

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992220** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.11

(51) Int. Cl. *A61K 31/336* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.23

**(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ
ОПУХОЛЕЙ**

(31) 2017901027

(32) 2017.03.23

(33) AU

(86) PCT/AU2018/050277

(87) WO 2018/170559 2018.09.27

(71) Заявитель:
КБЮБИОТИКС ПТИ ЛТД (AU)

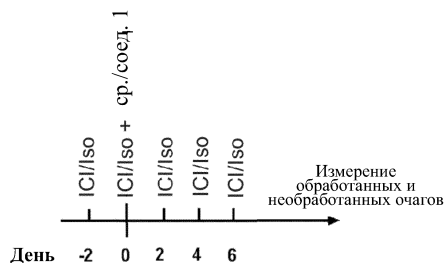
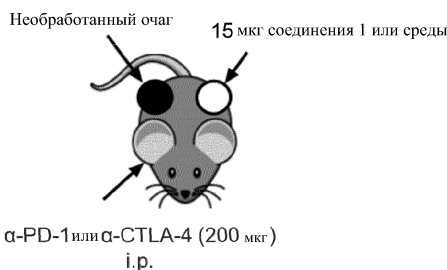
(72) Изобретатель:

Реддел Пол Уоррен, Каллен Джейсон
Кингсли, Бойль Глен Мэтью, Парсонс
Питер Гордон, Гордон Виктория Энн
(AU)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии опухолей, включающей введение эпокситиглианового соединения и ингибитора контрольной точки иммунитета. В отдельных вариантах осуществления - это способ лечения опухоли и/или лечения или предупреждения одной или нескольких сторонних опухолей с помощью такой терапии. Также описываются фармацевтические композиции и наборы, содержащие эпокситиглиановые соединения и ингибиторы контрольной точки иммунитета.

B16-F10-OVA



A1

201992220

201992220

A1

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии опухолей, включающей введение эпокситиглианового соединения и ингибитора контрольной точки иммунитета. Также описываются фармацевтические композиции и наборы, содержащие эпокситиглиановые соединения и ингибиторы контрольных точек иммунитета.

Предпосылки создания изобретения

Эпокситиглиеновые соединения обладают сильной противоопухолевой активностью. При введении интратуморально эпокситиглиеноны инициируют быстрый геморрагический некроз опухолевой массы путем прямого разрушения сосудистой сети опухоли (Boyle et al., 2014). На сегодняшний день не имеется данных, что локализованное введение эпокситиглиеновых соединений оказывает системное действие на сторонние или более удаленные опухоли, и полагают, что доставленные в опухоль эпокситиглиеновые соединения воздействуют, главным образом, в месте обработки. Как следствие, каждая опухоль подлежит индивидуальному лечению.

Различные виды иммунотерапии для лечения рака получили широкое признание в клинической практике. В частности, была показана перспективность ингибиторов контрольных точек иммунитета (ICI) при ряде злокачественных образований, включая метастатическую меланому поздних стадий, немелкоклеточный рак легких, рак почек, рак мочевого пузыря и ходжкинскую лимфому. ICI представляют собой молекулы (как правило, моноклональные антитела), которые блокируют действие белков, позволяющих опухолевым клеткам не поддаваться, подавлять или сопротивляться иммунной системе хозяина, в особенности Т-клеткам, которые являются специфическими для опухолевых антигенов. Одобренные в настоящее время Т-клеточные ингибиторы контрольных точек усиливают противоопухолевый иммунный ответ через совершенно иные механизмы действия. Например, блокада цитотоксического Т-лимфоцитассоциированного антигена 4 (CTLA4) преимущественно усиливает Т-клеточную активацию во время первой фазы иммунного ответа, в то время как оказывается, что блокада белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD1) высвобождает истощенные, но в иных отношениях активированные популяции эффекторных Т-клеток и снижает функцию регуляторных Т-клеток (Treg).

Хотя ICI могут обеспечить заметную и длительную реакцию у пациентов с раком поздних стадий, такие положительные реакции ограничены небольшой частью от общей популяции пациентов (Hu-Lieskovan et al., 2017). Поэтому подходы, которые

комбинируют ICI с другими видами лечения (например, лучевой терапией, онколитическими вирусами, противораковыми вакцинами), которые могут стимулировать иммунный ответ хозяина, представляют привлекательный и клинически осуществимый подход для преодоления врожденной и приобретенной резистентности к противораковой иммунотерапии и потенциально распространяют клинический успех на более широкий круг пациентов (Smyth et al., 2015).

Одним из таких подходов является комбинирование ICI с низкомолекулярными химиотерапевтическими средствами (доставляемыми системно или интратуморально), которые могут модулировать иммунные отклики путем (1) уменьшения общей опухолевой нагрузки, (2) потенцирования противоопухолевого ответа путем проявления неоантигена во время некроза опухоли и/или (3) прямого воздействия на стромальные клетки опухоли (Adams et al., 2015; Mahoney et al., 2015; O'Brien et al., 2014).

Настоящее изобретение по меньшей мере частично основано на обнаруженном авторами факте, что некоторые производные эпокситиглиен-3-она могут стимулировать иммунный ответ, который может синергично взаимодействовать с блокадой контрольных точек иммунитета, обеспечивая терапию не только для той опухоли, которая подвергается лечению, но также и для других опухолей, которые могут присутствовать у получающего лечение субъекта.

Сущность изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения по меньшей мере одной опухоли у субъекта, включающему введение субъекту эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора контрольной точки иммунитета.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения сторонней (от англ. «bystander») опухоли у субъекта, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора контрольной точки иммунитета, причем указанное эпокситиглиановое соединение вводят локально в опухоль, отличающуюся от сторонней опухоли.

В другом аспекте изобретение относится к применению эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора контрольной точки иммунитета в производстве лекарственного средства для лечения опухоли.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного средства для лечения опухоли, причем указанное лекарственное средство является

средством, предназначенным для введения в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунитета.

В другом аспекте изобретение относится к применению ингибитора контрольной точки иммунитета в производстве лекарственного средства для лечения опухоли, причем указанное лекарственное средство является средством, предназначенным для введения в комбинации с эпокситиглиановым соединением или его фармацевтически приемлемой солью.

В другом аспекте изобретение относится к применению эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора контрольной точки иммунитета в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения сторонней опухоли.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения сторонней опухоли, причем указанное лекарственное средство является средством, предназначенным для введения в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунитета.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению ингибитора контрольной точки иммунитета в производстве лекарственного средства для лечения или предупреждения сторонней опухоли, причем указанное лекарственное средство является средством, предназначенным для введения в комбинации с эпокситиглиановым соединением или его фармацевтически приемлемой солью.

В еще одном аспекте изобретение относится к эпокситиглиановому соединению или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунитета для лечения опухоли или лечения или предупреждения сторонней опухоли.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей эпокситиглиановое соединение или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор контрольной точки иммунитета, необязательно вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к набору, включающему эпокситиглиановое соединение или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор контрольной точки иммунитета.

Подробное описание изобретения

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в

настоящем описании, имеют такие значения, какие им обычно придают специалисты в данной области техники, к которой относится изобретение. Хотя на практике или при тестировании настоящего изобретения можно использовать любые методы и материалы, схожие или эквивалентные описанным в настоящем описании, в настоящем документе приведены предпочтительные методы и материалы. Ниже приводятся определения некоторых терминов для целей настоящего изобретения.

Артикли «a» и «an» используются в настоящем описании как относящиеся к одному или более, чем одному (т.е. к по меньшей мере одному) грамматическому объекту. Как пример, «элемент» («an element») означает один элемент или более, чем один элемент.

Используемый в настоящем описании термин «примерно» относится к части, уровню, величине, измерению, размеру или количеству, которое может варьироваться, например, на 30%, 25%, 20%, 15% или 10% от указанной части, уровня, величины, измерения, размера или количества.

