

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046925**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.13

(21) Номер заявки
202191256

(22) Дата подачи заявки
2019.12.06

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/015 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/138 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА НА МОДЕЛЯХ, ИМЕЮЩИХ МУТАЦИИ ESR1**(31) **62/776,338**(32) **2018.12.06**(33) **US**(43) **2021.10.06**(86) **PCT/US2019/064980**(87) **WO 2020/118202 2020.06.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РАДИУС ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Пател Хитиша, Бихани Тиру, Арлт
Хайке, Тао Нианджун (US)**

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М.,
Парамонова К.В. (RU)**

(56) **US-A1-2018153828**

TEERU BIHANI ET AL.: "Elacestrant (RAD1901), a Selective Estrogen Receptor Degradar (SERD), Has Antitumor Activity in Multiple ER+Breast Cancer Patient-derived Xenograft Models", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 23, № 16, 4 May 2017 (2017-05-04), pages 4793-4804, XP055669099, US, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2561, abstract figure 5; table 1

FANNING ET AL.: "Estrogen receptor alpha somatic mutations Y537S and D538G confer breast cancer endocrine resistance by stabilizing the activating function-2 binding conformation", ELIFE, vol. 5, 2 February 2016 (2016-02-02), pages 1-25, XP055659664, page 16, paragraph 1

REINERT TOMAS ET AL.: "Implications of ESR1 Mutations in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer", CURRENT TREATMENT OPTIONS IN ONCOLOGY MAY 2005, SPRINGER, US, BOSTON, vol. 19, № 5, 17 April 2018 (2018-04-17), pages 1-13, XP036495605, ISSN: 1527-2729, DOI: 10.1007/S11864-018-0542-0 [retrieved on 2018-04-17], "ESR1 Mutation: Pyhsiopathology and Potential Role as a Prognostic and Predictive Biomarker", figure 2

(57) В изобретении раскрываются способы лечения устойчивого к лекарственному средству положительного по рецептору эстрогена альфа рака у субъекта, имеющего мутантный рецептор эстрогена альфа, при этом способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества элацестранта или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, при этом мутантный рецептор эстрогена альфа содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из D538G, Y537X₁, L536X₂, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и их комбинаций, при этом X₁ представляет собой S, N или C; и X₂ представляет собой R или Q. Согласно некоторым вариантам осуществления устойчивый к лекарственному средству положительный по рецептору эстрогена альфа рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака матки, рака яичника и рака гипофиза.

B1**046925****046925 B1**

Ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно 35 U.S.C. § 119(e) в соответствии с находящейся на рассмотрении заявкой на выдачу патента Соединенных Штатов Америки № 62/776338, поданной 6 декабря 2018 г. Полное содержание упомянутой выше заявки тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте, включая графические материалы.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к способам обеспечения противоопухолевой активности с использованием элацстранта на моделях рака, имеющих мутации ESR1, устойчивых к стандарту лечебных терапевтических средств. Настоящее раскрытие также относится к способам лечения эстроген-положительных (ER+) раковых заболеваний с наличием мутаций ESR1, которые могут способствовать эндокринной устойчивости, при этом рак эффективно лечат с использованием элацстранта.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Рак молочной железы делится на три подтипа на основании экспрессии трех рецепторов: рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR) и рецептора эпидермального фактора роста человека-2 (Her2). Надэкспрессия ER обнаруживается у многих больных с раком молочной железы. ER-положительный (ER+) рак молочной железы составляет две трети всех случаев рака молочной железы. Помимо рака молочной железы, эстроген и ER связаны, например, с раком яичника, раком толстой кишки, раком предстательной железы и раком эндометрия.

ER могут активироваться эстрогеном и перемещаться в ядро для связывания с ДНК, тем самым регулируя активность различных генов (см., например, Marino et al., "Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription", *Curr. Genomics*, 7(8):497-508 (2006); и Heldring et al., "Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets", *Physiol. Rev.*, 87(3):905-931 (2007)).

Средства, которые ингибируют продуцирование эстрогена, такие как ингибиторы ароматазы (AI, например летрозол, анастрозол и экземестан), или средства, которые непосредственно блокируют активность ER, такие как селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM, например, тамоксифен, торемифен, дролоксифен, идоксифен, ралоксифен, лазофоксифен, арзоксифен, мипроксифен, левормелоксифен и EM-652 (SCH 57068)), а также селективные деструкторы рецепторов эстрогена (SERD, например фулвестрант, TAS-108 (SR16234), ZK191703, RU-5861068, ARNDC-0861068, ARNDC-08 810), GW5638/DPC974, SRN-927, ICI182780 и AZD9496), использовались ранее или находятся в разработке для лечения ER-положительных раковых заболеваний молочной железы.

SERM и AI часто используют в качестве вспомогательной системной терапии первой линии при ER-положительном раке молочной железы. AI подавляют продуцирование эстрогена в периферических тканях, блокируя активность ароматазы, которая превращает андроген в эстроген в организме. Однако AI не может остановить продуцирование эстрогена яичниками. Таким образом, AI в основном используют для лечения женщин в постменопаузе. Кроме того, поскольку AI более эффективны, чем SERM тамоксифен, с меньшим количеством серьезных побочных эффектов, AI также можно использовать для лечения женщин в пременопаузе с подавленной функцией яичников (см., например, Francis et al., "Adjuvant Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer", *the N. Engl. J. Med.*, 372:436-446 (2015)).

Устойчивость к эндокринной терапии представляет собой сложный аспект ведения больных с положительным по рецепторам эстрогена (ER+) раком молочной железы. Недавние исследования показали, что приобретенная устойчивость может развиваться после лечения ингибиторами ароматазы за счет появления мутаций в гене рецептора эстрогена 1 (ESR1). Хотя первоначальное лечение этими средствами может быть успешным, у многих больных в конечном итоге возникает рецидив устойчивого к лекарственному средству рака молочной железы. Мутации, влияющие на ER, появились как один из возможных механизмов развития этой устойчивости (см., например, Robinson et al., "Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer", *Nat Genet.*, 45:1446-51 (2013)). Мутации в лиганд-связывающем домене (LBD) ER обнаруживаются в 20-40% образцов метастатических ER-положительных опухолей молочной железы от больных, которые получали хотя бы одну линию эндокринного лечения (Jeselsohn et al., "ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer", *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 12:573-83 (2015)).

Следовательно, сохраняется потребность в более длительных и эффективных терапевтических средствах, нацеленных на ER, для преодоления некоторых проблем, связанных с современными эндокринными терапевтическими средствами, и для борьбы с развитием устойчивости.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способу ингибирования и разрушения положительного по мутантному рецептору эстрогена альфа рака у субъекта, предусматривающему введение субъекту терапевтически эффективного количества элацстранта или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата.

Варианты осуществления этого аспекта настоящего изобретения могут включать в себя один или несколько из следующих необязательных признаков. Согласно некоторым вариантам осуществления положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из D538G, Y537X₁, L536X₂, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и их

комбинаций, при этом X_1 представляет собой S, N или C; и X_2 представляет собой R или Q. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация представляет собой Y537S. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация представляет собой D538G. Согласно некоторым вариантам осуществления положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак является устойчивым к лекарственному средству, выбранному из группы, состоящей из противоэстрогенных средств, ингибиторов ароматазы и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака матки, рака яичника и рака гипофиза. Согласно некоторым вариантам осуществления положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак представляет собой запущенный или метастатический рак молочной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак представляет собой рак молочной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой женщину в постменопаузе. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой женщину в пременопаузе. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой женщину в постменопаузе, заболевание которой рецидивирует или прогрессирует после предшествующего лечения селективными модуляторами рецептора эстрогена (SERM) и/или ингибиторами ароматазы (AI). Согласно некоторым вариантам осуществления элацестрант вводят субъекту при дозе от приблизительно 200 мг/сутки до приблизительно 500 мг/сутки. Согласно некоторым вариантам осуществления элацестрант вводят субъекту при дозе приблизительно 200 мг/сутки, приблизительно 300 мг/сутки, приблизительно 400 мг/сутки или приблизительно 500 мг/сутки. Согласно некоторым вариантам осуществления элацестрант вводят субъекту при дозе, которая является максимальной переносимой дозой для субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает идентификацию субъекта для лечения путем измерения повышенной экспрессии одного или нескольких генов, выбранных из ABL1, AKT1, AKT2, ALK, APC, AR, ARID1A, ASXL1, ATM, AURKA, BAP, BAP1, BCL2L11, BCR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CEBPA, CTNBN1, DDR2, DNMT3A, E2F3, EGFR, EML4, EPHB2, ERBB2, ERBB3, ESR1, EWSR1, FBXW7, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, FRS2, HIF1A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, JAK2, KDM6A, KDR, KIF5B, KIT, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K4, MCL1, MDM2, MDM4, MET, MGMT, MLL, MPL, MSH6, MTOR, MYC, NF1, NF2, NKX2-1, NOTCH1, NPM, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PML, PTEN, PTPRD, RARA, RBI, RET, RICTOR, ROS1, RPTOR, RUNX1, SMAD4, SMARCA4, SOX2, STK11, TET2, TP53, TSC1, TSC2 и VHL. Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько генов выбраны из AKT1, AKT2, BRAF, CDK4, CDK6, PIK3CA, PIK3R1 и MTOR. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение концентрации элацестранта или его соли или сольвата в опухоли к концентрации элацестранта или его соли или сольвата в плазме (Т/Р) после введения составляет по меньшей мере приблизительно 15. Согласно другому аспекту настоящее раскрытие относится к способу лечения устойчивого к лекарственному средству положительного по рецептору эстрогена альфа рака у субъекта, имеющего мутантный рецептор эстрогена альфа, при этом способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества элацестранта или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, при этом мутантный рецептор эстрогена альфа содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из D538G, Y537X₁, L536X₂, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и их комбинаций, при этом X_1 представляет собой S, N или C; и X_2 представляет собой R или Q.

Варианты осуществления этого аспекта настоящего изобретения могут включать в себя один или несколько из следующих необязательных признаков. Согласно некоторым вариантам осуществления рак является устойчивым к лекарственному средству, выбранному из группы, состоящей из противоэстрогенных средств, ингибиторов ароматазы и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления противоэстрогенные средства выбраны из группы, состоящей из тамоксифена, торемифена и фулвестранта, а ингибиторы ароматазы выбраны из группы, состоящей из эксеместана, летрозолола и анастрозолола. Согласно некоторым вариантам осуществления устойчивый к лекарственному средству положительный по рецептору эстрогена альфа рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака матки, рака яичника и рака гипофиза. Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой запущенный или метастатический рак молочной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления рак представляет собой рак молочной железы. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой женщину в постменопаузе. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой женщину в пременопаузе. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой женщину в постменопаузе, заболевание которой рецидивирует или прогрессирует после предшествующего лечения с помощью SERM и/или AI. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект экспрессирует по меньшей мере один мутантный рецептор эстрогена альфа, выбранный из группы, состоящей из D538G, Y537S, Y537N, Y537C, E380Q, S463P, L536R, L536Q, P535H, V392I и V534E. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация включает в себя Y537S. Согласно некоторым вариантам осуществления мутация включает в себя D538G. Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает идентификацию субъекта для лечения путем измерения повышенной экспрессии одного или нескольких генов, выбранных из ABL1, AKT1, AKT2,

ALK, APC, AR, ARID1A, ASXL1, ATM, AURKA, BAP, BAP1, BCL2L11, BCR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CEIPA, CTNNB1, DDR2, DNMT3A, E2F3, EGFR, EML4, EPHB2, ERBB2, ERBB3, ESR1, EWSR1, FBXW7, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, FRS2, HIF1A, HRAS, IDH1, ISH2, IGF1R, JAK2, KDM6A, KDR, KIF5B, KIT, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K4, MCL1, MDM2, MDM4, MET, MGMT, MLL, MPL, MSH6, MTOR, MYC, NF1, NF2, NKX2-1, NOTCH1, NPM, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PML, PTEN, PTPRD, RAEA, RB1, RET, RICTOR, ROS1, RPTOR, RUNX1, SMAD4, SMARCA4, SOX2, STK11, TET2, TP53, TSC1, TSC2 и VHL. Согласно некоторым вариантам осуществления один или несколько генов выбраны из AKT1, AKT2, BRAF, CDK4, CDK6, PIK3CA, PIK3R1 и MTOR. Согласно некоторым вариантам осуществления элацестрант вводят субъекту при дозе от приблизительно 200 мг/сутки до приблизительно 500 мг/сутки. Согласно некоторым вариантам осуществления элацестрант вводят субъекту при дозе приблизительно 200 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг или приблизительно 500 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления элацестрант вводят субъекту при дозе приблизительно 300 мг/сутки. Согласно некоторым вариантам осуществления отношение концентрации элацестранта или его соли или сольвата в опухоли к концентрации элацестранта или его соли или сольвата в плазме (Т/Р) после введения составляет по меньшей мере приблизительно 15.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют значение, обычно известное рядовому специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. В настоящем изобретении описываются способы и материалы для применения в настоящем изобретении; также могут быть использованы другие подходящие способы и материалы, известные в уровне техники. Материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения. Все публикации, заявки на выдачу патентов, патенты, последовательности, объекты баз данных и другие ссылочные материалы, упоминаемые в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном своем объеме. В случае конфликта регулирующим будет настоящее описание, в том числе определения.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из подробного раскрытия и графических материалов, а также из формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

Следующие графические материалы представлены в качестве примера и не предназначены для ограничения объема заявляемого изобретения.

