

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293148 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.06.13

(22) Дата подачи заявки  
2021.06.11

(51) Int. Cl. *G01N 33/574* (2006.01)  
*A61K 38/12* (2006.01)  
*A61K 47/64* (2017.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 7/64* (2006.01)

---

(54) ЛЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ  
ЭРИТРОПОЭТИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОГО РЕЦЕПТОРА A2  
(EPC/A2)

---

(31) 63/038,279

(32) 2020.06.12

(33) US

(86) PCT/GB2021/051451

(87) WO 2021/250418 2021.12.16

(71) Заявитель:

БИСАЙКЛЕТКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Беннетт Гэвин, Блэкмор Стивен,  
Кемпбелл Карли, Ригби Майкл (GB)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

---

(57) Изобретение относится к конъюгату бициклического токсина ВТ5528, или его фармацевтически приемлемым солям, или его фармацевтическим композициям, и их применению.

---

A1

202293148

202293148

A1

**ЛЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ  
ЭРИТРОПОЭТИН-ПРОДУЦИРУЮЩЕГО ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОГО  
РЕЦЕПТОРА A2 (EPHA2)  
ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

5 [0001] Настоящее изобретение относится к конъюгатам бициклического токсина, специфичным в отношении EphA2, или их фармацевтически приемлемым солям, или их фармацевтическим композициям, и вариантам применения для предупреждения или  
лечения заболевания, нарушения или состояния, характеризующегося сверхэкспрессией  
эритропоэтин-продуцирующего гепатоцеллюлярного рецептора A2 (EphA2) в пораженной  
10 ткани, например, в опухолевой ткани.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0002] Циклические пептиды способны с высокой аффинностью и специфичностью в отношении мишени связываться с белковыми мишенями и, следовательно, являются  
15 привлекательным классом молекул для разработки терапевтических средств. Фактически, несколько циклических пептидов уже успешно используются в клинической практике, например, антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противораковое лекарственное средство октреотид (Driggers *et al.* (2008), Nat Rev Drug  
Discov 7 (7), 608-24). Эффективные связывающие свойства являются результатом  
20 относительно большой поверхности взаимодействия, образованной между пептидом и мишенью, а также сниженной конформационной гибкости циклических структур. Обычно макроциклические соединения связываются с поверхностями в несколько сотен квадратных ангстрем, как, например, антагонист циклического пептида CXCR4 CVX15 (400 Å<sup>2</sup>; Wu *et al.* (2007), Science 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом связывания  
25 Arg-Gly-Asp с интегрином αVβ3 (355 Å<sup>2</sup>) (Xiong *et al.* (2002), Science 296 (5565), 151-5) или циклический пептидный ингибитор uroain-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å<sup>2</sup>; Zhao *et al.* (2007), J Struct Biol 160 (1), 1-10).

[0003] Из-за своей циклической конфигурации пептидные макроциклы менее гибки, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с  
30 мишенями и приводит к более высокой аффинности связывания. Уменьшенная гибкость также приводит к блокировке конформаций, специфичных для мишени, повышая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект был продемонстрирован мощным и селективным ингибитором матриксной металлопротеиназы 8 (ММР-8), который утратил свою селективность по сравнению с другими ММР, когда его  
35 кольцо было раскрыто (Cherney *et al.* (1998), J Med Chem 41 (11), 1749-51). Благоприятные

свойства связывания, достигаемые за счет макроциклизации, еще более выражены у мультициклических пептидов, имеющих более одного пептидного кольца, как, например, у ванкомицина, низина и актиномицина.

5 **[0004]** Различные исследовательские группы ранее связывали полипептиды с цистеиновыми остатками с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), *J. Org. Chem*; Timmerman *et al.* (2005), *ChemBioChem*). Мелоен и его коллеги использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации поверхности белков (Timmerman *et al.* (2005), *ChemBioChem*).  
10 Способы получения лекарственных соединений-кандидатов, в которых указанные соединения получают путем связывания цистеинсодержащих полипептидов с молекулярным каркасом, например, 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).

15 **[0005]** Комбинаторные подходы на основе фагового дисплея были разработаны для создания и скрининга больших библиотек бициклических пептидов на интересующие мишени (Heinis *et al.* (2009), *Nat Chem Biol* 5 (7), 502-7 и WO 2009/098450). Вкратце, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащие три цистеиновых остатка и две области из шести случайных аминокислот (Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys), экспонировали на фage и циклизовали путем ковалентного связывания боковых цепей цистеина с  
20 небольшой молекулярный каркас.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0006]** Как описано в данном документе, авторы настоящего изобретения обнаружили, что уровни EphA2 в пораженной ткани указывают на реакцию пациента на лечение  
25 конъюгатом бициклического токсина, специфическим в отношении EphA2. EphA2 сверхэкспрессируется во многих трудно поддающихся лечению опухолях, таких как NSCLC, TNBC, рак поджелудочной железы, яичников, желудка/верхних отделов желудочно-кишечного тракта и уротелиальные формы рака. EphA2 экспрессируется при относительно низком уровне в нормальных тканях взрослого человека. EphA2 представлял  
30 собой мишень для некоторых других лекарственных средств, которые оказались неэффективными в клинической практике из-за неприемлемой токсичности.

**[0007]** В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ идентификации или отбора пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, включающий измерение уровня EphA2 в пораженной ткани пациента и отбор пациента,  
35 имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани.

5 [0008] В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения заболевания у пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, например, как определено с использованием способа, описанного в данном документе, включающий введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

10 [0009] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания у пациента, включающий отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, например, с применением способа, описанного в данном документе, и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

15 [0010] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак, например, рак, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления пораженная ткань представляет собой опухолевую ткань. В некоторых вариантах осуществления конъюгат бициклического токсина, специфический в отношении EphA2, выбран из конъюгатов, описанных в данном документе.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ВАРИАНТОВ

20

### ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

#### 1. Общее описание определенных вариантов осуществления изобретения:

25 [0011] Уровни EphA2 в опухолевых тканях измеряли с помощью анализов ИНС окрашивания. Было обнаружено, что уровни EphA2 на мембране опухолевых клеток и в цитоплазме опухолевых клеток указывают на чувствительность опухоли к лечению конъюгатом бициклического токсина, специфическим в отношении EphA2. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией или механизмом, авторы настоящего изобретения обнаружили, что опухоль, имеющая повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, с большей вероятностью будет характеризоваться положительным результатом от лечения конъюгатом бициклического токсина, специфическим в отношении EphA2. Также было обнаружено, что опухоль с повышенным уровнем EphA2 на мембране опухолевых клеток с большей вероятностью будет характеризоваться положительным результатом от лечения VT5528.

30 [0012] Соответственно, в одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ идентификации или отбора пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, включающий измерение уровня EphA2 в пораженной ткани пациента и

отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани.

**[0013]** В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения заболевания у пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, например, как определено с использованием способа, описанного в данном документе, включающий введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

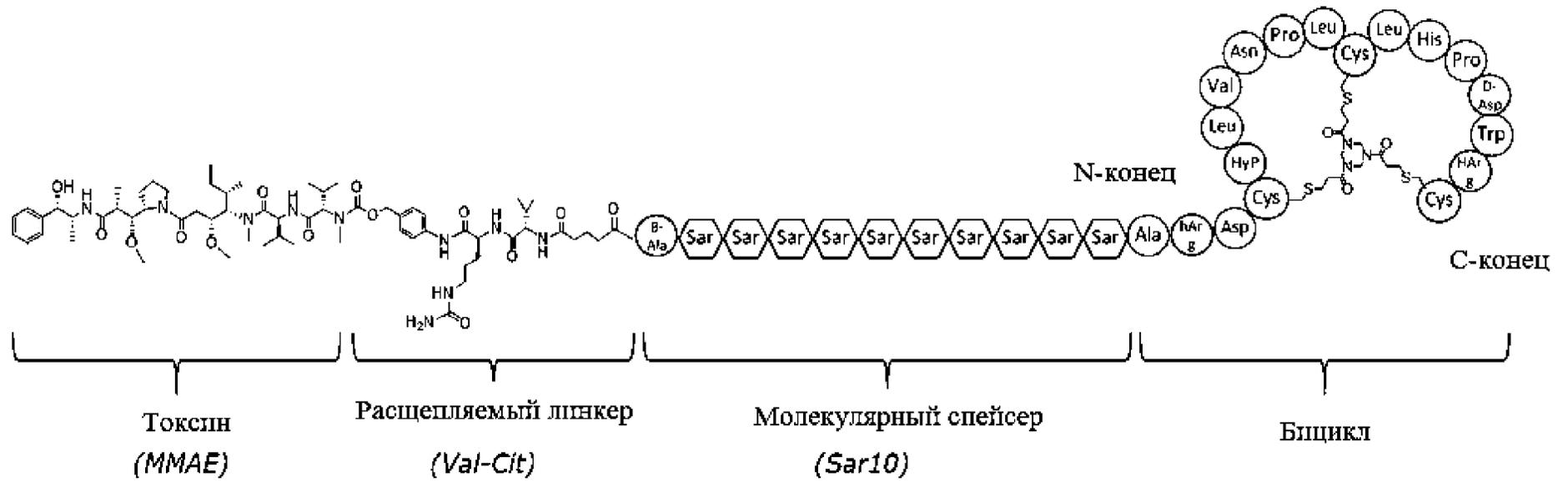
**[0014]** В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания у пациента, включающий отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, например, с применением способа, описанного в данном документе, и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

## 15 **2. Соединения и определения:**

**[0015]** Используемый в данном документе термин «конъюгат бициклического токсина, специфический в отношении EphA2» относится к конъюгату бициклическому токсина, который специфически связывается с EphA2. Различные конъюгаты бициклического токсина, специфические для EphA2, были описаны ранее, например, в US 2019/0184025, WO 2019/122861 и WO 2019/122863, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

**[0016]** Термин «BT5528», используемый в данном документе, представляет собой конъюгат бициклического токсина, имеющий структуру, показанную ниже, или его фармацевтически приемлемую соль, где молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (TATA), а пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность:

( $\beta$ -Ala)-Sar<sub>10</sub>-A(HArg)D-C<sub>i</sub>(HyP)LVNPLC<sub>ii</sub>LHP(D-Asp)W(HArg)C<sub>iii</sub> (SEQ ID NO: 1),  
где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин, а HyP представляет собой гидроксипролин.



**BT5528**

**[0017]** Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к тем солям, которые в рамках здравого медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями человека и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п., и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области техники. Например, S. M. Berge et al., подробно описывает фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1–19, включенной в данный документ посредством ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений по настоящему изобретению включают соли, полученные из подходящих неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных солей добавления кислот являются соли аминогрупп, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и хлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с помощью других методов, используемых в данной области техники, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, fumarat, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканат, валератные соли и т.п.

**[0018]** Соли, полученные из соответствующих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов, аммония и  $N^+(C_{1-4}алкил)_4$ . Типовые соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и тому подобные. Дополнительные фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, низший алкилсульфонат и арилсульфонат. Следует понимать, что солевые формы входят в объем настоящего изобретения, и ссылки на пептидные лиганды включают солевые формы указанных лигандов.

**[0019]** Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного

соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, с помощью обычных химических методов, таких как методы, 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 могут быть получены реакцией форм свободной кислоты или основания этих соединений с соответствующим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе, или в их смеси.