Во всем настоящем описании, если контекст не требует иного, слова «включать», «включает» или «включающий» следует понимать, как включение указанной стадии или элемента или группы стадий или элементов, но без исключения любой другой стадии или элемента или группы стадий или элементов.

Термин «алкил» относится к необязательно замещенным линейным и разветвленным углеводородным группам с 1-20 атомами углерода. Где уместно, алкильная группа может иметь определенное число атомов углерода, например, $\text{-C}_1\text{-C}_6$ -алкил, который включает алкильные группы, имеющие 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода в линейной или разветвленной конфигурации. Неограничивающие примеры алкильных групп включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, втор- и трет-бутил, пентил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, гексил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2-этилбутил, 3-этилбутил, гептил, октил, нонил, децил, ундецил, додецил, тридецил, тетрадецил и пентадецил.

Термин «алкенил» относится к необязательно замещенным ненасыщенным линейным и разветвленным углеводородам с 2-20 атомами углерода, имеющим по меньшей мере одну двойную связь. Где уместно, алкенильная группа может иметь определенное число атомов углерода, например $\text{C}_2\text{-C}_6$ -алкенил, который включает алкенильные группы, имеющие 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода в линейном или разветвленном расположении. Неограничивающие примеры алкенильных групп включают этенил, пропенил, изопропенил, бутенил, втор- и трет-бутенил, пентенил, гексенил, гепт-1,3-диен, гекс-1,3-диен, нон-1,3,5-триен и т.п.

Термин «алкинил» относится к необязательно замещенным ненасыщенным

линейным и разветвленным углеводородам с 2-20 атомами углерода, имеющим по меньшей мере одну тройную связь. В соответствующем случае алкинильная группа может иметь определенное число атомов углерода, например C_2 - C_6 -алкинил, который включает алкинильные группы, имеющие 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода в линейной или разветвленной конфигурации. Неограничивающие примеры включают этинил, пропинил, бутинил, пентинил и гексинил.

Термины «циклоалкил» и «карбоциклический» относятся к необязательно замещенным насыщенным или ненасыщенным моноциклическим, бициклическим или трициклическим углеводородным группам. Где уместно, циклоалкильная группа может иметь определенное число атомов углерода, например C_3 - C_6 -циклоалкил представляет собой карбоциклическую группу с 3, 4, 5 или 6 атомами углерода. Неограничивающие примеры могут включать циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексадиенил и т.п.

«Арил» означает C_6 - C_{14} -членную моноциклическую, бициклическую или трициклическую карбоциклическую систему, имеющую до 7 атомов в каждом цикле, причем по меньшей мере один цикл является ароматическим. Примеры арильных групп включают (без ограничения) фенил, нафтил, тетрагидронафтил, инданил и бифенил. Арил может включать 1-3 бензольных цикла. Если присутствуют два или больше ароматических циклов, эти циклы могут быть конденсированы, так что соседние циклы имеют общую связь.

Каждый алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил или арил, вне зависимости от того, является ли он отдельной сущностью или частью более крупной сущности, необязательно может быть замещен одним или несколькими необязательными заместителями, выбранными из группы, включающей C_{1-6} -алкил, C_{2-6} -алкенил, C_{3-6} -циклоалкил, оксо (=O), -ОН, -SH, C_{1-6} -алкил-О-, C_{2-6} -алкенил-О-, C_{3-6} -циклоалкил-О-, C_{1-6} -алкил-S-, C_{2-6} -алкенил-S-, C_{3-6} -циклоалкил-S-, -CO₂H, -CO₂ C_{1-6} -алкил, -NH₂, -NH(C_{1-6} -алкил), -N(C_{1-6} -алкил)₂, -NH(фенил), -N(фенил)₂, -CN, -NO₂, -галоген, -CF₃, -OCF₃, -SCF₃, -CHF₂, -OCHF₂, -SCHF₂, -фенил, - C_{1-6} -алкилфенил, -О-фенил, -C(O)-фенил, -C(O) C_{1-6} -алкил. Примеры подходящих заместителей включают (без ограничения) метил, этил, пропил, изопропил, бутил, втор-бутил, трет-бутил, винил, метокси, этокси, пропокси, изопропокси, бутокси, метилтио, этилтио, пропилтио, изопропилтио, бутилтио, гидроксид, гидроксиметил, гидроксипропил, гидроксипропил, фтор, хлор, бром, иод, циано, нитро, -CO₂H, -CO₂CH₃, -C(O)CH₃, трифторметил, трифторметокси, трифторметилтио, дифторметил, дифторметокси, дифторметилтио, морфолино, амина, метиламина, диметиламина, фенил, фенокси, фенилкарбонил, бензил и ацетил.

Эпокситиглиановые соединения могут находиться в форме фармацевтически приемлемых солей. Однако следует иметь в виду, что фармацевтически неприемлемые соли также входят в объем изобретения, так как они могут использоваться в качестве промежуточных соединений для получения фармацевтически приемлемых солей или могут использоваться во время хранения или транспортировки. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают (без ограничения) соли фармацевтически приемлемых неорганических кислот, таких как хлороводородная, серная, фосфорная, азотная, угольная, борная, сульфамовая и бромоводородная кислоты, или солей фармацевтически приемлемых органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, масляная, винная, малеиновая, гидроксималеиновая, фумаровая, лимонная, молочная, слизевая, глюконовая, бензойная, янтарная, щавелевая, фенилуксусная, метансульфоновая, толуолсульфоновая, бензолсульфоновая, салициловая, сульфаниловая, аспарагиновая, глутамовая, эдетовая, стеариновая, пальмитиновая, олеиновая, лауриловая, пантотеновая, дубильная, аскорбиновая и валериановая кислоты.

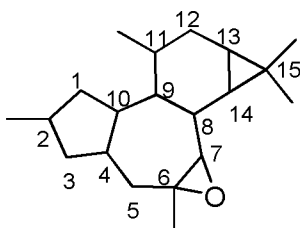
Соли оснований включают (без ограничения) соли, образованные с фармацевтически приемлемыми катионами, такими как натрий, калий, литий, кальций, магний, аммоний и алкиламмоний.

Основные азотсодержащие группы могут быть кватернизованы таким агентами, как низший алкилгалогенид, такой как метил-, этил-, пропил- и бутилхлориды, -бромиды и -иодиды, диалкилсульфаты, подобные диметил- и диэтилсульфату, и другими.

Также следует иметь в виду, что эпокситиглиановые соединения могут обладать асимметричными центрами и поэтому способны существовать в более, чем одной стереоизомерной форме. Таким образом, изобретение также относится к соединениям в по существу чистой изомерной форме по одному или нескольким асимметричным центрам, например с более примерно 90% эи, таким как примерно 95% или 97% эи или свыше 99% эи, а также в виде смесей, включая их рацемические смеси. Такие изомеры можно получить выделением из природных источников, асимметричным синтезом, например с использованием хиральных промежуточных соединений, или путем хирального расщепления. Соединения по изобретению могут существовать в виде геометрических изомеров. Изобретение также относится к соединениям в по существу чистых цис (Z) или транс (E) формах или их смесях.

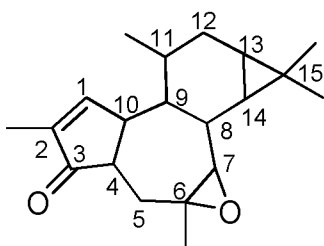
Соединения по настоящему изобретению можно получить путем выделения из растения или части растения или путем дериватизации выделенного соединения или путем дериватизации родственных соединений. Процедуры выделения и процедуры дериватизации можно найти в WO 2007/070985 и WO 2014/169356.

