

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045804**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.27**

(21) Номер заявки  
**202190104**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.06.21**

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 38/04** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)

**(54) БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К НЕКТИНУ-4**

(31) **1810250.9; 1815684.4; 1818499.4;  
1904632.5**

(32) **2018.06.22; 2018.09.26; 2018.11.13;  
2019.04.02**

(33) **GB**

(43) **2021.03.29**

(86) **PCT/GB2019/051741**

(87) **WO 2019/243833 2019.12.26**

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

(72) Изобретатель:  
**Бесвик Пол, Чэнь Люхун, Мадд  
Джемма Элизабет, Парк Питер, Ван  
Ритсотен Катерине, Ригби Майкл  
(GB)**

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

(56) **WO-A1-2016067035**

HEINIS CHRISTIAN ET AL.: "Phage-  
encoded combinatorial chemical libraries based  
on bicyclic peptides", NATURE CHEMICAL  
BIOLOGY, vol. 5, no. 7, 31 May 2009  
(2009-05-31), pages 502-507, XP002588840, DOI:  
10.1038/NCHEMBIO.184, the whole document

SHIYLJ 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, XP55356354, DE ISSN: 1433-7851, DOI:  
10.1002/anie.201309459, the whole document

(57) Изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связаны с молекулярными каркасами, так что две или более пептидных цепи замкнуты между точками присоединения к каркасу. В частности, изобретение относится к пептидам, которые являются высокоаффинными связывающими нектин-4 соединениями. Изобретение также относится к конъюогатам лекарственного средства, содержащим указанные пептиды, конъюогированным с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные пептидные лиганды, и к конъюогатам лекарственного средства и к применению указанных пептидных лигандов и конъюогатов лекарственного средства для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого нектином-4.

**B1****045804****045804****B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связаны с молекулярными каркасами, так что две или более пептидных петли замыкаются между точками присоединения к каркасу. В частности, изобретение относится к пептидам, которые представляют собой высокоаффинные агенты, связывающие нектин-4. Также изобретение относится к конъюгатам лекарственных средств, содержащим указанные пептиды, конъюгированные с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами, к фармацевтическим композициям, содержащим указанные пептидные лиганды и конъюгаты лекарственных средств, и к применению указанных пептидных лигандов и конъюгатов лекарственных средств для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого нектином-4.

### Уровень техники, к которому относится изобретение

Циклические пептиды способны связываться с высокой аффинностью и специфичностью с белковыми мишенями и, таким образом, они являются привлекательным классом молекул для разработки терапевтических средств. В действительности, несколько циклических пептидов уже успешно используются в клинике, например, таких как антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессивное лекарственное средство циклоспорин или лекарственное средство против злокачественной опухоли октреотид (Driggers et al. (2008), *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 608-24). Хорошие связывающие свойства являются результатом относительно большой поверхности взаимодействия между пептидом и мишенью, а также сниженной конформационной гибкости циклических структур. Как правило, макроциклы связываются с поверхностями размером несколько сот квадратных ангстрем, как например, циклический пептидный антагонист CXCR4 CVX15 (400 Å<sup>2</sup>; Wu et al. (2007), *Science* 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, связывающийся с интегрином αVβ3 (355 Å<sup>2</sup>) (Xiong et al. (2002), *Science* 296 (5565), 151-5) или циклический пептидный ингибитор уаин-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å<sup>2</sup>; Zhao et al. (2007), *J Struct Biol* 160 (1), 1-10).

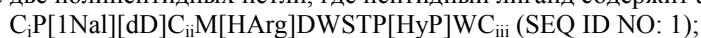
Вследствие циклической конфигурации, пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с мишенями и обеспечивает более высокую аффинность связывания. Уменьшенная гибкость также приводит к фиксации специфичных к мишени конформаций, повышая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект проиллюстрирован с помощью мощного и селективного ингибитора матриксной металлопротеиназы 8 (MMP-8), который утрачивал его селективность относительно других MMP, когда его кольцо раскрывали (Cherney et al. (1998), *J Med Chem* 41 (11), 1749-51). Благоприятные свойства связывания, которые достигались посредством макроциклизации, являются еще более выраженными в полициклических пептидах, имеющих более одного пептидного кольца, как например, в ванкомицине, низине и актиномицине.

Различные исследовательские команды ранее проводили связывание полипептидов с остатками цистеина с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem*; Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Meloen и коллеги использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной кристаллизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации белковых поверхностей (Timmerman et al. (2005), *ChemBioChem*). Описаны способы получения лекарственных соединений-кандидатов, где указанные соединения получают путем связывания цистеинсодержащих полипептидов с молекулярным каркасом, например, таким как ТАТА (1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он, Heinis et al. *Angew Chem, Int Ed.* 2014; 53:1602-1606).

Были разработаны комбинаторные подходы на основе фагового дисплея для получения и скрининга крупных библиотек бициклических пептидов против представляющих интерес мишеней (Heinis et al. (2009), *Nat Chem Biol* 5 (7), 502-7 и WO 2009/098450). В кратком изложении, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и две области из шести случайных аминокислот (Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys), экспонировали на фаге и подвергали циклизации посредством ковалентного связывания боковых цепей цистеина с низкомолекулярным каркасом.

### Сущность изобретения

Согласно первому аспекту изобретения предусматривается пептидный лиганд, специфичный к нектину-4, содержащий полипептид, содержащий по меньшей мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петли, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида, так что на молекулярном каркасе образуется по меньшей мере две полипептидных петли, где пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:



где 1NaI обозначает 1-нафтилаланин, HAArg обозначает гомоаргинин, HyP обозначает гидроксипролин и C<sub>i</sub>, C<sub>ii</sub> и C<sub>iii</sub> обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается конъюгат лекарственного средства, содержащий пептидный лиганд, как определено в настоящем описании, конъюгированный с одной или несколькими эффекторными и/или функциональными группами.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, для применения для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого нектином-4.

#### **Краткое описание чертежей**

Когда они присутствуют на чертежах, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего значения (SEM).

Фиг. 1 и 2. Кривые объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат NCI-H292.

Фиг. 3 и 4. Кривые объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей CB17-SCID, имеющим ксенотрансплантат HT-1376.

Фиг. 5. Кривая объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат Panc2.13.

Фиг. 6. Кривая объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат MDA-MB-468.

Фиг. 7. Кривая объема опухоли после введения BCY8549 (с BCY8245 в качестве контроля), самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат NCI-H292.

Фиг. 8. Стратегия гейтирования для нейтина-4 в молочной железе (T-47D и MDA-MB-468).

Фиг. 9. Стратегия гейтирования для нектина-4 в NCI-H292 и NCI-H322.

Фиг. 10 и 11. Стратегия гейтирования для нектина-4 в NCI-H526 и HT1080, соответственно.

Фиг. 12-16. Стратегия гейтирования для нектина-4 при раке мочевого пузыря (HT1376; фиг. 12), раке молочной железы (MDA-MB-468; фиг. 13), раке ободочной и прямой кишки (HT-29; фиг. 14A и НСТ-116; фиг. 14B), раке легкого (A549; фиг. 15A, NCI-H292; фиг. 15B, NCI-H358; фиг. 15C и NCI-526; фиг. 15D) и раке поджелудочной железы (Panc02.13; фиг. 16), соответственно.

Фиг. 17. Кривая объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат A549.

Фиг. 18. Кривая объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат НСТ116.

Фиг. 19. Кривая объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей CB17-SCID, имеющим ксенотрансплантат HT-1376.

Фиг. 20. Кривая объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат MDA-MB-468.

Фиг. 21. Кривая объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат NCI-H292.

Фиг. 22. Кривая объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат NCI-H526.

Фиг. 23. Кривая объема опухоли после введения BCY8245 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат Panc2.13.

Фиг. 24. Кривые объема опухоли после введения BCY8245 или BCY8245 в комбинации с BCY8234 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат MDA-MB-468.

Фиг. 25. Кривые объема опухоли после введения BCY8245 отдельно или BCY8245 в комбинации с BCY8234 самкам мышей BALB/c nude, имеющим ксенотрансплантат MDA-MB-468.

Фиг. 26-31. Кривые объема опухоли в ксенотрансплантатах Lu-01-0412, LU-01-0007, CTG-1771, CTG-1171, CTG-1106 и CTG-0896 PDX.

Фиг. 32. Эффективность BT8009 (т.е. BCY8245) коррелирует с экспрессией в ксенотрансплантатах CDX/PDX. Ксенотрансплантаты с малой/отсутствием экспрессии нектина-4 демонстрируют сниженную скорость роста опухоли. Ксенотрансплантаты, экспрессирующие нектин-4, демонстрируют регрессию опухоли. Модели как PDX, так и CDX включены в этот анализ, величины обобщены из различных отчетов.

Фиг. 33. Клетки MDA-MB-468 экспрессируют нектин-4 и демонстрирует пролонгированное удержание ММАЕ в опухоли.

Фиг. 34. HCS - анализ данных на клеточной линии MDA-MB-468.

#### **Подробное описание изобретения**

В одном варианте осуществления пептидный лиганд

$C_1P[1Na][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO: 1) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8234);

Ac-[B-Ala][Sar5]-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8122);

Ac-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8126);

(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8116);

флуоресцеин-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8205); и  
[PYA][B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8846).

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд

$C_iP[1Na][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO: 1) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8234);

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8122);

Ac-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8126);

(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8116); и

флуоресцеин-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8205).

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд

$C_iP[1Na][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO: 1) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8122);

Ac-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8126); и

(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8116).

В настоящем описании представлены данные в табл. 2, которые демонстрируют, что пептидные лиганды согласно этому варианту осуществления демонстрировали превосходные уровни связывания с нектином-4 человека, о чем свидетельствуют данные связывания SPR.

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд

$C_iP[1Na][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO: 1) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8122); и

Ac-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8126).

В настоящем описании представлены данные в табл. 1, которые демонстрируют, что пептидные лиганды согласно этому варианту осуществления демонстрировали превосходные уровни связывания с нектином-4 человека, о чем свидетельствуют данные связывания SPR.

В следующем варианте осуществления пептидный лиганд

$C_iP[1Na][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO: 1) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемый как BCY8234).

В настоящем описании представлены данные в табл. 3, которые демонстрируют, что пептидные лиганды согласно этому варианту осуществления, когда они были конъюгированы с цитотоксическим средством, демонстрировали превосходные уровни (< 10 нМ) связывания с нектином-4 человека, о чем свидетельствуют данные связывания SPR.

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).

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевают специалисты в данной области, например, в области пептидной химии, культивирования клеток и фагового дисплея, химии нуклеиновых кислот и биохимии. Используют стандартные технологии молекулярной биологии, способы генетики и биохимические способы (см. 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) 4<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc.), которые включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Номенклатура.

Нумерация.

При указании на положения аминокислотных остатков в пептидах по изобретению остатки цистеина ( $C_i$ ,  $C_{ii}$  и  $C_{iii}$ ) исключены из нумерации, поскольку они являются инвариантными, и, таким образом, нумерация аминокислотных остатков в пептидах по изобретению является такой, как указано ниже:

$C_i$ -I-E-E-G-Q-Y- $C_{ii}$ .Y-R-D-M-Y-M- $C_{iii}$  (SEQ ID NO: 1).

Для целей настоящего описания принимается, что все бициклические пептиды циклизованы с помощью ТВМВ (1,3,5-трис(бромметил)бензол) или 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) с образованием трехзамещенной структуры. Циклизация посредством ТВМВ и ТАТА происходит по  $C_i$ ,  $C_{ii}$  и  $C_{iii}$ .

Молекулярный формат.

N- или C-концевые удлинения к бициклической центральной последовательности добавлены с левой или с правой стороны от последовательности, отделенные дефисом. Например, N-концевая хвостовая часть  $\beta$ Ala-Sar<sub>10</sub>-Ala обозначается следующим образом:

$\beta$ Ala-Sar<sub>10</sub>-A-(SEQ ID NO: X).

Инвертированные пептидные последовательности.

С учетом описания в Nair et al (2003) *J Immunol* 170(3), 1362-1373, предусматривается, что пептид-

ные последовательности, описанные в настоящем описании, также могут быть применимыми в их ретроинвертированной форме. Например, последовательность переворачивается (т.е. N-конец становится C-концом и наоборот) и их стереохимия аналогично также переворачивается (т.е. D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот).

Пептидные лиганды.

Пептидный лиганд, как указано в настоящем описании, относится к пептиду, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Как правило, такие пептиды содержат две или более реакционноспособных групп (т.е. остатков цистеина), которые способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, которая замыкается между указанными реакционноспособными группами, называется последовательностью петли, поскольку она формирует петлю, когда пептид связан с каркасом. В данном случае, пептиды содержат по меньшей мере три остатка цистеина (обозначаемых в настоящем описании как C<sub>i</sub>, C<sub>ii</sub> и C<sub>iii</sub>), и образуют по меньшей мере две петли на каркасе.

Преимущества пептидных лигандов.

Определенные бициклические пептиды по настоящему изобретению имеют ряд преимущественных свойств, которые позволяют рассматривать их в качестве подходящих подобных лекарственному средству молекул для инъекционного, ингаляционного, глазного, перорального или местного введения. Такие преимущественные свойства включают:

видовая перекрестная реактивность. Это является типичным требованием для доклинической фармакодинамики и фармакокинетической оценки;

устойчивость к действию протеаз. Бициклические пептидные лиганды в идеальном случае должны демонстрировать устойчивость к протеазам плазмы, эпителиальным ("заякоренным на мембране") протеазам, желудочным и кишечным протеазам, поверхностным протеазам легких, внутриклеточным протеазам и т.п. Стабильность к протеазам должна сохраняться между различными видами, чтобы основные бициклические кандидаты можно было разработать в моделях на животных, а также с уверенностью вводить человеку;

желаемый профиль растворимости. Он является функцией соотношения заряженных и гидрофильных против гидрофобных остатков и внутри/межмолекулярного образования H-связей, которое является важным для целей составления и всасывания;

оптимальное время полужизни в плазме. В зависимости от клинического показания и режима лечения может потребоваться разработка бициклического пептида для кратковременного воздействия в условиях контроля острого состояния или разработка бициклического пептида с усиленным удержанием в кровотоке и, таким образом, являющегося оптимальным для контроля более хронических болезненных состояний. Другими факторами, определяющими желаемое время полужизни в плазме, являются необходимость в длительной максимальной терапевтической эффективности против сопутствующей токсикологии вследствие длительного воздействия средства; и

селективность. Определенные пептидные лиганды по изобретению демонстрируют высокую селективность относительно других нектинов.

Фармацевтически приемлемые соли.

Будет понятно, что солевые формы входят в объем изобретения и указание на пептидные лиганды включает солевые формы указанных лигандов.

Соли по настоящему изобретению можно синтезировать из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную часть, общепринятыми химическими способами, такими как способы, описанные в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Как правило, такие соли можно получать путем реакции форм свободной кислоты или основания этих соединений с соответствующим основанием или кислотой в воде или органическом растворителе, или в их смеси.

Кислотно-аддитивные соли (моно- или дисоли) могут быть образованы с широким диапазоном кислот, как неорганических, так и органических. Примеры кислотно-аддитивных солей 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-ацетамидобензойной, бутановой, (+) камфорной, камфор-сульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, фумаровой, галактаровой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α-оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галогенводородной (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изотионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, (±)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, (±)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памовой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминосалициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной,

дигалловой, (+)-L-виннокаменной, тиоциановой, п-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных из уксусной, хлористоводородной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изотионовой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, серной, метансульфоновой (мезилат), этансульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, пропионовой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислот. Одной конкретной солью является гидрохлорид. Другой конкретной солью является ацетат.

Если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например,  $-\text{COOH}$  может представлять собой  $-\text{COO}^-$ ), тогда соль может быть образована с органическим или неорганическим основанием с образованием подходящего катиона. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но не ограничиваются ими, ионы щелочных металлов, такие как  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , катионы щелочноземельных металлов, такие как  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , и другие катионы, такие как  $\text{Al}^{3+}$  или  $\text{Zn}^{2+}$ . Примеры подходящих органических катионов включают, но не ограничиваются ими, ион аммония (т.е.  $\text{NH}_4^+$ ) и замещенные ионы аммония (например,  $\text{NH}_3\text{R}^+$ ,  $\text{NH}_2\text{R}_2^+$ ,  $\text{NHR}_3^+$ ,  $\text{NR}_4^+$ ). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, образованные из: метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислоты, такие как лизин и аргинин. Примером распространенного четвертичного иона аммония является  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ .

Когда пептиды по изобретению содержат функциональную аминогруппу, они могут образовывать четвертичные соли аммония, например, путем реакции с алкилирующим агентом в соответствии со способами, известными специалисту в данной области. Такие четвертичные соединения аммония входят в объем изобретения.

Модифицированные производные.

Будет понятно, что модифицированные производные пептидных лигандов, как определено в настоящем описании, входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают одну или несколько модификаций, выбранных из: N-концевых и/или C-концевых модификаций; замены одного или нескольких аминокислотных остатков одним или несколькими неприродными аминокислотными остатками (такой как замена одного или нескольких полярных аминокислотных остатков одной или несколькими изостерическими или изоэлектронными аминокислотами; замена одного или нескольких неполярных аминокислотных остатков другими неприродными изостерическими или изоэлектронными аминокислотами); присоединения спейсерной группы; замены одного или нескольких подверженных окислению аминокислотных остатков одним или несколькими устойчивыми к окислению аминокислотными остатками; замены одного или нескольких аминокислотных остатков аланином; замены одного или нескольких остатков L-аминокислот одним или несколькими остатками D-аминокислот; N-алкилирования одной или нескольких амидных связей в бициклическом пептидном лиганде; замены одной или нескольких пептидных связей суррогатной связью; модификации длины пептидного остова; замены водорода на альфа-углероде одного или нескольких аминокислотных остатков другой химической группой, модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспартат и тирозин, подходящим амином, тиолом, карбоновой кислотой и реагирующими с фенолом реагентами для функционализации указанных аминокислот, и внесения или замены на аминокислоты, которые вносят ортогональные реакционно-способные группы, которые пригодны для функционализации, например, содержащие азидные или алкиновые группы аминокислоты, которые позволяют функционализацию посредством содержащих алкин или азид частей, соответственно.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает N-концевую и/или C-концевую модификацию. В следующем варианте осуществления, где модифицированное производное включает N-концевую модификацию с использованием подходящей реагирующей с амино химической группы, и/или C-концевую модификацию с использованием подходящей реагирующей с карбокси химической группы. В следующем варианте осуществления указанная N-концевая или C-концевая модификация включает присоединение эффекторной группы, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксическое средство, радиохелатор или хромофор.

В следующем варианте осуществления модифицированное производное содержит N-концевую модификацию. В следующем варианте осуществления N-концевая модификация включает N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления N-концевая группа цистеина (группа, обозначаемая в настоящем описании как  $\text{C}_1$ ) кэппируется уксусным ангидридом или другими подходящими реагентами в ходе пептидного синтеза, что приводит к молекуле, которая является ацетилированной на N-конце. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки распознавания для аминокислоты и устраняет возможность деградации бициклического пептида.

В альтернативном варианте осуществления N-концевая модификация включает присоединение молекулярной спейсерной группы, которая облегчает конъюгацию эффекторных групп и сохранение эффективности бициклического пептида в отношении его мишени.

В следующем варианте осуществления модифицированное производное содержит С-концевую модификацию. В следующем варианте осуществления С-концевая модификация включает амидную группу. В этом варианте осуществления С-концевую группу цистеина (группа, обозначаемая в настоящем описании как  $C_{iii}$ ) синтезируют в качестве амида в ходе пептидного синтеза, что приводит к молекуле с С-концевым амидированием. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество удаления потенциальной точки распознавания карбоксипептидазой и снижает потенциал к протеолитической деградации бициклического пептида.

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких аминокислотных остатков на один или несколько неприродных аминокислотных остатков.

Альтернативно можно использовать неприродные аминокислоты, имеющие ограниченные боковые цепи аминокислот, так что происходит конформационное и пространственное препятствование протеолитическому гидролизу ближайшей пептидной связи. В частности, это касается аналогов пролина, объемных боковых цепей,  $\alpha\alpha$ -двухзамещенных производных (например, аминокислоты, Aib), и циклоаминокислот, причем простым производным является аминокислота циклопропилкарбоновая кислота.

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает присоединение спейсерной группы. В следующем варианте осуществления модифицированное производное включает присоединение спейсерной группы к N-концевому цистеину ( $C_i$ ) и/или С-концевому цистеину ( $C_{iii}$ ).

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких подверженных окислению аминокислотных остатков на один или несколько устойчивых к окислению аминокислотных остатков. В следующем варианте осуществления модифицированное производное содержит замену остатка триптофана на остаток нафтилаланина или аланина. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество улучшения профиля фармацевтической стабильности полученного бициклического пептидного лиганда.

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких заряженных аминокислотных остатков на один или несколько гидрофобных аминокислотных остатков. В альтернативном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких гидрофобных аминокислотных остатков на один или несколько заряженных аминокислотных остатков. Правильный баланс между заряженными и гидрофобными остатками является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания белками плазмы, и, таким образом, на концентрацию свободной доступной фракции в плазме, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхностях клеток. Комбинация этих двух типов может влиять на время полужизни, объем распределения и экспозицию пептидного лекарственного средства, и может быть модифицирована в зависимости от клинического конечного результата. Кроме того, правильное комбинирование и количество заряженных против гидрофобных аминокислотных остатков может снижать раздражение в области инъекции (если пептидное лекарственное средство вводят подкожно).

В одном варианте осуществления модифицированное производное содержит замену одного или нескольких остатков L-аминокислот на один или несколько остатков D-аминокислот. Полагают, что этот вариант осуществления увеличит протеолитическую стабильность посредством пространственного препятствования и вследствие склонности D-аминокислот к стабилизации конформаций P-изгибов (Tugui et al. (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

В одном варианте осуществления модифицированное производное включает удаление каких-либо аминокислотных остатков и замену на аланин. Этот вариант осуществления обеспечивает преимущество устранения потенциального участка(ов) протеолитической атаки.

Следует отметить, что каждая из вышеупомянутых модификаций служит для намеренного повышения эффективности или стабильности пептида. Дальнейшее повышение эффективности на основе модификаций может быть достигнуто посредством следующих механизмов:

включение гидрофобных частей, которые имеют гидрофобный эффект и обеспечивают более низкие константы скорости диссоциации, так чтобы достигалась более высокая аффинность;

включение заряженных групп, которые осуществляют ионные взаимодействия дальнего действия, что приводит к более быстрым константам скорости ассоциации и к более высокой аффинности (см., например, Schreiber et al, Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); и

включение дополнительного ограничения в пептид, например, посредством надлежащего ограничения боковых цепей аминокислот, так что снижение энтропии является минимальным при связывании мишени, ограничения торсионных углов основной цепи, так что снижение энтропии является минимальным при связывании мишени, и внесения дополнительных циклизаций в молекулу по идентичным причинам.

(Для обзора см. Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, и Nestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

Изотопные варианты.

Настоящее изобретение относится ко всем фармацевтически приемлемым (радио)изотопно меченым пептидным лигандам по изобретению, где один или несколько атомов заменены атомами, имеющими то же атомное число, но атомную массу или массовое число, отличные от атомной массы или массового числа, встречающихся в природе, и к пептидным лигандам по изобретению, к которым присоединены металл-хелатирующие группы (называемые "эффекторными"), которые способны удерживать соответствующие (радио)изотопы, и к пептидным лигандам по изобретению, где определенные функциональные группы ковалентно заменены соответствующими (радио)изотопами или изотопно мечеными функциональными группами.

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

Определенные изотопно меченные пептидные лиганды по изобретению, например, пептидные лиганды, включающие радиоактивный изотоп, являются пригодными в исследованиях распределения лекарственных средств и/или субстратов в тканях и для клинической оценки наличия и/или отсутствия мишени нектин-4 на пораженных заболеванием тканях. Пептидные лиганды по изобретению, кроме того, могут иметь ценные диагностические свойства, поскольку их можно использовать для детекции или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В способах детекции или идентификации могут использоваться соединения, которые мечены агентами для мечения, такими как радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза) и т.д. Особенно пригодными для этой цели являются радиоактивные изотопы тритий, т.е.  $^3\text{H}$  (T), и углерода-14, т.е.  $^{14}\text{C}$ , ввиду их простоты включения и доступных средств детекции.

Замена на более тяжелые изотопы, такие как дейтерий, т.е.  $^2\text{H}$  (D), может обеспечить определенные терапевтические преимущества в результате большей метаболической стабильности, например, увеличенного времени полужизни *in vivo* или снижения требуемых дозировок, и, таким образом, она может быть предпочтительной в некоторых обстоятельствах.

Замена на позитронно-активные изотопы, такие как  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{15}\text{O}$  и  $^{13}\text{N}$ , может быть полезной в исследованиях с использованием позитронно-эмиссионной томографии (PET) для изучения занятости мишени.

Изотопно меченные соединения пептидных лигандов по изобретению, главным образом, можно получать общепринятыми способами, известными специалистам в данной области, или посредством процессов, аналогичных процессам, описанным в прилагаемых примерах, с использованием подходящего изотопно меченного реагента вместо немеченого реагента, используемого ранее.

Молекулярный каркас.

В одном варианте осуществления молекулярный каркас содержит неароматический молекулярный каркас. Упоминание в настоящем описании "неароматического молекулярного каркаса" относится к любому молекулярному каркасу, как определено в настоящем описании, который не содержит ароматическую (т.е. ненасыщенную) карбоциклическую или гетероциклическую кольцевую систему.

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

Как отмечалось в вышеуказанных документах, молекулярный каркас может представлять собой низкомолекулярное соединение, такое как низкомолекулярное органическое соединение.

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 содержит реакционноспособные группы, которые способны реагировать с функциональной группой(ами) полипептида, образуя ковалентные связи.

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

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

Эффекторные и функциональные группы.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается конъюгат лекарственного средства, содержащий пептидный лиганд, как определено в настоящем описании, конъюгированный с одной или несколькими 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 (CL) антитела, домен СН1 тяжелой цепи антитела, домен СН2 тяжелой цепи антитела, домен СН3 тяжелой цепи антитела или любую их комбинацию, в дополнение к одному или нескольким доменам константной области. Эффекторная группа также может содержать шарнирную область антитела (такую как область, обычно находящаяся между доменами СН1 и СН2 молекулы IgG).

В следующем варианте осуществления этого аспекта изобретения эффекторная группа в соответствии с настоящим изобретением представляет собой Fc-область молекулы IgG. Преимущественно, конструкция пептидный лиганд-эффекторная группа в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из слитой конструкции пептидный лиганд-Fc, имеющей время полужизни  $t_{1/2}$ , составляющее сутки или более, двое суток или более, 3 суток или более, 4 суток или более, 5 суток или более, 6 суток или более или 7 суток или более. Наиболее преимущественно, пептидный лиганд в соответствии с настоящим изобретением содержит или состоит из слитой конструкции пептидный лиганд-Fc, имеющей время полужизни, составляющее сутки или более.

Функциональные группы включают, главным образом, связывающие группы, лекарственные средства, реакционноспособные группы для присоединения других структур, функциональные группы, которые способствуют захвату макроциклических пептидов в клетки и т.п.

Способность пептидов проникать в клетки позволит пептидам против внутриклеточных мишеней быть эффективными. Мишени, доступные для пептидов, обладающих способностью проникать в клетки, включают факторы транскрипции, внутриклеточные сигнальные молекулы, такие как тирозинкиназы, и молекулы, вовлеченные в апоптотический путь. Функциональные группы, которые позволяют проникновение в клетки, включают пептиды или химические группы, которые могут быть присоединены либо к пептиду, либо к молекулярному каркасу. Пептиды, такие как пептиды, происходящие из VP22, Tat ВИЧ, белка гомеобокса *Drosophila* (*Antennapedia*), описаны, например, в 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, для которых показано, что они являются эффективными в отношении переноса через плазматические мембраны, включают пептид пенетратин из 16 аминокислот из белка *Drosophila Antennapedia* (Derossi et al (1994) *J Biol. Chem.* Volume 269 p10444), "модельный амфипатический пептид" из 18 аминокислот (Oehlke et al (1998) *Biochim Biophys Acts* Volume 1414 p127) и аргинин-богатые области белка TAT ВИЧ. Непептидные подходы включают применение низкомолекулярных миметиков или SMOС, которые могут быть без труда присоединены к биомолекулам (Okuyama et al (2007) *Nature Methods* Volume 4 p153). Другие химические стратегии для присоединения групп гуанидина к молекулам также повышают проникновение в клетки (Elson-Scwab et al (2007) *J Biol Chem* Volume 282 p13585). Низкомолекулярные соединения, такие как стероиды, можно добавлять к молекулярному каркасу для повышения поглощения клетками.

Один из классов функциональных групп, которые могут быть присоединены к пептидным лигандам, включает антитела и их связывающие фрагменты, такие как Fab, Fv или однодоменные фрагменты. В частности, можно использовать антитела, которые связываются с белками, способными увеличивать время полужизни пептидного лиганда *in vivo*.

В одном варианте осуществления структура пептидный лиганд-эффекторная группа по изобретению имеет время полужизни  $t_{1/2}$ , выбранное из группы, состоящей из: 12 ч или более, 24 ч или более, 2 суток или более, 3 суток или более, 4 суток или более, 5 суток или более, 6 суток или более, 7 суток или более, 8 суток или более, 9 суток или более, 10 суток или более, 11 суток или более, 12 суток или более, 13 суток или более, 14 суток или более, 15 суток или более или 20 суток или более. Преимущественно структура пептидный лиганд-эффекторная группа или композиция по изобретению имеет время полужизни  $t_{1/2}$  в диапазоне от 12 до 60 ч. В следующем варианте осуществления она имеет время полужизни  $t_{1/2}$ , составляющее сутки или более. В следующем варианте осуществления оно находится в диапазоне от 12 до 26 ч.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения функциональная группа выбрана из хелатора металлов, который пригоден для образования комплекса с радиоизотопами металлов, имеющими медицинское значение.

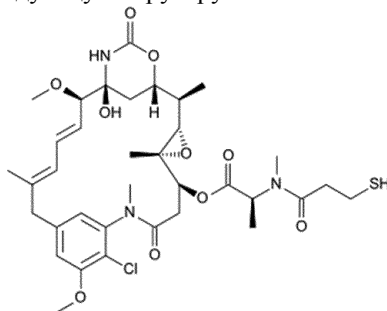
Возможные эффекторные группы также включают ферменты, например, такие как карбоксипептидаза G2, для применения в терапии фермент/пролекарство, где пептидный лиганд заменяет антитела в ADEPT.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения функциональная группа выбрана из лекарственного средства, такого как цитотоксическое средство для терапии злокачественной опухоли. Подходящие примеры включают: алкилирующие средства, такие как цисплатин и карбоплатин, а также оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, ифосфамид; антиметаболиты, включая аналоги пуринов азатиоприн и меркаптопуриин или аналоги пиримидинов; растительные алкалоиды и терпеноиды, включающие алкалоиды барвинка, такие как винкристин, винбластин, винорелбин и виндезин; по-

дофиллотоксин и его производные этопозид и тенипозид; таксаны, включая паклитаксел, первоначально известный как таксол; ингибиторы топоизомеразы, включая камптотецины: иринотекан и топотекан, и ингибиторы типа II, включая амсакрин, этопозид, этопозид фосфат и тенипозид. Следующие средства могут включать противоопухолевые антибиотики, которые включают иммунодепрессант дактиномицин (который используют для трансплантации почек), доксорубин, эпирубин, блеомицин, калихеамицины и другие.

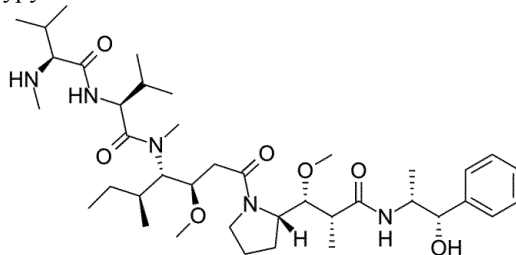
В одном конкретном варианте осуществления изобретения цитотоксическое средство выбрано из майтанзиноидов (таких как DM1) или монометилауристатинов (таких как MMAE).

DM1 представляет собой цитотоксическое средство, которое представляет собой тиолсодержащее производное майтанзина и имеет следующую структуру:



В настоящем описании в табл. 3 представлены данные, которые демонстрируют эффекты пептидного лиганда, конъюгированного с токсином, содержащим DM1.

Монометилауристатин E (MMAE) представляет собой синтетическое антинеопластическое средство и имеет следующую структуру:



В настоящем описании в табл. 3 представлены данные, которые демонстрируют эффекты пептидных лигандов, конъюгированных с токсином, содержащим MMAE.

В еще одном дополнительно конкретном варианте осуществления изобретения цитотоксическое средство выбрано из монометилауристатина E (MMAE).

В одном варианте осуществления цитотоксическое средство связано с бициклическим пептидом расщепляемой связью, такой как дисульфидная связь или чувствительная к действию протеаз связь. В следующем варианте осуществления группы, соседние с дисульфидной связью, модифицируют для контроля препятствования дисульфидной связи и посредством этого скорости расщепления и сопутствующего высвобождения цитотоксического средства.

В опубликованной работе показана возможность модификации чувствительности дисульфидной связи к восстановлению путем внесения пространственного препятствования с любой стороны дисульфидной связи (Kellogg et al (2011) *Bioconjugate Chemistry*, 22, 717). Более высокая степень пространственного препятствования снижает скорость восстановления посредством внутриклеточного глутатиона, а также внеклеточных (системных) восстановителей, вследствие чего происходит уменьшение простоты, с которой токсины высвобождаются, как внутри, так и снаружи клетки. Таким образом, выбор оптимальной стабильности дисульфида в кровотоке (которая минимизирует нежелательные побочные эффекты токсина) против эффективного высвобождения во внутриклеточной среде (которое максимизирует терапевтический эффект) может быть достигнут путем тщательного выбора степени препятствования с каждой из сторон от дисульфидной связи.

Препятствование с любой из сторон дисульфидной связи модулируют посредством внесения одной или нескольких металльных групп либо на нацеливающей структуре (в данном случае, бициклическом пептиде), либо на стороне токсина молекулярной конструкции.

В одном варианте осуществления цитотоксическое средство и линкер выбраны из любых комбинаций из тех, что описаны в WO 2016/067035 (цитотоксические средства и их линкеры включены в настоящее описание в качестве ссылок).

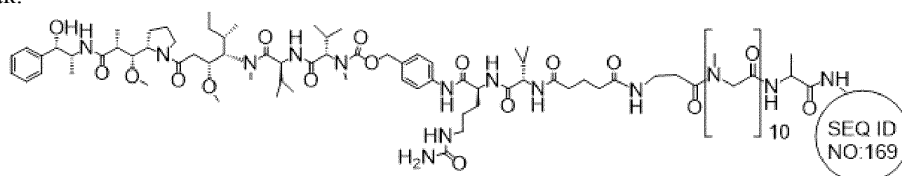
В одном варианте осуществления линкер между указанным цитотоксическим средством и указанным бициклическим пептидом содержит один или несколько аминокислотных остатков. Примеры подходящих аминокислотных остатков в качестве подходящих линкеров включают Ala, Cit, Lys, Trp и Val.

В одном варианте осуществления цитотоксическое средство выбрано из MMAE и указанный конъю-

югат лекарственного средства, кроме того, содержит линкер, выбранный из: -PABC-Cit-Val-глутарила- или -PABC-циклобутил-Ala-Cit-βAla-, где PABC означает п-аминобензилкарбамат. Полные детали, касающиеся циклобутилсодержащего линкера, могут быть найдены в Wei et al (2018) J. Med. Chem. 61, 989-1000. В следующем варианте осуществления цитотоксическое средство выбрано из MMAE и линкер представляет собой -PABC-Cit-Val-глутарил-.

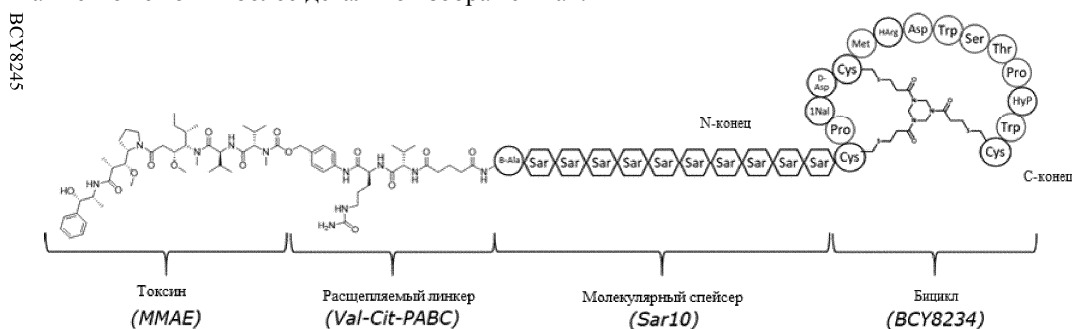
В альтернативном варианте осуществления цитотоксическое средство представляет собой DM1 и указанный конъюгат лекарственного средства, кроме того, содержит линкер, который представляет собой -SPDB-(SO<sub>3</sub>H)-, где SPDB означает N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат.

В альтернативном варианте осуществления цитотоксическое средство представляет собой MMAE, бициклической пептид выбран из BCY8234, как определено в настоящем описании, и линкер выбран из -PABC-Cit-Val-глутарила-. Этот BDC известен в настоящем описании как BCY8245 и схематично изображается как:



BCY8245

и также может быть более детально изображен как:



В настоящем описании представлены данные, которые демонстрируют превосходное связывание BCY8245 с нектин-4 человека в анализе связывания посредством SPR, как показано в табл. 3. Этот BDC также продемонстрировал хорошую противоопухолевую активность в модели немелкоклеточного рака легкого, как показано в примере 1, в модели рака мочевого пузыря, как показано в примере 2, в модели рака поджелудочной железы, как показано в примере 3, и в модели рака молочной железы, как показано в примере 4.

В альтернативном варианте осуществления цитотоксическое средство представляет собой MMAE, бициклической пептид выбран из BCY8234, как определено в настоящем описании, и линкер выбран из -PABC-циклобутил-(B-Ala)-. Этот BDC известен в настоящем описании как BCY8549. В настоящем описании представлены данные, которые демонстрируют превосходное связывание BCY8549 с нектин-4 человека в анализе связывания SPR, как показано в табл. 3.

В следующем варианте осуществления бициклический конъюгат лекарственного средства выбран из BCY8245 или BCY8549. В следующем варианте осуществления бициклический конъюгат лекарственного средства представляет собой BCY8245. Конъюгат лекарственного средства BCY8245 продемонстрировал лучшую дозозависимую противоопухолевую активность, как продемонстрировано в данных, описанных в настоящем описании.

#### Синтез.

Пептиды по настоящему изобретению можно изготавливать синтетическим путем стандартными способами с последующей реакцией с молекулярным каркасом *in vitro*. Когда это осуществляют, можно использовать стандартную химию. Это позволяет быстрое крупномасштабное получение растворимого материала для дальнейших экспериментов или подтверждения. Такие способы можно проводить с использованием общепринятой химии, такой как химия, описанная в Timmerman et al (выше).

Таким образом, изобретение также относится к производству полипептидов или конъюгатов, описанных, как описано в настоящем описании, где производство включает необязательные дополнительные стадии, как объяснено ниже. В одном варианте осуществления эти стадии проводят для конечного полипептида/конъюгата, полученного посредством химического синтеза.

Необязательно аминокислотные остатки в представляющем интерес полипептиде можно заменять при получении конъюгата или комплекса.

Пептиды также можно удлинять, например, путем включения, например, другой петли и, таким образом, внесения множественной специфичности.

Для удлинения пептида его можно просто удлинять химически на его N-конце или C-конце или в петлях с использованием ортогонально выступающих остатков лизина (и аналогов) с помощью стандартной твердофазной химии или химии в фазе раствора. Стандартные способы (био)конъюгации можно использовать для обеспечения активированного или активируемого N- или C-конца. Альтернативно вставки можно вносить путем конденсации фрагментов или нативного химического лигирования, например, как описано в (Dawson et al. 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science* 266:776-779), или посредством ферментов, например с использованием субтилизазы, как описано в (Chang et al *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Dec 20; 91 (26): 12544-8 или в Hikari et al *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

Альтернативно пептиды можно удлинять или модифицировать путем дальнейшей конъюгации через дисульфидные связи. Это имеет дополнительное преимущество, состоящее в позволении первому и второму пептидам диссоциировать друг от друга после того, как они оказываются в восстанавливающей среде в клетке. В этом случае, молекулярный каркас (например, ТАТА) можно присоединять в ходе химического синтеза первого пептида, чтобы он реагировал с тремя группами цистеина; затем можно присоединять дополнительный цистеин или тиол к N- или C-концу первого пептида, так чтобы этот цистеин или тиол реагировал только со свободным цистеином или тиолом второго пептида, образуя связанный дисульфидной связью конъюгат бициклический пептид-пептид.

Сходные способы в равной степени применимы для синтеза/присоединения двух бициклических и биспецифических макроциклов, потенциально создавая тетраспецифическую молекулу.

Более того, присоединения других функциональных групп или эффекторных групп можно проводить аналогичным образом с использованием соответствующей химии, осуществляя присоединение на N- или C-конце или посредством боковых цепей. В одном варианте осуществления присоединение проводят так, что не происходит блокирования активности любой из структур.

Фармацевтические композиции.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Главным образом, пептидные лиганды по настоящему изобретению могут использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически приемлемыми эксципиентами или носителями. Как правило, эти эксципиенты или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и/или забуференные среды. Парентеральные носители включают раствор хлорида натрия, раствор декстрозы Рингера, раствор декстрозы и хлорид натрия и лактатный раствор Рингера. Подходящие физиологически-приемлемые адьюванты, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Внутривенные носители включают жидкости и средства для восполнения питательных веществ и восполнения электролитов, такие как средства на основе раствора декстрозы Рингера. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition).