**[0020]** Если не указано иное, структуры, изображенные в данном документе, также включают все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные)) формы структуры; например, R- и S-конфигурации для каждого асимметричного центра, Z- и E-изомеры с двойной связью и конформационные Z- и E-изомеры. Таким образом, отдельные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) смеси данных соединений входят в объем настоящего изобретения. Если не указано иное, все таутомерные формы соединений по настоящему изобретению входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, если не указано иное, структуры, изображенные в данном документе, также включают соединения, которые отличаются только наличием одного или нескольких атомов, обогащенных изотопами. Например, соединения, имеющие структуры по настоящему изобретению, включая замену водорода на дейтерий или тритий или замену углерода на  $^{13}\text{C}$ - или  $^{14}\text{C}$ -обогащенный углерод, входят в объем настоящего изобретения. Такие соединения применимы, например, в качестве аналитических средств, в качестве зондов в биологических анализах или в качестве терапевтических средств в соответствии с настоящим изобретением.

**[0021]** Используемые в данном документе термины «приблизительно» или «примерно» имеют значение в пределах 20% от заданного значения или диапазона. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» относится к значениям в пределах 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от заданного значения.

### **3. Описание иллюстративных вариантов осуществления настоящего изобретения**

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ идентификации или отбора пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани, включающий измерение уровня EphA2 в опухолевой ткани пациента и отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически

приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе пациенту, имеющему повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента, имеющего рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента, имеющего рак желудка. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента, имеющего рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента, имеющего рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента, имеющего немелкоклеточный рак легких (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента, имеющего трижды негативный рак молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой пациента, имеющего рак яичников.

**[0024]** В некоторых вариантах осуществления опухолевая ткань представляет собой опухолевую ткань поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления опухолевая ткань представляет собой опухолевую ткань желудка. В некоторых вариантах осуществления опухолевая ткань представляет собой опухолевую ткань мочевого пузыря. В некоторых вариантах реализации опухолевая ткань представляет собой опухолевую ткань головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления опухолевая ткань представляет собой опухолевую ткань немелкоклеточного рака легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления опухолевая ткань представляет собой опухолевую ткань трижды негативного рака молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах осуществления опухолевая ткань представляет собой опухолевую ткань яичника.

**[0025]** Используемый в данном документе термин «повышенный уровень EphA2» относится к тому, что определенный процент клеток в опухолевой ткани имеет обнаруживаемое количество EphA2, например, на мембране опухолевых клеток или в цитоплазме опухолевых клеток, или и на том и в другом. В некоторых вариантах осуществления EphA2 положительный относится к тому, что приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95% клеток в опухолевой ткани имеют определяемое количество EphA2, например, на мембране опухолевых клеток или в цитоплазме опухолевых клеток, или и на том и в другом.

**[0026]** Существует множество способов измерения количества EphA2 в ткани. В

некоторых вариантах осуществления способ измерения уровня EphA2 в опухолевой ткани пациента включает использование анализа иммуногистохимического (ИНС) окрашивания EphA2. В некоторых вариантах осуществления анализ ИНС окрашивания EphA2 в опухолевой ткани включает окрашивание среза опухолевой ткани с использованием антитела к EphA2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека избирательно связывается с внеклеточным доменом (ECD) EphA2. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с ECD EphA2, представляет собой антитело к EphA2 человека AF3035. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека избирательно связывается с цитоплазматическим доменом EphA2. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с цитоплазматическим доменом EphA2, представляет собой антитело к EphA2 человека CST6997.

**[0027]** В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека находится в концентрации до приблизительно 50 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека находится в концентрации до приблизительно 40 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека находится в концентрации до приблизительно 30 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека находится в концентрации до приблизительно 20 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека находится в концентрации до приблизительно 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека находится в концентрации приблизительно 5 мкг/мл, приблизительно 6 мкг/мл, приблизительно 7 мкг/мл, приблизительно 8 мкг/мл, приблизительно 9 мкг/мл, приблизительно 10 мкг/мл, приблизительно 11 мкг/мл, приблизительно 12 мкг/мл, приблизительно 13 мкг/мл, приблизительно 14 мкг/мл или приблизительно 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с ECD EphA2, такое как AF3035, находится в концентрации приблизительно 5 мкг/мл, приблизительно 6 мкг/мл, приблизительно 7 мкг/мл, приблизительно 8 мкг/мл, приблизительно 9 мкг/мл, приблизительно 10 мкг/мл, приблизительно 11 мкг/мл, приблизительно 12 мкг/мл, приблизительно 13 мкг/мл, приблизительно 14 мкг/мл или приблизительно 15 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с ECD EphA2, такое как AF3035, находится в концентрации приблизительно 10 мкг/мл.

**[0028]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ идентификации и отбора пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани, включающий измерение интенсивности в срезе опухолевой ткани

пациента с использованием анализа ИНС окрашивания EphA2, и отбора пациента, который имеет положительное окрашивание в анализе ИНС окрашивания EphA2. В некоторых вариантах осуществления анализ ИНС окрашивания EphA2 описан в примере 2 в данном документе.

5 **[0029]** Используемый в данном документе термин «пациент, который имеет положительное окрашивание» относится к пациенту, имеющему определенный процент клеток в срезе опухолевой ткани, которые окрашиваются положительно в анализе ИНС окрашивания EphA2. В некоторых вариантах осуществления пациент, который имеет положительное окрашивание, имеет приблизительно 5%, приблизительно 10%,  
10 приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95% клеток в срезе опухолевой ткани, которые окрашиваются  
15 положительно в анализе ИНС окрашивания EphA2.

**[0030]** Существует множество способов измерения интенсивности окрашивания в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления интенсивность окрашивания измеряют визуальной оценкой, например, ручной оценкой с использованием обычной световой микроскопии. В некоторых вариантах осуществления интенсивность  
20 окрашивания измеряют с помощью компьютерного анализа тканей (СТА). Уровни интенсивности окрашивания могут быть следующими: отсутствие окрашивания (0), слабое окрашивание (1+), среднее окрашивание (2+) или сильное окрашивание (3+). В некоторых вариантах осуществления интенсивность окрашивания измеряют на мембране опухолевых клеток среза опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления интенсивность  
25 окрашивания измеряют в цитоплазме опухолевых клеток среза опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления интенсивность окрашивания измеряют как на мембране опухолевых клеток, так и в цитоплазме опухолевых клеток среза опухолевой ткани.

**[0031]** В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится  
30 к Н-индексу, составляющему приблизительно 15 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу, составляющему приблизительно 20 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу, составляющему приблизительно 30  
35 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах

осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу, составляющему приблизительно 40 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу, составляющему приблизительно 50 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу, составляющему приблизительно 75 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу, составляющему приблизительно 100 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу, составляющему приблизительно 125 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу, составляющему приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания.

**[0032]** Н-индекс представляет собой сумму произведений процента клеток на интенсивность их окрашивания по шкале от 0 до 3, как описано выше (отсутствие окрашивания (0), слабое окрашивание (1+), среднее окрашивание (2+) или сильное окрашивание (3+)):

$$[((0 \times (\% \text{ клеток по } 0)) + ((1 \times (\% \text{ клеток по } 1+)) + ((2 \times (\% \text{ клеток по } 2+)) + ((3 \times (\% \text{ клеток по } 3)))])]$$

**[0033]** Н-индекс может быть получен для различных компартментов в срезе опухолевой ткани, включая, например, мембрану и цитоплазму опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления Н-индекс относится к Н-индексу мембраны опухолевых клеток, которая представляет собой сумму произведений процента клеток на интенсивность окрашивания их клеточной мембраны по шкале от 0 до 3, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления Н-индекс относится к Н-индексу цитоплазмы опухолевых клеток, которая представляет собой сумму произведений процента клеток на интенсивность окрашивания их цитоплазмы по шкале от 0 до 3, как описано выше.

**[0034]** В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу мембраны опухолевых клеток, составляющему приблизительно 15 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу мембраны опухолевых клеток, составляющему приблизительно 20 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу мембраны опухолевых клеток, составляющему приблизительно 30 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах



приблизительно 125 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания. В некоторых вариантах осуществления положительное окрашивание относится к Н-индексу цитоплазмы опухолевых клеток, составляющему приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания.

5 **[0036]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ идентификации или отбора пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани, включающий измерение интенсивности окрашивания в срезе опухолевой ткани пациента с использованием анализа ИНС окрашивания EphA2 и отбор  
10 пациента, имеющего Н-индекс, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше.

**[0037]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ идентификации или отбора пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в  
15 опухолевой ткани, включающий измерение интенсивности окрашивания в срезе опухолевой ткани пациента с использованием анализа ИНС окрашивания EphA2 и отбор пациента, имеющего Н-индекс мембраны опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно  
20 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше.

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ идентификации или отбора пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани, включающий измерение интенсивности окрашивания в срезе  
25 опухолевой ткани пациента с использованием анализа ИНС окрашивания EphA2 и отбор пациента, имеющего Н-индекс цитоплазмы опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или  
30 приблизительно 150 или больше.

**[0039]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, например, с применением описанного в данном документе, и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в  
35 отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической

композиции на его основе. В некоторых вариантах осуществления повышенный уровень EphA2 соответствует описанному в данном документе.

**[0040]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего повышенный  
5 уровень EphA2 в опухолевой ткани и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе. В некоторых вариантах осуществления повышенный уровень EphA2 соответствует описанному в данном документе.

**[0041]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен  
10 способ лечения рака у пациента, включающий измерение уровня EphA2 в срезе опухолевой ткани пациента, отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе. В некоторых вариантах осуществления повышенный уровень  
15 EphA2 соответствует описанному в данном документе.

**[0042]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головы и шеи.  
20 В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичников.

**[0043]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен  
25 способ лечения рака у пациента, имеющего Н-индекс, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания  
30 EphA2 и включающий введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе. В некоторых вариантах осуществления анализ ИНС окрашивания EphA2 описан в данном документе.

**[0044]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен  
35 способ лечения рака у пациента, имеющего Н-индекс мембраны опухолевых клеток,

составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2 и включающий введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

5  
10  
15  
**[0045]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, имеющего Н-индекс цитоплазмы опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2 и включающий введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

20  
25  
**[0046]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего Н-индекс, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2 и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

30  
35  
**[0047]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего Н-индекс мембраны опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2 и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

**[0048]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен

способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего Н-индекс цитоплазмы опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2 и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

**[0049]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, включающий измерение интенсивности окрашивания в срезе опухолевой ткани пациента с использованием анализа ИНС окрашивания EphA2, отбор пациента, имеющего Н-индекс, составляющий приблизительно 15 или больше, примерно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше, и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

**[0050]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, включающий измерение интенсивности окрашивания в срезе опухолевой ткани пациента с использованием анализа ИНС окрашивания EphA2, отбор пациента, имеющего Н-индекс мембраны опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше, и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

**[0051]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, включающий измерение интенсивности окрашивания в срезе опухолевой ткани пациента с использованием анализа ИНС окрашивания EphA2, отбор пациента, имеющего Н-индекс цитоплазмы опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, примерно 20 или более, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше, и введение пациенту конъюгата бициклического токсина,

специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

5 [0052] В некоторых вариантах осуществления конъюгат бициклического токсина, специфический в отношении EphA2, выбран из соединений, описанных в US 2019/0184025, WO 2019/122861 и WO 2019/122863, каждое из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0053] В некоторых вариантах осуществления конъюгат бициклического токсина, специфический в отношении EphA2, представляет собой BT5528, как описано в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль.