Термин «эпокситиглиановое соединение» относится к соединению, имеющему следующую основную углеродную циклическую структуру:



Эти соединения имеют трицикло[9.3.0.0]тетрадекановую систему с конденсированным циклопропановым циклом, прикрепленным к шестичленному циклу. Эпоксид конденсирован с семичленным циклом в положении 6,7.

Одним примером эпокситиглианового соединения является эпокситиглиен-3-оновое соединение. Термин «эпокситиглиен-3-оновое соединение» относится к соединению, имеющему эпокситиглиановую структуру, определенную выше, где пятичленный цикл имеет 1,2-ен-3-оновую структуру:



Используемый в настоящем описании термин «сторонняя опухоль» относится к опухоли отличной от той опухоли, которую лечат эпокситиглиановым соединением. Сторонняя опухоль может представлять собой первичную опухоль или метастатическую опухоль.

Термин «в комбинации с», используемый в настоящем изобретении, относится к эпокситиглиановому соединению и ICI, вводимым в единой композиции или по отдельности, либо одновременно, либо последовательно. Эпокситиглиановое соединение и ICI можно вводить в различное время и с различной частотой, но в комбинации они проявляют биологическое действие в одно и то же время или в перекрывающиеся промежутки времени. Например, ICI вводят так, чтобы он оказывал действие на иммунный ответ, когда вводят эпокситиглиановое соединение.

Способы лечения

Настоящее изобретение относится к способам лечения опухолей, включая сторонние опухоли, причем этот способ включает введение эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ингибитором контрольной точки иммунитета (ICI). Изобретение также относится к способам

предупреждения сторонних опухолей, включающим введение эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с ICI.

В некоторых вариантах осуществления опухоль, которую лечат, представляет собой опухоль, в которую эпокситиглиановое соединение может быть доставлено локализованным образом непосредственно в опухоль. В отдельных вариантах осуществления опухоль представляет собой опухоль кожи или подкожную опухоль или опухоль, которая доступна с наружной стороны тела, например опухоль, которая пальпируется. В других вариантах осуществления опухоль представляет собой внутреннюю опухоль. В некоторых вариантах осуществления, где опухоль расположена внутри, локализованная доставка достигается во время операции, когда опухоль обнажена, и можно инъецировать эпокситиглиановое соединение. В других вариантах осуществления опухоль расположена внутри, и эпокситиглиановое соединение доставляется посредством инъекции, сопровождаемой использованием метода визуализации, например, эндоскопического ультразвукового исследования или стереотаксической визуализации.

В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение доставляется системно в одну или несколько опухолей.

В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой доброкачественную опухоль. В других вариантах осуществления опухоль представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой первичную опухоль, и в других вариантах осуществления опухоль представляет собой метастатическую опухоль. Примеры кожных опухолей включают себорейный кератоз, актиничный кератоз, базальноклеточную карциному (БСК), включая нодулярную БСК, поверхностную БСК, инфильтрирующую БСК и микронодулярную БСК, плоскоклеточную карциному, включая плоскоклеточную карциному *in-situ* и инвазивную плоскоклеточную карциному, меланому, включая поверхностно-распространяющуюся меланому, нодулярную меланому, меланому типа злокачественного лентиго и диспластическую/нейротропную меланому, подкожную В-клеточную лимфому и подкожную Т-клеточную лимфому. Примеры подкожных опухолей включают ангиокератому, пиогенную гранулему, сенильную гемангиому, гломусную опухоль, ангиосаркому, саркому Капоши, саркому Юинга, злокачественную фиброзную гистиоцитому, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, липосаркому, синовиальную саркому, стромальную саркому, гастроинтестинальную стромальную саркому, злокачественную опухоль периферического периневрия, примитивную нейроэктодермальную опухоль, нейрофиброму, карциному из клеток Меркеля, дерматофиброму, фибросаркому,

эпителиоидную саркому и мастоцитому (тучноклеточную опухоль).

Внутренняя опухоль может представлять собой любую опухоль, которая доступна для инъекции во время операции или направляемой инъекции, или опухоль, которую можно лечить системно введением эпокситиглиана, и включает опухоли головного мозга, легких, толстой кишки, эпидермоида, плоскоклеточные, мочевого пузыря, желудка, поджелудочной железы, молочной железы, головы, шеи, почечной системы, почек, печени, яичников, предстательной железы, матки, пищевода, яичка, шейки матки, влагалища, щитовидной железы или кожи.

Сторонняя опухоль может представлять собой любую опухоль, отличную от опухоли, которую лечат эпокситиглиановым соединением. Например, сторонняя опухоль может представлять собой вторую опухоль кожи или подкожную опухоль, или она может представлять собой опухоль другого органа или ткани. Примеры сторонних опухолей включают опухоли головного мозга, легких, толстой кишки, эпидермоида, плоскоклеточные, мочевого пузыря, желудка, поджелудочной железы, молочной железы, головы, шеи, почечной системы, почек, печени, яичников, предстательной железы, матки, пищевода, яичка, шейки матки, влагалища, щитовидной железы или кожи.

В некоторых вариантах осуществления сторонняя опухоль представляет собой другую первичную опухоль, а в других вариантах осуществления сторонняя опухоль представляет собой метастатическую опухоль.

В некоторых вариантах осуществления опухоль, которую лечат эпокситиглиановым соединением, представляет собой первичную опухоль, а сторонняя опухоль представляет собой метастатическую опухоль. В некоторых вариантах осуществления опухоль, которую лечат эпокситиглиановым соединением, представляет собой метастатическую опухоль, а сторонняя опухоль представляет собой первичную опухоль. В некоторых вариантах осуществления как опухоль, которую лечат эпокситиглиановым соединением, так и сторонняя опухоль являются первичными опухолями. В некоторых вариантах осуществления как опухоль, которую лечат эпокситиглиановым соединением, так и сторонняя опухоль являются метастатическими опухолями.

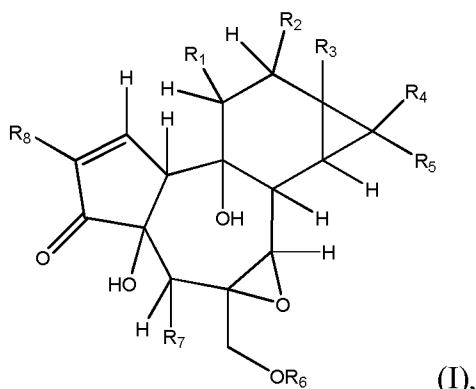
В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия предупреждает появление сторонней опухоли или задерживает появление сторонней опухоли. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия уменьшает размер сторонней опухоли.

Эпокситиглиановые соединения

В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение

представляет собой 6,7-эпокситиглиановое соединение. В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение представляет собой эпоксигли-1,2-ен-3-оновое соединение. В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение представляет собой 6,7-эпоксигли-1,2-ен-3-оновое соединение.