На фиг. 1 показаны репрезентативные изображения, представленные в верхнем ряду, показывают опухолевые клетки, обработанные контролем в виде среды-носителя для линий мутантных раковых клеток клона 1 Y537S, клона 2 Y537S, клона 1 D538G, клона 2 D538G и клона 1 S463P. На изображениях, представленных в нижнем ряду, показаны опухолевые клетки клона 1 Y537S, клона 2 Y537S, клона 1 D538G, клона 2 D538G и клона 1 S463P, обработанные элацестрантом при 100 нМ.

На фиг. 2 показаны среднее±SEM объемов опухоли с течением времени на мышинных моделях ксенотрансплантата, обработанных контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30, 60 и 120 мг/кг) и фулвестрантом (1 мг/доза).

На фиг. 3А показана кратность изменения относительно контроля рецептора прогестерона (PgR) для моделей опухолевых клеток, имеющих мутации дикого типа, S463P, D538G и Y537S, обработанных контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (10, 100 и 1000 нМ), E2 (10 пМ) и фулвестрантом (10, 100 и 1000 нМ).

На фиг. 3В показана кратность изменения относительно контроля роста, регулируемого эстрогеном (GREB1), в моделях опухолевых клеток, имеющих мутации дикого типа, S463P, D538G и Y537S, обработанных контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (10, 100 и 1000 нМ), E2 (10 пМ) и фулвестрантом (10, 100 и 1000 нМ).

На фиг. 3С показана кратность изменения относительно контроля фактора "трилистника" 1 (TFF1) в моделях опухолевых клеток, имеющих мутации дикого типа, S463P, D538G и Y537S, обработанных контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (10, 100 и 1000 нМ), E2 (10 пМ) и фулвестрантом (10, 100 и 1000 нМ).

На фиг. 4А показаны среднее±SEM объемов опухоли с течением времени у бестимусных голых мышей с имплантированным ксенотрансплантатом PDX ST2535-Н1 (предварительно обработанных тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвестрантом) с мутацией ESR1:D538G, обработанных контролем в виде среды-носителя и элацестрантом (30 и 60 мг/кг).

На фиг. 4В показаны среднее±SEM объемов опухоли с течением времени у бестимусных голых мышей с имплантированным ксенотрансплантатом PDX CTG-1211-Н1 (предварительно обработанных тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвестрантом) с мутацией ESR1:D538G, обработанных контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза).

На фиг. 4С показаны среднее±SEM объемов опухоли с течением времени у бестимусных голых мышей с имплантированным ксенотрансплантатом PDX WHIM43-Н1 (предварительно обработанных тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвестрантом) с мутацией ESR1:D538G, обработанных кон-

тролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза).

На фиг. 5A показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя содержания мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели ксенотрансплантата PDX ST2535-HI (с предварительной обработкой тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвестрантом) с мутацией ESR1:D538G, обработанной контролем в виде среды-носителя и элацестрантом (30 и 60 мг/кг).

На фиг. 5B показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий экспрессию PgR на модели ксенотрансплантата PDX ST2535-HI с мутацией ESR1:D538G, обработанной контролем в виде среды-носителя и элацестрантом (30 и 60 мг/кг).

На фиг. 5C показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя содержания мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели ксенотрансплантата PDX CTG-1211-HI (с предварительной обработкой тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвестрантом) с мутацией ESR1:D538G, обработанной контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза).

На фиг. 5D показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий экспрессию PgR на модели ксенотрансплантата PDX CTG-1211-HI с мутацией ESR1:D538G, обработанной контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом.

На фиг. 5E показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя содержания мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели ксенотрансплантата PDX WHTM43-HI (с предварительной обработкой тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвестрантом) с мутацией ESR1:D538G, обработанной контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза).

На фиг. 5F показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий экспрессию PgR на модели ксенотрансплантата PDX WHTM43-HI с мутацией ESR1:D538G, обработанной контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом.

На фиг. 6A показаны среднее±SEM объемов опухоли с течением времени на модели PDX ST941-HI, содержащей мутацию ESR1:Y537S, обработанной контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза), дозой 1 serd1 и дозой 2 serd1.

На фиг. 6B показаны среднее±SEM объемов опухоли с течением времени на модели PDX ST941-HI, содержащей мутацию ESR1:Y537S, обработанной контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза), дозой 1 serd2 и дозой 2 serd2.

На фиг. 7A показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя содержания мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели PDX ST941-HI, содержащей мутацию ESR1:Y537S, обработанной контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/доза), элацестрантом (30 мг/кг), дозой 1 serd1, дозой 2 serd1, дозой 1 serd2 и дозой 2 serd2.

На фиг. 7B показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий модель PDX ST941-HI, содержащую мутацию ESR1:Y537S, демонстрирующую экспрессию PgR, обработанную контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/кг), элацестрантом (30 мг/кг), дозой 1 serd1 и дозой 2 serd1.

На фиг. 7C показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий модель PDX ST941-HI, содержащую мутацию ESR1:Y537S, демонстрирующую экспрессию PgR, обработанную контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/кг), элацестрантом (30 мг/кг), дозой 1 serd2 и дозой 2 serd2.

На фиг. 8A показана *in vitro* жизнеспособность клеток (% контроля), представленная относительно Log[концентрация (мкМ)] для линии клеток PDX ST941-HI.

На фиг. 8B показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя содержания мРНК рецептора прогестерона (PgR), нанесенного на график по отношению к концентрации элацестранта (0, 10, 100 и 1000 нМ) и фулвестранта (0, 10, 100 и 1000 нМ), используемых при обработке *in vitro* линии клеток ST941-HI, полученной из PDX.

На фиг. 9A показаны среднее±SEM объемов опухоли у мышей с имплантированными PDX ST941-HI, содержащими мутацию ESR1:Y537S, нанесенное на график по отношению ко времени и обработке их контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (10, 30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза).

На фиг. 9B показана кратность изменения относительно контроля экспрессии мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели PDX ST941-HI, нанесенная на график по отношению к обработке ее контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/доза) и элацестрантом (10, 30 и 60 мг/кг).

На фиг. 10A показаны среднее±SEM объемов опухоли с течением времени у мышей с имплантированными ксенотрансплантатом PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, обработанных контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза).

На фиг. 10B показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя рецептора прогестерона (PgR) на модели ксенотрансплантата PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, обработанной контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза).

На фиг. 10C показана кратность изменения относительно контроля фактора "трилистника" 1 (TFF1) на модели ксенотрансплантата PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, обработанной контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза).

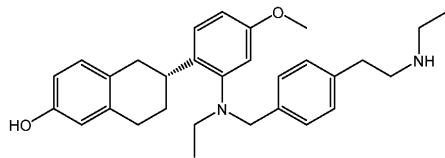
На фиг. 10D показана кратность изменения относительно контроля роста, регулируемого эстрогеном (GREB1) на модели ксенотрансплантата PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, обработанной

контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза).

На фиг. 10E показан вестерн-блоттинг, иллюстрирующий модель ксенотрансплантата PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, демонстрирующую экспрессию PgR, обработанную контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/доза) и элацестрантом (30 и 60 мг/кг).

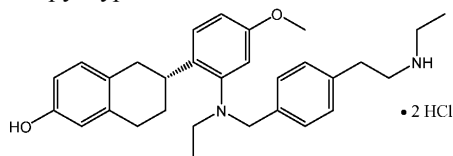
Подробное раскрытие настоящего изобретения

Используемый в настоящем изобретении элацестрант или "RAD1901" представляет собой перорально биодоступный селективный деструктор рецептора эстрогена (SERD) и характеризуется следующей химической структурой:



Элацестрант,

в том числе его соли, сольваты (например, гидрат) и пролекарства. Доклинические данные показали, что элацестрант эффективен в ингибировании роста опухоли на моделях ER⁺ рака молочной железы с ESR1 как дикого типа, так и мутантными. Согласно некоторым вариантам осуществления, описываемым в настоящем изобретении, элацестрант вводят в виде бис-гидрохлоридной ($\cdot 2\text{HCl}$) соли, характеризующейся следующей химической структурой:



Элацестрант дигидрохлорид.

Для женщины в постменопаузе рассматриваемый стандарт лечения ER⁺ раковых заболеваний, таких как рак молочной железы, предусматривает ингибирование пути ER посредством 1) ингибирования синтеза эстрогена (ингибиторов ароматазы (AI)); 2) непосредственного связывания с ER и модулирования его активности с использованием SERM (например, тамоксифена); и/или 3) непосредственного связывания с ER и обеспечения разложения рецептора с использованием SERD (например, фулвестранта). У женщины в пременопаузе рассматриваемый стандарт лечения будет дополнительно предусматривать подавление яичников посредством овариэктомии или агониста гормона, высвобождающего лютеинизирующий гормон (LHRH). Несмотря на то что больные обычно хорошо реагируют на клинически одобренные методы лечения, мутации ESR1 могут часто возникать (например, 20-40%) при метастатическом раке молочной железы и могут способствовать развитию эндокринной устойчивости. Хотя реакция мутаций ESR1 на AI и/или SERD до конца не изучена, недавние данные анализа ctDNA в испытании PALOMA-3 палбоциклиба и фулвестранта по сравнению с плацебо и фулвестрантом продемонстрировали тенденцию к отбору мутации ESR1 Y537S после лечения фулвестрантом. Эти данные показывают тенденцию ESR1 к мутированию в сочетании с необходимостью внутримышечной дозы фулвестранта и подчеркивают необходимость в новых и/или улучшенных перорально биодоступных эндокринных методах лечения, которые обладают эффективностью против ESR1 и всех мутаций ESR1.

Неожиданная эффективность элацестранта в отношении целевых опухолей, плохо отвечающих на лечение фулвестрантом, и в опухолях, экспрессирующих мутантный ER α , может быть связана с уникальными взаимодействиями между элацестрантом и ER α . Структурные модели ER α , связанного с элацестрантом и другими ER α -связывающими соединениями, анализировали для получения информации о специфических связывающих взаимодействиях. Компьютерное моделирование показало, что на взаимодействия элацестрант-ER α вряд ли могут повлиять мутанты LBD ER α , например, мутант Y537X, где X представлял собой S, N или C; D538G и S463P, на которые приходится приблизительно 81,7% мутаций LBD, обнаруженных в недавнем исследовании образцов метастатических ER-положительных опухолей молочной железы от больных, которые получали по меньшей мере одну линию эндокринного лечения. Это привело к идентификации специфических остатков в C-концевых лиганд-связывающих доменах ER α , которые имеют важное значение для связывания, информации, которая может быть использована для разработки соединений, которые связывают и антагонизируют не только ER α дикого типа, но также определенные мутации и их варианты.

На основании этих результатов в настоящем изобретении представлены способы ингибирования роста или обеспечения регрессии ER α -положительных рака или опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества элацестранта или его сольвата (например, гидрата) или соли. Согласно некоторым вариантам осуществления введение элацестранта или его соли или сольвата (например, гидрата) обладает дополнительными терапевтическими преимущес-

вами в дополнение к ингибированию роста опухоли, включающими в себя, например, ингибирование пролиферации раковых клеток или ингибирование активности ER α (например, путем ингибирования связывания эстрадиола или путем разложения ER α). Согласно некоторым вариантам осуществления способ не оказывает негативных эффектов на мышцы, кости, молочную железу и матку.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов ингибирования роста опухоли или регрессии, представленных в настоящем изобретении, способы дополнительно предусматривают стадию определения того, имеет ли больной опухоль, экспрессирующую ER α , до введения элацестранта или его сольвата (например, гидрата) или соли. Согласно некоторым вариантам осуществления способов ингибирования роста опухоли или регрессии, представленных в настоящем изобретении, способы дополнительно предусматривают стадию определения того, имеет ли больной опухоль, экспрессирующую мутантный ER α , до введения элацестранта или его сольвата (например, гидрата) или соли. Согласно некоторым вариантам осуществления способов ингибирования роста опухоли или регрессии, представленных в настоящем изобретении, способы дополнительно предусматривают стадию определения того, имеет ли больной опухоль, экспрессирующую ER α , которая отвечает или не отвечает на лечение AI, SERD (например, фулвестрантом) и/или SERM (например, тамоксифеном), до введения элацестранта или его сольвата (например, гидрата) или соли. Такие определения могут быть осуществлены с использованием любого способа выявления экспрессии, известного в уровне техники, и могут быть выполнены *in vitro* с использованием образца опухоли или ткани, выделенного у субъекта.