10 [0054] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, например, с применением описанного в данном документе, и введение пациенту BT5528, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

15 [0055] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, имеющего Н-индекс мембраны опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно  
20 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2 и включающий введение пациенту BT5528, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

[0056] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего повышенный  
25 уровень EphA2 в опухолевой ткани и введение пациенту BT5528, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

[0057] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего Н-индекс мембраны опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или  
30 больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания и введение пациенту BT5528, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

35 [0058] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен

способ лечения рака у пациента, включающий измерение уровня EphA2 опухолевой ткани пациента, отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани и введение пациенту BT5528, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

5 **[0059]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ лечения рака у пациента, включающий измерение интенсивности окрашивания в срезе опухолевой ткани пациента с использованием анализа ИНС окрашивания EphA2, отбор пациента, имеющего N-индекс мембраны опухолевых клеток, составляющий  
10 приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше, и введение пациенту BT5528, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.

**[0060]** Конъюгат бициклического токсина, специфический в отношении EphA2, или его  
15 фармацевтически приемлемая соль, или его фармацевтическая композиция могут быть введены пациенту в различных диапазонах доз.

**[0061]** В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической  
20 композиции на его основе в дозе, составляющей приблизительно 1 мг/кг или меньше. В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе в дозе, составляющей приблизительно 0,9 мг/кг, приблизительно 0,8 мг/кг,  
25 приблизительно 0,7 мг/кг, приблизительно 0,6 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 0,4 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг, приблизительно 0,2 мг/кг или приблизительно 0,1 мг/кг.

**[0062]** В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической  
30 композиции на его основе в дозе, составляющей приблизительно 100 мг/м<sup>2</sup> или меньше. В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению включает введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе в дозе, составляющей приблизительно 90 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 80 мг/м<sup>2</sup>,  
35

приблизительно 70 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 50 мг/м<sup>2</sup>,  
приблизительно 40 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 30 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 25 мг/м<sup>2</sup>,  
приблизительно 22,5 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 20 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 17,5 мг/м<sup>2</sup>,  
приблизительно 15 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 12,5 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 10 мг/м<sup>2</sup>,  
5 приблизительно 7,5 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 5 мг/м<sup>2</sup>, приблизительно 2,5 мг/м<sup>2</sup> или  
приблизительно 1 мг/м<sup>2</sup>. В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему  
изобретению включает введение пациенту конъюгата бициклического токсина,  
специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или  
фармацевтической композиции на его основе в дозе, составляющей от приблизительно 2  
10 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 25 мг/м<sup>2</sup>.

**[0063]** Конъюгат бициклического токсина, специфический в отношении EphA2, или его  
фармацевтически приемлемая соль, или его фармацевтическая композиция могут быть  
введены пациенту с различными частотами доз. В некоторых вариантах осуществления  
способ по настоящему изобретению включает введение конъюгата бициклического  
15 токсина, специфического для EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или  
фармацевтической композиции на его основе пациенту с частотой введения одной дозы  
каждые 2 дня, одной дозы каждые 3 дня, одной дозы каждые 4 дня, одной дозы каждые 5  
дней, одной дозы каждые 6 дней или одной дозы каждые 7 дней. В некоторых вариантах  
осуществления способ по настоящему изобретению включает введение пациенту  
20 конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его  
фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе с  
частотой введения двух доз в неделю, одной дозы в неделю, одной дозы каждые две недели,  
одной дозы каждые три недели или одной дозы каждые 4 недели.

#### 25 4. Составление и введение

**[0064]** В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в данном документе,  
включает введение фармацевтической композиции, содержащей конъюгат бициклического  
токсина, специфический в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли,  
как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или  
30 несущую среду. В некоторых вариантах осуществления конъюгат бициклического токсина,  
специфический в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемую соль  
составляют для в/в введения пациенту.

**[0065]** Термин «фармацевтически приемлемый носитель, адъювант или несущая среда»  
относится к нетоксичному носителю, адъюванту или несущей среде, которые не нарушают  
35 фармакологическую активность соединения, с которым он составлен. Фармацевтически

приемлемые носители, адъюванты или несущие среды, которые можно использовать в композициях по настоящему документу, включают без ограничения ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, белки сыворотки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воды, солей или электролитов, таких как протаминасульфат, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилен-полиоксипропилен, полиэтиленгликоль и шерстяной жир.

**[0066]** Композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально, парентерально, с помощью ингаляционного спрея, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через имплантированный резервуар. Термин «парентеральный», как используется в данном документе, включает подкожную, внутривенную, внутримышечную, внутрисуставную, интрасиновиальную, интрастернальную, интратекальную, внутрипеченочную, внутриочаговую и внутричерепную инъекцию или способы инфузии. Предпочтительно композиции вводят перорально, внутрибрюшинно или внутривенно. Стерильные инъекционные формы композиций настоящего изобретения могут представлять собой водную или масляную суспензию. Эти суспензии могут быть составлены в соответствии со способами, известными в данной области техники, с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств. Стерильный препарат для инъекций может находиться в виде стерильного раствора для инъекций или суспензии в нетоксичном парентерально-приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые можно применять, являются вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные, неподвижные масла обычно используют в качестве растворителя или суспендирующей среды.

**[0067]** Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные подходят при приготовлении инъекционных растворов, также как и натуральные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в форме их полиоксиэтилированных производных. Эти масляные растворы или суспензии могут также содержать разбавитель или диспергирующее средство на основе длинноцепочечного спирта, такие как

карбоксиметилцеллюлоза или аналогичные диспергирующие средства, которые обычно используются в составлении фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включая эмульсии и суспензии. Другие обычно используемые поверхностно-активные вещества, такие как Tween, Span и другие эмульгаторы или усилители биодоступности, которые

5 обычно используются при изготовлении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм, также могут быть использованы для целей составления.

**[0068]** Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально в любой приемлемой для перорального применения лекарственной форме, включая без ограничения капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. В

10 случае таблеток для перорального применения обычно используемые носители включают лактозу и кукурузный крахмал. Также обычно добавляют смазывающие средства, такие как стеарат магния. Для перорального введения в форме капсулы применимые разбавители включают лактозу и сушеный кукурузный крахмал. Когда водные суспензии необходимы для перорального применения, активный ингредиент объединяют с эмульгирующими и

15 суспендирующими средствами. При желании могут быть добавлены некоторые подслащивающие, ароматизирующие или красящие вещества.

**[0069]** В качестве альтернативы фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению можно вводить в виде суппозиториев для ректального введения. Они могут быть получены путем смешивания данного средства с подходящим не

20 раздражающим вспомогательным веществом, которое является твердым при комнатной температуре, но жидким при ректальной температуре и, следовательно, расплавится в прямой кишке, чтобы высвободить лекарственное средство. К таким материалам относятся масло какао, пчелиный воск и полиэтиленгликоли.

**[0070]** Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению также

25 можно вводить местно, особенно когда мишень лечения включает области или органы, легко доступные посредством местного применения, включая заболевания глаз, кожи или нижнего кишечного тракта. Подходящие местные составы легко готовят для каждой из этих областей или органов.

**[0071]** Местное применение для нижних отделов кишечного тракта может

30 осуществляться в виде ректальных суппозиториев (см. выше) или подходящих составов для клизмы. Также могут быть применяться трансдермальные пластыри для местного применения.

**[0072]** Для местного применения представленные фармацевтически приемлемые композиции могут быть составлены в подходящей мази, содержащей активный компонент,

35 суспендированный или растворенный в одном или более носителей. Носители для местного

введения соединений по настоящему изобретению включают без ограничения минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтилен, соединение полиоксипропилена, воск неионный эмульгированный и воду. В качестве альтернативы представленные фармацевтически приемлемые композиции могут быть составлены в 5 подходящем лосьоне или креме, содержащем активные компоненты, суспендированные или растворенные в одном или более фармацевтически приемлемых носителях. Подходящие носители включают без ограничения минеральное масло, моностеарат сорбитана, полисорбат 60, воск цетиловых эфиров, цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и воду.

10 **[0073]** Для офтальмологического применения представленные фармацевтически приемлемые композиции могут быть составлены в виде микронизированных суспензий в изотоническом стерильном физиологическом растворе с отрегулированным рН или, предпочтительно, в виде растворов в изотоническом стерильном физиологическом 15 растворе с отрегулированным рН, как с консервантом, так и без него, таким как хлорид бензилалкония. В качестве альтернативы для офтальмологического применения фармацевтически приемлемые композиции могут быть составлены в виде мази, такой как вазелин.

**[0074]** Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению также можно вводить с помощью назального аэрозоля или ингаляции. Такие композиции 20 получают в соответствии с методиками, хорошо известными в области получения фармацевтического состава, и могут быть получены в виде растворов в физиологическом растворе с использованием бензилового спирта или других подходящих консервантов, промоторов абсорбции для повышения биодоступности, фторуглеродов и/или других принятых солюбилизующих или диспергирующих средств.

25 **[0075]** Наиболее предпочтительно фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению составляют для перорального введения. Такие составы можно вводить с пищей или без нее. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению вводят без пищи. В других вариантах осуществления фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению 30 вводят с пищей.

**[0076]** Количества соединений по настоящему изобретению, которые можно комбинировать с материалами-носителями для получения композиции в разовой лекарственной форме, будут варьироваться в зависимости от подвергаемого лечению 35 хозяина и конкретного способа введения. Предпочтительно предложенные композиции должны быть составлены таким образом, что пациенту, получающему эти композиции,

может вводиться доза соединения от 0,01 до 1 мг/кг массы тела/день.

**[0077]** Следует также понимать, что конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая активность конкретно применяемого соединения, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, время введения, скорость выделения, комбинацию лекарственных средств и суждение лечащего врача и степень тяжести конкретного заболевания, которое подвергается лечению. Количество соединения по настоящему изобретению в композиции также будет зависеть от конкретного соединения в композиции.

## 10 **5. Варианты применения**

**[0078]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани, например, с применением способа, описанного в данном документе, и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе. В некоторых вариантах осуществления способ лечения дополнительно включает измерение уровня EphA2 в опухолевой ткани пациента, например, с использованием ИНС анализа, как описано в данном документе.

**[0079]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в пораженной ткани, например, с применением описанного в данном документе, и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе. В некоторых вариантах осуществления способ лечения дополнительно включает измерение уровня EphA2 в опухолевой ткани пациента, например, с использованием ИНС метода, как описано в данном документе.

### *Рак*

**[0080]** Рак или пролиферативное нарушение или опухоль, подлежащие лечению с использованием способов и вариантов применения, описанных в данном документе, включают без ограничения гематологический рак, лимфому, миелому, лейкоз, неврологический рак, рак кожи, рак молочной железы, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, рак желудочно-кишечного тракта, рак печени, рак поджелудочной железы, рак мочеполовой системы, рак костей, рак почек и рак сосудов.

**[0081]** Рак, подлежащий лечению с использованием способов, описанных в данном документе, может быть выбран из колоректального рака, такого как микросателлитно-стабильный (MSS) метастатический колоректальный рак, включая распространенный или прогрессирующий микросателлитно-стабильный (MSS) CRC; немелкоклеточный рак легких (NSCLC), такой как распространенный и/или метастатический NSCLC; рак яичников; рак молочной железы, такой как воспалительный рак молочной железы; рак эндометрия; рак шейки матки; рак головы и шеи; рак желудка; рак желудочно-пищеводного соединения; и рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления колоректальный рак представляет собой метастатический колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления колоректальный рак представляет собой микросателлитно-стабильный (MSS) метастатический колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой распространенный или прогрессирующий микросателлитно-стабильный (MSS) CRC. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой немелкоклеточный рак легких (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой прогрессирующий и/или метастатический NSCLC. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичников. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой воспалительный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак эндометрия. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудочно-пищеводного соединения. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря.