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно использовать в качестве вводимых по отдельности композиций или совместно с другими средствами. Они 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 совместно с белковыми лигандами по настоящему изобретению, или даже комбинациями выбранных полипептидов в соответствии с настоящим изобретением, обладающими различной специфичностью, такими как полипептиды, отобранные с использованием различных лигандов-мишеней, и их могут объединять или не объединять перед введением.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может представлять собой любой из путей, широко известных средним специалистам в данной области. Для терапии пептидные лиганды по изобретению можно вводить любому пациенту в соответствии со стандартными способами. Введение можно проводить посредством любого подходящего пути, в том числе парентерально, внутривенно, внутримышечно, внутривентриально, трансдермально, легочным путем или также в соответствующих случаях путем прямой инфузии с использованием катетера. Предпочтительно, фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить посредством ингаляции. Дозировка и частота введения зависят от возраста, пола и состояния пациента, сопутствующего введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должен учитывать клиницист.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению можно лиофилизировать для хранения и восстанавливать в подходящем носителе перед применением. Показано, что этот способ является эффективным, и можно использовать известные в данной области способы лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области будет понятно, что лиофилизация и восстановление могут приводить к различной степени потери активности, и что для компенсации этого уровня могут быть увеличены.

Композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их коктейль, можно

вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В определенных терапевтических применениях достаточное количество для достижения по меньшей мере частичного ингибирования, подавления, модулирования, уничтожения или некоторого другого поддающегося определению параметра популяции выбранных клеток определяют как "терапевтически-эффективная доза". Количества, требуемые для достижения этой дозировки, зависят от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, но, как правило, они находятся в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм массы тела, причем более часто используют дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических применений композиции, содержащие пептидные лиганды по настоящему изобретению или их коктейли, также можно вводить в сходных или несколько более низких дозировках.

Композицию, содержащую пептидный лиганд в соответствии с настоящим изобретением, можно использовать в профилактических и терапевтических условиях для способствования изменению, инактивации, уничтожению или удалению выбранной популяции клеток-мишеней у млекопитающего. Кроме того, пептидные лиганды, описанные в настоящем описании, можно использовать экстракорпорально или *in vitro* для селективного уничтожения, истощения или иного эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенной совокупности клеток. Кровь от млекопитающего можно комбинировать экстракорпорально с выбранными пептидными лигандами, и при этом нежелательные клетки убивают или иным образом извлекают из крови для возвращения млекопитающему в соответствии со стандартными способами.

Совместное введение с одним или несколькими другими терапевтическими средствами.

В зависимости от конкретного состояния или заболевания, подвергаемого лечению, также в композиции по настоящему изобретению могут присутствовать дополнительные терапевтические средства, которые обычно вводят для лечения этого состояния. Таким образом, в одном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, содержит одно или несколько терапевтических средств. Как используют в рамках изобретения, дополнительные терапевтические средства, которые обычно вводят для лечения конкретного заболевания или состояния, известны как "подходящие для заболевания или состояния, подвергаемого лечению".

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения описанного заболевания или состояния, включающему введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения, описанного в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемой соли, и совместное введение одновременно или последовательно эффективного количества одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, таких как средства, описанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ включает сопутствующее введение одного дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления способ включает сопутствующее введение двух дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления комбинация описанного соединения и дополнительного терапевтического средства или средств действует синергично.

Соединение по настоящему изобретению также можно использовать в комбинации с известными терапевтическими процессами, например, введением гормонов или лучевой терапией. В определенных вариантах осуществления предусматриваемое соединение используют в качестве радиосенсибилизирующего средства, особенно для лечения опухолей, которые демонстрируют низкую чувствительность к лучевой терапии.

Соединение по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими соединениями, и возможная комбинированная терапия принимает форму фиксированных комбинаций, или введение соединения по изобретению и одного или нескольких других терапевтических соединений является поочередным или проводимым независимо друг от друга, или проводят комбинированное введение фиксированных комбинаций и одного или нескольких других терапевтических соединений. Соединение по настоящему изобретению, альтернативно или дополнительно, можно вводить, в частности, для терапии опухоли в комбинации с химиотерапией, лучевой терапией, иммунотерапией, фототерапией, хирургическим вмешательством, или их комбинацией. В равной степени возможна долговременная терапия, также как и адьювантная терапия, в контексте других стратегий лечения, как описано выше. Другими возможными способами лечения являются терапия для поддержания состояния пациента после регрессии опухоли или даже химиопрофилактическая терапия, например, у пациентов, имеющих риск.

Одно или несколько других терапевтических средств можно вводить отдельно от соединения или композиции по изобретению в качестве режима многократного дозирования. Альтернативно одно или несколько других терапевтических средств могут быть частью однократной дозированной формы, смешанной с соединением по настоящему изобретению в единую композицию. При введении в качестве режима многократного дозирования одно или несколько других терапевтических средств и соединений или композиций по изобретению можно вводить одновременно, последовательно или в пределах некоторого периода времени друг от друга, например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 ч друг от друга. В некоторых вариантах осуществления одно или несколь-

ко других терапевтических средств и соединение или композицию по изобретению вводят в качестве режима многократного дозирования в пределах более 24 ч друг от друга.

Как используют в рамках изобретения, термин "комбинация", "комбинированный" и сходные термины относятся к одновременному или последовательному введению терапевтических средств в соответствии с настоящим изобретением. Например, соединение по настоящему изобретению можно вводить с одним или несколькими другими терапевтическими средствами одновременно или последовательно в отдельных единичных дозированных формах или вместе в единой единичной дозированной форме. Таким образом, настоящее изобретение относится к единой единичной дозированной форме, содержащей соединение по настоящему изобретению, одно или несколько других терапевтических средств и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или наполнитель.

Количество соединения по изобретению и одного или нескольких других терапевтических средств (в композициях, которые содержат дополнительное терапевтическое средство, как описано выше), которые можно комбинировать с материалами носителей для получения единичной дозированной формы, варьируется в зависимости от хозяина, подвергаемого лечению, и конкретного способа введения. Предпочтительно, композиция по изобретению должна быть составлена так, чтобы можно было вводить дозировку 0,01-100 мг/кг массы тела/сутки соединения по изобретению.

В композициях, которые содержат одно или несколько других терапевтических средств, одно или несколько других терапевтических средств и соединение по изобретению могут действовать синергически. Таким образом, количество одного или нескольких других терапевтических средств таких композиций может быть меньшим, чем количество, которое требуется в монотерапии с использованием только этого терапевтического средства. В таких композициях можно вводить дозировку 0,01-1000 мкг/кг массы тела/сутки одного или нескольких других терапевтических средств.

Количество одного или нескольких других терапевтических средств, присутствующих в композициях по настоящему изобретению, может быть не большим, чем количество, которое обычно бы вводи́лось в композиции, содержащей это терапевтическое средство в качестве единственного активного вещества. Предпочтительно количество одного или нескольких других терапевтических средств в описанных в настоящем описании композициях находится в диапазоне приблизительно от 50 до 100% от количества, обычно присутствующего в композиции, содержащей это средство в качестве единственного терапевтически активного вещества. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств вводят в дозировке приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95% от количества, обычно вводимого для этого средства. Как используют в рамках изобретения, выражение "обычно вводимый" означает количество одобренного FDA терапевтического средства, предоставляемое для дозирования в соответствии с одобренным FDA вкладышем или ярлыком.

Соединения по настоящему изобретению или их фармацевтические композиции также можно включать в композиции для нанесения покрытия на имплантируемое медицинское устройство, такое как протезы, искусственные клапаны, сосудистые трансплантаты, стенты и катетеры. Сосудистые стенты, например, используют для преодоления рестеноза (повторное сужение сосудистой стенки после повреждения). Однако, пациенты с использованием стентов или других имплантируемых устройств имеют риск образования тромбов или активации тромбоцитов. Эти нежелательные эффекты можно предупреждать или смягчать путем предварительного покрытия устройства фармацевтически приемлемой композицией, содержащей ингибитор киназы. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения являются имплантируемые устройства, покрытые соединением согласно настоящему изобретению.

Другие иллюстративные терапевтические средства.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор поли-ADP-рибозополимеразы (PARP). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PARP выбран из олапариба (Lynparza®, AstraZeneca); рукапариба (Rubraca®, Clovis Oncology); нирапариба (Zejula®, Tesaro); талазопариба (MDV3800/BMN 673/LT00673, Medivation/Pfizer/Biomarin); велипариба (ABT-888, AbbVie); и BGB-290 (BeiGene, Inc.).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор деацетилазы гистонов (HDAC). В некоторых вариантах осуществления ингибитор HDAC выбран из вориностата (Zolinza®, Merck); ромидепсина (Istodax®, Celgene); панобиностата (Farydak®, Novartis); белиностата (Beleodaq®, Spectrum Pharmaceuticals); энтиностата (SNDX-275, Syndax Pharmaceuticals) (NCT00866333); и чидамида (Epidaza®, HBI-8000, Chipscreen Biosciences, Китай).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор CDK, такой как ингибитор CDK4/CDK6. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CDK 4/6 выбран из пальбоциклиба (Ibrance®, Pfizer); рибоциклиба (Kisqali®, Novartis); абемациклиба (Ly2835219, Eli Lilly) и трилациклиба (G1T28, G1 Therapeutics).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). В некоторых вариантах осуществле-

ния ингибитор PI3K выбран из иделалисиба (Zydelig®, Gilead), алпелисиба (BYL719, Novartis), таселисиба (GDC-0032, Genentech/Roche); пиктилисиба (GDC-0941, Genentech/Roche); копанлисиба (BAY806946, Bayer); дувелисиба (ранее IPI-145, Infinity Pharmaceuticals); PQR309 (Piqur Therapeutics, Швейцария) и TGR1202 (ранее RP5230, TG Therapeutics).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой терапевтические средства на основе платины, также называемые платинами. Платины вызывают сшивание ДНК, так что они ингибируют репарацию ДНК и/или синтез ДНК, в основном в быстро репродуцирующихся клетках. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство на основе платины выбрано из цисплатина (Platinol®, Bristol-Myers Squibb); карбоплатина (Paraplatin®, Bristol-Myers Squibb; также Teva; Pfizer); оксалиплатина (Eloxitin® Sanofi-Aventis); недаплатина (Aqupla®, Shionogi), пикоплатина (Poniard Pharmaceuticals) и сатраплатина (JM-216, Agennix).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой соединение таксана, которое вызывает нарушение микротрубочек, которые необходимы для деления клеток. В некоторых вариантах осуществления соединение таксана выбрано из паклитаксела (Taxol®, Bristol-Myers Squibb), доцетаксела (Taxotere®, Sanofi-Aventis; Docefrez®, Sun Pharmaceutical), связанного с альбумином паклитаксела (Abraxane®; Abraxis/Celgene), кабазитаксела (Jevtana®, Sanofi-Aventis) и SID530 (SK Chemicals, Co.) (NCT00931008).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой нуклеозидный ингибитор или терапевтическое средство, которое препятствует нормальному синтезу ДНК, синтезу белка, репликации клеток или иным образом ингибирует быстро пролиферирующие клетки.

В некоторых вариантах осуществления нуклеозидный ингибитор выбран из трабектедина (гуанидин-алкилирующее средство, Yondelis®, Janssen Oncology), мехлорэтамидина (алкилирующее средство, Valchlor®, Aktelion Pharmaceuticals); винкристина (Oncovin®, Eli Lilly; Vincasar®, Teva Pharmaceuticals; Marqibo®, Talon Therapeutics); темозоломида (пролекарство алкилирующего средства 5-(3-метилтриазен-1-ил)-имидазол-4-карбоксамид (MTIC) Temodar®, Merck); инъекционного цитарабина (ара-С, антиметаболический аналог цитидина, Pfizer); ломустина (алкилирующее средство, CeeNU®, Bristol-Myers Squibb; Gleostine®, NextSource Biotechnology); азацитидина (пиримидиннуклеозидный аналог цитидина, Vidaza®, Celgene); омаетаксина мепесукцината (сложный эфир цефалотаксина) (ингибитор синтеза белков, Synribo®, Teva Pharmaceuticals); аспарагиназы Erwinia chrysanthemi (фермент для истощения аспарагина, Elspar®, Lundbeck; Erwinaze®, EUSA Pharma); эрибулина мезилата (ингибитор микротрубочек, антимитотическое средство на основе тубулина, Halaven®, Eisai); кабазитаксела (ингибитор микротрубочек, антимитотическое средство на основе тубулина, Jevtana®, Sanofi-Aventis); капацетрина (ингибитор тимидилатсинтазы, Xeloda®, Genentech); бендамустина (бифункциональное производное мехлорэтамидина, предположительно формирующее межцепочечные сшивки ДНК, Treanda®, Cephalon/Teva); иксабепилона (полусинтетический аналог эпотилона В, ингибитор микротрубочек, антимитотическое средство на основе тубулина, Ixempra®, Bristol-Myers Squibb); неларабина (пролекарство аналога дезоксирибозидина, нуклеозидный метаболический ингибитор, Arranon®, Novartis); клорафабина (пролекарство ингибитора рибонуклеотидредуктазы, конкурентный ингибитор дезоксицитидина, Clolar®, Sanofi-Aventis); и трифлуридина и типирацила (нуклеозидный аналог на основе тимидина и ингибитор тимидинфосфорилазы, Lonsurf®, Taiho Oncology).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор киназы или антагонист VEGF-R. Одобренные ингибиторы VEGF и ингибиторы киназ, пригодные в рамках настоящего изобретения, включают: бевацизумаб (Avastin®, Genentech/Roche), моноклональное антитело против VEGF; рамуцирумаб (Cyramza®, Eli Lilly), антитело против VEGFR-2 и ziv-афлиберцепт, также известный как VEGF Trap (Zaltrap®, Regeneron/Sanofi); ингибиторы VEGFR, такие как регорафениб (Stivarga®, Bayer); вандетаниб (Caprelsa®, AstraZeneca); акситиниб (Inlyta®, Pfizer); и ленватиниб (Lenvima®, Eisai); ингибиторы Raf, такие как сорафениб (Nexavar®, Bayer AG и Онух); дабрафениб (Tafinlar®, Novartis) и вемурафениб (Zelboraf®, Genentech/Roche); ингибиторы MEK, такие как кобиметаниб (Cotellic®, Exelixis/Genentech/Roche); траметиниб (Mekinist®, Novartis); ингибиторы тирозинкиназы Bcr-Abl, такие как иматиниб (Gleevec®, Novartis); нилотиниб (Tasigna®, Novartis); дасатиниб (Sprycel®, BristolMyersSquibb); босутиниб (Bosulif®, Pfizer); и понатиниб (Inclusig®, Ariad Pharmaceuticals); ингибиторы Her2 и EGFR, такие как гефитиниб (Iressa®, AstraZeneca); эрлотиниб (Tarceeva®, Genentech/Roche/Astellas); лапатиниб (Tykerb®, Novartis); афатиниб (Gilotrif®, Boehringer Ingelheim); осимертиниб (нацеленный на активированный EGFR, Tagrisso®, AstraZeneca); и бригатиниб (Alunbrig®, Ariad Pharmaceuticals); ингибиторы c-Met и VEGFR2, такие как кабозанитиб (Cometriq®, Exelixis); и мультикиназные ингибиторы, такие как сунитиниб (Sutent®, Pfizer); пазопаниб (Votrient®, Novartis); ингибиторы ALK, такие как кризотиниб (Xalkori®, Pfizer); церитиниб (Zykadia®, Novartis); и алектиниб (Alecenza®, Genentech/Roche); ингибиторы тирозинкиназы Брутона, такие как ибрутиниб (Im-

bruvica®, Pharnacocyclics/Janssen); и ингибиторы рецептора Flt3, такие как мидостаурин (Rydapt®, Novartis).

Другие ингибиторы киназ и антагонисты VEGF-R, которые находятся на стадии разработки и могут использоваться в рамках настоящего изобретения, включают: тивозаниб (AveoPharmaceuticals); ваталаниб (Bayer/Novartis); луцитаниб (Clovis Oncology); довитиниб (TKI258, Novartis); чиауаниб (Chipscreen Biosciences); CEP-11981 (Cephalon); линифаниб (Abbott Laboratories); ператиниб (HKI-272, Puma Biotechnology); радотиниб (Supect®, IY5511, Il-Yang Pharmaceuticals, S. Korea); руксолитиниб (Jakafi®, Incyte Corporation); PTC299 (PTC Therapeutics); CP-547,632 (Pfizer); форотиниб (Elexis, GlaxoSmithKline); кви-зартиниб (Daiichi Sankyo) и мотесаниб (Amgen/Takeda).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор mTOR, которые ингибируют пролиферацию клеток, ангиогенез и захват глюкозы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой эверолимус (Afinitor®, Novartis); темсилолимус (Torisel®, Pfizer); и сирилолимус (Rapamune®, Pfizer).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор протеасом. Одобренные ингибиторы протеасом, пригодные в рамках настоящего изобретения, включают бортезомиб (Velcade®, Takeda); карфилзомиб (Kyprolis®, Amgen); и иксазомиб (Ninlaro®, Takeda).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой антагонист фактора роста, такой как антагонист тромбоцитарного фактора роста (PDGF), или эпидермального фактора роста (EGF) или его рецептора (EGFR). Одобренные антагонисты PDGF, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают оларатумаб (Lartruvo®, Eli Lilly). Одобренные антагонисты EGFR, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают: цетуксимаб (Erbix®, Eli Lilly); нецитумумаб (Portrazza®, Eli Lilly), панитумумаб (Vectibix®, Amgen); и осимертиниб (нацеленный на активированный EGFR, Tagrisso®, AstraZeneca).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор ароматазы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор ароматазы выбран из: экземестана (Aromasin®, Pfizer); анастазола (Arimidex®, AstraZeneca) и лектрозола (Femara®, Novartis).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой антагонист каскада hedgehog. Одобренные ингибиторы каскада hedgehog, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают: сонидегиб (Odomzo®, Sun Pharmaceuticals); и висмодегиб (Erivedge®, Genentech), оба для лечения базально-клеточной карциномы.

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор фолиевой кислоты. Одобренные ингибиторы фолиевой кислоты, пригодные в рамках настоящего изобретения, включают пеметрексед (Alimta®, Eli Lilly).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор рецептора 4 СС-хемокинов (CCR4). Находящиеся на стадии исследований ингибиторы CCR4, которые могут быть пригодными в рамках настоящего изобретения, включают могамулизумаб (Poteligeo®, Kyowa Hakko Kirin, Япония).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор изоцитратдегидрогеназы (IDH). Находящиеся на стадии исследования ингибиторы IDH, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают: AG120 (Celgene; NCT02677922); AG221 (Celgene, NCT02677922; NCT02577406); BAY1436032 (Bayer, NCT02746081); IDH305 (Novartis, NCT02987010).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор аргиназы. Находящиеся на стадии исследований ингибиторы аргиназы, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают: АЕВ1102 (пегилированная рекомбинантная аргиназа, Aeglea Biotherapeutics), который находится в фазе I клинических испытаний против острого миелоидного лейкоза и миелодиспластического синдрома (NCT02732184) и солидных опухолей (NCT02561234); и СВ-1158 (Calithera Biosciences).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор глутаминазы. Находящиеся на стадии испытаний ингибиторы глутаминазы, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают СВ-839 (Calithera Biosciences).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой антитело, которое связывается с опухолевыми антигенами, т.е. белками, экспрессируемыми на поверхности опухолевых клеток. Одобренные антитела, которые связываются с опухолевыми антигенами, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают: ритуксимаб (Rituxan®, Genentech/BiogenIdec); офатумумаб (антитело против CD20, Arzerra®, GlaxoSmithKline); обинутумаб (антитело против CD20, Gazyva®, Genentech), ибритумумаб (антитело против CD20 и иттрий-90, Zevalin®, Spectrum Pharmaceuticals); даратумумаб (антитело против CD38, Darzalex®, Janssen Biotech),



динутуксимаб (антитело против гликолипида GD2, Unituxin®, United Therapeutics); трастузумаб (антитело против HER2, Herceptin®, Genentech); адотрастузумаб эмтанзин (антитело против HER2, слитое с эмтанзином, Kadcyla®, Genentech); и пертузумаб (антитело против HER2, Perjeta®, Genentech); и брентуксимаб ведотин (конъюгат антитело против CD30-лекарственное средство, Adcetris®, Seattle Genetics).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор топоизомеразы. Одобренные ингибиторы топоизомераз, пригодные в рамках настоящего изобретения, включают: иринотекан (Onivyde®, Merrimack Pharmaceuticals); топотекан (Гикамтин®, GlaxoSmithKline). Находящиеся на стадии испытаний ингибиторы топоизомераз, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают пиксантрон (Pixuvri®, CТI Biopharma).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор антиапоптотических белков, таких как BCL-2. Одобренные антиапоптотические средства, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают: венетоклак (Venclaxta®, AbbVie/Genentech) и блинатумомаб (Blincyto®, Amgen). Другие терапевтические средства, нацеленные на апоптотические белки, которые прошли клинические испытания и которые могут использоваться в рамках настоящего изобретения, включают навитоклак (ABT-263, Abbott), ингибитор BCL-2 (NCT02079740).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор рецепторов андрогенов. Одобренные ингибиторы рецепторов андрогенов, пригодные в рамках настоящего изобретения, включают энзалутамид (Xtandi®, Astellas/Medivation); одобренные ингибиторы синтеза андрогенов включают абиратерон (Zytiga®, Centocor/Ortho); одобренный антагонист рецептора гонадотропин-рилизинг гормона (GnRH) (дегараликс, Firmagon®, Ferring Pharmaceuticals).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой селективный модулятор рецепторов эстрогена (SERM), который препятствует синтезу или активности эстрогенов. Одобренные SERM, пригодные в рамках настоящего изобретения, включают ралоксифен (Evista®, Eli Lilly).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор резорбции кости. Одобренное терапевтическое средство, которое ингибирует резорбцию кости, представляет собой деносумаб (Xgeva®, Amgen), антитело, которое связывается с RANKL, препятствуя связыванию с его рецептором RANK, находящимся на поверхности остеокластов, их предшественников, и остеокласт-подобных гигантских клеток, которые опосредуют патологию костей при солидных опухолях с костными метастазами. Другие одобренные терапевтические средства, которые ингибируют резорбцию кости, включают бисфосфонаты, такие как золедроновая кислота (Zometa®, Novartis).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств представляют собой ингибитор взаимодействия между двумя первичными белками-супрессорами p53, MDMX и MDM2. Находящиеся на стадии испытаний ингибиторы белков супрессии p53, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают ALRN-6924 (Aileron), сшитый пептид, который эффективно связывает и нарушает взаимодействие MDMX и MDM2 с p53. ALRN-6924 в настоящее время находится на стадии клинических испытаний для лечения AML, развернутого миелодиспластического синдрома (MDS) и периферической T-клеточной лимфомы (PTCL) (NCT02909972; NCT02264613).

В некоторых вариантах осуществления одно или несколько терапевтических средств представляют собой ингибитор трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета или TGFβ). Находящиеся на стадии испытаний ингибиторы белков TGF-бета, которые также можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают NIS793 (Novartis), антитело против TGF-бета, находящееся на стадии испытаний в клинике для лечения различных злокачественных опухолей, включая рак молочной железы, легкого, печеночно-клеточный рак, рак ободочной и прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак почки (NCT 02947165). В некоторых вариантах осуществления ингибитор белков TGF-бета представляет собой фрезолимумаб (GC1008; Sanofi-Genzyme), который проходит испытания для лечения меланомы (NCT00923169); почечноклеточного рака (NCT00356460); и немелкоклеточного рака легкого (NCT02581787). Кроме того, в некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой ловушку для TGF-бета, как описано в Connolly et al. (2012) *Int'l J. Biological Sciences* 8:964-978. Одно терапевтическое испытание, в настоящее время проходящее клинические испытания для лечения солидных опухолей, представляет M7824 (Merck KgaA - ранее MSB0011459X), которое представляет собой биспецифическое соединение антитело против PD-L1/ловушка для TGFβ (NCT02699515); и (NCT02517398). M7824 состоит из полностью человеческого IgG1-антитела против PD-L1, слитого с внеклеточным доменом рецептора II TGF-бета человека, который функционирует как "ловушка" для TGFβ.

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько других терапевтических средств выбраны из глембатумаб ведотин-монометилауристатина E (MMAE) (Celldex), антитела против гликопротеина NMB (gpNMB) (CR011), сшитого с цитотоксическим MMAE. gpNMB представляет собой бе-

лок, сверхэкспрессируемый множеством типов опухолей, который ассоциирован со способностью злокачественных клеток к метастазированию.

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько других терапевтических средств представляют собой антипролиферативное соединение. Такие антипролиферативные соединения включают, но не ограничиваются ими: ингибиторы ароматаз; антиэстрогены; ингибиторы топоизомеразы I; ингибиторы топоизомеразы II; активные в отношении микротрубочек соединения; алкилирующие соединения; ингибиторы деацетилазы гистонов; соединения, которые индуцируют процессы клеточной дифференцировки; ингибиторы циклооксигеназы; ингибиторы MMP; ингибиторы mTOR; антинеопластические антиметаболиты; соединения платины; соединения, нацеленные на/снижающие активность киназ белков или липидов и другие антиангиогенные соединения; соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность фосфатаз белков или липидов; агонисты гонадорелина; антиандрогены; ингибиторы метионинаминопептидазы; ингибиторы матриксной металлопротеиназы; бисфосфонаты; модификаторы биологического ответа; антипролиферативные антитела; ингибиторы гепараназы; ингибиторы онкогенных изоформ Ras; ингибиторы теломеразы; ингибиторы протеасом; соединения, используемые для лечения гематологических злокачественных опухолей; соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность Flt-3; ингибиторы Hsp90, такие как 17-AAG (17-аллиламиногелданамицин, NSC330507), 17-DMAG (17-диметиламиноэтиламино-17-деметокси-гелданамицин, NSC707545), IPI-504, CNF1010, CNF2024, CNF1010 от Conforma Therapeutics; темозоломид (Temodal®); белковые ингибиторы кинезинов веретена вращения, такие как SB715992 или SB743921 от GlaxoSmithKline, или пентамидин/хлорпромазин от CombinatoRx; ингибиторы MEK, такие как ARRY142886 от Array BioPharma, AZd<sub>6</sub>244 от AstraZeneca, PD181461 от Pfizer и лейковорин.

Термин "ингибитор ароматазы", как используют в рамках изобретения, относится к соединению, которое ингибирует продуцирование эстрогенов, например, конвертирование субстратов андростендиона и тестостерона в эстрон и эстрадиол, соответственно. Термин включает, но не ограничивается ими, стероиды, особенно атаместан, экземестан и форместан и, в частности, нестероиды, особенно аминоклутетимид, роглетимид, пиридоглутетимид, трилостан, тестолактон, кетоконазол, ворозол, фазрозол, анастрозол и лектрозол. Экземестан выпускается в продажу под торговым названием Aromasin™. Форместан выпускается в продажу под торговым названием Lentaron™. Фазрозол выпускается в продажу под торговым названием Afema™. Анастрозол выпускается в продажу под торговым названием Arimidex™. Лектрозол выпускается в продажу под торговыми названиями Femara™ или Femar™. Аминоклутетимид выпускается в продажу под торговым названием Orimeten™. Комбинация по изобретению, содержащая химиотерапевтическое средство, которое представляет собой ингибитор ароматазы, является особенно пригодной для лечения опухолей, положительных по рецепторам гомонов, таких как опухоли молочной железы.

Термин "антиэстроген", как используют в рамках изобретения, относится к соединению, которое является антагонистом эффекта эстрогенов на уровне рецепторов эстрогена. Термин включает, но не ограничивается ими, тамоксифен, фулвестрант, ралоксифен и ралоксифена гидрохлорид. Тамоксифен выпускается в продажу под торговым названием Nolvadex™. Ралоксифена гидрохлорид выпускается в продажу под торговым названием Evista™. Фулвестрант может выпускаться под торговым названием Faslodex™. Комбинация по изобретению, содержащая химиотерапевтическое средство, которое представляет собой антиэстроген, является особенно пригодной для лечения положительных по рецепторам эстрогенов опухолей, таких как опухоли молочной железы.

Термин "антиандроген", как используют в рамках изобретения, относится к любому веществу, которое способно ингибировать биологические эффекты андрогенных гормонов, и включает, но не ограничивается ими, бикалутамид (Casodex™). Термин "агонист гонадорелина", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими абареликс, гозерелин и гозерелина ацетат. Гозерелин можно вводить под торговым названием Zoladex™.

Термин "ингибитор топоизомеразы I", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, топотекан, гиматекан, иринотекан, камптотецин и его аналоги, 9-нитрокамптотецин и макромолекулярный конъюгат камптотецина PNU-166148. Иринотекан можно вводить, например, в форме, в которой он выпускается в продажу, например, под торговым названием Camptosar™. Топотекан выпускается в продажу под торговым названием Нусамптин™.

Термин "ингибитор топоизомеразы II", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, антрациклины, такие как доксорубин (включая липосомальный состав, такой как Caelyx™), даунорубин, эпирубинин, идарубинин и неморубинин, антрахиноны митоксантрон и лозоксантрон, и подофилотоксины эпопозид и тенипозид. Эпопозид выпускается в продажу под торговым названием Etoporphos™. Тенипозид выпускается в продажу под торговым названием VM 26-Bristol. Доксорубинин выпускается в продажу под торговым названием Acridablastin™ или Adriamycin™. Эпирубинин выпускается в продажу под торговым названием Farmorubicin™. Идарубинин выпускается в продажу под торговым названием Zavedos™. Митоксантрон выпускается в продажу под торговым названием Novan-

tron.

Термин "активное в отношении микротрубочек средство" относится к стабилизирующим микротрубочки соединениями, дестабилизирующим микротрубочки соединениям и ингибиторам полимеризации микротубулина, включающим, но не ограничивающимся ими: таксаны, такие как паклитаксел и доцетаксел; алкалоиды барвинка, такие как винбластин или винбластин сульфат, винкристин или винкристин сульфат, и винорелбин; дискодермолиды; кохицин и эпотилоны и их производные. Паклитаксел выпускается в продажу под торговым названием Taxol™. Доцетаксел выпускается в продажу под торговым названием Taxotere™. Винбластин сульфат выпускается в продажу под торговым названием Vinblastin R.P™. Винкристин сульфат выпускается в продажу под торговым названием Farmistin™.

Термин "алкилирующее средство", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан или нитрозомочевину (BCNU или Глиадел). Циклофосфамид выпускается в продажу под торговым названием Cyclostin™. Ифосфамид выпускается в продажу под торговым названием Holoxan™.

Термин "ингибиторы деацетилазы гистонов" или "ингибиторы HDAC" относится к соединениям, которые ингибируют деацетилазу гистонов и которые обладают антипролиферативной активностью. Они включают, но не ограничиваются ими, субериоланилидгидроксамовую кислоту (SAHA).

Термин "antineoplastический антиметаболит" включает, но не ограничивается ими, 5-фторурацил или 5-FU, капецитабин, гемцитабин, деметилирующие ДНК соединения, такие как 5-азациитидин и децитабин, метотрексат и эдатрексат, и антагонисты фолиевой кислоты, такие как пеметрексед. Капецитабин выпускается в продажу под торговым названием Xeloda™. Гемцитабин выпускается в продажу под торговым названием Gemzar™.

Термин "соединение платины", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, карбоплатин, цис-платин, цисплатинум и оксалиплатин. Карбоплатин можно вводить, например, в форме, в которой он выпускается в продажу, например, под торговым названием Carboplat™. Оксалиплатин можно вводить, например, в форме, в которой он выпускается в продажу, например, под торговым названием Eloxatin™.

Термин "соединения, нацеленные на/снижающие активность киназы белков или липидов; или активность фосфатазы белков или липидов; или дополнительные антиангиогенные соединения", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, ингибиторы протеинтирозинкиназ и/или сериновых и/или треониновых киназ, или ингибиторы киназ липидов, такие как: а) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), такие как соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность PDGFR, особенно соединения, которые ингибируют рецептор PDGF, такие как производное N-фенил-2-пиримидинамина, такие как иматиниб, SU101, SU6668 и GFB-111; б) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность рецепторов фибробластного фактора роста (FGFR); в) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность рецептора инсулиноподобного фактора роста I (IGF-IR), такие как соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность IGF-IR, особенно соединения, которые ингибируют активность киназы рецептора IGF-I, или антитела, которые нацелены на внеклеточный домен рецептора IGF-I или его факторы роста; д) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность семейства рецепторных тирозинкиназ Trk, или ингибиторы эфрина B4; е) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность семейства рецепторных тирозинкиназ Axl; ф) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность рецепторной тирозинкиназы Ret; г) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность рецепторной тирозинкиназы Kit/SCFR, такие как иматиниб; h) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность рецепторных тирозинкиназ C-kit, которые являются частью семейства PDGFR, такие как соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность семейства рецепторных тирозинкиназ c-Kit, особенно соединения, которые ингибируют рецептор c-Kit, такие как иматиниб; i) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность представителей семейства c-Ab1, их продукты слияния генов (например, киназа BCR-Ab1) и мутанты, такие как соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность представителей семейства c-Ab1 и их продукты слияния генов, такие как производное N-фенил-2-пиримидинамина, такое как иматиниб или nilотиниб (AMN107); PD180970; AG957; NSC 680410; PD173955 от ParkeDavis; или дасатиниб (BMS-354825); j) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность представителей семейств сериновых/треониновых киназ протеинкиназы C (PKC) и Raf, представителей семейств MEK, SRC, JAK/pan-JAK, FAK, PDK1, PKB/Akt, Ras/MAPK, PI3K, SYK, TYK2, BTK и TEC, и/или представителей семейства циклин-зависимых киназ (CDK), включая производные стауроспорина, такие как мидостаурин; примеры следующих соединений включают UCN-01, сафингол, BAY 43-9006, бриостатин 1, перифозин; лимофозин; RO 318220 и RO 320432; GO 6976; Iis 3521; LY333531/LY379196; соединения изохинолинов; FTI; PD184352 или QAN697 (ингибитор PI3K) или AT7519 (ингибитор CDK); k) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность ингибиторов протеинтирозинкиназы, такие как соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность ингибиторов проте-

интирозинкиназ, включая иматиниба мезилат (Gleevec™) или тирфостин, такой как Tyrphostin A23/RG-50810; AG 99; Tyrphostin AG 213; Tyrphostin AG 1748; Tyrphostin AG 490; Tyrphostin B44; Tyrphostin B44 (+) энантиомер; Tyrphostin AG 555; AG 494; Tyrphostin AG 556, AG957 и адафостин (адамантиловый сложный эфир 4-[[2,5-дигидроксифенил]метил]амино}бензойной кислоты; NSC 680410, адафостин); л) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность рецепторных тирозинкиназ семейства эпидермального фактора роста (EGFR<sub>1</sub>, ErbB2, ErbB3, ErbB4 в качестве гомо- или гетеродимеры) и их мутанты, такие как соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность семейства рецепторов эпидермального фактора роста, особенно соединения, белки или антитела, которые ингибируют представителей семейства рецепторных тирозинкиназ EGF, такие как рецептор EGF, ErbB2, ErbB3 и ErbB4 или связываются с EGF или родственными EGF лигандами, CP 358774, ZD 1839, ZM 105180; трастузумаб (Herceptin™), цетуксимаб (Erbbitux™), Иресса, Тарцева, OSI-774, C1-1033, ЕКВ-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 или E7.6.3, и производные 7Н-пирроло-[2,3-d]пиримидина; м) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность рецептора с-Met, такие как соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность с-Met, особенно соединения, которые ингибируют киназную активность рецептора с-Met, или антитела, которые нацелены на внеклеточный домен с-Met или связываются с HGF, н) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие киназную активность одного или нескольких представителей семейств JAK (JAK1/JAK2/JAK3/ТУК2 и/или рап-JAK), включая, но не ограничиваясь ими PRT-062070, SB-1578, барицитиниб, пакритиниб, момелотиниб, VX-509, AZD-1480, TG-101348, тофацитиниб, и руксолитиниб; о) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие киназную активность PI3-киназы (PI3K), включая, но не ограничиваясь ими ATU-027, SF-1126, DS-7423, PBI-05204, GSK-2126458, ZSTK-474, бупарлисиб, пиктрелисиб, PF-4691502, BYL-719, дактолисиб, XL-147, XL-765 и иделалисиб; и; и р) соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие сигнальные эффекты каскадов белка hedgehog (Hh) или рецептора smoothed (SMO), включая, но не ограничиваясь ими циклорамин, висмодегиб, итраконазол, эрисмодегиб и IPI-926 (саридегиб).

Термин "ингибитор PI3K", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, соединения, обладающие ингибиторной активностью против одного или нескольких ферментов семейства фосфатидилинозитол-3-киназы, включая, но не ограничиваясь ими PI3K $\alpha$ , PI3K $\gamma$ , PI3K $\delta$ , PI3K $\beta$ , PI3K-C2 $\alpha$ , PI3K-C2 $\beta$ , PI3K-C2 $\gamma$ , Vps34, p110- $\alpha$ , p110- $\beta$ , p110- $\gamma$ , p110- $\delta$ , p85- $\alpha$ , p85- $\beta$ , p55- $\gamma$ , p150, p101 и p87. Примеры ингибиторов PI3K, пригодных в раках настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются ими ATU-027, SF-1126, DS-7423, PBI-05204, GSK-2126458, ZSTK-474, бупарлисиб, пиктрелисиб, PF-4691502, BYL-719, дактолисиб, XL-147, XL-765 и иделалисиб.

Термин "ингибитор Bcl-2", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, соединения, обладающие активностью ингибирования белка 2 В-клеточной лимфомы (Bcl-2), включая, но не ограничиваясь ими, АВТ-199, АВТ-731, АВТ-737, апогоссипол, общие ингибиторы Bcl-2 от Ascenta, куркумин (и его аналоги), двойные ингибиторы Bcl-2/Bcl-xL (Infinity Pharmaceuticals/Novartis Pharmaceuticals), Генасенс (G3139), HA14-1 (и его аналоги; см. WO 2008/118802), навитоклакс (и его аналоги, см. US 7390799), NH-1 (Shenayng Pharmaceutical University), обатоклакс (и его аналоги, см. WO 2004/106328), S-001 (Gloria Pharmaceuticals), соединения серии TW (Univ. of Michigan) и венетоклакс. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой низкомолекулярное терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления ингибитор Bcl-2 представляет собой пептидомиметик.

Термин "ингибитор ВТК", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, соединения, обладающие ингибиторной активностью против тирозинкиназы Брутона (ВТК), включая, но не ограничиваясь ими, AVL-292 и ибрутиниб.

Термин "ингибитор SYK", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, соединения, обладающие ингибиторной активностью против тирозинкиназы селезенки (SYK), включая, но не ограничиваясь ими, PRT-062070, R-343, R-333, экселлаир, PRT-062607 и фостаматиниб.

Дополнительные примеры ингибирующих ВТК соединений и состояний, которые можно лечить такими соединениями в комбинации с соединениями по настоящему изобретению, могут быть найдены в WO 2008/039218 и WO 2011/090760, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок.

Дополнительные примеры ингибирующих SYK соединений и состояний, которые можно лечить такими соединениями в комбинации с соединениями по настоящему изобретению, могут быть найдены в WO 2003/063794, WO 2005/007623 и WO 2006/078846, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок.

Дополнительные примеры ингибирующих PI3K соединений и состояний, которые можно лечить такими соединениями в комбинации с соединениями по настоящему изобретению, могут быть найдены в WO 2004/019973, WO 2004/089925, WO 2007/016176, US 8138347, WO 2002/088112, WO 2007/084786, WO 2007/129161, WO 2006/122806, WO 2005/113554 и WO 2007/044729, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок.

Дополнительные примеры ингибирующих JAK соединений и состояний, которые можно лечить такими соединениями в комбинации с соединениями по настоящему изобретению, могут быть найдены в WO 2009/114512, WO 2008/109943, WO 2007/053452, WO 2000/142246 и WO 2007/070514, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылок.

Дополнительные антиангиогенные соединения включают соединения, обладающие другим механизмом их активности, например, не связанным с ингибированием киназы белков или липидов, например, талидомид (Thalomid™) и TNP-470.

Примеры ингибиторов протеасом, пригодных для применения в комбинации с соединениями по изобретению, включают, но не ограничиваются ими, бортезомиб, дисульфирам, эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG), салиноспирамид А, карфилзомиб, ONX-0912, CEP-18770 HMLN9708.

Соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность фосфатаз белков или липидов, представляют собой, например, ингибиторы фосфатазы 1, фосфатазы 2А или CDC25, такие как оадаиксовая кислота или ее производное.

Соединения, которые индуцируют процессы дифференцировки клеток, включают, но не ограничиваются ими, ретиноевую кислоту,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - или 5-токоферол или  $\alpha$ -,  $\gamma$ - или  $\delta$ -токотриенол.

Термин ингибитор циклооксигеназы, как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, ингибиторы Cox-2, 5-алкиламзамещенную 2-ариламинофенилуксусную кислоту и производные, такие как целекоксиб (Celebrex™), рофекоксиб (Vioxx™), эторикоксиб, вальдекоксиб или 5-алкил-2-ариламинофенилуксусная кислота, такая как 5-метил-2-(2'-хлор-6'-фтораналино)фенилуксусная кислота, и люмиракоксиб.