В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение представляет собой соединение формулы (I)



(I),

или его геометрический изомер или стереоизомер или фармацевтически приемлемую соль, где в указанной формуле

R_1 представляет собой водород или C_{1-6} -алкил;

R_2 представляет собой -OH или $-OR_9$;

R_3 представляет собой -OH или $-OR_9$;

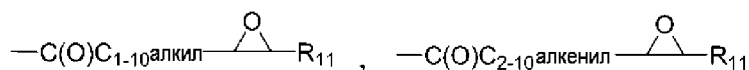
R_4 и R_5 выбирают независимо из водорода и C_{1-6} -алкила;

R_6 представляет собой водород или $-R_{10}$;

R_7 представляет собой гидроксильный или $-OR_{10}$;

R_8 представляет собой водород или C_{1-6} -алкил;

R_9 представляет собой $-C_{1-20}$ -алкил, $-C_{2-20}$ -алкенил, $-C_{2-20}$ -алкинил, $-C(O)C_{1-20}$ -алкил, $-C(O)C_{2-20}$ -алкенил, $-C(O)C_{2-20}$ -алкинил, $-C(O)$ -циклоалкил, $-C(O)C_{1-10}$ -алкилциклоалкил, $-C(O)C_{2-10}$ -алкенилциклоалкил, $-C(O)C_{2-10}$ -алкинилциклоалкил, $-C(O)$ -арил, $-C(O)C_{1-10}$ -алкиларил, $-C(O)C_{2-10}$ -алкениларил, $-C(O)C_{2-10}$ -алкиниларил, $-C(O)C_{1-10}$ -алкил- $C(O)R_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$ -алкенил- $C(O)R_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$ -алкинил- $C(O)R_{11}$, $-C(O)C_{1-10}$ -алкил- $CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-C(O)C_{2-10}$ -алкенил- $CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-C(O)C_{2-10}$ -алкинил- $CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-C(O)C_{1-10}$ -алкил- SR_{11} , $-C(O)C_{2-10}$ -алкенил- SR_{11} , $-C(O)C_{2-10}$ -алкинил- SR_{11} , $-C(O)C_{1-10}$ -алкил- $C(O)OR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$ -алкенил- $C(O)OR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$ -алкинил- $C(O)OR_{11}$, $-C(O)C_{1-10}$ -алкил- $C(O)SR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$ -алкенил- $C(O)SR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$ -алкинил- $C(O)SR_{11}$,



или



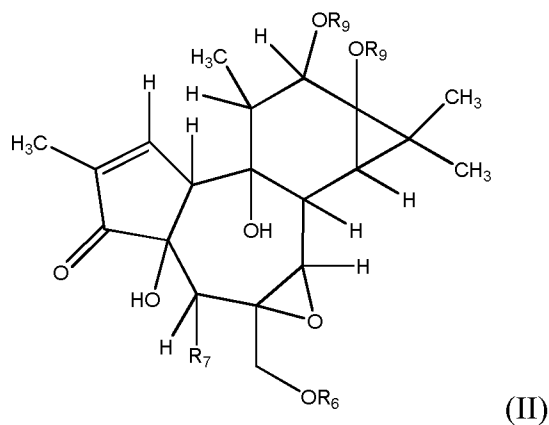
R_{10} представляет собой $-C_{1-6}$ -алкил, $-C_{2-6}$ -алкенил, $-C_{2-6}$ -алкинил, $-C(O)C_{1-6}$ -алкил, $-C(O)C_{2-6}$ -алкенил, $-C(O)C_{2-6}$ -алкинил, $-C(O)$ -арил, $-C(O)C_{1-6}$ -алкиларил, $-C(O)C_{2-6}$ -алкениларил, $-C(O)C_{2-6}$ -алкиниларил;

и

R_{11} представляет собой водород, $-C_{1-10}$ -алкил, $-C_{2-10}$ -алкенил, $-C_{2-10}$ -алкинил, циклоалкил или арил;

причем каждая алкильная, алкенильная, алкинильная, циклоалкильная или арильная группа является необязательно замещенной.

В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (II)



или его геометрический изомер или стереоизомер или фармацевтически приемлемую соль, где в указанной формуле R_6 , R_7 и R_9 имеют значения, указанные для формулы (I).

В отдельных вариантах осуществления формул (I) или (II) применимо одно или несколько определений из следующих:

R_1 представляет собой $-C_{1-3}$ -алкил, в частности $-CH_3$;

R_2 представляет собой $-OC(O)C_{1-20}$ -алкил, $-OC(O)C_{2-20}$ -алкенил, $-OC(O)C_{2-20}$ -алкинил, $-OC(O)$ циклоалкил, $-OC(O)C_{1-10}$ -алкилциклоалкил, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкенилциклоалкил, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкинилциклоалкил, $-OC(O)$ -арил, $-OC(O)C_{1-10}$ -алкиларил, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкениларил, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкиниларил, $-OC(O)C_{1-10}$ -алкил- $C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкенил- $C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкинил- $C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{1-10}$ -алкил- $CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкенил- $CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкинил- $CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{1-10}$ -алкил- SR_{11} , $-OC(O)C_{2-10}$ -алкенил- SR_{11} , $-OC(O)C_{2-10}$ -алкинил- SR_{11} , $-OC(O)C_{1-10}$ -алкил- $C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкенил- $C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкинил- $C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{1-10}$ -алкил- $C(O)SR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$ -алкенил- $C(O)SR_{11}$ или $-OC(O)C_{2-10}$ -алкинилилил- $C(O)SR_{11}$; в особенности $-OC(O)C_{1-20}$ -алкил, $-OC(O)C_{2-20}$ -алкенил, $-OC(O)C_{2-20}$ -алкинил, $-OC(O)$ циклоалкил, $-OC(O)C_{1-10}$ -алкилциклоалкил, $-OC(O)C_{2-10}$ -

алкенилциклоалкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкинилциклоалкил или $-\text{OC}(\text{O})$ арил; особенно $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-20}$ -алкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкенил или $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкинил;

R_3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-20}$ -алкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкенил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкинил, $-\text{OC}(\text{O})$ -циклоалкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-10}$ -алкилциклоалкил; $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкенилциклоалкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкинилциклоалкил, $-\text{OC}(\text{O})$ -арил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-10}$ -алкиларил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкениларил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкиниларил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-10}$ -алкил- $\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкенил- $\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкинил- $\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-10}$ -алкил- $\text{CH}(\text{OR}_{11})(\text{OR}_{11})$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкенил- $\text{CH}(\text{OR}_{11})(\text{OR}_{11})$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкинил- $\text{CH}(\text{OR}_{11})(\text{OR}_{11})$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-10}$ -алкил- SR_{11} , $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкенил- SR_{11} , $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкинил- SR_{11} , $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-10}$ -алкил- $\text{C}(\text{O})\text{OR}_{11}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкенил- $\text{C}(\text{O})\text{OR}_{11}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкинил- $\text{C}(\text{O})\text{OR}_{11}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-10}$ -алкил- $\text{C}(\text{O})\text{SR}_{11}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкенил- $\text{C}(\text{O})\text{SR}_{11}$ или $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкинил- $\text{C}(\text{O})\text{SR}_{11}$; особенно $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-20}$ -алкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкенил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкинил, $-\text{OC}(\text{O})$ -циклоалкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-10}$ -алкилциклоалкил; $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкенилциклоалкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкинилциклоалкил или $-\text{OC}(\text{O})$ -арил; особенно $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-20}$ -алкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкенил или $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкинил;

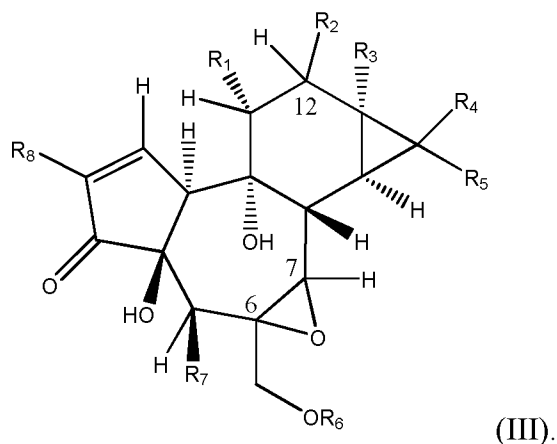
R_4 и R_5 выбирают независимо из $-\text{C}_{1-3}$ -алкила, в частности $-\text{CH}_3$;

R_6 представляет собой водород, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -алкил, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{2-6}$ -алкенил, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{2-6}$ -алкинил или $-\text{C}(\text{O})$ -арил; особенно водород, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-3}$ -алкил, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{2-3}$ -алкенил или $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{2-3}$ -алкинил, особенно водород или $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$;

R_7 представляет собой гидроксил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -алкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-6}$ -алкенил или $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-6}$ -алкинил, особенно гидроксил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-3}$ -алкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-3}$ -алкенил или $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-3}$ -алкинил, особенно гидроксил или $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$; и

R_8 представляет собой $-\text{C}_{1-3}$ -алкил, в частности $-\text{CH}_3$.