**[0082]** В некоторых вариантах осуществления различные виды рака включают без ограничения лейкозы (например, острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому (например, ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому), макроглобулинемию Вальденстрема, множественную миелому, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому,

- хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, саркому Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчного протока, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, рак яичка, карциному легких, мелкоклеточную карциному легких, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, мультиформную глиобластому (GBM, также известную как глиобластома), медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, акустическую невриному, олигодендроглиому, шванному, нейрофибросаркому, менингиому, меланому, нейробластому и ретинобластому).
- 15 **[0083]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой глиому, астроцитому, мультиформную глиобластому (GBM, также известную как глиобластома), медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, акустическую неврину, олигодендроглиому, шванному, нейрофибросаркому, менингиому, меланому, нейробластому или ретинобластому.
- 20 **[0084]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой неврину слухового нерва, астроцитому (например, I степени – пилоцитарную астроцитому, II степени – астроцитому низкой степени злокачественности, III степени – анапластическую астроцитому или IV степень – глиобластому (GBM)), хордому, лимфому ЦНС, краниофарингиому, глиому ствола головного мозга, эпендимому, смешанную глиому, глиому зрительного нерва, субэпендимому, медуллобластому, менингиому, метастатическую опухоль головного мозга, олигодендроглиому, опухоли гипофиза, примитивную нейроэктодермальную (PNET) опухоль или шванному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой тип, чаще обнаруживаемый у детей, чем у взрослых, такой как глиома ствола головного мозга, краниофарингиома, эпендимомма, ювенильная пилоцитарная астроцитомма (JPA), медуллобластома, глиома зрительного нерва, опухоль шишковидного тела, примитивные нейроэктодермальные опухоли (PNET) или рабдоидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой взрослого человека. В некоторых вариантах осуществления пациент представляет собой ребенка или пациента-ребенка.
- 30 **[0085]** В другом варианте осуществления различные виды рака включают без
- 35

ограничения мезотелиому, гепатобилиарный рак (печенки и желчных протоков), рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную меланому, рак яичников, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта (желудка, колоректальный и двенадцатиперстной кишки), рак матки, рак фаллопиевых труб, рак эндометрия, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, болезнь Ходжкина, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак предстательной железы, рак яичка, хронический или острый лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, лимфоцитарные лимфомы, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, почечно-клеточный рак, рак почки таза, неходжкинскую лимфому, опухоли оси позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, рак коры надпочечников, рак желчного пузыря, множественную миелому, холангиокарциному, фибросаркому, нейробластому, ретинобластому или комбинацию одного или нескольких из вышеперечисленных видов рака.

**[0086]** В некоторых вариантах осуществления рак выбран из гепатоцеллюлярной карциномы, рака яичника, рака эпителия яичников или рака фаллопиевых труб; папиллярной серозной цистаденокарциномы или папиллярной серозной карциномы матки (UPSC); рака предстательной железы; рака яичек; рака желчного пузыря; гепатохолангиокарциномы; синовиальной саркомы мягких тканей и костей; рабдомиосаркомы; остеосаркомы; хондросаркомы; саркомы Юинга; анапластического рака щитовидной железы; аденокарциномы; рак поджелудочной железы; протоковой карциномы поджелудочной железы или аденокарциномы поджелудочной железы; рака желудочно-кишечного тракта/желудка (GIST); лимфомы; плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN); рака слюнных желез; глиомы или рака головного мозга; злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, ассоциированных с нейрофиброматозом-1 (MPNST); макроглобулинемии Вальденстрема; или медуллобластомы.

**[0087]** В некоторых вариантах осуществления рак выбран из гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), гепатобластомы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака яичников, рака эпителия яичников, рака фаллопиевых труб, папиллярной серозной цистаденокарциномы, папиллярной серозной карциномы матки (UPSC), гепатохолангиокарциномы, рака мягких тканей и костной синовиальной саркомы, рабдомиосаркомы, остеосаркомы, анапластического рака щитовидной железы, аденокарциномы; аденокарциномы; рака поджелудочной железы, карциномы протоков

поджелудочной железы, аденокарциномы поджелудочной железы, глиомы, злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, ассоциированных с нейрофиброматозом-1 (MPNST), макроглобулинемии Вальденстрема или медуллобластомы.

5 **[0088]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, такую как саркома, карцинома или лимфома. Сплошные опухоли обычно состоят из аномальной массы ткани, которая обычно не включает кисты или жидкие участки. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из почечно-клеточной карциномы или рака почки; гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) или гепатобластомы, или рака печени; 10 меланомы; рака молочной железы; колоректальной карциномы или колоректального рака; рака толстой кишки; рака прямой кишки; анального рака; рака легких, такого как немелкоклеточный рак легких (NSCLC) или мелкоклеточный рак легких (SCLC); рака яичников, рака эпителия яичников, рака яичников или рака фаллопиевых труб; папиллярной серозной цистаденокарциномы или папиллярной серозной карциномы матки 15 (UPSC); рака предстательной железы; рака яичек; рака желчного пузыря; гепатохолангиокарциномы; синовиальной саркомы мягких тканей и костей; рабдомиосаркомы; остеосаркомы; хондросаркомы; саркомы Юинга; анапластического рака щитовидной железы; адренокортикальной карциномы; рака поджелудочной железы; протоковой карциномы поджелудочной железы или аденокарциномы поджелудочной 20 железы; рака желудочно-кишечного тракта/желудка (GIST); лимфомы; плоскоклеточного рака головы и шеи (SCCHN); рака слюнных желез; глиомы или рака головного мозга; злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, ассоциированных с нейрофиброматозом-1 (MPNST); макроглобулинемии Вальденстрема; или медуллобластомы.

25 **[0089]** В некоторых вариантах осуществления рак выбран из почечно-клеточной карциномы, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), гепатобластомы, колоректальной карциномы, колоректального рака, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака анального канала, рака яичников, рака эпителия яичников, рака яичников, рака фаллопиевых труб, папиллярно-серозной цистаденокарциномы, папиллярно-серозной карциномы матки 30 (UPSC), гепатохолангиокарциномы, синовиальной саркомы мягких тканей и костей, рабдомиосаркомы, остеосаркомы, хондросаркомы, анапластического рака щитовидной железы, адренокортикального рака, рака поджелудочной железы, протоковой карциномы поджелудочной железы, аденокарциномы поджелудочной железы, глиомы, рака головного мозга, злокачественных опухолей оболочек периферических нервов (MPNST), 35 ассоциированных с нейрофиброматозом-1, макроглобулинемии Вальденстрема или

медуллобластомы.

**[0090]** В некоторых вариантах осуществления рак выбран из гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), гепатобластомы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака яичников, рака эпителия яичников, карциномы яичников, рака фаллопиевых труб, папиллярной серозной цистаденокарциномы, папиллярной серозной карциномы матки (UPSC), гепатохолангиокарциномы, рака мягких тканей и костной синовиальной саркомы, рабдомиосаркомы, остеосаркомы, анапластического рака щитовидной железы, адренокортикальной карциномы, рака поджелудочной железы, карциномы протоков поджелудочной железы, аденокарциномы поджелудочной железы, глиомы, злокачественных опухолей оболочек периферических нервов, ассоциированных с нейрофиброматозом-1 (MPNST), макроглобулинемии Вальденстрема или медуллобластомы.

**[0091]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (HCC). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гепатобластому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак прямой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичников или карциному яичников. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак эпителия яичников. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак фаллопиевых труб. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой папиллярную серозную цистаденокарциному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой папиллярную серозную карциному матки (UPSC). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гепатохолангиокарциному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой синовиальную саркому мягких тканей и костей. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рабдомиосаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой остеосаркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой анапластический рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой адренокортикальную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы или карциному протоков поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой аденокарциному поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой глиому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой злокачественные опухоли оболочек периферических нервов (MPNST). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой MPNST, ассоциированную с

нейрофиброматозом-1. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой макроглобулинемию Вальденстрема. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой медуллобластому.

**[0092]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), аденокарциному, рак анального канала, рак аппендикса, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль, базально-клеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, опухоль головного мозга, астроцитому, опухоль головного и спинного мозга, глиому ствола головного мозга, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, эмбриональные опухоли центральной нервной системы, рак молочной железы, бронхиальные опухоли, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, карциному неизвестного происхождения, рак центральной нервной системы, рак шейки матки, различные виды рака у детей, хордому, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), хронические миелопролиферативные заболевания, рак толстой кишки, колоректальный рак, краниофарингиому, Т-клеточную лимфому кожи, протоковую карциному in situ (DCIS), эмбриональные опухоли, рак эндометрия, эпендимобластому, эпендимому, рак пищевода, эстеиоидную опухоль, саркому Юинга, экстракраниальную герминогенную опухоль, внегонадный герминогенный рак, рак внепеченочных желчных протоков, рак глаз, фиброзную гистиоцитому костей, рак желчного пузыря, рак желудка, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST), герминогенную опухоль, герминогенную опухоль яичников, гестационную трофобластную опухоль, глиому, волосато-клеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоцеллюлярный рак, гистиоцитоз, рак клеток Лангерганса, лимфому Ходжкина, рак гортани, внутриглазную меланому, опухоли островковых клеток, саркому Капоши, рак почек, гистиоцитоз из клеток Лангерганса, рак гортани, лейкоз, рак губ и ротовой полости, рак печени, лобулярную карциному in situ (LCIS), рак легких, лимфому, лимфому, связанную со СПИДом, макроглобулинемию, рак молочной железы у мужчин, медуллобластому, медуллоэпителиому, меланому, карцинома из клеток Меркеля, злокачественную мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи неясного происхождения, первичную карциному срединного тракта с участием гена NUT, рак ротовой полости, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/новообразование плазматических клеток, грибовидный микоз, миелодиспластический синдром, миелодиспластическое/миелопролиферативное новообразование, хронический миелогенный лейкоз (CML), острый миелоидный лейкоз

(AML), миелому, множественную миелому, хроническое миелопролиферативное заболевание, рак носовой полости, рак околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легких, рак полости рта, рак ротовой полости, рак губы, рак ротоглотки, остеосаркому, рак яичников, рак 5 поджелудочной железы, папилломатоз, параганглиому, рак околоносовых пазух, рак носовой полости, рак паращитовидной железы, рак полового члена, рак глотки, феохромоцитому, паренхиматозные опухоли шишковидной железы промежуточной дифференцировки, пинеобластому, опухоль гипофиза, новообразование плазматических клеток, плевропульмональную бластому, рак молочной железы, первичную лимфому 10 центральной нервной системы (ЦНС), рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почек, светлоклеточную почечную карциному, рак почечной лоханки, рак мочеточника, переходно-клеточный рак, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому, синдром Сезари, рак кожи, мелкоклеточный рак легких, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак шеи 15 неизвестного происхождения, плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), рак желудка, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, Т-клеточную лимфому, рак яичек, рак горла, тимому, карциному тимуса, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), гестационную трофобластическую опухоль неясного 20 происхождения, необычные виды рака у детей, рак уретры, рак матки, саркому матки, макроглобулинемию Вальденстрема или опухоль Вильмса.