Термин "бисфосфонаты", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, этидроновую, клодоновую, тилудоновую, памидроновую, алендроновую, ибандоновую, ризедоновую и золедоновую кислоту. Этидроновая кислота выпускается в продажу под торговым названием Didronel™. Клодроновая кислота выпускается в продажу под торговым названием Bonefos™. Тилудоновая кислота выпускается в продажу под торговым названием Skelid™. Памидроновая кислота выпускается в продажу под торговым названием Aredia™. Алендроновая кислота выпускается в продажу под торговым названием Fosamax™. Ибандоновая кислота выпускается в продажу под торговым названием Bondranat™. Ризедоновая кислота выпускается в продажу под торговым названием Actonel™. Золедоновая кислота выпускается в продажу под торговым названием Zometa™. Термин "ингибиторы mTOR" относится к соединениям, которые ингибируют мишень рапамицина у млекопитающих (mTOR) и которые обладают антипролиферативной активностью, такие как сиролimus (Rapamune®), эверолимус (Certican™), CCI-779 и ABT578.

Термин "ингибитор гепараназы", как используют в рамках изобретения, относится к соединениям, которые нацелены на, снижают или ингибируют деградацию гепаринсульфата. Термин включает, но не ограничивается ими, PI-88. Термин "модификатор биологического ответа", как используют в рамках изобретения, относится к лимфокинам или интерферонам.

Термин "ингибитор онкогенных изоформ Ras", таких как H-Ras, K-Ras или N-Ras, как используют в рамках изобретения, относится к соединениям, которые нацелены на, снижают или ингибируют онкогенную активность Ras; например, ингибитор "фарнезилтрансферазы", такой как L-744832, DK8G557 или R115777 (Zarnestra™). Термин "ингибитор теломеразы", как используют в рамках изобретения, относится к соединениям, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность теломераз. Соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность теломераз, в частности, представляют собой соединения, которые ингибируют рецептор теломераз, такие как теломестатин.

Термин "ингибитор метионинаминопептидазы", как используют в рамках изобретения, относится к соединениям, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность метионинаминопептидазы. Соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность метионинаминопептидазы, включают, но не ограничиваются ими, бенгамид или его производное.

Термин "ингибитор протеасом", как используют в рамках изобретения, относится к соединениям, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность протеасом. Соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность протеасом, включают, но не ограничиваются ими, бортезомиб (Velcade™) и MLN 341.

Термин "ингибитор матриксной металлопротеиназы" или (ингибитор "ММР"), как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, ингибиторы в виде коллагеновых пептидомиметиков и не пептидомиметиков, производные тетрациклина, например, гидроксаматный ингибитор пептидомиметик батимастан и его перорально биодоступный аналог маримастан (BB-2516), приномастан (AG3340), метастан (NSC 683551) BMS-279251, BAY 12-9566, TAA211, MMI270B или AAJ996.

Термин "соединения, используемые для лечения гематологических злокачественных опухолей", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, ингибиторы FMS-подобных тирозинкиназ, которые представляют собой соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие активность рецепторов FMS-подобной тирозинкиназы (Flt-3R); интерферон, 1- $\beta$ -D-арабинофурансилцитозин (ara-c) и бисульфан; и ингибиторы ALK, которые представляют собой соеди-

нения, которые нацелены на, снижают или ингибируют каназу анапластической лимфомы.

Соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность рецепторов FMS-подобной тирозинкиназы (Flt-3R), в частности, представляют собой соединения, белки или антитела, которые ингибируют представителя семейства рецепторных киназ Flt-3R, такие как РКС412, мидостаурин, производное стауроспорина, SU11248 и MLN518.

Термин "ингибиторы HSP90", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие собственную АТФ-азную активность HSP90, деградирующую, нацеленную на, снижающую или ингибирующую белки-клиенты HSP90 через убиквитиновый путь протеасом. Соединения, нацеленные на, снижающие или ингибирующие собственную АТФ-азную активность HSP90, в частности, представляют собой соединения, белки или антитела, которые ингибируют АТФ-азную активность HSP90, такие как 17-аллиламино,17-деметоксигелданамицин (17AAG), производное гелданамицина; другие родственные гелданамицину соединения; радицикол и ингибиторы HDAC.

Термин "антипролиферативные антитела", как используют в рамках изобретения, включает, но не ограничивается ими, трастузумаб (Herceptin™), трастузумаб-DM1, эрбитукс, бевацизумаб (Avastin™), ритуксимаб (Rituxan®), PRO64553 (антитело против CD40) и антитело 2C4. Под антителами подразумевают интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела, образованные из по меньшей мере 2 интактных антител, и фрагменты антител при условии, что они демонстрируют желаемую биологическую активность.

Для лечения острого миелоидного лейкоза (AML) соединения по настоящему изобретению можно использовать в комбинации со стандартными способами терапии лейкоза, особенно в комбинации со способами терапии, используемыми для лечения AML. В частности, соединения по настоящему изобретению можно вводить в комбинации, например, с ингибиторами фарнезилтрансферазы и/или другими лекарственными средствами, пригодными для лечения AML, такими как Даунорубин, Адриамицин, Ага-С, VP-16, Тенипозид, Митоксантрон, Идарубин, Карбоплатин и РКС412.

Другие проливолюзные соединения включают, например, Ага-С, аналог пиримидина, который представляет собой производное дезоксицитидина с 2'-альфагидроксирибозой (арабинозид). Также включен аналог пурина гипоксантин, 6-меркаптопурин (6-МР) и флударабина фосфат. Соединения, которые нацелены на, снижают или ингибируют активность ингибиторов деацетилазы гистонов (HDAC), такие как бутират натрия и субероиланилидгидроксамовая кислота (SAHA), ингибируют активность ферментов, известных как деацетилазы гистонов. Конкретные ингибиторы HDAC включают MS275, SAHA, FK228 (ранее FR901228), трихостатин А и соединения, описанные в US 6552065, включая, но не ограничиваясь ими, N-гидрокси-3-[4-[[[2-(2-метил-1H-индол-3-ил)-этил]амино] метил] фенил]-2Е-2-пропенамид, или его фармацевтически приемлемую соль, и N-гидрокси-3-[4-[(2-гидроксиэтил){2-(1H-индол-3-ил)этил]-амино]метил]фенил]-2Е-2-пропенамид, или его фармацевтически приемлемую соль, особенно лактат. Антагонисты рецепторов соматостатина, как используют в рамках изобретения, относятся к соединениям, которые нацелены на, воздействуют на или ингибируют рецептор соматостатина, таким как октреотид, и SOM230. Подходы повреждения опухолевых клеток относятся к таким подходам, как ионизирующее излучение. Термин "ионизирующее излучение", упоминаемый выше и далее, означает ионизирующую радиацию, которая встречается в качестве либо электромагнитных лучей (таких как рентгеновские лучи и гамма-лучи), либо частиц (таких как альфа- и бета-частицы). Ионизирующая радиация предусматривается в, но не ограничиваясь ими, лучевой терапии и известна в данной области. См. Hellman, Principles of Radiotherapy, Cancer, Principles and Practice of Oncology, Devita et al., Eds., 4<sup>th</sup> Edition, Vol. 1, pp. 248-275 (1993).

Также включены соединения, связывающие EDG, и рибонуклеотидные ингибиторы редуктаз. Термин "соединения, связывающие EDG", как используют в рамках изобретения, относится к классу иммунодепрессантов, которые модулируют рециркуляцию лимфоцитов, таких как FTY720. Термин "рибонуклеотидные ингибиторы редуктаз" относится к пиримидиновым или пуриновым нуклеозидным аналогам, включая, но не ограничиваясь ими, флударабин и/или цитозинарабинозид (ага-С), 6-тиогуанин, 5-фторурацил, кладрибин, 6-меркаптопурин (особенно в комбинации с ага-С против ALL) и/или пентостатин. Рибонуклеотидные ингибиторы редуктаз, в частности, представляют собой гидроксимочевину или производные 2-гидрокси-1H-изоиндол-1,3-диона.

Также, в частности, включены соединения, белки или моноклональные антитела против VEGF, такие как: 1-(4-хлоранилино)-4-(4-пиридилметил)фалазин или его фармацевтически приемлемая соль, 1-(4-хлоранилино)-4-(4-пиридилметил)фалазина сукцинат; Angiostatin™; Endostatin™; амиды антраниловой кислот; ZD4190; Zd<sub>4</sub>474; SU5416; SU6668; бевацизумаб; или антитела против VEGF или антитела против рецептора VEGF, такие как rhuMAb и RHUFab, аптамер против VEGF, такой как Макугон; ингибиторы FLT-4, ингибиторы FLT-3, IgG1-антитело против VEGFR-2, ангиозим (RPI 4610) и бевацизумаб (Avastin™).

Фотодинамическая терапия, как используют в рамках изобретения, относится к терапии, в которой используются определенные химические вещества, известные как фотосенсибилизаторы, для лечения

или предупреждения злокачественных опухолей. Примеры фотодинамической терапии включают лече- ние соединениями, такими как Visudyne™ и порфирин натрия.

Ангиостатические стероиды, как используют в рамках изобретения, относятся к соединениям, ко- торые блокируют или ингибируют ангиогенез, например, таким как анекортан, триамцинолон, гидрокор- тизон, 11- $\alpha$ -эпигидрокортизол, кортексолон, 17- $\alpha$ -гидроксипрогестерон, кортикостерон, дезоксикортико- стерон, тестостерон, эстрон и дексаметазон.

Имплантаты, содержащие кортикостероиды, относятся к соединениям, таким как флуоцинолон и дексаметазон.

Другие химиотерапевтические соединения включают, но не ограничиваются ими: растительные ал- калоиды, гормональные соединения и антагонисты; биологические модификаторы ответа, предпочти- тельно лимфокины или интерфероны; антисмысловые олигонуклеотиды или олигонуклеотидные произ- водные; кшРФИК или миРФИК; или прочие соединения или соединения с другим или неизвестным меха- низмом действия.

Структура активных соединений, идентифицированных посредством номеров кодов, генерических или торговых названий, может быть взята из текущего издания стандартного справочника "The Merck Index" или из баз данных, например, международных патентов (например, международных публикаций IMS).

Иллюстративные средства иммуноонкологии.

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько других терапевтических средств пред- ставляют собой средство иммуноонкологии. Как используют в рамках изобретения, термин "средство иммуноонкологии" относится к средству, которое является эффективным для усиления, стимуляции и/или активации иммунных ответов у индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления введение средства иммуноонкологии с соединением по изобретению имеет синергический эффект при лечении злокачественной опухоли.

Средство иммуноонкологии может представлять собой, например, низкомолекулярное лекарствен- ное средство, антитело или биологическое или низкомолекулярное средство. Примеры биологических средств иммуноонкологии включают, но не ограничиваются ими, вакцины против злокачественной опу- холи, антитела и цитокины. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моно- клональное антитело. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело является гумани- зированным или человеческим.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой (i) агонист стимулирующего (в том числе костимулирующего) рецептора или (ii) антагонист ингибиторного (в том числе коингибиторного) сигнала на Т-клетках, оба из которых приводят к усилению антигенспецифиче- ских Т-клеточных ответов.

Определенные стимулирующие и ингибиторные молекулы являются представителями суперсемей- ства иммуноглобулинов (IgSF). Одним важным семейством мембраносвязанных лигандов, которые свя- зываются с костимулирующими или коингибиторными рецепторами, является семейство B7, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другим семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибиторными рецепторами, является семейство молекул TNF, которые связываются с распознавае- мыми представителями семейства рецепторов TNF, которое включает CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT $\beta$ R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин  $\alpha$ /TNF $\beta$ , TNFR2, TNF $\alpha$ , LT $\beta$ R, лимфотоксин  $\alpha$ 1 $\beta$ 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY и NGFR.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой цитокин, который ингибирует активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF и другие иммуносупрес- сивные цитокины) или цитокин, который стимулирует активацию Т-клеток, для стимуляции иммунного ответа.

В некоторых вариантах осуществления комбинация соединения по изобретению и средства имму- ноонкологии может стимулировать Т-клеточные ответы. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой: (i) антагонист белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунной точки контроля), такой как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, галектин-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4; или (ii) агонист белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такой как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антагонист ингибиторных рецепторов на NK-клетках или агонист активирующих рецепторов на NK-клетках. В не- которых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антагонист KIR, та-

кой как лирилумаб.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой средство, которое ингибирует или истощает макрофаги или моноциты, включая, но не ограничиваясь ими, антагонисты CSF-1R, такие как антитела-антагонисты CSF-1R, включая RG7155 (WO 2011/70024, WO 2011/107553, WO 2011/131407, WO 2013/87699, WO 2013/119716, WO 2013/132044) или FPA-008 (WO 2011/140249; WO 2013/169264; WO 2014/036357).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии выбрано из средств-агонистов, которые связывают положительные костимулирующие молекулы, блокирующих средств, которые ослабляют передачу сигнала через ингибиторные рецепторы, антагонистов и одного или нескольких средств, которые системно увеличивают частоту противоопухолевых Т-клеток, которые обходят различные иммуносупрессивные каскады в микроокружении опухоли (например, блокируют связывание ингибиторного рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют Treg (например, с использованием моноклонального антитела против CD25 (например, даклизумаб) или посредством истощения с использованием гранул с антителом против CD25 ex vivo), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают вспять/препятствуют истощению энергии Т-клеток) и средств, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление в областях опухоли.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антагонист CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления антагонист CTLA-4 представляет собой антитело-антагонист CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления антитело-антагонист CTLA-4 представляет собой YERVOY (ипилилумаб) или тремелилумаб.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антагонист PD-1. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 вводят посредством инфузии. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антитело или его антиген-связывающую часть, которые специфически связываются с рецептором белка запрограммированной смерти 1 (PD-1) и ингибируют активность PD-1. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-1 представляет собой антитело-антагонист PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело-антагонист PD-1 представляет собой OPDIVO (ниволумаб), KEYTRUDA (пембролизумаб) или MEDI-0680 (AMP-514; WO 2012/145493). В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии может представлять собой пидилизумаб (CT-011). В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-частью IgG1, называемый AMP-224.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антагонист PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антагонист PD-L1 представляет собой антитело-антагонист PD-L1. В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1 представляет собой MPDL3280A (RG7446; WO 2010/077634), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559 (WO 2007/005874) и MSB0010718C (WO 2013/79174).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антагонист LAG-3. В некоторых вариантах осуществления антагонист LAG-3 представляет собой антитело-антагонист LAG-3. В некоторых вариантах осуществления антитело против LAG3 представляет собой BMS-986016 (WO 2010/19570, WO 2014/08218), или IMP-731 или IMP-321 (WO 2008/132601, WO 2009/44273).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой агонист CD137 (4-1BB). В некоторых вариантах осуществления агонист CD137 (4-1BB) представляет собой антитело-агонист CD137. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD137 представляет собой урелумаб или PF-05082566 (WO 2012/32433).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой агонист GITR. В некоторых вариантах осуществления агонист GITR представляет собой антитело-агонист GITR. В некоторых вариантах осуществления антитело против GITR представляет собой BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO 2006/105021, WO 2009/009116), или МК-4166 (WO 2011/028683).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антагонист индоламин (2,3)-диоксигеназы (IDO). В некоторых вариантах осуществления антагонист IDO выбран из: эпикадостата (INCB024360, Incyte); индоксимода (NLG-8189, NewLink Genetics Corporation); капманитиба (INC280, Novartis); GDC-0919 (Genentech/Roche); PF-06840003 (Pfizer); BMS:F001287 (Bristol-Myers Squibb); Phy906/KD108 (Phytoceutica); фермента, который разрушает кинуренин (Kynase, Kyn Therapeutics); и NLG-919 (WO 2009/73620, WO 2009/1156652, WO 2011/56652, WO 2012/142237).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой агонист OX40. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой антитело-агонист OX40. В некоторых вариантах осуществления антитело против OX40 представляет собой MEDI-6383 или MEDI-6469.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антагонист OX40L. В некоторых вариантах осуществления антагонист OX40L представляет собой антитело-антагонист OX40. В некоторых вариантах осуществления антагонист OX40L представляет собой RG-



7888 (WO 2006/029879).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой агонист CD40. В некоторых вариантах осуществления агонист CD40 представляет собой антитело-агонист CD40. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антагонист CD40. В некоторых вариантах осуществления антагонист CD40 представляет собой антитело-антагонист CD40. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD40 представляет собой лукатумумаб или дацетузумаб.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой агонист CD27. В некоторых вариантах осуществления агонист CD27 представляет собой антитело-агонист CD27. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD27 представляет собой варлилумаб.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой MGA271 (против B7H3) (WO 2011/109400).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой абаговомаб, адекатумумаб, афутузумаб, алемтузумаб, анатумомаб мафенатокс, аполизумаб, атезолимаб, авелумаб, бинатумомаб, BMS-936559, катумаксумаб, дурвалумаб, эпикадостат, эспратузумаб, индоксимод, инотузумаб озагомицин, интелумумаб, ипилимумаб, исатуксимаб, ламбролизумаб, MED14736, MPDL3280A, ниволумаб, обинутузумаб, окаратузумаб, офатумумаб, олататумаб, пембролизумаб, пидилизумаб, ритуксимаб, тицилимумаб, самализумаб или тремелилумаб.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой иммуностимулирующее средство. Например, антитела, блокирующие ингибиторную систему PD-1 и PD-L1, могут высвобождать активированные реактивные в отношении опухоли Т-клетки, и в клинических испытаниях было показано, что они индуцируют длительные противоопухолевые ответы во все большем количестве гистологических образцов опухоли, включая некоторые типы опухолей, которые обычно не считаются чувствительными к иммунотерапии. См., например, Okazaki, T. et al. (2013) Nat. Immunol. 14, 1212-1218; Zou et al. (2016) Sci. Transl. Med. 8. Было показано, что антитело против PD-1 ниволумаб (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb, также известное как ONO-4538, MDX1106 и BMS-936558), обладает потенциалом к повышению общей выживаемости у пациентов со светлоклеточным раком почки (RCC), у которых произошло прогрессирование заболевания в ходе или после предшествующей антиангиогенной терапии.

В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее терапевтическое средство специфически индуцирует апоптоз опухолевых клеток. Одобренные иммуномодулирующие терапевтические средства, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают: помалидомид (Pomalyst®, Celgene); леналидомид (Revlimid®, Celgene); ингенол мебутат (Picato®, LEO Pharma).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой вакцину против злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления вакцина против злокачественной опухоли выбрана из: сипулейцела-Т (Provenge®, Dendreon/Valeant Pharmaceuticals), который одобрен для лечения бессимптомного или имеющего минимальные симптомы метастазирующего кастрационно-резистентного (гормон-рефрактерного) рака предстательной железы; и талимоген лагерпарепвек (Imlygic®, BioVex/Amgen, ранее известный как T-VEC), генетически модифицированная онколитическая вирусная терапия, одобренная для лечения нерезектабельной кожной, подкожной меланомы и ее узловых очагов. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии выбрано из онколитической вирусной терапии, такой как пексастимоген девацирепвек (PexaVec/JX-594, SillaJen/панее Jennerex Biotechnaretics), вирус осповакцины с дефектом тимидинкиназы- (TK-), модифицированный для экспрессии GM-CSF, против печеночно-клеточной карциномы (NCT02562755) и меланомы (NCT00429312); пелареореп (Reolysin®, Oncolytics Biotech), вариант респираторного кишечного орфанного вируса (реовирус), который не реплицируется в клетках, которые не являются RAS-активированными, против многочисленных злокачественных опухолей, включая рак ободочной и прямой кишки (NCT01622543); рак предстательной железы (NCT01619813); плоскоклеточный рак головы и шеи (NCT01166542); аденокарциному поджелудочной железы (NCT00998322); и немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) (NCT 00861627); знаденотуцирев (NG-348, PsiOxus, ранее известный как ColoAd1), аденовирус, модифицированный способами инженерии для экспрессии полноразмерного CD80 и фрагмент антитела, специфичный к белку CD3 Т-клеточного рецептора, против рака яичника (NCT02028117); метастазирующих или развернутых эпителиальных опухолей, таких как рак ободочной и прямой кишки, рак мочевого пузыря, плоскоклеточная карцинома головы и шеи и рак слюнной железы (NCT02636036); ONCOS-102 (Targovax/панее Oncos), аденовирус, модифицированный для экспрессии GM-CSF, против меланомы (NCT03003676); и перитонеального заболевания, рака ободочной и прямой кишки или рака яичника (NCT02963831); GL-ONC1 (GLV-1h68/GLV-1h153, Genelux GmbH), вирусы осповакцины, модифицированные способами инженерии для экспрессии бета-галактозидазы (бета-gal)/бета-глюкуронидазы или бета-gal/симпортера йодида натрия человека (hNIS), соответственно, которые исследовались против перитонеального карциноматоза (NCT01443260); рака фаллопиевой трубы, рака яичника (NCT 02759588); или CG0070 (Cold Gene-sys), аденовирус, модифицированный для экспрессии GM-CSF, против рака мочевого пузыря (NCT02365818).

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии выбрано из: JX-929 (Silla-Jen/formerly Jennerex Biotherapeutics), вируса коровьей оспы с дефектом ТК и фактора роста коровьей оспы, модифицированного для экспрессии цитозиндезаминазы, которая способна конвертировать пролекарство 5-фторцитозин в цитотоксическое лекарственное средство 5-фторурацил; TG01 и TG02 (Tagovax/formerly Oncos), иммунотерапевтических средств на пептидной основе, нацеленных на случаи трудно поддающихся лечению мутаций RAS; и TILT-123 (TILT Biotherapeutics), сконструированного аденовируса, обозначаемого: Ad5/3-E2F-delta24-hTNF $\alpha$ -IRES-hIL20; и вируса везикулярного стоматита (VSV) VSV-GP (ViraTherapeutics), модифицированного для экспрессии гликопротеина (GP) вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), который может быть далее модифицирован для экспрессии антигенов, предназначенных для индукции ответа антигенспецифических CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой Т-клетку, модифицированную для экспрессии химерного рецептора антигена или CAR. Т-клетки модифицированные для экспрессии такого химерного рецептора антигена, называют CAR-Т-клетками.

CAR конструируют так, чтобы они состояли из связывающих доменов, которые могут происходить из природных лигандов, одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), происходящих из моноклональных антител, специфичных к антигенам клеточной поверхности, слитых с эндодоменами, которые представляют собой функциональный конец Т-клеточного рецептора (TCR), такими как сигнальный домен CD3-зета из TCR, который способен генерировать сигнал активации в Т-лимфоцитах. При связывании антигена такие CAR сопрягаются с эндогенными каскадами передачи сигнала в эффекторной клетке и генерируют активирующие сигналы, сходные с сигналами, инициируемыми комплексом TCR.

Например, в некоторых вариантах осуществления CAR-Т-клетка представляет собой одну из клеток, описанных в патенте США 8906682 (включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), в котором описаны CAR-Т-клетки, модифицированные так, чтобы они содержали внеклеточный домен, имеющий антигенсвязывающий домен (такой как домен, который связывается с CD19), слитый с внутриклеточным сигнальным доменом зета-цепи рецепторного комплекса Т-клеточного антигена (таким как CD3-зета). При экспрессии в Т-клетке CAR способен к перенацеливанию распознавания антигена на основе специфичности связывания антигена. В случае CD19 антиген экспрессируется на злокачественных В-клетках. В настоящее время проводят более 200 клинических испытаний с использованием CAR-Т при широком диапазоне показаний. [<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=chimeric+antigen+receptors&pg=1>].

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее средство представляет собой активатор орфанного рецептора  $\gamma$ , родственного ретиноевой кислоте (ROR $\gamma$ ). ROR $\gamma$  представляет собой фактор транскрипции, имеющий ключевую роль в дифференцировке и поддержании подгрупп эффекторов 17 типа, CD4<sup>+</sup> (Th17) и CD8<sup>+</sup> (Tc17) Т-клеток, а также в дифференцировке экспрессирующих IL-17 субпопуляций клеток врожденного иммунитета, таких как NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления активатор ROR $\gamma$  представляет собой LYC-55716 (Lucera), который в настоящее время проходит оценку в клинических испытаниях для лечения солидных опухолей (NCT02929862).

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее средство представляет собой агонист или активатор toll-подобного рецептора (TLR). Подходящие активаторы TLR включают агонист или активатор TLR9, такой как SD-101 (Dunavax). SD-101 представляет собой иммуностимулирующий CpG, который проходит исследование для В-клеточной, фолликулярной и других лимфом (NCT02254772). Агонисты или активаторы TLR8, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают мотолимод (VTX-2337, VentiRx Pharmaceuticals), который проходит испытания для плоскоклеточного рака головы и шеи (NCT02124850) и рака яичника (NCT02431559).

Другие средства иммуноонкологии, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают: урелумаб (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), моноклональное антитело против CD137; варлилумаб (CDX-1127, Celldex Therapeutics), моноклональное антитело против CD27; BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb), моноклональное антитело против OX40; лирилумаб (IPH2102/BMS-986015, Innate Pharma, Bristol-Myers Squibb), моноклональное антитело против KIR; монализумаб (IPH2201, Innate Pharma, AstraZeneca), моноклональное антитело против NKG2A; андекаликсимаб (GS-5745, Gilead Sciences), антитело против MMP9; и МК-4166 (Merck & Co.), моноклональное антитело против GITR.

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее средство выбрано из элотузумаба, мифамуртида, агониста или активатора toll-подобного рецептора и активатора ROR $\gamma$ .

В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее терапевтическое средство представляет собой рекомбинантный интерлейкин 15 человека (rhIL-15). rhIL-15 тестируется в клинике в качестве терапии меланомы и почечноклеточного рака (NCT01021059 и NCT01369888) и лейкозов (NCT02689453). В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее средство представляет собой рекомбинантный интерлейкин 12 человека (rhIL-12). В некоторых вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство на основе IL-15 представляет собой гетеродимерный IL-15 (hetIL-15, Novartis/Admune), слитый комплекс, состоящий из синтетической формы эндогенного IL-15 в комплексе с растворимым связывающим IL-15 белком альфа-цепью рецептора IL-15 (IL15:sIL-15RA), который про-

ходит тестирование в клинических испытаниях фазы 1 для меланомы, почечноклеточного рака, немелкоклеточного рака легкого и плоскоклеточной карциномы головы и шеи (NCT02452268). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный интерлейкин 12 человека (rhIL-12) представляет собой NM-IL-12 (Neumedicines, Inc.), NCT02544724 или NCT02542124.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии выбрано из средств, описанных в Jerry L. Adams et al., "Big opportunities for small molecules in immuno-oncology", *Cancer Therapy* 2015, Vol. 14, pages 603-622, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии выбрано из примеров, описанных в табл. 1 Jerry L. Adams et al. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой низкомолекулярное соединение, нацеленное на мишень иммуноонкологии, выбранную из мишеней, приведенных в табл. 2 Jerry L. Adams et al. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой низкомолекулярное соединение, выбранное из соединений, приведенных в табл. 2 Jerry L. Adams et al.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии выбрано из низкомолекулярных средств иммуноонкологии, описанных в Peter L. Toogood, "Small molecule immuno-oncology therapeutic agents", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2018, Vol. 28, pages 319-329, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой средство, нацеленное на каскады, описанные в Peter L. Toogood.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии выбрано из средств, описанных в Sandra L. Ross et al., "Bispecific T cell engager (BiTE®) antibody constructs can mediate bystander tumor cell killing", *PLoS ONE* 12(8): e0183390, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой конструкцию антитела, представляющую собой биспецифический активатор Т-клеток (BiTE®). В некоторых вариантах осуществления конструкция антитела, представляющая собой биспецифический активатор Т-клеток (BiTE®), представляет собой конструкцию биспецифического антитела CD19/CD3. В некоторых вариантах осуществления конструкция антитела, представляющая собой биспецифический активатор Т-клеток (BiTE®), представляет собой конструкцию биспецифического антитела EGFR/CD3. В некоторых вариантах осуществления конструкция антитела, представляющая собой биспецифический активатор Т-клеток (BiTE®), активирует Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления конструкция антитела, представляющая собой биспецифический активатор Т-клеток (BiTE®), активирует Т-клетки, которые высвобождают цитокины, индуцирующие активацию внутриклеточной молекулы адгезии 1 (ICAM-1) и FAS на клетках-свидетелях. В некоторых вариантах осуществления конструкция антитела, представляющая собой биспецифический активатор Т-клеток (BiTE®), активирует Т-клетки, которые вызывают индуцированный лизис клеток-свидетелей. В некоторых вариантах осуществления клетки-свидетели находятся в солидных опухолях. В некоторых вариантах осуществления лизируемые клетки-свидетели находятся вблизи BiTE®-активируемых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки-свидетели включают злокачественные клетки, негативные по опухолеассоциированному антигену (ТАА). В некоторых вариантах осуществления клетки-свидетели включают EGFR-негативные злокачественные клетки. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой антитело, которое блокирует систему PD-L1/PD1 и/или CTLA4. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой подвергнутую экспансии *ex vivo* инфильтрирующую опухоль Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой конструкцию биспецифического антитела или химерные рецепторы антигенов (CAR), которые прямо связывают Т-клетки с опухолеассоциированными поверхностными антигенами (ТАА).

Иллюстративные ингибиторы иммунной точки контроля.

В некоторых вариантах осуществления средство иммуноонкологии представляет собой ингибитор иммунной точки контроля, как описано в настоящем описании.

Термин "ингибитор точки контроля", как используют в рамках изобретения, относится к средствам, пригодным для предупреждения ускользания злокачественными клетками иммунной системы пациента. Один из основных механизмов нарушения противоопухолевого иммунитета известен как "истощение Т-клеток", которое является результатом длительного воздействия антигенов, вызывающего активацию ингибиторных рецепторов. Эти ингибиторные рецепторы служат в качестве иммунных точек контроля для предупреждения неконтролируемых иммунных реакций.

PD-1 и коингибиторные рецепторы, такие как антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4, В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор (BTLA; CD272), домен 3 Т-клеточного иммуноглобулина и муцина 3 (Tim-3), белок гена 3 активации лимфоцитов (Lag-3; CD223) и другие, часто указывают в качестве регуляторов точки контроля. Они выступают в качестве молекулярных "стражей", которые позволяют внеклеточной информации определять, должно ли происходить прогрессирование клеточного цикла и других внутриклеточные сигнальные процессы.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной точки контроля представляет собой

антитело к PD-1. PD-1 связывается с рецептором белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1) для предотвращения связывания рецептора с ингибиторным лигандом PDL-1, таким образом, преодолевая способность опухолей подавлять противоопухолевый иммунный ответ хозяина.

В одном аспекте ингибитор точки контроля представляет собой биологическое терапевтическое средство или низкомолекулярное соединение. В другом аспекте ингибитор точки контроля представляет собой моноклональное антитело, гуманизированное антитело, полностью человеческое антитело, слитый белок или их комбинацию. В следующем аспекте ингибитор точки контроля ингибирует белок точки контроля, выбранный из CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, лигандов семейства B-7 или их комбинации. В дополнительном аспекте ингибитор точки контроля взаимодействует с лигандом белка точки контроля, выбранным из CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, лигандов семейства B-7 или их комбинации. В одном аспекте ингибитор точки контроля представляет собой иммуностимулирующее средство, Т-клеточный фактор роста, интерлейкин, антитело, вакцину или их комбинацию. В следующем аспекте интерлейкин представляет собой IL-7 или IL-15. В конкретном аспекте интерлейкин является гликозилированным IL-7. В дополнительном аспекте вакцина представляет собой вакцину на основе дендритных клеток (DC).

Ингибиторы точки контроля включают любое средство, которое блокирует или ингибирует статистически значимым образом ингибиторные каскады иммунной системы. Такие ингибиторы могут включать низкомолекулярные ингибиторы или могут включать антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают и блокируют или ингибируют рецепторы иммунной точки контроля, или антитела, которые связывают и блокируют или ингибируют лиганды рецепторов иммунной точки контроля. Иллюстративные молекулы точки контроля, на которые можно проводить нацеливание для блокирования или ингибирования, включают, но не ограничиваются ими, CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, GAL9, LAG3, TIM3, VISTA, KIR, 2B4 (принадлежит семейству молекул CD2 и экспрессируется на всех NK,  $\gamma\delta$ , и CD8<sup>+</sup> ( $\alpha\beta$ ) Т-клетках памяти), CD160 (также обозначаемый как BY55), CGEN-15049, киназы CHK1 и CHK2, A2aR и различные лиганды семейства B-7. Лиганды семейства B7 включают, но не ограничиваются ими, B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6 и B7-H7. Ингибиторы точки контроля включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, другие связывающие белки, биологические терапевтические средства или низкомолекулярные соединения, которые связывают и блокируют или ингибируют активность одного или нескольких из CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD 160 и CGEN-15049. Иллюстративные ингибиторы иммунной точки контроля включают тремелимуаб (блокирующее CTLA-4 антитело), моноклональное антитело против OX40, PD-L1 (антитело против B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (блокатор PD-1), ниволумаб (антитело против PD1), CT-011 (антитело против PD1), моноклональные антитела против BY55, AMP224 (антитело против PDL1), BMS-936559 (антитело против PDL1), MPLDL3280A (антитело против PDL1), MSB0010718C (антитело против PDL1) и ипилимумаб (ингибитор точки контроля против CTLA-4). Лиганды белков точки контроля включают, но не ограничиваются ими PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD28, CD86 и TIM-3.

В определенных вариантах осуществления ингибитор иммунной точки контроля выбран из антагониста PD-1, антагониста PD-L1 и антагониста CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор точки контроля выбран из группы, состоящей из ниволумаба (Opdivo®), ипилимумаба (Yervoy®) и пембролизумаба (Keytruda®). В некоторых вариантах осуществления ингибитор точки контроля выбран из: ниволумаба (антитела против PD-1, Opdivo®, Bristol-Myers Squibb); пембролизумаба (антитело против PD-1, Keytruda®, Merck); ипилимумаба (антитело против CTLA-4, Yervoy®, Bristol-Myers Squibb); дурвалумаба (антитело против PD-L1, Imfinzi®, AstraZeneca) и атезолизумаба (антитело против PD-L1, Tecentriq®, Genentech).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор точки контроля выбран из группы, состоящей из ламбролизумаба (MK-3475), ниволумаба (BMS-936558), пидилизумаба (CT-011), AMP-224, MDX-1105, MEDI4736, MPDL3280A, BMS-936559, ипилимумаба, лирлумаба, IPH2101, пембролизумаба (Keytruda®) и тремелимумаба.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной точки контроля представляет собой: REGN2810 (Regeneron), антитело против PD-1, протестированное у пациентов с базально-клеточной карциномой (NCT03132636); NSCLC (NCT03088540); кожной плоскоклеточной карциномой (NCT02760498); лимфомой (NCT02651662); и меланомой (NCT03002376); пидилизумаб (CureTech), также известный как CT-011, антитело, которое связывается с PD-1, проходящее клинические испытания против диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой и множественной миеломой; авелумаб (Bavencio®, Pfizer/Merck KGaA), также известный как MSB0010718C), полностью человеческое IgG1-антитело против PD-L1, проходящее клинические испытания при немелкоклеточном раке легкого, карциноме из клеток Меркеля, мезотелиоме, солидных опухолях, раке почки, раке яичника, раке мочевого пузыря, раке головы и шеи и раке желудка; или PDR001 (Novartis), ингибиторное антитело, которое свя-

зывается с PD-1, проходящее клинические испытания при немелкоклеточном раке легкого, меланоме, тройном негативном раке молочной железы и развернутых или метастазирующих солидных опухолях. Трелелиумаб (CP-675,206; Astrazeneca) представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело против CTLA-4, которое исследовано в клинических испытаниях при ряде показаний, включая: мезотелиому, рак ободочной и прямой кишки, рак почки, рак молочной железы, рак легкого и немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному протоков поджелудочной железы, рак поджелудочной железы, герминогенный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, печеночно-клеточную карциному, рак предстательной железы, рак эндометрия, метастазирующий рак в печени, рак печени, крупноклеточную В-клеточную лимфому, рак яичника, рак шейки матки, метастазирующий анапластический рак щитовидной железы, рак уротелия, рак фаллопиевой трубы, множественную миелому, рак мочевого пузыря, саркому мягких тканей и меланому. AGEN-1884 (Agenus) представляет собой антитело против CTLA4, которое находится в фазе I клинических испытаний для развернутых солидных опухолей (NCT02694822).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор точки контроля представляет собой ингибитор белка 3, содержащего домен Т-клеточного иммуноглобулина и муцина (TIM-3). Ингибиторы TIM-3, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают TSR-022, LY3321367 и MBG453. TSR-022 (Tesaro) представляет собой антитело против TIM-3, которое проходит испытания при солидных опухолях (NCT02817633). LY3321367 (Eli Lilly) представляет собой антитело против TIM-3, которое проходит испытания при солидных опухолях (NCT03099109). MBG453 (Novartis) представляет собой антитело против TIM-3, которое проходит испытания при развернутых злокачественных опухолях (NCT02608268).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор точки контроля представляет собой ингибитор Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM, или TIGIT, иммунного рецептора на определенных Т-клетках и НК-клетках. Ингибиторы TIGIT, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают BMS-986207 (Bristol-Myers Squibb), моноклональное антитело против TIGIT (NCT02913313); OMP-313M32 (Oncomed); и моноклональное антитело против TIGIT (NCT03119428).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор точки контроля представляет собой ингибитор белка гена 3 активации лимфоцитов (LAG-3). Ингибиторы LAG-3, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают BMS-986016 и REGN3767 и IMP321. BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb), антитело против LAG-3, проходит испытания при глиобластоме и глиосаркоме (NCT02658981). REGN3767 (Regeneron) также представляет собой антитело против LAG-3 и проходит испытания при злокачественных опухолях (NCT03005782). IMP321 (Immutep S.A.) представляет собой слитый белок LAG-3-Ig, который проходит испытания при: меланоме (NCT02676869); аденокарциноме (NCT02614833); и метастазирующем раке молочной железы (NCT00349934).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают агонисты OX40. Агонисты OX40, которые исследуются в клинических испытаниях, включают: PF-04518600/PF-8600 (Pfizer), антитело-агонист OX40, при метастазирующем раке почки (NCT03092856) и развернутых злокачественных опухолях и новообразованиях (NCT02554812; NCT05082566); GSK3174998 (Merck), антитело-агонист OX40, находящееся в фазе I клинических испытаний (NCT02528357); MEDI0562 (Medimmune/AstraZeneca), антитело-агонист OX40, при развернутых солидных опухолях (NCT02318394 и NCT02705482); MEDI6469, антитело-агонист OX40 (Medimmune/AstraZeneca), у пациентов с раком ободочной и прямой кишки (NCT02559024), раком молочной железы (NCT01862900), раком головы и шеи (NCT02274155) и метастазирующим раком предстательной железы (NCT01303705); и BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb) антитело-агонист OX40, при развернутых злокачественных опухолях (NCT02737475).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают агонисты CD137 (также называемый 4-1BB). Агонисты CD137, которые исследуются в клинических испытаниях, включают: утомилумаб (PF-05082566, Pfizer) антитело-агонист CD137, при диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме (NCT02951156) и при развернутых злокачественных опухолях и новообразованиях (NCT02554812 и NCT05082566); урелумаб (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), антитело-агонист CD137, при меланоме и раке кожи (NCT02652455) и глиобластоме и глиосаркоме (NCT02658981).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают агонисты CD27. Агонисты CD27, которые проходят исследования в клинических испытаниях, включают: варлилумаб (CDX-1127, Celldex Therapeutics), антитело-агонист CD27, при плоскоклеточном раке головы и шеи, карциноме яичника, раке ободочной и прямой кишки, почечно-клеточном раке и глиобластоме (NCT02335918); лимфомах (NCT01460134); и глиоме и астроцитоме (NCT02924038).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают агонисты глюкокортикоид-индуцируемых рецепторов фактора некроза опухоли (GITR). Агонисты GITR, которые проходят исследования в клинических испытаниях, включают: TRX518 (Leap Therapeutics), антитело-агонист GITR, при злокачественной меланоме и других злокачественных солидных опухолях (NCT01239134 и NCT02628574); GWN323 (Novartis), антитело-агонист GITR, при солидных опухолях и лимфоме (NCT02740270); INCAGN01876 (Incyte/Agenus), антитело-агонист GITR, при

развернутых злокачественных опухолях (NCT02697591 и NCT03 126110); МК-4166 (Merck), антитело-агонист G1TR, при солидных опухолях (NCT02132754) и MEDI1873 (Medimmune/AstraZeneca), гексамерную молекулу-агонист G1TR-лиганда с Fc-доменом IgG1 человека, при развернутых солидных опухолях (NCT02583165).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают агонисты индуцируемого костимулятора Т-клеток (ICOS, также известный как CD278). Агонисты ICOS, которые проходят исследования в клинических испытаниях, включают: MEDI-570 (Medimmune), антитело-агонист ICOS, при лимфомах (NCT02520791); GSK3359609 (Merck), антитело-агонист ICOS, в фазе 1 (NCT02723955); и JTX-2011 (Jounce Therapeutics), антитело-агонист ICOS, в фазе 1 (NCT02904226).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают ингибиторы IgG-подобных рецепторов киллерных клеток (KIR). Ингибиторы KIR, которые проходят исследования в клинических испытаниях, включают: лирилумаб (IPH2102/BMS-986015, Innate Pharma/Bristol-Myers Squibb), антитело против KIR, при лейкозах (NCT01687387, NCT02399917, NCT02481297, NCT02599649), множественной миеломе (NCT02252263) и лимфоме (NCT01592370); IPH2101 (1-7F9, Innate Pharma) при миеломе (NCT01222286 и NCT01217203); и IPH4102 (Innate Pharma), антитело против KIR, которое связывается с тремя доменами длинной цитоплазматической хвостовой части (KIR3DL2), при лимфоме (NCT02593045).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают ингибиторы CD47, которые ингибируют взаимодействие между CD47 и регулирующим сигналом белком альфа (SIRPa). Ингибиторы CD47/SIRPa, которые проходят исследования в клинических испытаниях, включают: ALX-148 (Alexo Therapeutics), вариант-антагонист (SIRPa), который связывается с CD47 и препятствует опосредуемой CD47/SIRPa передаче сигнала, в фазе 1 (NCT03013218); TTI-621 (SIRPa-Fc, Trillium Therapeutics), растворимый рекомбинантный слитый белок, полученный путем сшивания N-концевого CD47-связывающего домена SIRPa с Fc-доменом IgG1 человека, действующий посредством связывания CD47 человека, и препятствующий доставке его сигнала "не поглощать" макрофагам, в клинических испытаниях фазы 1 (NCT02890368 и NCT02663518); CC-90002 (Celgene), антитело против CD47, при лейкозах (NCT02641002); и Hu5F9-G4 (Forty Seven, Inc.), при новообразованиях ободочной и прямой кишки и при солидных опухолях (NCT02953782), остром миелоидном лейкозе (NCT02678338) и лимфоме (NCT02953509).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают ингибиторы CD73. Ингибиторы CD73, которые проходят исследования в клинических испытаниях, включают: MEDI9447 (Medimmune), антитело против CD73, при солидных опухолях (NCT02503774); и BMS-986179 (Bristol-Myers Squibb), антитело против CD73, при солидных опухолях (NCT02754141).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают агонисты белка-стимулятора генов интерферонов (STING, также известный как трансмембранный блок 173, или TMEM173). Агонисты STING, которые проходят исследования в клинических испытаниях, включают: МК-1454 (Merck), синтетический циклический динуклеотид, являющийся агонистом, при лимфоме (NCT03010176); и ADU-S100 (MIW815, Aduro Biotech/Novartis), синтетический циклический динуклеотид, являющийся агонистом, в фазе 1 (NCT02675439 и NCT03172936).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают ингибиторы CSF1R. Ингибиторы CSF1R, которые проходят исследования в клинических испытаниях, включают: пексдартиниб (PLX3397, Plexxikon), низкомолекулярный ингибитор CSF1R, при раке ободочной и прямой кишки, раке поджелудочной железы, метастазирующих и развернутых злокачественных опухолях (NCT02777710) и меланоме, немелкоклеточном раке легкого, плоскоклеточном раке головы и шеи, желудочно-кишечной стромальной опухоли (GIST) и раке яичника (NCT02452424); и IMC-CS4 (LY3022855, Lilly), антитело против CSF-1R, при раке поджелудочной железы (NCT03153410), меланоме (NCT03101254) и солидных опухолях (NCT02718911); и BLZ945 (метиламид 4-[2((1R,2R)-2-гидроксициклогексиламино)бензотиазол-6-илокси]пиридин-2-карбоновой кислоты, Novartis), перорально доступный ингибитор CSF1R, при развернутых солидных опухолях (NCT02829723).