В способах, описываемых в настоящем изобретении, элацестрант демонстрирует ингибирование роста на нескольких моделях PDX, имеющих мутации ESR1:D538G и ESR1:Y537S, в том числе на моделях, которые устойчивы к палбоциклибу, устойчивы к фулвестранту и которые ранее лечили ингибиторами ароматазы/тамоксифеном/фулвестрантом. Элацестрант, как также продемонстрировали, и разлагает ER, и ингибирует передачу сигнала ER на моделях PDX, имеющих мутацию ESR1:D538G. Элацестрант является эффективным и *in vitro*, и *in vivo* на модели ST941-HI, которая имеет мутацию Y537. Кроме того, два SERD, имеющие боковые цепи акриловой кислоты, продемонстрировали частичное ингибирование роста *in vivo* на модели PDX ST941-HI. Фулвестрант, тогда как является эффективным *in vitro*, демонстрировал отсутствие активности *in vivo* на модели PDX ST941-HI. В то время как и элацестрант, и фулвестрант демонстрируют частичную эффективность на модели WHIM20, содержащей мутацию ESR1:Y537S, несмотря на то что оба средства разлагают ER и ингибируют передачу сигнала ER, роль элацестранта и его комбинации с ингибиторами других онкогенных факторов роста опухоли обеспечивает успехи в лечении опухолей с повышенной эффективностью.

Роль мутаций ESR1 в эндокринной устойчивости и их влияние на эффективность методов эндокринного лечения представляет собой сложную взаимосвязь. Действительно недавние данные анализа ctDNA в испытании PALOMA3 палбоциклиба и фулвестранта по сравнению с плацебо и фулвестрантом продемонстрировали тенденцию к отбору мутации ESR1:Y537S после лечения фулвестрантом. Это исследование показывает, что могут наблюдаться определенные случаи мутаций ESR1, при которых фулвестрант может иметь ограниченную активность. Следовательно, приведенные в настоящем изобретении исследования, показывающие эффективное применение элацестранта в качестве лечения раковых заболеваний, обладающего эффективностью против всех мутаций ESR1, являются многообещающим открытием.

Определения

Следует применять следующие используемые в настоящем изобретении определения, если не указано иное.

Используемые в настоящем изобретении термины "RAD1901" и "элацестрант" относятся к одному и тому же химическому соединению и используются взаимозаменяемо.

Используемый в настоящем изобретении термин "ингибирование роста" ER α -положительной опухоли может относиться к замедлению скорости роста опухоли или полному прекращению роста опухоли.

Используемый в настоящем изобретении термин "регрессия опухоли" или "регрессия" ER α -положительной опухоли может относиться к снижению максимального размера опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления введение комбинации, описываемой в настоящем изобретении, или ее сольватов (например, гидрата) или солей может приводить к уменьшению размера опухоли по сравнению с исходным уровнем (т.е. с размером до начала лечения) или даже к устранению или частичному устранению опухоли. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления способы регрессии опухоли, представленные в настоящем изобретении, могут быть, в качестве альтернативы, охарактеризованы, как способы снижения размера опухоли по сравнению с исходным уровнем.

Используемый в настоящем изобретении термин "опухоль" представляет собой злокачественную опухоль и используется взаимозаменяемо с термином "рак". Используемый в настоящем изобретении термин "рецептор эстрогена альфа" или "ER α " относится к полипептиду, содержащему, состоящему из или состоящему по сути из аминокислотной последовательности ER α дикого типа, которая кодируется геном ESR1.

Опухоль, которая является "положительной по рецептору эстрогена альфа", "ER α -положительной",

"ER+" или "ER α +", как используется в настоящем изобретении, относится к опухоли, в которой одна или несколько клеток экспрессируют по меньшей мере одну изоформу ER α .

Используемый в настоящем изобретении термин "стандарт лечебных терапевтических средств" относится к средствам, известным и традиционно используемым для лечения раковых заболеваний, таких как рак молочной железы, включающим в себя ингибиторы ароматазы (AI, например, летрозол, анастрозол и эксеместан), селективные модуляторы рецептора эстрогена (SERM, например, тамоксифен, торемифен, дролоксифен, идоксифен, ралоксифен, лазофоксифен, арзофоксифен, мипроксифен, левормелоксифен и EM-652 (SCH 57068)) и/или селективные деструкторы рецептора эстрогена (SERD, например, фулвестрант, TAS-108 (SR16234), ZK191703, RU58668, GDC-0810 (ARN-810), GW5638/DPC974, SRN-927, ICI182782 и AZD9496).

Способы лечения.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу ингибирования и разрушения положительного по мутантному рецептору эстрогена альфа рака у субъекта, предусматривающему введение субъекту терапевтически эффективного количества элацестранта или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата.

Согласно другим вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения устойчивого к лекарственному средству положительного по рецептору эстрогена альфа рака у субъекта, имеющего мутантный рецептор эстрогена альфа, при этом способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества элацестранта или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, при этом мутантный рецептор эстрогена альфа содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из D538G, Y537X₁, L536X₂, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и их комбинаций, при этом X₁ представляет собой S, N или C; и X₂ представляет собой R или Q.

Введение элацестранта.

Элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли при введении субъекту оказывают терапевтический эффект в отношении одного(одной) или нескольких раковых заболеваний или опухолей. Ингибирование роста опухоли или регрессия могут быть локализованы в отдельной опухоли или в ряде опухолей в определенных ткани или органе, или могут быть системными (т.е. поражать опухоли во всех тканях или органах).

Поскольку элацестрант, как известно, преимущественно связывает ER α по сравнению с рецептором эстрогена бета (ERP), если не указано обратное, термины "рецептор эстрогена", "рецептор эстрогена альфа", "ER α ", "ER" и "ER α дикого типа" используются взаимозаменяемо в настоящем изобретении. Согласно некоторым вариантам осуществления ER+ клетки надэкспрессируют ER α . Согласно некоторым вариантам осуществления больной имеет одну или несколько клеток в опухоли, экспрессирующих одну или несколько форм ER β . Согласно некоторым вариантам осуществления ER α -положительные опухоль и/или рак ассоциированы с раком молочной железы, матки, яичника или гипофиза. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления больной имеет опухоль, расположенную в ткани молочной железы, матки, яичника или гипофиза. Согласно таким вариантам осуществления, если больной имеет опухоль, расположенную в молочной железе, то опухоль может быть ассоциирована с внутрипротоковым раком молочной железы, который может быть или может не быть положительным по HER2, и, что касается HER2+ опухолей, опухоли могут экспрессировать высокий уровень или низкий уровень HER2. Согласно другим вариантам осуществления больной имеет опухоль, расположенную в других ткани или органе (например, в кости, мышце, головном мозге), но тем не менее, она ассоциирована с раком молочной железы, матки, яичника или гипофиза (например, опухоли, происходящие из миграции или метастазирования рака молочной железы, матки, яичника или гипофиза). Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления способов ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, представленных в настоящем изобретении, опухоль, на которую нацеливаются, представляет собой метастатическую опухоль и/или опухоль, характеризующуюся надэкспрессией ER, в других органах (например, костях и/или мышцах). Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль, на которую нацеливаются, представляет собой опухоль и/или рак головного мозга. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль, на которую нацеливаются, может быть более чувствительной к лечению элацестрантом, чем к лечению другим SERD (например, фулвестрантом, TAS-108 (SR16234), ZK191703, RU58668, GDC-0810 (ARN-810), GW5638/DPC974, SRN-927 и AZD9496), ингибиторами Her2 (например, трастузумабом, лапатинибом, адо-трастузумабом эмтанзином и/или пертузумабом), химиотерапией (например, абраксаном, адриамицином, карбоплатином, цитоксаном, даунорубицином, доксилемом, элленсом, флуороурацилом, гемзаром, хелавеном, лксемпрой, метотрексатом, митомидином, микоксантроном, навелбином, таксолом, таксотером, тиотепой, винкристином и кселодой), ингибитором ароматазы (например, анастрозолом, эксеместаном и летрозолом), селективными модуляторами рецептора эстрогена (например, тамоксифеном, ралоксифеном, лазофоксифеном и/или торемифеном), ингибитором ангиогенеза (например, бевацизумабом) и/или ритуксимабом.

В дополнение к демонстрации способности элацестранта ингибировать рост опухоли в опухолях, экспрессирующих ER α дикого типа, элацестрант обладает способностью ингибировать рост опухолей,

экспрессирующих мутантную форму ER α , а именно Y537S ER α . Оценки с помощью компьютерного моделирования примеров мутаций ER α , показали, что ни одна из этих мутаций не должна была влиять на LBD или специфически препятствовать связыванию элацестрантом, например, ER α , включающего в себя один или несколько мутантов, выбранных из группы, состоящей из ER α с мутацией Y537X, при этом X представляет собой S, N или C, ER α с мутацией D538G и ER α с мутацией S463P. На основе этих результатов в настоящем изобретении представлены способы ингибирования роста или обеспечения регрессии опухоли, которая является положительной по ER α , включающему в себя одного или несколько мутантов ER α по лиганд-связывающему домену (LBD), выбранных из группы, состоящей из Y537X₁, при этом X₁ представляет собой S, N или C, D538G, L536X₂, при этом X₂ представляет собой R или Q, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q, особенно Y537S, у субъекта с раком, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества элацестранта или его сольватов (например, гидратов) или солей. Используемый в настоящем изобретении термин "мутантный ER α " относится к ER α , содержащему одну или несколько замен или делеций, и его вариантам, содержащим, состоящим из или состоящим по сути из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или по меньшей мере на 99,5% идентичной по отношению к аминокислотной последовательности ER α .

В дополнение к ингибированию роста опухоли рака молочной железы на животной модели ксенотрансплантата элацестрант демонстрирует значительное накопление в опухолевых клетках и способность преодолевать гематоэнцефалический барьер. Способность преодолевать гематоэнцефалический барьер подтверждается демонстрацией того, что введение элацестранта существенно продлевает выживаемость на модели ксенотрансплантата с метастазисом в головном мозге. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления способов ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, представленных в настоящем изобретении, ER α -положительная опухоль, на которую нацеливаются, располагается в головном мозге или где-либо еще в центральной нервной системе. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления ER α -положительная опухоль главным образом связана с раком головного мозга. Согласно другим вариантам осуществления ER α -положительная опухоль представляет собой метастатическую опухоль, которая главным образом связана с другим типом рака, таким как рак молочной железы, матки, яичника или гипофиза, или опухоль, которая мигрировала из других тканей или органа. Согласно некоторым из таких вариантов осуществления опухоль представляет собой метастазы головного мозга, такие как метастазы рака молочной железы в головной мозг (BCBM). Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрываемых в настоящем изобретении, элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли накапливаются в одной или нескольких клетках в целевой опухоли.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрываемых в настоящем изобретении, элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли предпочтительно накапливаются в опухоли при отношении T/P (концентрация элацестранта в опухоли/концентрация элацестранта в плазме) приблизительно 15 или выше, приблизительно 18 или выше, приблизительно 19 или выше, приблизительно 20 или выше, приблизительно 25 или выше, приблизительно 28 или выше, приблизительно 30 или выше, приблизительно 33 или выше, приблизительно 35 или выше, или приблизительно 40 или выше.

Дозировка.

Терапевтически эффективное количество комбинации элацестранта или его сольватов (например, гидратов) или солей для применения в способах, раскрываемых в настоящем изобретении, представляет собой количество, которое при введении за определенный промежуток времени приводит к достижению одного или нескольких терапевтических показателей (например, замедление или устранение роста опухоли, что приводит к регрессии опухоли, прекращению симптомов и т.д.). Комбинация для применения в раскрываемых в настоящем изобретении способах может быть введена субъекту один раз или несколько раз. Согласно таким вариантам осуществления, при которых соединения вводят несколько раз, их можно вводить с интервалами, например, один раз в сутки, через сутки, один раз в неделю или один раз в месяц. В качестве альтернативы, их можно вводить с нерегулярными интервалами, например, по мере необходимости на основании симптомов, состояния здоровья больного и т.п. Терапевтически эффективное количество комбинации может быть введено один раз в сутки на протяжении одних суток, по меньшей мере 2 суток, по меньшей мере 3 суток, по меньшей мере 4 суток, по меньшей мере 5 суток, по меньшей мере 6 суток, по меньшей мере 7 суток, по меньшей мере 10 суток или по меньшей мере 15 суток. Необязательно, состояние рака или регрессию опухоли контролируют в ходе или после лечения, например, с помощью FES-PET сканирования субъекта. Дозировка комбинации, вводимой субъекту, может быть повышена или снижена в зависимости от состояния рака или выявляемой регрессии опухоли.

В идеале, терапевтически эффективное количество не превышает максимальной переносимой дозировки, при которой 50% или больше получающих лечение субъектов, испытывают тошноту или другие токсические реакции, которые препятствуют дальнейшим введениям лекарственного средства. Терапевтически эффективное количество может варьировать для субъекта в зависимости от ряда факторов, в том

числе от изменчивости и степени выраженности симптомов, пола, возраста, массы тела или общего состояния здоровья субъекта, способа введения и типа соли или сольвата, изменчивости в чувствительности к лекарственному средству, конкретного типа заболевания и т.п.