**[0093]** В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака мочевого пузыря, рака молочной железы (включая TNBC), рака шейки матки, колоректального рака, хронического лимфолейкоза (CLL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), 25 аденокарциномы пищевода, глиобластомы головы и шеи, лейкоза (острого и хронического), глиомы низкой степени злокачественности, рака легких (включая аденокарциному, немелкоклеточный рак легких и плоскоклеточный рак), лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (NHL), меланомы, множественной миеломы (MM), рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака почек 30 (включая светлоклеточную карциному почек и папиллярно-клеточную карциному почек) и рака желудка.

**[0094]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, колоректальный рак, множественную миелому, острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз (ALL), рак 35 поджелудочной железы, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, нейробластому, другие

солидные опухоли или другие гематологические виды рака.

**[0095]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, колоректальный рак, множественную миелому или AML.

5 **[0096]** В настоящем изобретении дополнительно представлены способы и композиции для диагностики, прогнозирования и лечения рака, ассоциированного с вирусом, включая солидные опухоли, ассоциированные с вирусом иммунодефицита человека (HIV), неизлечимые солидные опухоли, положительные в отношении папилломавируса человека (HPV)-16, и Т-клеточный лейкоз у взрослых, который вызывается вирусом Т-клеточного лейкоза человека типа I (HTLV-I) и представляет собой высокоагрессивную форму CD4+ Т-клеточного лейкоза, характеризующуюся клональной интеграцией HTLV-I в лейкозные клетки (см. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02631746>); а также вирус-ассоциированных опухолей при раке желудка, раке носоглотки, раке шейки матки, раке влагалища, раке вульвы, плоскоклеточной карциноме головы и шеи и раке из клеток Меркеля. (см. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02488759>; см. также <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT0240886>; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02426892>)

**[0097]** В некоторых вариантах осуществления рак или опухоль включает любой из видов рака, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рак включает рак меланому. В некоторых вариантах осуществления рак включает рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак включает рак легких. В некоторых вариантах осуществления рак включает мелкоклеточный рак легких (SCLC). В некоторых вариантах осуществления рак включает немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления способы или варианты применения, описанные в данном документе, ингибируют, уменьшают или останавливают рост или распространение рака или опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы или варианты применения, описанные в данном документе, ингибируют, уменьшают или останавливают дальнейший рост рака или опухоли. В некоторых вариантах осуществления способы или варианты применения, описанные в данном документе, уменьшают размер (например, объем или массу) рака или опухоли на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 99% относительно размера рака или опухоли до лечения. В некоторых вариантах осуществления способы или варианты применения, описанные в данном документе, уменьшают количество различных видов рака или опухолей у пациента на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере

50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 99% относительно количества различных видов рака или опухолей до лечения.

**[0099]** Соединения и композиции в соответствии со способами по настоящему изобретению можно вводить в любом количестве и любым способом введения, эффективным для лечения или уменьшения тяжести рака или опухоли. Требуемое точное количество варьируется от субъекта к субъекту в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести заболевания или состояния, конкретного средства, способа его введения и т.п. Соединения и композиции в соответствии со способами по настоящему изобретению предпочтительно изготавливают в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и однородности дозировки. Выражение «единичная лекарственная форма», используемое в данном документе, относится к физически дискретной единице средства, подходящей для пациента, подлежащего лечению. Однако следует понимать, что общее ежедневное использование соединений и композиций определяется лечащим врачом в рамках обоснованного медицинского заключения. Конкретный эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента зависит от множества факторов, включая нарушение, подлежащее лечению, и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого соединения; конкретный используемый состав; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион пациента; время введения, способ введения и скорость выведения конкретного используемого соединения; продолжительность лечения; лекарственные средства, используемые в комбинации или одновременно с конкретным применяемым соединением; и подобные факторы, хорошо известные в медицине. Термины «пациент» или «субъект», используемые в данном документе, означают животное, предпочтительно млекопитающее, и наиболее предпочтительно человека.

**[0100]** Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению могут вводить людям и другим животным перорально, ректально, парентерально, интрацистернально, интравагинально, внутривнутрибрюшинно, местно (в виде порошка, мазей или капель), буккально, в виде перорального или назального спрея и т.п., в зависимости от тяжести заболевания или нарушения, подлежащих лечению. В некоторых вариантах осуществления соединения можно вводить перорально или парентерально при уровнях доз от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг и предпочтительно от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 25 мг/кг массы тела на человека в день, один или несколько раз в день, до получения желаемого терапевтического эффекта.

**[0101]** Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают без ограничения фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям жидкие

лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в данной области техники, например, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие средства и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукуруза, 5 масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, а также их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции могут также включать адьюванты, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и 10 суспендирующие средства, подсластители, ароматизаторы и отдушки.

**[0102]** Инъекционные формы, например, стерильные инъеклируемые водные или масляные суспензии, могут быть приготовлены в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих средств и суспендирующих средств. Стерильный препарат для инъекций может также представлять 15 собой стерильный раствор для инъекций, суспензию или эмульсию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые могут быть использованы, находится вода, раствор Рингера U.S.P., и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные, неподвижные масла обычно используют в качестве 20 растворителя или суспендирующей среды. Для данной цели можно использовать любое нелетучее масло со слабовыраженным вкусом, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, в препарате инъекционных лекарственных форм используются жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

**[0103]** Инъекционные составы можно стерилизовать, например, путем фильтрации 25 через задерживающий бактерии фильтр и/или путем включения стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворять или диспергировать в стерильной воде или другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед применением.

**[0104]** Для продления действия соединения, описанного в данном документе, часто 30 желательно замедлять всасывание соединения от подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто за счет использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала со слабой растворимостью в воде. Тогда скорость всасывания соединения зависит от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера и формы кристаллов. В качестве альтернативы 35 замедленное всасывание парентерально вводимого соединения обеспечивают путем

растворения или суспендирования соединения в масляном носителе. Формы депо для инъекций получают путем образования матриц микрокапсул соединения в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения соединения к полимеру и природы конкретного используемого полимера скорость высвобождения соединения можно контролировать. Примеры других биоразлагаемых полимеров включают сложные поли(ортоэфир) и поли(ангидриды). Инъекционные депо-составы также получают путем включения соединения в липосомы или микроэмульсии, совместимые с тканями организма.

5  
10  
15  
**[0105]** Композиции для ректального или вагинального введения предпочтительно представляют собой суппозитории, которые можно приготовить путем смешивания соединений по настоящему изобретению с подходящими нераздражающими наполнителями или носителями, такими как масло какао, полиэтиленгликоль или воск для суппозиториев, которые являются твердыми при температуре окружающей среды, но жидкими при температуре тела, и поэтому тают в прямой кишке или полости влагалища и высвобождают активное соединение.

20  
25  
30  
**[0106]** Твердые лекарственные формы для перорального введения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активное соединение смешивают по меньшей мере с одним инертным фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем, таким как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или а) наполнителями или разбавителями, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота б) связующие, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и гуммиарабик, с) увлажнители, такие как глицерин, d) дезинтегрирующие средства, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия, e) средства, замедляющие растворение, такие как парафин, f) ускорители абсорбции, такие как соединения четвертичного аммония, g) смачивающие средства, такие как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина, h) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина, и i) смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственная форма также может содержать буферные средства.

35  
**[0107]** Твердые композиции подобного типа также могут применяться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с применением таких наполнителей как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и тому подобное. Твердые лекарственные формы таблеток, драже,

капсул, пилюль и гранул могут быть приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтических препаратов. Они могут необязательно содержать замутнительные средства, а также могут находиться в составе, в котором они высвобождают активный ингредиент (ингредиенты) только или предпочтительно в определенной части кишечного тракта, необязательно, замедленным образом. Примеры заливочных композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Твердые композиции аналогичного типа также можно использовать в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с использованием таких вспомогательных веществ, как лактоза или молочный сахар а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

**[0108]** Активные соединения также могут быть в микрокапсулированной форме с одним или более наполнителями, как указано выше. Твердые лекарственные формы таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия, покрытия, контролирующее высвобождение, и другие покрытия, хорошо известные в области фармацевтических препаратов. В таких твердых лекарственных формах активное соединение может быть смешано с по меньшей мере одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие лекарственные формы могут также содержать, как это принято на практике, дополнительные вещества, отличные от инертных разбавителей, *например*, смазывающие вещества для таблетирования и другие вспомогательные вещества для таблетирования, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственные формы также могут содержать буферные средства. Они могут необязательно содержать замутнительные агенты, а также могут быть в составе, в котором они высвобождают активный ингредиент (ингредиенты) только или предпочтительно в определенной части кишечного тракта, необязательно, замедленным образом. Примеры заливочных композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски.

**[0109]** Лекарственные формы для местного или трансдермального применения соединения по настоящему изобретению включают мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, порошки, растворы, спреи, средства для ингаляции или пластыри. Активный компонент смешивают в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и любыми необходимыми консервантами или буферами, которые могут потребоваться. Офтальмологический состав, ушные капли и глазные капли также входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, настоящее изобретение предусматривает применение чрескожных пластырей, которые имеют дополнительное преимущество, заключающееся в

обеспечении контролируемой доставки соединения в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены путем растворения или распределения соединения в подходящей среде. Усилители всасывания также можно использовать для повышения потока соединения через кожу. Скорость может контролироваться либо предоставлением регулирующей скорости мембраны, либо диспергированием соединения в полимерной матрице или геле.

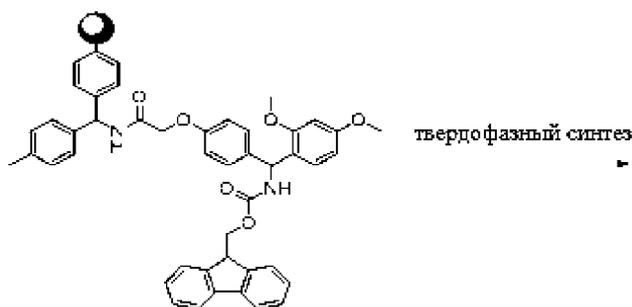
### ИЛЛЮСТРАЦИЯ НА ПРИМЕРАХ

[0110] Следующие примеры предназначены для иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие его. Все аминокислоты, если не указано иное, использовали в L-конфигурациях.