Ингибиторы точки контроля, которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают ингибиторы рецептора NKG2A. Ингибиторы рецептора NKG2A, которые проходят исследования в клинических испытаниях, включают монализумаб (IPH2201, Innate Pharma), антитело против NKG2A, при новообразованиях головы и шеи (NCT02643550) и хроническом лимфоцитарном лейкозе (NCT02557516).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной точки контроля выбран из ниволумаба, тембролизумаба, ипилимумаба, авелумаба, дурвалумаба, атезолизумаба или пидилизумаба.

Терапевтические применения.

Бициклические пептиды по изобретению особенно применимы в качестве связывающих нектин-4 соединений.

Нектин-4 представляет собой молекулу поверхности, которая принадлежит семейству белков нек-

тинов, которое включает 4 представителя. Нектины представляют собой молекулы клеточной адгезии, которые играют ключевую роль в различных биологических процессах, таких как полярность, пролиферация, дифференцировка и миграция, для эпителиальных, эндотелиальных, иммунных и нейрональных клеток, в ходе развития и взрослой жизни. Они вовлечены в несколько патологических процессов у человека. Они являются основными рецепторами для полиовируса, вируса простого герпеса и вируса кори. Мутации в генах, кодирующих нектин-1 (PVRL1) или нектин-4 (PVRL4), вызывают синдромы эктодермальной дисплазии, ассоциированные с другими аномалиями.

Нектин-4 экспрессируется в ходе эмбрионального развития. Во взрослых тканях его экспрессия более ограничена, чем экспрессия других представителей семейства. Нектин-4 представляет собой ассоциированный с опухолью антиген в 50, 49 и 86% карцином молочной железы, яичника и легкого, соответственно, в основном на опухолях с плохим прогнозом. Его экспрессия не обнаруживается в соответствующих нормальных тканях. При опухолях молочной железы нектин-4 экспрессируется в основном в тройных негативных и ERBB2+ карциномах. В сыворотке пациентов с этими злокачественными опухолями детекция растворимых форм нектин-4 ассоциирована с плохим прогнозом. Уровни сывороточного нектин-4 возрастают в ходе метастатического прогрессирования и снижаются после лечения. Эти результаты указывают на то, что нектин-4 может быть надежной мишенью для лечения злокачественной опухоли. Таким образом, на уровне техники описано несколько антител против нектин-4. В частности, Энфортумаб ведотин (ASG-22ME) представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), нацеленный на нектин-4 и в настоящее время он проходит клинические испытания для лечения пациентов, страдающих от солидных опухолей.

Полипептидные лиганды, выбранные в соответствии со способом по настоящему изобретению, можно использовать в терапевтических и профилактических применениях *in vivo*, диагностических применениях *in vitro* и *in vivo*, применениях для анализов и реагентов *in vitro*, и т.п. Лиганды, имеющие определенные уровни специфичности, являются пригодными в применениях, которые вовлекают тестирование на не являющихся человеком животных, где является желательной перекрестная реактивность, или в диагностических применениях, где перекрестную реактивность в отношении гомологов или паралогов необходимо тщательно контролировать. В некоторых применениях, таких как применения в вакцинах, способность индуцировать иммунный ответ на заданные диапазоны антигенов можно использовать для адаптации вакцины к определенным заболеваниям и патогенам.

По существу чистые пептидные лиганды с гомогенностью по меньшей мере 90-95% являются предпочтительными для введения млекопитающему, и наиболее предпочтительной для фармацевтических применений является гомогенность 98-99% или более, особенно когда млекопитающим является человек. После очистки частично или до гомогенности при желании выбранные полипептиды можно использовать в диагностических или терапевтических целях (в том числе экстракорпорально) или для разработки и проведения процедур анализа, иммунофлуоресцентного окрашивания и т.п. (Lefkovite and Pernis, (1979 and 1981) *Immunological Methods*, Volumes I and II, Academic Press, NY).

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства, как определено в настоящем описании, для применения для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого нектином-4.

В соответствии со следующим аспектом изобретения предусматривается способ предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого нектином-4, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгата эффекторной группы и лекарственного средства пептидного лиганда, как определено в настоящем описании.

В одном варианте осуществления нектин-4 представляет собой нектин-4 млекопитающего. В следующем варианте осуществления нектин-4 млекопитающего представляет собой нектин-4 человека.

В одном варианте осуществления заболевание или нарушение, опосредуемое нектином-4, выбрано из вирусных инфекций, синдромов эктодермальной дисплазии и других аномалий, карциномы молочной железы, яичника и легкого, прогрессирования метастазов и солидных опухолей.

В следующем варианте осуществления заболевание или нарушение, опосредуемое нектином-4, выбрано из злокачественной опухоли.

Примеры злокачественных опухолей (и их доброкачественных аналогов), которые можно лечить (или ингибировать), включают, но не ограничиваются ими, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточные карциномы, переходноклеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевыводящих путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая пищевод, желудок (гастральная), тонкий кишечник, толстый кишечник, прямую кишку и анус), печени (печеночно-клеточная карцинома), желчного пузыря и желчевыводящей системы, экзокринные карциномы поджелудочной железы, почки, легкого (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легкого, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), головы и шеи (например, злокачественные опухоли языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалевидных желез, слюнных желез, носовой полости и околоносовых пазух), яичника, фаллопиевых труб, брюшины, вагины, вульвы, полового члена, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярная кар-

цинома щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и смежных органов (например, меланома, базально-клеточная карцинома, плоскоклеточная карцинома, кератоакантома, диспластический невус); гематологические злокачественные опухоли (т.е. лейкозы, лимфомы) и предзлокачественные гематологические нарушения и нарушения пограничной злокачественности, включая гематологические злокачественные опухоли и родственные состояния лимфоидного происхождения (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 из клеток мантийной зоны, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы из натуральных киллеров [NK], лимфома Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональная гаммапатия неуточненного значения, плазмацитомы, множественная миелома и посттрансплантационные лимфопролиферативные нарушения), и гематологические злокачественные опухоли и родственные состояния миелоидного ростка (например, острый миелогенный лейкоз [AML], хронический миелогенный лейкоз [CMML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелолиферативные нарушения, такие как истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелолиферативный синдром, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимного происхождения, например, саркомы мягких тканей, костей или хрящей, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркома Капоши, саркома Юинга, синовиальные саркомы, эпителиоидные саркомы, желудочно-кишечные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистиоцитомы, и возвышающаяся дерматофибросаркома; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, пиниальные опухоли и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли паращитовидной железы и медуллярная карцинома щитовидной железы); опухоли глаза и прилежащих тканей (например, ретинобластома); герминогенные и трофобластические опухоли (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, хорионаденомы и хориокарциномы); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластома, нейробластома, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают пациента предрасположенным к злокачественным опухолям (например, пигментная кероидерма).

В следующем варианте осуществления злокачественная опухоль выбрана из гемопоэтической злокачественной опухоли, например, выбранной из: неходжкинской лимфомы (NHL), лимфомы Беркитта (BL), множественной миеломы (MM), хронического В-лимфоцитарного лейкоза (B-CLL), острого В- и Т-лимфоцитарного лейкоза (ALL), Т-клеточной лимфомы (TCL), острого миелоидного лейкоза (AML), волосатоклеточного лейкоза (HCL), лимфомы Ходжкина (HL) и хронического миелоидного лейкоза (CML).

В следующем варианте осуществления злокачественная опухоль выбрана из рака легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы и рак молочной железы. В настоящем описании в примерах 1-5 приводятся данные, которые демонстрируют, что выбранные бициклические конъюгаты лекарственного средства по изобретению демонстрировали противоопухолевую активность в этих моделях злокачественной опухоли.

Упоминание в настоящем описании термина "предупреждение" вовлекает введение защитной композиции до индукции заболевания. "Подавление" относится к введению композиции после индуцирующего события, но до клинического появления заболевания. "Лечение" вовлекает введение защитной композиции после проявления симптомов заболевания.

Модельные системы на животных, которые можно использовать для скрининга эффективности пептидных лигандов в отношении защиты от или лечения заболевания, являются доступными. Настоящее изобретение облегчает использование модельных систем на животных, что позволяет разработку полипептидных лигандов, которые могут перекрестно реагировать с мишенями из человека и животных, для обеспечения возможности применения моделей на животных.

Более того, в настоящем описании представлены данные, которые демонстрируют ассоциацию между варьированием количества копий (CNV) и экспрессией гена нектин-4 из множества типов опухолей. Таким образом, согласно следующему аспекту изобретения, предусматривается способ предупреждения, подавления или лечения злокачественной опухоли, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффекторной группы и конъюгата лекарственного средства, представляющего собой пептидный лиганд, как определено в настоящем описании, где указанный пациент идентифицирован как имеющий увеличенное варьирование числа копий (CNV) нектин-4.

В одном варианте осуществления злокачественная опухоль выбрана из злокачественных опухолей, идентифицированных в настоящем описании как имеющие увеличенное CNV нектин-4. В следующем варианте осуществления злокачественная опухоль выбрана из злокачественных опухолей, идентифицированных в настоящем описании как имеющие увеличенное CNV нектин-4, а именно: рака молочной железы, матки, мочевого пузыря, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, рака шейки матки, головы и шеи, поджелудочной железы, щитовидной железы, ободочной и прямой кишки, тимомы, саркомы, светлоклеточной карциномы почек (RCC), рака предстательной железы и желудка.

Изобретение дополнительно описано ниже с помощью следующих примеров.



## Примеры.

Сокращенные обозначения.

1,2,4-TriAz: 3-(1,2,4-триазол-1-ил)аланин;

1Nal: 1-нафтилаланин;

2FuAla: 2-фурилаланин;

2MePhe: 2-метилфенилаланин;

2Nal: 2-нафтилаланин;

2Pal: 2-пиридилаланин;

3,3-DPA: 3,3-дифенилаланин;

3MePhe: 3-метилфенилаланин;

3Pal: 3-пиридилаланин;

4,4-BPA: 4,4-бифенилаланин;

4,4-DFP: 4,4-дифторпролин;

4MePhe: 4-метилфенилаланин;

4Pal: 4-пиридилаланин;

4ThiAz: бета-(4-тиазолил)аланин;

5FTp: 5-фтор-L-триптофан;

Agb: 2-амино-4-гуанидиномасляная кислота;

Aib: аминокислотная кислота;

AzaTp: азатриптофан;

Aze: азетидин;

C5A: циклопентилглицин;

Cha: 3-циклогексилаланин;

Cpa: циклопропилаланин;

Cya: цистеиновая кислота;

DOPA: 3,4-дигидроксифенилаланин;

HArg: гомоаргинин;

HGln: гомоглутамин;

Hleu: гомолейцин;

Hphe: гомофенилаланин;

Hse(me): гомосерин(Me);

HSer: гомосерин;

HyP: гидроксипролин;

Lys(Ac): лизин(ацетил);

Met(O2): метионинсульфон;

Me: норлейцин;

Oic: октагидроиндолкарбоновая кислота;

Oxa: оксазолидин-4-карбоновая кислота;

pCoPhe: пара-карбоксифенилаланин;

PheOPhe: 4-феноксифенилаланин;

Phg: фенилглицин;

Pip: пипеколиновая кислота;

Pro(4NH): 4-аминопролин;

tBuAla: трет-бутилаланин;

TetraZ: тетразолаланин;

Thi: тиени-аланин;

THP(O): тетрагидропиран-4-пропионовая кислота;

THP(SO2): диоксо-4-тетрагидропиранилуксусная кислота;

Tp(Me): метилтриптофан.

Материалы и способы.

Синтез пептидов.

Синтез пептидов был основан на химии Fmoc с использованием устройства для синтеза пептидов Symphony, производимого Peptide Instruments, и устройства для синтеза Syro II от MultiSynTech. Использовали стандартные Fmoc-аминокислоты (Sigma, Merck) с подходящими защитными группами боковых цепей: когда это было применимо, в каждом случае использовали стандартные условия присоединения, за которыми следовало удаление защитных групп с использованием стандартной методологии.

Альтернативно, пептиды очищали с использованием ВЭЖХ и после выделения их модифицировали посредством 1,3,5-триакрилоилгексагидро-1,3,5-триазина (TATA, Sigma). Для этого линейный пептид разбавляли 50:50 посредством MeCN:H<sub>2</sub>O вплоть до ~35 мл, добавляли ~500 мкл 100 мМ TATA в ацетонитриле и реакцию начинали посредством 5 мл 1 М NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> в H<sub>2</sub>O. Реакции позволяли протекать в течение ~30-60 мин при к.т., и лиофилизировали после завершения реакции (на основе данных MALDI-MS). После завершения 1 мл к реакционной смеси добавляли 1 М моногидрат гидрохлорида L-цистеина

(Sigma) в H<sub>2</sub>O на ~60 мин при к.т. для гашения любого избытка ТАТА.

После лиофилизации модифицированный пептид очищали, как описано выше, заменяя Luna C8 на колонку Gemini C18 (Phenomenex), и заменяя кислоту на 0,1% трифторуксусную кислоту. Очищенные фракции, содержавшие правильный ТАТА-модифицированный материал, объединяли, лиофилизовали и держали при -20°C для хранения.

Все аминокислоты, если нет иных указаний, использовали в L-конфигурациях.

В некоторых случаях пептиды конвертируют в активированные дисульфиды перед присоединения к свободной тиольной группе токсина с использованием следующего способа; раствор 4-метил(сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноата) (100 мМ) в сухом DMSO (1,25 мол. экв.) добавляли к раствору пептида (20 мМ) в сухом DMSO (1 мол. экв.). Реакционную смесь хорошо перемешивали и добавляли DIPEA (20 мол. экв.). Мониторинг реакции проводили посредством LC/MS до завершения.

Получение бициклических конъюгатов пептид-лекарственное средство.

Получение BCY8549.

Условия разделения: фаза А: 0,075%TFA в H<sub>2</sub>O, фаза В : MeCN.

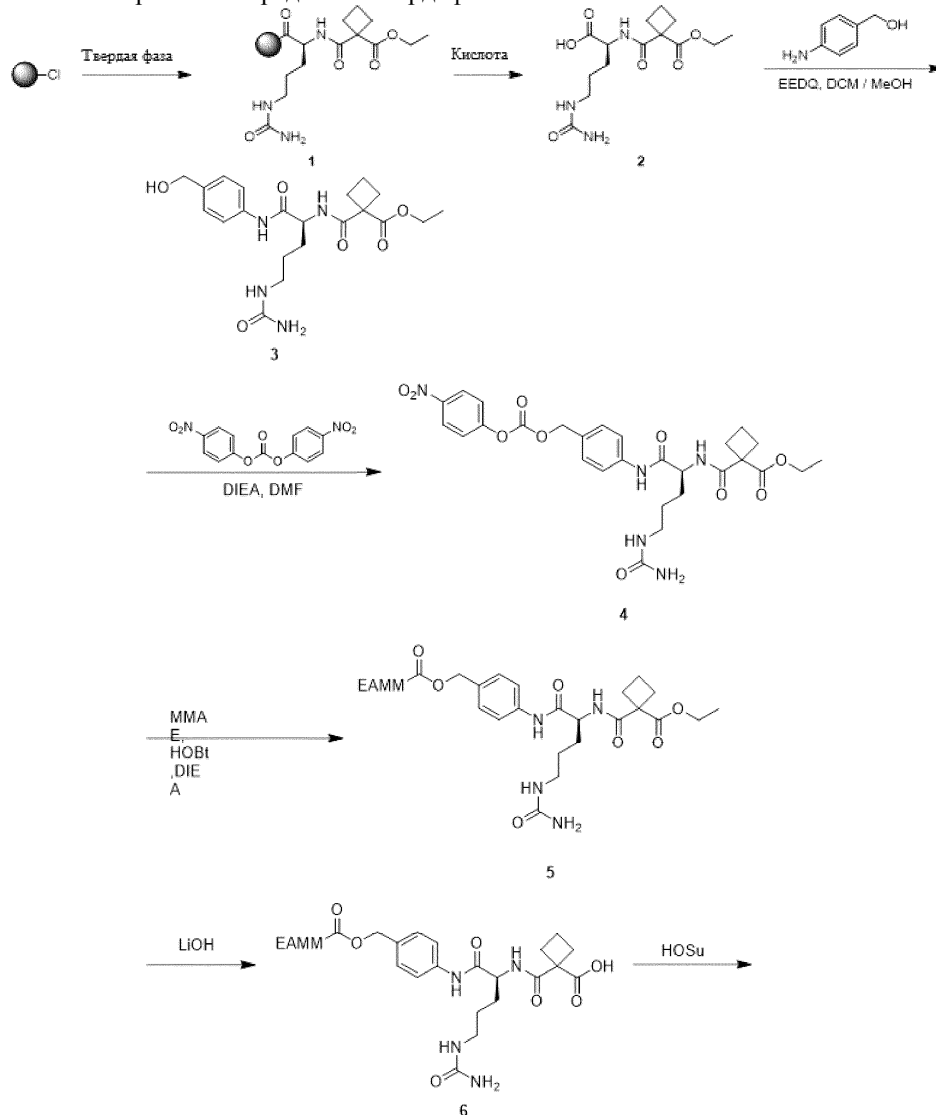
Способ разделения: 18-48-55 мин, RT=53,5 мин.

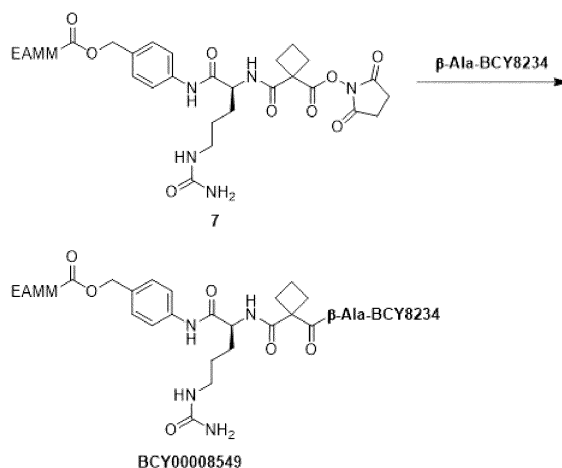
Разделительная колонка: Luna 200\*25мм 10 мкм, C18, 110А и Gemini150\*30 мм, C18, 5 мкм, 110А, подсоединение, 50°C.

Способ растворения: DMF.

Чистота разделения: 95%.

BCY8234 синтезировали посредством твердофазного синтеза.





Получение соединения 2.

Пептид синтезировали с использованием стандартной химии Fmoc.

1. Добавить DCM в емкость, содержащую смолу CTC (5 ммоль, 4,3 г, 1,17 ммоль/г) и Fmoc-Cit-OH (2,0 г, 5 ммоль, 1,0 экв.) при барботировании N<sub>2</sub>.
2. Капельно добавить DIEA (4,0 экв.) и перемешать в течение 2 ч.
3. Добавить MeOH (5 мл) и перемешать в течение 30 мин.
4. Слить и промыть DMF 5 раз.
5. Добавить 20% пиперидин/DMF и позволять протекать реакции в течение 30 мин.
6. Слить и промыть DMF 5 раз.
7. Добавить раствор Fmoc-аминокислоты и перемешать в течение 30 с, затем добавить буфер для активации при барботировании N<sub>2</sub> в течение приблизительно 1 ч.
8. Повторить указанные выше стадии 4-7 для присоединения последующих аминокислот.

Примечание:

#	Материалы	Реагенты для присоединения
1	Fmoc-Cit-OH (1,0 экв.)	DIEA (4,0 экв.)
2	1-этоксикарбонилциклобутанкарбоновая кислота (3,0 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,0 экв.)

20% пиперидин в DMF использовали для удаления защитной группы Fmoc в течение 30 мин. Мониторинг реакции присоединения проводили посредством теста с нингидрином, и смолу промывали DMF 5 раз.

Расщепление и очистка пептидов.

1. Добавить буфер для расщепления (20%TFIP/80%DCM) в колбу, содержащую пептид с защищенной боковой цепью, при комнатной температуре и перемешивать в течение 1 ч два раза.
2. Профильтровать и собрать фильтрат.
3. Концентрировать для удаления растворителя.
4. Неочищенный пептид лиофилизировать с получением конечного продукта (1,4 г, выход 85,0%).

Получение соединения 3.

К раствору соединения 2 (1,65 г, 5,01 ммоль, 1,0 экв.) в DCM (30 мл) и MeOH (15 мл) добавляли EEDQ (2,48 г, 10,02 ммоль, 2,0 экв.) и (4-аминофенил)метанол (740,37 мг, 6,01 ммоль, 1,2 экв.). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 2 израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной m/z. TLC показала, что соединение 2 израсходовалась полностью и образовывалось множество новых пятен. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; 80 SepaFlash® Silica Flash Column, элюент: градиент 0-15 DCM/MeOH при 60 мл/мин). Соединение 3 (1,3 г, 2,99 ммоль, выход 59,72%) получали в виде желтого твердого вещества.

Получение соединения 4.

К раствору соединения 3 (1,3 г, 2,99 ммоль, 1,0 экв.) в DMF (10 мл) добавляли DIEA (2,32 г, 17,95 ммоль, 3,13 экв.) и бис(4-нитрофенил)карбонат (3,64 г, 11,97 ммоль, 4,0 экв.). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 3 израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной m/z. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 4 (1,0 г, 1,67 ммоль, выход 55,74%) получали в виде желтого твердого вещества.

Получение соединения 5.

К раствору соединения 5 (250,53 мг, 417,84 мкмоль, 1,5 экв.) в DMF (5 мл) добавляли HOBt (56,46 мг,

417,84 мкмоль, 1,5 экв.) и DIEA (108,01 мг, 835,68 мкмоль, 145,56 мкл, 3,0 экв.), MMAE (0,200 г, 278,56 мкмоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 35°C в течение 12 ч. LC-MS продемонстрировала, что MMAE израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной *m/z*. Реакционную смесь прямо очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 5 (0,180 г, 152,74 мкмоль, выход 54,83%) получали в виде желтого твердого вещества.

Получение соединения 6.

К раствору соединения 5 (0,170 г, 144,26 мкмоль, 1,0 экв.) в THF (5 мл) и H<sub>2</sub>O (5 мл) добавляли Li-OH·H<sub>2</sub>O (12,11 мг, 288,51 мкмоль, 2,0 экв.). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 5 израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной *m/z*. Доводили до pH=7 посредством AcOH и THF удаляли при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 6 (0,185 г, неочищенный материал) получали в виде желтого твердого вещества.

Получение BCY8549.

К раствору соединения 6 (0,100 г, 86,93 мкмоль, 1,0 экв.) в DMA (4 мл) добавляли HOSu (10,00 мг, 86,93 мкмоль, 1,0 экв.) и EDCI (16,66 мг, 86,93 мкмоль, 1,0 экв.). После образования сложного эфира NHS добавляли β-Ala-BCY8234 (525,98 мг, 173,85 мкмоль, 2,0 экв.) и DIEA (33,70 мг, 260,78 мкмоль, 45,42 мкл, 3,0 экв.). Смесь перемешивали при 15°C в течение 4 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 6 израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной *m/z*. Реакционную смесь прямо очищали препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение BCY8549 (0,0528 г, 12,15 мкмоль, выход 13,98%, чистота 95,70%) получали в виде белого твердого вещества. Время удержания=11,48 мин. Обнаруженная масса=1386,4 (M/3+H).

Получение BCY8245.

Условия разделения: фаза А: 0,075%TFA в H<sub>2</sub>O, фаза В : MeCN.

Способ разделения: 18-48-55 мин, RT=53,5 мин.

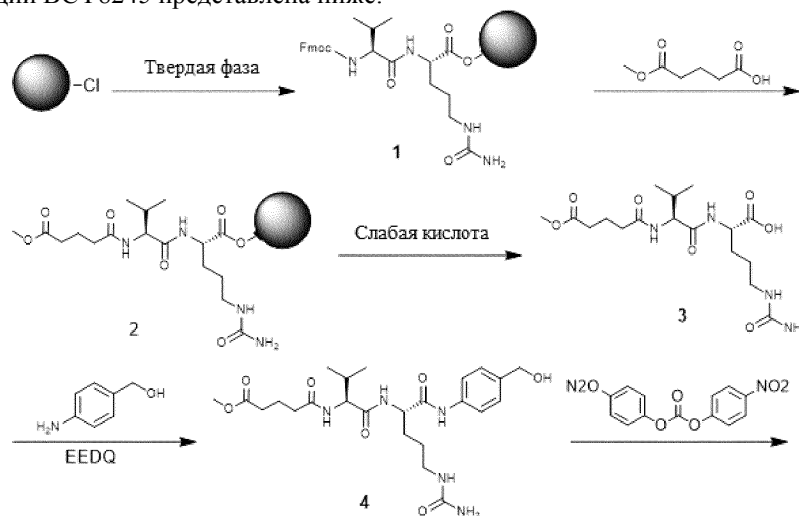
Разделительная колонка: Luna 200\*25мм 10 мкм, C18, 110А и Gemin150\*30 мм, C18, 5 мкм, 110А, подсоединение, 50°C.

Способ растворения: DMF.

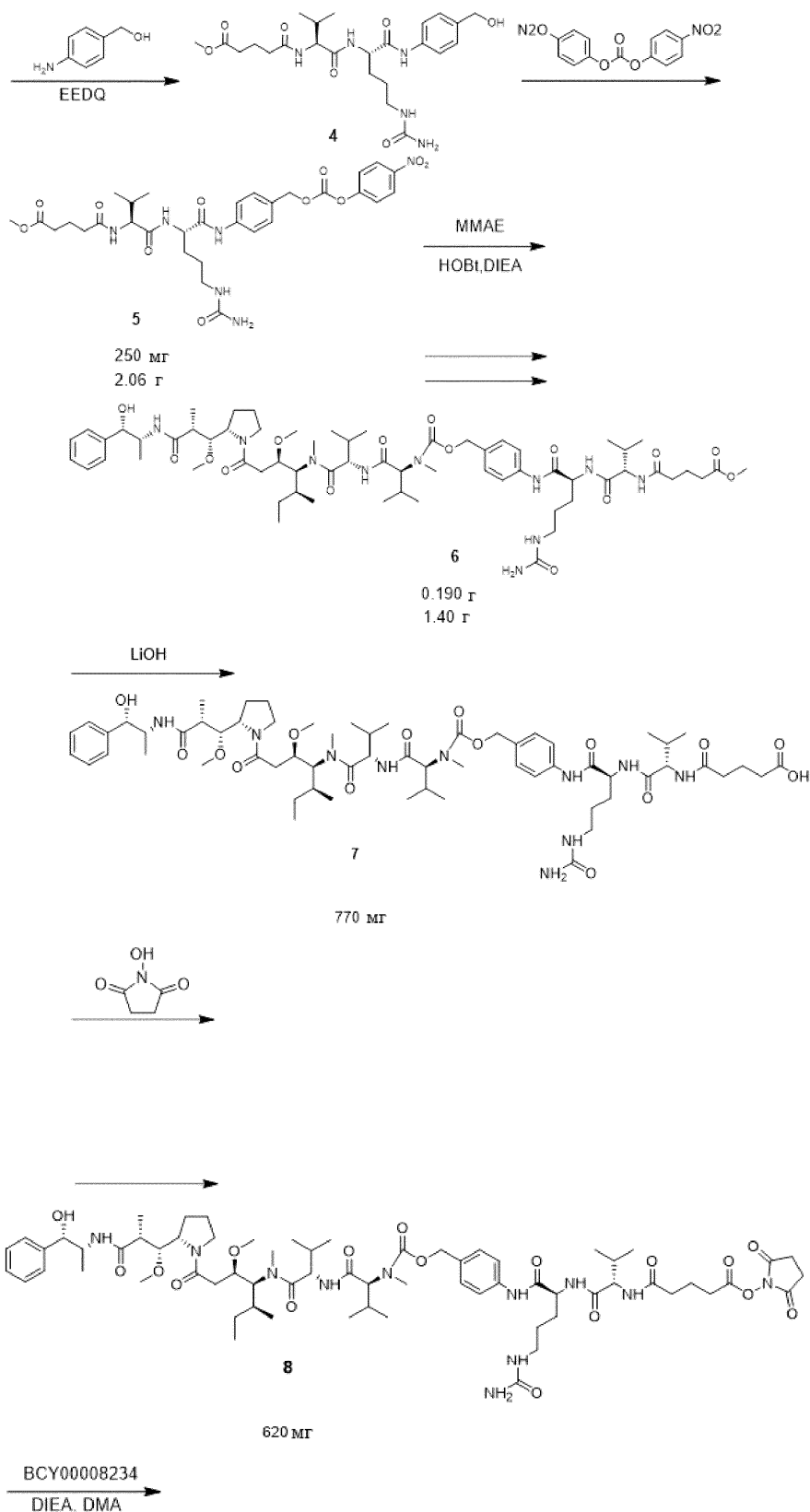
Чистота разделения: 95%.

BCY8234 синтезировали посредством твердофазного синтеза.

Схема реакции BCY8245 представлена ниже:



045804



Получение соединения 3.

Соединение 3 синтезировали способом твердофазного синтеза.

Получение соединения 4.

К раствору соединения 3 (1,3 г, 3,23 ммоль, 1,0 экв.) в DCM (10 мл) и MeOH (5 мл) добавляли EEDQ (1,60 г, 6,46 ммоль, 2,0 экв.) и (4-аминофенил)метанол (517,16 мг, 4,20 ммоль, 1,3 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 3 израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной m/z. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; 40 г

SepaFlash® Silica Flash Column, элюент: градиент 0~15 DCM/MeOH при 40 мл/мин). Соединение 4 (0,950 г, 1,87 ммоль, выход 57,94%) получали в виде желтого твердого вещества.

Получение соединения 5.

К раствору соединения 4 (0,950 г, 1,87 ммоль, 1,0 экв.) в DMF (5 мл) добавляли DIEA (1,21 г, 9,36 ммоль, 1,63 мл, 5,0 экв.) и бис(4-нитрофенил)карбонат (2,28 г, 7,49 ммоль, 4,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 4 израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной m/z. Реакционную смесь прямо очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 5 (0,400 г, 594,64 мкмоль, выход 31,77%) получали в виде белого твердого вещества.

Получение соединения 6.

К раствору соединения 5 (0,200 г, 297,32 мкмоль, 1,0 экв.) в DMF (5 мл) добавляли HOBt (52,23 мг, 386,51 мкмоль, 1,3 экв.) и DIEA (115,28 мг, 891,95 мкмоль, 155,36 мкл, 3,0 экв.), MMAE (192,12 мг, 267,59 мкмоль, 0,9 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 5 израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной m/z. Реакционную смесь прямо очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 6 (0,160 г, 127,84 мкмоль, выход 43,00%) получали в виде белого твердого вещества.

Получение соединения 7.

К раствору соединения 6 (0,160 г, 127,84 мкмоль, 1,0 экв.) в TFIF (3 мл) и H<sub>2</sub>O (3 мл) добавляли Li-OH.H<sub>2</sub>O (26,82 мг, 639,21 мкмоль, 5,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 6 израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной m/z. THF удаляли при пониженном давлении и доводили до pH=7 посредством AcOH, смесь лиофилизировали. Соединение 7 (0,130 г, 105,05 мкмоль, выход 82,17%) получали в виде белого твердого вещества.

Получение соединения 8.

К раствору соединения 7 (36,27 мг, 315,15 мкмоль, 3,0 экв.) в DMA (6 мл) и DCM (2 мл) добавляли EDCI (60,41 мг, 315,15 мкмоль, 3,0 экв.). Смесь перемешивали при 15°C в течение 3 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 7 израсходовалось полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной m/z. DCM удаляли при пониженном давлении. Реакционную смесь прямо очищали посредством препаративной ВЭЖХ (нейтральные условия). Соединение 8 (0,095 г, 71,18 мкмоль, выход 67,76%) получали в виде белого твердого вещества.

Получение BCY8245.

К раствору BCY8234 (66,41 мг, 22,48 мкмоль, 1,0 экв.) в DMA (4 мл) добавляли DIEA (8,72 мг, 67,44 мкмоль, 11,75 мкл, 3,0 экв.) и соединение 8 (0,030 г, 22,48 мкмоль, 1,0 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 16 ч. LC-MS продемонстрировала, что BCY8234 израсходовался полностью, и обнаруживался только один основной пик с желаемой величиной m/z. Реакционную смесь прямо очищали посредством препаративной ВЭЖХ (условия TFA). Соединение BCY8245 (0,0427 г, 10,16 мкмоль, выход 45,19%, чистота 99,30%) получали в виде белого твердого вещества. Время удержания=11,7 мин. Найденная масса=1043,9 (M/4+H).

#### Биологические данные

Анализ прямого связывания нектин-4.

Аффинность пептидов по изобретению в отношении нектин-4 человека (Ki) определяли с использованием флуоресцентного анализа поляризации в соответствии со способами, описанными в WO 2016/067035. Пептиды по изобретению с флуоресцентной меткой (либо флуоресцеин, либо SIGMA, либо Alexa Fluor488™, Fisher Scientific) разбавляли до 2,5 нМ в PBS с 0,01% tween 20 или 50 mM HEPES с 100 mM NaCl и 0,01% tween pH 7,4 (оба упоминаются как буфер для анализа). Это комбинировали с титрованием белка в том же буфере для анализа, что и для пептида, с получением 1 нМ пептида в общем объеме 25 мкл в 384-луночных планшетах с черными лунками и дном, низким связыванием и низким объемом, как правило, включая 5 мкл буфера для анализа, 10 мкл белка, а затем 10 мкл флуоресцентного пептида. Использование серийных разведений один к двум для получения 12 различных концентраций с максимальными концентрациями в диапазоне от 500 нМ для известных высокоаффинных связывающих соединений до 10 мкМ для низкоаффинных связывающих соединений и анализа селективности. Измерение проводили на BMG PHERAstar FS, оборудованном оптическим модулем "FP 485 520 520" с возбуждением при 485 нм и регистрирующем параллельное и перпендикулярное испускание при 520 нм. PHERAstar FS был установлен на 25°C с 200 промываниями на лунку и задержкой позиционирования, составляющей 0,1 с, причем измерение в каждой лунке проводили с интервалами 5-10 мин в течение 60 мин. Коэффициент усиления, использованный для анализа, определяли для каждой метки в конце 60 мин, когда в лунке не было белка. Данные анализировали с использованием Systat Sigmaplot версии 12.0. Величины mP аппроксимировали к выбираемому произвольно квадратному уравнению для получения величины Kd:  $f = y_{min} + (y_{max} - y_{min}) / \text{Lig} * ((x + \text{Lig} + \text{Kd}) / 2 - \sqrt{(((x + \text{Lig} + \text{Kd}) / 2)^2 - (\text{Lig} * x))}$ . "Lig" представляла собой определенную величину концентрации использованной метки.

Конкурентный анализ связывания нектин-4.

Пептиды без флуоресцентной метки тестировали в конкуренции с ACPFGCHTDWSWPIWCA-Sar6-K(F1) (SEQ ID NO: 2) и ( $K_d=5$  нМ - определенная с использованием описанного выше протокола), добавляли до соответствующей концентрации в буфере для анализа, как описано в прямом анализе связывания с максимум 5% DMSO, затем подвергали серийному разведению 1 к 2. В планшет добавляли пять мкл разбавленного пептида, затем 10 мкл нектин-4 человека, а затем добавляли 10 мкл флуоресцентного пептида. Измерения проводили, как для анализа прямого связывания, однако коэффициент усиления определяли до первого измерения. Анализ данных проводили в Systat Sigmaplot версии 12.0, где величины mP аппроксимировали к выбираемому произвольно кубическому уравнению с получением величины  $K_i$ :

$$f = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / \text{Lig} * ((\text{Lig} * ((2 * ((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp-Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^0,5 * \text{COS}(\text{ARCCOS}((-2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c)^3 + 9 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c) * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp-Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp})) - 27 * (-1 * \text{Klig} * \text{Kcomp} * \text{Prot} * c)) / (2 * (((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp-Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^3)^0,5))) / 3)) - (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c))) / ((3 * \text{Klig}) + ((2 * ((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp-Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^0,5 * \text{COS}(\text{ARCCOS}((-2 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c)^3 + 9 * (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c) * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp-Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp})) - 27 * (-1 * \text{Klig} * \text{Kcomp} * \text{Prot} * c)) / (2 * (((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c)^2 - 3 * (\text{Kcomp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + \text{Klig} * (\text{Comp-Prot} * c) + \text{Klig} * \text{Kcomp}))^3)^0,5))) / 3)) - (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp-Prot} * c))))).$$

Все из "Lig", "Klig" и "Prot" представляли собой определенные величины, связанные с: концентрацией флуоресцентного пептида,  $K_d$  флуоресцентного пептида и концентрацией нектин-4, соответственно.

Анализ связывания нектин-4 с использованием Biacore

Эксперименты Biacore проводили для определения величин  $k_a$  ( $M^{-1}c^{-1}$ ),  $k_d$  ( $c^{-1}$ ),  $K_D$  (нМ) мономерных пептидов, связывающихся с белком нектин-4 человека (полученным от Charles River).

Нектин-4 человека (остатки Gly32-Ser349; NCBI RefSeq: NP\_112178.2) с сигнальной последовательностью gp67 и C-концевой FLAG-меткой клонировали в pFastbac-1 и бакуловирус, полученный с использованием стандартных протоколов Bac-to-Bac™ (Life Technologies). Клетки Sf21 в количестве  $1 \times 10^6$  мл<sup>-1</sup> в среде Excell-420 (Sigma) при 27°C инфицировали при MOI 2 исходным вирусом P1 и супернатант собирали через 72 ч. Супернатант подвергали связыванию партиями в течение 1 ч при 4°C с аффинной агарозной смолой против FLAG M2 (Sigma), промывали PBS, а затем смолу переносили на колонку и тщательно промывали PBS. Белок элюировали с использованием 100 мг/мл пептида FLAG. Элюированный белок концентрировали до 2 мл и загружали в колонку S-200 Superdex (GE Healthcare) в PBS при 1 мл/мин. Фракции объемом 2 мл собирали и фракции, содержавшие белок нектин-4, концентрировали до 16 мг/мл.

Белок случайным образом биотинилировали в PBS с использованием реагента сульфо-NHS-LC-LC-биотин EZ-Link™ (Thermo Fisher) в соответствии с протоколом, предложенным изготовителем. Белок тщательно обессоливали для удаления не связанного биотина с использованием центрифужных колонок в PBS.