Примеры терапевтически эффективных количеств элацестранта или его сольватов (например, гидратов) или солей для применения в способах, раскрываемых в настоящем изобретении, включают в себя без ограничения дозировку от приблизительно 150 мг до приблизительно 1500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 1500 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 1500 мг или от приблизительно 300 мг до приблизительно 1500 мг один раз в сутки для субъектов, имеющих устойчивые вызванные ER опухоли или раковые заболевания; дозировку от приблизительно 150 мг до приблизительно 1500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 1000 мг или от приблизительно 250 мг до приблизительно 1000 мг, или от приблизительно 300 мг до приблизительно 1000 мг один раз в сутки для субъектов, имеющих как вызванные ER опухоли и/или раковые заболевания дикого типа, так и устойчивые опухоли и/или раковые заболевания; и дозировку от приблизительно 300 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 300 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 600 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 250 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 600 мг один раз в сутки для субъектов, имеющих в основном вызванные ER опухоли и/или раковые заболевания дикого типа. Согласно некоторым вариантам осуществления дозировка соединения формулы I (например, элацестранта) или его соли или сольвата для применения в раскрываемых в настоящем изобретении способах, общих для взрослого субъекта, может составлять приблизительно 200, 400 мг, от 30 до 2000 мг, от 100 до 1500 мг или от 150 до 1500 мг перорально один раз в сутки. Такая дозировка один раз в сутки может быть достигнута посредством однократного введения или нескольких введений.

Введение дозы элацестранта при лечении рака молочной железы, в том числе устойчивых штаммов, а также случаев с экспрессией мутантного(ых) рецептора(ов), варьирует от 100 до 1000 мг в сутки. Например, доза элацестранта может составлять 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 мг в сутки. В частности, отмечены 200, 400, 500, 600, 800 и 1000 мг в сутки. Необычайно длительный период полужизни элацестранта у людей после перорального введения делает этот вариант особенно целесообразным. Соответственно, лекарственное средство может быть введено как 200 мг два раза в сутки (общая суточная доза 400 мг), 250 мг два раза в сутки (общая суточная доза 500 мг), 300 мг два раза в сутки (общая суточная доза 600 мг), 400 мг два раза в сутки (общая суточная доза 800 мг) или 500 мг два раза в сутки (общая суточная доза 1000 мг). Согласно некоторым вариантам осуществления введение дозы является пероральным.

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, раскрываемых в настоящем изобретении, элацестрант или его сольват (например, гидрат) или соль предпочтительно накапливается в опухоли при отношении T/P (концентрация элацестранта в опухоли/концентрация элацестранта в плазме) приблизительно 15 или выше, приблизительно 18 или выше, приблизительно 19 или выше, приблизительно 20 или выше, приблизительно 25 или выше, приблизительно 28 или выше, приблизительно 30 или выше, приблизительно 33 или выше, приблизительно 35 или выше или приблизительно 40 или выше.

Элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли можно вводить субъекту один раз или несколько раз. Согласно таким вариантам осуществления, если соединения вводят несколько раз, то они могут быть введены с интервалами, например, один раз в сутки, через сутки, один раз в неделю или один раз в месяц. В качестве альтернативы они могут быть введены с нерегулярными интервалами, например, по мере необходимости на основании симптомов, состояния здоровья больного и т.п.

Состав.

Согласно некоторым вариантам осуществления элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли вводят как часть одного состава. Например, элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли составляют в одну пилюлю для перорального введения или в однократную дозу для инъекции. Согласно некоторым вариантам осуществления введение соединений в одном составе улучшает соблюдение больным режима и схемы лечения.

Согласно некоторым вариантам осуществления состав, содержащий элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли, может дополнительно содержать одно или несколько фармацевтических вспомогательных средств, носителей, адъювантов и/или консервантов.

Элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли для применения в раскрываемых в настоящем изобретении способах могут быть составлены в единичные дозированные формы, что означают физически дискретные единицы, подходящие в качестве единичной дозировки для субъектов, проходящих лечение, при этом каждая единица содержит заранее определенное количество активного материала, рассчитанное на достижение желаемого терапевтического эффекта, необязательно в сочетании с подходящим фармацевтическим носителем. Единичная дозированная форма может быть предназначена для однократной суточной дозы или одной из нескольких суточных доз (например, от приблизительно

1 до 4 или более раз в сутки). При использовании нескольких суточных доз единичная дозированная форма может быть одинаковой или разной для каждой дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления соединения могут быть составлены для контролируемого высвобождения.

Элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли, а также соли или сольваты для применения в раскрываемых в настоящем изобретении способах могут быть составлены согласно любому доступному традиционному способу. Примеры предпочтительных дозированных форм включают в себя таблетку, порошок, мелкую гранулу, гранулу, покрытую таблетку, капсулу, сироп, пастилку, ингаляционную форму, суппозиторий, инъекционную форму, мазь, глазную мазь, глазные капли, назальные капли, ушные капли, катаплазму, лосьон и т.п. В составе могут быть использованы обычно используемые добавки, такие как разбавитель, связующее, разрыхлитель, смазочное средство, краситель, ароматизатор и при необходимости стабилизатор, эмульгатор, усилитель абсорбции, поверхностно-активное средство, регулятор pH, антисептическое средство, антиоксидант и т.п. Кроме того, составление также осуществляют путем объединения композиций, которые обычно используют в качестве сырьевого материала для фармацевтического состава, согласно традиционным способам. Примеры таких композиций включают в себя, например, (1) масло, такое как соевое масло, говяжий жир и синтетический глицерид; (2) углеводород, такой как жидкий парафин, сквалан и твердый парафин; (3) сложноэфирное масло, такое как октилододецилмиристиновая кислота и изопропилмиристиновая кислота; (4) высший спирт, такой как цетостеариловый спирт и бегениловый спирт; (5) силиконовую смолу; (6) силиконовое масло; (7) поверхностно-активное средство, такое как сложный эфир полиоксиэтиленовой жирной кислоты, сложный эфир сорбитана и жирной кислоты, сложный эфир глицерина и жирной кислоты, сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты, твердое полиоксиэтиленовое касторовое масло и блок-сополимер полиоксиэтилена и полиоксипропилена; (8) водорастворимые макромолекулы, такие как гидроксипропилцеллюлоза, полиакриловая кислота, карбоксиметилполимер, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон и метилцеллюлоза; (9) низший спирт, такой как этанол и изопропанол; (10) мультивалентный спирт, такой как глицерин, пропиленгликоль, дипропиленгликоль и сорбит; (11) сахар, такой как глюкоза и тростниковый сахар; (12) неорганический порошок, такой как безводная кремниевая кислота, алюмосиликат магния и силикат алюминия; и (13) очищенную воду и т.п. Добавки для применения в вышеуказанных составах могут включать в себя, например, 1) лактозу, кукурузный крахмал, сахарозу, глюкозу, маннит, сорбит, кристаллическую целлюлозу и диоксид кремния в качестве разбавителя; 2) поливиниловый спирт, поливиниловый эфир, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, аравийскую камедь, трагакант, желатин, шеллак, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, блок-сополимер полипропиленгликоля и полиоксиэтилена, меглумин, цитрат кальция, декстрин и т.п. в качестве связующего; 3) крахмал, агар, желатиновый порошок, кристаллическую целлюлозу, карбонат кальция, бикарбонат натрия, цитрат кальция, декстрин, пектиновую кислоту, карбоксиметилцеллюлозу/кальций и т.п. в качестве разрыхлителя; 4) стеарат магния, тальк, полиэтиленгликоль, оксид кремния, конденсированное растительное масло и т.п. в качестве смазочного средства; 5) любые красители, при этом в качестве красителя подходят те, добавление которых является фармацевтически приемлемым; 6) какао-порошок, ментол, ароматизатор, масло мяты перечной, порошок корицы в качестве ароматизатора; и 7) антиоксиданты, добавление которых приемлемо с фармацевтической точки зрения, такие как аскорбиновая кислота или альфа-токоферол. Элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли для применения в раскрываемых в настоящем изобретении способах могут быть составлены в фармацевтическую композицию в виде одного или нескольких активных соединений, описываемых в настоящем изобретении, и физиологически приемлемого носителя (также называемого фармацевтически приемлемым носителем, или раствором, или разбавителем). Такие носители и растворы включают в себя фармацевтически приемлемые соли и сольваты соединений, используемых в способах в соответствии с настоящим изобретением, и смеси, содержащие два или более из таких соединений, фармацевтически приемлемых солей соединений и фармацевтически приемлемых сольватов соединений. Такие композиции получают согласно приемлемым фармацевтическим процедурам, таким как описанные в работе Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Eaton, Pa. (1985), которая включена в настоящий изобретении посредством ссылки. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю, который не вызывает аллергической реакции или другого нежелательного эффекта у больных, которым его вводят, и является совместимым с другими ингредиентами в составе. Фармацевтически приемлемые носители включают в себя, например, фармацевтические разбавители, вспомогательные средства или носители, соответствующим образом выбранные с учетом предполагаемой формы введения и согласующиеся с общепринятой фармацевтической практикой. Например, твердые носители/разбавители включают в себя без ограничения камедь, крахмал (например, кукурузный крахмал, прежелатинизированный крахмал), сахар (например, лактозу, маннит, сахарозу, декстрозу), целлюлозный материал (например, микрокристаллическую целлюлозу), акрилат (например, полиметилакрилат), карбонат кальция, оксид магния, тальк или их смеси. Фармацевтически приемлемые носители, кроме того, могут включать в себя незначительные количества вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые повышают срок хранения или эффективность терапевтического средства.

Элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли в свободной форме можно превратить в соль традиционными способами. Используемый в настоящем изобретении термин "соль" не является ограниченным, если соль образована с элацестрантом или его сольватами (например, гидратами) или солями и является фармакологически приемлемой; предпочтительные примеры солей включают в себя гидрогалогенидную соль (например, хлористоводородную, бромистоводородную, йодистоводородную и т.п.), соль неорганической кислоты (например, сульфат, нитрат, перхлорат, фосфат, карбонат, бикарбонат и т.п.), органическую карбоксилатную соль (например, ацетатную соль, малеатную соль, тартратную соль, фумаратную соль, цитратную соль и т.п.), органическую сульфонатную соль (например, метансульфонатную соль, этансульфонатную соль, бензолсульфонатную соль, толуолсульфонатную соль, камфорсульфонатную соль и т.п.), соль аминокислоты (например, аспартатную соль, глутаматную соль и т.п.), соль четвертичного аммония, соль щелочного металла (например, соль натрия, соль калия и т.п.), соль щелочноземельного металла (соль магния, соль кальция и т.п.) и т.п. Кроме того, хлористоводородная соль, сульфатная соль, метансульфонатная соль, ацетатная соль и т.п. предпочтительны в качестве "фармакологически приемлемой соли" соединений в соответствии с настоящим изобретением.

Изомеры элацестранта или его сольватов (например, гидратов) или солей (например, геометрические изомеры, оптические изомеры, ротамеры, таутомеры и т.п.) могут быть очищены с использованием общих средств разделения, включая, например, перекристаллизацию, оптическое разделение, такое как способ диастереомерных солей, способ ферментативного фракционирования, различные хроматографии (например, тонкослойная хроматография, колоночная хроматография, хроматография со стеклянной колонкой и т.п.), до одного изомера. Термин "один изомер" в настоящем изобретении включает в себя не только изомер, имеющий чистоту 100%, но также изомер, включающий в себя изомер, отличный от целевого, который имеется даже при традиционной операции очистки. Кристаллический полиморф иногда существует для элацестранта или его сольватов (например, гидратов) или солей и/или фулвестранта, и все их кристаллические полиморфы включены в настоящее изобретение. Кристаллический полиморф иногда является отдельным, а иногда смесью, и то, и другое включены в настоящий изобретение.

Согласно некоторым вариантам осуществления элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли могут иметь форму пролекарства, что означает, что они должны претерпевать некоторое изменение (например, окисление или гидролиз) для достижения своей активной формы. В качестве альтернативы, элацестрант или его сольваты (например, гидраты) или соли могут представлять собой соединение, полученное путем преобразования исходного пролекарства в его активную форму.

Путь введения.

Пути введения элацестранта или его сольватов (например, гидратов) или солей включают в себя без ограничения местное введение, пероральное введение, внутрикожное введение, внутримышечное введение, внутривенное введение, интравезикальную инфузию, подкожное введение, чрескожное введение и трансмукозальное введение. Согласно некоторым вариантам осуществления путь введения является пероральным.

