таких как MMAE).

DM1 представляет собой цитотоксическое средство, которое является тиолсодержащим производным майтансина и имеет следующую структуру:



Монометил ауристатин E (MMAE) представляет собой синтетическое противоопухолевое средство и имеет следующую структуру:



В одном варианте осуществления, цитотоксическое средство связано с бициклическим пептидом легко расщепляемой связью, такой как дисульфидная связь или чувствительная к воздействию протеазы связь. В еще одном варианте осуществления, модифицируют группы, расположенные рядом с дисульфидной связью, с целью регулирования стерического затруднения при доступе к дисульфидной связи и тем самым скорости расщепления и одновременного высвобождения цитотоксического средства.

Были опубликованы результаты исследования по возможности модифицирования подверженности дисульфидной связи к разрушению путем введения стерического затруднения с обеих сторон дисульфидной связи (Kellogg et al (2011) *Bioconjugate Chemistry*, 22, 717). Более высокая степень стерического затруднения приводит к снижению скорости разрушения дисульфидной связи под воздействием внутриклеточного глутатиона, а также внеклеточных (системных) восстановителей, в результате чего возрастает затруднение при высвобождении токсического средства как внутри, так и снаружи клетки.

Таким образом, путем тщательного выбора степени стерического затруднения с обеих сторон дисульфидной связи может быть достигнуто оптимальное соотношение между стабильностью дисульфидной связи в кровотоке (которая минимизирует нежелательные побочные эффекты токсина) и эффективностью высвобождения во внутриклеточной среде (которое максимизирует терапевтический эффект).

Стерическое затруднение с обеих сторон дисульфидной связи регулируют путем введения одной или более металльных групп либо в таргетирующий структурный фрагмент (в данном случае, в бициклический пептид), либо на стороне токсического средства молекулярной конструкции.

В одном варианте осуществления, конъюгат лекарственного средства дополнительно включает линкер между указанным пептидным лигандом и указанными цитотоксическими средствами.

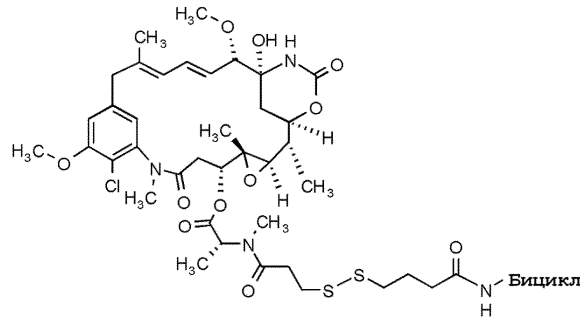
В одном варианте осуществления, цитотоксическое средство и линкер выбирают из любых комбинаций цитотоксического средства и линкера, описанных в патентном документе WO 2016/067035 (полное содержание которого включено в настоящее изобретение путем ссылки на него).

В одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE.

В одном варианте осуществления, линкер между указанным цитотоксическим средством и указанным бициклическим пептидом включает один или более аминокислотных остатков. Так, в одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер выбирают из -Val-Cit-, -Trp-Cit-, -Val-Lys-, -D-Trp-Cit-, -Ala-Ala-Asn-, D-Ala-Phe-Lys- или -Glu-Pro-Cit-Gly-hPhe-Tyr-Leu- (SEQ ID NO: 3). В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер выбирают из -Val-Cit-, -Trp-Cit-, -Val-Lys- или -D-Trp-Cit-. В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер представляет собой -Val-Cit- или -Val-Lys-. И еще в одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE и линкер представляет собой -Val-Cit-.

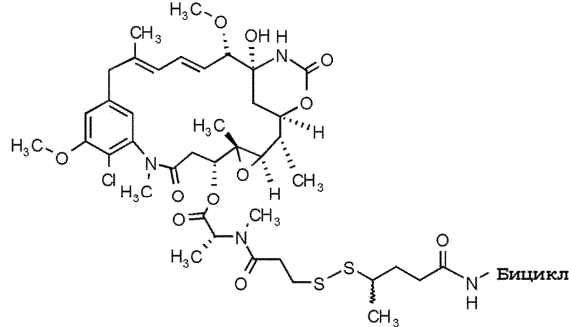
В альтернативном варианте осуществления, линкер между указанным цитотоксическим средством включает дисульфидную связь, такую как способную к расщеплению дисульфидную связь. Так, в еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и линкер выбирают из -S-S-, -SS(SO₃H)-, -SS(Me)-, -(Me)-SS-(Me)-, -SS-(Me₂)- или -SS-(Me)-SO₃H-. В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и линкер включает -S-S- фрагмент, такой как N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDB), или -SS(SO₃H)- фрагмент, такой как SO₃H-SPDB. В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и линкер включает -S-S- фрагмент, такой как -S-S- или -S-S-(SO₃H)-.

В одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (A):



(A)

где указанный бицикл представляет собой определенный выше ВСУ6099. В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (B):



(B)

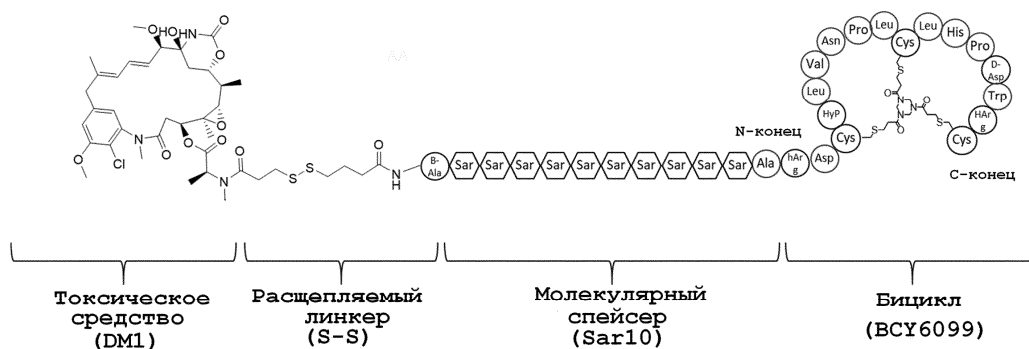
где указанный бицикл представляет собой определенный выше ВСУ6099.

В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (A), где указанный бицикл выбирают из определенного выше ВСУ6099. Этот бициклический конъюгат лекарственного средства (BDC) обозначен в изобретении как ВСУ6027. Представленные в изобретении в табл. 4 и 8 данные иллюстрируют отличное конкурентное связывание для ВСУ6027 при проведении анализа на конкурентное связывание EphA2.

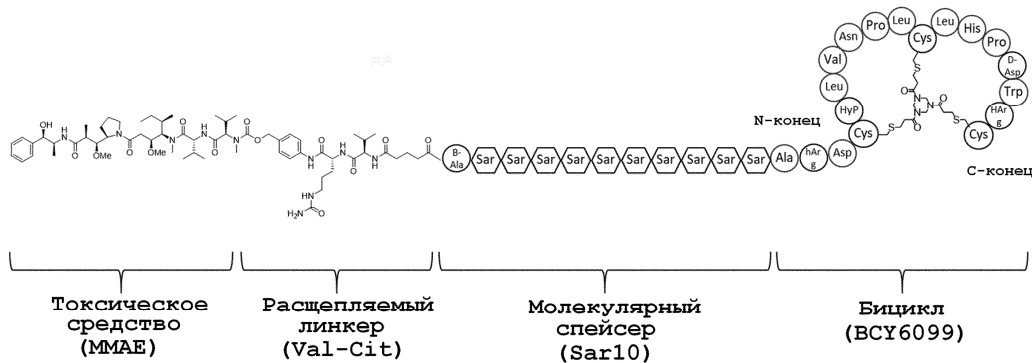
В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (B), где указанный бицикл выбирают из определенного выше ВСУ6099. Этот бициклический конъюгат лекарственного средства (BDC) обозначен в изобретении как ВСУ6028. Представленные в изобретении в табл. 4 и 8 данные иллюстрируют отличное конкурентное связывание для ВСУ6028 при проведении анализа на конкурентное связывание EphA2.

В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE или DM1, и конъюгат лекарственного средства выбирают из ВСУ6136 и ВСУ6173. Представленные в изобретении в табл. 11 и 12 данные показывают, что эти два бициклических конъюгата лекарственных средств не проявляли значимого связывания с близкородственными человеческими гомологами EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7 и EphB4; мышинными EphA3 и EphA4; и крысиными EphA3 и EphB1.

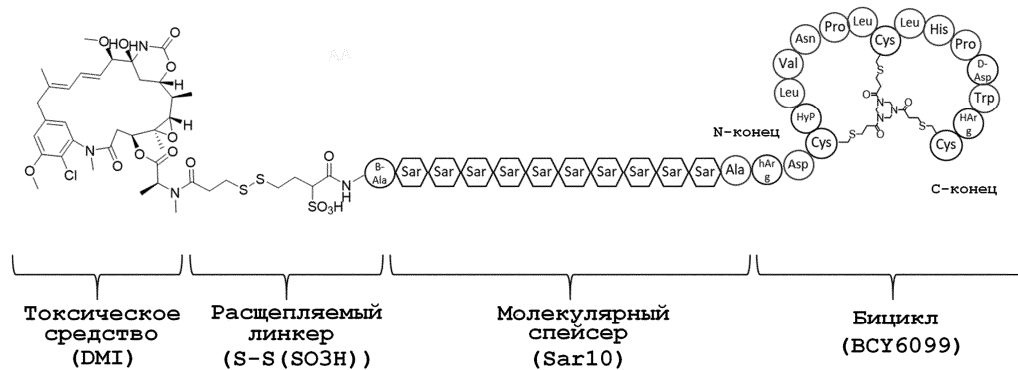
В еще одном варианте осуществления, конъюгат лекарственного средства выбирают из любого одного из ВСУ6135, ВСУ6136, ВСУ6173, ВСУ6174 и ВСУ6175:



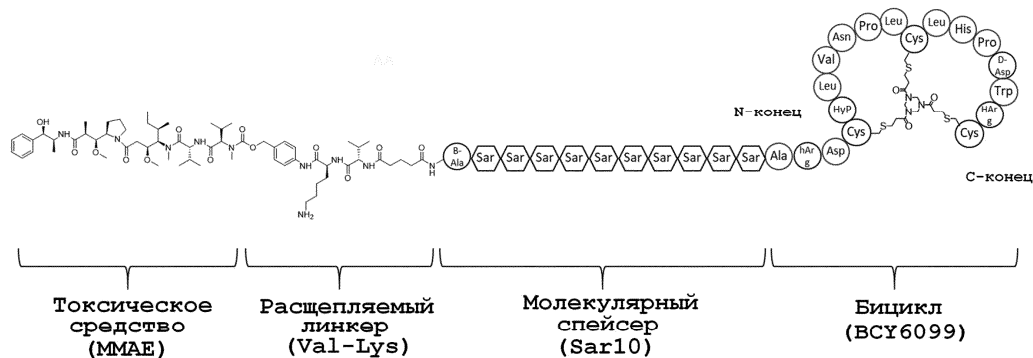
BCU6135



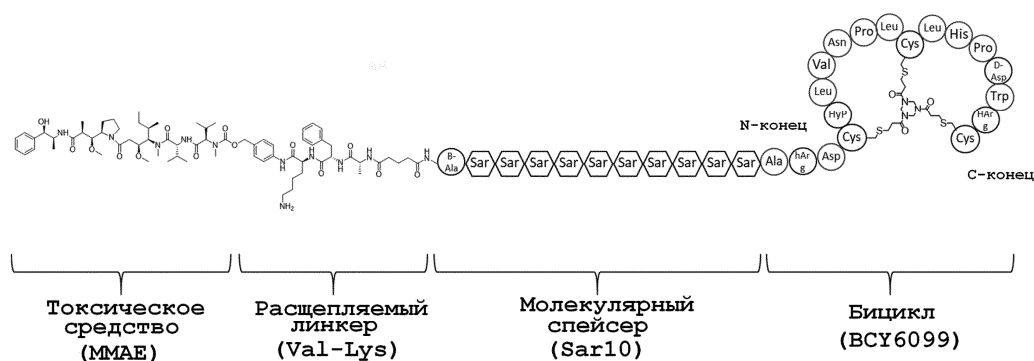
BCU6136



BCU6173



BCU6174



BCY6175

И еще в одном варианте осуществления, конъюгат лекарственного средства представляет собой BCY6136. Данные, представленные в изобретении в исследованиях 7 и 8, показывают, что BCY6136 проявлял значительную и высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака предстательной железы PC-3 (смотрите фиг. 5 и 6 и табл. 16-19). Представленные в изобретении данные также показывают, что BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака легкого NCI-H1975 (немелкоклеточного рака легкого) (смотрите фиг. 8 и табл. 20-25). Данные, представленные в изобретении в исследованиях 10 и 11, также показывают, что BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в моделях рака легкого LU-01-0251 PDX (немелкоклеточного рака легкого) как в случае опухоли большого размера, так и опухоли малого размера (смотрите фиг. 9 и 10 и табл. 26-29), в которых наблюдался полный регресс опухоли. Данные, представленные в изобретении в исследовании 12, также показывают, что BCY6136 проявлял статистически значимое противоопухолевое действие в модели рака легкого LU-01-0046 PDX (немелкоклеточного рака легкого) (смотрите фиг. 11 и табл. 30-31), в которой наблюдался полный регресс опухоли в случае использования BCY6136. Данные, представленные в изобретении в исследовании 13, также показывают, что BCY6136 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность в модели рака легкого LU-01-0046 PDX (немелкоклеточного рака легкого) (смотрите фиг. 12 и табл. 32 и 33). Данные, представленные в изобретении в исследовании 14, также показывают, что использование BCY6136 приводило к полному уничтожению опухолей в модели рака легкого LU-01-0046 PDX (немелкоклеточного рака легкого) (смотрите фиг. 13-15 и табл. 34-37). Данные, представленные в изобретении в исследованиях 15 и 16, также иллюстрируют эффекты BCY6136 в двух моделях, в которых используются клеточные линии с низкой/пренебрежимо малой экспрессией EphA2 (а именно Lu-01-0412 и Lu-01-0486). Эти данные, приведенные на фиг. 23 и 24 и табл. 38-41, показывают, что использование BCY6136 не приводило к регрессу опухоли ни в одной из клеточных линий, но использование BCY8245 и BCY8781, которые связываются с мишенью, в высокой степени экспрессированной в клеточной линии Lu-01-0412, приводило к полному уничтожению опухоли. Данные, представленные в исследовании 17, показывают, что BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака молочной железы MDA-MB-231 (смотрите фиг. 18 и табл. 42-45). Данные, представленные в изобретении в исследовании 18, иллюстрируют воздействия BCY6136 в модели рака молочной железы, в которой используются клеточная линия с низкой/пренебрежимо малой экспрессией EphA2 (а именно EMT6). Эти данные, представленные на фиг. 19 и табл. 46 и 47, показывают, что использование BCY6136 не приводило к регрессу опухоли в случае этой клеточной линии. Данные, представленные в изобретении в исследовании 19, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака желудка NCI-N87 (смотрите фиг. 20 и табл. 48 и 49). Данные, представленные в изобретении в исследовании 20, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака яичников SK-OV-3 (смотрите фиг. 21 и табл. 50 и 51) по сравнению с ADC MEDI-547, который проявлял умеренную противоопухолевую активность. Данные, представленные в изобретении в исследовании 21, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака пищевода OE-21 (смотрите фиг. 22 и табл. 52 и 53). Данные, представленные в изобретении в исследовании 22, показывают, что BCY6136 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели множественной миеломы MOLP-8 (смотрите фиг. 23 и табл. 59 и 60). Данные, представленные в изобретении в исследовании 23, показывают, что BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели фибросаркомы HT-1080 (смотрите фиг. 24-28 и табл. 56 и 57).

Синтез.

Пептиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы с использованием стандартных методик и затем подвергнуты реакции с молекулярным каркасом *in vitro*. Для этого могут быть использованы стандартные химические методы. Такой подход позволяет проводить препаративный синтез растворимого материала для проведения последующих экспериментов или валидации. Такие методы могут

быть реализованы с использованием традиционных химических подходов, таких как раскрытые в публикации Timmerman et al (supra).

Соответственно, изобретение также относится к получению полипептидов или конъюгатов, выбранных, как это указано в изобретении, где получение включает, необязательно, дополнительные стадии, которым приводятся разъяснения ниже. В одном варианте осуществления, эти стадии проводят на конечном продукте полипептид/конъюгат, который был получен методом химического синтеза.

При получении конъюгата или комплекса, в представляющем интерес полипептиде могут быть, необязательно, заменены аминокислотные остатки.

Пептиды могут быть также удлинены с целью введения, например, еще одной петли и, вследствие этого, придания пептидам полиспецифичности.

Удлинение пептида может быть осуществлено простым химическим путем на его N-конце или C-конце или в пределах его петель с использованием ортогонально защищенных лизинов (и аналогов) стандартными методами твердофазного или жидкофазного химического синтеза. Для введения активированного или активированного N- или C-конца могут быть использованы стандартные методы (био)конъюгации. В качестве варианта, могут быть сделаны дополнительные удлинения путем конденсации фрагментов или нативного химического лигирования, например, как описано в публикации Dawson et al. 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science* 266:776-779, или с помощью ферментов, например, с использованием субтилизазы, как описано в публикации Chang et al *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Dec 20; 91(26): 12544-8, или в публикации Hikari et al *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

В качестве варианта, пептиды могут быть удлинены или модифицированы путем последующей конъюгации с использованием дисульфидных связей. Такой подход имеет дополнительное преимущество, позволяющее первому и второму пептиду диссоциировать друг от друга при попадании в восстановительную среду клетки. В этом случае, молекулярный каркас (например, ТВМВ) может быть добавлен в процессе химического синтеза первого пептида, для того чтобы он вступал в реакцию с тремя группами цистеина; затем к N- или C-концу первого пептида может быть присоединен дополнительный цистеин или тиол, для того чтобы этот цистеин или тиол взаимодействовал только со свободным цистеином или тиолом второго пептида, образуя связанный дисульфидной связью конъюгат бициклического пептида-пептида.

Аналогичные методы применимы в равной степени к синтезу/сопряжению двух бициклических и биспецифических макроциклов, что потенциально позволяет создавать тетраспецифическую молекулу.

Кроме того, может быть осуществлено таким же способом добавление других функциональных групп или эффекторных групп, используя соответствующие химические методы, присоединение на N- или C-концах или через боковые цепи. В одном варианте осуществления, присоединение проводят таким образом, что оно не блокирует активность любого из структурных фрагментов.

Фармацевтические композиции.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая определенные выше пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Обычно, представленные пептидные лиганды должны использоваться в очищенной форме совместно с фармакологически приемлемыми вспомогательными веществами или носителями. Как правило, эти вспомогательные вещества или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и/или забуференные среды. Среда для парентерального введения включает раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, и раствор Рингера с лактатом. Подходящие физиологически приемлемые вспомогательные средства, если требуется поддерживать полипептидный комплекс в суспензионной форме, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Среды для внутривенного введения включают восполнители недостатка жидкости и питательных веществ и восполнители недостатка электролитов, такие как восполнители на основе раствора Рингера с декстрозой. Кроме того, могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие реагенты и инертные газы (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition).

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут применять в форме отдельно вводимых композиций или в сочетании с другими лекарственными средствами. Эти лекарственные средства могут включать антитела, фрагменты антител и различные иммунотерапевтические лекарственные средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "коктейли" различных цитотоксических или других средств в сочетании с белковыми лигандами по настоящему изобретению, или даже комбинации выбранных полипептидов по настоящему изобретению, имеющих различную специфичность, таких как полипептиды, выбранные с использованием различных целевых лигандов, независимо от того, будут ли их объединять вместе перед введением или не будут.

Способ введения фармацевтических композиций согласно изобретению может быть любым из спо-

соединений, которые хорошо известны специалистам в данной области. С целью проведения терапии, пептидные лиганды по изобретению могут быть введены любому пациенту стандартными способами. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, включая парентеральный, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, трансдермальный, ингаляционный способы, или же, соответственно, путем прямой инфузии с использованием катетера. Доза и частота введения будет зависеть от возраста, пола и состояния больного, от одновременного введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должны приниматься во внимание лечащим врачом.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут быть лиофилизированы с целью хранения и затем восстановления в подходящем носителе перед использованием. Было показано, что этот метод является эффективным, и известные методы лиофилизации и восстановления могут быть использованы в изобретении. Для специалистов в данной области является очевидным, что лиофилизация и восстановление могут приводить к различной степени потери активности, и что для компенсации этих потерь, необходимо проводить корректировку концентрации пептидных лиганд в сторону повышения.

Композиции, содержащие представленные в изобретении пептидные лиганды или их коктейль, могут быть введены с целью профилактического и/или терапевтического лечения. При конкретных вариантах применения в терапевтических целях, под "терапевтически эффективной дозой" подразумевают соответствующее количество, применение которого позволяет достигать, по меньшей мере, частичного ингибирования, подавления, модуляции, уничтожения или какого-либо другого измеримого параметра популяции выбранных клеток. Количества, необходимые для достижения этой дозы, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, но обычно эти количества находятся в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм массы тела, причем чаще всего используются дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических целей, композиции, включающие представленные в изобретении пептидные лиганды или их смеси, также могут быть введены в аналогичных или слегка более низких дозах.

Композиция, содержащая пептидный лиганд по настоящему изобретению, может применяться в профилактических и терапевтических целях, для того чтобы способствовать изменению, инактивации, уничтожению или удалению выбранной популяции клеток-мишеней в организме млекопитающего. Кроме того, пептидные лиганды, описанные в изобретении, могут селективно применяться экстракорпорально или *in vitro* для избирательного уничтожения, истощения или эффективного удаления иным образом популяции клеток-мишеней из гетерогенной популяции клеток. Взятая у млекопитающего кровь может быть экстракорпорально объединена с выбранными пептидными лигандами, в результате чего нежелательные клетки уничтожаются или иным образом удаляются из крови, которую возвращают млекопитающему с использованием стандартных методов.

Терапевтическое применение.

Бициклические пептиды по изобретению обладает специфической способностью связывать EphA2.

Eph-рецепторы тирозинкиназы (Eph) относятся к большой группе рецепторных тирозинкиназ (RTK), киназы которых фосфорилируют белки на остатках тирозина. Ephs и их мембраносвязанные эфринные лиганды (эфрины) контролируют позиционирование клеток и организацию тканей (Poliakov et al. (2004) *Dev Cell* 7, 465-80). Функциональные и биохимические Eph-ответы возникают при более высоких состояниях олигомеризации лигандов (Stein et al. (1998) *Genes Dev* 12, 667-678).

Было показано, что среди других функций формирования паттернов, различные Ephs и эфрины играют определенную роль в развитии сосудов. Нокаут EphB4 и эфрин-B2 приводит к отсутствию способности ремоделировать капиллярные русла в кровеносные сосуды (Poliakov et al., *supra*) и к эмбриональной летальности. Персистирующая экспрессия некоторых рецепторов Eph и эфринов также наблюдалась во вновь образованных микрососудах у взрослых (Brantley-Sieders et al. (2004) *Curr Pharm Des* 10, 3431-42; Adams (2003) *J Anat* 202, 105-12).

Также было обнаружено, что нерегулированное повторное появление некоторых эфринов и их рецепторов у взрослых людей способствует инвазии опухоли, метастазированию и неоангиогенезу (Nakamoto et al. (2002) *Microsc Res Tech* 59, 58-67; Brantley-Sieders et al., *supra*). Кроме того, было обнаружено, что некоторые представители семейства Eph сверхэкспрессируются в опухолевых клетках из различных опухолей человека (Brantley-Sieders et al., *supra*); Marine (2002) *Ann Hematol* 81 Suppl 2, S66; Booth et al. (2002) *Nat Med* 8, 1360-1).

EPH рецептор A2 (эфрин типа-A рецептор 2) представляет собой белок, который у людей кодируется геном EPHA2.

EphA2 активируется при наличии множественных злокачественных заболеваниях у человека, часто коррелируя с прогрессированием заболевания, метастазированием и неблагоприятным прогнозом, например, при раке молочной железы (Zelinski et al (2001) *Cancer Res.* 61, 2301-2306; Zhuang et al (2010) *Cancer Res.* 70, 299-308; Brantley-Sieders et al (2011) *PLoS One* 6, e24426), раке легкого (Brannan et al (2009) *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 1039-1049; Kinch et al (2003) *Clin Cancer Res.* 9, 613-618; Guo et al (2013) *J Thorac Oncol.* 8, 301-308), раке желудка (Nakamura et al (2005) *Cancer Sci.* 96, 42-47; Yuan et al (2009) *Dig Dis Sci* 54, 2410-2417), раке поджелудочной железы (Mudali et al (2006) *Clin Exp Metastasis* 23, 357-365), раке предстательной железы (Walker-Daniels et al (1999) *Prostate* 41, 275-280), раке печени (Yang et

al (2009) *Hepatology* 39, 1169-1177) и глиобластоме (Wykosky et al (2005) *Mol Cancer Res.* 3, 541-551; Li et al (2010) *Tumour Biol.* 31, 477-488).

Полностью роль EphA2 в прогрессировании рака до сих пор не выяснена, хотя и существуют доказательства его влияния на многочисленных этапах прогрессирования рака, включая рост опухолевых клеток, выживание, инвазию и ангиогенез. Понижающая регуляция экспрессии EphA2 подавляет размножение опухолевых раковых клеток (Binda et al. (2012) *Cancer Cell* 22, 765-780), в то время как блокада EphA2 ингибирует VEGF-индуцированную миграцию клеток (Hess et al (2001) *Cancer Res.* 61, 3250-3255), прорастание и ангиогенез (Cheng et al. (2002) *Mol Cancer Res.* 1, 2-11; Lin et al. (2007) *Cancer* 109, 332-40), и прогрессирование метастазирования (Brantley-Sieders et al. (2005) *FASEB J.* 19, 1884-1886).