Для анализа связывания пептида использовали устройство Biacore 3000 с чипом CM5 (GE Healthcare). Стрептавидин иммобилизовывали на чипе с использованием стандартной химии присоединения аминов при 25°C с HBS-N (10 мМ HEPES, 0,15 М NaCl, pH 7,4) в качестве подвижного буфера. В кратком изложении поверхность из карбоксиметилдекстрана активировали посредством инжектирования в течение 7 мин соотношения 1:1 0,4 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорид (EDC)/0,1 М N-гидроксисукцинимид (NHS) при скорости потока 10 мкл/мин. Для улавливания стрептавидина белок разбавляли до 0,2 мг/мл в 10 мМ ацетате натрия (pH 4,5) и улавливали путем инжектирования 120 мкл стрептавидина на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали инжектированием в течение 7 мин 1 М этаноламина (pH 8,5) и биотинилированного нектин-4, уловленного на уровне 1200-1800 RU. Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20 и серию разведений пептидов получали в этом буфере с конечной концентрацией DMSO 0,5%. Максимальная концентрация пептида составляла 100 нМ с 6 дополнительными 2-кратными разведениями. Анализ с использованием SPR проводили при 25°C при скорости потока 50 мкл/мин с ассоциацией в течение 60 с и диссоциацией между 400 и 1200 с в зависимости от индивидуального пептида. В данные вносили поправку на эффекты объема после исключения DMSO. Для всех данных проводили двойное сравнение с инжектированием пустых растворов и эталонной поверхностью с использованием стандартных методик обработки, и обработку данных и кинетическую аппроксимацию проводили с использованием программного обеспечения Scrubber, версия 2.0c (BioLogic Software). Данные аппроксимировали с использованием простой модели связывания 1:1, допускающей эффекты переноса масс, когда это целесообразно.

Определенные пептидные лиганды по изобретению тестировали в упомянутых выше анализах свя-

звания нектин-4, и результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Данные о конкурентном связывании для отдельных пептидных лигандов по изобретению

Бицикл №	K <sub>i</sub> (мкМ)	Количество экспериментов
BCY8122	0,003	2
BCY8126	0,0027	6

Определенные бициклические пептиды по изобретению тестировали в упоминаемом выше анализе SPR, и результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Данные SPR для отдельных пептидных лигандов по изобретению

Бицикл №	Kd согласно SPR для человека (нМ)	n
BCY8122	0,89	1
BCY8126	1,07	4
BCY8116	0,372	1

n=среднее количество экспериментов

Определенные бициклические пептиды по изобретению конъюгировали с цитотоксическими средствами и тестировали в описанном выше анализе SPR, и результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Данные SPR для отдельных BDC по изобретению

Бициклический конъюгат лекарственного средства (BDC) №	Пептид	Kd согласно SPR для человека (нМ)
BCY8245	ММАЕ-РАВС-Cit-Val-глутарил-BCY8234	5,12 (n=4)
BCY8549	ММАЕ-РАВС-циклобутил-(B-Ala)-BCY8234	1,44 (n=1)

Исследования *in vivo*.

В каждом из примеров 1-5 и 9 для каждого исследования использовали следующую методологию:

Тестируемые и положительные контрольные образцы.

Номер	Физическое описание	Молекулярная масса	Чистота	Условия хранения
BCY8245	Лиофилизированный порошок	4173,85	99,60%	Хранение при -80°C
BCY8549	Лиофилизированный порошок	4157,81	95,70%	Хранение при -80°C

Экспериментальные способы и методики.

(i) Наблюдения.

Все процедуры, касающиеся содержания животных, ухода и лечения в испытания проводили в соответствии с руководством, одобренным Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) WuXi AppTec, в соответствии с руководством Международной ассоциацией оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC). В момент стандартного мониторинга животных каждый день проверяли в отношении каких-либо эффектов роста опухоли и лечения на нормальное поведение, такое как двигательная активность, употребление пищи и воды (только посредством осмотра), увеличение/снижение массы тела, потускнение глаз/шерсти и любой другой аномальный эффект, указанный в протоколе. Смерть и наблюдаемые клинические признаки регистрировали на основе количества животных в каждой подгруппе.

(ii) Измерение опухоли и конечные результаты.

Основным результатом был наблюдение, может ли быть замедлен рост опухоли или могут ли мыши быть вылечены. Объем опухоли измеряли три раза в неделю в двух измерениях с использованием толщиномера, и объем выражали в мм<sup>3</sup> с использованием формулы:  $V=0,5 \times a \times b^2$ , где a и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Затем размер опухоли использовали для вычисления величины T/C. Величина T/C (в процентах) является признаком противоопухолевой эффективности; T и C представляют собой средние объемы групп лечения и контроля, соответственно, в данный день.

TGI вычисляли для каждой группы с использованием формулы:  $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ; T<sub>i</sub> представляет собой средний объем опухоли в группе лечения в данный день, T<sub>0</sub> представляет собой средний объем опухоли в группе лечения в день начала лечения, V<sub>i</sub> представляет собой средний объем



опухоли в контрольной группе носителя в той же день с  $T_i$ , и  $V_0$  представляет собой средний объем опухоли в группе носителя в день начала лечения.

(iii) Статистический анализ.

Суммарная статистика, включая среднее значение и стандартную ошибку среднего значения (SEM), предоставлена для объема опухоли в каждой группе в каждый момент времени.

Статистический анализ различий в объеме опухоли среди групп проводили для данных, полученных в наилучший терапевтический момент времени после последней дозы.

Односторонний ANOVA проводили для сравнения объема опухоли среди групп, и, когда получали значимую F-статистику (соотношение дисперсии лечения и дисперсии ошибки), сравнения между группами проводили с использованием критерия Геймса-Ховелла. Все данные анализировали с использованием GraphPad Prism 5.0. Статистически значимым считали  $P < 0,05$ .

Пример 1. Тест эффективности *in vivo* BCY8245 при лечении мышей BALB/c nude с ксенотрансплантатом NCI-H292 (модель немелкоклеточного рака легкого (NSCLC)).

1. Задача исследования.

Задачей исследования была оценка противоопухолевой эффективности *in vivo*.

BCY8245 при лечении модельных мышей BALB/c nude с ксенотрансплантатом NCI-H292.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	3	--	10	<i>в/в</i>	Biw
2	BCY8245	3	1/3/5	10	<i>в/в</i>	qw
3	BCY8245	3	3 мг/кг	10	<i>в/в</i>	qw
4	BCY8245	3	3 мг/кг	10	<i>в/в</i>	biw
5	BCY8245	3	5 мг/кг	10	<i>в/в</i>	qw

Примечание: n: количество животных; объем дозирования: объем дозирования довели на основе массы тела из расчета 10 мкл/г.

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 18 мышей для BCY8245 плюс запасные;

поставщик животных: Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

3.1.2. Условия содержания.

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

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: Животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

3.2. Тестируемые и положительные контрольные образцы.

4. Способы и процедуры эксперимента.

4.1. Культивирование клеток.

Опухолевые клетки NCI-H292 поддерживают в среде, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивируют два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирают и подсчитывают для инокуляции опухоли.

4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышце инокулируют подкожно в правый бок опухолевые клетки NCI-H292 ( $10 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. Животных случайным образом распределяют на группы и лечение начинают,

когда средний объем опухоли достигает приблизительно 158-406 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в следующей таблице схемы эксперимента.

#### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	1	Растворить 1,61 мг BCY8245 в 1,604 мл буфера (носитель)
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 810 мкл буфера (носитель)
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 630 мкл буфера (носитель)
	0,5	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 450 мкл буфера (носитель)
Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	1	Растворить 10,56 мг BCY8245 в 10,518 мл гистидинового буфера
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 560 мкл гистидинового буфера

#### 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования проводили взятие плазмы через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин и 120 мин после последнего дозирования.

#### 5. Результаты.

##### 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривые роста опухоли представлены на фиг. 1 и 2.

##### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат NCI-H292, представлен в таблицах ниже:

Таблица 4

Регистрация объема опухоли с течением времени								
Лечение	0	2	4	7	9	11	14	16
Носитель, qw	410±77	516±69	627±61	931±141	1118±225	1208±257	1495±365	1743±419
BCY8245, 1/3/5 мг/кг, qw	404±65	391±42	542±14	721±136	762±115	607±95	614±89	626±93
Лечение	18	21	23	25	28	30	32	35
Носитель, qw	1950±551	2149±639						
BCY8245, 1/3/5 мг/кг, qw	611±93	654±152	732±139	755±132	713±114	762±165	968±290	1119±216

Лечение	Регистрация объема опухоли с течением времени						
	Сутки после начала лечения						
	0	2	4	7	9	11	14
Носитель, qw	161±2	270±14	357±14	448±17	570±16	720±36	948±61
BCY8245, 3 мг/кг, qw	160±5	220±11	266±15	218±23	167±10	161±36	149±43
BCY8245, 3 мг/кг, biw	162±13	243±19	211±12	101±11	100±8	87±7	65±3
BCY8245, 5 мг/кг, qw	160±9	176±7	191±3	105±8	82±3	91±14	83±8

### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для BCY8245 в модели с ксенотрансплантатом NCI-H292 на 14 сутки вычисляли на основе измерения объема опухоли.

Таблица 6

Лечение	Анализ ингибирования роста опухоли				Значение <i>P</i> по сравнению с носителем
	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)		
Носитель, qw	2149±639	--	--	--	
BCY8245, 1/3/5 мг/кг, qw	654±152	30,4	85,7	<i>p</i> <0,05	

a. Среднее значение ± SEM.

b. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

Таблица 7

Лечение	Анализ ингибирования роста опухоли				Значение <i>P</i> по сравнению с носителем
	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)		
Носитель, qw	948±61	--	--	--	
BCY8245, 3 мг/кг, qw	149±43	15,8	101,4	<i>p</i> <0,001	
BCY8245, 3 мг/кг, biw	65±3	6,9	112,2	<i>p</i> <0,001	
BCY8245, 5 мг/кг, qw	83±8	8,8	109,8	<i>p</i> <0,001	

a. Среднее значение ± SEM.

b. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

### 6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY8245 в модели с ксенотрансплантатом NCI-H292. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 1 и 2 и в таблицах 4-7.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 879 мм<sup>3</sup> на 14 сутки.

BCY8245 в дозе 1 мг/кг не обеспечивал значительной противоопухолевой активности, тестируемый образец продемонстрировал заметную противоопухолевую активность после увеличения дозировки до 3 мг/кг с 7 суток, однако эффективность далее не повышалась после увеличения дозировки до 5 мг/кг на 21 сутки. В этом исследовании все из протестированных животных продемонстрировали неизменное снижение массы тела в ходе режима дозирования, это может быть следствием опухолевой нагрузки и токсичности тестируемых образцов.

BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=149 мм<sup>3</sup>, TGI=101,4%, *p*<0,001), 3 мг/кг, biw (TV=65 мм<sup>3</sup>, TGI=112,2%, *p*<0,001) и 5 мг/кг, qw (TV=83 мм<sup>3</sup>, TGI=109,8%, *p*<0,001) имел значительную противоопухолевую активность.

Пример 2. Тест эффективности *in vivo* BCY7825, BCY8245, BCY8253, BCY8254 и BCY8255 при ле-

чении мышей лечение CB17-SCID с ксенотрансплантатом HT-1376 (модель рака мочевого пузыря)

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка противоопухолевой эффективности *in vivo* тестируемых образцов при лечении мышей CB17-SCID с ксенотрансплантатом HT-1376.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	3	--	10	в/в	qw
2	BCY8245	3	1/3 <sup>a</sup> мг/кг	10	в/в	qw
3	Носитель	5	--	10	в/в	qw
4	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	qw
5	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	biw
6	BCY8245	3	5 мг/кг	10	в/в	qw

1 мг/кг в течение первой недели и 3 мг/кг в течение последующих 2 недель.

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания

3.1.1. Животные

Вид: Mus Musculus;

линия: CB17-SCID;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 21-41 мышь плюс запасные;

поставщик животных: Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: Идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

4. Способы и процедуры эксперимента.

4.1. Культивирование клеток.

Клетки опухоли HT-1376 поддерживали *in vitro* в качестве культуры в виде монослоя в среде EMEM, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю посредством обработки трипсином-EDTA. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышке подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки HT-1376 ( $5 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS с матригелем (1:1) для формирования опухоли. Животных случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 153-164 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 810 мкл буфера (носитель)
BCY8245	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 630 мкл буфера (носитель)
Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 560 мкл гистидинового буфера

## 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования проводили взятие плазмы в группе 2 через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин и 120 мин после последнего дозирования. Взятие плазмы в группе 6 проводили через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин и 120 мин после последнего дозирования. Извлечение опухоли в группе 6 проводили через 2 ч после последнего дозирования. Извлечение опухоли в группах 4 и 5 проводили через 2 ч после последнего дозирования.

## 5. Результаты

## 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривые роста опухоли представлены на фиг. 3 и 4.

## 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей CB17-SCID, имеющих ксенотрансплантат NT-1376, представлен в таблицах 8 и 9.

Таблица 8

		Регистрация объема опухоли с течением времени									
Группа	Лечение	Сутки после начала лечения									
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Носитель, qw	168±37	220±47	274±56	391±73	442±75	503±82	576±84	649±81	801±84	884±81
2	BCY8245, 1/3 мг/кг, qw	164±16	184±12	206±14	265±21	291±10	281±28	335±16	354±11	309±19	347±14

Таблица 9

		Регистрация объема опухоли с течением времени							
Группа	Лечение	Сутки после начала лечения							
		0	2	5	7	9	12	14	
3	Носитель, qw	153±16	266±30	398±41	529±56	721±76	908±91	1069±90	
4	BCY8245, 3 мг/кг, qw	153±26	254±53	298±69	398±61	468±73	502±67	603±76	
5	BCY8245, 3 мг/кг, biw	154±30	248±58	203±15	273±45	356±50	391±53	407±53	
6	BCY8245, 5 мг/кг, qw	153±15	237±41	228±36	317±31	394±20	438±31	465±33	

## 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом NT-1376 вычисляли на основе измерения объема опухоли на 21 сутки после начала лечения

Таблица 10

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение <i>P</i> по сравнению с носителем
1	Носитель, qw	884±81	--	--	--
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	347±14	39,2	74,5	<i>p</i> <0,001

a. Среднее значение ± SEM.

б. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (Т/С).

Таблица 11

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>а</sup>	Т/С <sup>б</sup> (%)	TGI (%)	Значение <i>P</i> по сравнению с носителем
3	Носитель, qw	1069±90	--	--	--
4	BCY8245, 3 мг/кг, qw	603±76	56,4	50,9	<i>p</i> <0,01
5	BCY8245, 3 мг/кг, biw	407±53	38,1	72,3	<i>p</i> <0,001
6	BCY8245, 5 мг/кг, qw	465±33	43,5	66,0	<i>p</i> <0,001

а. Среднее значение ± SEM.

б. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (Т/С).

6. Обобщение и обсуждение результатов.

Группы 1 и 2.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом HT-1376. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 3 и в таблицах 8 и 10.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 884 мм<sup>3</sup> на 21 сутки. BCY8245 в дозе 1 мг/кг имел небольшую противоопухолевую активность, и лучшая эффективность была выявлена после увеличения дозировки до 3 мг/кг с 7 суток.

В этом исследовании некоторые мыши, которым вводили тестируемый образец в дозе 3 мг/кг, продемонстрировали снижение массы тела более 10%.

Группы 3-6.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом HT-1376. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 4 и в таблицах 9 и 11.

BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=603 мм<sup>3</sup>, TGI=50,9%, *p*<0,01), 3 мг/кг, biw (TV=407 мм<sup>3</sup>, TGI=72,3%, *p*<0,001) и 5 мг/кг, qw (TV=465 мм<sup>3</sup>, TGI=66,0%, *p*<0,001) имел значительную противоопухолевую активность.

В этом исследовании BCY8245 в дозе 5 мг/кг qw вызвал снижение массы тела у животных более 10% в ходе режима лечения.

Пример 3. Исследование эффективности *in vivo* BCY8245 при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом Panc2.13 (модель рака поджелудочной железы).

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом Panc2.13.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	5	--	10	в/в	qw
2	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	qw
3	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	biw
4	BCY8245	3	5 мг/кг	10	в/в	qw

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 41 мышь плюс запасные;

поставщик животных: Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

## 3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20–26°C.

Влажность 40–70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: Идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

## 4. Способы и процедуры эксперимента.

## 4.1. Культивирование клеток.

Опухолевые клетки Panc2.13 поддерживают в среде RPMI1640, дополненной 15% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой и 10 единиц/мл рекомбинантного инсулина человека, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивируют два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирают и подсчитывают для инокуляции опухоли.

## 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышке подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки Panc2.13 ( $5 \times 10^6$ ) с матригелем (1:1) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 41 животное случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 149 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

## 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахароза
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 560 мкл гистидинового буфера

## 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования опухоли во всех группах извлекали через 2 ч после последнего дозирования.

## 5. Результаты.

## 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 5.

## 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат Panc2.13, представлен в табл. 12.

Таблица 12

		Регистрация объема опухоли с течением времени						
Группа	Лечение	Сутки после начала лечения						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Носитель, qw	149±12	202±12	240±9	321±17	410±27	479±32	545±17
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	149±34	160±33	191±39	215±53	242±62	259±59	271±54
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	148±46	170±38	204±57	216±56	236±59	241±60	231±57
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	149±18	180±11	231±33	242±34	248±40	231±37	238±40

## 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом Panc2.13 вычисляли на основе измерения объема опухоли через 14 суток после начала лечения.

Таблица 13

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение <i>P</i> по сравнению с носителем
1	Носитель, qw	545±17	--	--	--
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	271±54	49,6	69,2	<i>p</i> <0,01
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	231±57	42,3	79,1	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	238±40	43,6	77,5	<i>p</i> <0,001

а. Среднее значение ± SEM.

б. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом Рапс2.13. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 5 и в таблицах 12 и 13.

BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=271 мм<sup>3</sup>, TGI=69,2%, *p*<0,01), 3 мг/кг, biw (TV=231 мм<sup>3</sup>, TGI=79,1%, *p*<0,001) и 5 мг/кг, qw (TV=238 мм<sup>3</sup>, TGI=77,5%, *p*<0,001) имел значительную противоопухолевую активность.

Пример 4. Исследование эффективности *in vivo* BCY8245 при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом MDA-MB-468 (модель рака молочной железы).

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности BCY8245 при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом MDA-MB-468.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	5	--	10	в/в	qw
2	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	qw
3	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	biw
4	BCY8245	3	5 мг/кг	10	в/в	qw

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 41 мышь плюс запасные;

поставщик животных: Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.



## 4. Способы и процедуры эксперимента.

## 4.1. Культивирование клеток.

Опухолевые клетки поддерживали в среде Лейбовитца L-15, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

## 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мыши подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки MDA-MB-468 ( $10 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS, дополненной 50% матригелем, для формирования опухоли. 41 животное случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 196 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

## 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	1	Растворить 10,56 мг BCY8245 в 10,518 мл гистидинового буфера
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 560 мкл гистидинового буфера

## 4.4. Взятие образцов.

На 21 сутки исследования проводили взятие плазмы в группе 2 через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин и 120 мин после последнего дозирования. Опухоли в группах 1 и 3 извлекали через 2 ч после последнего дозирования. Животных в группе 4 продолжали содержать в течение 21 суток без какого-либо дозирования и опухоли в этих группах извлекали на 42 сутки.

## 5. Результаты.

## 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 6.

## 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат MDA-MB-468, представлен в таблицах 14 и 15.

Таблица 14

Регистрация объема опухоли с течением времени (сутки с 0 по 21)

Группа	Лечение	Сутки после начала лечения									
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Носитель, qw	199±6	217±9	235±15	274±14	291±14	314±20	348±24	374±33	398±39	447±39
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	194±12	192±26	184±20	131±20	113±17	104±13	94±25	81±23	87±23	85±31
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	195±33	193±27	154±20	103±20	83±16	67±14	49±11	45±14	32±12	22±4
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	199±28	193±11	135±4	98±5	58±5	49±5	47±2	37±4	35±3	29±3

Таблица 15

Регистрация объема опухоли с течением времени (сутки с 23 по 42)

Группа	Лечение	Сутки после начала лечения						
		23	25	28	32	35	39	42
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	35±5	48±5	37±7	28±6	24±4	28±6	26±6

## 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели ксенотрансплантата MDA-MB-468 вычисляли на основе измерения объема опухоли на 21 сутки после начала лечения.

## Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение P по сравнению с носителем
1	Носитель, qw	447±39	--	--	--
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	85±31	18,9	144,2	p<0,001
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	22±4	4,9	169,8	p<0,001
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	29±3	6,6	168,4	p<0,001

а. Среднее значение ± SEM.

б. Ингибирование роста опухоли вычисляются путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом MDA-MB-468. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 6 и в таблицах 14-16.

BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=85 мм<sup>3</sup>, TGI=144,2%, p<0,001), 3 мг/кг, biw (TV=22 мм<sup>3</sup>, TGI=169,8%, p<0,001) и 5 мг/кг, qw (TV=29 мм<sup>3</sup>, TGI=168,4%, p<0,001) имел значительную противоопухолевую активность зависимым от дозы или частоты дозирования образом.

Дозирование в группах 5 мг/кг прекращали с 21 суток, опухоли не демонстрировали никакого рецидива в ходе мониторинга в течение дополнительных 3 недель.

Пример 5. Тест эффективности BCY8549 in vivo при лечении мышей BALB/c nude с ксенотрансплантатом NCI-H292 (модель немелкоклеточного рака легкого (NSCLC))

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности BCY8549 при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом NCI-H292.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	4	--	10	в/в	qw
2	BCY8549	3	3	10	в/в	qw

3. Материалы.

3.1 Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 43 мыши плюс запасные;

поставщик животных: Shanghai Lingchang Biotechnology Experimental Animal Co. Ltd.

3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 4 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер

группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

4. Способы и процедуры эксперимента.

4.1. Культивирование клеток.

Опухолевые клетки NCI-H292 поддерживали *in vitro* в качестве культуры в виде монослоя в среде RPMI-1640, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю посредством обработки трипсином-EDTA. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышке подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки NCI-H292 ( $10 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 43 животных случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 168 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

Получение состава тестируемого образца.

Лечение	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	--	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахароза
BCY8549	1	Растворить 2 мг BCY8549 посредством 1914 мкл буфера для носителя
BCY8549	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8549 посредством 560 мкл буфера для носителя

4.4. Взятие образцов.

В конце исследования проводили взятие плазмы мышей в группе 2 через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 1 ч и 2 ч после последнего дозирования.

5. Результаты.

5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 7.

5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат NCI-H292, представлен в табл. 17.

Таблица 17

		Регистрация объема опухоли с течением времени						
Группа	Лечение	Сутки после начала лечения						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Носитель,	168±1	297±4	362±5	460±6	548±6	697±10	843±15
	qw	6	8	8	2	9	2	2
2	BCY8549,	168±3	187±3	164±3	205±5	234±5	240±98	251±66
	3 мг/кг, qw	0	6	1	0	7		
3	BCY8550,	167±1	208±2	237±1	324±3	421±3	489±44	545±77
	3 мг/кг, qw	8	1	6	5	5		
4	BCY8783,	167±2	182±2	161±4	137±1	135±2	97±20	97±19
	3 мг/кг, qw	8	7	0	9	2		
5	BCY8784,	167±3	165±2	111±1	121±1	123±8	99±10	94±7
	3 мг/кг, qw	6	8	9	2			

5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом NCI-H292 вычисляли на основе измерения объема опухоли на 14 сутки после начала лечения.

Таблица 18

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем	T/C <sup>b</sup>	TGI	Значение P
		опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	(%)	(%)	
1	Носитель, qw	843±152	--	--	--
2	BCY8549, 3 мг/кг, qw	251±66	29,8	87,7	p<0,05

a. Среднее значение ± SEM.

б. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (Т/С).

6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность ВСУ в модели с ксенотрансплантатом NCI-H292. Измеренный объем опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлен на фиг. 7 и в таблицах 17 и 18.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 843 мм<sup>3</sup> на 14 сутки. ВСУ8549 в дозе 3 мг/кг продемонстрировал значительную противоопухолевую активность. В этом исследовании у всех мышей хорошо сохранялась масса тела.

Пример 6. Исследование ассоциации между варьированием числа копий (CNV) и экспрессией гена нектина-4 для множества типов опухолей.

Способы.

1. Выбрать все исследования на cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) и провести поиск для нектина-4.

(a) Удалить предварительные исследования.

(b) Отменить выбор исследований с перекрывающимися образцами для предотвращения смещения выборки (на основе предупреждения cBioPortal) - всегда оставлять исследования PanCancer, если есть такая возможность.

(c) Исследования, отобранные для анализа (табл. 19).

Таблица 19

Исследования, проанализированные из cBioPortal, и исследуемые элементы

Название исследование	Элементы
Рак молочной железы (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)	Экспрессия мРНК (микрочип)

Инвазивная карцинома молочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Карцинома эндометрия тела матки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Карцинома уротелия мочевого пузыря (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Плоскоклеточная карцинома шейки матки (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Плоскоклеточная карцинома легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (TCGA, PanCancer Atlas)	мРНК Expression, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома поджелудочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Карцинома щитовидной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома толстого кишечника (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Тимома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369

Саркома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома желудка (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома предстательной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Хромофобная аденокарцинома почки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома прямой кишки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Метастазирующий рак предстательной железы, SU2C/PCF Dream Team (Robinson <i>et al.</i> , Cell 2015)	Экспрессия/улавливание мРНК (RNA Seq RPKM)
Феохромоцитома и параганглиома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Светлоклеточная карцинома почки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома предстательной железы (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	Экспрессия мРНК
Аденокарцинома ободочной и прямой кишки (TCGA, Nature 2012)	RNA Seq RPKM
Серозная цистаденокарцинома яичника (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369

Папиллярная карцинома почки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Низкодифференцированная глиома головного мозга (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома пищевода (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Карцинома надпочечников (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Мультиформная глиобластома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома предстательной железы (MSKCC, Cancer Cell 2010)	Экспрессия мРНК
Карциносаркома матки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Острый миелоидный лейкоз (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Кожная меланома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Мезотелиома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Холангиокарцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Педиатрический острый лимфоидный лейкоз - фаза II (TARGET, 2018)	Нектин-4: экспрессия мРНК (RNA-Seq RPKM)
Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)

Atlas)	
Энциклопедия линий злокачественных клеток (Novartis/Broad, Nature 2012)	Экспрессия мРНК (микрочип)
Увеальная меланома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Педиатрическая опухоль Вильмса (TARGET, 2018)	Нектин-4: экспрессия мРНК (RNA-Seq RPKM)
Опухоли мужских половых клеток (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Печеночно-клеточная карцинома печени (TCGA, PanCancer Atlas)	Нектин-4: экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNASeqV2)

2. Экспортировать CNV и данные экспрессии РНК из cBioPortal.

3. Протестировать, ассоциированы ли CNV на значимых уровнях с изменениями экспрессии мРНК для нектин-4 (log<sub>2</sub> не применялся).

(a) Провести непараметрический тест Крускала-Уоллиса в GraphPad Prism (7.04) и R/R studio (порог для значимости:  $p < 0,01$ ).

(i) GraphPad Prism: создать таблицу из столбцов, провести непараметрический тест без подбора или формирования пар и не предполагая гауссово распределение.

(ii) Пакеты программ, используемые в R.

1. XLConnect.

2. dplyr.

3. Критерий суммы рангов Крускала-Уоллиса: критерий Крускала.

4. Внести поправку на множественные сравнения (включая все возможные сравнения, даже если  $n=1$  в пределах группы) в R/Rstudio с использованием критерия Данна (пороговое значение для значимости:  $p < 0,025$ ).

(a) критерий Данна со способом множественных сравнений = "bonferonni".

Результаты.

Результаты представлены в табл. 20 ниже. Среди 41 общедоступного набора данных TCGA, в которых описаны как данные CNV, так и данные экспрессии мРНК нектин-4 для опухолей, существует множество показаний, где были описаны случаи либо прироста числа копий нектин-4 (2-3 копии), либо их амплификации ( $>3$  копий). Кроме того, было продемонстрировано, что отдельные случаи имеют мелкие делеции ( $<2$  копий) с редкими сообщениями об опухолях, содержащих крупные делеции, соответствующие потере более чем 1 копии или биаллельной потере нектин-4. Сообщения об обнаружении амплификации наиболее часто были для рака молочной железы (10-22%), рака мочевого пузыря (20%), рака легкого (5-7%) и печеночно-клеточной карциномы (8%). Показаниями, где наиболее часто обнаруживалась амплификация, были хромобная опухоль почек (77%), светлоклеточная карцинома почки (RCC) (6,5%), саркома (10%), рак толстого кишечника (10%), рак головы и шеи (7%) и плоскоклеточный рак легкого. Эти данные указывают на то, что существует диапазон CNV в пределах и среди опухолевых показаний и разнообразии паттернов числа копий среди различных опухолей.

В дополнение к CNV в пределах набора данных TCGA средний уровень экспрессии мРНК нектин-4 на опухоль охватывает диапазон приблизительно  $2^{10}$ . Таким образом, учитывая диапазон уровней экспрессии мРНК нектин-4 и CNV, наблюдаемые среди и в пределах типов опухолей, проводили статистическое тестирование для идентификации потенциальных ассоциаций между уровнями нектин-4 мРНК и CNV для нектин-4 в пределах индивидуальных наборов данных/показаний TCGA. Опухоли в соответствии с показаниями относили к 1 из 5 классов:

a) крупная делеция;

b) мелкая делеция;

c) диплоидная;

d) прирост; или

e) амплификация.

Затем проводили тест Крускала-Уоллиса для определения того, различались ли распределения величин экспрессии мРНК на класс между классами ( $P < 0,01$ ). Для наборов данных TCGA с  $P < 0,01$  и для



идентификации того, какие классы отличались друг от друга, проводили апостериорное тестирование посредством вычисления Z-статистики с вычисленными скорректированными значениями P (Bonferonni). Для простоты интерпретации рассматривали попарные сравнения против диплоидных на показание (хотя были включены все значения P для попарных сравнений). 18/41 исследований TCGA удовлетворяли  $P < 0,01$  для теста Крускала-Уоллиса и  $P < 0,025$  для Бонферрони для сравнений прирост против диплоидного и/или амплификация против диплоидного, указывая на ассоциации увеличенной экспрессии мРНК нектин-4 мРНК с увеличенным количеством копий нектин-4. Эти 18 исследований соответствовали 14 независимым гистологиям опухоли:

молочной железы, матки, мочевого пузыря, аденокарциномы легкого, плоскоклеточной карциномы легкого, шейки матки, головы и шеи, поджелудочной железы, ободочной и прямой кишки, тимомы, саркомы, светлоклеточной карциномы почки (RCC) и желудка.

Кроме того, 6 исследований имели сниженную экспрессию мРНК, ассоциированную со снижением числа копий. Четыре из этих шести исследований не только продемонстрировали ассоциацию между снижением CNV и сниженной экспрессией, но также сообщили о увеличении CNV, ассоциированным с высокой экспрессией:

желудка, плоскоклеточный легкого, толстого кишечника и щитовидной железы. Между тем, для двух показаний, хромофобный рак почки и рак предстательной железы, описаны только ассоциации со снижением CNV и низким содержанием транскрипта. Кроме того, существовало отдельное исследование рака предстательной железы (метастазирующий рак предстательной железы, SU2C/PCF Dream Team (Robinson et al., Cell 2015)), которое показало прирост числа копий, ассоциированный с высокой экспрессией (относительно диплоидного).

Эти наблюдения снижения CNV в опухоли и увеличения уровней экспрессии мРНК могут отражать механизм для экспрессии белка нектин-4 в опухоли при тех показаниях, при которых наблюдались такие ассоциации. Очевидно, существуют показания, где CNV, по-видимому, не влияли на уровни экспрессии мРНК в прогнозируемом паттерне, такие как печеночно-клеточная карцинома. Было продемонстрировано, что доклиническая эффективность *in vivo* определенных бициклических конъюгатов лекарственного средства против нектин-4 коррелирует с экспрессией белка нектин-4 при определении посредством ИНС. Таким образом, если CNV нектин-4 в опухоли ассоциирован с уровнями мРНК и прогнозируемыми уровнями экспрессии белков, формально является возможным, что пациенты с опухолями, содержащими увеличение количества копий (прирост или амплификация), более вероятно могут отвечать на бициклические конъюгаты лекарственного средства против нектин-4 по изобретению. Если бы можно было идентифицировать пациентов с увеличенным CNV нектин-4, тогда эту информацию можно было бы использовать для выбора пациентов для лечения бициклическими конъюгатами лекарственного средства против нектин-4 по изобретению.

Таблица 20

Результаты исследования ассоциации между варьированием числа копией (CNV) и экспрессией гена для нектин-4

Название исследования	Элементы	Количество образцов/группа (n=X)					Критерий Крускала-Уоллиса		Попарное сравнение, Z-статистика (скорректированное значение p), Бонферрони			
		Крупная делеция	Мелкая делеция	Диплоидный	Прирост	Амплификация	Статистика Крускала-Уоллиса	Значение p	Крупная делеция - диплоидный	Диплоидный - мелкая делеция	Диплоидный - Прирост	Амплификация - диплоидный
Рак молочной железы (META BRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)	Экспрессия мРНК (микрочип)	0	11	745	706	404	380,4	< 2,2e-16	N/A	0,568782 (1,0000)	- 11,89096 (0,0000) *	18,85085 (0,0000)*

Инвазивная карцинома молочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	13	244	640	97	219,5	< 2,2e-16	N/A	1,186089 (0,7068)	- 12,30176 (0,0000) *	12,07 432 (0,0000)*
Карцинома эндометрия тела матки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	5	274	210	18	76,392	< 2,2e-16	N/A	1,130854 (0,7743)	- 7,274308 (0,0000) *	5,601 260 (0,0000)*
Карцинома уротели	RSEM (нормализованная по партиям из HiSeq_RNA SeqV2)	0	16	171	145	70	67,078	1,80E-14	N/A	0,060907 (1,0000)	- 3,323839 (0,0027)	8,054 269
я мочевого пузыря (TCGA, PanCancer Atlas)	париям из HiSeq_RNA SeqV2)										*	(0,0000)*
Аденокарцинома легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	9	129	332	33	59,578	7,24E-13	N/A	0,237200 (1,0000)	- 6,244156 (0,0000) *	6,247 228 (0,0000)*
Плоскоклеточная карцинома шейки матки (TCGA,	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	7	115	147	6	51,372	4,08E-11	N/A	1,093749 (0,8222)	- 6,170067 (0,0000) *	3,815 296 (0,0004)*

PanCancer Atlas)												
Плоская карцинома легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	22	199	222	23	42,128	3,77E-09	N/A	2,819759 (0,0144) *	- 3,034709 (0,0072) *	4,860 629 (0,0000)*
Плоская карцинома головы и шеи (TCGA, PanCancer Atlas)	мРНК Expression, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	32	330	122	4	37,81	3,10E-08	N/A	1,736867 (0,2472) *	- 4,848550 (0,0000) *	3,033 083 (0,0073)*
Аденокарцинома поджелудочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	7	105	50	6	36,863	4,92E-08	N/A	1,333193 (0,5474) *	- 4,388701 (0,0000) *	4,166 401 (0,0001)*
Карцинома щитовидной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	3	451	26	0	31,882	1,19E-07	N/A	2,486724 (0,0193) *	- 5,021279 (0,0000) *	N/A
Аденокарцинома толстого	RSEM (нормализованная по	0	40	266	80	2	31,309	7,32E-07	N/A	3,811621 (0,0004)	- 2,987223 (0,0084)	1,759 508

кишечника (TCGA, PanCancer Atlas)	партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)									*	*	(0,2355)	
Тимома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	0	95	22	2	26,213	2,03E-06	N/A	N/A	-	4,962115 (0,0000)*	1,567541 (0,1755)
Саркома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA	0	22	120	74	14	26,831	6,39E-06	N/A	-	0,410850 (1,0000)	4,582047 (0,0000)*	3,106262 (0,0057)*
	SeqV2 syn4976369												
Аденокарцинома желудка (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	11	253	134	9	19,096	0,0002611	N/A	2,835658 (0,0137)*	-	2,921683 (0,0104)*	-
Аденокарцинома предстательной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	3	15	437	29	3	19,125	0,0007426	-	2,532734 (0,0566)	3,202764 (0,0068)*	-	1,351661 (0,8824)

Хромофобная аденокарцинома почки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	50	14	1	0	13,851	0,0009823	N/A	3,609735 (0,0005)*	- 0,058395 (1,0000)	N/A
Аденокарцинома прямой кишки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	11	91	33	1	14,056	0,00283	N/A	1,050760 (0,8801)	- 2,951363 (0,0095)*	1,809 506 (0,2111)
Метастазирующий рак предстательной железы, SU2C/PanCF Dream Team (Robinson <i>et al.</i> , Cell 2015)	Экспрессия/улавливание мРНК (RNA Seq RPKM)	0	3	75	37	2	12,336	0,006317	N/A	0,040058 (1,0000)	- 3,420479 (0,0019)*	- 0,362 109 (1,0000)
Феохромоцитомы и параганглиома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	14	123	19	5	11,573	0,008998	N/A	- 1,271308 (0,6109)	- 2,597791 (0,0281)	2,201 970 (0,0830)
Светлоклеточная я	Экспрессия мРНК, RSEM	0	22	297	32	1	11,314	0,01014	N/A	- 0,748380 (1,0000)	- 2,996852 (0,0082)	1,502 464

карцинома почки (TCGA, PanCancer Atlas)	(нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)										*	(0,3989)
Аденокарцинома предстательной железы (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	Экспрессия мРНК	0	1	59	66	7	9,8842	0,01958	N/A	0,677737 (1,0000)	- 0,409530 (1,0000)	3,028793 (0,0074)*
Аденокарцинома ободочной и прямой кишки (TCGA,	RNA Seq RPKM	0	4	153	34	2	9,4054	0,02	N/A	0,062894 (1,0000)	- 1,860678 (0,1884)	2,514653 (0,0357)
Nature 2012)												
Серозная цистаденокарцинома яичника (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	7	75	117	2	9,3101	0,02544	N/A	1,589035 (0,3362)	- 2,168253 (0,0904)	0,062706 (1,0000)
Папиллярная карцинома почки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	1	19	239	15	0	9,1134	0,02782	1,607764 (0,3237)	- 0,569938 (1,0000)	- 2,552083 (0,0321)	N/A

Низкодифференцированная глиома головного мозга (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	11	462	32	2	4,769	0,1895	N/A	0,462462 (1,0000)	- (0,2569)	1,261960 (0,6209)
Аденокарцинома пищевода (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	8	78	86	9	4,267	0,234	N/A	0,747441 (1,0000)	- (0,768855)	1,756911 (0,2368)
Карцинома надпочечников (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	9	54	11	2	4,0298	0,2583	N/A	0,157281 (1,0000)	- (0,131234)	1,984800 (0,1415)
Мультиформная глиобластома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	3	115	27	0	2,6252	0,2691	N/A	0,180194 (1,0000)	- (0,1665)	N/A
Аденокарцинома предстательной железы (MSKCC, Cancer Cell 2010)	Экспрессия мРНК	0	3	78	4	0	2,181	0,3361	N/A	1,423206 (0,2320)	0,454433 (0,9743)	N/A
Карцинома матки (TCGA,	Экспрессия мРНК, нормализованная по	0	4	14	37	1	3,308	0,3465	N/A	0,104285 (1,0000)	- (0,539065)	1,764353 (0,23

PanCancer Atlas)	партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369											30)			
Острый миелоидный лейкоз (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	0	163	2	0	0,82638	0,3633	N/A	N/A	0,909052 (0,1817)	N/A			
Кожная меланома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	1	19	146	189	8	3,6483	0,4557	-	-	-	0,900287 (1,0000)			
	SeqV2 syn4976369														
Мезотелиома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	2	56	23	1	2,3747	0,4984	N/A	-	1,426445 (0,4612)	0,418206 (1,0000)	0,143440 (1,0000)		
Холангиокарцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	0	13	18	5	1,3058	0,5205	N/A	N/A	-	0,653051 (0,7706)	1,121055 (0,3934)		
Педиатрический острый	Нектин-4: экспрессия мРНК	0	4	66	10	1	2,2337	0,5253	N/A		0,133399 (1,0000)	-	0,504875 (1,0000)	-	1,375728



лимфоидный лейкоз - фаза II (TARGET, 2018)	(RNA-Seq RPKM)											(0,5067)
Диффузная крупноклеточная лимфома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	2	25	9	1	1,4939	0,6837	N/A	0,374642 (1,0000)	1,170326 (0,7256)	- 0,405844 (1,0000)
Эндокринный злокачественный	Экспрессия мРНК (микрочип)	1	112	396	319	49	1,9013	0,7539	- 0,398204 (1,0000)	0,562427 (1,0000)	- 0,847920 (1,0000)	- 0,379251 (1,0000)
клеток (Novartis/Broad, Nature 2012)												
Уvealная меланома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	0	72	8	0	0,067914	0,7944	N/A	N/A	- 0,260603 (0,3972)	N/A
Педиатрическая опухоль Вильмса (TARGET, 2018)	Нектин-4: экспрессия мРНК (RNA-Seq RPKM)	0	1	50	46	4	0,78538	0,853	N/A	0,165021 (1,0000)	- 0,815915 (1,0000)	- 0,090701 (1,0000)

Опухоль и мужских половых клеток (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, нормализованная по партиям/объединенная из Illumina HiSeq_RNA SeqV2 syn4976369	0	1	76	67	0	0,14279	0,9311	N/A	- 0,366969 (1,0000)	0,061216 (1,0000)	N/A
Печеночноклеточная карцинома печени (TCGA, PanCancer Atlas)	Нектин-4: экспрессия мРНК, RSEM (нормализованная по партиям из Illumina HiSeq_RNA SeqV2)	0	1	89	224	34	0,2908	0,9618	N/A	0,082418 (1,0000)	0,188961 (1,0000)	0,363 341 (1,0000)

Пример 7. Анализ экспрессии нектин-4 в 6 клеточных линиях.

1. Задача исследования.

Задачей исследования была оценка экспрессии нектин-4 в 6 клеточных линиях посредством точной цитометрии, включая 2 клеточных линии рака молочной железы (T-47D, MDA-MB-468), 3 клеточных линии рака легкого (NCI-H292, NCI-H322, NCI-H526) и 1 клеточную линию фибросаркомы (HT-1080)).