В некоторых вариантах осуществления соединения формул (I) и/или (II) обладают стереохимией, как показано ниже в формуле (III):



В некоторых вариантах осуществления эпексид в положении 6,7 находится над плоскостью циклической системы. В других вариантах осуществления эпексид в

положении 6,7 находится под плоскостью циклической системы. В некоторых вариантах осуществления группа R_2 в положении 12 представляет собой S, а в других вариантах осуществления группа R_2 в положении 12 представляет собой R.

В отдельных вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение выбирают из группы, включающей

12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он (соединение 1);

12,13-ди(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он (соединение 2);

12-гексаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он (соединение 3);

12,13-дигексаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он (соединение 4);

12-миристоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он (соединение 5);

12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13-пентагидрокси-20-ацетилокси-1-тиглиен-3-он (соединение 6);

12-миристоил-13-ацетилокси-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он (соединение 7);

12-пропаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он (соединение 8);

12,13-дитиглоил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он (соединение 9) и

12-(2-метилбутаноил)-13-тиглоил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он (соединение 10).

Ингибитор контрольной точки иммунитета (ICI)

ICI может представлять собой любую молекулу, которая ингибирует белки иммунной клетки или раковых клеток, блокирующие иммунные ответы иммунной клетки, в частности, в случае, когда иммунная клетка представляет собой Т-клетку или клетку естественный киллер (NK-клетку). Примеры белков иммунных клеток и опухолевых клеток включают белок запрограммированной гибели 1 (PD-1) на Т-клетках, который связывает PD-L1 опухолевой клетки, блокируя иммунный ответ Т-клетки против опухолевой клетки, и цитотоксический Т-лимфоцитассоциированный белок 4 (CTLA-4) на Т-клетке, который связывает белок B7-1/B7-2 на раковой клетке, блокируя иммунный ответ Т-клетки против опухолевой клетки. Поэтому ICI включают молекулы, которые

связываются или блокируют взаимодействие PD-1 с PD-L1/PD-L2 или CTLA-4 с B7-1/B7-2. Другие белки иммунных клеток, которые блокируют иммунные ответы в иммунных клетках и могут быть модулированы для предотвращения их действия, включают рецептор аденозина A2A, B7-H3, B7-H4, индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO), иммуноглобулин-подобный рецептор клетки-киллера (KIR), ген 3 активации лимфоцитов (LAG3), Т-клеточный иммунорецептор с доменами IG и ITIM (TIGIT), Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина 3 (TIM-3), CD96 и иммуноглобулиновый супрессор активирования Т-клеток домена V (VISTA).

Примеры ICI включают (без ограничения) антагонисты PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, белок B7-1/B7-2, рецептор аденозина A2A, B7-H3, B7-H4, IDO, KIR, LAG3, TIM-3, TIGIT, CD96 и VISTA, в частности антагонисты PD-1, PD-L1, CTLA-4 или белок B7-1/B7-2, особенно антагонисты PD-1 или CTLA-4. В отдельных вариантах осуществления антагонист представляет собой антитело для белка контрольной точки иммунитета, например анти-PD-1 антитело или анти-CTLA-4 антитело. В других вариантах осуществления конкретным антагонистом является антагонист IDO.

Композиции

Хотя эпокситиглиановые соединения или их фармацевтически приемлемые соли и ICI можно вводить в чистом виде, может быть удобно вводить эпокситиглиановые соединения и ICI в форме одной или нескольких фармацевтических композиций, каждая из которых вводится с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем и/или эксципиентом.

Лекарственную форму и дозы для фармацевтического применения и композиций может легко определить специалист в данной области техники.

В отдельных вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение включают в состав для введения непосредственно на или в опухоль, которую лечат. В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение включают в состав для топического введения в форме геля, мази, лосьона, крема или трансдермального пэджа, которые можно нанести непосредственно на опухоль, которую лечат. В других вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение включают в состав для инъекции, в частности интратуморальной инъекцией, когда соединение инъецируют в одно или несколько мест опухоли.

ICI можно вводить любым способом, который способен доставить молекулу системно или локально. В отдельных вариантах осуществления, когда ICI представляет собой антитело, молекулу обычно доставляют инъекцией, например внутривенной, интраартикулярной, внутримышечной, подкожной или интраперитонеальной инъекцией.

ICI также может быть включен в состав для локальной доставки посредством инъекции, например интратуморально. В композиции ICI также могут быть включены фармацевтически приемлемые носители и приемлемые носители для системного или локального введения.

В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение и ICI доставляются по отдельности или одновременно или последовательно. В других вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение и ICI доставляются в единой композиции, например в одной композиции, подходящей для интратуморальной доставки, или в одной композиции, составленной для системной доставки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей эпокситиглиановое соединение или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор контрольной точки иммунитета необязательно вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

В подходящем варианте фармацевтическая(ие) композиция(ии) включает(ют) фармацевтически приемлемый или приемлемый эксципиент. «Фармацевтически приемлемым эксципиентом» называют твердый или жидкий наполнитель, разбавитель или инкапсулирующее вещество, которые можно использовать безопасно. В зависимости от конкретного пути введения можно использовать различные носители, хорошо известные в технике. Эти носители или эксципиенты можно выбрать из группы, включающей сахара, крахмалы, целлюлозу и ее производные, циклодекстрины, солод, желатин или другие желирующие агенты, полимеры, тальк, сульфат кальция, растительные масла, синтетические масла, спирты и/или полиолы, альгиновую кислоту, забуференные фосфатом растворы, эмульгаторы, изотонический физиологический раствор и апирогенную воду.

Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например водные растворы или растворы в смесях вода/пропиленгликоль. Например, жидкие препараты для парентеральной инъекции можно получить в виде растворов в водном 1,2-пропандиоле, диметилсульфоксиде (ДМСО), водных растворах гамма-циклодекстрина или 2-гидроксипропил-бета-циклодекстрина, в физиологическом растворе или растворе полиэтиленгликоля, с добавлением буфера или без него. Предпочтительный интервал pH составляет 3,0-4,5. Подходящие буферы буферируют препарат при pH 3,5-4,5 и включают (без ограничения) ацетатный буфер и цитратный буфер.

Таким образом, композиции эпокситиглианового соединения и/или ICI могут быть получены для парентерального введения (например, инъекцией, например болюсной инъекцией или длительной инфузией) и могут быть представлены в стандартной

лекарственной форме в ампулах, предварительно заполненных шприцев, инфузии небольшого объема или в многодозовых контейнерах с добавлением консерванта. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы, гели или эмульсии в масляных или водных средах, и могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. С другой стороны активный ингредиент может находиться в форме порошка, полученного асептическим выделением стерильного твердого вещества или лиофилизацией из раствора, для получения состава с подходящей средой, например стерильной апиrogenной водой, перед применением.

Фармацевтические композиции эпокситиглианового соединения и/или ICI, подходящие для введения, могут быть представлен в дискретных единицах, таких как шприцы, флаконы, тубы или саше, причем каждая содержит предварительно заданное количество одного или нескольких фармацевтически активных соединений или экстрактов по изобретению, в виде порошка или гранул или в виде раствора или суспензии в водной жидкости, растворе циклодекстрина, неводной жидкости, эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле или в виде раствора или суспензии в креме или геле или в виде суспензии микро- или наночастиц, включающих эпокситиглиановое соединение, включающих (без ограничения) микро- или наночастицы диоксида кремния или полилактида. Такие композиции можно получить любым фармацевтическим методом, но все эти методы включают стадию приведения в контакт одного или нескольких фармацевтически активных соединений по изобретению с носителем, который состоит из одного или нескольких необходимых ингредиентов. Как правило, композиции получают путем равномерного и тщательно смешивания агентов по изобретению с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или теми и другими, с последующим, при необходимости, приданием продукту нужной формы.