Было показано, что конъюгат лекарственного средства с антителом против EphA2 значительно снижает рост опухоли в ксенотрансплантатных моделях на крысах и мышах (Jackson et al (2008) *Cancer Research* 68, 9367-9374), и аналогичный подход был опробован на мужчине, хотя лечение пришлось прервать из-за необходимости проведения лечения взаимосвязанных неблагоприятных побочных эффектов (Annunziata et al (2013) *Invest New drugs* 31, 77-84).

Полипептидные лиганды, выбранные в соответствии со способом по настоящему изобретению, могут быть использованы при *in vivo* терапевтическом и профилактическом применениях, *in vitro* и *in vivo* диагностических применениях, при проведении *in vitro* исследования и в качестве реагента, и в других подобных целях. Лиганды с выбранными уровнями специфичности могут применяться при проведении испытаний на животных, не относящихся к человеку, когда желательным является наличие перекрестной реактивности, или при диагностике, когда необходимо тщательно контролировать перекрестную реактивность с гомологами или паралогами. При некоторых применениях, таких как применение вакцин, может быть использована способность пептидных лигандов вызывать иммунный ответ на заранее определенные ряды антигенов, для того чтобы адаптировать вакцину к конкретным заболеваниям и патогенам.

Практически чистые пептидные лиганды с гомогенностью, по меньшей мере, от 90 до 95% являются предпочтительными для введения млекопитающему, и с гомогенностью от 98 до 99% или более являются наиболее предпочтительными для фармацевтического применения, в частности, когда млекопитающим является человек. После очистки, частичной или до состояния гомогенности, в зависимости от требований, выбранные полипептиды могут быть использованы в диагностике или терапии (в том числе экстракорпорально), или при разработке и проведении методик анализа, иммунофлуоресцентных окрашиваний и для других подобных целей (Lefkovite and Pernis, (1979 and 1981) *Immunological Methods*, Volumes I and II, Academic Press, NY).

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается определенный выше пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства для применения для предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль).

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается способ предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль), который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффекторной группы и определенного выше конъюгата лекарственного средства с пептидным лигандом.

В одном варианте осуществления, EphA2 представляет собой EphA2 млекопитающего. В еще одном варианте осуществления, EphA2 млекопитающего представляет собой EphA2 человека.

В одном варианте осуществления, заболевание или нарушение, характеризующееся сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани, выбирают из рака.

Примеры раковых заболеваний (и их доброкачественных типов), которые могут быть подвергнуты лечению (или ингибированию), включают, но этим не ограничивая, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточные карциномы, переходные клеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевых путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая карциномы пищевода, желудка (желудочные), тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки и заднего прохода), печени (гепатоцеллюлярная карцинома), желчного пузыря и билиарной системы, экзокринной части поджелудочной железы, почек, легких (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), карциномы головы и шеи (например, рак языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, полости носа и околоносовых пазух), яичников, маточных труб, брюшины, влагалища, вульвы, пениса, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярную карциному щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и прилежащих органов (например, меланому, базальноклеточный рак, плоскоклеточный рак, кератоакантому, диспластический невус); гематологические злокачественные опухоли (например, лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические нарушения и нарушения с пограничной злокачественностью, включая гематологические злокачественные заболевания и связанные с ними состояния клеток лимфоидного ряда (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ALL], хронический лимфоцитарный лейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома

клеток мантии, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы с природными клетками-киллерами [NK], лимфомы Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональную гаммапатию неясного генеза, плазмцитому, множественную миелому и лимфопролиферативные нарушения после трансплантации), а также гематологические злокачественные и родственные состояния клеток миелоидного ряда (например, острый миелолейкоз [AML], хронический миелолейкоз [CML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелолипролиферативные расстройства, такие как полицитемия вера, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелолипролиферативный синдром, синдром миелодисплазии и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например, саркомы мягких тканей, кости или хряща, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркому Капоши, саркому Юинга, синовиальную саркому, эпителиоидные саркомы, желудочно-кишечные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистiocитомы и дерматофибросаркому протуберанс; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли эпифиза и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли парашитовидных желез, карциноидные опухоли и медуллярную карциному щитовидной железы); опухоли глаз и их придатков (например, ретинобластому); опухоли зародышевых клеток и трофобласта (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, пузырьный занос и хориокарциному); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластомы, нейробластомы, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают пациента восприимчивым к возникновению злокачественного новообразования (например, пигментную ксеродерму).

В еще одном варианте осуществления, рак выбирают из рака молочной железы, рака легкого, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака печени, глиобластомы и ангиогенеза.

В еще одном варианте осуществления, рак выбирают из рака предстательной железы, рака легкого (такого как немелкоклеточная карцинома легкого (NSCLC)), рака молочной железы (такого как трижды негативный рак молочной железы), рака желудка, рака яичников, рака пищевода, множественной миеломы и фибросаркомы.

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак предстательной железы. Данные, представленные в изобретении в исследованиях 7 и 8, показывают, что BCY6136 проявлял значительную и высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака предстательной железы PC-3 (смотрите фиг. 5 и 6 и табл. 16-19).

В еще одном варианте осуществления, конъюгат лекарственного средства применяют для предотвращения, торможения развития или лечения солидных опухолей, таких как фибросаркомы и карциномы молочной железы, и немелкоклеточные карциномы легкого.

В еще одном варианте осуществления, рак выбирают из рака легкого, такого как немелкоклеточные карциномы легкого (NSCLC). Данные, представленные в изобретении в исследовании 9, показывают, что BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака легкого NCI-H1975 (NSCLC) (смотрите фиг. 8 и табл. 20-25). Данные, также представленные в изобретении в исследованиях 10 и 11, показывают, что BCY6136 проявлял сильный противоопухолевый эффект как в случае опухоли большого размера, так и в случае опухоли малого размера, в модели рака легкого LU-01-0251 PDX (NSCLC) (смотрите фиг. 9 и 10 и табл. 26-29), при котором наблюдался полный регресс опухоли. Данные, представленные в изобретении в исследовании 12, показывают, что BCY6136 проявлял значительный противоопухолевый эффект в модели рака легкого LU-01-0046 PDX (NSCLC) (смотрите фиг. 11 и табл. 30 и 31), при котором наблюдался полный регресс опухоли для BCY6136. Данные, представленные в изобретении в исследовании 13, показывают, что BCY6136 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность в модели рака легкого LU-01-0046 PDX (NSCLC) (смотрите фиг. 12 и табл. 32 и 33). Данные, представленные в изобретении в исследовании 14, показывают, что BCY6173 проявлял противоопухолевую активность, а применение BCY6136 и BCY6175 приводило к уничтожению опухолей в модели рака легкого LU-01-0046 PDX (NSCLC) (смотрите фиг. 13-15 и табл. 34-37). Данные, также представленные в изобретении в исследованиях 15 и 16, иллюстрируют эффекты BCY6136 в двух моделях, в которых используются клеточные линии с низкой/пренебрежимо малой экспрессией EphA2 (а именно Lu-01-0412 и Lu-01-0486). Эти данные, приведенные на фиг. 23 и 24 и в табл. 38-41, показывают, что BCY6136 не оказывал никакого воздействия на регресс опухоли в случае и той и другой клеточной линии, а применение BCY8245 и BCY8781, которые связываются с мишенью, с высокой степенью экспрессированной в клеточной линии Lu-01-0412, приводило к полному уничтожению опухоли. В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак молочной железы. В еще одном варианте осуществления, рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы. Данные, представленные в изобретении в исследовании 17, показывают, что BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака молочной железы MDA-MB-231 (смотрите фиг. 18 и табл. 42-45). Данные, представленные в изобретении в исследовании 18, иллюстрируют эффекты BCY6136 в модели рака молочной железы, в которой используются клеточные линии с низ-

кой/пренебрежимо малой экспрессией EphA2 (а именно EMT6). Эти данные, представленные на фиг. 19 и в табл. 46 и 47, показывают, что BCY6136 не оказывал никакого воздействия на регресс опухоли в случае этой клеточной линии. В альтернативном варианте осуществления, рак молочной железы представляет собой резистентный к герцептину рак молочной железы. Не ссылаясь в качестве доказательства на какую-либо теорию, тем не менее, предполагают, что EphA2 имеет непосредственное отношение к возникновению резистентности к герцептину, и поэтому, нацеленный на EphA2 структурный фрагмент имеет перспективу использования у пациентов, у которых не достигается ответ при лечении герцептином.

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак желудка. Данные, представленные в изобретении в исследовании 19, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака желудка NCI-N87 (смотрите фиг. 20 и табл. 48 и 49).

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак яичников. Данные, представленные в изобретении в исследовании 20, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака яичников SK-OV-3 (смотрите фиг. 21 и табл. 50 и 51) по сравнению с ADC MEDI-547, который проявлял умеренную противоопухолевую активность.

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак пищевода. Данные, представленные в изобретении в исследовании 21, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака пищевода OE-21 (смотрите фиг. 22 и табл. 52 и 53).

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой множественную миелому. Данные, представленные в изобретении в исследовании 22, показывают, что BCY6136 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели множественной миеломы MOLP-8, а BCY6082 проявлял значительную противоопухолевую активность (смотрите фиг. 23 и табл. 59 и 60).

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой фибросаркому. Данные, представленные в изобретении в исследовании 23, показывают, что BCY6173, BCY6135, BCY6174 и BCY6175 проявляли дозозависимую противоопухолевую активность, а BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели фибросаркомы HT-1080 (смотрите фиг. 24-28 и табл. 56-57).

Используемый в изобретении термин "предотвращение" подразумевает введение защитной композиции до возникновения заболевания. "Торможение развития" относится к введению композиции после возникновения заболевания, но до клинического проявления заболевания. "Лечение" подразумевает введение защитной композиции после проявления симптомов заболевания.

Доступны экспериментальные модели на животных, в которых можно проводить исследования по эффективности пептидных лигандов при предотвращении или лечении заболевания. Использование экспериментальных моделей на животных способствует настоящему изобретению, которое позволяет разрабатывать полипептидные лиганды, способные перекрестно реагировать с мишенями человека и животных, что делает возможным использование моделей на животных с последующей интерпретацией полученных данных в отношении человека.

Кроме того, данные, представленные в изобретении в исследовании 3, иллюстрируют взаимосвязь между вариацией числа копий (CNV) и экспрессией гена для EphA2 для типов множественных опухолей. Так, в соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается способ предотвращения, торможения развития или лечения рака, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффекторной группы и определенного выше конъюгата лекарственного средства с пептидным лигандом, где указанный пациент идентифицируется как имеющий повышенную вариацию числа копий (CNV) EphA2.

В одном варианте осуществления, рак выбирают из тех типов рака, которые идентифицируются в изобретении как имеющие повышенную вариацию числа копий (CNV) EphA2. В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак молочной железы.

Далее приводится дополнительное описание изобретения с использованием следующих примеров.

Примеры

Условные сокращенные обозначения	Название	Название прекурсора	Прекурсор CAS	Фирма-производитель
β -Ala	β -Аланин	Fmoc- β -аланин	35737-10-1	Fluorochem
D-Asp	D-Аспарагиновая кислота	Fmoc-D-аспарагиновая кислоты 4-трет-бутиловый эфир	112883-39-3	Sigma aldrich
Fl	5(6)-карбокси-флуоресцеин			Sigma
HArg	Гомоаргинин	Fmoc-L-HomoArg(Pbf)-OH	401915-53-5	Fluorochem
HuP	Гидроксипролин	Fmoc-Гидроксипролин (tBu)-OH	122996-47-8	Sigma
Sar	Саркозин, так что Sar _x представляет x остатков Sar	Fmoc-Саркозин-OH	77128-70-2	Sigma

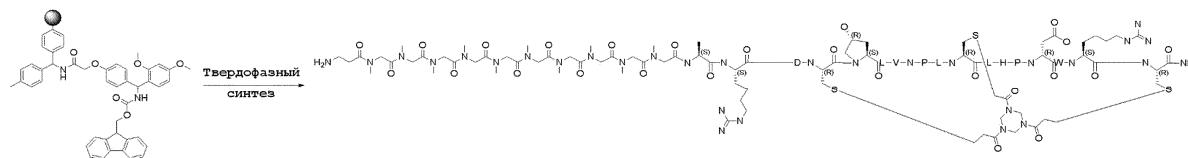
Материалы и методы.

Синтез пептидов.

Пептиды синтезировали методом твердофазного синтеза. Использовали смолу Rink Amide MBHA. К смеси, содержащей смолу Rink Amide MBHA (0,4-0,45 ммоль/г) и Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,0 экв) добавляли DMF, затем добавляли DIC (3 экв) и HOAt (3 экв) и смешивали в течение 1 ч. Для разблокирования использовали 20% пиперидина в DMF. Каждую последующую аминокислоту присоединяли с использованием 3 экв активирующих реагентов, DIC (3,0 экв) и HOAT (3,0 экв) в DMF. Контролировали протекание реакции с использованием цветной реакции нингидрина или цветной реакции tetrachlor. После завершения синтеза, пептидную смолу промывали с помощью DMF x 3, MeOH x 3, и затем сушили при барботировании N₂ в течение ночи. Затем пептидную смолу обрабатывали с помощью 92,5% TFA/2,5% TIS/2,5% EDT/2,5% H₂O в течение 3 ч. Пептид осаждали холодным изопропиловым эфиром и центрифугировали (3 мин при 3000 об/мин). Осадок промывали два раза изопропиловым эфиром, и неочищенный пептид сушили под вакуумом в течение 2 ч и затем лиофилизировали. Лиофилизированный порошок растворяли в смеси ACN/H₂O (50:50), и добавляли раствор 100 мМ ТАТА в ACN, затем бикарбонат аммония в H₂O (1М), и раствор перемешивали в течение 1 ч. После завершения циклизации, реакцию оставляли в 1М водном растворе гидрохлорида цистеина (10 экв относительно ТАТА), затем перемешивали и выдерживали в течение одного часа. Раствор лиофилизировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный пептид очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) и лиофилизировали с получением продукта.

Если не указаны иначе, то все аминокислоты использовали в L-конфигурациях.

BCY6099



Последовательность: (β -Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 2)-CONH₂.

8,0 г смолы использовали для генерации 2,1 г BCY6099 (чистота 99,2%; выход 16,3%) в виде белого твердого вещества.

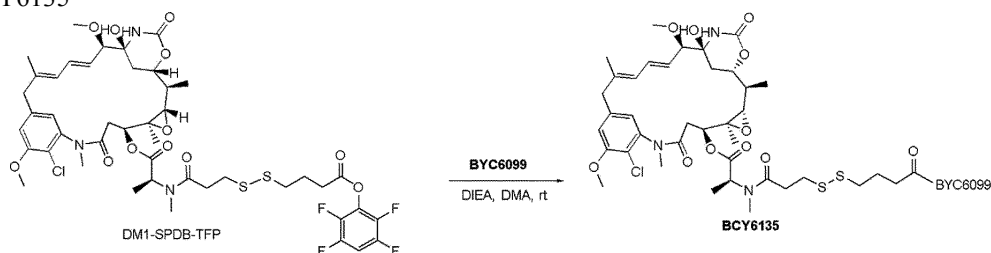
Данные анализа BCY6099	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	15-45% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,31 мин
LCMS (ESI):	m/z 1061,8 [M+3H] ³⁺ , 796,5 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3183,68

Приготовление конъюгатов лекарственных средств с бициклическим пептидом. Общая схема приготовления бициклических конъюгатов лекарственных средств (BDC) представлена на фиг. 1, и в табл. А описан компонент таргетирующего бицикла и линкер/токсическое средство внутри каждого BDC.

Таблица А

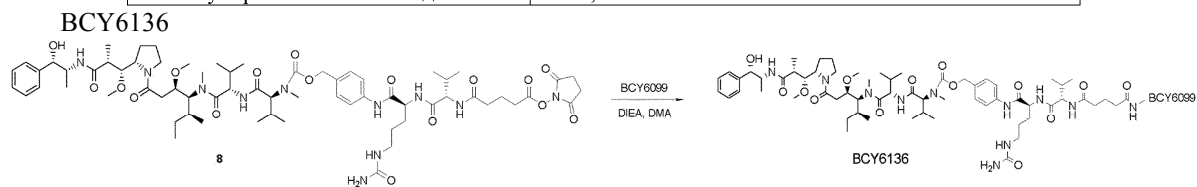
BDC (номер BCY)	Таргетирующий бицикл (номер BCY)	Линкер/токсическое средство
6135	6099	DM1-SS-
6136	6099	ValCit-MMAE
6173	6099	DM1-SS(SO ₃ H)-
6174	6099	ValLys-MMAE
6175	6099	MMAE-D-Ala-Phe-Lys-

BCY6135



BCY6099 (114,1 мг, 35,84 мкмоль) использовали в качестве бициклического реагента. Получали 22,4 мг соединения BCY6135 (5,30 мкмоль, выход 17,74%, чистота 95,14%) в виде белого твердого вещества.

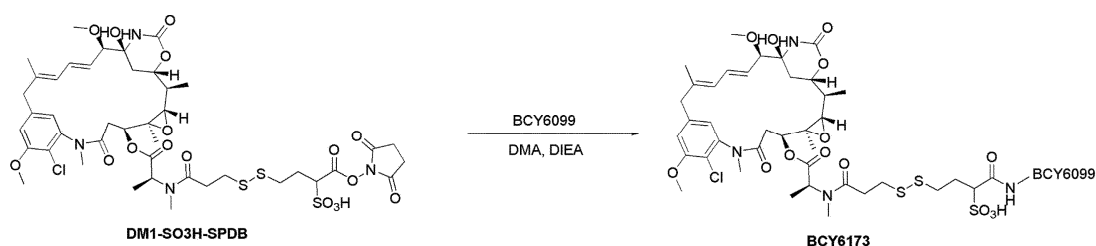
Данные анализа BCY6135	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	9,81 мин
LCMS (ESI):	m/z 1341,5 [M+3H] ³⁺ , 805,0 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса пептида	4021,08



В качестве бициклического реагента использовали BCY6099 (71,5 мг, 22,48 мкмоль). Соединение BCY6136 (40,9 мг, 9,05 мкмоль, выход 40,27%, чистота 97,42%) получали в виде белого твердого вещества.

Данные анализа BCY6136	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,35 мин
LCMS (ESI):	m/z 1468,1 [M+3H] ³⁺ , 1101,2 [M+4H] ⁴⁺ , 881,3 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса пептида	4404,2

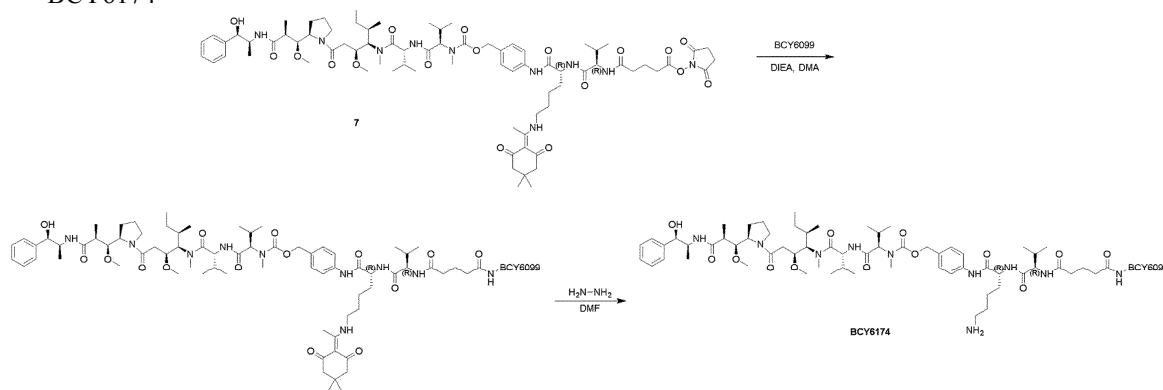
BCY6173



В качестве бициклического реагента использовали BSY6099 (200,15 мг, 62,89 мкмоль). Получали 57,1 мг соединения BSY6173 (3,40 мкмоль, выход 22,79%, чистота 95,80%) в виде белого твердого вещества.

BSY6173 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	10,30 мин
LCMS (ESI):	m/z 1361,9 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 1021,8 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	4101,15

BSY6174



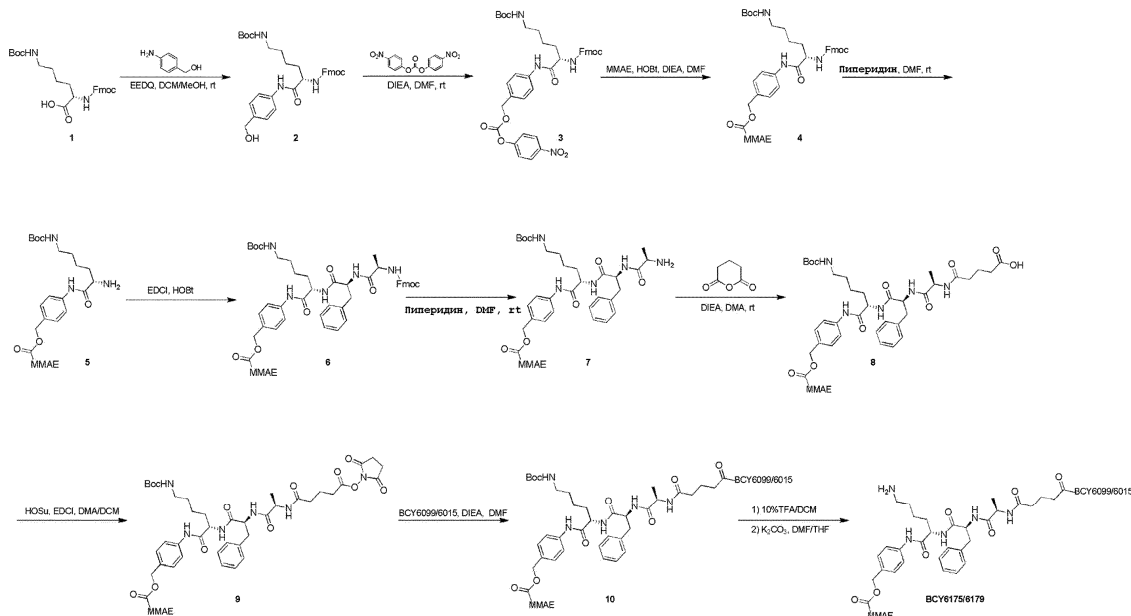
Использовали в качестве бициклического реагента BSY6099 (389,77 мг, 122,47 мкмоль, 1,2 экв). Получали Dde-BSY6174 (0,250 г, 55,10 мкмоль, выход 53,99%) в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 1513,0 [M+3H] ³⁺ , 1135,0 [M+4H] ⁴⁺ , 908,2 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса	4538,38

Удаляли защиту с Dde-BSY6174 (0,250 г, 55,10 мкмоль, 1,0 экв), используя гидразин в соответствии с общей методикой, с получением BSY6174 (0,1206 г, 27,45 мкмоль, выход 49,82%) в виде белого твердого вещества.

Данные анализа BSY6174	
Подвижная фаза:	A: 0.1% TFA в H ₂ O B: 0.1%TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	9,85 мин
LCMS (ESI):	m/z 1458,5 [M+3H] ³⁺ , 1094,1 [M+4H] ⁴⁺ , 875,4 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса пептида	4373,17

BCY6175



Общая методика получения соединения 10A.

К раствору BCY6099 (195,15 мг, 61,32 мкмоль, 1,1 экв) в DMA (3 мл) добавляли DIEA (21,61 мг, 167,23 мкмоль, 29,13 мкл, 3 экв) и соединение 9 (0,085 г, 55,74 мкмоль, 1,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 ч. Методом LC-MS контролировали момент полного расходования соединения 9, и детектировали один основной пик с требуемой величиной отношения m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка (светло-желтое масло). Реакционную смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Получали соединение 10A (0,160 г, 34,84 мкмоль, выход 62,50%) в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения BCY6175.

К раствору соединения 10A в DCM (4,5 мл) добавляли TFA (4,5 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин. Методом LC-MS контролировали момент полного расходования соединения 10A, и детектировали один основной пик с требуемой величиной отношения m/z. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка, который очищали методом препаративной HPLC (TFA условие). Получали соединение BCY6175 (61,40 мг, 13,56 мкмоль, выход 31,13%) в виде белого твердого вещества.

Данные исследований биологической активности

Исследование 1. Измерения флуоресцентной поляризации.

(а) Анализ прямого связывания.

Пептиды с флуоресцентной меткой (либо с флуоресцеином, фирмы SIGMA, либо с Alexa Fluor488™, фирмы Fisher Scientific) разводили до 2,5 нМ в PBS с 0,01% tween 20 или в 50 мМ HEPES с 100 мМ NaCl и 0,01% tween pH 7,4 (оба называют буфером для анализа). В этот же раствор пептида в буфере для анализа добавляли белок и проводили его титрование с получением 1 нМ пептида в суммарном об 25 мкл в 384-луночных планшетах с черными стенками и дном с малым объемом и с низкой степенью связывания, в итоге, 5 мкл буфера для анализа, 10 мкл белка (табл. 1), затем 10 мкл флуоресцентного пептида. Использовали последовательные разведения один к двум для получения 12 различных концентраций с наивысшими концентрациями в диапазоне от 500 нМ для известных лекарственных препаратов для связывания, обладающих высокой аффинностью, до 10 мкМ для известных лекарственных препаратов для связывания, обладающих низкой аффинностью, и для проведения исследований по селективности. Измерения проводили на считывающем устройстве для микропланшетов BMG PHERAstar FS, оснащенный оптическим модулем "FP 485 520 520", в котором используется возбуждающее излучение при 485 нм и проводится детекция параллельной и перпендикулярной эмиссии при 520 нм. Прибор PHERAstar FS использовали при 25°C в режиме 200 вспышек на лунку и с задержкой позиционирования 0,1 с, при этом измерение каждой лунки проводили с интервалами от 5 до 10 мин в течение 60 мин. Используемое для анализа приращение определяли для каждого меченого вещества по истечению 60 мин, когда уже в лунке отсутствовал белок. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Systat Sigmaplot version 12.0. Величины mP аппроксимировали с помощью определенного пользователем уравнения второго порядка с получением величины Kd:

$$f = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / \text{Lig} * ((x + \text{Lig} + Kd) / 2 - \sqrt{((x + \text{Lig} + Kd) / 2)^2 - (\text{Lig} * x)})$$

"Lig" представляло собой определяемую величину концентрации используемого меченого веществ-

ва.