2. Схема панели.

Панель для FCM в T-47D, MDA-MB-468, NCI-H292, NCI-H322 и HT-1080.

Флуорохром	Пустой	Изотипический	Панель
PE	-	Изотипический контроль	Нектин-4

Панель для NCI-H526.

Флуорохром	Пустой	Изотипический	Панель
PE	-	Изотипический контроль	Нектин-4
BV421	Живые/погибшие	Живые/погибшие	Живые/погибшие

3. Материал.

3.1. Образец.

Перечень клеточных линий.

Положение	Клеточные линии	Тип злокачественной опухоли	Поставщик	Свойства культуры	Культуральная среда
1	T-47D	Рак молочной железы	ATCC-NTB-133	приклепляющаяся	RPMI-1640+0,2 единицы/мл бычьего инсулина+10%FBS
2	MDA-MB-468	Рак молочной железы	ATCC-NTB-132	Приклепляющаяся	Среда Лейбовитца L-15+10%FBS
3	NCI-H292	Легкого	91091815	Приклепляющаяся	RPMI-1640+10%FBS
4	NCI-H322	Легкого	95111734	Приклепляющаяся	RPMI-1640+2 мМ глутамин+10% FBS
5	NCI-H526	Легкого	CRL-5811	Округлые кластеры в суспензии	RPMI-1640+10%FBS
6	HT1080	Фибросаркома	ECACC-85111505	приклепляющаяся	EMEM+2 мМ глутамин+1% неосновные аминокислоты (NEAA)+10% FBS

### 3.2. Реагенты.

Антитела и набор для проточно-цитометрического анализа.

Флуоресценция	Маркер	Каталожный номер	Поставщик	Комментарий
PE	Нектин-4	FAB2659P	R&D	AAA00217021
PE	Изотипический контрольный IgG2b	IC0041P	R&D	От BICY-20161117A

DPBS (Corning-21-031-CV).

Буфер для окрашивания (eBioscience-00-4222).

Буфер для фиксации (BD-554655).

### 3.3. Устройства.

Центрифуга Eppendorf 5810R.

Проточный цитометр BD FACS Canto (BD).

### 4. Способы и процедуры эксперимента.

#### 4.1. Взятие образцов.

Собрать клеточные линии, растущие в экспоненциальной фазе роста. Подсчитать клетки посредством гемоцитометра с окрашиванием трипановым синим. Центрифугировать клетки при 400×g в течение 5 мин при 4°C, промыть клетки два раза буфером для окрашивания и суспендировать клетки в буфере для окрашивания до  $1 \times 10^7$ /мл.

#### 4.2. Окрашивание антителом.

1. Распределить аликвотами 100 мкл суспензии клеток в каждую лунку 96-луночного V-образного планшета.

2. Добавить изотипический контроль или антитела к суспензии клеток и инкубировать в течение 30 мин при 4°C в темноте.

3. Промыть клетки 2× посредством центрифугирования при 400×g в течение 5 мин при 4°C и слить супернатант.

4. Ресуспендировать клетки с 100 мкл фиксирующего буфера и инкубировать в течение 30 мин при 4°C в темноте.

5. Промыть клетки 2× посредством центрифугирования при 300×g в течение 5 мин при 4°C и удалить супернатант.

6. Ресуспендировать клетки в 400 мкл буфера для окрашивания.

7. Проанализировать данные FACS с использованием программного обеспечения FlowJo V10.

## 4.3. Анализ данных.

Все данные FACS анализировали посредством программного обеспечения Flowjo V10 и Graphpad Prism или программного обеспечения Excel.

## 5. Результаты.

## 5.1. Стратегия гейтирования для панели.

Стратегия гейтирования для нектин-4 представлена на фиг. 8-11.

## 5.2. Анализ данных.

## 5.2.1. Жизнеспособность клеточных линий.

Жизнеспособность клеточных линий была такой, как показано ниже.

№	Клеточная линия	Тип злокачественной опухоли	Жизнеспособность	Количество жизнеспособных клеток/ миллион
1	T-47D	Молочной железы	98,1	8,6
2	MDA-MB-468	Молочной железы	98,7	5,3
3	NCI-H292	Легкого	98,7	10,4
4	NCI-H322	Легкого	98,5	6,6
5	NCI-H526	Легкого	79,9	4,0
6	HT1080	Фибросаркома	98,0	14,7

## 5.2.2. Положительная экспрессия нектин-4 в клеточных линиях.

Положительная экспрессия и MFI нектин-4 в 6 клеточных линиях соответствовала перечню.

№	Клеточная линия	Нектин-4	MFI-изотипический	MFI-панель
1	T-47D	99,0%	132	1808
2	MDA-MB-468	99,0%	184	2324
3	NCI-H292	97,9%	180	729
4	NCI-H322	99,1%	145	1655
5	NCI-H526	0,21%	104	91,3
6	HT1080	1,53%	134	134

## 6. Обсуждение.

Экспрессия нектин-4 была высокой в клетках рака молочной железы T-47D (99,0%), MDA-MB-468 (99,0%) и клетках рака легкого NCI-H292 (97,9%), NCI-H322 (99,1%). В NCI-H526 и HT-1080, не было обнаружено экспрессии нектин-4.

Пример 8. Анализ экспрессии нектин-4 в 9 клеточных линиях CDX посредством проточной цитометрии

## 1. Задача исследования.

Задачей этого проекта является оценка поверхностной экспрессии нектин-4 (PVRL-4) в 9 клеточных линиях, включая 1 клеточную линию рака молочной железы (MDA-MB-468), 4 клеточных линии рака легкого (NCI-H292, NCI-H358, NCI-H526, A549), 1 клеточную линию рака поджелудочной железы (Panc02.13), 2 клеточных линии рака ободочной и прямой кишки (HCT-116, HT-29) и 1 клеточную линию рака мочевого пузыря (HT1376).

## 2. Схема панели.

Панель для FCM в 9 клеточных линиях.

Флуорохром	Пустой	Изотипический	Панель
PE	-	Изотипический контрольный IgG2b	Нектин-4
BV421	Живые/погибшие	Живые/погибшие	Живые/погибшие

## 3. Материалы.

## 3.1. Образцы.

Перечень клеточных линий

Пол оже ние	Клеточная линия	Тип злокачес твенной опухоли	Поставщик	Свойства культуры	Культуральная среда
1	HT1376	Мочевых пузыря	ATCC-CRL- 1472	Прикрепля ющаяся	EMEM+10% FBS
2	MDA-MB- 468	Молочно й железы	ATCC-HTB-132	Прикрепля ющаяся	Лейбовитца L- 15+10%FBS
3	HCT-116	Ободочно й и прямой кишки	ATCC-CCL-247	Прикрепля ющаяся	RPMI 1640+10% FBS
4	HT-29	Ободочно й и прямой кишки	ATCC-HTB-38	Прикрепля ющаяся	МакКоя 5a+10% FBS
5	A549	Легкого	ATCC-CCL-185	Прикрепля ющаяся	F-12K+10% FBS
6	NCI-H292	Легкого	ECACC-	Суспензио нная	RPMI 1640+10% FBS
			91091815	нная	
7	NCI-H358	Легкого	ECACC- 95111733	Прикрепля ющаяся	RPMI 1640+10% FBS
8	NCI-526	Легкого	ATCC-CRL- 5811	Прикрепля ющаяся	RPMI 1640+10% FBS
9	Panc02.13	Поджелу дочной железы	ATCC-CRL- 2554	прикрепля ющаяся	RPMI-1640+15% FBS+5 мкг/мл инсулина человека

## 3.2. Реагенты.

1. DPBS (Corning, 21-031-CV).
2. Трипсин 0,25% (Invitrogen- 25200072).
3. Буфер для окрашивания (eBioscience, 00-4222).
4. Буфер для фиксации (BD, 554655).
5. Антитело.

Флуоресценция	Маркер	Каталожны й номер	Поставщик	Комментарий
PE	Нектин-4	FAB2659P	R&D	AAAA0217021
PE	IgG2b мыши	IC0041P	R&D	
BV421	Живые/погибшие	L34964	Invitrogen	-

## 3.3. Устройства.

Центрифуга Eppendorf 5810R.

Проточный цитометр BD FACS Canto (BD).

## 4. Способы и процедуры эксперимента.

## 4.1. Культивирование клеток.

Размораживание клеток.

1. Очистить замороженные флаконы 70% спиртом и быстро разморозить флаконы на водяной бане при 37°C.

2. Центрифугировать суспензию клеток при приблизительно 1000 об/мин в течение 5 мин, удалить супернатант и добавить предварительно нагретую среду во флаконы.

3. Инкубировать культивируемые флаконы в инкубаторе при 37°C, с 5% CO<sub>2</sub>.

Пассирование клеток.

1. Нагреть среду и трипсин на водяной бане при 37°C.

2. Удалить культуральную среду и ополоснуть клеточный слой DPBS.

3. Добавить 5 мл 0,25% раствора трипсина в колбу и разбавить трипсин 5 мл среды.

4. Центрифугировать суспензию клеток при 1000 об/мин в течение 5 мин.

5. Добавить 15 мл свежей среды и ресуспендировать клетки посредством осторожного пипетирова-

ния.

6. Добавить соответствующую суспензию клеток в новые культуральные флаконы.

7. Инкубировать культуральные флаконы в инкубаторе при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

4.2. Взятие образцов.

Собрать клеточные линии, растущие в экспоненциальной фазе роста. Подсчитать клетки с окрашиванием трипановым синим. Центрифугировать клетки при 400×g в течение 5 мин при 4°C, промыть клетки два раза буфером для окрашивания и суспендировать клетки в буфере для окрашивания до 5×10<sup>6</sup>/мл.

4.3. Окрашивание антителом.

Распределить аликвотами 100 мкл суспензии клеток в каждую лунку 96-луночного V-образного планшета. Добавить изотипический контроль или антитела к суспензии клеток и инкубировать в течение 30 мин при 4°C в темноте. Промыть клетки 2 раза посредством центрифугирования при 400×g в течение 5 мин при 4°C и слить супернатант. Ресуспендировать клетки в 300 мкл буфера для окрашивания. Проанализировать данные FACS с использованием программного обеспечения Flow Jo V10.

4.4. Анализ данных.

Все данные FACS анализировали посредством программного обеспечения Flowjo V10 и Graphpad Prism или программного обеспечения Excel. 5.

Результаты.

5.1. Стратегия гейтирования для панели.

Стратегия гейтирования для нектин-4 представлена на фиг. 12-16.

5.2. Анализ данных.

Положительная экспрессия и MFI нектин-4 в 9 клеточных линиях соответствовала перечню.

№	Клеточная линия	Нектин-4	MFI-изотипический	MFI-панель
1	HT1376	92,4%	36,2	803
2	MDA-MB-468	97,1%	28,9	460
3	HCT-116	1,85%	14,5	15,6
4	HT-29	40,0%	20,5	88,3
5	A549	1,07%	20,5	21,6
6	NCI-H292	71,1%	22,9	149
7	NCI-H358	90,1%	26,5	361
8	NCI-526	1,22%	8,33	12,1
9	Panc02.13	51,9%	36,2	128

6. Обсуждение.

Экспрессия нектин-4 была высокой в клеточной линии рака мочевого пузыря HT-1376 (92,4%), рака молочной железы MDA-MB-468 (97,1%) и рака легкого NCI-H358 (90,1%). Экспрессия нектин-4 была умеренной в клеточных линиях HT-29 (40,0%), NCI-H292 (71,1%) и Panc02.13 (51,9%). В HCT-116, A549 и NCI-526 не было обнаружено экспрессии нектин-4. Эти данные также можно использовать в качестве ориентира для выбора модели для исследований эффективности.

Пример 9. Исследования эффективности *in vivo*.

Пример 9.1. Исследование эффективности *in vivo* тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом A549.

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом A549.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	5	--	10	в/в	Qw
2	VCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	qw
3	VCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	biw
4	VCY8245	3	5 мг/кг	10	в/в	qw

3. Материалы.

Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;  
 пол: самки;  
 масса тела: 18-22 г;  
 Количество животных: 41 мышь плюс запасные.

### 3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах. 4. Способы и процедуры эксперимента

### 4.1. Культивирование клеток.

Опухолевые клетки A549 поддерживали *in vitro* в качестве культуры в виде монослоя в среде F-12K, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю посредством обработки трипсином-EDTA. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

### 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышце подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки A549 ( $5 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 41 животных случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 158 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахараза
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 560 мкл гистидинового буфера

### 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования опухоли всех групп извлекали через 2 ч после последнего дозирования.

## 5. Результаты.

### 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 17.

### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат A549, представлен в табл. 21.

Таблица 21

		Регистрация объема опухоли с течением времени						
Групп	Лечение	Сутки после начала лечения						
		0	2	5	7	9	12	14
1	Носитель, qw	158±13	235±24	278±26	346±39	387±35	471±45	568±49
2	BCY8245,	157±10	208±15	197±25	257±40	293±41	341±54	356±53

3 мг/кг, qw								
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	157±14	183±27	158±16	184±6	182±8	190±15	194±27
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	157±14	179±22	147±10	172±23	173±24	204±36	228±33

### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом A549 вычисляли на основе измерения объема опухоли на 14 сутки после начала лечения.

Таблица 22

Анализ ингибирования поста опухоли						
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение <i>P</i> по сравнению с носителем	по с
1	Носитель, qw	568±49	--	--	--	
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	356±53	62,8	51,4	<i>p</i> <0,05	
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	194±27	34,2	90,8	<i>p</i> <0,001	
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	228±33	40,2	82,6	<i>p</i> <0,001	

а. Среднее значение ± SEM.

б. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

### 6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом A549. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 17 и в таблицах 21 и 22.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 568 мм<sup>3</sup> на 14 сутки. BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=356 мм<sup>3</sup>, TGI=51,4%, *p*<0,05), 3 мг/кг, biw (TV=194 мм<sup>3</sup>, TGI=90,8%, *p*<0,01) и 5 мг/кг, qw (TV=228 мм<sup>3</sup>, TGI=82,6%, *p*<0,001) имел значительную противоопухолевую активность зависимым от дозы или частоты дозирования опухоли.

У животных в группах BCY8245 хорошо сохранялась масса тела. В этой клеточной линии, которая демонстрирует минимальную экспрессию нектин-4 в исследованиях

FACS, рост опухоли сдерживался посредством BCY8245, однако не происходила регрессия опухоли, подтверждая, что для оптимальной эффективности требуется опосредование мишенью.

Пример 9.2: Исследование эффективности *in vivo* тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом HCT116

#### 1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка противоопухолевой эффективности *in vivo* тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом HCT116.

#### 2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	5	--	10	в/в	qw
2	BCY8245	3	3	10	в/в	qw
3	BCY8245	3	3	10	в/в	biw
4	BCY8245	3	5	10	в/в	qw

### 3. Материалы.

#### 3.1. Животные и условия содержания.

##### 3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 41 мышь плюс запасные.

##### 3.1.2. Условия содержания.



Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

#### 4. Способы и процедуры эксперимента.

##### 4.1. Культивирование клеток.

Клетки НСТ116 поддерживали в среде, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

##### 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мыши подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки НСТ116 ( $5,0 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 41 животное случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 166 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

##### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 560 мкл гистидинового буфера

##### 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования на 14 сутки опухоли из групп 1 и 2 извлекали для FFPE. Для группы 4 проводили взятие плазмы через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин и 120 мин после дозирования. Опухоли также извлекали и хранили при -80°C.

#### 5. Результаты.

##### 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 18.

##### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат НСТ116, представлен в табл. 23.

Таблица 23

Регистрация объема опухоли с течением времени		Сутки после начала лечения						
Группа	Лечение	0	2	4	7	9	12	14
1	Носитель, qw	166±12	219±21	323±29	397±28	488±36	630±49	769±71
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	167±11	209±13	227±17	269±33	324±39	348±27	425±28
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	166±18	229±40	215±42	213±49	213±48	206±55	197±50
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	166±35	201±42	176±15	183±17	170±16	125±18	134±12

##### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом

НСТ116 вычисляли на основе измерения объема опухоли на 14 сутки после начала лечения.

Таблица 24

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение P
1	Носитель, qw	769±71	--	--	--
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	425±28	55,2	57,1	p<0,001
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	197±50	25,6	94,9	p<0,001
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	134±12	17,4	105,2	p<0,001

a. Среднее значение ± SEM.

b. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом НСТ116. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 18 и в таблицах 23 и 24.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 769 мм<sup>3</sup> на 14 сутки после начала лечения. BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=425 мм<sup>3</sup>, TGI=57,1%, p<0,001), 3 мг/кг, biw (TV=197 мм<sup>3</sup>, TGI=94,9%, p<0,001) и 5 мг/кг, qw (TV=134 мм<sup>3</sup>, TGI=105,2%, p<0,001) имел значительную противоопухолевую активность зависимым от дозы или частоты дозирования образом.

В этом исследовании животные во всех группах 5 мг/кг qw теряли в среднем более 10% массы тела.

В этой клеточной линии, которая демонстрирует минимальную экспрессию нектин-4 в исследованиях FACS, рост опухоли сдерживался посредством BCY8245, однако не происходила регрессия опухоли, подтверждая, что для оптимальной эффективности требуется опосредование мишенью.

Пример 9.3. Исследование эффективности in vivo тестируемых образцов при лечении мышей CB17-SCID с ксенотрансплантатом НТ-1376.

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка противоопухолевой эффективности in vivo тестируемых образцов при лечении мышей CB17-SCID с ксенотрансплантатом НТ-1376.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	5	--	10	в/в	qw
2	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	qw
3	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	biw
4	BCY8245	3	5 мг/кг	10	в/в	qw

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: CB17-SCID;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 41 мышь плюс запасные.

3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

#### 4. Способы и процедуры эксперимента.

##### 4.1. Культивирование клеток.

Клетки опухоли HT-1376 поддерживают в среде EMEM, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивируют два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирают и подсчитывают для инокуляции опухоли.

##### 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мыши подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки HT-1376 ( $5 \times 10^6$ ) с матригелом (1:1) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 41 животное случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 153 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

##### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 mM гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 560 мкл гистидинового буфера

##### 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования проводили взятие плазмы в группе 4 через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин и 120 мин после последнего дозирования. Опухоль в группе 4 извлекали через 2 ч после последнего дозирования. Опухоль в группах 1, 2 и 3 извлекали через 2 ч после последнего дозирования.

#### 5. Результаты.

##### 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 19.

##### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей CB17-SCID, имеющих ксенотрансплантат HT-1376, представлен в табл. 25.

Таблица 25

		Регистрация объема опухоли с течением времени						
Группа	Лечение	Сутки после начала лечения						
		0	2	5	7	9	12	14
1	Носитель, qw	153±1	266±3	398±4	529±5	721±7	908±9	1069±9
		6	0	1	6	6	1	0
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	153±2	254±5	298±6	398±6	468±7	502±6	603±76
		6	3	9	1	3	7	
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	154±3	248±5	203±1	273±4	356±5	391±5	407±53
		0	8	5	5	0	3	
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	153±1	237±4	228±3	317±3	394±2	438±3	465±33
		5	1	6	1	0	1	

##### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом HT-1376 вычисляли на основе измерения объема опухоли на 14 сутки после начала лечения.

Таблица 26

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение <i>P</i> по сравнению с носителем
1	Носитель, qw	1069±90	--	--	--
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	603±76	56,4	50,9	<i>p</i> <0,01
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	407±53	38,1	72,3	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	465±33	43,5	66,0	<i>p</i> <0,001

#### 6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом HT-1376. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 19 и в таблицах 25 и 26.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 1069 мм<sup>3</sup> на 14 сутки. BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=603 мм<sup>3</sup>, TGI=50,9%, *p*<0,01), 3 мг/кг, biw (TV=407 мм<sup>3</sup>, TGI=72,3%, *p*<0,001) и 5 мг/кг, qw (TV=465 мм<sup>3</sup>, TGI=66,0%, *p*<0,001) обеспечивал значительную противоопухолевую активность. В этом исследовании BCY8245 в дозе 5 мг/кг qw вызывал снижение массы тела, составляющее 10% массы тела животного, в ходе режима лечения.

Пример 9.4. Исследование эффективности *in vivo* тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатами MDA-MB-468.

#### 1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом MDA-MB-468.

#### 2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	5	--	10	в/в	qw
2	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	qw
3	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	biw
4	BCY8245	3	5 мг/кг	10	в/в	qw

#### 3. Материалы.

##### 3.1. Животные и условия содержания.

##### 3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 41 мышь плюс запасные.

##### 3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

#### 4. Способы и процедуры эксперимента.

##### 4.1. Культивирование клеток.

Опухолевые клетки поддерживали в среде Лейбовитца L-15, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

#### 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышке подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки MDA-MB-468 ( $10 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS, дополненном 50% матригелем, для формирования опухоли. 41 животных случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 196 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

#### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахароза
BCY8245	1	Растворить 10,56 мг BCY8245 в 10,518 мл гистидинового буфера
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 560 мкл гистидинового буфера

#### 4.4. Взятие образцов.

На 21 сутки исследования проводили взятие плазмы в группе 2 через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 60 мин и 120 мин после последнего дозирования. Опухоли в группах 1 и 3 извлекали через 2 ч после последнего дозирования. Животных в группе 4 продолжали содержать в течение дополнительных 21 суток без какого-либо дозирования, и опухоли в этих группах извлекали на 42 сутки.

#### 5. Результаты.

##### 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 20.

##### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат MDA-MB-468, представлен в таблице 27 и 28.

##### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом MDA-MB-468 вычисляли на основе измерения объема опухоли на 21 сутки после начала лечения.

Таблица 27

Регистрация объема опухоли с течением времени (сутки с 0 по 21)

Группа	Лечение	Сутки после начала лечения									
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Носитель, qw	199±6	217±9	235±15	274±14	291±14	314±20	348±24	374±33	398±39	447±39
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	194±12	192±26	184±20	131±20	113±17	104±13	94±25	81±23	87±23	85±31
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	195±33	193±27	154±20	103±20	83±16	67±14	49±11	45±14	32±12	22±4
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	199±28	193±11	135±4	98±5	58±5	49±5	47±2	37±4	35±3	29±3

Таблица 28: Регистрация объема опухоли с течением времени (сутки с 23 по 42)

Группа	Лечение	Сутки после начала лечения						
		23	25	28	32	35	39	42
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	35±5	48±5	37±7	28±6	24±4	28±6	26±6

Таблица 29

## Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение <i>P</i> по сравнению с носителем
1	Носитель, qw	447±39	--	--	--
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	85±31	18,9	144,2	<i>p</i> <0,001
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	22±4	4,9	169,8	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	29±3	6,6	168,4	<i>p</i> <0,001

а. Среднее значение ± SEM.

б. Ингибирование роста опухоли вычисляются путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом MDA-MB-468. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 20 и в таблице 27-29.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 447 мм<sup>3</sup> на 21 сутки. BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=85 мм<sup>3</sup>, TGI=144,2%, *p*<0,001), 3 мг/кг, biw (TV=22 мм<sup>3</sup>, TGI=169,8%, *p*<0,001) и 5 мг/кг, qw (TV=29 мм<sup>3</sup>, TGI=168,4%, *p*<0,001) имел значительную противоопухолевую активность зависимым от дозы или частоты дозирования образом.

Дозирование в группах 5 мг/кг прекращали с 21 сутки, опухоли не демонстрировали никакого рецидива в ходе мониторинга в течение дополнительных 3 недель. В этой клеточной линии, которая демонстрирует высокую экспрессию нектин-4 в исследованиях FACS, BCY8245 вызывает регрессию опухоли, подтверждая определяемую мишенью природу оптимальной эффективности.

Пример 9.5. Исследование эффективности *in vivo* тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом NCI-H292.

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом NCI-H292.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	5	--	10	в/в	qw
2	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	qw
3	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	biw
4	BCY8245	3	5 мг/кг	10	в/в	qw

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 41 мышь плюс запасные.

3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

#### 4. Способы и процедуры эксперимента.

##### 4.1. Культивирование клеток.

Опухолевые клетки NCI-H292 поддерживали *in vitro* в качестве культуры в виде монослоя в среде RPMI-1640, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю посредством обработки трипсином-EDTA. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

##### 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышши подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки NCI-H292 ( $10 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 41 животное случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 162 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

##### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	1	Растворить 10,56 мг BCY8245 в 10,518 мл гистидинового буфера
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 560 мкл гистидинового буфера

##### 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования опухоль во всех группах извлекали через 2 ч после последнего дозирования.

#### 5. Результаты.

##### 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 21.

##### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат NCI-H292, представлен на фиг. 30.

Таблица 3

Регистрация объема опухоли с течением времени

Группа	Лечение	Сутки после начала лечения						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Носитель, qw	161±2	270±1	357±1	448±1	570±1	720±3	948±6
		4	4	7	6	6	1	
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	160±5	220±1	266±1	218±2	167±1	161±3	149±4
		1	5	3	0	6	3	
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	162±1	243±1	211±1	101±1	100±8	87±7	65±3
		3	9	2	1			
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	160±9	176±7	191±3	105±8	82±3	91±14	83±8

##### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом NCI-H292 вычисляли на основе измерения объема опухоли через 14 суток после начала лечения.

Таблица 31

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение <i>P</i> по сравнению с носителем
1	Носитель, qw	948±61	--	--	--
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	149±43	15,8	101,4	<i>p</i> <0,001
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	65±3	6,9	112,2	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	83±8	8,8	109,8	<i>p</i> <0,001

a. Среднее значение ± SEM.

b. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом NCI-H292. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 21 и в таблицах 30 и 31.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 948 мм<sup>3</sup> на 14 сутки. BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=149 мм<sup>3</sup>, TGI=101,4%, *p*<0,001), 3 мг/кг, biw (TV=65 мм<sup>3</sup>, TGI=112,2%, *p*<0,001) и 5 мг/кг, qw (TV=83 мм<sup>3</sup>, TGI=109,8%, *p*<0,001) имел значительную противоопухолевую активность.

Все из тестируемых образцов в дозе 3 мг/кг, qw, 3 мг/кг, biw и 5 мг/кг, qw продемонстрировали сравнимую противоопухолевую активность, эффективность не повышалась далее при увеличении дозировки или частоты дозирования.

В этом исследовании у мышей во всех группах хорошо сохранялась масса тела.

В этой клеточной линии, которая демонстрирует высокую экспрессию нектин-4 в исследованиях FACS, BCY8245 вызывает регрессию опухоли, подтверждая определяемую мишенью природу оптимальной эффективности.

Пример 9.6. Исследование эффективности *in vivo* тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом NCI-H526

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом NCI-H526.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	3	--	10	в/в	qw
2	BCY8245	3	3	10	в/в	qw
3	BCY8245	3	3	10	в/в	biw
4	BCY8245	3	5	10	в/в	qw

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 21 мышь плюс запасные.

3.1.2. Условия содержания

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

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.



Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: Идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

#### 4. Способы и процедуры эксперимента.

##### 4.1. Культивирование клеток.

Клетки NCI-H526 поддерживали в среде, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

##### 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышши подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки NCI-H526 ( $5,0 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 21 животное случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 181 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

##### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 560 мкл гистидинового буфера

##### 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования на 14 сутки все опухоли извлекали для FFPE.

#### 5. Результаты.

##### 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 22.

##### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат NCI-H526, представлен в табл. 32.

Таблица 32

Регистрация объема опухоли с течением времени

Группа	Лечение	Сутки после начала лечения						
		0	2	4	7	9	12	14
1	Носитель,	181±3	262±5	431±9	563±72	729±11	1076±15	1365±20
	qw	2	6	0		5	5	8
2	BCY8245,	180±3	256±5	403±7	545±68	657±83	1019±15	1205±79
	3 мг/кг, qw	2	1	2			5	
3	BCY8245,	182±4	232±4	308±7	440±11	530±12	810±197	1109±25
	3 мг/кг, biw	3	9	9	2	1		0
4	BCY8245,	180±5	209±6	236±7	383±11	375±11	365±79	476±103
	5 мг/кг, qw	2	6	2	9	5		

##### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом NCI-H526 вычисляли на основе измерения объема опухоли на 14 сутки после начала лечения.

Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение P
1	Носитель, qw	1365±208	--	--	--
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	1205±79	88,3	13,4	p>0,05
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	1109±250	81,3	21,6	p>0,05
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	476±103	34,9	75,0	p<0,01

a. Среднее значение ± SEM.

b. Ингибирование роста опухоли вычисляются путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом NCI-H526. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 22 и в таблицах 32 и 33.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 1365<sup>3</sup> на 14 сутки после начала лечения. BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=1205 мм<sup>3</sup>, TGI=13,4%, p> 0,05) и 3 мг/кг, biw (TV=1109 мм<sup>3</sup>, TGI=21,6%, p>0,05) продемонстрировал небольшую противоопухолевую активность, BCY8245 в дозе 5 мг/кг, qw (TV=476 мм<sup>3</sup>, TGI=75,0%, p<0,01) продемонстрировал значительную противоопухолевую активность. В этом исследовании BCY8245 в дозе 5 мг/кг biw вызвал снижение массы тела более чем на 10% массы тела животного. В этой клеточной линии, которая демонстрирует минимальную экспрессию нектин-4 в исследованиях FACS, рост опухоли сдерживался посредством BCY8245, однако не происходила регрессия опухоли, подтверждая опосредование мишенью оптимальной эффективности.

Пример 9.7: Исследование эффективности in vivo тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude, с ксенотрансплантатом Panc2.13

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом Panc2.13.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	5	--	10	в/в	qw
2	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	qw
3	BCY8245	3	3 мг/кг	10	в/в	biw
4	BCY8245	3	5 мг/кг	10	в/в	qw

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 41 мышь плюс запасные.

3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 3 или 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую

информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

#### 4. Способы и процедуры эксперимента.

##### 4.1. Культивирование клеток.

Опухолевые клетки Рапс2.13 поддерживают в среде RPMI1640, дополненной 15% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, и 10 единиц/мл рекомбинантного инсулина человека при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивируют два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирают и подсчитывают для инокуляции опухоли.

##### 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышке подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки Рапс2.13 ( $5 \times 10^6$ ) с матригелем (1:1) в 0,2 мл PBS для развития опухоли. 41 животное случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 149 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

##### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	25 мМ гистидин, pH, 7 10% сахароза
BCY8245	0,5	Разбавить 400 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 400 мкл гистидинового буфера
BCY8245	0,3	Разбавить 240 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 560 мкл гистидинового буфера

##### 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования опухоли во всех группах извлекали через 2 ч после последнего дозирования.

#### 5. Результаты.

##### 5.1. Кривые роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 23.

##### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат Рапс2.13, представлен в табл. 34.

Таблица 34

Регистрация объема опухоли с течением времени		Сутки после начала лечения						
Группа	Лечение	0	2	4	7	9	11	14
1	Носитель, qw	149±12	202±12	240±9	321±17	410±27	479±32	545±1
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	149±34	160±33	191±39	215±53	242±62	259±59	271±5
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	148±46	170±38	204±57	216±56	236±59	241±60	231±5
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	149±18	180±11	231±33	242±34	248±40	231±37	238±4
								0

##### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом Рапс2.13 вычисляли на основе измерения объема опухоли через 14 суток после начала лечения.

Таблица 35

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение P по сравнению с

носителем					
1	Носитель, qw	545±17	--	--	--
2	BCY8245, 3 мг/кг, qw	271±54	49,6	69,2	p<0,01
3	BCY8245, 3 мг/кг, biw	231±57	42,3	79,1	p<0,001
4	BCY8245, 5 мг/кг, qw	238±40	43,6	77,5	p<0,001

а. Среднее значение ± SEM.

б. Ингибирование роста опухоли вычисляются путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (Т/С).

6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом Paпс2.13. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 23 и в таблицах 34 и 35.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 545 мм<sup>3</sup> на 14 сутки. BCY8245 в дозе 3 мг/кг, qw (TV=271 мм<sup>3</sup>, TGI=69,2%, p<0,01), 3 мг/кг, biw (TV=231 мм<sup>3</sup>, TGI=79,1%, p<0,001) и 5 мг/кг, qw (TV=238 мм<sup>3</sup>, TGI=77,5%, p<0,001) имел значительную противоопухолевую активность. В этом исследовании животные во всех группах 5 мг/кг qw теряли в среднем 15% массы тела. В этой клеточной линии, которая демонстрирует только умеренную экспрессию нектин-4 в исследованиях FACS, рост опухоли сдерживается посредством BCY8245, однако опухоль регрессии опухоли не происходит.

Пример 9.8. Исследование эффективности in vivo тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом MDA-MB-468.

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности BCY8245 и BCY8235 в комбинации с BCY8234 при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом MDA-MB-468 для определения роли, которую связывание мишени играет в оптимальной эффективности.

2. Схема эксперимента

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	N	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	--	4	в/в	Qw, 3 недели
2	BCY8245	0,3	4	в/в	Qw, 3 недели
3	BCY8245	1	4	в/в	Qw, 3 недели
4	BCY8245	3	4	в/в	Qw, 3 недели
5	BCY8245+BCY8234	1+300	4	в/в	Qw, 3 недели
6	BCY8245+BCY8234	3+300	4	в/в	Qw, 3 недели

Примечание: N, количество животных в каждой группе.

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 36 мышей плюс запасные.

3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 4 животными в каждой клетке.

Температура: 20-26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

#### 4. Способы и процедуры эксперимента.

##### 4.1. Культивирование клеток

Опухолевые клетки поддерживали в среде Лейбовитца L-15, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 0% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

##### 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышке подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки MDA-MB-468 ( $10 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS, дополненном 50% матригелем, для формирования опухоли. 36 животных случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 186 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

##### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Чистота	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	99,4%	1	Растворить 5,0 мг BCY8245 в 4,97 мл гистидинового буфера <sup>1</sup>
		0,03	Разбавить 36 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 1164 мкл гистидинового буфера
		0,1	Разбавить 120 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 1080 мкл гистидинового буфера
		0,3	Разбавить 360 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 840 мкл гистидинового буфера
BCY8234	98,10%	30	Растворить 147 мг BCY8234 в 4,807 мл гистидинового буфера

##### 4.4. Взятие образцов.

На 21 сутки исследования опухоли в группах 5 и 6 извлекали для FFPE. В конце исследования опухоли в группе 3 извлекали для FFPE.

#### 5. Результаты.

##### 5.1. Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 24.

##### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат MDA-MB-468, представлен в таблицах 36-38.

##### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом MDA-MB-468 вычисляли на основе измерения объема опухоли через 21 сутки после начала лечения.

#### 6. Обобщение и обсуждение результатов.

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом MDA-MB-468. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 24 и в таблицах 36-39.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 420 мм<sup>3</sup> на 21 сутки. BCY8245 в дозе 1 мг/кг, qw (TV=204 мм<sup>3</sup>, TGI=92,1%, p<0,001), 3 мг/кг, qw (TV=27 мм<sup>3</sup>, TGI=164,9%, p<0,001) имел значительную зависимую от дозы противоопухолевую активность. BCY8245 в дозе 0,3 мг/кг qw или biw не демонстрировал никакой противоопухолевой активности.

BCY8245 в дозе 1 мг/кг, qw и 3 мг/кг, qw в комбинации с BCY8234 (свободный от токсина родственный пептид) в дозе 300 мг/кг, qw имели значительную противоопухолевую активность (TV=242 мм<sup>3</sup>, TGI=75,4%, p<0,01). По сравнению с BCY8245 отдельно, BCY8234 в дозе 300 мг/кг был антагонистом противоопухолевой активности BCY8245 в дозе 3 мг/кг (p<0,001). Это снижение эффективности посредством конкуренции со свободным от токсина пептидом демонстрирует важность связывания мишени для оптимальной эффективности. В ходе последующего мониторинга мыши, которым вводили BCY8245 1

мг/кг qw, продемонстрировали отчетливый рецидив опухоли, в то время мыши, которым вводили ВСУ8245 3 мг/кг qw, не продемонстрировали никакого рецидива опухоли.

Таблица 36

		Регистрация объема опухоли с течением времени (сутки с 0 по 21)									
Группа	Лечение	Сутки после начала лечения									
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Носитель, qw	182±15	196±18	217±18	260±15	283±19	302±26	335±27	362±28	386±31	420±37
2	ВСУ8245 0,3 мг/кг, qw	188±21	189±19	211±21	235±28	252±25	253±33	275±26	277±27	295±26	300±27
3	ВСУ8245 1 мг/кг, qw	185±21	187±22	183±22	190±28	205±29	195±27	201±25	197±22	218±24	204±19
4	ВСУ8245 3 мг/кг, qw	181±14	171±17	163±10	141±21	113±16	92±5	66±4	58±2	41±2	27±1
5	ВСУ8245+ВСУ8234 1+300 мг/кг, qw	184±15	189±22	194±28	212±30	221±34	221±39	223±36	211±38	221±51	242±67
6	ВСУ8245+ВСУ8234 3+300 мг/кг, qw	184±16	178±57	193±36	197±46	179±44	138±41	137±32	114±24	110±24	99±18

Таблица 37

		Регистрация объема опухоли с течением времени (сутки с 23 по 32)				
Группа	Лечение	Сутки после начала лечения				
		23	25	28	30	32
1	Носитель, qw	434±35	460±38	504±32	535±46	548±51
2	ВСУ8245 0,3 мг/кг, qw	284±14	268±10	254±15	240±21	241±32
3	ВСУ8245 1 мг/кг, qw	200±16	199±13	210±6	221±14	239±16
4	ВСУ8245 3 мг/кг, qw	22±3	19±3	20±3	15±2	15±1

Таблица 38

		Регистрация объема опухоли с течением времени (сутки с 35 по 91)			
Сутки	Группа 1, Носитель, qw, дозированный с ВСУ8245 5 мг/кг на PG-D32	Группа 2, ВСУ8245, 0,3 мг/кг, qw	Группа 3, ВСУ8245, 1 мг/кг, qw	Группа 4, ВСУ8245, 3 мг/кг, qw	
					35
37	373±92	246±40	292±19	16±2	
39	247±48	248±37	304±36	14±1	
42	134±18	245±48	314±42	14±2	
44	108±3	251±48	327±42	18±4	
46	79±3	248±61	342±55	19±4	
49	63±8	250±65	356±59	20±4	
51	62±5	264±68	374±71	18±5	
53	53±12	268±81	381±87	22±4	
56	52±13	271±87	416±104	21±4	
58	58±0	267±95	433±113	20±5	
60	61±7	270±108	464±119	18±6	
64	71±23	276±132	532±154	23±6	
67	66±14	269±137	550±162	23±5	
71	73±5	280±155	565±170	24±7	
74	82±4	295±167	594±173	27±8	
78	90±8	313±194	612±195	23±6	
81	104±17	291±192	639±206	27±8	
84	110±1	301±194	695±234	34±7	
88	106±7	277±194	743±236	32±7	
91	110±3	293±209	771±240	26±6	

Таблица 39

## Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение	
					Р по сравнению с носителем	Комбинация по сравнению с BCY8245
1	Носитель, qw	420±37	--	--	--	--
2	BCY8245 0,3 мг/кг, qw	300±27	71,4	52,7	$p>0,05$	
3	BCY8245 1 мг/кг, qw	204±19	48,6	92,1	$p<0,001$	
4	BCY8245 3 мг/кг, qw	27±1	6,5	164,9	$p<0,001$	
5	BCY8245+BCY82 34 1+300 мг/кг, qw	242±67	57,8	75,4	$p<0,01$	$p>0,05$
6	BCY8245+BCY82 34 3+300 мг/кг, qw	99±18	23,5	135,9	$p<0,001$	$P<0,001$

a. Среднее значение  $\pm$  SEM.

b. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (T/C).

Пример 9.9. Исследование эффективности *in vivo* тестируемых образцов при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом MDA-MB-468.

1. Задача исследования.

Задачей исследования является оценка *in vivo* противоопухолевой эффективности BCY8245 отдельно или в комбинации с BCY8234 при лечении мышей Balb/c nude с ксенотрансплантатом MDA-MB-468.

2. Схема эксперимента.

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	N	Путь дозирования	Схема
1	Носитель	--	5	в/в	Qw, 3 недели
2	BCY8245	1	5	в/в	Qw, 3 недели
3	BCY8245	3	5	в/в	Qw, 3 недели
4	BCY8245+ BCY8234	3+300 =300	5	в/в	Qw, 3 недели

Примечание: N, количество животных в каждой группе.

3. Материалы.

3.1. Животные и условия содержания.

3.1.1. Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22 г;

количество животных: 20 мышей плюс запасные.

3.1.2. Условия содержания.

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности с 5 животными в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки: изготовлены из поликарбоната. Размер составляет 300 мм×180 мм×150 мм. Материалом подстилки были сердцевинки кукурузных початков, которые заменяли два раза в неделю.

Рацион: животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму в ходе всего периода исследования.

Вода: животные имели свободный доступ к питьевой воде.

Идентификация клеток: идентификационные ярлыки для каждой клетки содержали следующую

информацию: количество животных, пол, линия, дата получения, лечение, номер испытания, номер группы и дата начала испытания.

Идентификация животных: животных маркировали кодированием на ушах.

#### 4. Способы и процедуры эксперимента.

##### 4.1. Культивирование клеток.

Опухолевые клетки поддерживали в среде Лейбовитца L-15, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой, при 37°C в атмосфере 0% CO<sub>2</sub> в воздухе. Опухолевые клетки стандартным образом субкультивировали два раза в неделю. Клетки, растущие в экспоненциальной фазе роста, собирали и подсчитывали для инокуляции опухоли.