Для топического введения на эпидермис или другой орган соединения по изобретению можно получать в виде гелей, мазей, эмульсий, паст, кремов или лосьонов или в виде трансдермального пэтча. Гели можно получать с использованием подходящих загустителей и добавления их в водные/спиртовые композиции соединения. Подходящие загустители или желирующие агенты известны в уровне техники, например поливинилкарбоксиполимер карбомер 940. Мази и кремы можно получать, например, на водной или масляной основе с добавлением подходящих загустителей и/или желирующих агентов. Лосьоны можно получать на водной или масляной основе, и как правило, они также будут содержать один или больше эмульгаторов, стабилизаторов, диспергаторов, суспендирующих агентов, загустителей или красителей.

Составы, подходящие для топического введения, также включают растворы или суспензии, которые можно наносить топически в форме раствора для ванн или замачивания или спрея, или которые могут абсорбироваться перевязочным материалом.

Когда ICI представляет собой небольшую молекулу, его можно доставить любыми подходящими способами, включая пероральный, топический, ректальный, парентеральный, сублингвальный, трансбуккальный, внутривенный, интраартикулярный, внутримышечный, интрадермальный, подкожный, ингаляцию, внутриглазное введение, интарперитонеальный, интрацеребровентрикулярный, трансдермальный и подобные способы, известные в данной области техники или в фармацевтике.

Схемы приема

В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение доставляется в той же композиции, что и ICI. Однако, в некоторых вариантах осуществления ICI вводят в отдельной композиции отдельно от эпокситиглианового соединения.

В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение вводят непосредственно в опухоль, например топическим введением или интратуморальной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение вводят в опухоль один раз. В других вариантах осуществления осуществляют мониторинг обработанной опухоли, и, если требуется, дополнительно вводят эпокситиглиановое соединение, если опухоль не полностью реагирует на лечение. В вариантах осуществления, где опухоль лечат топически, эпокситиглиановое соединение в некоторых случаях может вводиться в течение некоторого периода времени, например ежедневно в течение недели или один раз в неделю в течение до 10 недель. Специалист в данной области техники, наблюдающий субъекта, которого лечат, сможет определить соответствующую схему приема лекарства, которая может меняться в зависимости от отклика на лечение.

В некоторых вариантах осуществления ICI вводят по меньшей мере один раз перед, одновременно или после эпокситиглианового соединения. В некоторых вариантах осуществления несколько доз ICI вводят в течение периода времени, начиная до или одновременно с введением эпокситиглианового соединения и затем продолжая после введения эпокситиглианового соединения.

В некоторых вариантах осуществления ICI вводят более одного раза и на регулярной основе до и после введения эпокситиглианового соединения. В некоторых вариантах осуществления ICI вводят до введения эпокситиглианового соединения,

последовательно или одновременно с введением эпокситиглианового соединения и по меньшей мере один раз после введения эпокситиглианового соединения. Например, ICI можно вводить за период от 1 недели до 1 дня до введения эпокситиглианового соединения, в частности, за 1-3 дня и особенно приблизительно за 2 дня до введения эпокситиглианового соединения, затем ICI вводят последовательно или одновременно с эпокситиглиановым соединением или непосредственно перед или непосредственно после введения эпокситиглианового соединения, затем ICI вводят один или больше раз в течение следующего месяца после эпокситиглианового соединения, например один раз в неделю, один раз каждые 5 дней, один раз каждые 4 дня, один раз каждые 3 дня, один раз каждые 2 дня или каждый день, в частности каждые 1-3 дня, особенно каждые 2 дня. Последовательное введение ICI может продолжаться, так что после введения эпокситиглианового соединения вводят 1-10 доз ICI, в частности 1-8 доз, 1-6 доз, 1-4 дозы, 1-3 дозы или 1-2 дозы.

В одном варианте осуществления ICI вводят за 2 дня до введения эпокситиглианового соединения, последовательно (непосредственно перед или непосредственно после) с эпокситиглиановым соединением, и затем каждые два дня в течение 6 дней после введения эпокситиглианового соединения.

Эпокситиглиановое соединение вводят в эффективном количестве. «Эффективное количество» означает количество, необходимое для по меньшей мере частичного достижения желаемого отклика, например для уменьшения размера опухоли или для разрушения опухоли вообще. Это количество меняется в зависимости от состояния здоровья и физического состояния индивидуума, которого лечат, таксономической группы индивидуума, которого лечат, состава композиции, размера опухоли, оценки медицинской ситуации и других релевантных факторов. Ожидается, что это количество будет попадать в относительно широкий диапазон, который можно определить рутинными исследованиями. Эффективное количество, например, может лежать в диапазоне от примерно 0,1 нг на кг массы тела до 1 г на кг массы тела на дозировку. Дозировка предпочтительно находится в диапазоне 1 мкг – 0,5 г на кг массы тела на дозировку, например в диапазоне 0,1 мкг – 100 мг на кг массы тела на дозировку. В одном варианте осуществления, где дозу вводят интратуморально, дозировка находится в диапазоне 50 нг – 100 мг на кг массы тела, например 0,1 мг – 5 мг на кг массы тела, 0,1 – 1 мг/кг массы тела, например 0,25 мг/кг массы тела. В другом варианте осуществления дозировка находится в диапазоне 0,001 мг – 20 мг на дозу, например 0,005 мг – 15 мг на дозу, в частности 0,05 – 10 мг на дозу, особенно примерно 0,1 – примерно 5 мг на дозу. Схемы приема лекарства могут быть подогнаны для получения оптимального

терапевтического ответа. Например, в некоторых вариантах осуществления, где введение является интратуморальным, эпокситиглиановое соединение вводят один раз и контролируют прогресс лечения. В некоторых вариантах осуществления, если опухоль не разрушилась полностью или если опухоль рецидивирует, может быть введена вторая доза. В некоторых вариантах осуществления, где введение является топическим, топический состав соединения можно вводить непосредственно на место опухоли в форме геля, крема, мази или лосьона. Частота обработки будет зависеть от опухоли, ее размера, субъекта, которого лечат, и т.п. В некоторых вариантах осуществления топический препарат можно наносить еженедельно до тех пор, пока опухоль не разрушится. В других вариантах осуществления лечение может представлять одну обработку, и вторую обработку назначают только если опухоль не разрушилась полностью.

ICI также можно вводить в эффективном количестве. Здесь количество ICI, считающееся эффективным, также будет зависеть от субъекта, которого лечат, состояния его здоровья и физического состояния, числа имеющихся сторонних опухолей, состава композиции и оценки медицинской ситуации. Ожидается, что количество ICI будет попадать в довольно широкий диапазон. Эффективное количество может лежать в диапазоне от примерно 0,1 нг/кг до примерно 500 мг/кг массы тела, 100 мкг/кг – 100 мг/кг массы тела, 1 мг/кг – 50 мг/кг массы тела, 1 мг/кг – 20 мг/кг массы тела. В другом варианте осуществления фактические дозировки могут находиться в диапазоне от 1 мкг до 1 г, например, 100 мкг – 750 мг на дозу.