(b) Анализ конкурентного связывания.

Пептиды без флуоресцентной метки подвергали испытаниям на конкурентное связывание с пептидом с флуоресцентной меткой и известной величиной K_d (табл. 2). Референсное соединение А имеет последовательность FI-G-Sar₅-ACPWGPAWCPVNRPGCA (FI-G-Sar₅-(SEQ ID NO: 4)). Референсное соединение В имеет последовательность FI-G-Sar₅-ACPWGPFWCPVNRPGCA (FI-G-Sar₅-(SEQ ID NO: 5)). Референсное соединение С имеет последовательность FI-G-Sar₅-ADVTCPWGPFWCPVNRPGCA (FI-G-Sar₅-(SEQ ID NO: 6)). Каждое из референсных соединений А, В и С содержит молекулярный каркас ТВМВ. Пептиды разбавляли до соответствующей концентрации в буфере для анализа, описанном для анализа прямого связывания, с максимальным содержанием 5% DMSO, затем последовательно разбавляли 1 к 2. Добавляли в планшет пять микролитров разбавленного пептида, затем 10 мкл человеческого или мышинного EphA2 (табл. 1) при фиксированной концентрации, которая зависела от используемого флуоресцентного пептида (табл. 2), затем добавляли 10 мкл флуоресцентного пептида. Измерения проводили таким же способом, как в случае проведения анализа прямого связывания, однако, приращение определяли перед первым измерением. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Systat Sigmaplot version 12.0. Величины mP аппроксимировали с помощью определенного пользователем уравнения третьего порядка с получением величины K_i :

$$f = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / \text{Lig} * ((\text{Lig} * ((2 * ((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^0.5 * \text{COS}(\text{ARCCOS}((-2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^3 + 9 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c) * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp})) - 27 * (-1 * \text{Klig} * \text{Kcomp} * \text{Prot} * c)) / (2 * (((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^3)^0.5))) / 3) - (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c))) / ((3 * \text{Klig}) + ((2 * ((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^0.5 * \text{COS}(\text{ARCCOS}((-2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^3 + 9 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c) * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp})) - 27 * (-1 * \text{Klig} * \text{Kcomp} * \text{Prot} * c)) / (2 * (((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^3)^0.5))) / 3) - (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c))))).$$

"Lig", "Klig" и "Prot" представляли собой определяемые величины, относящиеся к концентрации флуоресцентного пептида, K_d флуоресцентного пептида и концентрации EphA2, соответственно.

Таблица 1

Рецепторы эфрина и источник

Рецептор (домен)	Вид	Формат/метка	Фирма-поставщик	Номер по каталогу
EphA1 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	7146-A1
EphA2 (Ecto)	Человек	C-концевой полиHis	R&D systems	3035-A2
EphA2 (Ecto)	Человек	C-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA2 (Ecto)	Мышь	Fc-слияние	R&D Systems	639-A2
EphA2 (Ecto)	Мышь	C-концевой полиHis	Sino Biological	50586-M08H
EphA2 (ligand binding)	Крыса	C-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA2 (ligand binding)	Собака	C-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA3 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	6444-A3
EphA3 (Ecto)	Человек	N-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA3 (Ecto)	Крыса	C-концевой полиHis	Sino Biological	80465-R08H
EphA4 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	6827-A4
EphA4 (Ecto)	Человек	C-концевой полиHis	Sino Biological	11314-H08H
EphA4 (Ecto)	Крыса	C-концевой полиHis	Sino Biological	80123-R08H
EphA6 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	5606-A6
EphA7 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	6756-A7
EphB1 (Ecto)	Крыса	Fc-слияние	R&D systems	1596-B1
EphB4 (Ecto)	Человек	C-концевой полиHis	R&D systems	3038-B4

Таблица 2

Конечные концентрации флуоресцентного пептида и EphA2, используемые при проведении анализов на конкурентное связывание

Флуоресцентный пептид	Концентрация флуоресцентного пептида (нМ)	Концентрация человеческого EphA2 (нМ)	Концентрация мышинового EphA2 (нМ)
Референсное соединение А	10	75	
Референсное соединение В	1	30	
Референсное соединение С	0,8 (человек) 1 (мышь)	2,4	50

Проводили испытания конкретных пептидных лигандов по изобретению с помощью упомянутых выше методов анализа, результаты которых приведены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Данные биологических испытаний пептидного лиганда по изобретению
(ТАТА пептиды, анализ конкурентного связывания)

Номер бициклического соединения	Последовательность	Каркас	K _i , нМ ± 95% CI	
			EphA2 человека	EphA2 мыши
			Флуоресцентный пептид, референсное соединение С	
BCY6099	(β-Ala)-Sar ₁₀ - A(HArg)DC(HyP)LVNPLCLHP(D-Asp)W(HArg)C (SEQ ID NO: 2)	ТАТА	4,94±1,41	57,6±24,86

Таблица 4

Данные биологических испытаний пептидных лигандов по изобретению
(данные по конкурирующему связыванию ВДС с ТАТА каркасами)

Номер соединения ВДС	Прекурсор бицикла	Общая формула	Каркас	K _i , нМ, EphA2 человека флуоресцентный пептид, референсное соединение С
BCY6027	BCY6099	Формула (А)	ТАТА	10,23
BCY6028	BCY6099	Формула (В)	ТАТА	13,04

Исследование 2. Измерения флуоресцентной поляризации (альтернативный протокол).

(а) Конкурентное связывание.

Пептиды без флуоресцентной метки подвергали испытаниям на конкурентное связывание с пептидом с флуоресцентной меткой и известной величиной K_d (табл. 9).

Добавляли в планшет пять микролитров испытуемого соединения с возрастающими концентрациями (двухкратно), затем 10 мкл EphA2 белка (табл. 8) при фиксированной концентрации, которая зависела от используемого флуоресцентного пептида (табл. 9), затем добавляли 10 мкл флуоресцентного пептида. Буфер представлял собой буфер для анализа, такой как описанный выше, с DMSO <1%. Измерения проводили на считывающем устройстве для микропланшетов BMG PHERAstar FS, оснащённом оптическим модулем "FP 485 520 520", в котором используется возбуждающее излучение при 485 нм и проводится детекция параллельной и перпендикулярной эмиссии при 520 нм. Прибор PHERAstar FS использовали при 25°C в режиме 200 вспышек на лунку и с задержкой позиционирования 0,1 с, при этом измерение каждой лунки проводили с интервалами от 5 до 10 мин в течение 60 мин. В качестве варианта, измерения проводили с аналогичными вариантами времени на планшетном анализаторе Perkin Elmer Envision, оснащённом двухзеркальным FITC FP Dual Mirror, фильтром возбуждающего излучения FITC FP 480 и фильтрами эмиссионного излучения FITC FP P-pol 535 и FITC FP S-pol с 30 вспышками и со значением G-фактора 1,2. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения SyStat Sigmaplot версии 12.0 или 13.0, где величины mP в момент времени 60 мин аппроксимировали с помощью определённого пользователем уравнения третьего порядка с получением величины K_i:

$$f = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / \text{Lig} * ((\text{Lig} * ((2 * ((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^0.5 * \text{COS}(\text{ARCCOS}((-2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^3 + 9 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c) * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp})) - 27 * (-1 * \text{Klig} * \text{Kcomp} * \text{Prot} * c)) / (2 * (((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^3)^{0.5}))) / 3) - (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c))) / ((3 * \text{Klig}) + ((2 * ((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^0.5 * \text{COS}(\text{ARCCOS}((-2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^3 + 9 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c) * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp})) - 27 * (-1 * \text{Klig} * \text{Kcomp} * \text{Prot} * c)) / (2 * (((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^3)^{0.5}))) / 3) - (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c))))).$$

"Lig", "Klig" и "Prot" представляли собой определяемые величины, относящиеся к концентрации флуоресцентного пептида, Kd флуоресцентного пептида и концентрации EphA2, соответственно.

Таблица 5

Рецепторы Eph и источник

Рецептор (домен)	Вид	Формат/метка	Фирма-поставщик	Номер по каталогу
EphA2 (Ecto)	Человек	С-концевой полиHis	R&D systems	3035-A2
EphA2 (Ecto)	Человек	С-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA2 (Ecto)	Мышь	С-концевой полиHis	Sino Biological	50586-M08H
EphA2 (связывание лиганда)	Крыса	С-концевой полиHis	In-house	N/A

Таблица 6

Конечные концентрации флуоресцентного пептида и EphA2, используемые при проведении анализов на конкурентное связывание

Флуоресцентный пептид	Концентрация флуоресцентного пептида (нМ)	Концентрация человеческого EphA2 (нМ)	Концентрация мышинного EphA2 (нМ)	Концентрация крысиного EphA2 (нМ)
Референсное соединение С	0,8	2,4 или 25	50 или 15 нМ	25

Конкретные пептидные лиганды и бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению подвергали испытанию в упомянутом выше анализе на конкурентное связывание, и результаты представлены в табл. 7.

Таблица 7

Конкурентное связывание с выбранными бициклическими пептидами

Номер бицикла	Человек Ki (нМ)	Мышь Ki (нМ)	Крыса Ki (нМ)
BCY6099	2,7	4,5	1,9

Результаты анализа конкурентного связывания в табл. 7 показывают, что нацеленные на EphA2 человека бициклические пептиды (BCY6099) связываются с высокой аффинностью с EphA2 мыши и крысы. Эти результаты показывают, что пептид по изобретению может использоваться в *in vivo* экспериментальных моделях на мышах и крысах для проведения исследований по оценке эффективности и токсических эффектов.

Таблица 8

Конкурентное связывание с выбранными бициклическими конъюгатами лекарственных средств (BDC)

Идентификационный номер бицикла	Человек K _i (нМ)	Мышь K _i (нМ)	Крыса K _i (нМ)
BCY6027	10,2		
BCY6028	13,0		
BCY6135	2,4	5,0	2,9
BCY6136	1,9	5,5	3,2
BCY6173	1,7	4,3	2,5
BCY6174	1,7	3,9	3,0

Данные, приведенные в табл. 8, показывают, что конкретные бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению проявляют отличную перекрестную реактивность между EphA2 человека, мыши и грызунов. Поэтому, пептид по изобретению может быть использован в *in vivo* экспериментальных моделях на мышах и крысах для проведения исследований по оценке эффективности и токсических эффектов.

(b) Измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Не подвергавшиеся Fc-слиянию белки биотинилировали с помощью EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin в течение 1 ч в 4 мМ ацетата натрия, 100 мМ NaCl, pH 5,4 при трехкратном мольном избытке биотина относительно белка. Степень нанесения метки определяли с использованием набора Fluorescence Biotin Quantification Kit (Thermo) после диализа реакционной смеси в PBS. Для анализа связывания пептидов, использовали прибор Biacore T200 с чипом ХанТес CMD500D. Стрептавидин иммобилизировали на чипе, используя стандартную химическую реакцию сочетания амина при 25°C с HBS-N (10 мМ HEPES, 0,15 М NaCl, pH 7,4) в качестве подвижного буфера. Вкратце, активировали поверхность карбоксиметилдекстрана путем введения в течение 7 мин смеси 1:1 0,4 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид (EDC)/0,1 М N-гидрокси-сукцинимид (NHS) при расходе 10 мкл/мин. Для захвата стрептавидина, белок разбавляли до 0,2 мг/мл в 10 мМ ацетата натрия (pH 4,5) и захватывали путем введения 120 мкл на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали путем введения в течение 7 мин смеси 1 М этаноламин (pH 8,5):HBS-N (1:1). Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20, и биотинилированный EphA2 захватывали до уровня 500-1500 резонансных единиц, используя разбавление белка до 0,2 мкМ в буфере. Приготавливали серию разбавлений пептидов в этом буфере с конечной концентрацией DMSO 0,5%, при этом наивысшая концентрация пептида составляла 50 или 100 нМ и 6 дополнительных двухкратных разбавлений. Анализ методом SPR проводили при 25°C при расходе 90 мкл/мин при 60 с ассоциации и 900-1200 с диссоциации. Проводили корректировку данных для исключения объемных эффектов DMSO. Все данные дважды сопоставляли с холостыми введениями и референсной поверхностью, используя стандартные процедуры обработки, и обработку данных и аппроксимацию кинетических данных проводили с использованием программного обеспечения Scrubber software, version 2.0c (фирмы BioLogic Software). Данные аппроксимировали с использованием модели простого связывания 1:1, учитывающей в требуемых случаях эффекты переноса массы.

Для исследования связывания бициклических конъюгатов лекарственных средств использовали прибор Biacore 3000. Для биотинилированных белков уровни иммобилизирования составляли 1500 резонансных единиц, а наивысшая концентрация составляла 100 нМ. Во всех других отношениях, метод был таким же, как описанный выше метод, с использованием либо чипа CMD500D, либо чипа CM5 (GE Healthcare). Для Fc-меченых белков, чип CM5 активировали, как описано выше, и затем козье антитело против человеческого IgG (Thermo-Fisher H10500) разбавляли до 20 мкг/мл в 10 мМ ацетата натрия pH 5,0 и захватывали до приблизительно 3000 резонансных единиц. Поверхность затем блокировали, как описано выше. Проводили последовательный захват Fc-меченых белков с получением приблизительно 200-400 резонансных единиц белка-мишени. Используемые белки описаны ниже. Все белки ресуспендировали в рекомендованных фирмой-производителем буферах и концентрациях и захватывали с использованием 5-10 мкг/мл белка в PBS/0,05% Tween 20.

Таблица 9

Рецептор	Вид	Формат/метка	Фирма-поставщик	Номер по каталогу
EphA1	Человек	Fc-слияние	Sino Biologics	15789-H02H
EphA2	Человек	0,95 моль биотин/мономер	In house	N/A
EphA2	Мышь	Fc-слияние	R&D Systems	639-A2
EphA2	Крыса	1,4 моль биотин/мономер	In house	N/A
EphA3	Человек	Fc-слияние	R&D Systems	6444-A3
EphA3	Мышь	Fc-слияние	Sino Biologics	51122-M02H
EphA3	Крыса	Fc-слияние	Sino Biologics	80465-R02H
EphA4	Человек	Fc-слияние	Sino Biologics	11314-H03H
EphA4	Мышь	Fc-слияние	Sino Biologics	50575-M02H
EphA4	Крыса	Fc-слияние	Sino Biologics	80123-R02H
EphA5	Человек	3,1 моль биотин/мономер	R&D Systems	3036-A5
EphA6	Человек	Fc-слияние	R&D Systems	5606-A6
EphA7	Человек	Fc-слияние	R&D Systems	6756-A7
EphB1	Крыса	Fc-слияние	R&D Systems	1596-B1
EphB4	Человек	Fc-слияние	Sino Biologics	10235-H02H

Конкретные пептидные лиганды и бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению подвергали испытанию в упомянутом выше анализе на конкурентное связывание, и результаты представлены в табл. 10-12.

Таблица 10

Анализ связывания методом SPR выбранных бициклических пептидов и бициклических конъюгатов лекарственных средств по изобретению

Номер бицикл/В DC	Человек				Мышь				Крыса			
	K _D (нМ)	K _{off} (с ⁻¹)	t _{1/2} (мин)	K _{on} (M ⁻¹ с ⁻¹)	K _D (нМ)	K _{off} (с ⁻¹)	t _{1/2} (мин)	K _{on} (M ⁻¹ с ⁻¹)	K _D (нМ)	K _{off} (с ⁻¹)	t _{1/2} (мин)	K _{on} (M ⁻¹ с ⁻¹)
BCY6136	1,17	1,15E-03	10,0	9,86E+05	2,53	1,11E-03	10,4	4,37E+05	2,96	9,11E-04	12,6	3,07E+05
BCY6173	0,73	1,24E-03	9,3	1,69E+06	2,95	1,14E-03	10,1	3,86E+05	1,10	9,60E-04	12,0	8,81E+05

В табл. 10 представлена подробная информация по аффинностям связывания и кинетическим параметрам (K_{off} и K_{on}) для связывания выбранных бициклических конъюгатов лекарственных средств с EphA2 человека, полученные методом SPR.

Таблица 11

Анализ связывания методом SPR выбранных бициклических конъюгатов лекарственных средств по изобретению с гомологами Eph человека

Номер BDC	EphA1	EphA3	EphA4	EphA5	EphA6	EphA7	EphB4
BCY6136	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 25 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ
BCY6173	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 25 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ

В табл. 11 представлены результаты связывания для двух бициклических конъюгатов лекарственных средств (BCY6136 и BCY6173) при проведении анализа методом SPR с близкородственными гомологами эфрина человека. Результаты показывают, что соединения по изобретению не проявляют значимого связывания с близкородственными гомологами EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7 и EphB4 человека.

Таблица 12

Анализ связывания методом SPR выбранных бициклических конъюгатов лекарственных средств по изобретению с ортологами Eph мыши и крысы

Номер BDC	EphA3 мыши	EphA4 мыши	EphA3 крысы	EphB1 крысы
BCY61 36	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ
BCY61 73	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ

Результаты в табл. 12 показывают, что конкретные бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению (BCY6136 и BCY6173) являются также селективными в отношении EphA2 мыши и крысы и не проявляют значимого связывания с близкородственными гомологами EphA3 и EphA4 мыши, и EphA3 и EphB1 крысы.

Исследования 3 и 7-23.

В каждом из исследований 3 и 7-23, применяли следующую методологию для каждого исследования:

(a) Материалы.

(i) Животные и условия их содержания.

Животные.

Вид: домовая мышь.

Штамм: Balb/c nude или CB17-SCID.

Возраст: 6-8 недель.

Масса тела: 18-22 г.

Число животных: 9-90 мышей.

Фирма-поставщик животных: Shanghai Lingchang Biotechnology Experimental Animal Co. Limited.

Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности по 3-5 животных в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки изготовлены из поликарбоната. Размер 300 мм × 180 мм × 150 мм. Материал для подстилки - стержень кукурузного початка, который заменяют дважды в неделю.

Рацион. Животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму на протяжении всего периода исследования.

Вода. Животные имели свободный доступ к стерилизованной питьевой воде.

Идентификация клетки. Идентифицирующие этикетки для каждой клетки содержали следующую информацию: число животных, пол, штамм, дата получения, лечение, номер исследования, номер группы и дата начала лечения.

Идентификация животного. Животных маркировали путем маркировки уха.

(ii) Испытание и материалы для положительного контроля.

Номер	Описание физического состояния	Молекулярная масса	Чистота	Условие хранения
BCY6135	Лиофилизированный порошок	4021	95,14%	Хранили при -80°C
BCY6136	Лиофилизированный порошок	4402,23	97,5-98,6%	Хранили при -80°C
BCY6173	Лиофилизированный порошок	4101,15	95,80%	Хранили при -80°C
BCY6174	Лиофилизированный порошок	4537	99,50%	Хранили при -80°C
BCY6175	Лиофилизированный порошок	4492,29	96,20%	Хранили при -80°C
BCY8245	Лиофилизированный порошок	4173,85	99,30%	Хранили при -80°C
BCY8781	Лиофилизированный порошок	4173,83	99,00%	Хранили при -80°C
ADC (MEDI-547) ¹	Раствор (концентрация 10,47 мг/мл)	-	> 99,00%	Хранили при -80°C

¹ Подробные сведения о MEDI-547 (полностью человеческое моноклональное антитело 1C1 (распознающее как человеческий, так и мышинный EphA2), конъюгированное с MMAF через MC линкер) приведены в публикации Jackson et al (2008) Cancer Res 68, 9367-74.

(b) Экспериментальные методы и методики.

(i) Наблюдения.

Все методики, относящиеся к содержанию, уходу и лечению животных при исследовании проводили в соответствии с руководящими принципами, одобренными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC) международной фармацевтической, биофармацевтической и медицинской компанией WuXi AppTec, следуя руководству Международной ассоциации оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC). Во время проведения мониторинга, осуществляемого по обычной программе, животных подвергали ежедневному осмотру на наличие любых воздействий роста опухоли и лечения на нормальное поведение, такое как подвижность, потребление корма и воды (путем только визуального осмотра), прибавление/потеря массы тела, тусклость глаз/шерсти и любое другое аномальное воздействие, указанное в протоколе. Случай смерти и наблюдаемые клинические проявления регистрировали с учетом числа животных в каждой подгруппе.

(ii) Измерения опухоли и конечные клинические результаты.

Главным конечным клиническим результатом являлось обнаружение возможности отсрочки роста опухоли или возможности излечения мышей. Объем опухоли измеряли три раза в неделю в двух направлениях, используя штангенциркуль, и объем выражали в мм³, используя формулу: $V=0,5 \times a \times b^2$, где a и b представляют собой наибольший и наименьший диаметры опухоли, соответственно. Затем размер опухоли использовали для расчетов величины T/C. Величина T/C (в процентах) представляет собой показатель противоопухолевой активности; T и C представляют собой средние объемы в подвергаемых лечению и контрольных группах, соответственно, на данный день.

Для каждой группы рассчитывали TGI, используя формулу:

$$TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100;$$

T_i представляет собой средний объем опухоли в подвергаемой лечению группе на данный день, T_0 представляет собой средний объем опухоли в подвергаемой лечению группе на день начала лечения, V_i представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе с плацебо на тот же самый день, что и для T_i , и V_0 представляет собой средний объем опухоли в группе с плацебо на день начала лечения.

(iii) Сбор образцов.

В конце исследования, опухоли во всех группах собирали для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE).

(iv) Статистический анализ.

Сводная статистика, включающая среднее значение и стандартную ошибку среднего значения (SEM), приведена для объема опухоли в каждой группе в каждый момент времени.

Статистический анализ различия в объеме опухоли между группами проводили на данных, полу-

ченных в момент времени достижения наилучшего терапевтического результата после введения последней дозы.

Для сравнения объема опухоли между группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), и затем получали оценку статистической значимости с критерием Фишера (F-критерий) (отношение дисперсии результатов лечения к дисперсии ошибки), сравнения между группами проводили с использованием теста Геймса-Ховелла (Games-Howell). Все данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.0. Статистически значимой считали величину $P < 0,05$.

Исследование 3. Выяснение наличия взаимосвязи между вариацией числа копий (CNV) и экспрессией гена для EPH2 в случае типов множественных опухолей.

Методы.

1. Выберите все исследования на портале cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) и ищите исследования для EPH2.

(a) Удалите предварительные исследования.

(b) Снимите выделение "исследования с перекрывающимися образцами" для предотвращения ошибки выборки (на основе предупреждения в портале cBioPortal), всегда выбирайте исследование PanCancer, если можно использовать этот выбор.

(c) Исследования, выбранные для анализа (табл. 13).

Таблица 13

Исследования, подвергнутые анализу на портале cBioPortal, и подразделы в исследовании

Название исследования	Подразделы
Инвазивная карцинома молочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Плоскоклеточная карцинома легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Папиллярная почечно-клеточная карцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Светлоклеточная карцинома почки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома толстой кишки (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Уротелиальная карцинома мочевого пузыря (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Увеальная меланома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)

Серозная цистаденокарцинома яичников (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Рак молочной железы (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)	Экспрессии мРНК (микроматричный анализ)
Мезотелиома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Колоректальная аденокарцинома (TCGA, Nature 2012)	РНК последовательность RPKM
Плоскоклеточная карцинома шейки матки (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Саркома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Энциклопедия линий раковых клеток (Novartis/Broad, Nature 2012)	Экспрессии мРНК (микроматричный анализ)
Аденокарцинома прямой кишки (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Гепатоцеллюлярная карцинома печени (TCGA, PanCancer Atlas)	EPHA2: экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома желудка (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Эндометриальная карцинома тела матки (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Меланома кожи (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома предстательной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)

Хромофобная почечно-клеточная карцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Опухоль Вильмса в детском возрасте (TARGET, 2018)	Era2: экспрессия мРНК (PHK-последовательность RPKM)
Феохромоцитомы и параганглиомы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Карцинома щитовидной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома пищевода (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Холангиокарцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Глиома головного мозга низкой степени злокачественности (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Тимомы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Острый лимфолейкоз в детском возрасте - фаза II (TARGET, 2018)	Era2: экспрессия мРНК (PHK-последовательность RPKM)
Диффузная В-крупноклеточная лимфома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Мультиформная глиобластома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Метастатический рак предстательной железы, SU2C/PCF Dream Team (Robinson et al., Cell 2015)	Экспрессия мРНК/захват (PHK-последовательность RPKM)
Острый миелолейкоз (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)

Опухоли половых клеток яичка (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Адренокортикальная карцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Карциносаркома матки (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома поджелудочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома предстательной железы (MSKCC, Cancer Cell 2010)	Экспрессия мРНК
Аденокарцинома предстательной железы (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	Экспрессия мРНК

2. Экспортируйте данные по вариациям числа копий (CNV) и экспрессии РНК из портала sBioPortal.

3. Проведите тест на то, что вариации числа копий (CNV) статистически значимо связаны с изменениями экспрессии мРНК для EphA2 (log2 не используют).