##### 4.2. Инокуляция опухоли.

Каждой мышке подкожно инокулировали в правый бок опухолевые клетки MDA-MB-468 ( $10 \times 10^6$ ) в 0,2 мл PBS, дополненном 50% матригелем, для формирования опухоли. 20 животных случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 464 мм<sup>3</sup>. Введение тестируемых образцов и количества животных в каждой группе представлены в таблице схемы эксперимента.

##### 4.3. Получение состава тестируемого образца.

Тестируемый образец	Чистота	Конц. (мг/мл)	Состав
Носитель	-	-	25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара
BCY8245	99,7%	1	Растворить 5,0 мг BCY8245 в 4,985 мл гистидинового буфера
		0,1	Разбавить 140 мкл 1 исходный раствор мг/мл BCY8245 посредством 1260 мкл гистидинового буфера
		0,3	Разбавить 420 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY8245 посредством 980 мкл гистидинового буфера
BCY8234	98,10%	30	Растворить 147 мг BCY8234 в 4,807 мл гистидинового буфера
<i>1. 25 мМ гистидин, pH 7, 10% сахара</i>			

##### 4.4. Взятие образцов.

В конце исследования опухоли в группе 3 извлекали для FFPE.

#### 5. Результаты.

##### 5.1. Кривая роста опухоли.

Кривая роста опухоли представлена на фиг. 25.

##### 5.2. Регистрация объема опухоли.

Средний объем опухоли с течением времени у самок мышей Balb/c nude, имеющих ксенотрансплантат MDA-MB-468 представлен в таблицах 40-42.

##### 5.3. Анализ ингибирования роста опухоли.

Скорость ингибирования роста опухоли для тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом MDA-MB-468 вычисляли на основе измерения объема опухоли через 28 суток после начала лечения.

#### 6. Обобщение и обсуждение результатов

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность тестируемых образцов в модели с ксенотрансплантатом MDA-MB-468. Измеренные объемы опухоли во всех группах лечения в различные моменты времени представлены на фиг. 25 и в таблицах 40-43.

Первоначальный размер опухоли намеренно был больше, чем использовался раньше для определения того, демонстрирует ли BCY8245 эффективность при этом большем размере. Средний размер опухоли у мышей, которым вводили носитель, достигал 773 мм<sup>3</sup> на 28 сутки. BCY8245 в дозе 1 мг/кг, qw (TV=384 мм<sup>3</sup>, TGI=126,6%, p<0,001) и 3 мг/кг, qw (TV=50 мм<sup>3</sup>, TGI=234,6%, p<0,001) имел значительную противоопухолевую активность зависимым от дозы образом на 28 сутки. Среди них, мыши, которым вводили BCY8245, доза 3 мг/кг qw продемонстрировала некоторый рецидив опухоли после прекращения лечения, дополнительно дозирование с 76 суток не привело к полной регрессии опухоли.

BCY8245 в дозе 3 мг/кг qw в комбинации с BCY8234 300 мг/кг qw имели значительную противоопухолевую активность (TV=55 мм<sup>3</sup>, TGI=234,0%, p<0,001) на 28 сутки, и опухоли не продемонстрировали никакого рецидива в ходе всего мониторинга.

Мыши в группе носителя, которым вводили 10 мг/кг ADC против нектин-4 или 5 мг/кг BCY8245 и мыши в группе 2 (BCY8245, 1 мг/кг, qw), которым вводили 5 мг/кг BCY8245 на PG-D28, продемонстрировали эффективную регрессию опухоли в последующие 3 недели, после чего опухоли продемонстрировали повторный рост в последующие 4 недели после прекращения введения лекарственного средства.



BCY8245 был способен обеспечить регрессию опухолей приблизительно 450 мм<sup>3</sup>, а также при введении в группе, в которой ранее вводили носитель, в опухолях с начальным объемом приблизительно 770 мм<sup>3</sup>.

Таблица 40

		Регистрация объема опухоли с течением времени (Сутки с 0 по 28)													
Группа	Лечение	Сутки после начала лечения													
		0	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28	
1	Носитель, qw	466±89	494±94	529 ±106	548 ±109	574 ±117	602 ±130	632 ±133	659 ±129	686 ±133	706 ±145	741 ±148	769 ±157	773 ±155	
2	BCY8245 1мг/кг, qw	466±22	480±24	453 ±29	474 ±25	446 ±31	461 ±34	460 ±28	433 ±37	412 ±32	430 ±32	421 ±34	382 ±37	384 ±41	
3	BCY8245 3 мг/кг, qw	464±28	451±24	388 ±25	333 ±30	284 ±26	168 ±24	129 ±20	93 ±23	83 ±17	71 ±19	60 ±17	49 ±17	50 ±17	
4	BCY8245+BCY8234 (3+300) мг/кг, qw	467±45	457±46	401 ±47	389 ±42	309 ±25	205 ±9	150 ±9	125 ±5	95±3	90±5	78±5	66±4	55±5	

Таблица 41

		Регистрация объема опухоли с течением времени (сутки с 30 по 75)					
Сутки после начала лечения	Группа 1, носитель, дозированный в количестве 5 мг/кг BCY8245 на PG-D28	Группа 2, BCY8245, 1мг/кг, с заменой на 5мг/кг на PG-D28		Группа 3, BCY8245, 3 мг/кг, qw		Группа 4, BCY8245+BCY8234 3+300 мг/кг, qw	
		30	625±27	351±42	44±18	49±8	
33	477±31	213±29	43±20	33±10			
35	405±65	151±18	44±20	31±10			
37	237±36	98±16	50±24	31±10			
40	148±33	89±17	55±29	36±14			
42	142±33	95±16	66±32	40±13			
44	132±69	103±20	71±33	35±11			
48	146±100	106±21	80±36	43±14			
51	171±122	103±21	91±43	45±18			
55	227±166	104±20	108±53	42±13			
56	264±182	120±23	125±58	43±12			
62	288±206	145±29	146±70	40±12			
65	316±212	163±31	147±74	41±14			
68	347±215	173±32	155±81	46±13			
72	368±242	180±36	170±89	45±20			
75	385±245	196±40	223±115	43±19			

Таблица 42

		Регистрация объема опухоли с течением времени (сутки с 79 по 103)							
Группа	Лечение	Сутки после начала лечения							
		79	82	86	89	93	96	100	103
3	BCY8245 3 мг/кг, qw	221±118	198±107	185±105	180±102	155±91	166±95	221±119	250±125

Таблица 43

Анализ ингибирования роста опухоли					
Группа	Лечение	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	T/C <sup>b</sup> (%)	TGI (%)	Значение <i>P</i> по сравнению с носителем
1	Носитель, qw	773±155	--	--	--
2	BCY8245 1мг/кг, qw	384±41	49,7	126,6	<i>p</i> <0,001
3	BCY8245 3 мг/кг, qw	50±17	6,4	234,6	<i>p</i> <0,001
4	BCY8245+BCY8234 3+300 мг/кг, qw	55±5	7,1	234,0	<i>p</i> <0,001

a. Среднее значение ± SEM.

в. Ингибирование роста опухоли вычисляют путем деления среднего по группе объема опухоли для группы лечения на средний по группе объем опухоли для контрольной группы (Т/С).

Пример 10. Испытания PK in vivo.

Животным с ксенотрансплантатом MDA-MB-468 инъецировали BCY8245 (BT8009) в дозе 3 мг/кг. В различные моменты времени животных умерщвляли и проводили взятие плазмы и извлечение опухолей, и их быстро замораживали. Образцы анализировали в отношении ММАЕ. Уровни в плазме BT8009 (BCY8245) взяты из исторических исследований PK. Концентрации ММАЕ в плазме, ММАЕ в опухоли, и BT8009 в плазме представлены на фиг. 33. ММАЕ задерживался в опухоли дольше, чем в плазме, подтверждая гипотезу, что системная экспозиция является значительно меньшей, чем экспозиция в опухоли.

Пример 11. Анализ HCS.

Анализ HCS использовали в исследовании связывания BDC против нектина-4. Клетки инкубировали с тестируемым веществом, а затем промывали. Детекцию проводили посредством флуоресцентного антитела к ММАЕ. Клетки MDA-MB-468 демонстрируют умеренную экспрессию нектина-4, причем 20000 клеток давали наилучшие изображения. Клетки NCI-H292 демонстрируют низкую экспрессию в этом анализе, детекция ММАЕ была низкой даже для 20000 клеток.

Данные HCS на клеточной линии MDA-MB-468 представлены на фиг. 34 и в табл. 44.

Таблица 44

Тестируемое вещество	Максимальная интенсивность	Kd (нМ)	Историческая Kd (нМ)
	флуоресценции		
ADC против нектина-4	33,63	0,2	0,28±0,07
BCY8245	13,34	3,52	5,18
ММАЕ	2,95	>10000	>10000

ADC против нектина-4 и BCY8245 удерживались в клетках и колокализовались с мембранным красителем. BCY8781 и ММАЕ продемонстрировали минимальное удержание. Kd для всех соединений на клеточной линии MDA-MB-468 согласовывались с историческими данными. ADC против нектина-4 продемонстрировал поддающуюся обнаружению аффинность связывания на клеточной линии MDA-MB-468. BCY8425 продемонстрировал одноразрядную наномолярную аффинность с  $B_{max}$  ниже, чем у ADC против нектина-4. Эта сниженная максимальная интенсивность флуоресценции является следствием того, что ADC против нектина-4 имеет соотношение ММАЕ и лекарственного средства 4, в то время как BCY8245 имеет соотношение ММАЕ и лекарственного средства 1. BCY8781 продемонстрировал только очень слабую аффинность связывания на клеточной линии MDA-MB-468, в то время как ММАЕ практически не продемонстрировал поддающейся обнаружению аффинности связывания на клеточной линии MDA-MB-468.

Пример 12. Эффективность in vivo BCY8245 в двух моделях PDX для рака легкого.

Цель.

Оценить эффективность BCY8245 в модели PDX для плоскоклеточного немелкоклеточного рака и аденокарциномы (оба немелкоклеточные карциномы).

Животные.

Вид: Mus Musculus;

линия: Balb/c nude;

возраст: 6-8 недель;

пол: самки;

масса тела: 18-22;

тестируемые средства.

BCY8245 и ADC против нектина-4 или BCY8781.

Животные до исследования.

Каждой мышце подкожно инокулировали в правый бок фрагмент опухоли LU-01-0007 или LU-01-0412 (~30 мм<sup>3</sup>) для формирования опухоли. Животных случайным образом распределяли на группы, когда средний объем опухоли достигал 161 мм<sup>3</sup> (LU-01-0007) или 147 мм<sup>3</sup> (LU-01-0412).

Прижизненные измерения и конечные результаты.

Животных проверяли каждые сутки в отношении каких-либо эффектов роста опухоли и лечения на нормальное поведение, такое как двигательная активность, употребление пищи и воды (только посредством осмотра), увеличение/снижение массы тела, потускнение глаз/шерсти и любой другой аномальный эффект, указанный в протоколе. Смерть и наблюдаемые клинические признаки регистрировали на основе количества животных в каждой подгруппе.

Основным результатом было наблюдение, может ли быть замедлен рост опухоли или могут ли мыши быть вылечены. Объем опухоли измеряли три раза в неделю в двух измерениях с использованием

толщиномером, и объем выражали в мм<sup>3</sup> с использованием формулы:  $V=0,5 a \times b^2$ , где а и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно. Затем размер опухоли использовали для вычисления величины Т/С. Величина Т/С (в процентах) является признаком противоопухолевой эффективности; Т и С представляют собой средние объемы групп лечения и контроля, соответственно, в данный день.

TGI вычисляли для каждой группы с использованием формулы:  $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ; T<sub>i</sub> представляет собой средний объем опухоли в группе лечения в данный день, T<sub>0</sub> представляет собой средний объем опухоли в группе лечения в день начала лечения, V<sub>i</sub> представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе носителя в той же день с T<sub>i</sub>, и V<sub>0</sub> представляет собой средний объем опухоли в группе носителя в день начала лечения.

Результаты этих испытаний представлены на фиг. 26 и 27.

Lu-01-0412 (фиг. 26): BCY8245 обеспечивал зависимую от дозы эффективность в этой модели PDX со снижением скорости роста опухоли при 1 мг/кг qw, но выраженной регрессией опухоли в дозе 3 мг/кг qw до исходного уровня. После прекращения дозирования (21 сутки) 5/6 животных продемонстрировали отсутствие повторного роста опухоли вплоть до 105 суток после начала исследования. Одно животное, демонстрирующее повторный рост, отвечало на 3 мг/кг BCY8245 и продемонстрировало восстановление регрессии до исходного уровня. Не связывающий BDC BCY8781 обеспечивал стабильное заболевание в дозе 3 мг/кг и при прекращении дозирования опухоль быстро росла с той же скоростью, как и в группе, в которой вводили носитель, подтверждая повышенную эффективность, которую придает этим средствам связывание нектин-4. Большие опухоли (группа, в которой вводили носитель) регрессировали в ответ на однократную дозу BCY8245 или BCY8781.

LU-01-0007 (фиг. 27): BCY8245 обеспечивал связанную с дозой эффективность, причем 1 мг/кг qw обеспечивала стабильное и 3 мг/кг обеспечивала полную регрессию. Дозирование необходимо было продолжать до 56 суток для достижения полной регрессии (когда дозирование прекращали). Не происходило повторного роста опухоли в этой группе после этого (вплоть до 126 суток после начала исследования). ADC против нектин-4 обеспечил сходную степень эффективности. Группа стабильного заболевания 1 мг/кг отвечала на повышение дозирования (3 и 5 мг/кг), указывая на то, что низкие дозы BCY8245 не приводят к развитию резистентности.

Пример 13. Оценка *in vivo* BCY8245 в моделях PDX с низким пассированием у мышей с иммунодефицитом с раком молочной железы, пищевода и мочевого пузыря человека.

Цель.

Оценить противоопухолевую активность бициклического средства в моделях Low Passage Champions TumorGraft Models у мышей с иммунодефицитом с раком молочной железы, пищевода и мочевого пузыря человека.

Тестируемая система.

Вид: мышь.

Линия: Athymic Nude-Foxnlnu (с иммунодефицитом).

Источник: Envigo: Индианаполис, Индиана.

Пол: самки.

Целевой возраст при начале дозирования: по меньшей мере 6-8 недель.

Целевая масса при начале дозирования: по меньшей мере 18 граммов.

Период акклиматизации: 3 суток.

Схема эксперимента.

Животные до исследования: когда достаточное количество животных достигают 1,0-1,5 см<sup>3</sup>, опухоли извлекают для реимплантации животным до исследования. Животным до исследования проводят одностороннюю имплантацию в левый бок фрагментов опухоли, извлеченных из исходных животных. Каждому животному проводят имплантации из конкретной партии пассирования и документируют.

Исследуемые животные: объемы опухолей до исследования регистрируют для каждого эксперимента, начиная через от семи до десяти суток после имплантации. Когда опухоли достигают среднего объема 150-300 мм<sup>3</sup>, животных будут подбирать по объему опухоли в группы лечения или контроля для применения для дозирования и дозирование начинают на сутки 0.

Тестируемые средства.

BCY8245 и конъюгат антитело-лекарственное средство против нектин-4 по сравнению с контролем в виде носителя. Может быть включено стандартное средство доцетаксел. Все средства подлежат дозированию qw внутривенным путем, дозы указаны на графиках.

Прижизненные измерения.

Эффективность в отношении объема опухоли: Объемы опухоли измеряют два раза в неделю. Конечный объем опухоли определяют в день окончания исследования. Если возможно, конечный объем опухоли определяют, если животное считают умирающим.

Эффективность в отношении массы животного: животных взвешивают два раза в неделю. Конечную массу определяют в день, когда исследование достигает конечного результата, или если животного

определяют как умирающее, если возможно. Животным, демонстрирующим снижение массы тела  $\geq 10\%$  по сравнению с 0 сутками, предоставляют DietGel® без ограничений. Любое животное, демонстрирующее суммарное снижение массы тела  $>20\%$  в течение 7 суток, или если мышшь демонстрирует суммарное снижение массы тела  $>30\%$  по сравнению с сутками 0, считают умирающим и умерщвляют.

Анализ данных.

Токсичность средства: начиная на 0 сутки животных наблюдают каждые сутки и взвешивают два раза в неделю с использованием цифровых весов; данные, включающие индивидуальную и среднюю массу в граммах (средняя масса  $\pm$  SEM) и среднее процентное изменение массы против 0 суток (%vD0) регистрируют для каждой группы и %vD0 наносят на график после завершения исследования. Смерти животных регистрируют каждые сутки и обозначают как связанные с лекарственным средством (D), технические (T), связанные с опухолью (B), или неизвестные (U), исходя из снижения массы и простого осмотра; группы единственного средства или комбинации со средним значением %vD0  $>20\%$  и/или смертности  $>10\%$  считаются группами доз выше максимально переносимой дозы (MTD) для этого лечения по оцениваемому режиму. Максимальное среднее значение %vD0 (максимальное снижение массы) для каждой группы лечения регистрируют при завершении исследования.

Эффективность средства.

Ингибирование роста опухоли - начиная на 0 сутки размеры опухолей измеряют два раза в неделю посредством цифрового толщиномера и данные, включающие индивидуальные и средние оцененные объемы опухолей (средний TV  $\pm$  SEM) регистрируют для каждой группы; объем опухоли вычисляют с использованием формулы (1):  $TV = \text{ширина} \times \text{длина} \times 0,52$ . После завершения исследования вычисляют процентное ингибирование роста опухоли (%TGI) и регистрируют для каждой группы лечения (T) против контроля (C) с использованием первоначальных (i) и конечных (f) размеров опухоли по формуле (2):  $\%TGI = 1 - (Tf - Ti) / (Cf - Ci)$ . Индивидуальных мышшь, для которых зарегистрирован объем опухоли  $\leq 30\%$  от размера на сутки 0 в течение двух последовательных измерений, считают частично отвечающими (PR). Индивидуальных мышшь, лишенных пальпируемых опухолей ( $0,00 \text{ мм}^3$  в течение двух последовательных измерений), классифицируют как полностью отвечающих (CR); CR, которая сохраняется до конца исследования, считается свободным от опухоли выживанием (TFS). Время удвоения опухоли (DT) определяют для групп введения носителя с использованием формулы  $DT = (Df - Di) * \log_2 / (\log TVf - \log TVi)$ , где D=сутки и TV=объем опухоли. Все данные, полученные в этом исследовании, обрабатывают в электронной форме и хранят на резервной серверной системе.

Результаты этих исследований представлены на фиг. 28-31.

BCY8245 был протестирован в четырех моделях PDX с низким пассированием, соответствующих раку мочевого пузыря (CTG-1771), эстроген- и прогестерон-негативному Her2-позитивному раку молочной железы (CTG-1171), тройному негативному раку молочной железы (CTG-1106) и раку пищевода (CTG-0896). Во всех из этих моделей BCY8245 продемонстрировал превосходную эффективность, обеспечивающую регрессию опухоли, и в трех из четырех случаев полную регрессию до исходного уровня. Эффективность была сравнимой с ADC во всех случаях и была лучшей или равной доцетакселу SOC. Во всех моделях BCY8245 лучше переносился, чем доцетаксел.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидный лиганд, специфичный к нектину-4, содержащий полипептид, содержащий по меньшей мере три остатка цистеина, разделенных по меньшей мере двумя последовательностями петель, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида, так что на молекулярном каркасе образуется по меньшей мере две полипептидных цепи, где пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

$C_iP[1NaI][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO: 1);

где 1NaI обозначает 1-нафтилаланин, HAArg обозначает гомоаргинин, HyP обозначает гидроксипролин и  $C_i$ ,  $C_{ii}$  и  $C_{iii}$  обозначают первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Пептидный лиганд по п.1, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8234);

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8122);

Ac-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8126);

(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8116);

флуоресцеин-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8205); и

[PYA][B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8846).

3. Пептидный лиганд по п.1 или 2, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8234);

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8122);

Ac-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8126);  
 (SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8116); и  
 флуоресцеин-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8205).

4. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>](SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8122);  
 Ac-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8126); и  
 (SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8116).

5. Пептидный лиганд по любому из пп.1-4, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>](SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8122); и  
 Ac-(SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8126).

6. Пептидный лиганд по любому из пп.1-3, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:

[B-Ala][Sar10](SEQ ID NO: 1) (далее обозначаемая как BCY8234).

7. Пептидный лиганд по любому из пп.1-6, где молекулярный каркас выбран из 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она(ТАТА).

8. Пептидный лиганд по любому из пп.1-7, где фармацевтически приемлемая соль выбрана из свободной кислоты или соли натрия, калия, кальция, аммония.

9. Пептидный лиганд по любому из пп.1-8, где нектин-4 представляет собой нектин-4 человека.

10. Конъюгат лекарственного средства, содержащий пептидный лиганд по любому из пп.1-9, конъюгированный с одной или несколькими цитотоксическими средствами.

11. Конъюгат лекарственного средства по п.10, где указанное цитотоксическое средство выбрано из ММАЕ или DM1, в частности ММАЕ.

12. Конъюгат лекарственного средства по п.11, где цитотоксическое средство представляет собой ММАЕ и указанный конъюгат, кроме того, содержит линкер, выбранный из: -РАВС-Cit-Val-глутарила- или -РАВС-циклобутил-Ala-Cit-βAla-, такого как -РАВС-Cit-Val-глутарил-, где РАВС обозначает п-аминобензилкарбамат.

13. Конъюгат лекарственного средства по п.12, где цитотоксическое средство представляет собой DM1, и указанный конъюгат, кроме того, содержит линкер, который представляет собой -SPDB-(SO<sub>3</sub>H)-, где SPDB обозначает N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат.

14. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп.10-13, который выбран из: BCY8245 или BCY8549, в частности BCY8245.

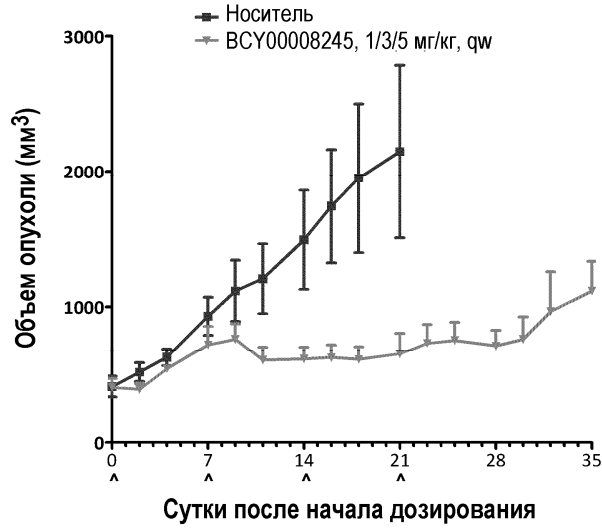
15. Фармацевтическая композиция, которая содержит пептидный лиганд по любому из пп.1-9 или конъюгат лекарственного средства по любому из пп.10-14 в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, которая, кроме того, содержит одно или несколько терапевтических средств.

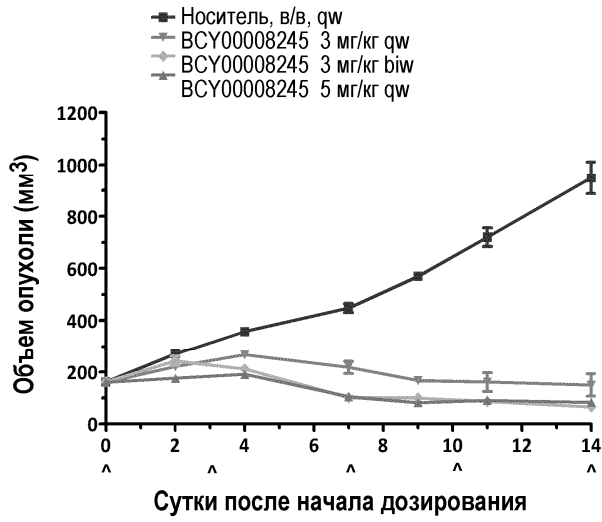
17. Применение конъюгата лекарственного средства по любому из пп.10-14 для предупреждения, подавления или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого нектином-4.

18. Способ предупреждения, подавления или лечения злокачественной опухоли, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгата лекарственного средства по любому из пп.10-14, где указанный пациент идентифицирован как имеющий увеличенное варьирование числа копий (CNV) нектина-4.