Субъект, которого можно лечить комбинированной терапией, представляет собой млекопитающее, птицу, водное животное, такое как рыба, или рептилию. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек, лабораторное животное, такое как мышь, крыса или кролик, домашнее животное, такое как собака или кошка, рабочее животное, такое как лошадь, осел и т.п., домашний скот, такой как корова, буйвол, свинья, овца, коза, олень, лама, альпака и т.п., или содержащиеся в неволе дикие животные, такие как животные в зоопарках или парках дикой природы, включая львов, леопардов, гепардов, слонов, зебр, антилоп, жирафов, коал, кенгуру, и рептилий, таких как крокодилы, ящерицы, змеи и т.п., птиц, таких как волнистый попугайчик или канарейка, какаду, длиннохвостый попугай, ара, попугай и т.п., или рыба, такая как тропическая рыба (рыба-зебра, гуппи, сиамская бойцовая рыбка, рыба-клоун, тетра-кардинал и т.п.), дельфины, киты и т.п. В отдельных вариантах осуществления субъектом является человек или домашнее животное.

Наборы

Композиции эпокситиглианового соединения и ICI могут быть составлены

отдельно и продаваться вместе в наборе или упаковке. Каждый набор может включать дозировки каждого соединения для достижения лечения опухоли и лечения или предупреждения одной или нескольких сторонних опухолей.

В некоторых вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение входит в композицию для топического введения, такую как гель, лосьон, крем или мазь или пропитанный перевязочный материал. В других вариантах осуществления эпокситиглиановое соединение входит в композицию для инъекции, такой как интратуморальная инъекция. В этом варианте осуществления эпокситиглиановый препарат может присутствовать в наборе в виде жидкости, готовой для набора в шприц, в виде порошка или твердого препарата, который можно растворить в носителе перед инъекцией, или может присутствовать в наборе в предварительно наполненном шприце.

Каждый набор может включать одну или несколько доз эпокситиглианового соединения. В одном варианте осуществления набор будет содержать одну дозу эпокситиглианового соединения в препарате, подходящем для интратуморальной инъекции. В другом варианте осуществления набор будет содержать топический препарат эпокситиглианового соединения, содержащий несколько доз для нанесения на опухоль.

В некоторых вариантах осуществления ICI входит в препарат для парентерального введения в форме одной болюсной дозы или многодозовой форме. Например, набор может содержать ICI в предварительно наполненном шприце, в виде жидкости во флаконе, готовой для загрузки в шприц, или в виде твердого вещества, готового для растворения перед загрузкой в шприц. Жидкие или твердые препараты могут представлять собой однодозовые препараты или многодозовые препараты. С другой стороны, набор может содержать несколько доз ICI, каждая составленная отдельно в предварительно наполненном шприце, в виде жидкости во флаконе, готовой к загрузке в шприц, или в виде твердого вещества, готового для растворения и загрузки в шприц.

Набор может дополнительно включать вкладыш с инструкцией по применению каждого препарата, включая инструкцию по получению каждой дозы, если требуется, инструкцию, как вводить каждую дозировку и когда вводить каждую дозировку.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 показывает А – изображения транслокации РКС- α , - β II, - γ , - δ и - θ после обработки средой (ср.) или 500 нМ соединения 1 (соед. 1), соединения 3 (соед. 3) и РМА. Эти изображения также используют для количественного анализа, показанного на В. В – тепловая карта, отображающая профиль транслокации изоформ РКС (- α , - β I, - β II, - γ , - δ , - θ , - η и - ζ – средний % клеток, показывающих транслокацию EGFP к плазматической мембране) в ответ на 500, 50 и 5 нМ соединения 1 и указанных аналогов. Подсчитано >150

клеток на биологическую репликацию. $n = 3$.

Фиг. 2 показывает А – схему эксперимента. В: отобранные цитокины/хемокины хозяина с ролями в рекрутменте лейкоцитов индуцированы обработкой соединением 1 (30 мкг). Показана кратность изменений в экспрессии генов указанных цитокинов/хемокинов. С: получают тепловую карту после сравнения данных по профилям интенсивности экспрессии генов как для среды, так и для соединения 1 при $t=8$ час. Последующие списки генов анализируют с использованием Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Qiagen) для идентификации путей, затрагиваемых обработкой соединением 1.

Фиг. 3 показывает А – высвобождение LDH из линий раковых клеток, обработанных соединением 1. A431, MM649 и B16-OVA обрабатывают соединением 1 в указанных концентрациях или только средой (ср.), и высвобожденный LDH анализируют со временем с использованием набора для анализа на цитотоксичность Pierce LDH. $n=3$. В. Соединение 1 индуцирует значительное снижение уровней внутриклеточного АТФ. Снова клетки обрабатывают соединением 1 или средой (ср.), и анализируют уровни внутриклеточного АТФ в указанные моменты времени с использованием набора для анализа CellTiter-Glo 2®. $n=3$.

Фиг. 4 показывает А – определение высвобождения АТФ из линий раковых клеток в ответ на обработку соединением 1. Клетки обрабатывают соединением 1 или средой (ср.) в течение указанного времени, и высвобождение АТФ из супернатантов клеточных культур анализируют с использованием набора для анализа биoluminesценции на основе АТФ. Определяют средние величины $RLU \pm S.D.$, и строят график зависимости от времени. $n=4$. В. Другие эпокситиглиановые аналоги (соединение 2: Bi, соединение 3: Bii, и соединение 4: Biii) также промотируют высвобождение АТФ из клеточных линий A431, MM649 и B16-OVA. $n=4$. С. Определение высвобождения HMGB1 из линий раковых клеток, обработанных соединением 1 и эпокситиглиановыми аналогами. Супернатанты клеточных культур из обработанных эпокситиглианом или средой (ср.) A431 (Ci), MM649 (Cii) или B16-OVA (Ciii) анализируют на высвобождение HMGB1 методом ELISA. Величины для клеток, обработанных соединением 1, нормализуют к клеткам, обработанным средой, для определения кратности усиления высвобождения HMGB1. $n=2$ для A431 и MM649, в то время как $n=3$ для B16-OVA. (Civ) Высвобождение HMGB1 также происходит в ответ на обработку соединением 2, 3 и 4. $n=3$. D. Соединение 1 промотирует экстернализацию кальретикулина в ряде линий раковых клеток. A431 (Di), MM649 (Dii) и B16-OVA (Diii) обрабатывают соединением 1 или только средой (ср.) в указанное время и затем перед проточной цитометрией окрашивают антикальретикулиновым/антикроличьим Alexa 488. Показывают средние величины

интенсивности флуоресценции (экст. 488 нм, исп. 530/530 нм) +/- S.D. для каждого момента времени.

Фиг. 5 показывает А и В. Обработанные эпокситиглианом клетки процессируют CD11c⁺ BMDCs *in vitro*. Меченные CMFDA клетки B16-OVA, обработанные соединением 1 или средой (ср.), инкубируют с незрелыми BMDC в течение 4 час и затем перед проточной цитометрией окрашивают анти-CD11c-APC. Темно-серый прямоугольник – клетки CD11c⁺ BMDC. Заштрихованный темный прямоугольник – CD11c⁺ BMDC, которые имеют окрашенные фрагменты клеток B16-OVA (CD11c⁺ CMFDA_{mid}). Процент клеток CD11c⁺ CMFDA_{mid} показан на 5А, и результат 4 биологических репликаций показан на фиг. 5В. n=4. С. Аналоги эпокситиглиана также индуцируют поглощение клеток B16-OVA CD11c⁺ BMDC. Отображены данные, полученные при использовании соединений 2, 3 и 4. n=3.

Фиг. 6 показывает А – схему экспериментального подхода для комбинаций соединения 1 и ICI. Все опухоли инъецированы либо 15/30 мкг соединения 1, либо средой (ср.). Также отображена схема обработки ICI. В и С. Графики Каплана-Мейера, показывающие % обработанных опухолей, которые остаются размером ниже 100 мм³ в различных условиях обработки ICI, с или анти-PD-1 (фиг. 6В) или анти-CTLA-4 (фиг. 6С). Также отображено выживание мышей в ответ на комбинацию.