Профилирование генов.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы ингибирования роста опухоли или регрессии опухоли, представленные в настоящем изобретении, дополнительно предусматривают профилирование генов субъекта, при этом ген, подлежащий профилированию, представляет собой один или несколько генов, выбранных из группы, состоящей из ABL1, AKT1, AKT2, ALK, APC, AR, ARID1A, ASXL1, ATM, AURKA, BAP, BAP1, BCL2L11, BCR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CEBPA, CTNNB1, DDR2, DNMT3A, E2F3, EGFR, EML4, ERBB2, ERBB3, ESR1, EWSR1, FBXW7, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, FRS2, HIF1A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, JAK2, KDM6A, KDR, KIF5B, KIT, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K4, MCL1, MDM2, MDM4, MET, MGMT, MLL, MPL, MSH6, MTOR, MYC, NF1, NF2, NKX2-1, NOTCH1, NPM, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PML, PTEN, PTPRD, RARA, RB1, RET, RICTOR, ROS1, RPTOR, RUNX1, SMAD4, SMARCA4, SOX2, STK11, TET2, TP53, TSC1, TSC2 и VHL. Согласно другим вариантам осуществления ген, подлежащий профилированию, представляет собой один или несколько генов, выбранных из группы, состоящей из AKT1, AKT2, BRAF, CDK4, CDK6, PIK3CA, PIK3R1 и MTOR.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения субпопуляции больных раком молочной железы, при этом указанная субпопуляция характеризуется повышенной экспрессией одного или нескольких генов, раскрываемых выше, и лечения указанной субпопуляции с помощью эффективной дозы элацестранта или его сольватов (например, гидратов) или солей согласно вариантам осуществления введения дозы, описываемым в настоящем раскрытии.

Корректировка дозы.

Помимо установления способности элацестранта ингибировать рост опухоли, элацестрант ингибирует связывание эстрадиола с ER в матке и гипофизе. В этих экспериментах связывание эстрадиола с ER в ткани матки и гипофиза оценивали с помощью визуализации FES-PET. После лечения элацестрантом наблюдаемый уровень связывания ER был на уровне исходного значения или ниже. Эти результаты показывают, что антагонистический эффект элацестранта в отношении активности ER можно оценивать с

помощью сканирования в режиме реального времени. На основании этих результатов в настоящем изобретении представлены способы мониторинга эффективности лечения элацестрантом или его сольватами (например, гидратами) или солями в комбинированной терапии, раскрываемой в настоящем изобретении, путем измерения связывания эстрадиола с ER в одной или нескольких целевых тканях, при этом уменьшение или исчезновение связывания указывает на эффективность. Кроме того, представлены способы корректировки дозировки элацестранта или его сольватов (например, гидратов) или солей в комбинированной терапии, раскрываемой в настоящем изобретении, на основании связывания эстрадиола с ER. Согласно некоторым вариантам осуществления этих способов связывание измеряют в некоторой точке после одного или нескольких введений первой дозировки соединения.

Если связывание эстрадиола с ER не нарушено, или наблюдается снижение ниже заданного порога (например, снижение связывания по сравнению с исходным уровнем менее чем 5%, менее чем 10%, менее чем 20%, менее чем 30% или менее чем 50%), то первая дозировка считается слишком низкой. Согласно некоторым вариантам осуществления эти способы предусматривают дополнительную стадию введения увеличенной второй дозировки соединения. Эти стадии можно повторять, многократно увеличивая дозировку до тех пор, пока не будет достигнуто желаемое снижение связывания эстрадиола с ER. Согласно некоторым вариантам осуществления эти стадии могут быть включены в способы ингибирования роста опухоли, представленные в настоящем изобретении. В этих способах связывание эстрадиола с ER может служить индикатором ингибирования роста опухоли или дополнительным средством оценки ингибирования роста. Согласно другим вариантам осуществления эти способы можно использовать в сочетании с введением элацестранта или его сольватов (например, гидратов) или солей для целей, отличных от ингибирования роста опухоли, включая, например, ингибирование пролиферации раковых клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы, представленные в настоящем изобретении, для корректировки дозировки элацестранта или его соли или сольвата (например, гидрата) в комбинированной терапии предусматривают

(1) введение первой дозировки элацестранта или его соли или сольвата (например, гидрата) (например, от приблизительно 350 мг/сутки до приблизительно 500 мг/сутки или от приблизительно 200 мг/сутки до приблизительно 600 мг/сутки) в течение 3, 4, 5, 6 или 7 суток;

(2) выявление активности связывания эстрадиола с ER, при этом

(i) если активность связывания ER не выявляется или ниже предварительно определенного порогового уровня, продолжают вводить первую дозировку (т.е. поддерживают уровень дозировки), или

(ii) если активность связывания ER выявляется или выше предварительно определенного порогового уровня, вводят вторую дозировку, которая больше первой дозировки (например, первая дозировка плюс от приблизительно 50 до приблизительно 200 мг) в течение 3, 4, 5, 6 или 7 суток, затем переходят к стадии (3);

(3) выявление активности связывания эстрадиола с ER, при этом

(i) если активность связывания ER не выявляется или ниже предварительно определенного порогового уровня, продолжают вводить вторую дозировку (т.е. поддерживают уровень дозировки), или

(ii) если активность связывания ER выявляется или выше предварительно определенного порогового уровня, вводят третью дозировку, которая больше второй дозировки (например, вторая дозировка плюс от приблизительно 50 мг до приблизительно 200 мг) в течение 3, 4, 5, 6 или 7 суток, затем переходят к стадии (4);

(4) повторение описанных выше стадий для четвертой дозировки, пятой дозировки и т.д., до тех пор пока не будет выявлено отсутствие активности связывания ER.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее изобретение относится к применению визуализации PET для выявления и/или лечения чувствительных к ER или устойчивых к ER раковых заболеваний.

Следующие примеры представлены для лучшей иллюстрации заявляемого изобретения и не должны интерпретироваться как ограничение объема настоящего изобретения. В той степени, в которой упоминаются конкретные материалы, они являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Специалист в данной области сможет разработать эквивалентные средства или реагенты, без излишней изобретательской деятельности и не выходя за рамки настоящего изобретения. Следует учитывать, что в описанные в настоящем изобретении процедуры можно внести множество изменений, не выходя при этом за пределы объема настоящего изобретения. Авторы настоящего изобретения предусматривают включение таких вариантов в объем настоящего изобретения.

Примеры

Материалы и способы.

Тестируемые соединения.

Элацестрант, используемый в приведенных ниже примерах, представлял собой (6R)-6-(2-(N-(4-(2-(этиламино)этил)бензил)-N-этиламино)-4-метоксифенил)-5,6,7,8-тетрагидронафтален-2-ола дигидрохлорид, изготовленный, например, компанией IRIX Pharmaceuticals, Inc. (Florence, SC). Элацестрант хранили в виде сухого порошка, составленного для применения в виде гомогенной суспензии в 0,5% (мас./об.) метилцеллюлозы в деионизированной воде, и для животных моделей вводили перорально. Тамоксифен,

ралоксифен и эстрадиол (E2) получали из компании Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) и вводили путем подкожной инъекции. Фулвестрант получали из компании Tocris Biosciences (Minneapolis, MN) и вводили путем подкожной инъекции. Другие лабораторные реагенты приобретали у компании Sigma-Aldrich, если не отмечено иное.

Модели PDX.

Опухоли пересаживали в виде фрагментов бестимусным голым мышам (Nu (NCR)-Foxnlnu). Полученные от больных фрагменты ксенотрансплантата CTG-1211 (Champions Oncology), ST2535 (START) и WHIM43 (Horizon) имплантировали мышам без добавления эстрадиола. Всех мышей содержали в свободном от патогенов помещении, в индивидуально вентилируемых клетках со стерилизованной и беспыльной подстилкой из початков, с доступом к стерилизованному корму и воде ad libitum, в условиях цикла света и темноты (12-14-часового циркадного цикла искусственного освещения) и при контролируемой комнатной температуре и влажности. Опухоли измеряли два раза в неделю штангенциркулем Вернье, объемы рассчитывали с использованием формулы $(L \cdot W^2) \cdot 0,52$. Элацестрант вводили перорально один раз в сутки на протяжении всего исследования. Фулвестрант вводили подкожно один раз в неделю.

Количественная PCR в режиме реального времени (RT-qPCR).

In vivo модели ксенотрансплантата.

В конце исследования опухоли измельчали с помощью импактора CryoPREP™ (Covaris) и общую РНК экстрагировали с помощью мининабора RNeasy (Qiagen). qPCR выполняли с использованием Taqman Fast Virus 1-Step Master Mix и зондов TaqMan™ (Applied Biosystems). Значения Ct анализировали для оценки относительных изменений экспрессии мРНК PgR (рецептора прогестерона) с GAPDH в качестве внутреннего контроля с использованием способа 2-ΔΔCT.

In vitro модели ксенотрансплантата.

В конце обработки клетки лизировали лизисным буфером из набора 1-Step Cells-to-Ct и лизаты обрабатывали в соответствии с инструкциями производителя. qPCR выполняли с использованием 1-Step Master Mix и зондов TaqMan™ (Applied Biosystems). Значения Ct анализировали для оценки относительных изменений экспрессии мРНК PgR (рецептора прогестерона) с GAPDH в качестве внутреннего контроля с использованием способа 2-ΔΔCT.

Эффективность средства.

Для всех исследований, начиная с суток 0, размеры опухоли измеряли с помощью цифрового штангенциркуля и данные, в том числе индивидуальные и средние оцениваемые объемы опухоли (среднее $TV \pm SEM$), регистрировали для каждой группы; объем опухоли рассчитывали с использованием формулы (Yasui et al., *Invasion Metastasis*, 17:259-269 (1997), которая включена в настоящий документ посредством ссылки): $TV = \text{ширина}^2 \times \text{длина} \times 0,52$. Каждые группы или исследование заканчивали, когда оцениваемый средний объем опухоли в группе достигал конечной точки объема опухоли (TV) (конечная точка времени составляла 60 дней, конечной точкой объема было среднее значение группы 2 см^3), при этом отдельных мышей, достигавших объема опухоли 2 см^3 или больше, исключали из исследования, и последнее измерение включали в среднее значение группы до тех пор, пока среднее значение не достигало конечной точки объема, или пока исследование не достигло конечной точки времени.

Вычисления эффективности и статистический анализ.

Значения % ингибирования роста опухоли (% TGI) рассчитывали в единственной точке времени (когда контрольная группа достигала объема опухоли или конечной точки времени) и регистрировали для каждой группы лечения (T) по сравнению с контролем (C) с использованием начального (i) и окончательного (f) измерений опухоли по формуле (Corbett TH et al., *In vivo methods for screening and preclinical testing*, in: Teicher B., ed., *Anticancer Drug Development Guide*. Totowa, NJ: Humana, 2004:99-123) $\% TGI = 1 - \frac{T_f - T_i}{C_f - C_i}$.

Статистический анализ.

Статистический анализ выполняли с использованием GraphPadPrism 7.0 и данные обычно выражали в виде среднего значения $\pm SEM/SD$. Сравнения групп лечения выполняли с использованием однофакторного анализа ANOVA, статистические анализы выполняли с апостериорным критерием Даннетта. Статистические показатели выражали следующим образом: н. з. - не значимое; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Сбор образцов.

В конечной точке опухоли удаляли. Один фрагмент мгновенно замораживали, в то время как другой фрагмент помещали в 10% NBF по меньшей мере на 24 ч, фиксировали формалином и заливали парафином (FFPE). Мгновенно замороженные образцы хранили при -80°C ; FFPE блоки хранили при комнатной температуре.

Вестерн-блоттинг.

Клетки или опухоли собирали после введения дозы и анализировали экспрессию белка с использованием стандартных методик и следующих антител: ER α , PR (Cell Signaling Technologies, № по каталогу 13258, № 3153) и винкулин: Sigma-Aldrich, № v9131). Экспрессию белка количественно оценива-

ли с использованием программного обеспечения AzureSpot и нормализовали по экспрессии винкулина.

Примеры.

На фиг. 1 видно, что элацестрант ингибирует пролиферацию и передачу сигнала ER в *in vitro* моделях, содержащих различные мутации ESR1, в том числе в линиях раковых клеток клона 1 Y537S, клона 2 Y537S, клона 1 D538G, клона 2 D538G и клона 1 S463P. Иллюстративные изображения, представленные в верхнем ряду, визуализируют опухолевые клетки, обработанные контролем в виде среды-носителя, для линий мутированных раковых клеток клона 1 Y537S, клона 2 Y537S, клона 1 D538G, клона 2 D538G и клона 1 S463P. На изображениях, представленных в нижнем ряду, визуализируются опухолевые клетки клона 1 Y537S, клона 2 Y537S, клона 1 D538G, клона 2 D538G и клона 1 S463P, обработанные элацестрантом при 100 нМ. На фиг. 2 видно, что элацестрант продемонстрировал зависимое от дозы ингибирование роста опухоли и регрессию опухоли на моделях ксенотрансплантата бестимусных голых мышей. На фиг. 2 показано среднее±SEM объемов опухоли с течением времени на мышинных моделях ксенотрансплантата, которые обрабатывали контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30, 60 и 120 мг/кг) и фулвэстрантом (1 мг/доза).