(a) Запустите непараметрический критерий Крускала-Уоллиса в программе GraphPad Prism (7.04) и R/R studio (пороговое значением для значимости: $p < 0,01$).

(i) GraphPad Prism: установите столбец в таблице, запустите непараметрический критерий без подгонки или сопряжения и не выдвигайте предположение о распределении Гаусса.

(ii) Пакеты, используемые в R:

1) XLConnect;

2) dplyr;

3) критерий для суммы рангов Крускала-Уоллиса: `Kruskal.test`;

4) проведите коррекцию для множественных сравнений (включите все возможные сравнения, даже если $n=1$ внутри группы) в R/Rstudio, используя критерий Данна (пороговое значением для значимости: $p < 0.025$).

(a) `dunn.test` с методом множественного сравнения = "бонферрони".

Результаты.

Результаты представлены в табл. 14 ниже. Во всех 41 общедоступных наборах данных, собранных на портале sBioPortal, в которых сообщается как о вариации числа копий (CNV), так и экспрессии гена мРНК для EphA2, существуют многочисленные типов рака, при которых сообщали о случаях мелких делециях EphA2 (<2 копий). Хотя это встречалось и более редко, но, при этих же самых типах рака, субпопуляция опухолей скрывала глубокие делеции EphA2 (потеря >1 копии или биаллельная потеря), приращения EphA2 (2-3 копии) или амплификации EphA2 (>3 копий). Случаи, при которых >33% опухолей имели либо мелкие делеции, либо глубокие делеции, в EphA2 включали: хромофобную почечно-клеточную карциному, холангиокарциному, феохромоцитому и параганглиому, плоскоклеточный рак легкого, молочной железы, прямой кишки, глиому головного мозга низкой степени злокачественности, рак печени, адренокортикальную карциному, мезотелиому, аденокарциному пищевода и рак толстой кишки. В отличие от этого, не было исследований, при которых >33% образцов имели либо приращения, либо амплификацию в EphA2. Взятые в совокупности, эти результаты показывают, что делеции в EphA2 ДНК обнаруживаются для целого ряда типов рака.

Приблизительно одна треть из всех образцов, проанализированных в 41 исследовании, скрывала вариации числа копий (CNV) EphA2. Исходя из этого высокого процента вариаций числа копий (CNV) во всех исследованиях и высокого процента мелких делеций в опухолях специфического типа, проводили статистическое испытание для выявления возможных взаимосвязей между изменениями числа копий и экспрессией РНК. Опухоли по признаку были отнесены к 1 из 5 классов:

a) глубокая делеция;

b) мелкая делеция;

c) диплоид;

d) приращение; или

е) амплификация.

Затем проводили тест Краскела-Уоллиса с целью выявления наличия отличий между классами ($P < 0,01$) при распределении величин экспрессии мРНК по классам. Для этих наборов данных TCGA с $P < 0,01$ и для определения, какие классы отличались друг от друга, было проведено апостериорное тестирование путем расчета Z-статистики с скорректированными вычисленными P-величинами (Бонферрони). Для простоты интерпретации, рассматривали попарные сравнения против диплоида по показателю (хотя рассчитывали все попарные P-величины). 19/41 из этих исследований имели в тесте Краскела-Уоллиса p-величину $< 0,01$, что указывало на то, что число копий статистически значимо связано с экспрессией РНК. Из этих 19 исследований, 17 из них имели поправку Бонферрони $P < 0,025$ для диплоида относительно мелкой делеции, что указывало на взаимосвязь снижения экспрессии Epha2 mRNA со уменьшением числа копий Epha2. Только 2 из этих 19 исследований имели поправку Бонферрони $P < 0,025$ для диплоида относительно приращения, и эти оба исследования были исследованиями рака молочной железы. Кроме того, одно из этих исследований рака молочной железы (инвазивная карцинома молочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)) имела поправку Бонферрони $P < 0,025$ как для диплоида относительно мелкой делеции, так и для диплоида относительно приращения, что позволяло предположить, что альтерации числа копий могут иметь сильное влияние на экспрессию Epha2 РНК при раке молочной железы.

Центральная догма генетики предполагает, что уменьшение числа копий в Epha2 приводит к снижению экспрессии РНК и белка. Поэтому наблюдаемые взаимосвязи между потерей числа копий Epha2 и снижением экспрессии мРНК при различных типах опухолей позволяют предположить, что может быть также снижена и экспрессия белка Epha2. Аналогично, приращение числа копий Epha2 при раке молочной железы, которые были взаимосвязаны с повышением экспрессии мРНК, может также предполагать повышение экспрессии белка Epha2. Более того, более высокая экспрессия белка Epha2 (измеряемая методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS)) связана с повышением эффективности в отношении Epha2 конкретных бициклических конъюгатов лекарственных средств по изобретению (измеряемой по объему опухоли) в преclinical in vivo моделях. Исходя из совокупности приведенных выше фактов, можно предположить, что если альтерации числа копий, которые взаимосвязаны с изменениями экспрессии мРНК, действительно позволяют предсказывать уровни экспрессии белка, то тогда пациенты с опухолями, содержащими делеции числа копий Epha2, могут, с определенной долей вероятности, в меньшей степени отвечать на лечение бициклическими конъюгатами лекарственных средств по изобретению, специфичных к Epha2. Аналогично, если пациенты с опухолью имеют приращение числа копий Epha2 (например, при раке молочной железы), то, возможно, что эти пациенты, с определенной долей вероятности, будут в большей степени отвечать на лечение бициклическими конъюгатами лекарственных средств по изобретению в отношении Epha2. Поэтому, если пациенты были разделены на группы по статусу числа копий Epha2, то эта информация могла бы быть использована как для исключения, так и для отбора пациентов с целью повышения эффективности лечения бициклическими конъюгатами лекарственных средств по изобретению, специфичных к Epha2.

Таблица 14

Результаты изучения взаимосвязи между вариациями числа копий (CNV) и экспрессией гена для Epha2

Название исследования	Подразделы	Число образцов/группа (n=X)					Критерий Краскела-Уоллиса			Парное сравнение, Z- статистика(поправка r-величины), Бонферрони			
		Глубокая делеция	Мелкая делеция	Диплоид	Приращени	Амплифика	Статистика Краскела-Уоллиса	r-величина	Глубокая делеция - диплоид	Диплоид - мелкая делеция	Диплоид-приращени	Амплифика ция - диплоид	
Инвазивная карцинома молочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369	5	415	511	61	2	80,816	$< 2,2E-16$	0,176118 (1,0000)	6,460580 (0,0000)*	- 4,603180 (0,0000)*	0,713978 (1,0000)	
Плоскоклеточная карцинома легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из	3	207	201	55	0	52,942	1,89E-11	-1,584610 (0,3392)	6,786501 (0,0000)*	- 0,019607 (1,0000)	N/A	

	Иllumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369											
Папиллярная почечно- клеточная карцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализован ная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	1	48	224	0	1	42,161	3,71E-09	-1,586207 (0,3381)	6,097375 (0,0000)*	N/A	1,549107 (0,3641)
Светлоклеточна я карцинома почки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализован ная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	0	69	278	5	0	38,342	4,72E-09	N/A	6,133219 (0,0000)*	- 0,487059 (0,9393)	N/A
Аденокарцином а толстой кишки (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализован ная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	3	132	245	8	0	35,397	1,00E-07	-2,158194 (0,0927)	5,670600 (0,0000)*	0,781046 (1,0000)	N/A
Плоскоклеточна я карцинома голова и шея (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализован ная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	3	86	345	54	0	32,72	3,69E-07	-2,444914 (0,0435)	4,680789 (0,0000)*	- 1,530670 (0,3776)	N/A
Уротелиальная карцинома мочевого пузыря (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализован ная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	0	73	245	80	4	28,906	2,34E-06	N/A	5,203251 (0,0000)*	0,211744 (1,0000)	0,581704 (1,0000)
Увеальная меланома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализован ной/объединен ной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	0	24	56	0	0	21,051	4,47E-06	N/A	4,588095 (0,0000)*	N/A	N/A

Аденокарцином а легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализован ная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	1	115	263	121	3	28,874	8,29E-06	-0,690460 (1,0000)	4,280100 (0,0001)*	- 0,626707 (1,0000)	2,276458 (0,1141)
Серозная цистаденокарци нома яичников (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализован ной/объединен ной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	0	59	78	60	4	25,349	1,31E-05	N/A	4,390097 (0,0000)*	- 0,239249 (1,0000)	0,240543 (1,0000)
Рак молочной железы (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)	Экспрессии мРНК (микроматрич ный анализ)	1	491	1349	25	0	23,875	2,65E-05	0,568937 (1,0000)	2,274564 (0,0688)	- 4,115288 (0,0001)*	N/A
Мезотелнома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализован ной/объединен ной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	0	29	50	3	0	18,866	8,00E-05	N/A	4,319425 (0,0000)*	0,170478 (1,0000)	N/A
Колоректальная аденокарцином а (TCGA, Nature 2012)	РНК последо вательность RPKM	0	53	138	2	0	18,847	8,08E-05	N/A	4,298092 (0,0000)*	- 0,338975 (1,0000)	N/A
Плоскоклеточна я карцинома шейки матки (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализован ная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	1	31	167	76	0	19,435	2,22E-04	-1,618248 (0,3168)	3,429609 (0,0018)*	- 1,446339 (0,4442)	N/A
Саркома (TCGA,	Партия нормализован ной/объединен	0	43	113	70	4	19,389	2,27E-04	N/A	3,666949 (0,0007)*	- 0,852454 (1,0000)	0,953027 (1,0000)

PanCancer Atlas)	ной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369													
Энциклопедия линий раковых клеток (Novartis/Broad, Nature 2012)	Экспрессии мРНК (микроматричный анализ)	17	279	418	150	13	20,977	0,00032	-2,084879 (0,1854)	-3,615935 (0,0015)*	-	2,007004 (0,2237)	-	0,108880 (1,0000)
Аденокарцинома прямой кишки (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	1	54	78	3	0	18,215	0,0003971	-1,926519 (0,1621)	3,877166 (0,0003)*	1,167400 (0,7291)		N/A	
Гепатоцеллюлярная карцинома печени (TCGA, PanCancer Atlas)	EPHA2: экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	1	130	194	21	2	15,514	0,003745	0,302341 (1,0000)	3,697248 (0,0011)*	-	0,336659 (1,0000)	0,454454 (1,0000)	
Аденокарцинома желудка (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	2	90	264	44	7	13,966	0,007404	-2,072978 (0,1909)	1,606072 (0,5413)	-	1,750466 (0,4002)	1,602806 (0,5449)	
Эндометриальная карцинома тела матки (TCGA,	Партия нормализованной/объединенной экспрессии	3	61	395	43	5	12,916	0,0117	-1,905863 (0,2833)	1,039307 (1,0000)	-	1,597383 (0,5509)	2,268798 (0,1164)	

PanCancer Atlas)	мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369											
Меланома кожи (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	2	70	216	72	3	12,242	0,01564	1,094526 (1,0000)	2,674493 (0,0374)	0,095966 (1,0000)	1,692628 (0,4526)
Аденокарцинома предстательной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	0	44	438	4	1	10,112	0,01764	N/A	2,905502 (0,0110)*	1,374609 (0,5078)	- 0,082790 (1,0000)
Хромофобная почечно-клеточная карцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	0	52	12	1	0	7,8781	0,01947	N/A	2,498340 (0,0187)*	1,863169 (0,0937)	N/A
Опухоль Вильмса в детском возрасте (TARGET, 2018)	Epha2: экспрессия мРНК (РНК-последовательность, RPKM)	0	22	74	5	0	7,4912	0,02362	N/A	2,690766 (0,0107)*	- 0,173274 (1,0000)	N/A
Феохромоцитомы и параганглиомы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	4	96	60	1	0	8,8074	0,03196	-1,411567 (0,4742)	2,201344 (0,0831)	1,946134 (0,1549)	N/A

Карцинома щитовидной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	0	4	474	2	0	5,1773	0,08	N/A	2,221884 (0,0394)	0,503577 (0,9218)	N/A
Аденокарцинома пищевода (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	1	64	83	32	1	7,6886	0,1037	-1,462679 (0,7178)	0,910990 (1,0000)	- 1,682311 (0,4625)	- 0,362298 (1,0000)
Холангиокарцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	2	27	7	0	0	4,1691	0,1244	-2,037840 (0,0623)	0,972100 (0,4965)	N/A	N/A
Глиома головного мозга низкой степени	RSEM (партия, нормализованная из Illumina	0	191	303	13	0	4,0473	0,1322	N/A	0,722383 (0,7051)	- 1,771514 (0,1147)	N/A
злокачественности (TCGA, PanCancer Atlas)	HiSeq_RNASe qV2)											
Тимома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	0	8	110	1	0	4,0322	1,33E-01	N/A	1,982334 (0,0712)	0,369115 (1,0000)	N/A
Острый лимфолейкоз в детском возрасте - фаза II (TARGET, 2018)	Epha2: экспрессия мРНК (РНК-последовательность RPKM)	1	6	70	4	0	5,5309	0,1368	1,437404 (0,4518)	-0,805100 (1,0000)	1,607586 (0,3238)	N/A
Диффузная В-крупноклеточная лимфома	Экспрессия мРНК, RSEM (партия,	0	4	33	0	0	1,744	0,1866	N/A	1,320613 (0,0933)	N/A	N/A

(TCGA, PanCancer Atlas)	нормализованная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)											
Мультиформная глиобластома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	0	13	104	28	0	2,9376	0,2302	N/A	1,428778 (0,2296)	- 0,716110 (0,7109)	N/A
Метастатический рак предстательной железы, SU2C/PCF Dream Team (Robinson et al., Cell 2015)	Экспрессия мРНК/захват (PHK-последовательность RPKM)	2	21	87	7	0	4,069	0,254	-1,812613 (0,2097)	0,992571 (0,9628)	0,314089 (1,0000)	N/A
Острый миелолейкоз (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	0	1	160	4	0	2,4016	0,301	N/A	-1,539142 (0,1857)	- 0,199532 (1,0000)	N/A
Опухоли половых клеток яичка (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASe qV2 syn4976369	1	29	92	22	0	3,3144	0,3456	0,574846 (1,0000)	-0,443110 (1,0000)	- 1,751161 (0,2398)	N/A
Адренокортикальная карцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASe qV2)	0	28	47	1	0	2,0003	0,3678	N/A	1,346397 (0,2673)	0,550103 (0,8734)	N/A
Карциносаркома матки (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной	0	16	22	16	2	2,44	0,4862	N/A	0,476071 (1,0000)	- 0,550292 (1,0000)	1,215102 (0,6730)

	экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeq v2 syn4976369											
Аденокарцинома поджелудочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeq v2 syn4976369	2	50	106	9	1	3,3833	4,96E-01	-1,195082 (1,0000)	0,159442 (1,0000)	- 0,602558 (1,0000)	1,217697 (1,0000)
Аденокарцинома предстательной железы (MSKCC, Cancer Cell 2010)	Экспрессия мРНК	0	5	77	3	0	1,3139	0,5184	N/A	-0,406579 (1,0000)	- 1,089948 (0,4136)	N/A
Аденокарцинома предстательной железы (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	Экспрессия мРНК	0	39	84	10	0	0,028351	0,9859	N/A	0,160404 (1,0000)	0,079785 (1,0000)	N/A

Исследование 4. In vivo эффективность BCY6136 в ксенотрансплантатных моделях CDX.

В исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в трех полученных моделях раковых клеточных линий (CDX): линии фибросаркомы HT1080, линии трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 и линии немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) NCI-H1975.

(a) Методика проведения эксперимента.

Мышам линии Balb/c подкожно инокулировали опухолевые клетки в правую боковую поверхность, и лечение с помощью лекарственного средства начинали, когда средний объем опухоли достигал от 150 до 200 мм³. Измерения опухоли и статистический анализ проводили так, как описано выше. Несущим опухоль животным вводили один раз в неделю BCY6136 или плацебо.

(b) Обсуждение.

На фиг. 4-6 показано, что BCY6136 является эффективным в ксенотрансплантатных моделях рака молочной железы, легкого и фибросаркомы после дозирования один раз в неделю.

Модель фибросаркомы HT1080

В модели HT1080 полный регресс роста опухоли достигался ко дню 14 после дозирования BCY6136 один раз в неделю в дни 0 и 7 при дозе 3 и 5 мг/кг (фиг. 2). Дозирование BCY6136 один раз в неделю при дозе 2 мг/кг в дни 0 и 7 вызывало остановку роста опухоли (частичный регресс) (фиг. 2). Лечение с применением BCY6136 приводило к незначительной потере массы тела, и на протяжении всего исследования не обнаруживались неблагоприятные клинические проявления у подвергнутых лечению лекарственным средством мышей.

Модель NCI-H1975 NSCLC.

Полный регресс роста опухоли в модели NCI-H1975 наблюдался приблизительно на день 28 после дозирования BCY6136 один раз в неделю при дозе 2 и 3 мг/кг (фиг. 3). После прекращения дозирования на день 35, не обнаруживалось возобновление роста опухоли у животных, которым вводили дозу 3 мг/кг, в период от дня 35 до дня 72, когда были закончены измерения размера передней лапы животных, которым вводили дозу 3 мг/кг (фиг. 3). Дозирование BCY6136 при величине дозы 2 мг/кг вызывало полный регресс в этой модели приблизительно со дня 28. После прекращения дозирования на день 35, не обнаруживалось возобновление роста опухоли приблизительно вплоть до дня 51 при величине дозы 2 мг/кг. При этом уровне дозы наблюдалось умеренное возобновление роста опухоли приблизительно от дня 51 и вплоть до окончания исследования в день 77. Лечение с помощью BCY6136 при дозе 1 мг/кг вызывало

остановку роста опухоли (частичный регресс) (фиг. 3). Лечение с применением ВСУ6136 вызывало незначительную потерю массы тела, и на протяжении всего исследования не обнаруживались неблагоприятные клинические проявления у подвергнутых лечению лекарственным средством мышей.

Модель рака молочной железы MDA-MB-231.

Остановку роста опухоли (частичный регресс) наблюдали в модели MDA-MB231 после дозирования один раз в неделю при дозе 2 и 3 мг/кг от дня 0 до дня 45 (фиг. 4). Наблюдалась некоторая потеря массы тела (относимая за счет массы опухоли) у животных, которым вводили дозу 2 мг/кг.

Эти результаты показывают, что ВСУ6136 вызывает глубокое ингибирование роста опухоли у мышей, которым имплантировали ксенотрансплантаты CDX фибросаркомы, рака молочной железы и рака легкого, после дозирования один раз в неделю.

Исследование 5. Исследования безопасности на крысах.

Шесть (6) самцов крыс распределяли случайным образом на 3 группы по 2 крысы в группе для определения токсичности ВСУ6136, затем вводили внутривенно болюсную инъекцию при дозе 5, 7,5 и 10 мг/кг в дни 1 и 8. Исследование заканчивали на день 15.

Не было обнаружено значительных воздействий на показатели коагуляции (протромбиновое время (сек), активированное парциальное тромбопластиновое время (сек) или уровни фибриногена (г/л)) в дни 2, 12 и 15 (данные не показаны). Не сообщалось по поводу прижизненных случаев кровотечения, и не было обнаружено доказательств внутреннего кровотечения после патологоанатомического вскрытия.

Исследование 6. Исследования безопасности на яванских макаках.

Проводили токсикологические исследования продолжительностью двадцать восемь дней при применении ВСУ6136 на яванских макаках. ВСУ6136 дозировали в дозе 1,0 и 2,0 мг/кг в дни 1, 8, 15 и 22. Животных подвергали эвтаназии и проводили вскрытие в день 29 (через 7 дней после введения последней дозы).

Не было обнаружено значительных воздействий на показатели коагуляции по сравнению с исходным уровнем в дни 18, 22 и 25 (данные не показаны) и день 29 (табл. 15). Не сообщалось по поводу прижизненных случаев кровотечения, и не было обнаружено доказательств внутреннего кровотечения после патологоанатомического вскрытия.

Таблица 15

Показатели коагуляции на день 29 после дозирования ВСУ6136 яванским макакам при дозе 1,0 и 2,0 мг/кг

	1,0 мг/кг x 4		2,0 мг/кг x 4	
	Исходный уровень	День 29	Исходный уровень	День 29
Протромбиновое время (сек)	13,4	11,7	9,4	9,7
Протромбиновое время (сек)	11	9,2	11,2	11,0
Активированное парциальное тромбопластиновое время (сек)	18,9	19,4	19,4	20,9
Активированное парциальное тромбопластиновое время (сек)	16,1	15,7	18,7	18,2
Уровни фибриногена (г/л)	2,08	2,42	1,86	6,1
Уровни фибриногена (г/л)	2,28	2,35	1,82	3,1

Исследование 7. Исследование *in vivo* эффективности ВСУ6136 и ADC при лечении ксенотрансплантата РС-3 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(а) Цель исследования.

Целью исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой активности ВСУ6136 при лечении ксенотрансплантата РС-3.

(б) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	-	10	внутривенно	раз в неделю
2	BCY6136	3	1	10	внутривенно	раз в неделю
3	BCY6136	3	2	10	внутривенно	раз в неделю
4	BCY6136	3	3	10	внутривенно	раз в неделю
5	ADC	3	3	10	внутривенно	раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Клетки опухоли РС-3 следует содержать в среде F12K, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки следует пересевать стандартным методом два раза в неделю. Для инокуляции опухоли, следует собирать клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, и подсчитывать их.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мыши следует инокулировать подкожно в правую боковую поверхность опухолевые клетки РС-3 (10×10⁶). Животных следует рандомизировать, и лечение следует начинать, когда средний объем опухоли достигнет приблизительно 150 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в следующей таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецептúra приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат/уксусная кислота pH 5 10% сахарозы
BCY6136	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл буфера для плацебо
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл буфера для плацебо
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл буфера для плацебо
ADC	0,3	Разбавить 26 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 874 мкл буфера для ADC

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста представлена на фиг. 5 и 6.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат РС-3, приведен в табл. 16.

Таблица 16

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени											
Группа	Лечение	0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Плацебо, один раз в неделю	149±9	235±9	377±9	718±30	1126±41	1431±79	1792±69	2070±152		
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	150±11	185±25	228±31	201±17	183±23	153±38	137±33	107±32	64±28	45±23
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	149±18	179±28	158±22	137±16	122±15	114±20	101±16	79±20	57±19	42±17
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	149±2	155±8	144±16	132±20	107±28	94±23	83±22	70±27	38±16	35±17
5	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	151±27	203±10	210±12	189±11	185±16	190±37	158±36	124±35	103±27	74±14
Группа	Лечение	23	25	28	30	32	35	37	39	42	
1	Плацебо, один раз в неделю										
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	35±18	28±14	37±19	34±17	42±21	42±23	43±21	28±14	18±9	
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	21±11	22±12	22±12	24±12	33±16	22±11	26±14	22±12	16±9	
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	21±10	23±12	27±14	22±11	24±12	20±11	27±14	12±6	12±6	
5	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	53±16	50±22	46±23	70±35	78±39	53±27	60±30	53±27	40±22	

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в ксенотрансплантатной модели PC-3 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 16 после начала лечения.

Таблица 17

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	2070±152	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	107±32	5,2	102,2	p<0,001
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	79±20	3,8	103,6	p<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	70±27	3,4	104,1	p<0,001
5	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	124±35	6,0	101,4	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность испытуемых препаратов в ксенотрансплантатной модели PC-3. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 5 и 6 и в табл. 16 и 17.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили плацебо, достигал 2070 мм³ на день 16. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг, один раз в неделю (TV=107 мм³, TGI=102,2%, p<0,001), BCY6136 при дозе 2 мг/кг, один раз в неделю (TV=79 мм³, TGI=103,6%, p<0,001) и BCY6136 при 3 мг/кг, один раз в неделю (TV=70 мм³, TGI=104,1%, p<0,001) демонстрировал мощное противоопухолевое действие. В этом исследовании, регулярно контролировали массу тела животных. У всех мышей масса тела сохранялась на нормальном уровне.

Исследование 8. Изучение in vivo эффективности BCY6136 при лечении бестимусных мышей линии Balb/c в ксенотрансплантатной модели PC-3.

(a) Цель исследования.

Целью исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой активности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата PC-3 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	N ^a	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	--	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
2	BCY6136	0,167	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
3 ^b	BCY6136	0,5	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
4	BCY6136	1,5	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
5 ^b	BCY6136	0,5	4	внутривенно	Один раз в две недели x 2 недели
6 ^b	BCY6136	1,5	4	внутривенно	Один раз в две недели x 2 недели
7	EphA2-ADC	0,33	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
8	EphA2-ADC	1	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
9	EphA2-ADC	3	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
10 ^c	Доцетаксел	15	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели

^a N, число животных в каждой группе.

^b После 4 недельного лечения, представленного в таблице дизайна эксперимента, мышей в группах 3, 5 и 6 подвергали лечению с помощью BCY6136 в дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю от дня 52 по схеме текущего контроля.

^c Вследствие очень большой потери массы тела у мышей после первого дозирования, которых подвергали лечению доцетакселом, лечение приостанавливали в течение 2 недель, затем на день 28 проводили лечение при более низкой дозе (доцетаксел, 10 мг/кг). После чего, мышей подвергали лечению с помощью BCY6136 при дозировании 1,5 мг/кг один раз в неделю со дня 42 до дня 70.