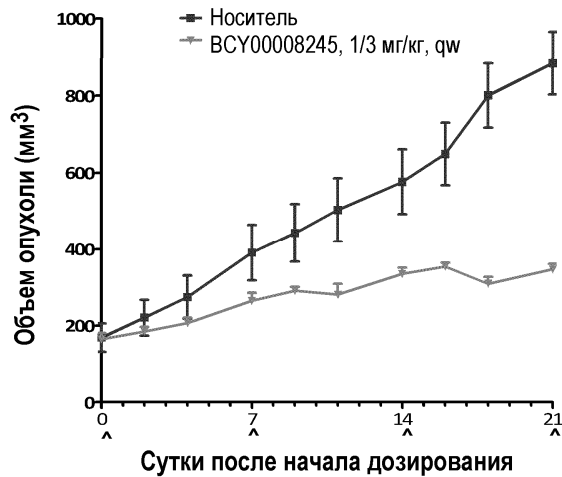
045804



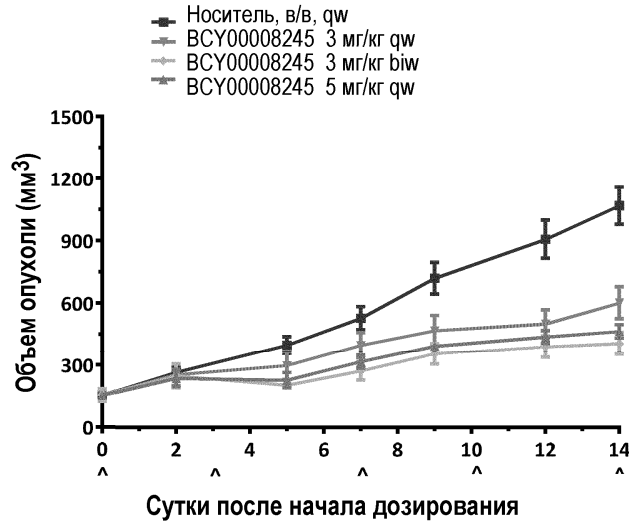
Фиг. 1



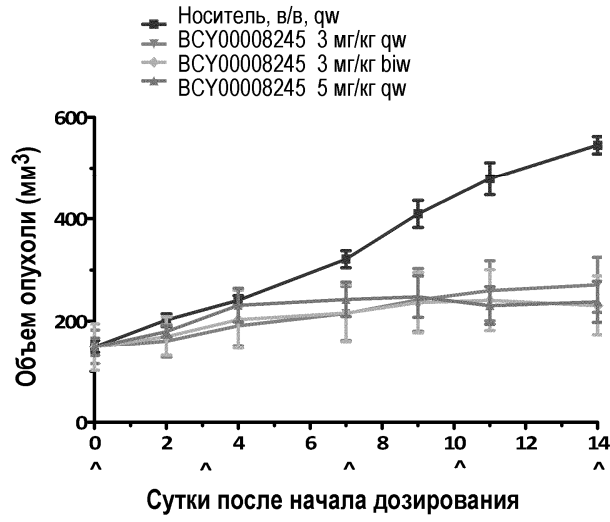
Фиг. 2



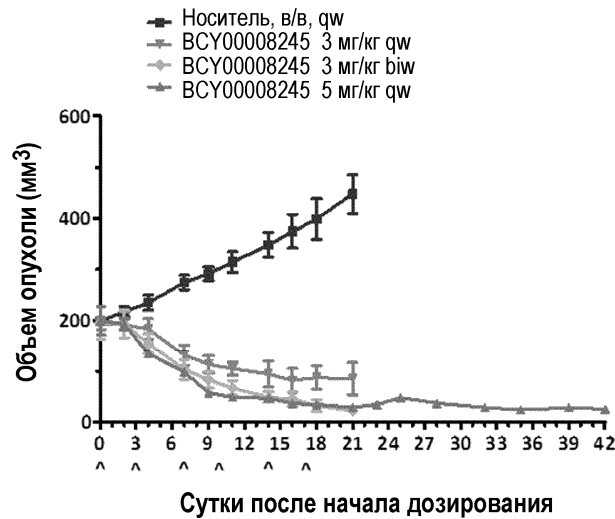
Фиг. 3



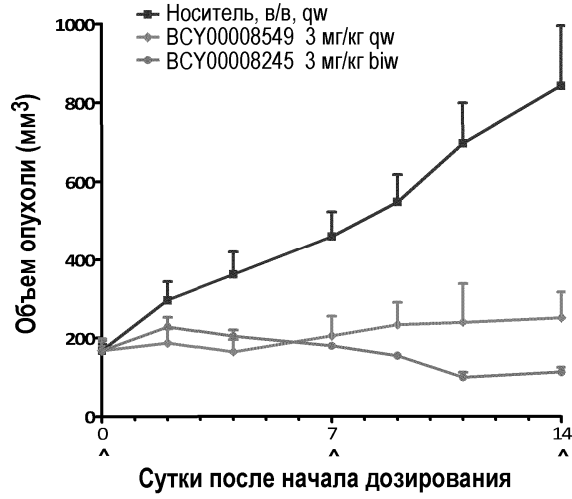
Фиг. 4



Фиг. 5

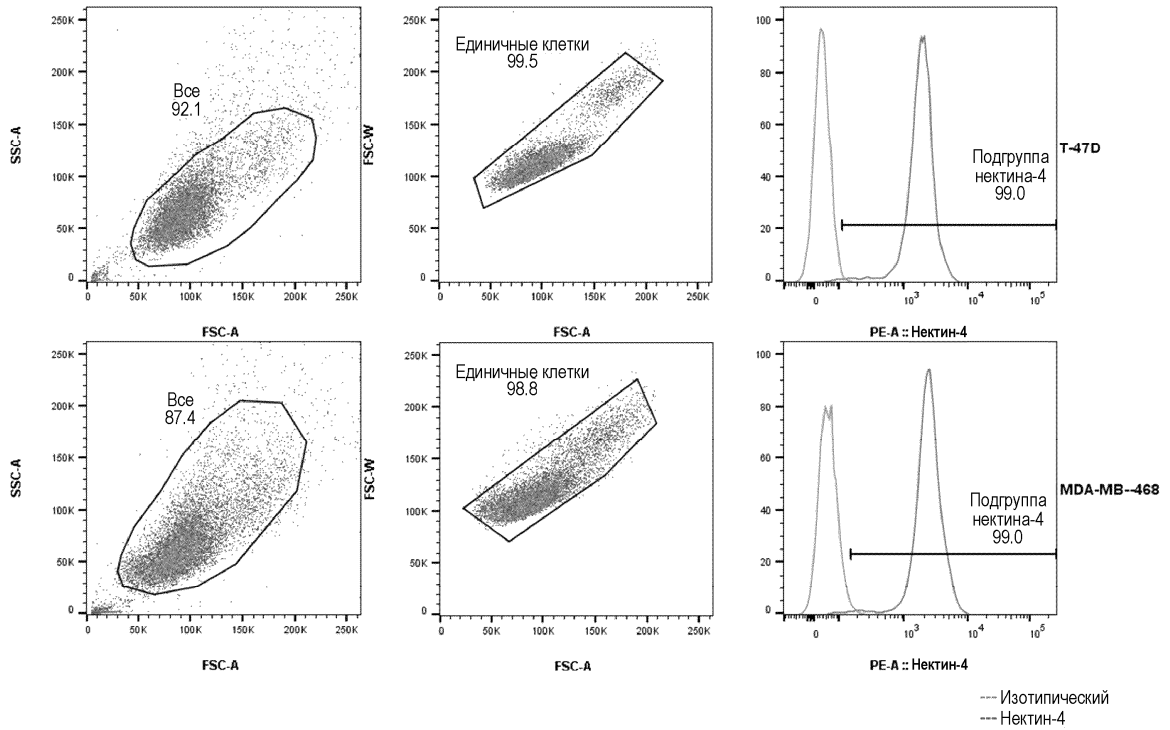


Фиг. 6



Сутки после начала дозирования

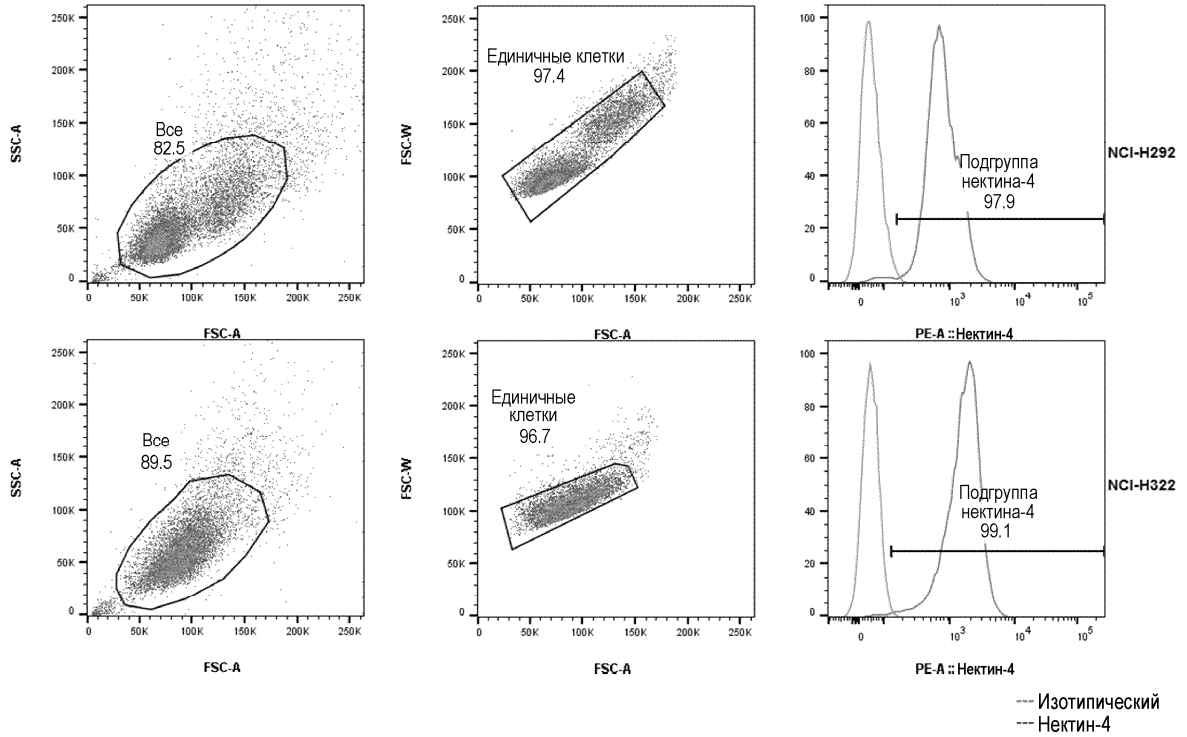
Фиг. 7



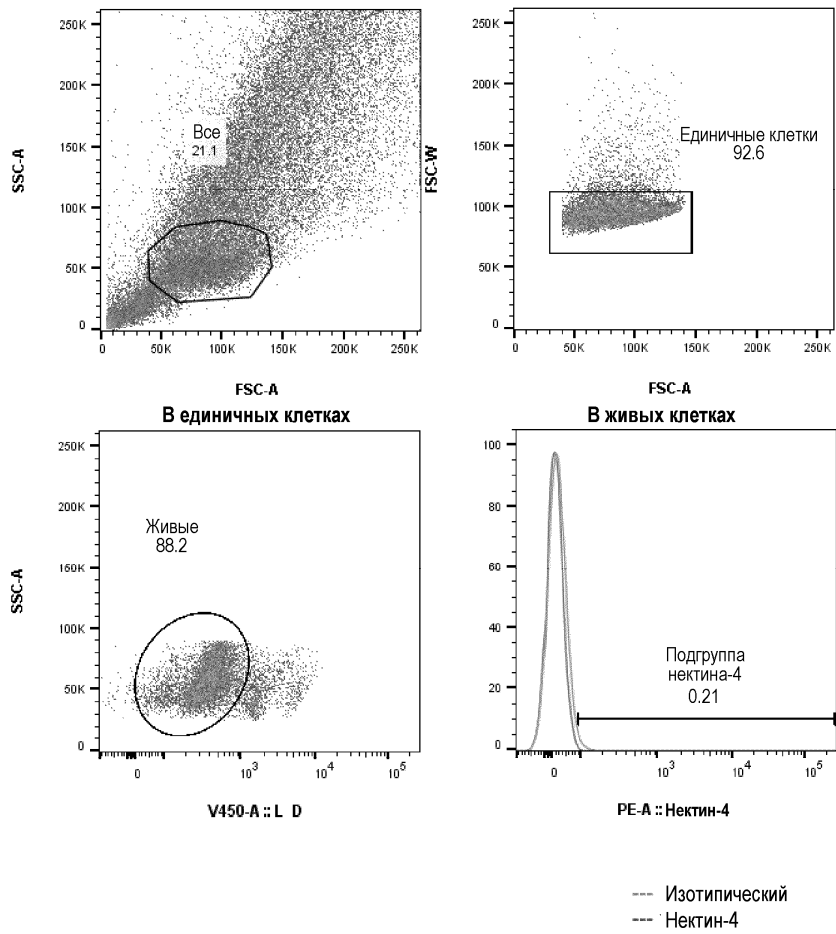
Фиг. 8



045804

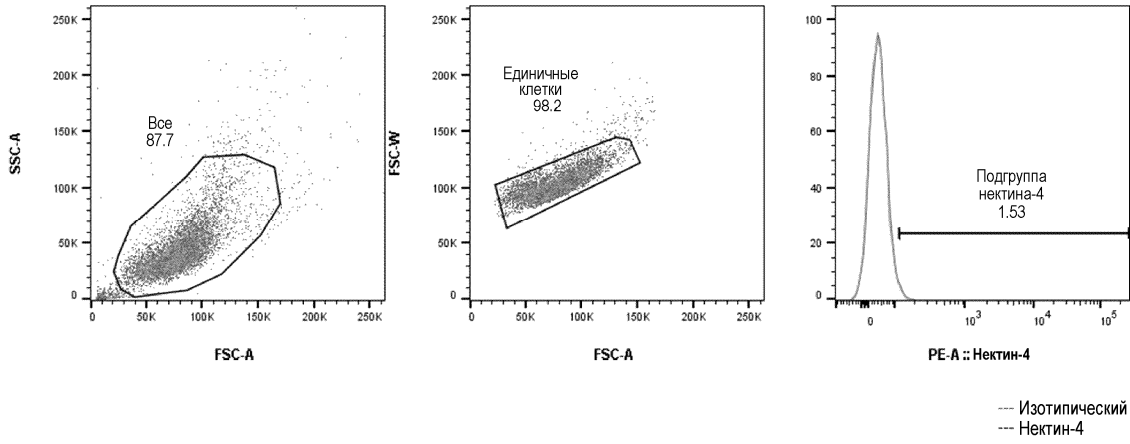


Фиг. 9

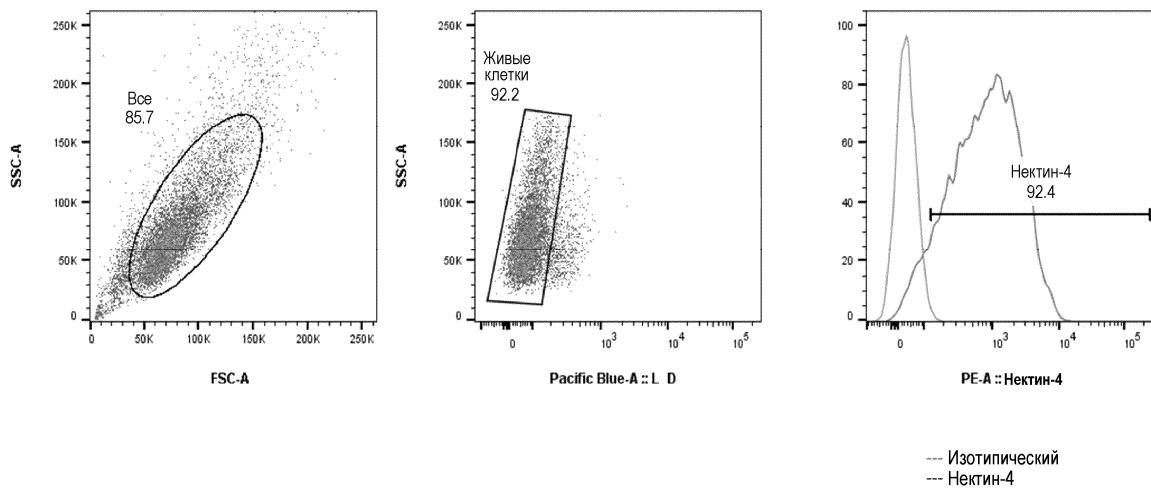


Фиг. 10

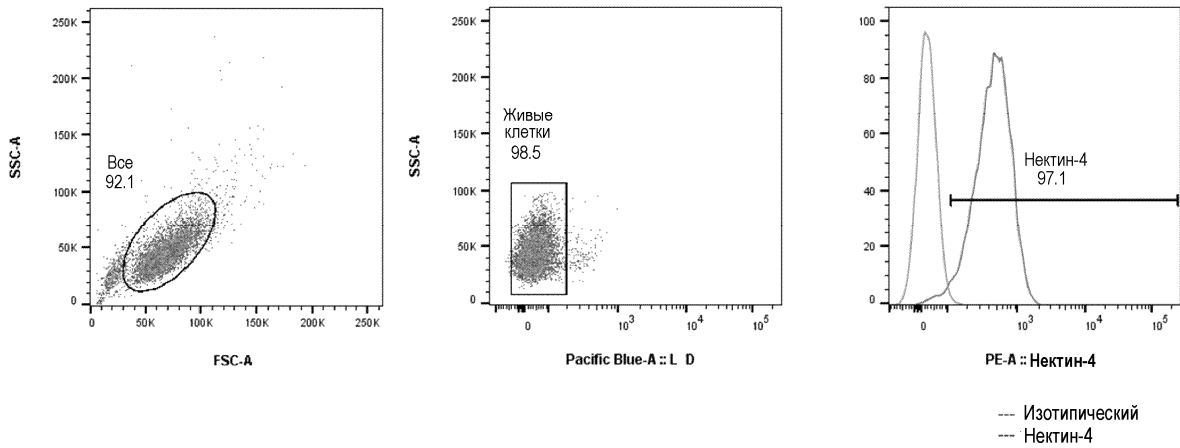
045804



Фиг. 11

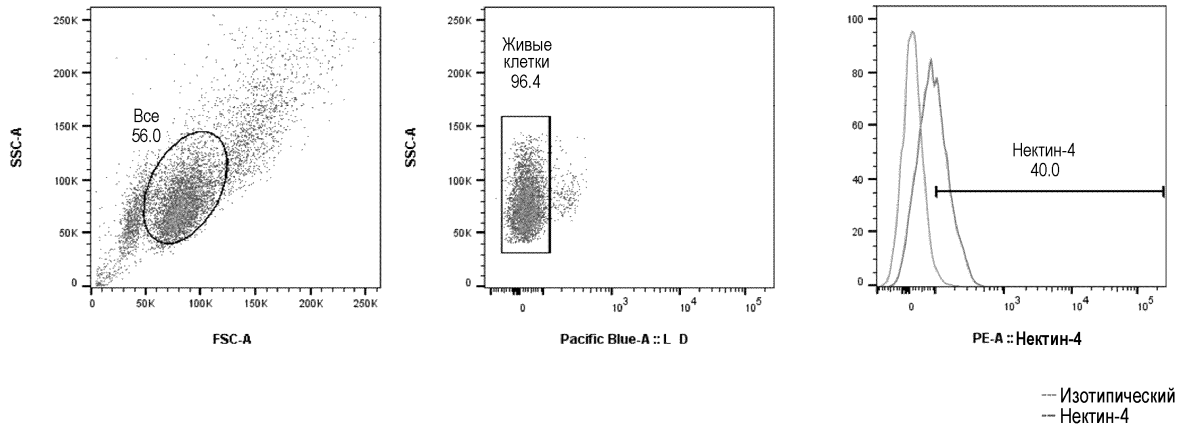


Фиг. 12

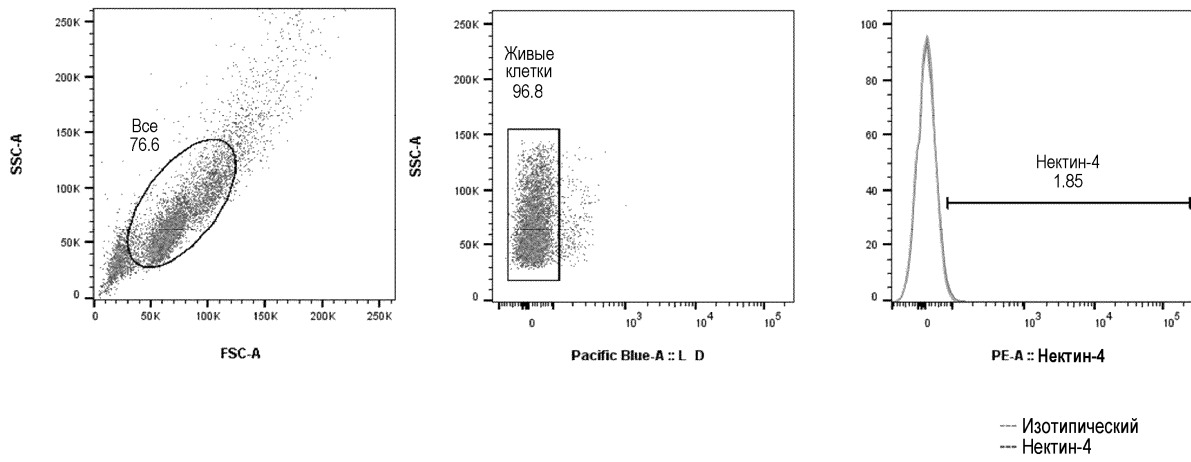


Фиг. 13

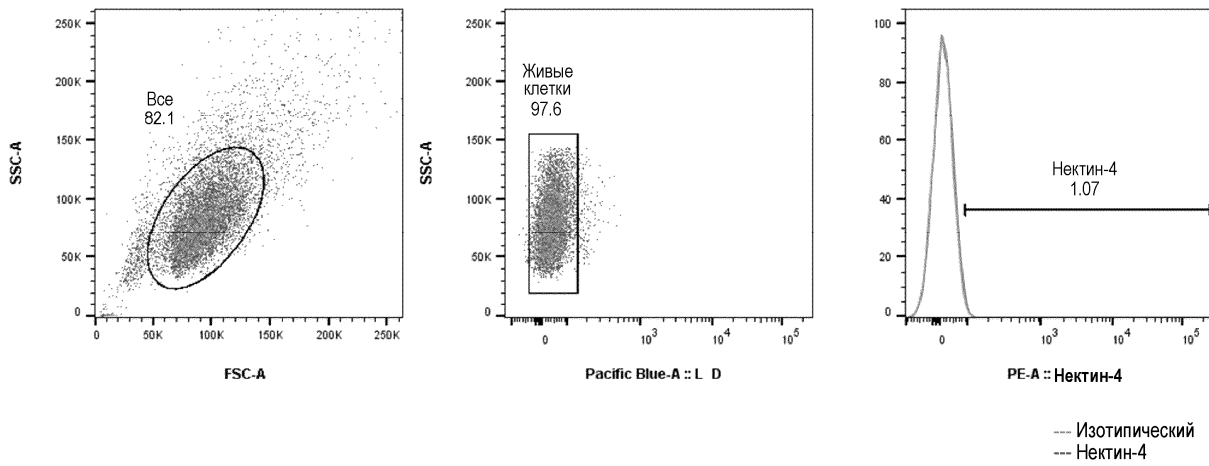
045804



Фиг. 14А

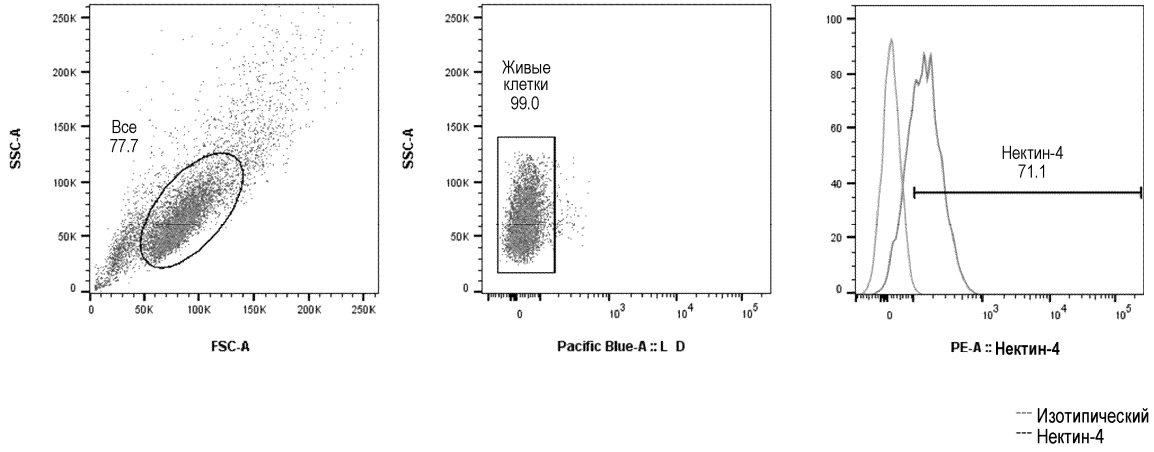


Фиг. 14В

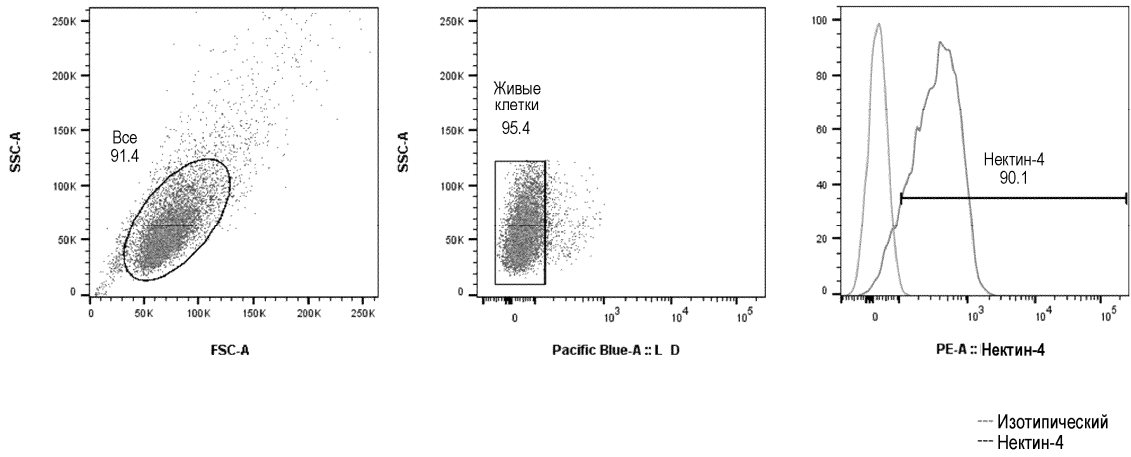


Фиг. 15А

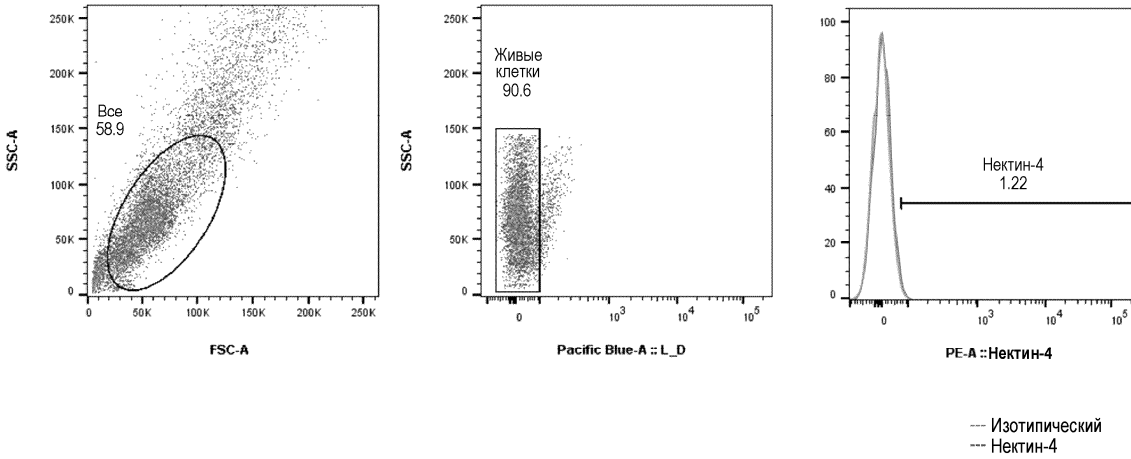
045804



Фиг. 15В

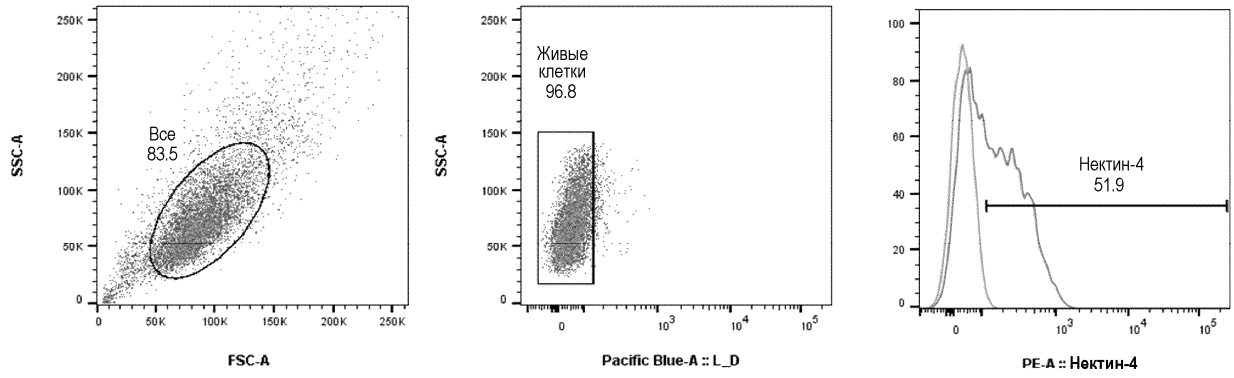


Фиг. 15С

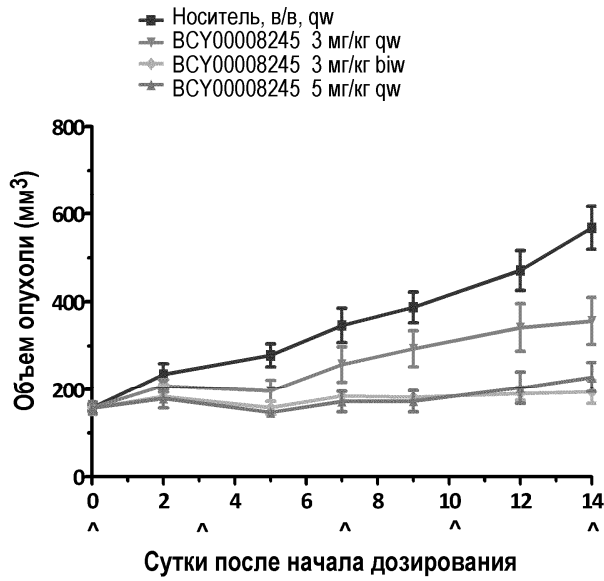


Фиг. 15D

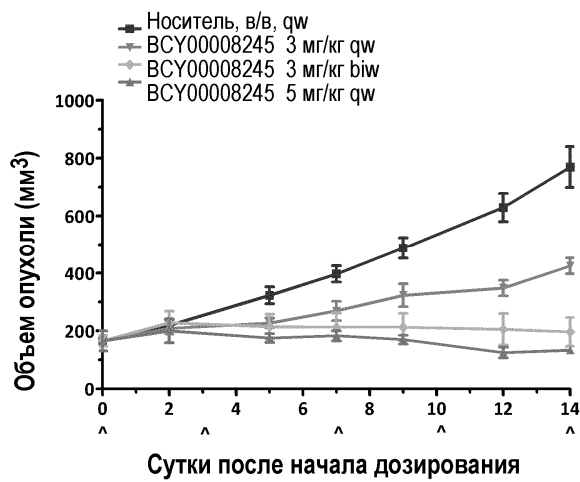
045804



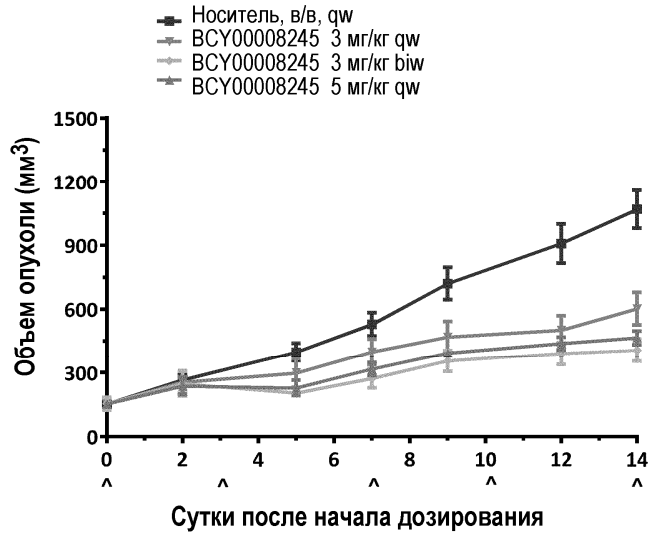
Фиг. 16



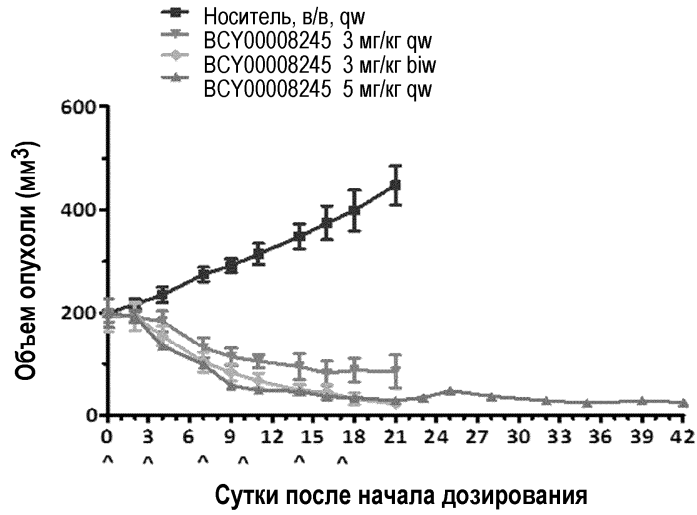
Фиг. 17



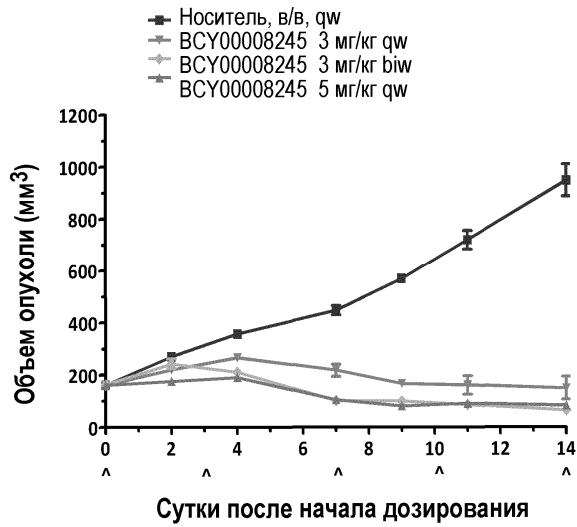
Фиг. 18



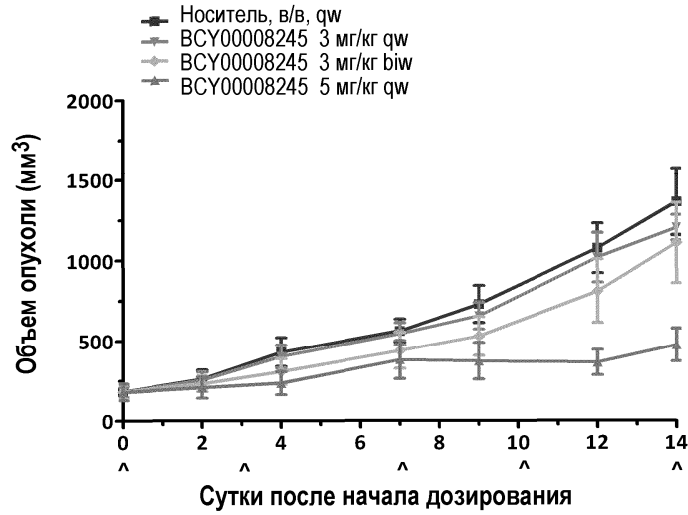
Фиг. 19



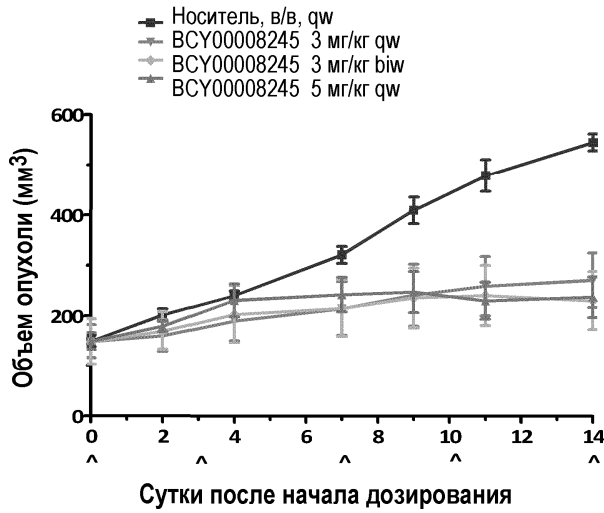
Фиг. 20



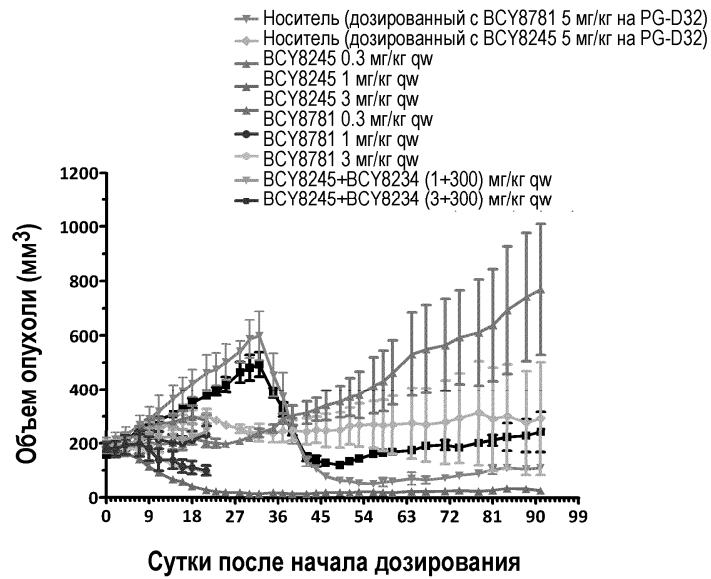
Фиг. 21



Фиг. 22

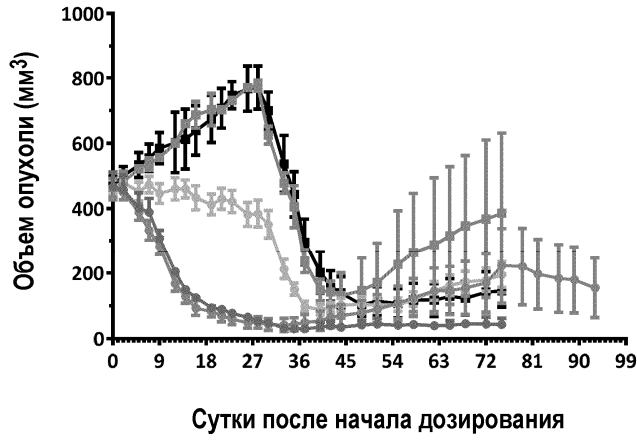


Фиг. 23

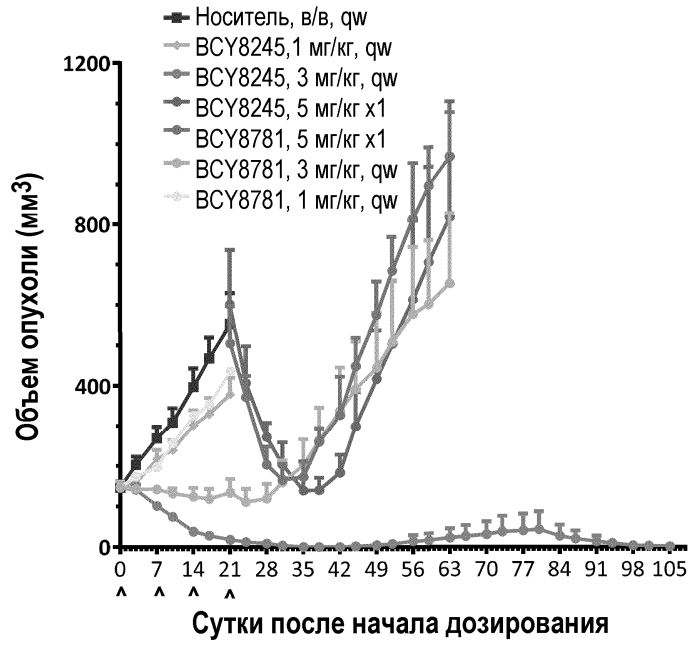


Фиг. 24

- Носитель, дозированный с ADC против нектина-4, 10 мг/кг, на PG-D28
- Носитель, дозированный с BCY8245, 5 мг/кг, на PG-D28
- ▲ BCY8245 1 мг/кг (замена на 5 мг/кг на PG-D28) qw
- ▲ BCY8245, 3 мг/кг, qw
- ▲ BCY8245+BCY8234 (3+300) мг/кг qw

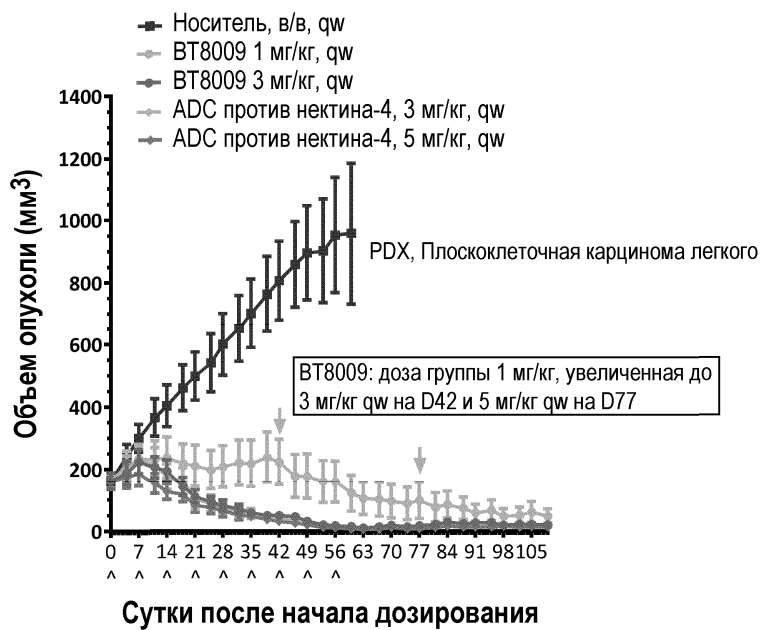


Фиг. 25

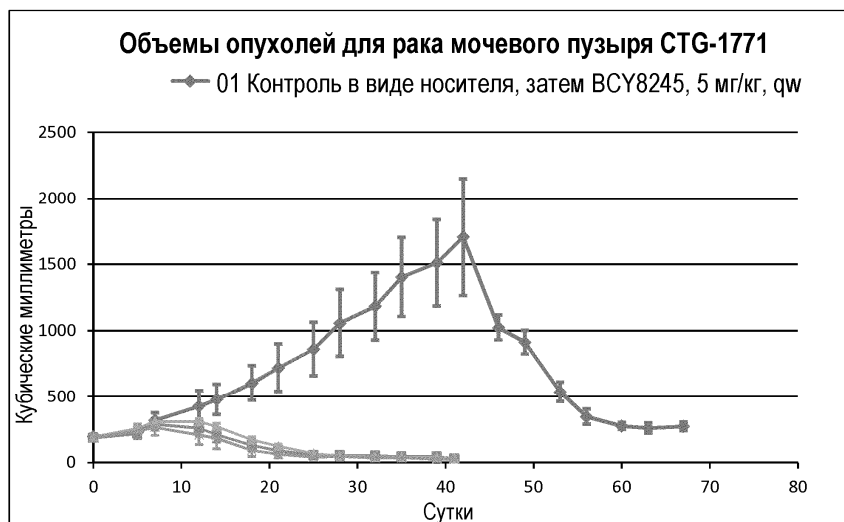


Фиг. 26

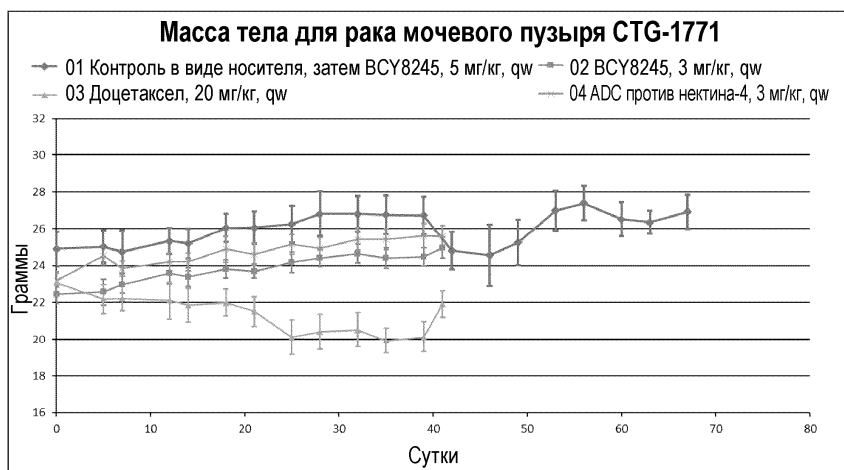




Фиг. 27

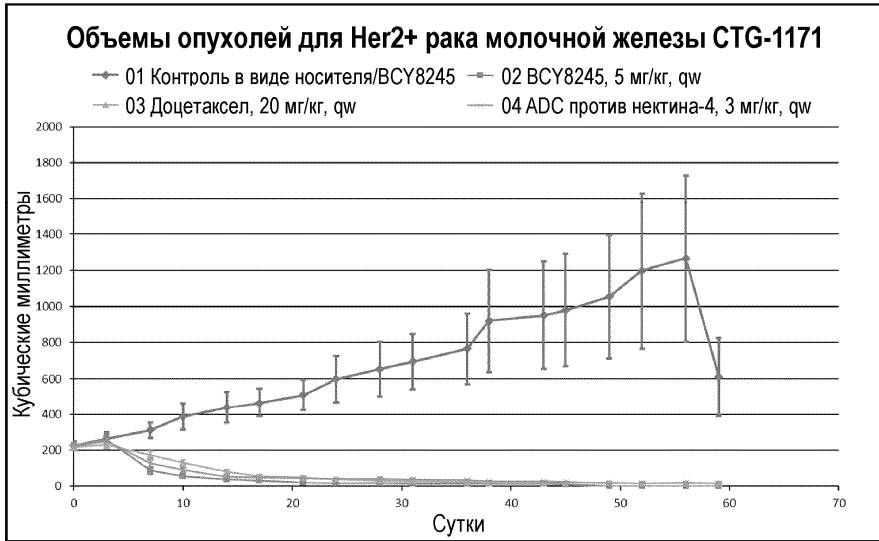


(A)

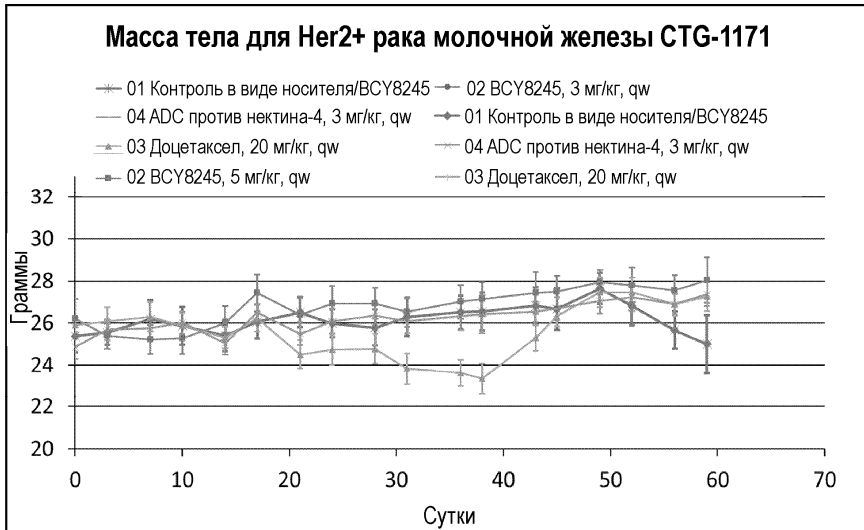


(B)

Фиг. 28

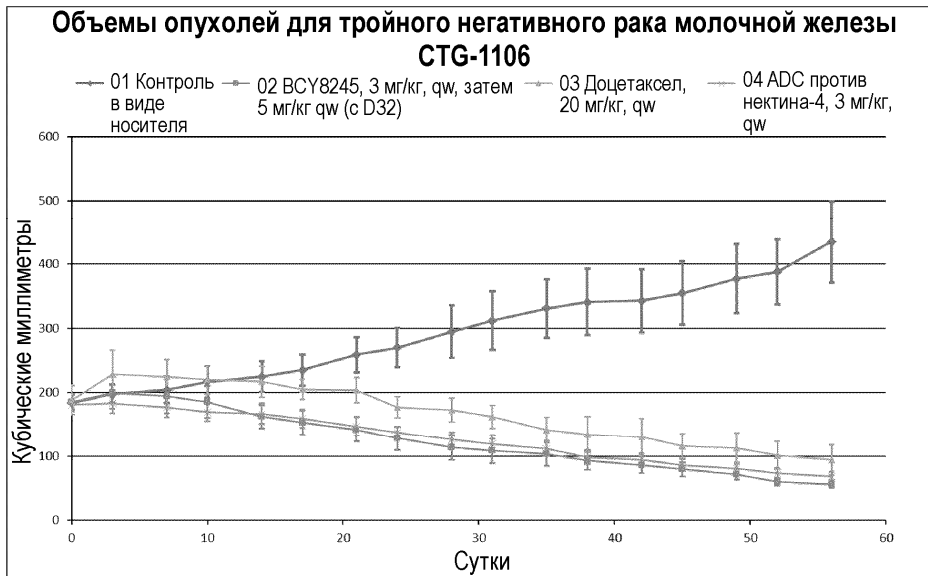


(A)

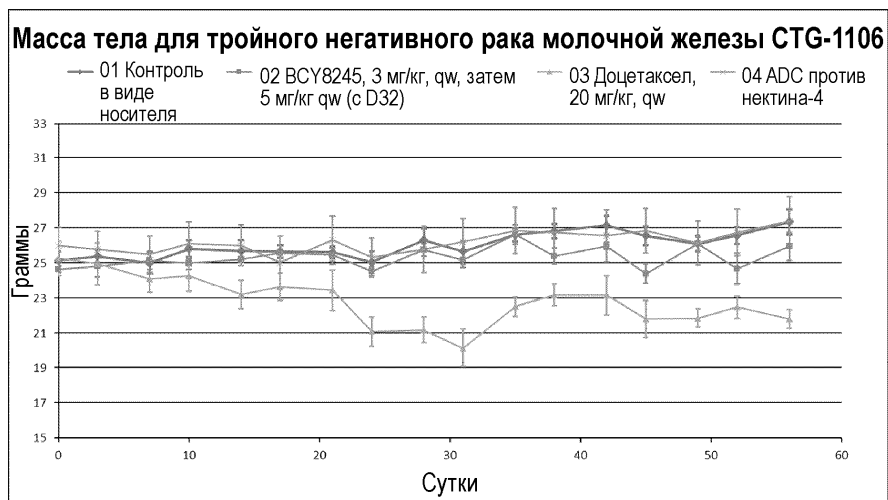


(B)

Фиг. 29

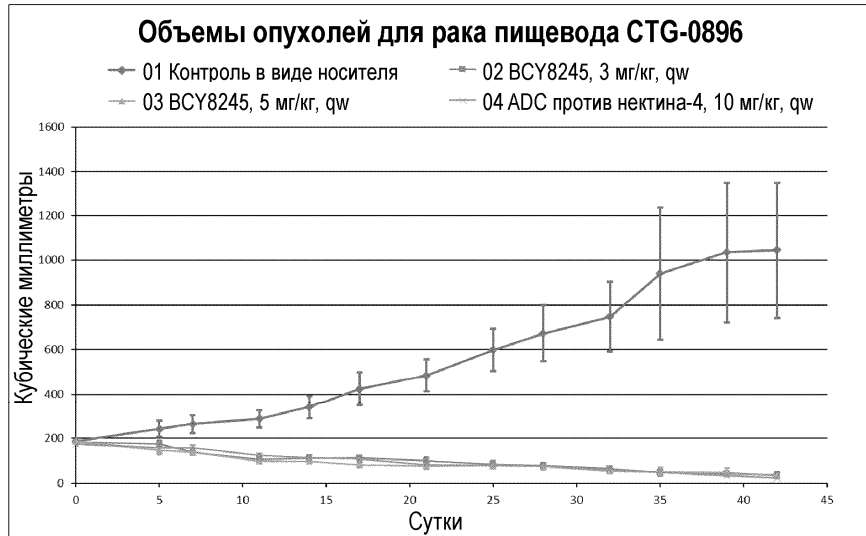


(A)

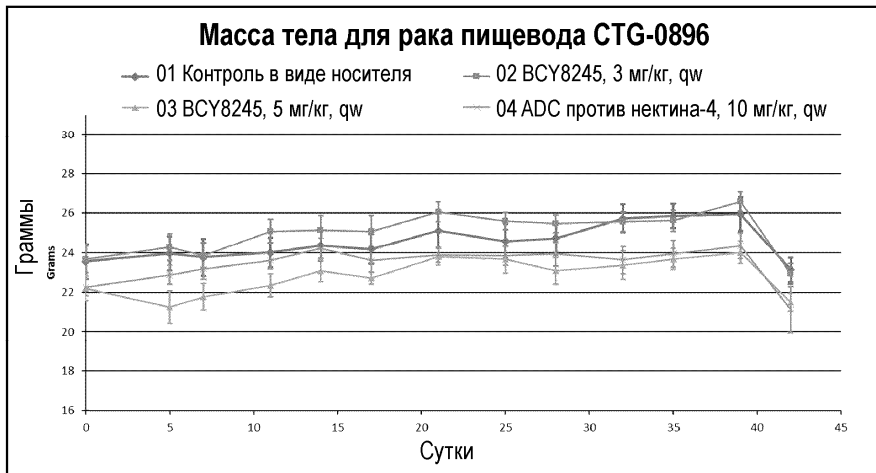


(B)

Фиг. 30

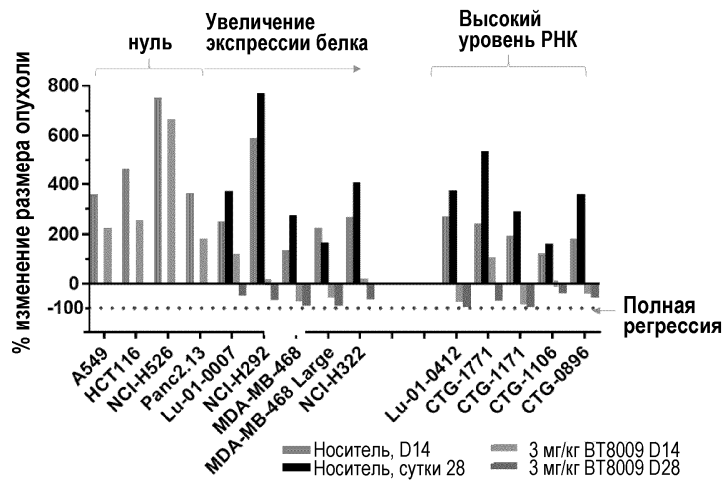


(A)

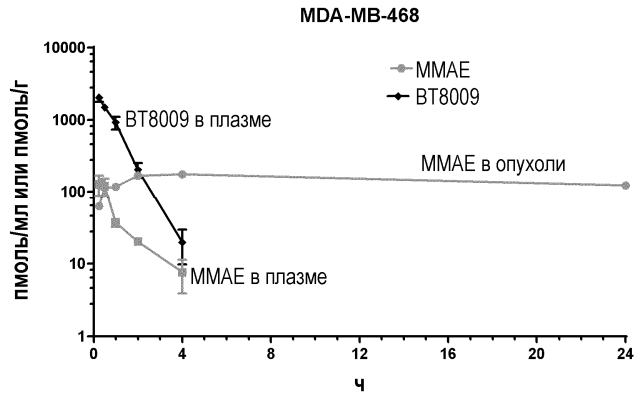


(B)

Фиг. 31

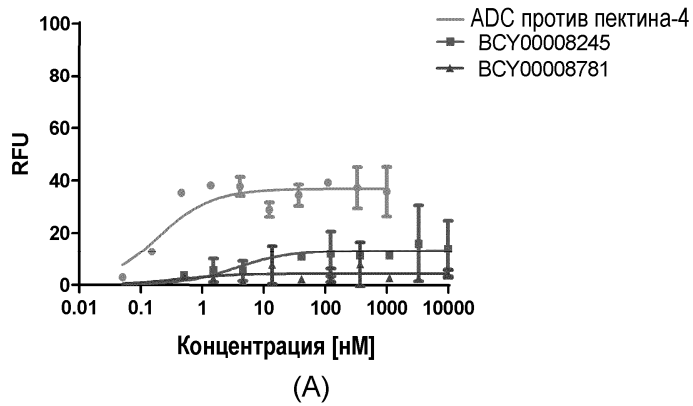


045804



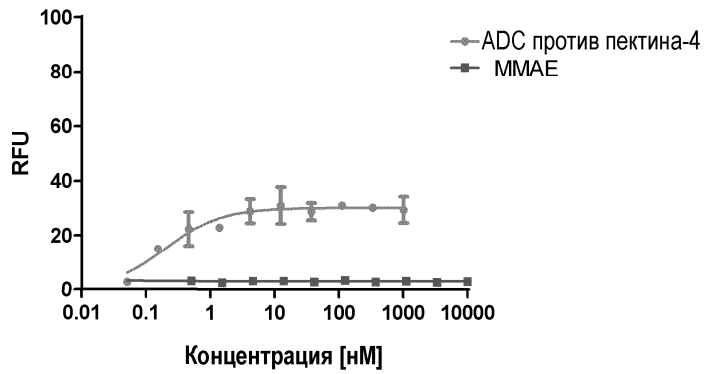
Фиг. 33

[Клеточная] (Мембранная) средняя интенсивность CH2 (AVG) при 4 °C  
Клеточная линия: MDA-MB-468



(A)

[Клеточная] (Мембранная) средняя интенсивность CH2 (AVG) при 4 °C  
Клеточная линия: MDA-MB-468



(B)

Фиг. 34



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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