На фиг. 3А-3С видно, что элацестрант ингибирует передачу сигнала ER *in vitro* в моделях, содержащих различные мутации ESR1, при этом на иллюстративных гистограммах показано снижение маркеров пролиферации в моделях ксенотрансплантатов *in vitro*. На фиг. 3А представлена кратность изменения относительно контроля рецептора прогестерона (PgR) для моделей опухолевых клеток, имеющих мутации дикого типа, S463P, D538G и Y537S, обрабатываемых контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (10, 100 и 1000 нМ), E2 (10 пМ) и фулвэстрантом (10, 100 и 1000 нМ). На фиг. 3В представлена кратность изменения относительно контроля роста, регулируемого эстрогеном (GREB1), на моделях опухолевых клеток, имеющих мутации дикого типа, S463P, D538G и Y537S, обработанных контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (10, 100 и 1000 нМ), E2 (10 пМ) и фулвэстрантом (10, 100 1000 нМ). На фиг. 3С представлена кратность изменения относительно контроля фактора "трилистника" 1 (TFF1) на моделях опухолевых клеток, имеющих мутации дикого типа, S463P, D538G и Y537S, обработанных контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (10, 100 и 1000 нМ), E2 (10 пМ) и фулвэстрантом (10, 100 и 1000 нМ). На фиг. 4А-4С видно, что элацестрант продемонстрировал зависимое от дозы ингибирование роста опухоли на множестве моделей PDX, имеющих мутацию ESR1:D538G. На фиг. 4А показано среднее±SEM объемов опухоли с течением времени у бестимусных голых мышей, которым имплантировали ксенотрансплантат PDX ST2535-Н1 (с предварительной обработкой тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвэстрантом) с мутацией ESR1:D538G, которых обрабатывали контролем в виде среды-носителя и элацестрантом (30 и 60 мг/кг). На фиг. 4В показано среднее±SEM объемов опухоли с течением времени у бестимусных голых мышей, которым имплантировали ксенотрансплантат PDX CTG-1211-Н1 (с предварительной обработкой тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвэстрантом) с мутацией ESR1:D538G, которых обрабатывали контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвэстрантом (3 мг/доза). На фиг. 4С показано среднее±SEM объемов опухоли с течением времени у бестимусных голых мышей, которым имплантировали ксенотрансплантат PDX WHIM43-Н1 (с предварительной обработкой тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвэстрантом) с мутацией ESR1:D538G, которых обрабатывали контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвэстрантом (3 мг/доза).

На фиг. 5А-5F показано, что элацестрант разрушает ER и ингибирует передачу сигнала ER на моделях PDX, имеющих мутации ESR1:D538G, на моделях ксенотрансплантата у бестимусных голых мышей. На фиг. 5А показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя содержания мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели ксенотрансплантата PDX ST2535-Н1 (с предварительной обработкой тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвэстрантом) с мутацией ESR1:D538G, которую обрабатывали контролем в виде среды-носителя и элацестрантом (30 и 60 мг/кг). На фиг. 5В проиллюстрирован вестерн-блоттинг, демонстрирующий экспрессию PgR на модели ксенотрансплантата PDX ST2535-Н1 с мутацией ESR1:D538G, которую обрабатывали контролем в виде среды-носителя и элацестрантом (30 и 60 мг/кг). На фиг. 5С показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя содержания мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели ксенотрансплантата PDX CTG-1211-Н1 (с предварительной обработкой тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвэстрантом) с мутацией ESR1:D538G, которую обрабатывали контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвэстрантом (3 мг/доза). На фиг. 5D проиллюстрирован вестерн-блоттинг, демонстрирующий экспрессию PgR на модели ксенотрансплантата PDX CTG-1211-Н1 с мутацией ESR1:D538G, обработанной контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвэстрантом. На фиг. 5E показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя содержания мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели ксенотрансплантата PDX WHIM43-Н1 (с предварительной обработкой тамоксифеном, ингибитором ароматазы и фулвэстрантом) с мутацией ESR1:D538G, которую обрабатывали контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвэстрантом (3 мг/доза). На фиг. 5F проиллюстрирован вестерн-блоттинг, демонстрирующий экспрессию PgR на модели ксенотрансплантата PDX WHIM43-Н1 с мутацией ESR1:D538G, которую обрабатывали контролем в виде

среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом.

На фиг. 6А и 6В показано, что элацестрант демонстрирует большее ингибирование роста опухоли, чем препараты сравнения SERD на моделях PDX ST941-Н1, имеющих мутации ESR1:Y537S. На фиг. 6А показано среднее±SEM объемов опухоли с течением времени на модели PDX ST941-Н1, содержащей мутацию ESR1:Y537S, которую обрабатывали контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза, подкожно, один раз в сутки), дозой 1 serd1, и дозой 2 serd1. На фиг. 6В показано среднее±SEM объемов опухоли с течением времени на модели PDX ST941-Н1, содержащей мутацию ESR1:Y537S, которую обрабатывали контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза), дозой 1 serd2 и дозой 2 serd2.

На фиг. 7А-7С показано, что элацестрант демонстрирует большее ингибирование роста опухоли, чем препараты сравнения SERD на моделях PDX ST941-Н1, имеющих мутации ESR1:Y537S. На фиг. 7А показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя по сравнению с содержаниями мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели PDX ST941-Н1, содержащей мутацию ESR1:Y537S, которую обрабатывали контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/доза), элацестрантом (30 мг/кг), дозой 1 serd1, дозой 2 serd1, дозой 1 serd2 и дозой 2 serd2. На фиг. 7В представлен вестерн-блоттинг для модели PDX ST941-Н1, содержащей мутацию ESR1:Y537S, демонстрирующей экспрессию PgR, которую обрабатывали контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/кг), элацестрантом (30 мг/кг), дозой 1 serd1 и дозой 2 serd1. На фиг. 7С представлен вестерн-блоттинг для модели PDX ST941-Н1, содержащей мутацию ESR1:Y537S, демонстрирующей экспрессию PgR, которую обрабатывали контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/кг), элацестрантом (30 мг/кг), дозой 1 serd2 и дозой 2 serd2.

На фиг. 8А и 8В представлено оценивание элацестранта и фулвестранта и их соответствующих активностей *in vitro*. На фиг. 8А представлена *in vitro* жизнеспособность клеток (% контроля) относительно Log[концентрация (мкМ)] для клеточной линии PDX ST941-Н1. На фиг. 8В показана кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя содержания мРНК рецептора прогестерона (PgR), нанесенного на график по отношению к концентрации элацестранта (0, 10, 100 и 1000 нМ) и фулвестранта (0, 10, 100 и 1000 нМ), используемых при обработке *in vitro* клеточной линии ST941-Н1, полученной из PDX.

На фиг. 9А и 9В представлено оценивание элацестранта и фулвестранта и их соответствующих активностей *in vitro*. На фиг. 9А показано среднее±SEM объемов опухоли у мышей, которым имплантировали PDX ST941-Н1, содержащий мутацию ESR1:Y537S, нанесенное на график по отношению ко времени и обработке их контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (10, 30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза). На фиг. 9В показана кратность изменения относительно контроля экспрессии мРНК рецептора прогестерона (PgR) на модели PDX ST941-Н1, нанесенная на график по отношению к обработке их контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/доза) и элацестрантом (10, 30 и 60 мг/кг).

На фиг. 10А-10Д показано, что элацестрант и фулвестрант демонстрируют частичную эффективность на модели мутантного PDX ESR1, имеющей дополнительные онкогенные мутации. На фиг. 10А показано среднее±SEM объемов опухоли с течением времени у мышей, которым имплантировали ксенотрансплантат PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, с обработкой контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза). На фиг. 10В представлена кратность изменения относительно контроля в виде среды-носителя рецептора прогестерона (PgR) в ксенотрансплантате PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, обработанном контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза). На фиг. 10С представлена кратность изменения относительно контроля фактора "трилистника" 1 (TFF1) в ксенотрансплантате PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, обработанном контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза). На фиг. 10Д представлена кратность изменения относительно контроля роста, регулируемого эстрогеном (GREB1) в ксенотрансплантате PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, обработанном контролем в виде среды-носителя, элацестрантом (30 и 60 мг/кг) и фулвестрантом (3 мг/доза). На фиг. 10Е представлен вестерн-блоттинг ксенотрансплантата PDX WHIM20 с мутацией ESR1:Y537S^{hom}, демонстрирующего экспрессию PgR и обработанного контролем в виде среды-носителя, фулвестрантом (3 мг/доза) и элацестрантом (30 и 60 мг/кг).

Другие варианты осуществления.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем раскрытии, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на выдачу патента были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки. Если значение терминов в любом из патентов или публикаций, включенных посредством ссылки, противоречит значению терминов, используемых в настоящем раскрытии, предполагается, что значение терминов в настоящем раскрытии является определяющим. Кроме того, предшествующее обсуждение раскрывает и описывает исключительно иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения. Специалист в данной области техники легко поймет из такого обсуждения, а также из прилагаемых графических материалов и формулы изобретения, что в них могут быть внесены различные изменения, модификации и вариации, не выходящие за рамки сути и объема настоящего изобретения, который определяется сле-

дующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение элацестранта или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата для ингибирования и разрушения положительного по мутантному рецептору эстрогена альфа негативного рака по эпидермальному фактору роста человека-2 (Her2) у субъекта, причем субъект был предварительно обработан ингибитором ароматазы, тамоксифеном и фулвестрантом, где элацестрант вводят субъекту при дозе от приблизительно 200 мг/сутки до приблизительно 500 мг/сутки.

2. Применение по п.1, при котором положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из D538G, Y537X₁, L536X₂, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и их комбинаций, при этом X₁ представляет собой S, N или C; и X₂ представляет собой R или Q.

3. Применение по п.2, при котором мутация представляет собой Y537S.

4. Применение по п.2, при котором мутация представляет собой D538G.

5. Применение по любому из пп.1-4, при котором положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак является устойчивым к лекарственному средству, выбранному из группы, состоящей из противоэстрогенных средств, ингибиторов ароматазы и их комбинаций.

6. Применение по любому из пп.1-5, при котором положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака матки, рака яичника, метастаз рака молочной железы в головной мозг и рака гипофиза.

7. Применение по любому из пп.1-6, при котором положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак представляет собой рак молочной железы.

8. Применение по любому из пп.1-7, при котором положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак представляет собой запущенный или метастатический рак молочной железы.

9. Применение по любому из пп.1-8, при котором субъект представляет собой женщину в постменопаузе.

10. Применение по любому из пп.1-8, при котором субъект представляет собой женщину в пременопаузе.

11. Применение по любому из пп.1-8, при котором субъект представляет собой женщину в постменопаузе, заболевание которой рецидивирует или прогрессирует после предшествующего лечения селективными модуляторами рецептора эстрогена (SERM) и/или ингибиторами ароматазы (AI).

12. Применение по любому из пп.1-11, при котором элацестрант вводят субъекту при дозе приблизительно 200 мг/сутки, приблизительно 300 мг/сутки, приблизительно 400 мг/сутки или приблизительно 500 мг/сутки.

13. Применение по любому из пп.1-12, дополнительно предусматривающее идентификацию субъекта для лечения путем измерения повышенной экспрессии одного или нескольких генов, выбранных из ABL1, AKT1, AKT2, ALK, APC, AR, ARID1A, ASXL1, ATM, AURKA, BAP, BAP1, BCL2L11, BCR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CEPBA, CTNNB1, DDR2, DNMT3A, E2F3, EGFR, EML4, EPHB2, ERBB2, ERBB3, ESR1, EWSR1, FBXW7, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, FRS2, HIF1A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, JAK2, KDM6A, KDR, KIF5B, KIT, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K4, MCL1, MDM2, MDM4, MET, MGMT, MLL, MPL, MSH6, MTOR, MYC, NF1, NF2, NKX2-1, NOTCH1, NPM, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PML, PTEN, PTPRD, RARA, RB1, RET, RICTOR, ROS1, RPTOR, RUNX1, SMAD4, SMARCA4, SOX2, STK11, TET2, TP53, TSC1, TSC2 и VHL.

14. Применение по п.13, при котором один или несколько генов выбраны из AKT1, AKT2, BRAF, CDK4, CDK6, PIK3CA, PIK3R1 и MTOR.

15. Применение по любому из пп.1-14, при котором отношение концентрации элацестранта или его соли или сольвата в опухоли к концентрации элацестранта или его соли или сольвата в плазме (Т/Р) после введения составляет по меньшей мере приблизительно 15.

16. Применение элацестранта или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата для лечения устойчивого к лекарственному средству положительного по рецептору эстрогена альфа негативного рака по эпидермальному фактору роста человека-2 (Her2) у субъекта, имеющего мутантный рецептор эстрогена альфа, при этом мутантный рецептор эстрогена альфа содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из D538G, Y537X₁, L536X₂, P535H, V534E, S463P, V392I, E380Q и их комбинаций, при этом X₁ представляет собой S, N или C; и X₂ представляет собой R или Q, причем субъект был предварительно обработан ингибитором ароматазы, тамоксифеном и фулвестрантом, где элацестрант вводят субъекту при дозе от приблизительно 200 мг/сутки до приблизительно 500 мг/сутки.

17. Применение по п.16, при котором рак является устойчивым к лекарственному средству, выбранному из группы, состоящей из противоэстрогенных средств, ингибиторов ароматазы и их комбинаций.

18. Применение по п.17, при котором противоэстрогенные средства выбраны из группы, состоящей из тамоксифена, торемифена и фулвестранта, а ингибиторы ароматазы выбраны из группы, состоящей из

эксеместана, летроззола и анастрозола.