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Опухолевые клетки содержали в среде F12K, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки пересеивали стандартным методом два раза в неделю. Для инокуляции опухоли, собирали клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мышши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность опухолевые клетки PC-3 (10×10⁶) в 0,2 мл PBS. Когда средний объем опухоли достигал 454 мм³, 52 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в следующей таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Чистота	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	-	25 мМ гистидина рН 7 10% сахарозы
BCY6136	98,6%	-	50 мМ ацетата 10% сахарозы рН 5
		1	Растворить 2,70 мг BCY6136 в 2,662 мл ацетатного буфера
		0,3	Разбавить 300 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 700 мкл ацетатного буфера ¹
		0,15	Разбавить 600 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 600 мкл ацетатного буфера
		0,05	Разбавить 200 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 1000 мкл ацетатного буфера
		0,0167	Разбавить 66,7 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 1133,3 мкл ацетатного буфера
		-	25 мМ гистидин рН 5,5
EphA2-ADC	-	0,033	Разбавить 9,3 мкл исходного раствора 4,24 мг/мл EphA2-ADC с помощью 1191 мкл гистидинового буфера
		0,1	Разбавить 28 мкл исходного раствора 4,24 мг/мл EphA2-ADC с помощью 1172 мкл гистидинового буфера
		0,3	Разбавить 84,9 мкл исходного раствора 4,24 мг/мл EphA2-ADC с помощью 1115 мкл гистидинового буфера
Доцетаксел	-	10	Смешать 0,5 мл 20 мг доцетаксела с 1,5 мл буфера
		1,5	Разбавить 180 мкл исходного раствора 10 мг/мл доцетаксела с помощью 1020 мкл солевого буфера

¹ 50 мМ ацетат 10% сахарозы рН 5,3. 25 мМ гистидин рН 5,5.

(с) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 7.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самцов бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат РС-3, приведен в табл. 18.

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени (от дня 0 до дня 20)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения									
		0	2	4	6	8	10	13	15	17	20
1	Плацебо, один раз в неделю	456±25	648±50	880±23	1022±29	1178±118	1327±133	1631±93	1868±90	2052±139	2364±102
2	BCY6136 0,167 мг/кг, один раз в неделю	450±33	631±55	695±78	739±39	850±68	904±73	975±47	1089±74	1124±92	1188±111
3	BCY6136 0,5 мг/кг, один раз в неделю	451±47	622±96	519±70	460±55	398±50	329±38	260±33	249±33	231±38	234±42
4	BCY6136 1,5 мг/кг, один раз в неделю	458±49	587±63	494±54	363±32	283±32	237±24	192±13	164±16	155±20	131±19
5	BCY6136 0,5 мг/кг, один раз в две недели	454±37	643±25	531±37	458±33	411±32	382±49	430±88	522±124	560±129	530±147
6	BCY6136 1,5 мг/кг, один раз в две недели	452±42	590±75	457±49	375±44	328±47	242±63	206±61	197±62	182±55	128±36
	1,5 мг/кг, один раз в неделю										
7	ErbA2-ADC 0,33 мг/кг, один раз в две недели	457±43	636±57	712±70	792±78	870±87	900±58	1049±66	1242±123	1443±129	1637±181
8	ErbA2-ADC 1 мг/кг, один раз в две недели	450±49	617±48	673±50	721±61	782±78	755±67	840±93	913±91	978±100	981±100
9	ErbA2-ADC 3 мг/кг, один раз в две недели	452±60	593±98	643±141	593±106	433±103	290±81	268±64	232±60	225±66	184±62
10	Доцетаксел	453±62	584±72	632±56	636±48	568±50	408±31	374±26	388±36	361±25	419±31
	15 мг/кг, один раз в две недели										

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в ксенотрансплантатной модели РС-3 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 20 после начала лечения.

Таблица 19

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	2364±102	--	--	--
2	BCY6136, 0,167 мг/кг, один раз в неделю	1188±111	50,2	61,4	p<0,001
3	BCY6136, 0,5 мг/кг, один раз в неделю	234±42	9,9	111,4	p<0,001
4	BCY6136, 1,5 мг/кг, один раз в неделю	131±19	5,5	117,2	p<0,001
5	BCY6136, 0,5 мг/кг, один раз в две недели	530±147	22,4	96,0	p<0,001
6	BCY6136, 1,5 мг/кг, один раз в две недели	128±36	5,4	117,0	p<0,001
7	EphA2-ADC, 0,33 мг/кг, один раз в неделю	1637±181	69,2	38,1	p<0,001
8	EphA2-ADC, 1 мг/кг, один раз в неделю	981±100	41,5	72,2	p<0,001
9	EphA2-ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	184±62	7,8	114,0	p<0,001
10	Доцетаксел, 15 мг/кг, один раз в неделю	419±31	17,7	101,8	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(d) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность испытываемых препаратов в ксено-трансплантатной модели РС-3. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 7 и в табл. 18 и 19.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили плацебо, достигал 2364 мм³ на день 20. Препарат BCY6136 при дозе 0,167 мг/кг один раз в неделю (TV=1188 мм³, TGI=61,4%, p<0,001), при и дозе 0,5 мг/кг один раз в две недели (TV=530 мм³, TGI=96,0%, p<0,001), при дозе 0,5 мг/кг один раз в неделю (TV=234 мм³, TGI=111,4%, p<0,001) и при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю (TV=131 мм³, TGI=117,2%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность, зависящую от дозы или от частоты введения дозы, на день 20. Препарат BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в две недели (TV=128 мм³, TGI=117,0%, p<0,001) проявлял сопоставимую противоопухолевую активность с препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю. Из них, мыши, подвергаемые лечению препаратом BCY6136 при дозе 0,5 мг/кг один раз в неделю или препаратом BCY6136 при дозе 0,5 мг/кг один раз в две недели, обнаруживали очевидный рецидив опухоли после прекращения лечения, дальнейшее лечение препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю со дня 52 давало хороший результат по регрессу опухоли. Мыши, подвергавшиеся лечению препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в две недели, также обнаруживали рецидив опухоли после прекращения лечения, но дальнейшее дозирование не приводило к полному регрессу опухоли. Мыши, подвергавшиеся лечению препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю, не обнаруживали рецидива опухоли вплоть до дня 48.

Препарат EphA2-ADC при дозе 0,33 мг/кг один раз в неделю (TV=1637 мм³, TGI=38,1%, p<0,001), при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=981 мм³, TGI=72,2%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг, один раз в неделю (TV=184 мм³, TGI=114,0%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность, зависящую от величины дозы, на день 20. Мыши, подвергнутые лечению препаратом EphA2-ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю, не обнаруживали рецидива опухоли вплоть до дня 59.

Доцетаксел при дозе 15 мг/кг один раз в неделю ($TV=419 \text{ мм}^3$, $TGI=101,8\%$, $p<0,001$) проявлял значительную противоопухолевую активность, но вызывал очень большие потери массы тела у животных. После прекращения лечения, мыши обнаруживали очевидный рецидив опухоли. Лечение препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю со дня 42 давало хороший результат по регрессу опухоли у этих мышей.

Исследование 9. Испытание *in vivo* эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата NCI-H1975 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(a) Цель исследования.

Целью изучения являлась оценка *in vivo* противоопухолевой активности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата NCI-H1975 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозируемый объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Для инокуляции опухоли, собирали клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность опухолевые клетки NCI-H1975 (10×10^6) в 0,2 мл PBS. Когда средний объем опухоли достигал 149 мм^3 , 36 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в следующей таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата.

Лечение	Доза (мг/мл)	Рецептура
Плацебо		50 мМ ацетат, 10% сахара pH 5
BCY6136	1	Растворить 3,79 мг BCY6136 в 3,695 мл буфера для приготовления
	0,3	Разбавить 270 мкл 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл буфера для приготовления
	0,2	Разбавить 180 мкл 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл буфера для приготовления
	0,1	Разбавить 90 мкл 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл буфера для приготовления

(iv) Сбор образцов.

На PG-D44, фиксировали формалином и заливали парафином (FFPE) опухоли группы 2.

В конце исследования, фиксировали формалином и заливали парафином (FFPE) опухоли группы 3.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фигуре 8.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самцов бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат NCI-H1975, приведен в табл. 20-24.

Таблица 20

Объем остаточной опухоли (PG-D0~PG-D17)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения							
		0	2	4	7	9	11	14	17
1	Плацебо, один раз в неделю	148±4	195±11	297±33	466±64	732±107	1028±192	1278±252	1543±298
2	ВСУ6136 1 мг/кг, один раз в неделю	150±6	178±20	232±49	336±43	400±24	407±42	299±113	261±127
3	ВСУ6136 2 мг/кг, один раз в неделю	150±14	181±26	237±27	277±36	297±37	306±55	256±53	218±49
4	ВСУ6136 3 мг/кг, один раз в неделю	148±9	168±10	231±6	365±16	390±13	423±42	319±26	228±16

Таблица 21

Объем остаточной опухоли (PG-D18~PG-D35)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения							
		18	21	23	25	28	30	33	35
1	Плацебо, один раз в неделю	1864±395	2371±470	--	--	--	--	--	--
2	ВСУ6136 1 мг/кг, один раз в неделю	215±113	205±117	197±113	200±105	202±112	202±117	230±142	241±127
3	ВСУ6136 2 мг/кг, один раз в неделю	149±31	99±30	69±22	42±13	30±10	16±8	20±9	4±2
4	ВСУ6136 3 мг/кг, один раз в неделю	149±17	94±30	50±15	41±21	21±8	6±6	10±6	3±1

Таблица 22

Объем остаточной опухоли (PG-D37~PG-D53)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения							
		37	39	42	44	46	49	51	53
2	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю	277±149	294±159	351±188	--	--	--	--	--
3	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	7±4	2±1	1±0	3±1	2±1	3±2	6±3	14±10
4	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	3±3	2±1	1±0	0±0	0±0	0±0	1±0	1±0

Таблица 23

Объем остаточной опухоли (PG-D56~PG-D74)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения								
		56	58	60	63	65	67	70	72	74
3	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	16±11	27±1 8	34±2 3	45±3 1	63±4 0	71±47	95±7 0	111±7 3	122±7 5
4	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	1±0	1±0	1±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	--

Таблица 24

Объем остаточной опухоли (PG-D77~PG-D98)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		77	81	84	88	91	95	98
3	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	208±11 2	337±12 3	501±17 2	626±18 2	856±24 5	1035±1 69	1266±3 9

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования роста опухоли для BCY6136 в ксенотрансплантатной модели NCI-H1975 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 21 после начала лечения.

Таблица 25

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	2371±470	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	205±117	8,6	97,5	p<0,001
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	99±30	4,2	102,3	p<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	94±30	4,0	102,4	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность ВСУ6136 в ксенотрансплантатной модели NCI-H1975. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 8 и в табл. 20-25.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили плацебо, достигал 2371 мм³ на день 21. Препарат ВСУ6136 при дозе 1 мг/кг (TV=205 мм³, TGI=97,5%, p<0,001), при 2 мг/кг (TV=99 мм³, TGI=102,3%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг (TV=94 мм³, TGI=102,4%, p<0,001) проявлял высокую противоопухолевую активность. Препарат ВСУ6136 при дозе 2 мг/кг и 3 мг/кг уничтожал опухоли или вызывал регресс опухоли до малого размера. Лечение приостанавливали со дня 35, и опухоли в группе с дозой 3 мг/кг не обнаруживали очевидного возобновления роста в течение следующих 5-6 недель постоянного наблюдения, однако опухоли в группе с дозой 2 мг/кг обнаруживали очевидное возобновление роста, и возобновление дозирования не приводило к значительному ингибированию опухоли. В этом исследовании, масса тела мышей практически не изменялась.

Исследование 10. Исследование *in vivo* эффективности ВСУ6136 в модели LU-01-0251 PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c.

(a) Цель исследования.

Целью изучения является оценка *in vivo* противоопухолевой активности ВСУ6136 в модели LU-01-0251 PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозируемый объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	ВСУ6136	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	ВСУ6136	5	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	ВСУ6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
5	ADC	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0251 (~30 мм³). Для исследования эффективности, лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 174 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в следующей таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецептúra приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	50 мМ ацетат, 10% сахароза pH 5
ВСУ6136	0,3	Растворить 6,11 мг ВСУ6136 в 20 мл ацетатного буфера ¹
	0,2	Разбавить 940 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл ВСУ6136 с помощью 470 мкл ацетатного буфера
	0,1	Разбавить 470 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл ВСУ6136 с помощью 940 мкл ацетатного буфера
ADC	0,3	Разбавить 43 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 1457 мкл буфера для ADC ²

¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахарозы pH 5.

² Буфер для ADC: 20 мМ гистидин pH 5,5.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 9.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли на день 28 после начала лечения у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0251, приведен в табл. 26.

Таблица 26

День	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
	Плацебо	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю
0	174±17	175±15	174±17	175±14	174±16
3	264±33	230±29	205±21	187±19	227±12
7	403±68	281±55	154±21	118±13	239±42
10	562±83	370±104	111±19	72±12	241±46
14	777±163	362±104	62±17	30±5	191±47
17	1021±246	437±136	46±13	17±3	139±39
21	1472±342	526±167	30±18	4±3	101±31
24	1790±417	491±132	32±24	1±1	70±23
28	2208±512	499±128	32±30	0±0	39±14

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования роста опухоли для BCY6136 и ADC в модели LU-01-0251 PDX рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 28 после начала лечения.

Таблица 27

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	2208±512	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	499±128	22,6	84,0	P<0,001
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	32±30	1,4	107,0	P<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0,0	108,6	P<0,001
5	ADC, 3 мг/кг, один раз в	39±14	1,8	106,6	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 и ADC в модели LU-01-0251 PDX. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 9 и в табл. 26 и 27.

В этом исследовании, средний размер опухоли у мышей, которым вводили плацебо, достигал 2208 мм³ на день 28 после начала лечения. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=499 мм³, TGI=84,0%, p<0,001), при дозе 2 мг/кг, один раз в неделю (TV=32 мм³, TGI=107,0%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=0 мм³, TGI=108,6%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность. Препарат ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=39 мм³, TGI=106,6%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность.

Исследование 11. Исследование *in vivo* эффективности BCY6136 в модели LU-01-0251 PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c.

(a) Цель исследования.

Целью изучения является оценка *in vivo* противоопухолевой активности BCY6136 в модели LU-01-

0251 PDX на бестимусных мышах линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозируемый объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю x 21 неделя
2	BCY6136	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю x 28 недель
3 ^a	BCY6136	5	2	10	внутривенно	один раз в неделю x 70 недель
4 ^b	BCY6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю x 56 недель
5 ^c	ADC	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю x 70 недель

^a Схему дозирования сохраняли от дня 0 до дня 70 для всех мышей в этой группе, затем мышь 3-2 и мышь 3-4 подвергали дополнительному дозированию BCY6136 в дозе 3 мг/кг один раз в неделю со дня 77, в то время как лечение других мышей из группы 3 временно прекращали.

^b Схему дозирования сохраняли от дня 0 до дня 56 для всех мышей в этой группе.

^c Схему дозирования сохраняли от дня 0 до дня 70 для всех мышей в этой группе.

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0251 (~30 мм³). Для исследования эффективности, лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 960 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецептuru приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	25 мМ гистидин 10% сахара pH 7
BCY6136	0,3	0,3 мг/мл BCY6136 получали как описано выше в исследовании 10
	0,2	Разбавить 940 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 470 мкл гистидинового буфера ¹
	0,1	Разбавить 470 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 940 мкл гистидинового буфера
ADC	0,3	Разбавить 43 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 1457 мкл буфера для ADC ²

¹ Гистидиновый буфер: 25 мМ гистидин 10% сахара pH 7.

² Буфер для ADC: 20 мМ гистидин pH 5,5.

(iii) Сбор образцов.

Опухоль мыши #3-2 собирали для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE) на день

94. Опухоли мышей #5-2 и 5-3 собирали и помещали в один блок для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE) на день 140.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 10.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в период времени от дня 0 до дня 28 после начала лечения у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0251, приведен в табл. 28.

Таблица 28

День	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
	Плацебо	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю
0	962±102	963±97	962±137	960±103	959±124
3	1176±108	1003±121	973±105	989±128	1043±158
7	1351±142	1056±151	873±125	890±98	1100±156
10	1591±179	1122±139	722±157	674±96	1172±188
14	1951±225	1417±191	503±151	342±64	1228±174
17	2301±344	1672±262	398±160	216±43	1143±186
21		1794±328	307±169	94±26	996±187
24		1867±408	261±168	62±14	867±178
28		2120±483	217±167	45±16	713±178

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования роста опухоли для BCY6136 и ADC в модели LU-01-0251 PDX рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 17 после начала лечения.

Таблица 29

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	2301±344	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1672±262	72,7	47,0	p>0,05
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	398±160	17,3	142,1	P<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	216±43	9,4	155,6	P<0,001
5	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	1143±186	49,7	86,3	P<0,01

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 и ADC в модели LU-01-0251 PDX. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 10 и в табл. 28 и 29.

В этом исследовании, лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 960 мм³. На день 17 после начала лечения, средний объем опухоли мышей, подвергаемых лечению с помощью плацебо, достигал 2301 мм³. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=1672 мм³, TGI=47,0%, p>0,05) не проявлял очевидной противоопухолевой активности; препарат BCY6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=398 мм³, TGI=142,1%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=216 мм³,

TGI=155,6%, $p<0,001$) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность на день 17.

После лечения в течение 70 дней препаратом BCY6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю, у 3 из 5 этих мышей обнаруживали полный регресс опухоли, у оставшихся 2 мышей обнаруживали очевидный рецидив опухоли от дня 42 до дня 77. При последующем проведении лечения двух рецидивов опухолей препаратом BCY6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю со дня 7, у одной из опухолей достигался очевидный регресс опухоли, в то время как другая опухоль проявляла резистентность к лечению.

После лечения в течение 56 дней препаратом BCY6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю, у всех мышей в этой группе обнаруживали полный регресс опухоли.

Препарат ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю ($TV=1143 \text{ мм}^3$, TGI=86,3%, $p<0,01$) проявлял очевидную противоопухолевую активность на день 17, после проведения лечения в течение еще 53 дней, у этих мышей обнаруживали дополнительный, но не полный регресс опухоли.

В этом исследовании, у некоторых мышей обнаруживалась резкая потеря массы тела, которая может быть связана с длительным периодом кормления иммунодефицитных мышей.

Исследование 12. Исследование *in vivo* эффективности BCY6136 в модели LU-01-0046 NSCLC PDX у бестимусных мышей линии Balb/c.

(a) Цель исследования.

Целью исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности BCY6136 в обширных опухолях LU-01-0046 PDX у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозируемый объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
4	ADC	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0046 (~30 мм³). Лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 1039 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецептúra приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат 10% сахароза pH 5
BCY6136	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1350 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
ADC	0,3	Разбавить 43 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC в 1457 мкл буфера ²

¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахароза pH 5.

² Растворить 0,419 г гидрохлорида гистидина в 100 мл воды, использовать 1М HCl для доведения величины pH 5,5.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 11.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046, представлен в табл. 30.

Таблица 30

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени
(кросс-секционное исследование бициклических препаратов (BCY))

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	4	8	11	15	18	22
1	Плацебо, один раз в неделю	1044±115	1762±178	2404±262	--	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1037±130	1163±146	1927±283	2483±530	--	--	--
3	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	1036±100	784±146	548±107	362±110	325±122	275±152	233±187
4	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	1033±114	1155±230	2200±505	--	--	--	--

Примечание: объем остаточной опухоли не обнаруживали после дня 22 для группы 2 и 4.

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 PDX рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 22 и день 28, соответственно, для двух кросс-секционных исследований после начала лечения.

Таблица 31

Анализ ингибирования роста опухоли (кросс-секционные исследования BCYs на день 22)

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	6186±596*	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	4564±981*	73,8	31,4	p>0,05
3	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	233±187	3,8	115,6	p<0,001
4	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	5446±1250*	88,0	14,2	p>0,05

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

* В некоторых группах исследования прекращали до дня 22, и объем опухоли вычисляли путем использования уравнения экспоненциального роста, представленного ниже.

Группа плацебо: $Y=995,4 \times \exp(0,1134 \times X)$.

Группа BCY6136, 1 мг/кг: $Y=855,0 \times \exp(0,0974 \times X)$.

Группа ADC, 3 мг/кг: $Y=757,4 \times \exp(0,1312 \times X)$.

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании проводили оценку терапевтической эффективности испытуемых препаратов в отношении обширных опухолей LU-01-0046. Измеренные объемы опухолей для всех подвергаемых лечению групп в различные моменты времени представлены на фиг. 11 и в табл. 30 и 31.

В этом исследовании, средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, составлял 6186 мм³ на день 22. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг и препарат ADC при дозе 3 мг/кг не проявляли очевидной противоопухолевой активности, когда размер опухоли перед началом лечения составлял 1000 мм³.

Препарат BCY6136 (TV=233 мм³, TGI=115,6%, p<0,001) при дозе 3 мг/кг проявлял значительную противоопухолевую активность. В частности, применение препарата BCY6136 приводило к полному

уничтожению 2/5 и 4/5 опухолей.

Исследование 13. In vivo эффективность BCY6136 в модели бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046 NSCLC PDX

(a) Цель исследования.

Целью исследования являлась оценка in vivo терапевтической эффективности BCY6136 в модели бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046 NSCLC PDX.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	5	--	внутривенно	один раз в неделю x 2 недели
2	BCY6136	5	1	внутривенно	один раз в неделю x 3 недели
3	BCY6136	5	2	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели
4	BCY6136	5	3	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели
5	ADC	5	3	внутривенно	один раз в неделю x 3 недели
6	ADC	5	5	внутривенно	один раз в неделю x 3 недели

Примечание: исследование в группах прекращали, когда средний объем опухоли превышал 2000 мм³, и опухоли собирали для фиксации формалином и заливки парафином (FFPE): группа 1 на PG-D14, группа 5 на PG-D18, группа 2 и 6 на PG-D21, и группа 3 и 4 на PG-D31.

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли конкретного типа (~30 мм³). Лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал приблизительно 198 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецепт приготовления испытуемого препарата.

Группа	Соединения	Доза (мг/кг)	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
1	Плацебо	-	-	50 mM ацетат, 10% сахараза рН 5 (без DMSO)
2	BCY6136	1	0,1	Растворить 10,93 мг BCY6136 в 10,766 мл среды, используя ультразвуковую обработку, для получения исходного раствора 1 мг/мл BCY6136. Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1350 мкл среды
3	BCY6136	2	0,2	Разбавить 300 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1200 мкл среды
4	BCY6136	3	0,3	исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1050 мкл среды
Буфер 2: растворить 0,419 г гидрохлорида гистидина в 100 мл воды, использовать 1 M HCl для доведения величины рН до 5,5				
5	ADC	3	0,3	Разбавить 43 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 1457 мкл буфера 2
6	ADC	5	0,5	Разбавить 71,6 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 1428,4 мкл буфера 2

Примечание: дозируемый препарат обычно является свежеприготовленным.

(iii) Сбор образцов.

Исследования в группах прекращали, когда средний объем опухоли достигал более 2000 мм³, и, после последнего измерения, опухоли собирали для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE): группа 1 на PG-D14, группа 5 на PG-D18, группа 2 и 6 на PG-D21, и группа 3 и 4 на PG-D31.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 12.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени в модели на самках бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046 NSCLC PDX, представлен в табл. 32.

Таблица 32

Объем остаточной опухоли (мм ³) в зависимости от времени						
Группа	1	2	3	4	5	6
Лечение	Плацебо один раз в неделю	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	ADC 3 мг/кг, один раз в неделю	ADC 5 мг/кг, один раз в неделю
0	201 ± 37	198 ± 39	201 ± 40	200 ± 46	195 ± 28	195 ± 40
3	441 ± 82	310 ± 59	283 ± 77	155 ± 40	418 ± 99	389 ± 68
7	927 ± 171	547 ± 88	423 ± 132	74 ± 19	643 ± 159	596 ± 116
10	1546 ± 377	747 ± 121	321 ± 108	31 ± 8	938 ± 230	882 ± 134
14	2307 ± 594	1058 ± 140	264 ± 95	26 ± 11	1475 ± 466	1215 ± 193
17	-	1390 ± 205	127 ± 41	26 ± 13	2281 ± 556	1576 ± 228
21	-	2138 ± 301	118 ± 34	64 ± 42	-	2049 ± 242
24	-	-	101 ± 40	99 ± 63	-	-
28	-	-	255 ± 140	276 ± 176	-	-
31	--	-	582 ± 346	477 ± 283	-	-

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в модели на бестимусных мышцах линии Balb/c, несущих LU-01-0046 PDX, рассчитывали на основе объема опухоли, измеренного на PG-D14.

Таблица 33

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C (%) ^b	TGI (%) ^c	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо один раз в неделю	2307 ± 594	--	--	--
2	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю	1058 ± 140	45,9	59,1	p<0,05
3	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	264 ± 95	11,4	97,0	p<0,001
4	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	26 ± 11	1,1	108,3	p<0,001
5	ADC 3 мг/кг, один раз в неделю	1475 ± 466	63,9	39,2	p>0,05
6	ADC 5 мг/кг, один раз в неделю	1215 ± 193	52,7	51,6	p>0,05

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывали путем деления среднего объема опухоли в группе для подвергавшейся лечению группы на средний объем опухоли в группе для контрольной группы (T/C).

^c TGI рассчитывали для каждой группы, используя формулу: $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$.

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В настоящем исследовании оценивали терапевтическую эффективность испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 PDX. Измеренные объемы опухолей во всех подвергавшихся лечению группах в различные моменты времени представлены на фиг. 12 и в табл. 32 и 33.

Средний объем опухоли мышцей, которым вводили плацебо, достигал 2307 мм³ на PG-D14. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг (TV=1058 мм³, TGI=59,1%, p<0,05), при дозе 2 мг/кг (TV=264 мм³, TGI=97,0%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг (TV=26 мм³, TGI=108,3%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность. ADC при дозе 3 мг/кг и 5 мг/кг не проявлял явной противоопухолевой активности (p>0,05).