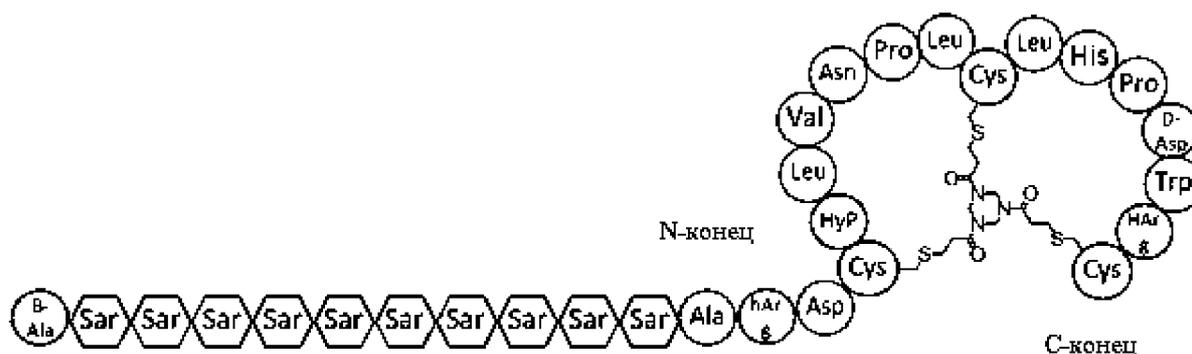
Сокращения	Название
Ac	Ацетил
$\beta$ -Ala	$\beta$ -аланин
D-Asp	D-аспарагиновая кислота
HArg	Гомоаргинин
Hyp	Гидроксипролин
Sar	Саркозин, такой как Sar <sub>x</sub> представляет собой x остатков Sar

#### Пример 1: Синтез VT5528

##### Получение бициклического пептида 1



15



**[0111]** Пептиды синтезировали методом твердофазного синтеза. Использовали смолу Rink Amide MBHA. К смеси, содержащей Rink Amide MBHA (0,4-0,45 ммоль/г) и Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,0 экв.), добавляли DMF, затем добавляли DIC (3 экв.) и HOAt (3 экв.) и перемешивали в течение 1 часа. Для деблокирования использовали 20% пиперидин в DMF.

5 Каждую последующую аминокислоту связывали с 3 экв. с использованием активирующих реагентов, DIC (3,0 экв.) и HOAT (3,0 экв.) в DMF. Реакцию контролировали с помощью цветной реакции с нингидрином или с помощью цветной реакции с тетрахлором. После завершения синтеза пептидную смолу промывали DMF x 3, MeOH x 3, а затем сушили при барботировании N<sub>2</sub> в течение ночи. Затем пептидную смолу обрабатывали 92,5% TFA/2,5%

10 TIS/2,5% EDT/2,5% H<sub>2</sub>O в течение 3 ч. Пептид осаждали холодным изопропиловым эфиром и центрифугировали (3 мин при 3000 об/мин). Осадок дважды промывали изопропиловым эфиром, неочищенный пептид сушили в вакууме в течение 2 часов и затем лиофилизировали. Лиофилизированный порошок растворяли в смеси ACN/H<sub>2</sub>O (50:50) и добавляли раствор 100 мМ TATA в ACN, затем бикарбонат аммония в H<sub>2</sub>O (1M), и раствор перемешивали в течение 1 ч. После завершения циклизации реакцию гасили 1 М водн.

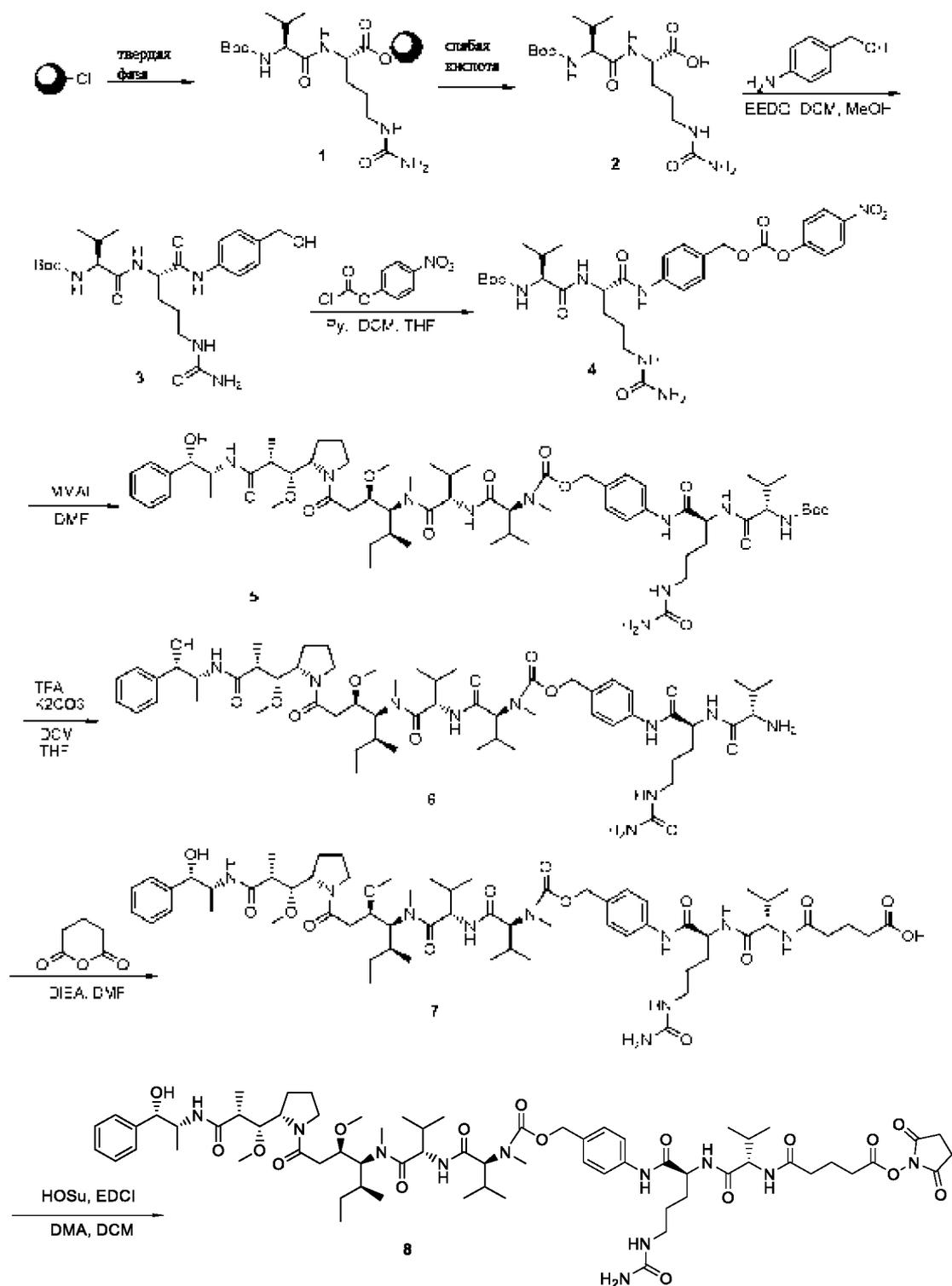
15 раствором гидрохлорида цистеина (10 экв. относительно TATA), затем смешивали и оставляли стоять на час. Раствор лиофилизировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный пептид очищали с помощью препаративной HPLC и лиофилизировали с получением бициклического **пептида 1**, имеющего аминокислотную последовательность:

20 (β-Ala)-Sar<sub>10</sub>-(SEQ ID NO: 1)-CONH<sub>2</sub>.

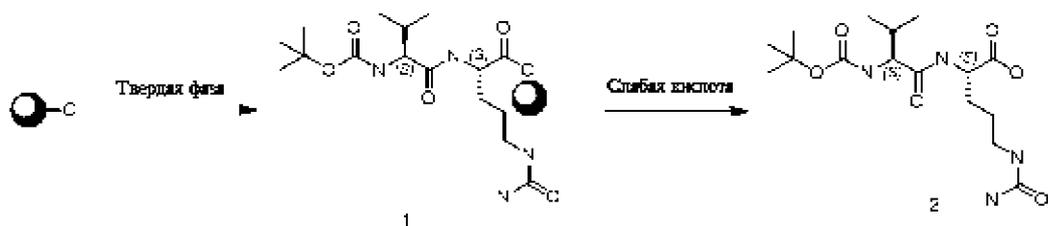
**[0112]** 8,0 г смолы использовали для получения 2,1 г бициклического пептида 1 (чистота 99,2%, выход 16,3%) в виде твердого вещества белого цвета.

Аналитические данные для бициклического пептида 1	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H <sub>2</sub> O B: 0,1% TFA в ACN
Поток:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150*4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	15-45% B в течение 20 минут, затем 3 мин 95% B
Время удерживания:	11,31 мин
LCMS (ESI):	m/z 1061,8 [M+3H] <sup>3+</sup> , 796,5 [M+4H] <sup>4+</sup>
М.м. пептида	3183,68

### Получение MMAE-PAVC-Cit-Val-глутарат-NHS



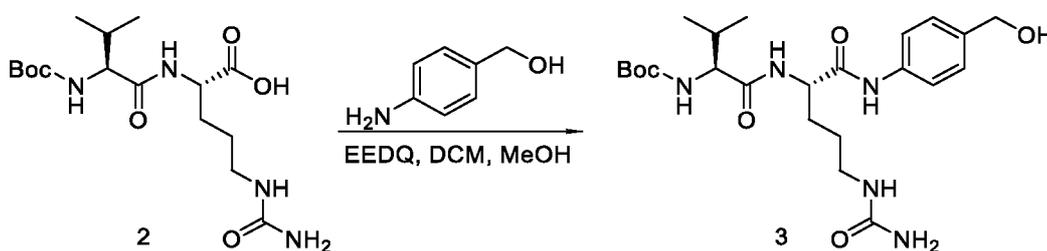
### Получение соединения 2



**[0113]** Пептид синтезировали методом твердофазного синтеза. Использовали 50 г смолы CTC (под.: 1,0 ммоль/г). К смеси, содержащей смолу CTC (50 ммоль, 50 г, 1,0 ммоль/г) и Fmoc-Cit-OH (19,8 г, 50 ммоль, 1,0 экв.), добавляли DCM (400 мл), затем добавляли DIEA (6,00 экв.) и перемешивали в течение 3 часов. Затем добавляли MeOH (50 мл) и перемешивали в течение 30 мин для укупорки. Для деблокирования использовали 20% пиперидин в DMF. Boc-Val-OH (32,5 г, 150 ммоль, 3 экв.) сочетали с 3 экв. с использованием HBTU (2,85 экв.) и DIPEA (6,0 экв.) в DMF (400 мл). Реакцию контролировали с помощью нингидринового цветового теста. После завершения синтеза пептидную смолу промывали DMF x 3, MeOH x 3, а затем сушили при барботировании N<sub>2</sub> в течение ночи. После этого пептидную смолу обрабатывали 20% HFIP/DCM в течение 30 мин 2 раза. Раствор удаляли на роторном испарителе с получением неочищенного продукта. Неочищенный пептид растворяли в ACN/H<sub>2</sub>O, затем дважды лиофилизировали с получением пептидного продукта (17,3 г неочищенного).

LCMS (ESI):	m/z 374,9 [M+H] <sup>+</sup>
Молекулярная масса	374,44

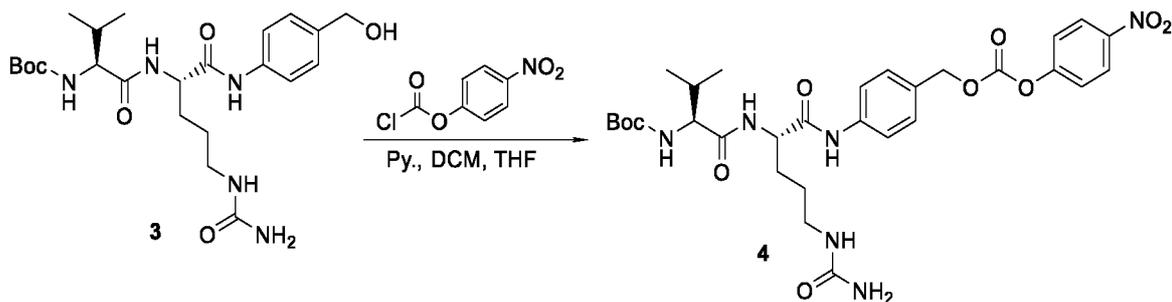
### 15 Получение соединения 3



**[0114]** Раствор соединения **2** (4,00 г, 10,68 ммоль, 1,00 экв.) в DCM (40,00 мл) и MeOH (20,00 мл) перемешивали при комнатной температуре, затем (4-аминофенил)метанол (1,58 г, 12,82 ммоль, 1,20 экв.) и EEDQ (5,28 г, 21,37 ммоль, 2,00 экв.) добавляли и смесь перемешивали в темноте в течение 9 часов. TLC (дихлорметан/метанол = 5/1, R<sub>f</sub> = 0,56) показала, что образовалось одно новое пятно. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя. Полученный остаток очищали методом флэш-хроматографии на силикагеле (ISCO®; испарительная колонка с силикагелем 120 г SepaFlash®, элюент 0~20% смесь этилацетат/петролейный эфир при 80 мл/мин). Соединение **3** (3,00 г, 6,26 ммоль, выход 58,57%) получали в виде твердого вещества белого цвета.