19. Применение по любому из пп.16-18, при котором устойчивый к лекарственному средству положительный по рецептору эстрогена альфа рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака матки, рака яичника, метастаз рака молочной железы в головной мозг и рака гипофиза.

20. Применение по любому из пп.16-19, при котором рак представляет собой рак молочной железы.

21. Применение по любому из пп.16-19, при котором рак представляет собой запущенный или метастатический рак молочной железы.

22. Применение по любому из пп.16-21, при котором субъект представляет собой женщину в постменопаузе.

23. Применение по любому из пп.16-21, при котором субъект представляет собой женщину в пременопаузе.

24. Применение по любому из пп.16-21, при котором субъект представляет собой женщину в постменопаузе, заболевание которой рецидивирует или прогрессирует после предшествующего лечения с помощью SERM и/или AI.

25. Применение по любому из пп.16-24, при котором указанный субъект экспрессирует по меньшей мере один мутантный рецептор эстрогена альфа, выбранный из группы, состоящей из D538G, Y537S, Y537N, Y537C, E380Q, S463P, L536R, L536Q, P535H, V392I и V534E.

26. Применение по любому из пп.16-25, при котором мутация включает в себя Y537S.

27. Применение по любому из пп.16-26, при котором мутация включает в себя D538G.

28. Применение по любому из пп.16-27, при этом дополнительно предусматривающее идентификацию субъекта для лечения путем измерения повышенной экспрессии одного или нескольких генов, выбранных из ABL1, AKT1, AKT2, ALK, APC, AR, ARID1A, ASXL1, ATM, AURKA, BAP, BAP1, BCL2L11, BCR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDH1, CDK4, CDK6, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, СЕВРА, CTNNB1, DDR2, DNMT3A, E2F3, EGFR, EML4, ERBB2, ERBB3, ESR1, EWSR1, FBXW7, FGF4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, FRS2, HIF1A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, JAK2, KDM6A, KDR, KIF5B, KIT, KRAS, LRP1B, MAP2K1, MAP2K4, MCL1, MDM2, MDM4, MET, MGMT, MLL, MPL, MSH6, MTOR, MYC, NF1, NF2, NKX2-1, NOTCH1, NPM, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PIK3R1, PML, PTEN, PTPRD, RARA, RB1, RET, RICTOR, ROS1, RPTOR, RUNX1, SMAD4, SMARCA4, SOX2, STK11, TET2, TP53, TSC1, TSC2 и VHL.

29. Применение по п.28, при котором один или несколько генов выбраны из AKT1, AKT2, BRAF, CDK4, CDK6, PIK3CA, PIK3R1 и MTOR.

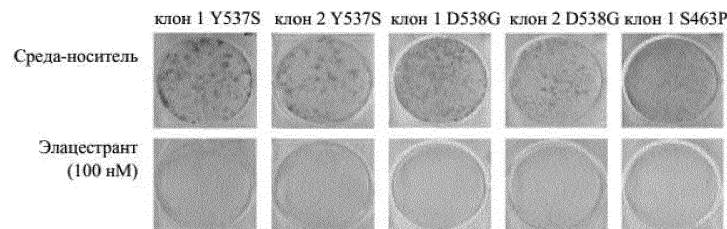
30. Применение по любому из пп.16-29, при котором элацестрант вводят субъекту при дозе приблизительно 200 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг или приблизительно 500 мг.

31. Применение по любому из пп.16-30, при котором элацестрант вводят субъекту при дозе приблизительно 300 мг/сутки.

32. Применение по любому из пп.16-31, при котором отношение концентрации элацестранта или его соли или сольвата в опухоли к концентрации элацестранта или его соли или сольвата в плазме (Т/Р) после введения составляет по меньшей мере приблизительно 15.

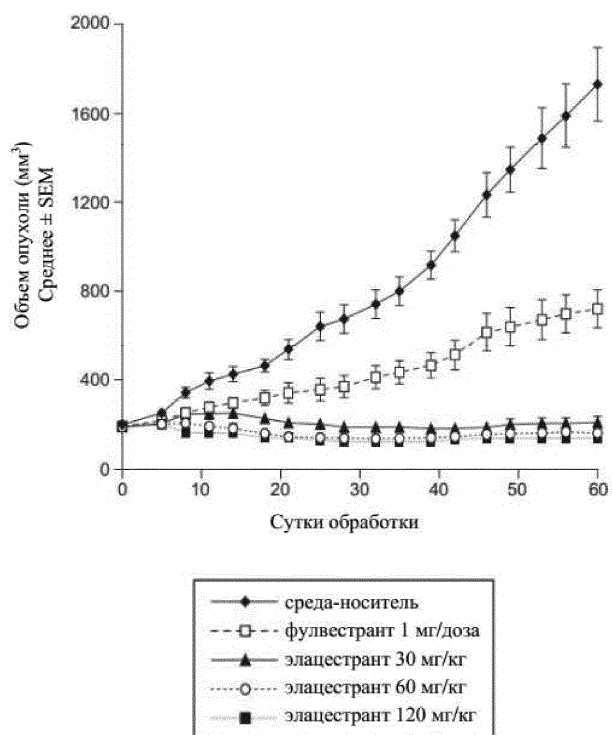
33. Применение по п.6, при котором положительный по мутантному рецептору эстрогена альфа рак представляет собой метастазы рака молочной железы в головной мозг.

34. Применение по п.19, при котором устойчивый к лекарственному средству положительный по рецептору эстрогена альфа рак представляет собой метастазы рака молочной железы в головной мозг.

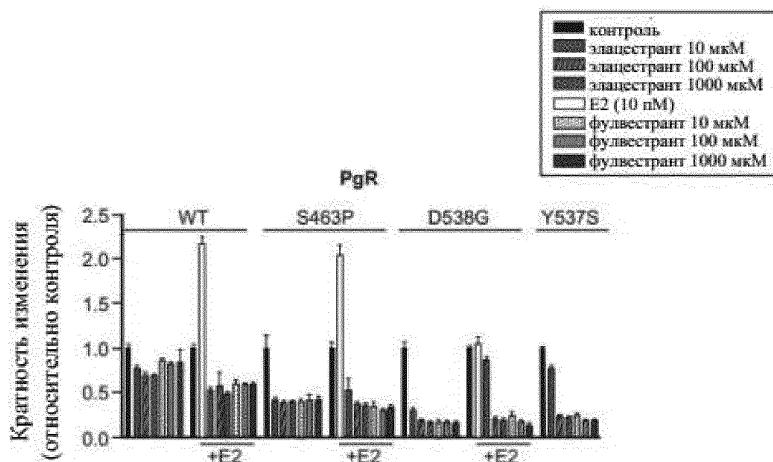


Фиг. 1

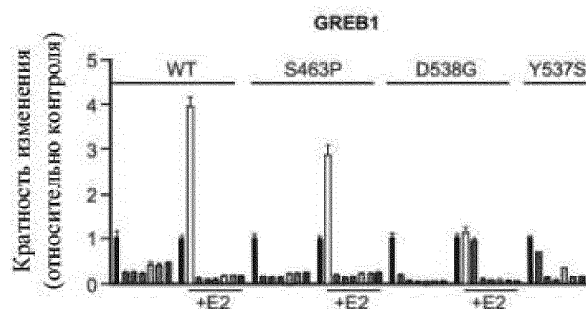
PDX: ST2177
 ESR1 mut: Y537S^{hom}



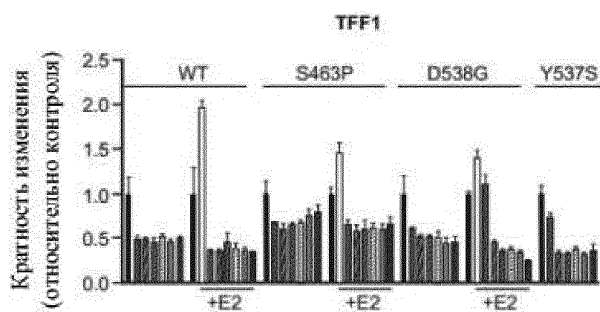
Фиг. 2



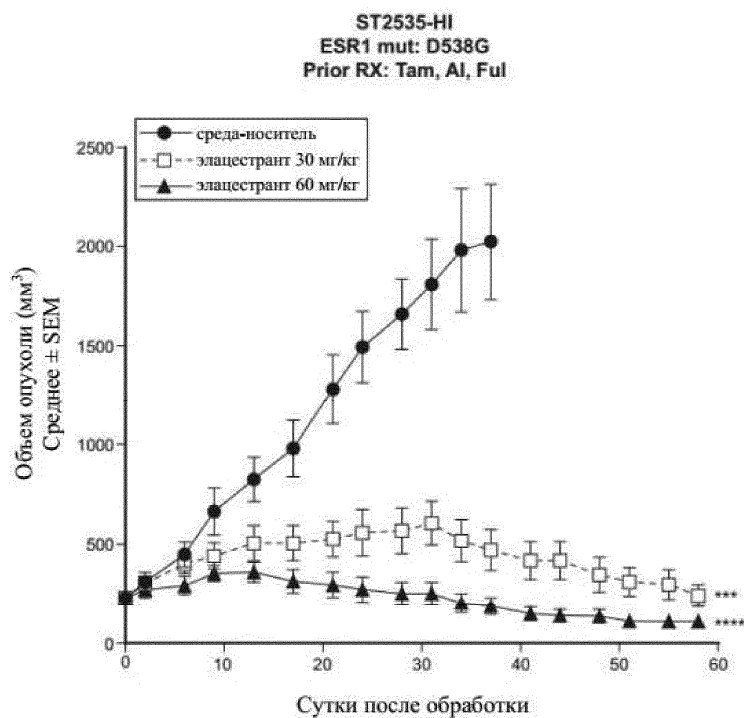
Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 3С

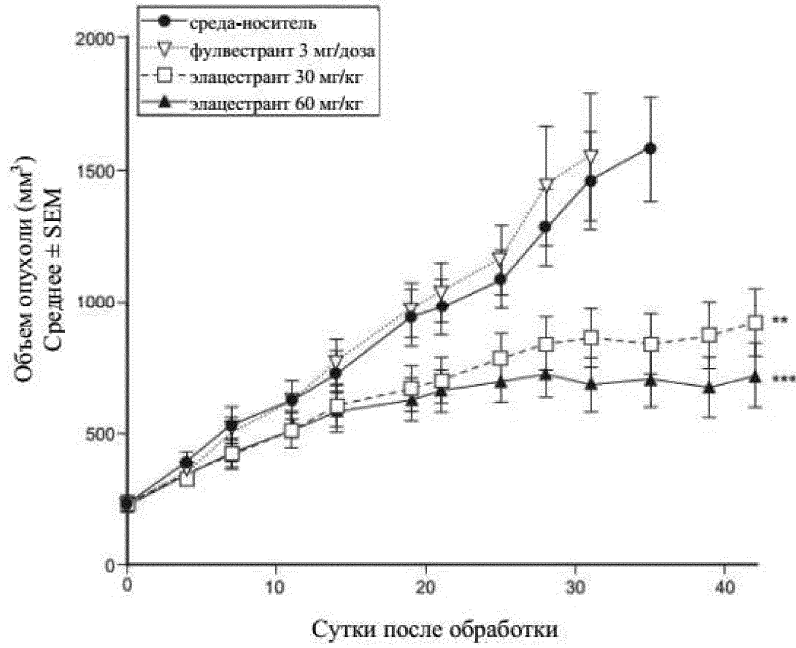


ns = не значимое, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$,

mut = мутант, Tam = тамоксифен, AI = ингибитор ароматазы, Ful = фулвестрант

Фиг. 4А

CTG-1211-HI
 ESR1 mut: D538G
 Prior RX: Tam, AI, Ful

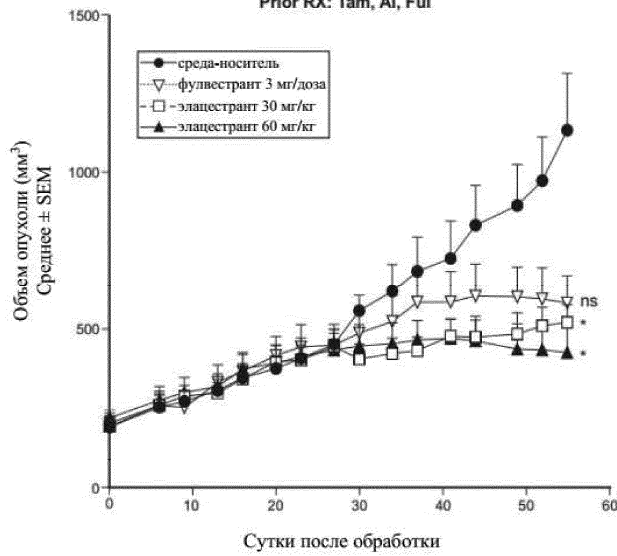


ns = не значимое, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001,

mut = мутант, Tam = тамоксифен, AI = ингибитор ароматазы, Ful = фулвестрант

Фиг. 4В

WHIM43
 ESR1 mut: D538G
 Prior RX: Tam, AI, Ful



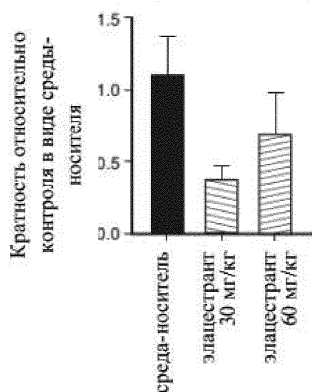
ns = не значимое, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001,