В этом исследовании, масса тела животных во всех группах сохранялась практически постоянной.

Исследование 14. Исследование in vivo эффективности BCY6136, BCY6173 и BCY6175 в модели LU-01-0046 NSCLC PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c.

(a) Цель исследования.

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 NSCLC PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
Часть 1						
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	5	1/2	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
Часть 2						
4	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю
5	BCY6173	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
6	BCY6173	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
7	BCY6175	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента.

(i) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0046 (~30 мм³). Лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 200 мм³, в случае части 1 исследования, и 192 мм³, в случае части 2 исследования. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецептúra приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат 10% сахараза рН 5
BCY6136	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1350 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
BCY6173	0,1	Растворить 3,65 мг BCY6173 в 3,5 мл ацетатного буфера для получения 1 мг/мл исходного раствора. Разбавить 150 мкл 1350 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6173 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
BCY6175	0,3	Растворить 3,02 мг BCY6175 в 2,9 мл ацетатного буфера для получения исходного раствора 1 мг/мл. Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6175 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера

¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахараза рН 5.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 13-15.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли на день 21 после начала лечения у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046, представлен в табл. 34 и 35.

Таблица 34

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени (часть 1)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	3	6	10	14	17	21
1	Плацебо, один раз в неделю	202±2 6	328±4 8	536±6 8	953±10 7	1386±97	1833±13 2	2551±24 2
2	ВСУ6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	200±3 3	293±5 6	426±9 1	682±15 1	964±194	976±258	1285±23 4
3	ВСУ6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	201±3 3	194±3 1	135±2 7	52±18	13±9	4±4	0±0

Таблица 35

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени (часть 2)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	3	7	10	14	17	21
4	Плацебо, один раз в неделю	192±30	311±8 3	562±14 6	830±23 0	1320±44 4	1652±52 8	2342±65 1
5	ВСУ6173, 1 мг/кг, один раз в неделю	191±33	318±5 8	553±88	817±16 5	1314±27 6	1546±27 6	2151±26 2
6	ВСУ6173, 3 мг/кг, один раз в неделю	192±37	259±5 1	400±53	455±28	636±92	646±138	890±260
7	ВСУ6175, 3 мг/кг, один раз в неделю	192±42	186±5 7	92±38	19±11	0±0	0±0	0±0

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 PDX рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 21 после начала лечения.

Таблица 36

Анализ ингибирования роста опухоли (часть 1)

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	2551±242	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1285±234	50,4	53,9	P<0,001
3	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0,0	108,5	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

Таблица 37

Анализ ингибирования роста опухоли (часть 2)

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
4	Плацебо, один раз в неделю	2342±651	--	--	--
5	BCY6173, 1 мг/кг, один раз в неделю	2151±262	91,8	8,9	p>0,05
6	BCY6173, 3 мг/кг, один раз в неделю	890±260	38,0	67,5	P<0,05
7	BCY6175, 3 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0,0	108,9	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 PDX. Измеренные объемы опухолей для всех подвергаемых лечению групп в различные моменты времени представлены на фиг. 13-15 и в табл. 34-37.

В части 1 исследования, средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 2551 мм³ на день 21 после начала лечения.

Препарат BCY6136 при дозе 1/2 мг/кг один раз в неделю (TV=1285 мм³, TGI=53,9%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность, но она не приводила к регрессу опухоли. Препарат BCY6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=0 мм³, TGI=108,5%, p<0,001) полностью уничтожал опухоли, 1 из 5 опухолей, соответственно, в группах с дозированием BCY6136 3 мг/кг обнаруживалось возобновление роста после временного прекращения дозирования, и после возобновления дозирования опухоли были резистентны к лечению препаратом BCY6136. Остальные опухоли в группах дозирования BCY6136 (4/5 в каждой группе) не обнаруживали возобновления роста после 80 дней временного прекращения дозирования.

В части 2 исследования, средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 2342 мм³ на день 21 после начала лечения. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=2151

мм³, TGI=8,9%, p>0,05) не проявлял противоопухолевой активности. BCY6173 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=890 мм³, TGI=67,5%, p<0,05) проявлял очевидную противоопухолевую активность.

Препарат BCY6175 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=0 мм³, TGI=108,9%, p<0,001) полностью уничтожал 4/5 опухолей на день 14.

Исследование 15. Исследование *in vivo* эффективности BCY6136 в модели LU-01-0412 NSCLC PDX на бестимусных мышах линии Balb/c.

(a) Цель исследования.

Целью исследования является оценка *in vivo* терапевтической эффективности BCY6136 в модели LU-01-0412 NSCLC PDX на бестимусных мышах линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозирующийся объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	6	--	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели
2	BCY6136	6	1	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели
3	BCY6136	6	3	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели
4	BCY8245	6	3	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели
5	BCY8781	6	3	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мышке инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0412 (~30 мм³). Животных рандомизировали, когда средний объем опухоли достигал 159 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура

Плацебо	-	25 мМ гистидин 10% сахараза рН 7
BCY6136	1	Растворить 6,06 мг BCY6136 в 5,969 мл 50 мМ ацетат/уксусная кислота рН 5 10% сахараза
	0,1	Разбавить 180 мкл раствора 1 мг/мл BT5528 с помощью 1620 мкл 50 мМ ацетат/уксусная кислота рН 5 10% сахараза
	0,3	Разбавить 540 мкл раствора 1 мг/мл BT5528 с помощью 1260 мкл 50 мМ ацетат/уксусная кислота рН 5 10% сахараза
BCY8245	1	Растворить 4,15 мг порошка BCY8245 в 4,121 мл в буфере для плацебо
	0,3	Разбавить 540 мкл раствора 1 мг/мл BCY8245 с помощью 1260 мкл буфера для плацебо
BCY8781	1	Растворить 4,08 мг порошка BCY8781 в 80,8 мкл DMSO, затем разбавить до 1 мг/мл с помощью 3958 мкл буфера для плацебо
	0,3	Разбавить 540 мкл раствора 1 мг/мл BCY8781 с помощью 1260 мкл буфера для плацебо

(iii) Сбор образцов.

Собирали плазму мышей, которым вводили плацебо и которым вводили BCY6136, BCY8245 и BCY8781, через 30 мин и через 24 ч после дозирования. Собирали опухоли у мышей, которым вводили плацебо и которым вводили BCY6136, BCY8245 и BCY8781, через 24 ч после дозирования.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 16.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии BALB/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0412, представлен в табл. 38.

Таблица 38

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Дни	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
	Плацебо один раз в неделю x 4 недели	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	BCY8245 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	BCY8781 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели
0	159±11	159±13	159±11	159±12	159±11
4	255±12	214±16	197±16	168±18	176±21
7	309±20	237±16	195±16	132±10	167±13
11	395±31	246±19	156±18	78±4	107±15
14	464±31	300±18	177±29	45±5	72±12
18	521±26	369±32	210±32	21±2	44±8
21	611±33	470±46	225±32	11±1	31±6
25	737±68	632±47	252±37	6±1	20±6
28	788±80	664±52	299±37	2±1	14±5
32	1104±142	758±70	416±52	1±1	12±5

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования опухоли для BCY6136, BCY8245 и BCY8781 в ксенотрансплантатной модели LU-01-0412 рассчитывали на основе измерений объема опухолей на день 32 после начала лечения.

Таблица 39

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю x 4 недели	1104±142	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	758±70	68,6	36,7	P<0,05
3	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	416±52	37,6	72,9	P<0,001
4	BCY8245, 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	1±1	0,1	116,8	P<0,001
5	BCY8781, 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	12±5	1,0	115,6	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136, BCY8245 и BCY8781 в ксенотрансплантатной модели LU-01-0412. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 16 и в табл. 38 и 39.

Средний объем опухоли мышей, подвергаемых лечению с помощью плацебо, достигал 1104 мм³ на день 32 после начала лечения. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю × 4 недели (TV=758 мм³, TGI=36,7%, p<0,05) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю × 4 недели (TV=416 мм³, TGI=72,9%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность, но его применение не приводило к регрессу опухоли. Препарат BCY8245 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю × 4 недели (TV=1 мм³, TGI=116,8%, p<0,001) и препарат BCY8781 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю × 4 недели (TV=12 мм³, TGI=115,6%, p<0,001) вызывали очевидный регресс опухоли. В том числе, 5 из 6 опухолей, подвергнутых лечению препаратом BCY8245 в дозе 3 мг/кг, и 2 из 6 опухолей, подвергнутых лечению препаратом BCY8781 в дозе 3 мг/кг, были полностью уничтожены на день 32.

В этом исследовании, у животных во всех группах масса тела сохранялась практически постоянной.

Исследование 16. Исследование *in vivo* эффективности BCY6136 при лечении бестимусных мыши линии Balb/c в модели LU-01-0486 PDX.

(a) Цель исследования.

Целью исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности BCY6136 в модели LU-01-0486 PDX на бестимусных мышках линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозирующий объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	5	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента.

(i) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0486 (~30 мм³). Для исследования эффективности, лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 180 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецепт приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	50 мМ ацетат 10% сахара рН 5
BCY6136	0,3	Раствор 0,3 мг/мл BCY6136 готовили так, как описано в исследовании 10
	0,2	Разбавить 940 мкл раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 470 мкл ацетатного буфера ¹
	0,1	Разбавить 470 мкл раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 940 мкл ацетатного буфера

¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахара рН 5.

(d) Результат.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 17.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли на день 14 после начала лечения у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0486, приведен в табл. 40.

Таблица 40

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени						
Группа	Лечение	Дни после начала лечения				
		0	3	7	10	14
1	Плацебо, один раз в неделю	179±20	232±30	358±45	450±47	651±112
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	180±23	221±20	326±34	420±34	638±71
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	179±27	222±26	365±44	459±82	645±105
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	180±25	209±37	304±51	348±77	449±115

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 в модели LU-01-0486 PDX рассчитывали на основе измерения объема опухоли в день 14 после начала лечения.

Таблица 41

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	651±112	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	638±71	98,0	3,0	p>0,05
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	645±105	99,1	1,2	p>0,05
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	449±115	68,9	43,1	p>0,05

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в модели LU-01-0486 PDX. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 17 и в табл. 40 и 41.

В этом исследовании, средний объем опухоли мышей, подвергаемых лечению с помощью плацебо, достигал 651 мм³ на день 14 после начала лечения. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=638 мм³, TGI=3,0%, p>0,05) и при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=645 мм³, TGI=1,2%, p>0,05) не проявлял противоопухолевой активности. Препарат BCY6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=449 мм³, TGI=43,1%, p>0,05) проявлял в небольшой степени противоопухолевую активность без статистической значимости.

Исследование 17. Испытание in vivo эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата

MDA-MB-231-luc у бестимусных мышей линии Balb/c.

(a) Цель исследования.

Целью исследования являлась оценка *in vivo* противоопухолевой активности ВСУ6136 при лечении бестимусных мышей линии Balb/c в ксенотрансплантатной модели MDA-MB-231-luc.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	ВСУ6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	ВСУ6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	ВСУ6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли MDA-MB-231-luc (10×10^6) в 0,1 мл PBS с 0,1 мл матригеля. Когда средний объем опухоли достигал 159 мм^3 , 36 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецептúra приготовления испытуемого препарата.

Лечение	Доза (мг/мл)	Рецептура
Плацебо		50 мМ ацетат, 10% сахароза pH=5
ВСУ6136	1	Растворить 3,79 мг ВСУ6136 в 3,695 мл в буфере для приготовления
	0,3	Разбавить 270 мкл раствора 1 мг/мл ВСУ6136 в 630 мкл буфера для приготовления
	0,2	Разбавить 180 мкл раствора 1 мг/мл ВСУ6136 в 720 мкл буфера для приготовления
	0,1	Разбавить 90 мкл раствора 1 мг/мл ВСУ6136 в 810 мкл буфера для приготовления

(iv) Сбор образцов.

На PG-D33, для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE), собирали и фиксировали опухоли группы 2.

В конце исследования, для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE), собирали и фиксировали опухоли группы 3 и 4.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Рост опухоли представлен на фиг. 18.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат MDA-MB-231-luc, представлен в табл. 42-44.

Таблица 42

Объем остаточной опухоли (PG-D0~PG-D17)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения							
		0	2	4	7	9	11	14	17
1	Плацебо, один раз в неделю	159±14	269±8	306±1 9	425±5 2	688±5 4	908±5 4	1064±9 8	1315±9 5
2	ВСУ6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	159±10	226±3 6	221±5 4	310±7 2	416±8 9	526±7 7	636±92	809±13 5
3	ВСУ6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	159±16	218±1 7	182±2 2	182±2 6	101±2 0	77±24	36±4	41±10
4	ВСУ6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	158±5	241±1 2	259±6	325±1 4	258±1 2	246±1 5	162±19	178±10

Таблица 43

Объем остаточной опухоли (PG-D19~PG-D33)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения							
		19	21	24	26	28	31	33	
1	Плацебо, один раз в неделю	1453±1 28	1661±1 73	--	--	--	--	--	
2	ВСУ6136 , 1 мг/кг, один раз в неделю	879±19 0	994±21 3	1253±3 13	1431±3 53	1507±2 53	2181±6 09	--	
3	ВСУ6136 , 2 мг/кг, один раз в неделю	35±9	33±9	31±17	41±32	59±45	82±59	87±71	
4	ВСУ6136 , 3 мг/кг, один раз в неделю	171±21	132±19	108±19	85±15	81±8	87±14	92±18	

Таблица 44

Объем остаточной опухоли (PG-D35~PG-D47)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения					
		35	38	40	42	45	47
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	124±106	156±120	179±142	239±19 7	285±23 9	350±298
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	129±38	173±65	181±65	269±11 3	293±11 4	371±128

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 в ксенотрансплантатной модели MDA-MB-231-luc рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 21 после начала лечения.

Таблица 45

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	1661±173	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	994±213	59,8	44,4	p<0,01
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	33±9	2,0	108,4	p<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	132±19	8,0	101,7	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в ксенотрансплантатной модели MDA-MB-231-luc. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергнутых лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 18 и в табл. 42-45.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1661 мм³ на день 21. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг (TV=994 мм³, TGI=44,4%, p<0,01) проявлял умеренную противоопухолевую активность, препарат BCY6136 при дозе 2 мг/кг (TV=33 мм³, TGI=108,4%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг (TV=132 мм³, TGI=101,1%, p<0,001) проявлял высокую противоопухолевую активность, но опухоли не обнаруживали очевидного возобновление роста со дня 28. В этом исследовании, одна мышь, подвергавшаяся лечению препаратом BCY6136 при дозе 2 мг/кг, потеряла более 15% массы тела в процессе курса лечения, у другой мыши сохранялась практически постоянная масса тела.

Исследование 18. Испытание *in vivo* эффективности BCY6136 при лечении мышей линии BALB/c в сингенной модели EMT-6.

(a) Цель исследования.

Целью исследования являлась оценка *in vivo* противоопухолевой активности препарата BCY6136 при лечении мышей линии BALB/c в сингенной модели EMT-6.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	N	Способ дозирования	Схема	Сбор образцов
1	Плацебо	--	5	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели	будет проводиться сбор опухолей от резервных мышей для сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS)
2	BCY6136	3	5	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели	
3	BCY6136	1/5 ^b	5	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели	
4	BCY6136	0,3/3 ^b	5	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели	

^a Инъецируемый объем каждой мыши составляет 10 мл/кг.

^b Дозу в группе 3 и группе 4 изменяли на 5 мг/кг и 3 мг/кг со дня 14.

(с) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Опухолевые клетки ЕМТ-6 содержали *in vitro* в виде монослойной культуры в среде ЕМЕМ, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали два раза в неделю путем обработки с помощью трипсин-EDTA. Для инокуляции, клетки собирали на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли ЕМТ-6 (5×10^6) в 0,1 мл PBS. Когда средний объем опухоли достигал 75 мм³, 44 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецептuru приготовления испытуемого препарата.

Приготовление препарата BCY6136		
Лечение	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо/буфер	--	50 мМ ацетат, 10% сахароза pH 5
BCY6136	1	Растворить 6,2 мг BCY6136 с помощью 6113 мкл буфера

BCY6136	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1050 мкл буфера
BCY6136	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1350 мкл буфера
BCY6136	0,03	Разбавить 45 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1455 мкл буфера
Приготовление препарата BCY6136		
Лечение	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо/буфер	--	50 mM ацетат, 10% сахара рН 5
BCY6136	1	Исходный раствор
BCY6136	0,3	Разбавить 420 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 980 мкл буфера
BCY6136	0,3	Разбавить 420 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 980 мкл буфера
BCY6136	0,5	Разбавить 700 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 700 мкл буфера

(iv) Сбор образцов.

Собирали 3 опухоли от резервных мышей для сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) на день 11. Данные были представлены командой биологов.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 19.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок мышей линии BALB/c, несущих сингенную EMT-6, представлен в табл. 46.

Таблица 46

Группа	Лечение	Дни после начала лечения									
		0	3	5	7	10	12	14	17	19	21
1	Плацебо, один раз в неделю	82±4	141±11	260±24	443±90	557±99	703±119	812±139	948±191	1129±24	1499±34
2	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	82±4	58±1	59±2	125±18	240±23	322±23	374±22	431±37	486±50	561±61
3	BCY6136, 1/5 ^a мг/кг, один раз в неделю	82±4	108±18	204±27	350±57	426±49	588±72	691±65	850±98	1018±115	1272±140
4	BCY6136, 0,3/3 ^a мг/кг, один раз в неделю	82±4	130±16	255±35	358±34	450±67	607±94	731±	872±119	1082±	1394±161

Дозирование группы 3 и группы 4 заменяли на 5 мг/кг и 3 мг/кг со дня 14.

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования опухоли для ВСУ6136 в сингенной модели ЕМТ-6 рассчитывали на основе измерений объема опухолей на день 21 после начала лечения.

Таблица 47

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	1499±340	--	--	--
2	ВСУ6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	561±61	37,4	66,2	p<0,05
3	ВСУ6136, 1/5 ^c мг/кг, один раз в неделю	1272±140	84,8	16,1	ns
4	ВСУ6136, 0,3/3 ^c мг/кг, один раз в неделю	1394±161	93,0	7,4	ns

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

^c Дозирование группы 3 и группы 4 заменяли на 5 мг/кг и 3 мг/кг со дня 14.

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность ВСУ6136 в сингенной модели ЕМТ-6. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергнутых лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 19 и в табл. 46 и 47.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1499 мм³ на день 21. Препарат ВСУ6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=561 мм³, TGI=66,2%, p<0,05) проявлял очевидную противоопухолевую активность. Препарат ВСУ6136 при дозе 1/5 мг/кг один раз в неделю (TV=1272 мм³, TGI=16,1%, p>0,05) и препарат ВСУ6136 при дозе 0,3/3 мг/кг один раз в неделю (TV=1394 мм³, TGI=7,4%, p>0,05) не проявлял противоопухолевой активности.

Дозирование группы 3 и группы 4 заменяли на 5 мг/кг и 3 мг/кг со дня 14. Обнаруживали изъязвление опухоли у мыши 3-5 на день 14, и мышей подвергали обработке кремом с антибиотиком. В этом исследовании, у всех мышей масса тела сохранялась практически неизменной.

Исследование 19. Исследование in vivo эффективности ВСУ6136 при лечении ксенотрансплантата NCI-N87 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(a) Цель исследования.

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности ВСУ6136 при лечении ксенотрансплантата NCI-N87 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Клетки опухоли NCI-N87 содержали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали два раза в неделю. Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мышши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли NCI-N87 (10×10^6) с матригелем (1:1) в 0,2 мл PBS. Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 176 мм³, животных рандомизировали и начинали проведение лечения. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат 10% сахароза pH 5
BCY6136	1	Растворить 4,295 мг BCY6136 в 4,214 мл ацетатного буфера ¹
	0,1	Разбавить 90 мкл 1 мг/мл исходного раствора BCY6136 с помощью 810 мкл ацетатного буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл 1 мг/мл исходного раствора BCY6136 с помощью 720 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл 1 мг/мл исходного раствора BCY6136 с помощью 630 мкл ацетатного буфера

¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахароза pH 5.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 20.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат NCI-N87, представлен в табл. 48.

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	Дни после начала лечения													
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21	23	25	28	30
1	Плацебо, один раз в неделю	174±7	213±5	266±6	421±10	537±17	598±30	734±46	821±55	918±91	1024±83	1151±68	1305±57	1407±64	1465±90
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	176±7	200±8	210±14	224±27	238±21	184±18	244±23	276±35	308±44	343±37	390±43	406±48	422±42	425±47
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	176±18	197±25	168±25	170±26	165±34	96±27	133±35	150±52	160±49	190±63	203±65	218±66	201±53	210±60
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	177±8	197±9	169±7	158±3	148±8	95±16	141±12	145±24	164±28	202±28	205±30	201±16	196±21	201±22

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования опухоли препаратом BCY6136 в случае ксенотрансплантата NCI-N87 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 30 после начала лечения.

Таблица 49

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	1465±90	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	425±47	29,0	80,7	P<0,001
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	210±60	14,3	97,4	P<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	201±22	13,7	98,1	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли для группы, подвергнутой лечению, на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в модели NCI-N87. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 20 и в табл. 48 и 49.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1465 мм³ на день 30. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=425 мм³, TGI=80,7%, p<0,001) и при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=210 мм³, TGI=97,4%, p<0,001) проявлял значительную дозозависимую противоопухолевую активность, BCY6136 в дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=201 мм³, TGI=98,1%, p<0,001) прояв-

для сравнимую противоопухолевую активность с активностью BCY6136 при дозе 2 мг/кг.

В этом исследовании, у мышей во всех группах не обнаруживали очевидной потери масса тела в процессе проведения курса лечения.

Исследование 20. Исследование *in vivo* эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантат SK-OV-3 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(a) Цель исследования.

Целью исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантат SK-OV-3 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	ADC	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
5	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Клетки опухоли SK-OV-3 содержали в среде МакКоя 5а, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали два раза в неделю. Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли SK-OV-3 (10×10^6) с матригелем (1:1) в 0,2 мл PBS. Животных рандомизировали, и начинали проведение лечения, когда средний объем опухоли достигал приблизительно 186 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Чистота	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	-	50 мМ ацетат 10% сахара рН5

BCY6136	98,5%	1	Растворить 3,65 мг BCY6136 в 3,60 мл 50 мМ ацетатного буфера ¹
		0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл ацетатного буфера ¹
		0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл ацетатного буфера ¹
		0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл ацетатного буфера ¹
ADC	ADC	0,3	Разбавить 69 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 2331 мкл буфера для ADC ²

¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахара pH 5.

² Буфер для ADC: 25 мМ гистидин 10% сахара pH 5,5.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 21.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат SK-OV-3, представлен в табл. 50.

Таблица 50

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	Дни после начала лечения													
		0	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28	
1	Плацебо, один раз в неделю	187±1 6	243±2 4	313±2 8	399±3 7	470±2 3	606±6 1	742±10 3	891±13 3	1076±1 85	1173±2 14	1340±2 36	1490±2 73	1560± 305	
2	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	187±1 6	181±1 5	212±1 6	263±3 5	268±1 4	335±2 3	353±18	392±63	449±4	481±27	573±33	647±26	684±1 11	
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	186±2 3	222±1 9	293±3 4	331±2 1	356±2 3	440±8	503±28	587±33	702±43	752±26	893±34	1002±6 8	1035± 67	
4	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	186±2 3	170±1 8	164±2 8	188±3 3	180±3 4	202±2 9	200±29	230±46	229±48	231±58	236±49	240±48	277±5 8	
5	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	184±2 4	168±1 8	150±1 2	164±1 2	158±8	180±8	187±4	212±17	208±29	204±12	205±17	227±31	254±4 8	

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 в случае ксенотрансплантата SK-OV-3 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 28 после начала лечения.

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	1560±305	--	--	--
2	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	684±111	43,9	63,8	P<0,01
3	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1035±67	66,4	38,1	p>0,05
4	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	277±58	17,8	93,3	P<0,001
5	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	254±48	16,3	95,0	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в модели SK-OV-3. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 21 и в табл. 50 и 51.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1560 мм³ на день 28. ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=684 мм³, TGI=63,8%, p<0,01) проявлял умеренную противоопухолевую активность. BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=1035 мм³, TGI=38,1%, p>0,05) не проявлял очевидной противоопухолевой активности. BCY6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=277 мм³, TGI=93,3%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=254 мм³, TGI=95,0%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность.

В этом исследовании не было обнаружено очевидной потери массы тела у животных во всех группах в процессе проведения курса лечения.

Исследование 21. Исследование *in vivo* эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата OE21 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(а) Цель исследования.

Целью исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата OE21 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Клетки опухоли OE21 содержали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали два раза в неделю. Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли OE21 (5×10⁶) с матригелем (1:1) в 0,2 мл PBS. Животных рандомизировали, и начинали проведение лечения когда средний объем опухоли достигал приблизительно 157 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата.

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат 10% сахара рН 5
BCY6136	1	Растворить 4,295 мг BCY6136 в 4,214 мл ацетатного буфера ¹
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл ацетатного буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл ацетатного буфера

¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахара рН 5.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 22.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат OE21, представлен в табл. 52.

Таблица 52

Группа	Лечение	Дни после начала лечения										
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21	23
1	Плацебо, один раз в неделю	155±9	211±1 6	291±1 6	379±1 4	456±3 2	539±1 3	828±4 2	955±4 0	1035±5 8	1250±4 6	1586± 57
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	159±1 4	202±2 8	251±2 9	282±6	331±1 9	392±3 5	609±5 6	694±4 4	777±68	1083±8 5	1155± 98
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	157±1 9	197±1 3	219±6	235±2 7	268±3 5	243±3 7	346±7 8	371±9 8	396±10 9	515±94	537±1 22
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	155±1 9	200±1 6	197±7	209±1 1	229±2 6	211±1 4	289±3 8	318±5 3	330±40	474±42	489±5 1

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 в случае ксенотрансплантата OE21 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 23 после начала лечения.