LCMS (ESI):	m/z 480,1 [M+H] <sup>+</sup>
Молекулярная масса	479,58

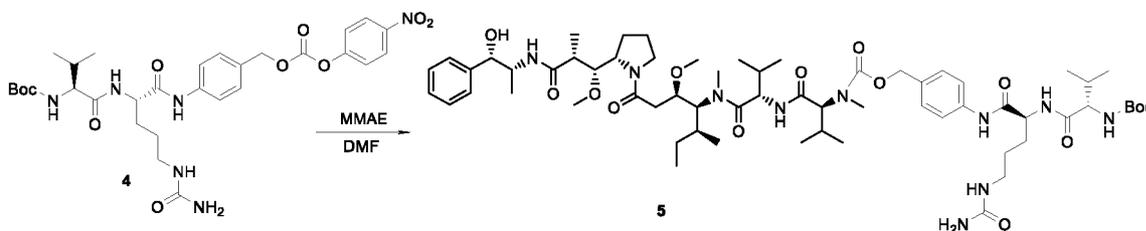
### Получение соединения 4



[0115] К раствору соединения **3** (3,00 г, 6,26 ммоль, 1,00 экв.) в безводном THF (35,00 мл) и безводном DCM (15,00 мл) добавляли (4-нитрофенил)хлорформиат (6,31 г, 31,30 ммоль, 5,00 экв.) и пиридин (2,48 г, 31,30 ммоль, 2,53 мл, 5,00 экв.) и смеси перемешивали при 25 °С в течение 5 часов. TLC (дихлорметан/метанол = 10/1, R<sub>f</sub> = 0,55) показала, что образовалось новое пятно. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали методом флэш-хроматографии на силикагеле (ISCO®; испарительная колонка с силикагелем 120 г SepaFlash®, элюент 0~10% смесь DCM/MeOH при 80 мл/мин). Соединение **4** (2,00 г, 3,10 ммоль, выход 49,56%) получали в виде твердого вещества белого цвета.

LCMS (ESI):	m/z 667,3 [M+Na] <sup>+</sup>
Молекулярная масса	644,68

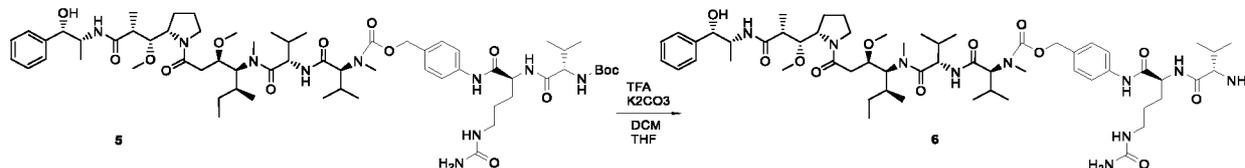
### Получение соединения 5



15 [0116] Смесь соединения **4** (278,43 мг, 387,80 мкмоль, 1,00 экв.) и DIEA (501,19 мг, 3,88 ммоль, 677,29 мкл, 10,00 экв.) в DMF (5,00 мл) перемешивали в атмосфере азота в течение 10 мин. Добавляли MMAE (250,00 мг, 387,80 мкмоль, 1,00 экв.) и HOBT (52,40 мг, 387,80 мкмоль, 1,00 экв.) и смесь перемешивали при 0 °С в атмосфере азота в течение 20 мин и перемешивали при 30 °С в течение дополнительных 18 часов. LC-MS продемонстрировала, что был обнаружен один основной пик с требуемой массой. Полученную смесь очищали методом флэш-хроматографии на силикагеле C18 (ISCO®; испарительная колонка с силикагелем 130 г SepaFlash® C18, элюент 0~50% смесь MeCN/H<sub>2</sub>O при 75 мл/мин). Соединение **5** (190,00 мг, 155,29 мкмоль, выход 40,04%) получали в виде твердого вещества белого цвета.

LCMS (ESI):	m/z 1223,4 [M+H] <sup>+</sup>
Молекулярная масса	1223,57

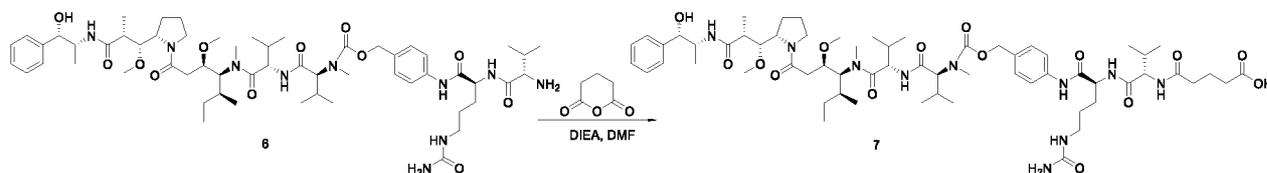
### Получение соединения 6



[0117] К раствору соединения **5** (170,00 мг, 138,94 мкмоль, 1,00 экв.) в DCM (2,70 мл) добавляли 2,2,2-трифторуксусную кислоту (413,32 мг, 3,62 ммоль, 268,39 мкл, 26,09 экв.) и смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение **5** было израсходовано полностью. Смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток растворяли в THF (10,00 мл) и добавляли K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (192,03 мг, 1,39 ммоль, 10,00 экв.), смесь перемешивали при комнатной температуре еще 3 ч. LC-MS продемонстрировала, что был обнаружен один основной пик с требуемой массой. Полученную реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали методом флэш-хроматографии на силикагеле C18 (ISCO®; испарительная колонка с силикагелем 130 г SepaFlash® C18, элюент 0~50% смесь MeCN/H<sub>2</sub>O при 75 мл/мин). Соединение **6** (110,00 мг, 97,92 мкмоль, выход 70,48%) получали в виде твердого вещества белого цвета.

LCMS (ESI):	m/z 1123,4 [M+H] <sup>+</sup>
Молекулярная масса	1123,45

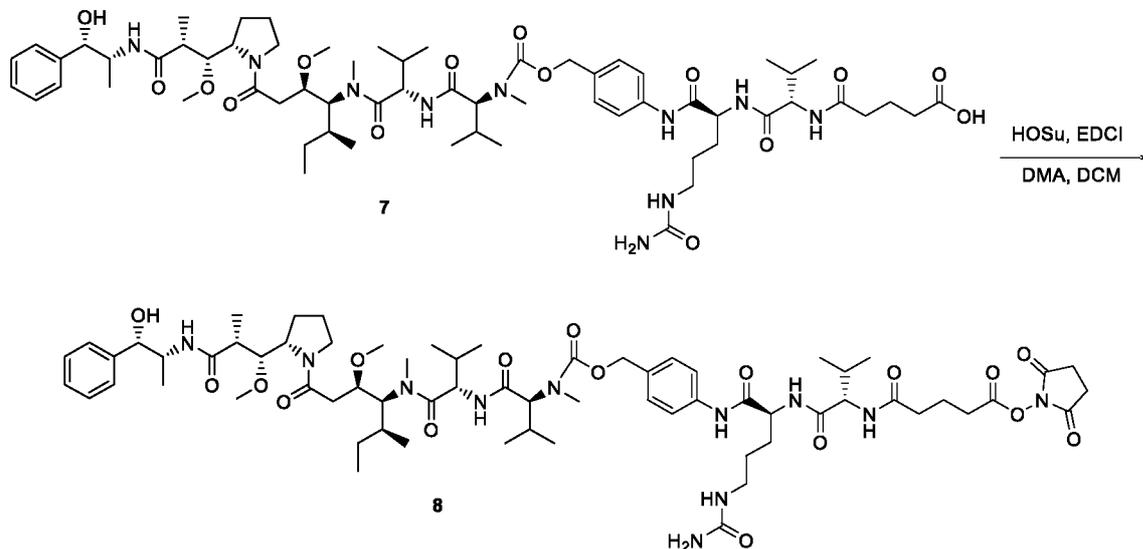
### Получение соединения 7



[0118] К раствору соединения **6** (110,00 мг, 97,92 мкмоль, 1,00 экв.) в DMA (5 мл), DIEA (25,31 мг, 195,83 мкмоль, добавляли 34,20 мкл, 2,00 экв.) и тетрагидропиран-2,6-дион (22,34 мг, 195,83 мкмоль, 2,00 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение **6** было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с требуемой массой. Реакционную смесь очищали методом флэш-хроматографии на силикагеле C18 (ISCO®; испарительная колонка с силикагелем 130 г SepaFlash® C18, элюент 0~50% смесь MeCN/H<sub>2</sub>O при 75 мл/мин). Соединение **7** (100,00 мг, 80,81 мкмоль, выход 82,53%) получали в виде твердого вещества белого цвета.

LCMS (ESI):	m/z 1237,4 [M+H] <sup>+</sup>
Молекулярная масса	1236,74

**Получение соединения 8 (ММАЕ-РАВС-Cit-Val-глутарат-NHS)**

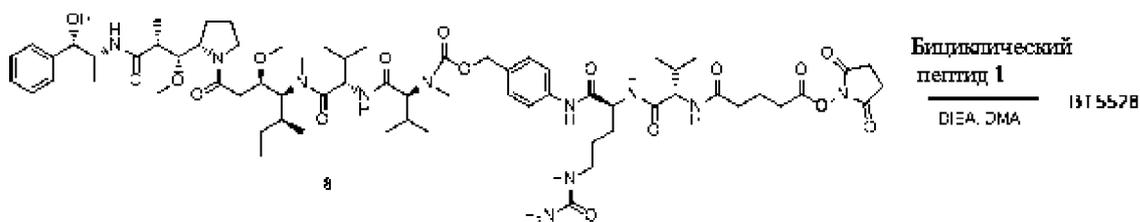


[0119] К раствору соединения 7 (100,00 мг, 80,81 мкмоль, 1,00 экв.) в DMA (4,5 мл) и DCM (1,5 мл) добавляли 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (27,90 мг, 242,42 мкмоль, 3,00 экв.) в N<sub>2</sub>, смесь перемешивали при 0 °С в течение 30 мин. К смеси добавляли EDCI (46,47 мг, 242,43 мкмоль, 3,00 экв.) и смесь перемешивали при 25 °С в течение дополнительных 16 ч. LC-MS продемонстрировала, что соединение 7 было полностью израсходовано, и был обнаружен один основной пик с требуемой массой. Реакционную смесь очищали методом флэш-хроматографии на силикагеле C18 (ISCO®; испарительная колонка с силикагелем 130 г SepaFlash® C18, элюент 0~50% смесь MeCN/H<sub>2</sub>O при 75 мл/мин). Соединение 8 (90,00 мг, 60,69 мкмоль, выход 75,11%) получали в виде твердого вещества белого цвета.