mut = мутант, Tam = тамоксифен, AI = ингибитор ароматазы, Ful = фулвестрант

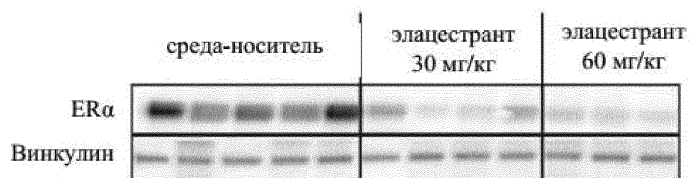
Фиг. 4С

ST2535-HI
ESR1 mut: D538G
Prior Rx: Tam, AI, Ful

Содержания мРНК PgR



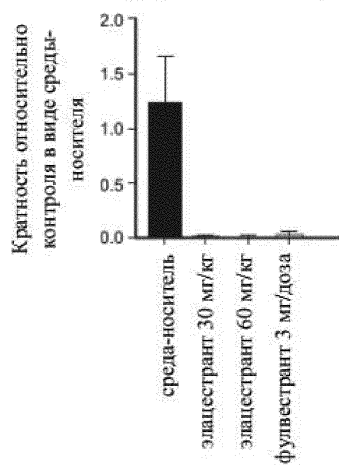
Фиг. 5А



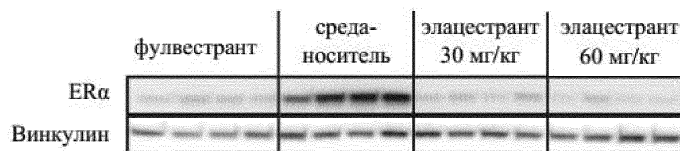
Фиг. 5В

CTG-1211-HI
ESR1 mut: D538G
Prior Rx: Tam, AI, Фулвестрант

Содержания мРНК PgR

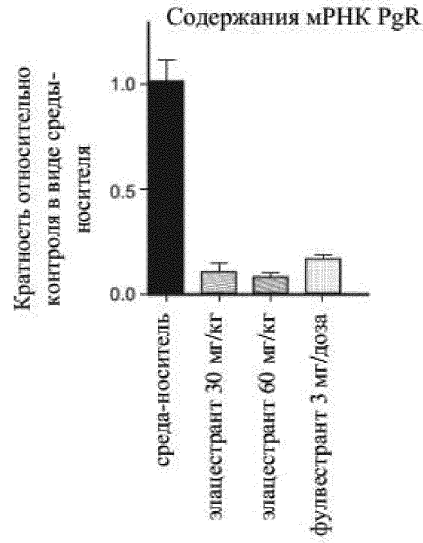


Фиг. 5С



Фиг. 5D

WHIM43
ESR1 mut: D538G
Prior Rx: Tam, AI, Фулвестран

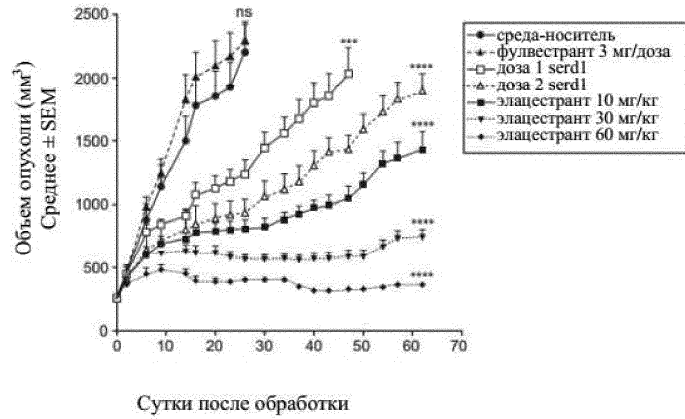


Фиг. 5E

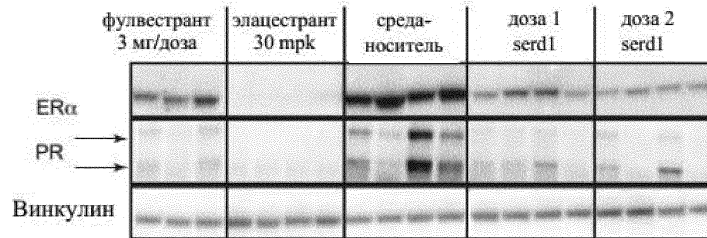
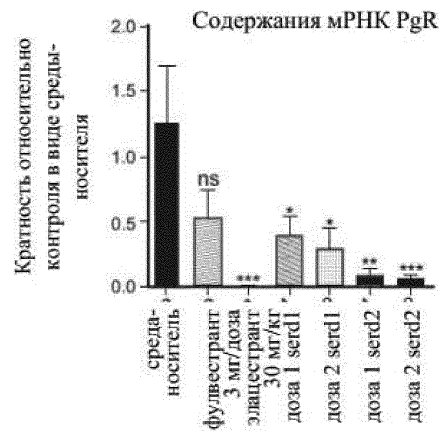
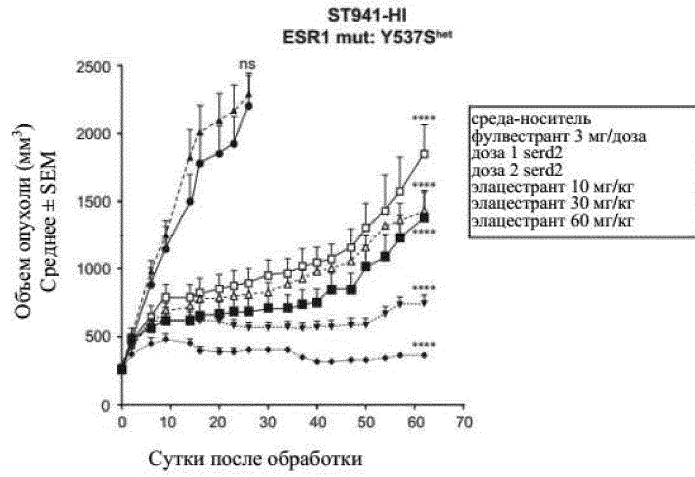


Фиг. 5F

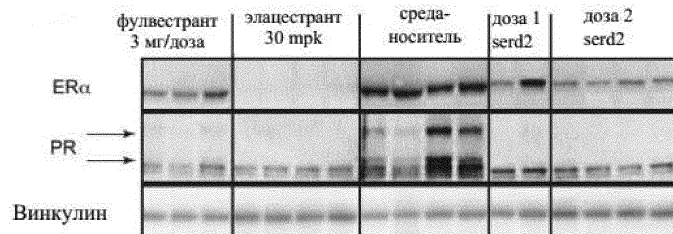
ST941-HI
ESR1 mut: Y537S^{het}



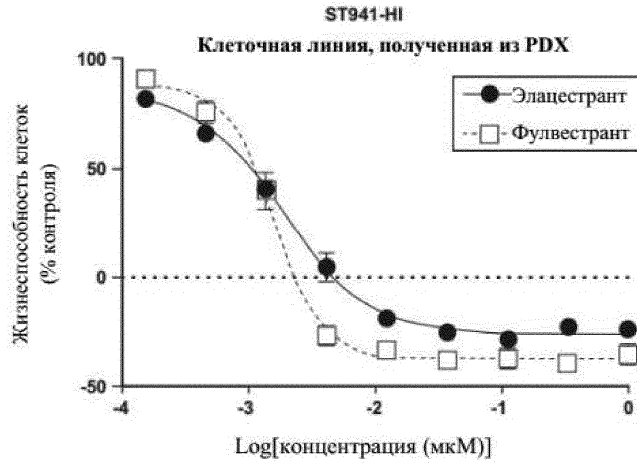
Фиг. 6A



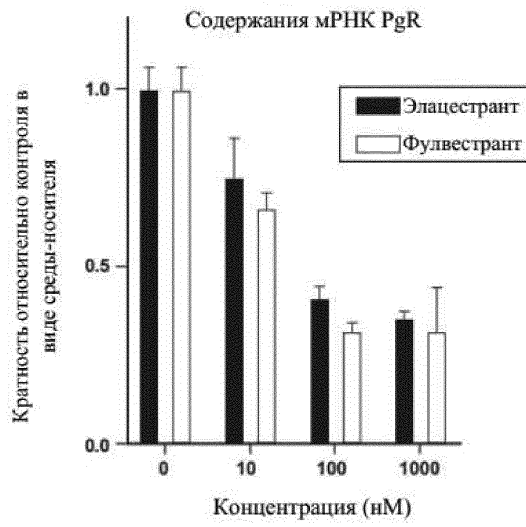
Фиг. 7В



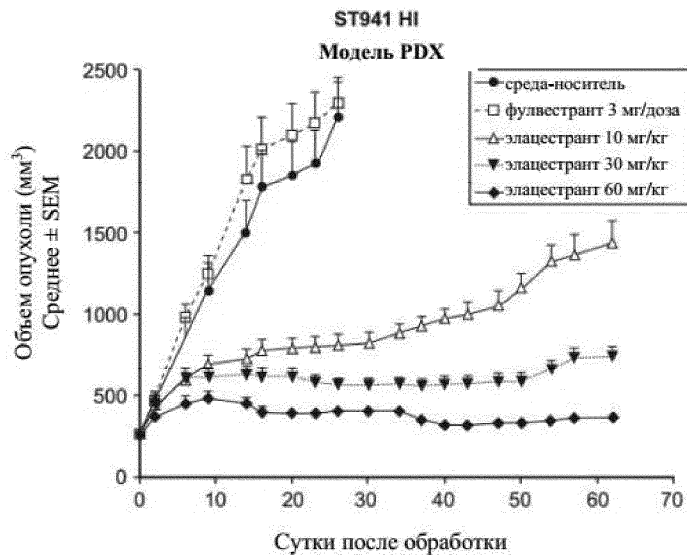
Фиг. 7С



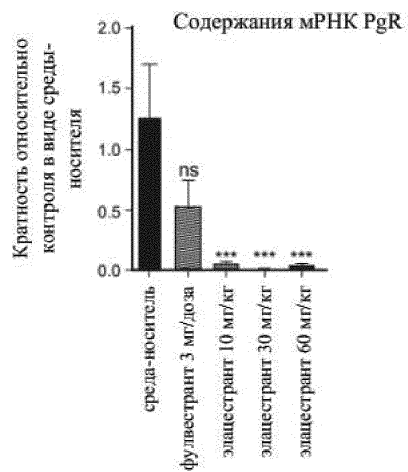
Фиг. 8А



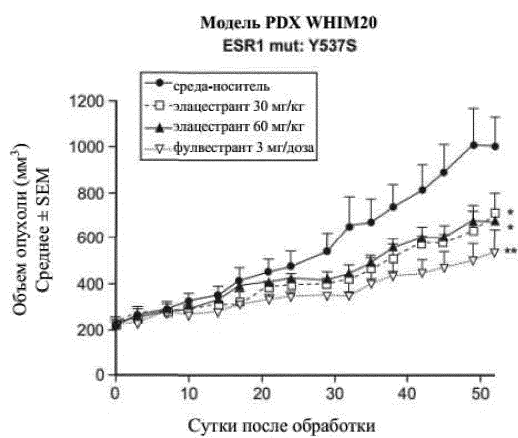
Фиг. 8В



Фиг. 9А

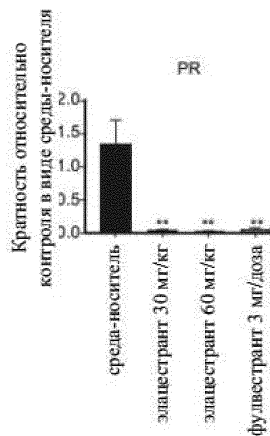


Фиг. 9В

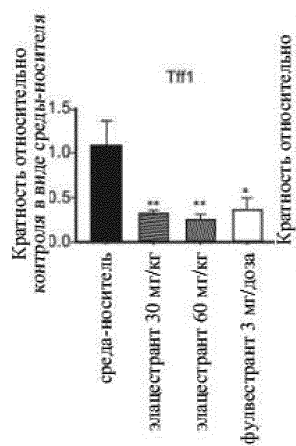


ns = не значимое, * p < 0,05; ** p < 0,01

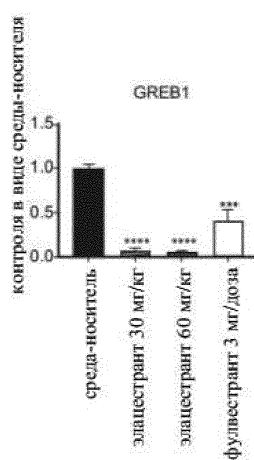
Фиг. 10А



Фиг. 10В



Фиг. 10С



Фиг. 10D



Фиг. 10E