Таблица 53

Группа	Лечение	Анализ ингибирования роста опухоли			
		Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	1586±57	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1155±98	72,8	30,4	P<0,05
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	537±122	33,9	73,4	P<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	489±51	30,8	76,7	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли для группы, подвергнутой лечению, на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в модели OE21. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 22 и в табл. 52 и 53.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1586 мм³ на день 23. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=1155 мм³, TGI=30,4% p<0,05) проявлял противоопухолевая активность в слабой степени. BCY6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=537 мм³, TGI=73,4%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=489 мм³, TGI=76,7%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность.

В этом исследовании не было обнаружено очевидной потери массы тела у животных во всех группах в процессе проведения курса лечения.

Исследование 22. Испытание *in vivo* эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантат MOLP-8 у мышей линии CB17-SCID.

(a) Цель исследования.

Целью исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантат MOLP-8 у мышей линии CB17-SCID.

(b) Дизайн эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(c) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Клетки опухоли MOLP-8 содержали *in vitro* в виде монослойной культуры в среде RPMI-1640, дополненной 20% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали путем обработки трипсин-EDTA. Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли MOLP-8 (10×10^6) в 0,2 мл PBS с 50% матригеля. Когда средний объем опухоли достигал 141 мм³, 36 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата.

Лечение	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	50 мМ ацетат, 10% сахара рН 5
BCY6136	0,1	Разбавить 90 мкл исходных растворов* 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл буфера**
	0,2	Разбавить 180 мкл исходных растворов* 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл буфера**
	0,3	Разбавить 270 мкл исходных растворов* 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл буфера**

* Исходные растворы BCY6136: 10,93 мг BCY6136 растворяли в 10,93 мл 50 мМ ацетат, 10% сахара, рН 5 и разливали в отдельные пробирки, и хранили при -80°C.

** Буфер: 50 мМ ацетат, 10% сахара рН 5.

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 23.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок мышей линии CB17-SCID, несущих ксенотрансплантат MOLP-8, представлен в табл. 54.

Таблица 54

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Плацебо, один раз в неделю	139±2	375±3 6	604±2 8	984±8 8	1451±1 33	1981±1 96	2528±2 95
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	143±1 3	299±6	444±4 9	576±3 1	806±85	1132±1 70	1446±2 34
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	140±1 5	271±4 3	250±2	509±2 3	662±78	873±49	1218±1 44
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	142±1 9	239±6 7	197±2 0	342±7 8	425±90	693±13 3	938±15 5

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли.

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 в ксенотрансплантатной модели MOLP-8 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 14 после начала лечения.

Таблица 55

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	2528±295	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1446±234	57,2	45,5	p>0,05
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	1218±144	48,2	54,9	p<0,05
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	938±155	37,1	66,7	p<0,01

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в ксенотрансплантатной модели MOLP-8. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергнутых лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 23 и в табл. 54 и 55.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 2528 мм³ на день 14. BCY6136 при дозе 1 мг/кг (TV=1146 мм³, TGI=45,5%, p>0,05), при дозе 2 мг/кг (TV=1218 мм³, TGI=54,9%, p<0,05) и при дозе 3 мг/кг (TV=938 мм³, TGI=66,7%, p<0,01) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность, но при всех величинах доз не достигался регресс опухолей в ксенотрансплантатах MOLP-8. В

этом исследовании, у всех мышей сохранялась масса тела практически на постоянном уровне.

Исследование 23. Испытание *in vivo* эффективности препаратов ВСУ при лечении ксенотрансплантата НТ1080 у бестимусных мышей линии BALB/c.

(a) Цель исследования.

Целью исследования являлась оценка *in vivo* противоопухолевой активности препаратов ВСУ при лечении ксенотрансплантатной модели НТ1080 на бестимусных мышках линии BALB/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	ВСУ6173	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	ВСУ6173	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	ВСУ6173	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
5	ВСУ6135	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
6	ВСУ6135	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю

7	BCY6135	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
8	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
9	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
10	BCY6136	3	5	10	внутривенно	один раз в неделю
11	BCY6174	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
12	BCY6174	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
13	BCY6174	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
14	BCY6175	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
15	BCY6175	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
16	BCY6175	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
17	ADC	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

Примечание: n: число животных; объем дозирования: скорректированный объем дозирования 10 мкл/г с учетом массы тела.

(с) Методы и методики эксперимента.

(i) Культивирование клеток.

Клетки опухоли HT1080 следует содержать в среде, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки следует в установленном порядке пассировать два раза в неделю. Для инокуляции опухоли, клетки следует собирать в экспоненциальной фазе роста и посчитать их число.

(ii) Инокуляция опухоли.

Для развития опухоли, каждой мыши следует инокулировать подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли HT1080 (5×10^6). Животных следует рандомизировать, и лечение следует начать, когда средний объем опухоли достигнет приблизительно 150-200 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе приведены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата.

Лечение	Доза (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	50 мМ ацетат/уксусная кислота pH 5 10% сахараза
BCY6173	1	Растворить 2,13 мг BCY6173 в 2,04 мл буфера
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6173 с помощью 810 мкл буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6173 с помощью 720 мкл буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6173 с помощью 630 мкл буфера
BCY6135	1	Растворить 2 мг BCY6135 в 1,9 мл буфера
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6135 с помощью 810 мкл буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6135 с помощью 720 мкл буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6135 с помощью 630 мкл буфера
BCY6136	0,2	Разбавить 200 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 800 мкл буфера
	0,3	Разбавить 300 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 700 мкл буфера
	0,5	Разбавить 500 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 500 мкл буфера
BCY6174	1	Растворить 2,69 мг BCY6174 в 2,677 мл буфера
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6174 с помощью 810 мкл буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6174 с помощью 720 мкл буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6174 с помощью 630 мкл буфера
BCY6175	1	Растворить 2 мг BCY6175 в 1,924 мл буфера
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6175 с помощью 810 мкл буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6175 с помощью 720 мкл буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6175 с помощью 630 мкл буфера
ADC	0,3	Разбавить 25,78 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 874,22 мкл 25 мМ гистидин pH 7 10% сахараза

(d) Результаты.

(i) Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 24-29.

(ii) Объем остаточной опухоли.

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат NT1080, приведен в табл. 56.

Таблица 56

Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Плацебо, один раз в неделю	179±2	312±	529±1	886±2	1185±1	1467±2	1737±2
		2	84	35	07	72	24	58
2	BCY6173 1 мг/кг, один раз в неделю	178±2	276±	328±7	594±6	745±22	960±53	1074±1
		6	8	3	2			50
3	BCY6173, 2 мг/кг, один раз в неделю	178±2	277±	262±1	309±2	425±33	436±32	480±34
		8	61	25	38	4	3	7
4	BCY6173, 3 мг/кг, один раз в неделю	179±4	182±	133±8	87±68	77±65	60±54	47±42
		3	71	8				
5	BCY6135 1 мг/кг, один раз в неделю	178±2	267±	262±5	436±6	599±89	703±36	871±28
		2	66	8	7			
6	BCY6135 2 мг/кг, один раз в неделю	178±2	176±	117±4	70±23	67±23	52±21	62±7
		3	48	3				
7	BCY6135 3 мг/кг, один раз в неделю	177±3	178±	92±67	62±46	62±51	57±51	44±40
		9	79					
8	BCY6136 2мг/кг, один раз в неделю	178±1	249±	115±8	126±5	158±71	140±89	245±11
		9	22		3			6
9	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	178±3	168±	72±18	22±7	21±15	8±6	3±2
		6	21					
10	BCY6136 5 мг/кг, один раз в неделю	178±2	165±	52±10	18±7	9±4	5±2	2±1
		6	33					
11	BCY6174 1 мг/кг, один раз в неделю	180±3	231±	226±2	432±3	602±63	742±62	1066±1
		5	19	9	7			30

12	BCY6174 2 мг/кг, один раз в неделю	178±3 1	203± 50	123±2 9	216±4 7	291±40	326±68	532±91
13	BCY6174 3 мг/кг, один раз в неделю	178±3 3	195± 13	110±3 9	58±23	34±17	21±11	11±7
14	BCY6175 1 мг/кг, один раз в неделю	178±2 7	248± 62	244±7 4	347±1 8	435±18	558±38	769±26
15	BCY6175 2 мг/кг, один раз в неделю	178±2 2	223± 42	158±5 9	116±3 5	156±52	166±51	295±88
16	BCY6175 3 мг/кг, один раз в неделю	179±3 9	189± 48	116±5 0	43±18	33±18	25±13	11±9
17	ADC 3 мг/кг, один раз в неделю	180±2 6	158± 30	58±8	18±2	7±1	2±2	0±0

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для препаратов BCY в ксенотрансплантатной модели HT1080 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 14 после начала лечения.

Таблица 57

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	1737±258	--	--	--

2	BCY6173, 1 мг/кг, один раз в неделю	1074±150	61,8	42,5	p>0,05
3	BCY6173, 2 мг/кг, один раз в неделю	480±347	27,6	80,6	p<0,05
4	BCY6173, 3 мг/кг, один раз в неделю	47±42	2,7	108,4	p<0,01
5	BCY6135, 1 мг/кг, один раз в неделю	871±28	50,1	55,5	p<0,01
6	BCY6135, 2 мг/кг, один раз в неделю	62±7	3,5	107,5	p<0,001
7	BCY6135, 3 мг/кг, один раз в неделю	44±40	2,5	108,6	p<0,001
8	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	245±116	14,1	95,7	p<0,001
9	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	3±2	0,2	111,2	p<0,001
10	BCY6136, 5 мг/кг, один раз в неделю	2±1	0,1	111,3	p<0,001
11	BCY6174, 1 мг/кг, один раз в неделю	1066±130	61,4	43,1	p<0,05
12	BCY6174, 2 мг/кг, один раз в неделю	532±91	30,6	77,3	p<0,01
13	BCY6174, 3 мг/кг, один раз в неделю	11±7	0,6	110,7	p<0,001
14	BCY6175, 1 мг/кг, один раз в неделю	769±26	44,3	62,1	p<0,01
15	BCY6175, 2 мг/кг, один раз в неделю	295±88	17,0	92,5	p<0,001
16	BCY6175, 3 мг/кг, один раз в неделю	11±9	0,6	110,8	p<0,001
17	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0,0	111,5	-

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(e) Полученные результаты и их обсуждение.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность препаратов ВСУ в ксенотрансплантатной модели НТ1080. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергнутых лечению, в различные моменты времени представлены на фиг. 24-29 и в табл. 56 и 57.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1737 мм³ на день 14.

Препарат ВСУ6173 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=1074 мм³, TGI=42,5%, p>0,05), при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=480 мм³, TGI=80,6%, p<0,05) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=7 мм³, TGI=108,4%, p<0,01) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность.

Препарат ВСУ6135 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=871 мм³, TGI=55,5%, p<0,01), при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=62 мм³, TGI=107,5%, p<0,001) и дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=44 мм³, TGI=108,6%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность.

Препарат ВСУ6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=345 мм³, TGI=95,7%, p<0,001), при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=3 мм³, TGI=111,2%, p<0,001) и при дозе 5 мг/кг один раз в неделю (TV=2 мм³, TGI=111,3%, p<0,001) проявлял мощную противоопухолевую активность.

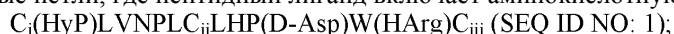
Препарат ВСУ6174 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=1066 мм³, TGI=43,1%, p<0,05), при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=532 мм³, TGI=77,3%, p<0,01) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=11 мм³, TGI=110,7%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность.

Препарат ВСУ6175 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=769 мм³, TGI=62,1%, p<0,01), при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=295 мм³, TGI=92,5%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=11 мм³, TGI=110,8%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность.

Препарат ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=0 мм³, TGI=111,5%) полностью уничтожил опухоли ко дню 14.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидный лиганд, обладающий специфичностью к EphA2, включающий полипептид, содержащий, по меньшей мере, три остатка цистеина, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида таким образом, что на молекулярном каркасе формируются, по меньшей мере, две полипептидные петли, где пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность:



где HyP представляет собой гидроксипролин, HArg представляет собой гомоаргинин, и C_i, C_{ii} и C_{iii} представляют первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Пептидный лиганд по п.1, где молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)-трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

3. Пептидный лиганд по п.1 или 2, где пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность:



(ВСУ6099);

где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин, и HyP представляет собой гидроксипролин.

4. Пептидный лиганд по любому одному из пп.1-3, где фармацевтически приемлемую соль выбирают из соли свободной кислоты или соли натрия, калия, кальция, аммония.

5. Пептидный лиганд по любому одному из пп.1-4, где EphA2 представляет собой EphA2 человека.

6. Конъюгат лекарственного средства, включающий пептидный лиганд по любому одному из пп.1-5, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами, такими как цитотоксическое средство.

7. Конъюгат лекарственного средства по п.6, где указанное цитотоксическое средство выбирают из DM1 или MMAE.

8. Конъюгат лекарственного средства по п.7, где указанное цитотоксическое средство выбирают из MMAE.

9. Конъюгат лекарственного средства по любому одному из пп.6-8, который дополнительно включает линкер между указанным пептидным лигандом и указанными цитотоксическими средствами.

10. Конъюгат лекарственного средства по п.9, где указанное цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер выбирают из -Val-Cit-, -Trp-Cit-, -Val-Lys-, -D-Trp-Cit-, -Ala-Ala-Asn-, D-Ala-Phe-Lys- или -Glu-Pro-Cit-Gly-hPhe-Tyr-Leu- (SEQ ID NO: 3).

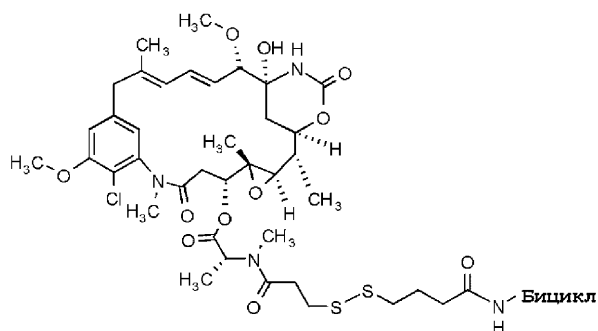
11. Конъюгат лекарственного средства по п.10, где указанное цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер представляет собой -Val-Cit-.

12. Конъюгат лекарственного средства по п.9, где указанное цитотоксическое средство представляет собой DM1, и линкер выбирают из -S-S-, -SS(SO₃H)-, -SS(Me)-, -(Me)-SS-(Me)-, -SS-(Me₂)- или -SS-(Me)-SO₃H-.

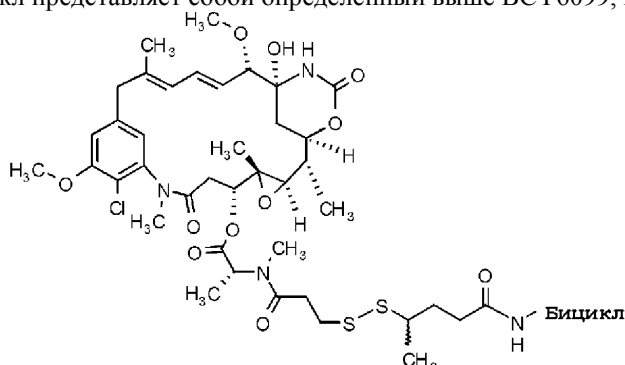
13. Конъюгат лекарственного средства по п.12, где указанное цитотоксическое средство представ-

ляет собой DM1, и линкер выбирают из -S-S- и -SS(SO₃H)-.

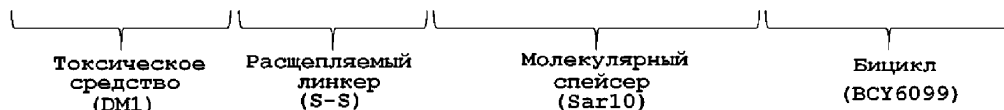
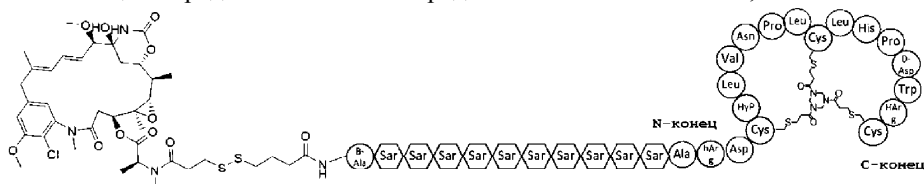
14. Конъюгат лекарственного средства по любому одному из пп.6-13, который выбирают из любого одного из ВСУ6027:



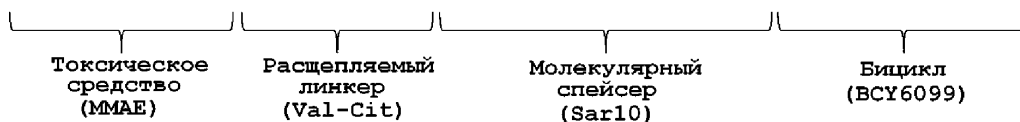
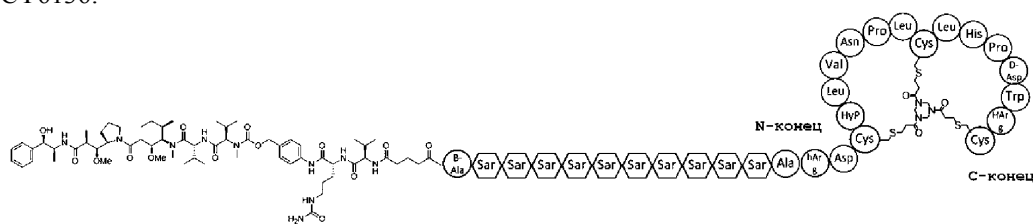
где указанный бицикл представляет собой определенный выше ВСУ6099, ВСУ6028:



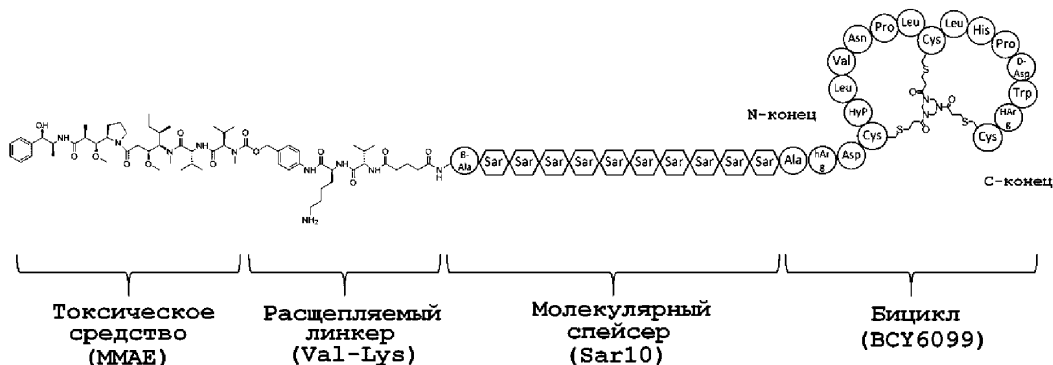
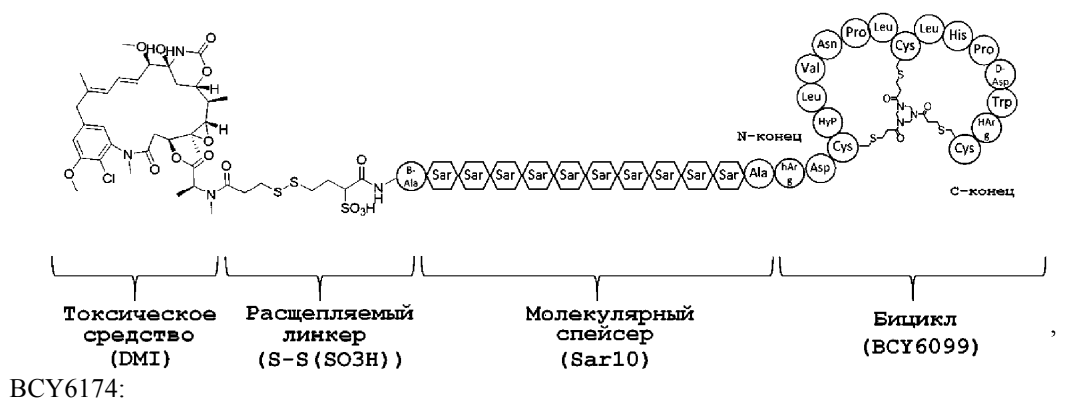
где указанный бицикл представляет собой определенный выше ВСУ6099, ВСУ6135:



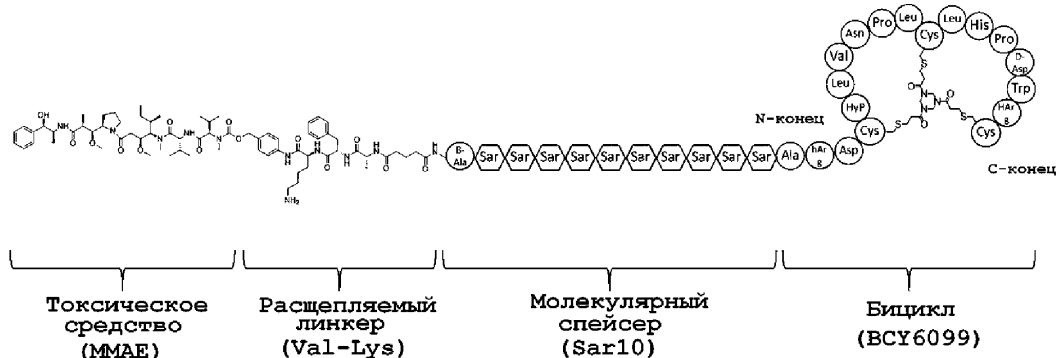
BCY6136:



BCY6173:



И
VCU6175:



15. Конъюгат лекарственного средства по п.14, который выбирают из любого одного из VCU6135, VCU6136, VCU6173, VCU6174 и VCU6175.

16. Конъюгат лекарственного средства по п.14 или 15, который представляет собой VCU6136.

17. Фармацевтическая композиция, которая включает пептидный лиганд по любому одному из пп.1-5 или конъюгат лекарственного средства по любому одному из пп.6-16 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

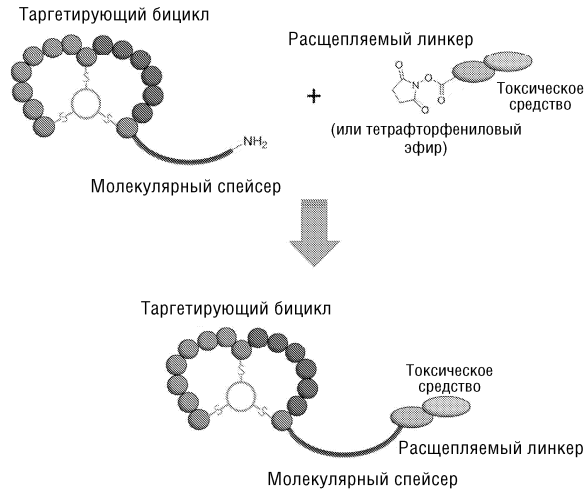
18. Применение конъюгата лекарственного средства по любому одному из пп.6-16 с целью предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани.

19. Применение конъюгата лекарственного средства по любому одному из пп.6-16 с целью предотвращения, торможения развития или лечения рака.

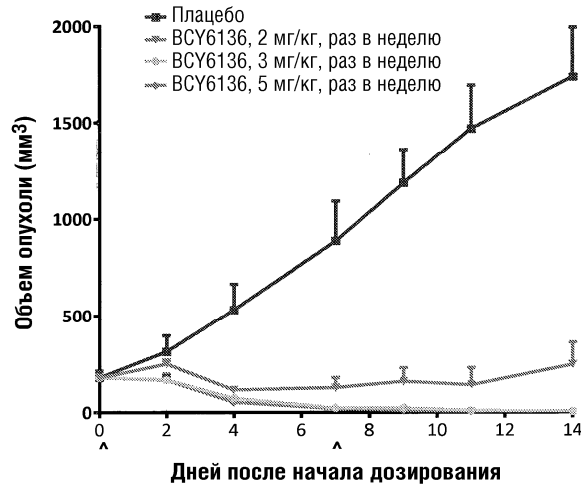
20. Применение по п.19, где рак выбирают из рака предстательной железы, рака легкого (такого как немелкоклеточные карциномы легкого (NSCLC)), рака молочной железы (такого как трижды негативный рак молочной железы), рака желудка, рака яичников, рака пищевода и фибросаркомы.

21. Способ предотвращения, торможения развития или лечения рака, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгата лекарственного средства по любому одному из пп.6-16, где у пациента выявлено наличие повышенной вариации числа копий (CNV) EphA2.