LCMS (ESI):	m/z 1334,5 [M+H] <sup>+</sup>
Молекулярная масса	1334,62

**Получение BT5528**

15 [0120] К раствору бициклического пептида 1 (1,0 – 1,3 экв.) в DMA добавляли DIEA (3 экв.) и соединение 8 (1 экв.). Смесь перемешивали при температуре 25 °С в течение 18 ч. Реакцию контролировали с помощью LC-MS и после ее завершения очищали непосредственно с помощью препаративной HPLC.



[0121] Бициклический пептид 1 (71,5 мг, 22,48 мкмоль) использовали в качестве бициклического реагента. BT5528 (40,9 мг, 9,05 мкмоль, выход 40,27%, чистота 97,42%) получали в виде твердого вещества белого цвета.

Аналитические данные для BT5528	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H <sub>2</sub> O B: 0,1% TFA в ACN
Поток:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150*4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 мин 95% B
Время удерживания:	11,35 мин
LCMS (ESI):	m/z 1468,1 [M+3H] <sup>3+</sup> , 1101,2 [M+4H] <sup>4+</sup> , 881,3 [M+5H] <sup>5+</sup>
М.м. пептида	4404,2

5

### Пример 2. ИНС анализ EphA2.

[0122] Этот анализ обнаруживает внеклеточный домен EphA2 (ECD), который является сайтом связывания BT5528.

#### 1. РЕАГЕНТЫ/ЗОНДЫ/АНТИТЕЛА

Название	Температура хранения
Антитело EphA2 человека [поликлональный козий IgG] (R&D Systems, кат. № AF3035)	-20°C
Нормальный контроль на основе козьего IgG (R&D Systems, кат. № АВ-108-С)	-20°C
Белковый блок, бессывороточный (Agilent/Dako, кат. № X0909)	2-8°C
Раствор для извлечения мишени, низкое значение pH (Agilent/Dako, кат. № K8005)	2-8°C
Набор на основе полимера для обнаружения ImmPRESS® на основе конъюгированного HRP (пероксидазой) антитела к козьему IgG, получено в организме лошади (Vector Labs, кат. № MP-7405)	2-8°C

Название	Температура хранения
Набор EnVision™ FLEX, высокое значение pH, (Link): Реагент En Vision FLEX, блокирующий пероксидазу Промывочный буфер Envision FLEX 20X Буфер субстрата DAB и хромоген (Dako, кат. № K8002)	2-8°C
Гематоксилин EnVision™ FLEX (Dako, кат. № K8008)	Окружающей среды
Деионизованная вода	Окружающей среды
100% спирт	Окружающей среды
95% спирт	Окружающей среды
Ксилен	Окружающей среды

## 2. ОБОРУДОВАНИЕ

Название	Модель
Холодильник	Thermo Scientific REL3004A22 или эквивалент
Микротом	Leica RM2235 или эквивалент
Сушильная печь	Biocare 10-180 Aer Desert Chamber или эквивалент
Автоматический ИНС окрашиватель	Dako Link 48
Модуль предварительной обработки	Dako PT Link
Линейный окрашиватель	Автоокрашиватель Leica XL или эквивалент
Покровное стекло	Sakura Tissue-Tek Film 4740 или эквивалент
Водяная баня	TBS TFBL или эквивалент

## 3. ПРОЦЕДУРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА

- 5 1. Закрепите и вставьте ткань, вырежьте и поместите срезы на положительно заряженные предметные стекла, депарафинируйте и регидратируйте срез в соответствии со стандартной практикой.

2. Загрузите образцы в модуль предварительной обработки Dako PT Link.
3. Нагрейте модуль до 65 °С, выполните выделение антигена в течение 20 минут при 97 °С с помощью раствора для извлечения мишени, низкое значение pH, охладите автоокрашиватель до 65 °С
- 5 4. Выгрузите покровные стекла из PT Link и погрузите в промывочный буфер Dako при комнатной температуре (минимум 5 минут).
5. Загрузите образцы в автоокрашиватель Dako 48.
6. Промойте промывочным буфером Dako в течение 5 мин при комнатной температуре.
7. Блокируйте блокирующим реагентом Flex Peroxide в течение 5 минут при
- 10 температуре окружающей среды
8. Промойте промывочным буфером
9. Блокируйте с помощью Protein Block в течение 10 минут при температуре окружающей среды
10. Воздушный удар
- 15 11. Инкубируйте с антителом к hEphA2 (10 мкг/мл), разведенным в разбавителе Dako Background Reduction Diluent, в течение 30 мин при комнатной температуре
12. Промойте промывочным буфером
13. Инкубируйте с нормальной лошадиной сывороткой, 2,5% в течение 20 мин при комнатной температуре
- 20 14. Промойте промывочным буфером
15. Инкубируйте с реагентом на основе полимера на основе лошадиного антитела к козьему IgG в течение 15 мин при комнатной температуре
16. Промойте промывочным буфером
17. Инкубируйте с буфером для субстрата FLEX DAB и хромогеном в течение 10 мин
- 25 при комнатной температуре
18. Промойте промывочным буфером
19. Промойте деионизированной водой
20. Инкубируйте с FLEX Hematoxylin в течение 1 мин при комнатной температуре
21. Промойте деионизированной водой
- 30 22. Промойте деионизированной водой
23. Выгрузите из Dako, дегидратируйте в батарее спиртов и очистите в ксилоле в течение 7 мин при комнатной температуре
24. Покровное стекло

#### 35 4. ИHC оценка EphA2

[0123] Оцените результаты окрашивания EphA2, используя метод H-индекса (определяемый как сумма произведений процента клеток и интенсивности их окрашивания по шкале от 0 до 3, где 0 означает отрицательное значение, а 3 означает сильное окрашивание). Независимые H-индексы для мембраны опухолевых клеток (TM) и цитоплазмы опухолевых клеток (TC) могут быть получены для различения двух компартментов. H-индексы  $\geq 20$  считались положительными для EphA2.

## 5. РЕЗУЛЬТАТЫ

[0124] TMA показаний, включая поджелудочную железу, мочевого пузыря, голову и шею, желудок, NSCLC, TNBC и рак яичников, окрашивали и оценивали в отношении экспрессии EphA2. Паттерн экспрессии EphA2 отличался в зависимости от тестируемых показаний с поджелудочной железой, имеющей наибольшую частоту экспрессии EphA2. В отличие от других оцененных показаний, поджелудочная железа и мочевого пузыря имели более высокий процент ядер, положительных в отношении TM, чем на TC. Эти различия могут иметь значение для выбора показаний для BT5528, учитывая, что механизм BTC может быть усилен в случаях положительной TM.

Показание	Общие индексы (N)	TM положительный N (%)	TC положительный N (%)	TM или TC положительный N (%)
Поджелудочная железа	92	48 (52)	14 (15)	48 (52)
Мочевого пузыря	142	42 (30)	37 (26)	51 (36)
Голова и шея	69	14 (20)	17 (25)	22 (32)
Желудок	53	10 (19)	15 (28)	15 (28)
NSCLC	221	45 (20)	52 (24)	60 (27)
Яичники	83	8 (10)	13 (16)	17 (20)
TNBC	124	3 (2)	25 (20)	25 (20)

[0125] Использование ИНС анализа для оценки экспрессии EphA2 в нескольких TMA и индивидуальной оценки TM и TC может способствовать выбору показаний для клинической программы в случае BT5528.

[0126] Хотя описано несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, очевидно, что примеры могут быть изменены для предоставления других вариантов осуществления, в которых используются соединения и способы настоящего изобретения. Поэтому следует понимать, что объем настоящего изобретения должен определяться

заявкой и формулой изобретения, а не конкретными вариантами осуществления, которые были представлены в качестве примера.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации или отбора пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани, включающий измерение уровня EphA2 в опухолевой ткани пациента и отбор пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани.
2. Способ по п. 1, в котором стадия измерения уровня EphA2 в опухолевой ткани пациента включает использование анализа иммуногистохимического (ИНС) окрашивания EphA2.
3. Способ идентификации и отбора пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани, включающий измерение интенсивности в срезе опухолевой ткани пациента с использованием анализа ИНС окрашивания EphA2, и отбора пациента, который имеет положительное окрашивание в анализе ИНС окрашивания EphA2.
4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором у пациента имеется рак поджелудочной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или рак яичников.
5. Способ по п. 2 или п. 3, в котором в анализе иммуногистохимического (ИНС) окрашивания EphA2 используется антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с внеклеточным доменом (ECD) или цитоплазматическим доменом EphA2.
6. Способ по п. 5, в котором антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с внеклеточным доменом (ECD) EphA2 человека, представляет собой антитело к EphA2 человека AF3035.
7. Способ по п. 3, в котором положительное окрашивание в анализе ИНС окрашивания EphA2 относится к H-индексу, составляющему приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2.
8. Способ по п. 3, в котором положительное окрашивание в анализе ИНС окрашивания EphA2 относится к H-индексу мембраны опухолевых клеток, составляющему

- приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2.
- 5 EphA2.
9. Способ по п. 3, в котором положительное окрашивание в анализе ИНС окрашивания EphA2 относится к H-индексу цитоплазмы опухолевых клеток, составляющему приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или
- 10 больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2.
- 15 10. Способ лечения рака у пациента, имеющего повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани, включающей введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.
- 20 11. Способ по п. 10, в котором пациент, имеющий повышенный уровень EphA2 в опухолевой ткани, относится к пациенту, имеющему H-индекс, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или
- 25 приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2.
12. Способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего H-индекс, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше,
- 30 приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2, и введение пациенту конъюгата бициклического токсина, специфического в отношении EphA2, или его фармацевтически приемлемой соли, или
- 35 фармацевтической композиции на его основе.

13. Способ по любому из пп. 10-12, в котором рак представляет собой рак поджелудочной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или рак яичников.
- 5
14. Способ по п. 11 или п. 12, в котором в анализе ИНС окрашивания EphA2 используется антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с внеклеточным доменом (ECD) или цитоплазматическим доменом EphA2.
- 10
15. Способ по п. 14, в котором антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с внеклеточным доменом (ECD) EphA2 человека, представляет собой антитело к EphA2 человека AF3035.
- 15
16. Способ по п. 12, в котором Н-индекс относится к Н-индексу мембраны опухолевых клеток или Н-индексу цитоплазмы опухолевых клеток.
17. Способ лечения рака у пациента, включающий отбор пациента, имеющего Н-индекс мембраны опухолевых клеток, составляющий приблизительно 15 или больше, приблизительно 20 или больше, приблизительно 30 или больше, приблизительно 40 или больше, приблизительно 50 или больше, приблизительно 75 или больше, приблизительно 100 или больше, приблизительно 125 или больше или приблизительно 150 или больше в срезе опухолевой ткани в анализе ИНС окрашивания EphA2, и введение пациенту BT5528, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции на его основе.
- 20
- 25
18. Способ по п. 17, в котором рак представляет собой рак поджелудочной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или рак яичников.
- 30
19. Способ по п. 17, в котором в анализе ИНС окрашивания EphA2 используется антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с внеклеточным доменом (ECD).
- 35
20. Способ по п. 19, в котором антитело к EphA2 человека, избирательно связывающееся с внеклеточным доменом (ECD) EphA2 человека, представляет собой антитело к EphA2 человека AF3035.