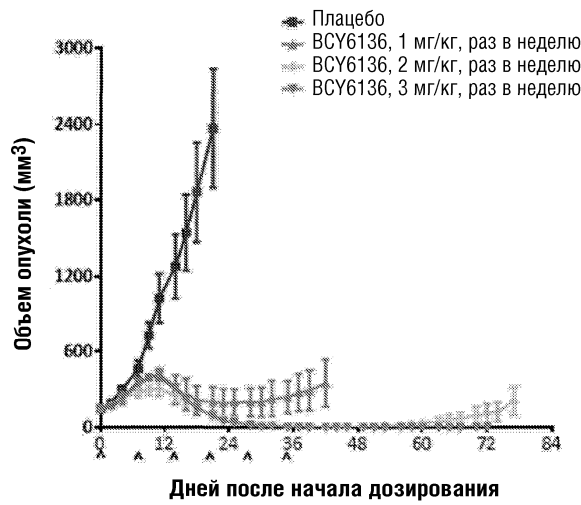
Бициклические конъюгаты лекарственных средств



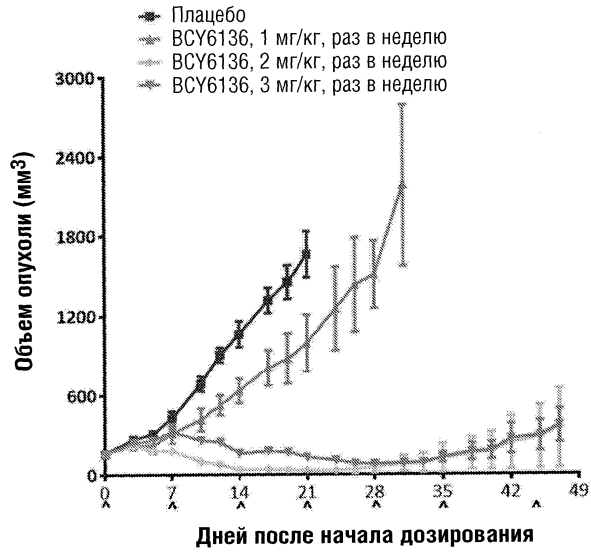
Фиг. 1



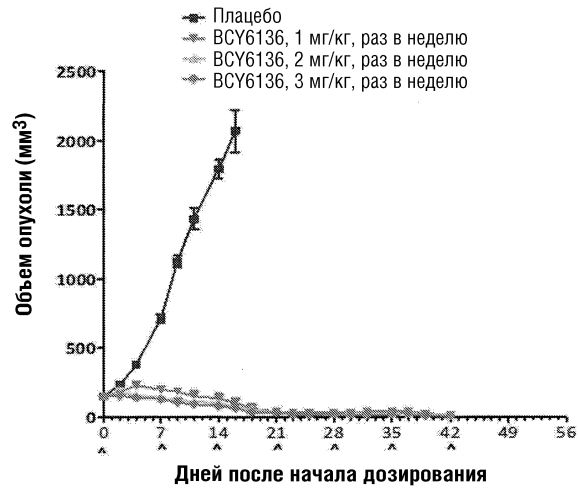
Фиг. 2



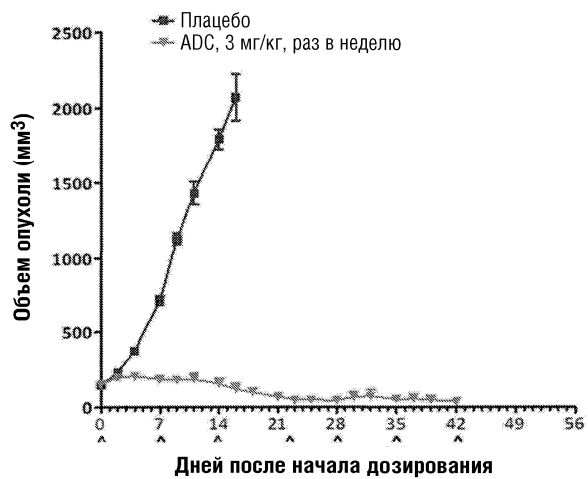
Фиг. 3



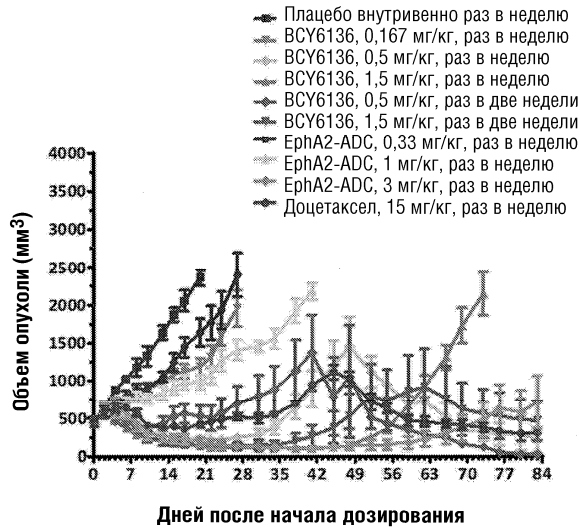
Фиг. 4



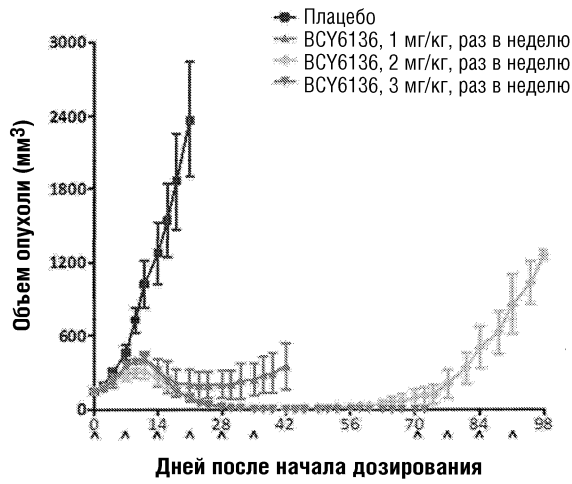
Фиг. 5



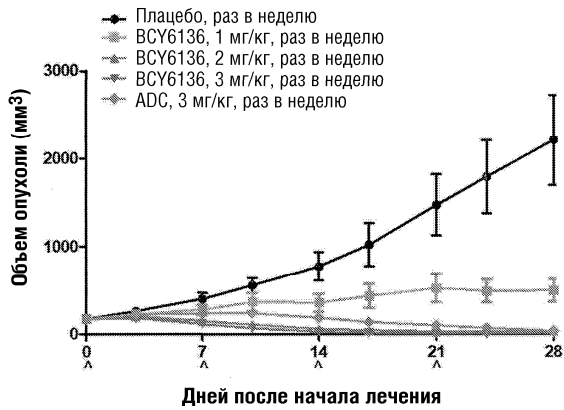
Фиг. 6



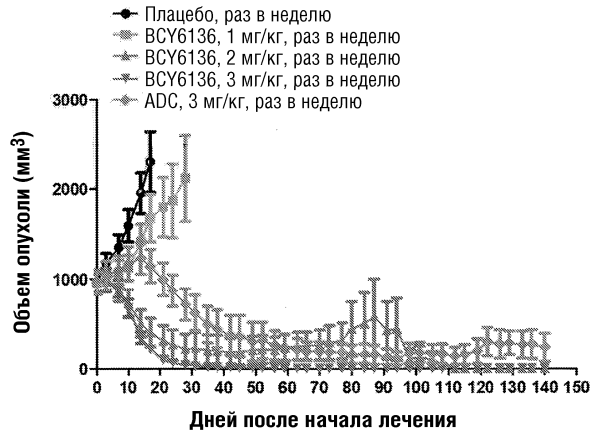
Фиг. 7



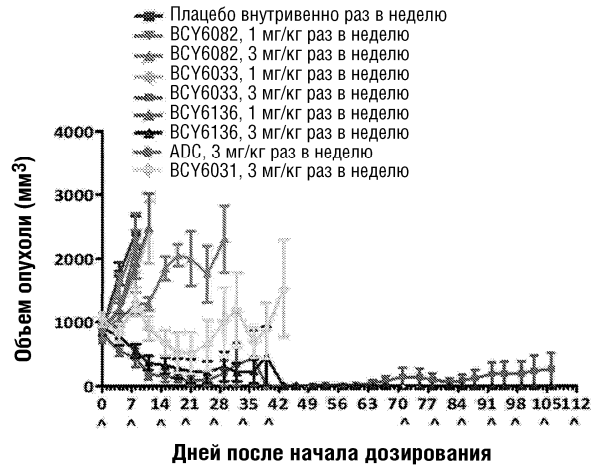
Фиг. 8



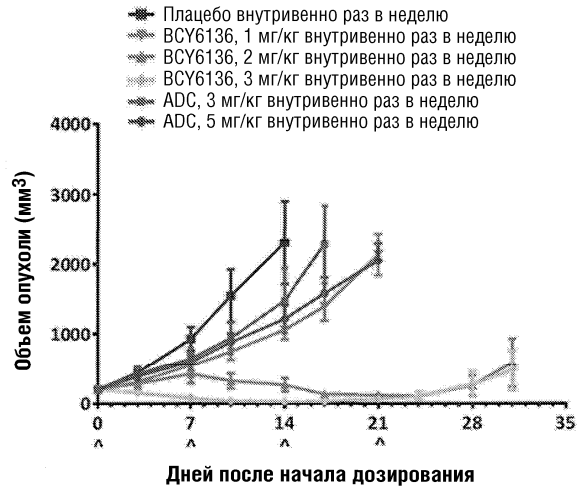
Фиг. 9



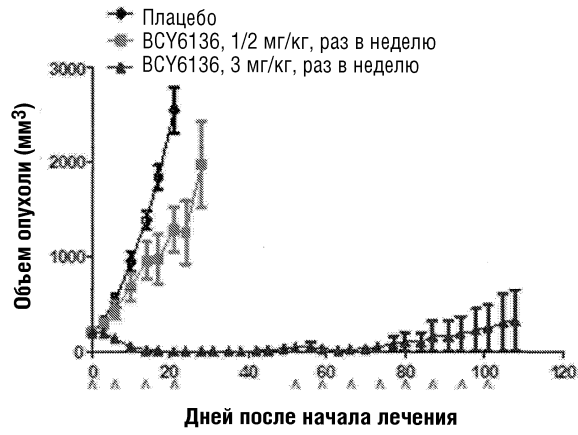
Фиг. 10



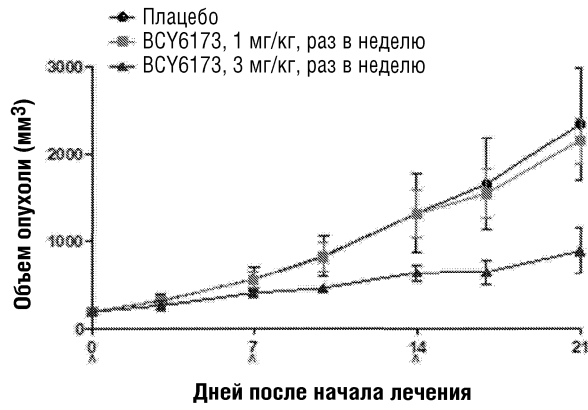
Фиг. 11



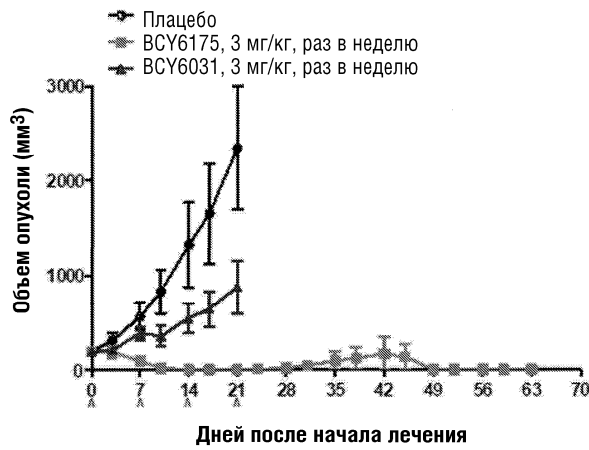
Фиг. 12



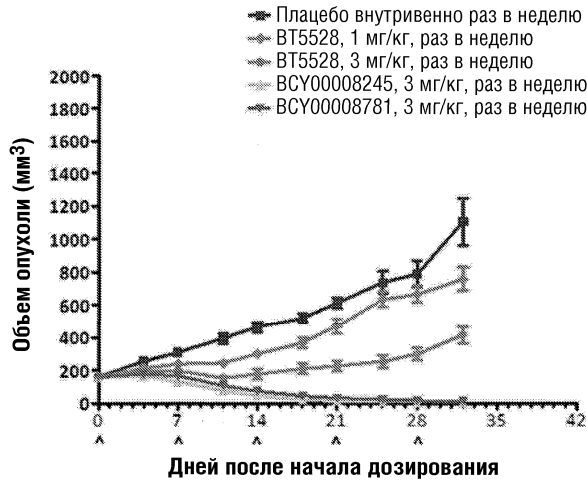
Фиг. 13



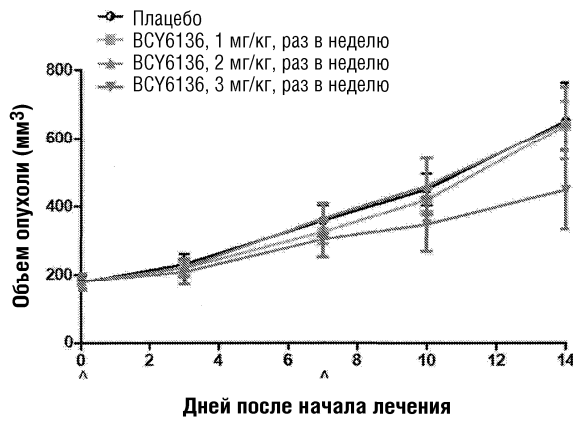
Фиг. 14



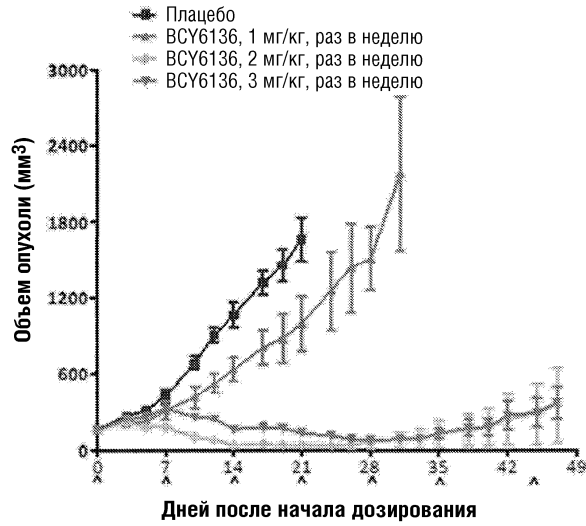
Фиг. 15



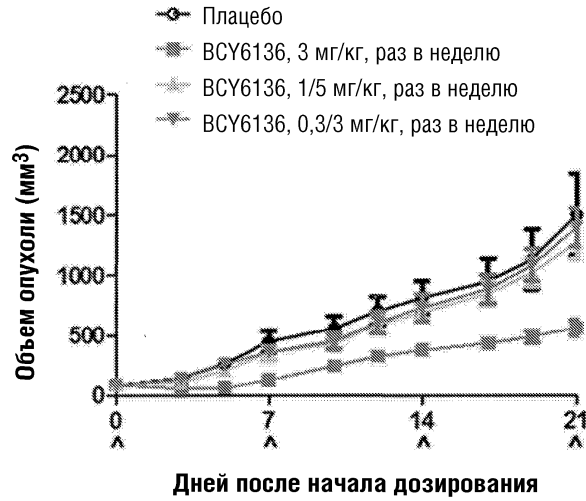
Фиг. 16



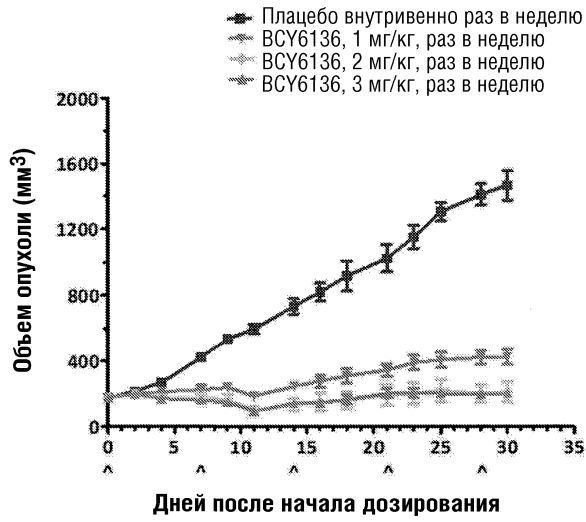
Фиг. 17



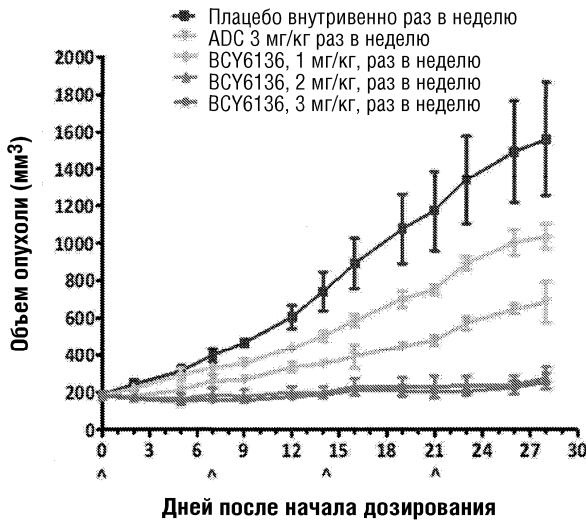
Фиг. 18



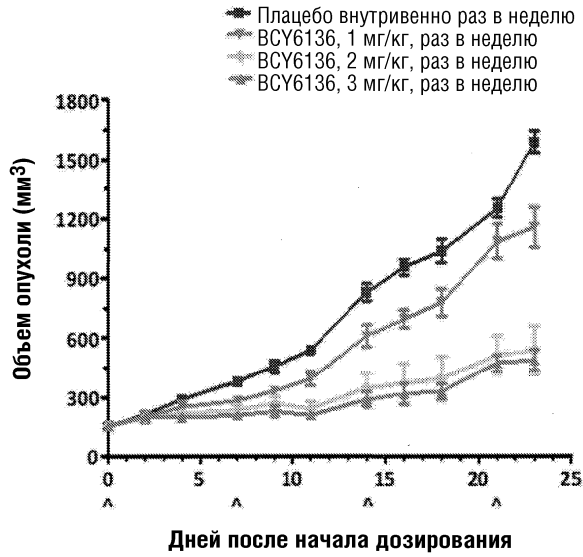
Фиг. 19



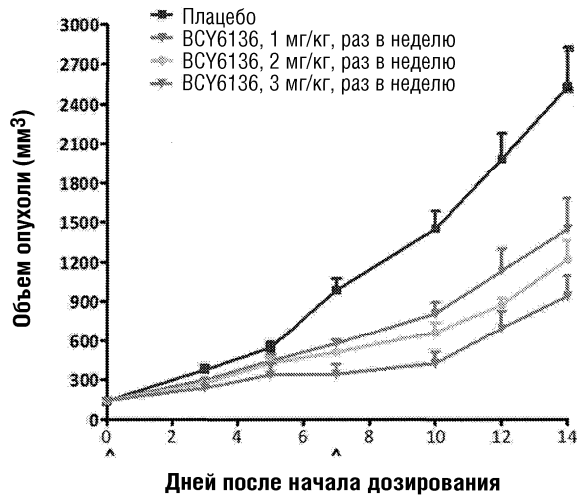
Фиг. 20



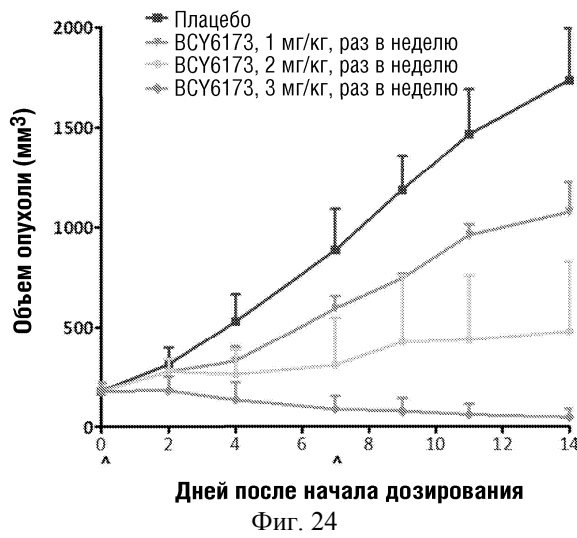
Фиг. 21



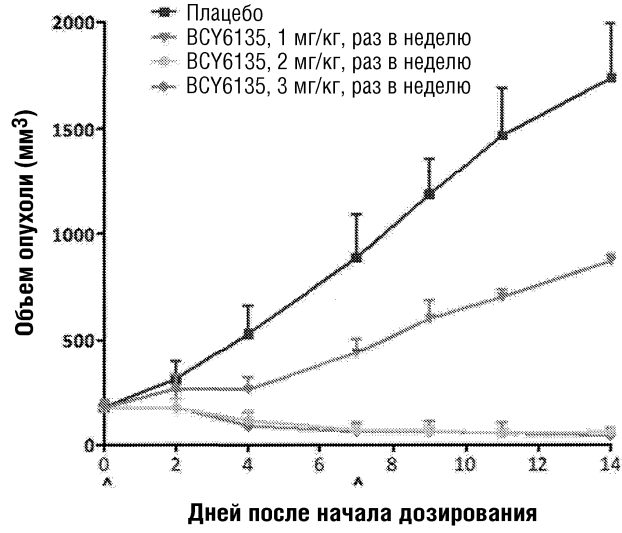
Фиг. 22



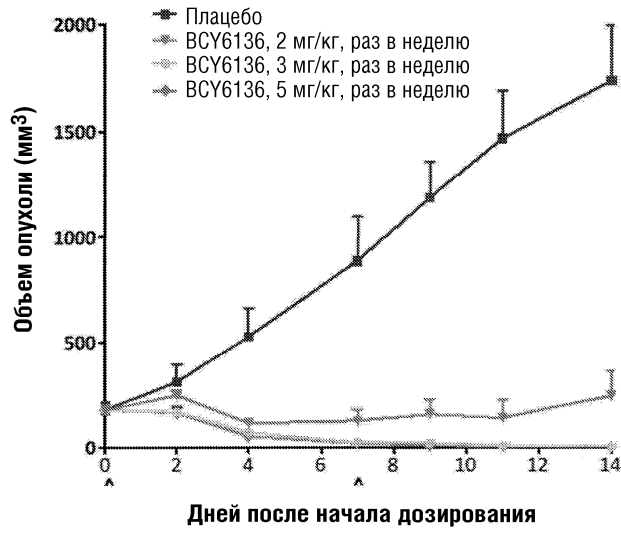
Фиг. 23



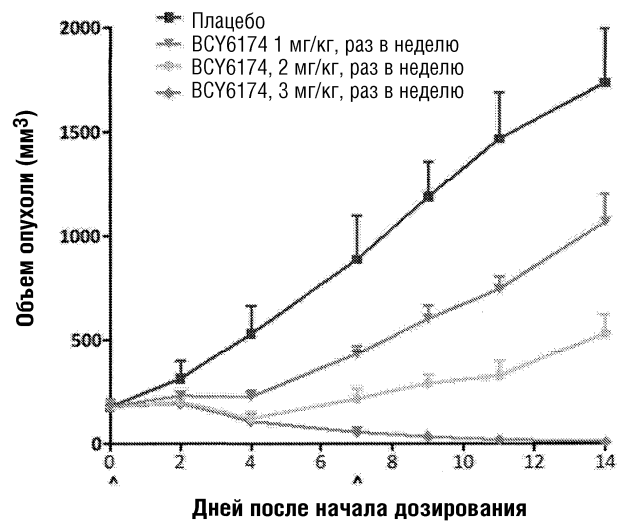
Фиг. 24



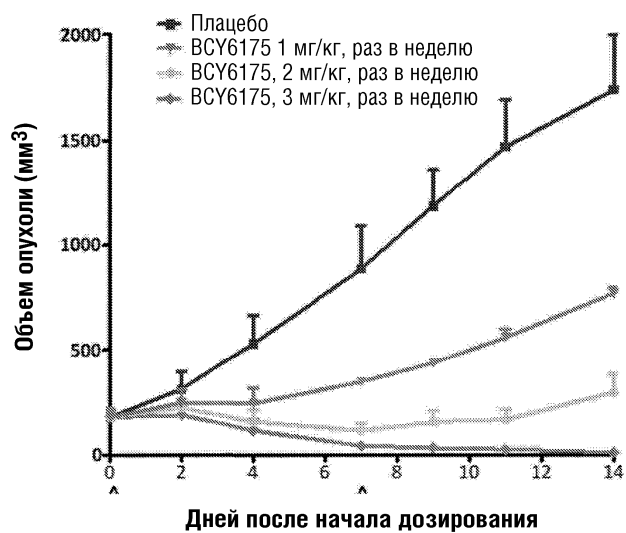
Фиг. 25



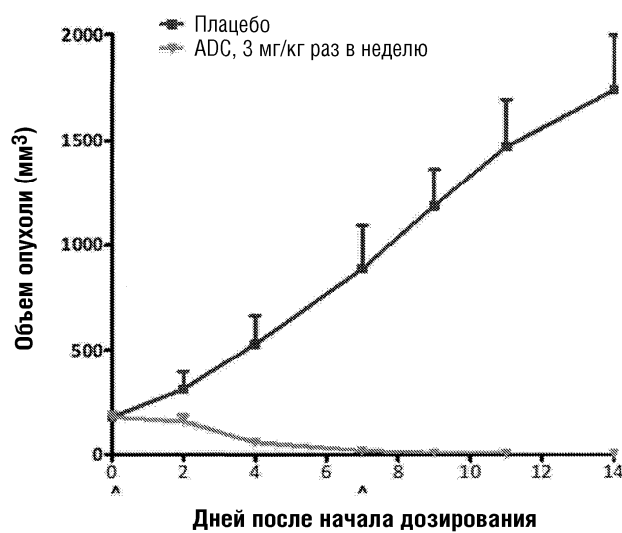
Фиг. 26



Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29