Фиг. 7 показывает А – принципиальную схему подхода с комбинированной терапией: индекс и сторонняя опухоль показаны вместе со схемой приема лекарства; и В – графические представления результатов комбинированной терапии (объемы опухолей). Антитело изотипа + соединение 1 (линия из точек), анти-PD-1 антитело или анти-CTLA-4 антитело + среда (пунктирная линия) и анти-PD-1 антитело или анти-CTLA-4 антитело + соединение 1 (сплошная линия) в опухолях, которые лечат (светлые кружочки), и сторонних опухолях (черные кружочки).

Фиг. 8 показывает как объемы (левая панель), так и анализы опухолей по Каплану-Мейеру (правая панель) (% опухолей < 100 мм³), инъецированных субоптимальной дозой соединения 1 (15 мкг) в диком и нокаутированном фенотипах GCSF.

Примеры

Соединения по настоящему изобретению можно получить выделением из растения или части растения или путем дериватизации выделенного соединения или путем дериватизации родственного соединения. Процедуры выделения и процедуры дериватизации можно найти в WO 2007/070985 и WO2014/169356.

Соединение 6 – 20-ацетилпроизводное соединения 1 можно получить из соединения 1 ацетилированием уксусным ангидридом (1 эквив.) в присутствии

триэтиламина в дихлорметане. Такие условия дают селективное ацетилирование C-20 гидроксигруппы без ацетилирования других гидроксигрупп.

Соединение 10, хотя в WO2014/169356 не синтезировано в явном виде, можно получить с использованием общего метода получения несимметричных эфиров, представленного в примере 1 WO2014/169356, страницы 64-70.

Пример 1. Аналоги эпокситиглиана активируют изоформы РКС

Протеинкиназы С являются семейством ключевых ферментов, вовлеченных в пути передачи сигналов, которые специфически фосфорилируют субстрат в сериновых/треониновых остатках. Фосфорилирование с помощью РКС является важным в регуляции ряда клеточных событий, таких как пролиферация и регуляция экспрессии генов. Изоформы РКС (- θ , - η , - α , - β , - δ , - ε) непосредственно вовлечены в реакции иммунных клеток и могут также промотировать экспрессию ключевых генов иммунного ответа. Однако картина экспрессии и уровни каждой из таких изоформ РКС связаны с типом клеток и специфичностью контекста (Lim et al., 2015; Anel et al., 2012; Pfeifhofer et al., 2006).

Для того, чтобы идентифицировать профили активации изоформ РКС (специфичность и действенность) эпокситиглиановых соединений, клетки HeLa временно трансфицируют с селекцией векторов РКС-EGFP (РКС- α , РКС- β I, РКС- β II, РКС- γ , РКС- δ , РКС- θ , РКС- η , РКС- ζ – получены на фирме) с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen), следуя методам, описанным в Boyle et al., 2014. Объем, соответствующий 0,16 мкг РКС-EGFP и 0,48 мкл липофектамина, смешивают с 25 мкл среды Opti-MEM (Invitrogen) и инкубируют в течение 5 мин при RT. Растворы объединяют и инкубируют еще 20 мин при RT (отношение ДНК:липофектамин 2000 1:3). Комплексы (50 мкл) добавляют в каждую лунку, и после 3 ч инкубации при 37°C добавляют еще 50 мкл RPMI-1640, 10% FCS, до общего объема 100 мкл на лунку. После 24 ч инкубации при 37°C клетки промывают забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS) и обрабатывают 500, 50 и 5 нМ эпокситиглиана. Можно испытывать три соединения в 96-луночном планшете. Для эксперимента требуются пять 96-луночных планшетов. После 1-часовой обработки клетки промывают дважды 100 мкл PBS и фиксируют 50 мкл of 2% формальдегида/0,2% глутеральдегида в PBS в течение 10 мин. Затем фиксированные клетки дважды промывают 100 мкл PBS. Для окрашивания ядер используют Hoechst 3342 в разведении 1:10000. После 7-мин инкубации в темноте Hoechst удаляют, и клетки промывают PBS. Наконец, клетки покрывают 100 мкл PBS и хранят при 4°C в темноте до визуализации. Визуализацию выполняют с использованием анализатора GE InCell Analyzer 2000. Транслокацию РКС к плазматической мембране или другие субклеточные

позиции считают вручную с использованием Adobe Photoshop CS6.

Изображения, показывающие транслокацию выбранных изоформ РКС α -, β II, γ -, δ и θ к клеточной мембране в присутствии эпокситиглиановых соединений соединения 1, соединения 3, а также РМА (форбол-12-миристан-13-ацетат), показаны на фиг. 1А. Эти изображения показывают, что активировать различные изоформы РКС могут различные эпокситиглиановые соединения.

Процент клеток, показывающих транслокацию на плазматической мембране соединений 1-10, а также положительного контроля РМА, конвертируют в тепловую карту, отображающую профиль транслокации изоформ РКС в ответ на 500, 50 и 5 нМ каждого соединения. Тепловая карта показана на фиг. 1В.

Результаты показывают, что все соединения 1-7 активируют РКС- θ (до различной степени) – изоформу РКС, известную как вовлеченную в активацию Т- и НК-клеток и супрессию развития Treg (Brezar et al., 2015; Anel et al., 2012). Все эпокситиглиановые соединения активируют РКС- β , которая критична при передаче сигналов В-клеточного рецептора и презентации антигена (см., например, Kang et al., 2001; Lim et al., 2015). Три другие изоформы РКС (η -, α -, δ), которые слабее активируются некоторыми или всеми эпокситиглианами, также непосредственно вовлечены в ответы иммунных клеток (Lim et al., 2015; Pfeifhofer et al., 2006).

Пример 2. Изменения экспрессии генов в строме опухолей мышей, совпадающие с рекрутментом иммунных клеток и индукцией Th-1/M1-подобного противоопухолевого иммунного ответа

Th-1/M1-подобный ответ при противоопухолевом иммунитете. Th-1/M1-подобный иммунный ответ ассоциируется с индукцией противоопухолевого клеточного иммунитета через ряд механизмов, включая прямую тумороцидную активность, модификацию противоопухолевых реакций цитокинами и потенцирование длительной иммунологической памяти. Например, несколько наборов данных показывают, что CD4⁺ Т-хелперные типа 1 (Th1) клетки – двигатели иммунитета Th1 могут способствовать поддержанию клиренса опухолевых клеток через секрецию различных цитокинов, включая интерферон- γ (IFN- γ), интерлейкин-2 (IL-2) и фактор некроза опухоли α (TNF- α) (Knutson et al., 2005; DeNardo et al., 2010; Burkholder et al., 2014). Эти цитокины промотируют активности нескольких типов клеток, включая антигенпредставляющие клетки (APC), цитотоксические Т-клетки, НК-клетки и различные подтипы врожденных иммунных клеток (см., например, Cohen et al., 2000; Bos & Sherman, 2010). Также известно, что IFN- γ и TNF имеют прямое действие на выживание опухолевых клеток (Sugarman et al., 1985; Bayaert et al., 1994). Хотя IL-1 и IL-6 (продуцированные

макрофагами M1) ассоциируются с развитием опухоли, более поздние данные предполагают, что они фактически являются ключевыми компонентами резких противоопухолевых иммунных ответов (Haabeth et al., 2011; Gabrilovich et al., 2012; Haabeth et al., 2016). Они показывают усиление пролиферации В-клеток и продуцирования антител, повышение активности антигенпредставляющих клеток (АРС), стимуляцию пролиферации антигенспецифических цитотоксических типов клеток и промотирование дифференцировки клеток Th1 (Haabeth et al., 2011; Burkholder et al., 2014). Также показано, что комбинации цитокинов Th1 и M1 являются важными в иммунологическом надзоре за опухолями. Например, как IL-1, так и IFN- γ усиливают взаимно действие для активации опухоцидной активности макрофагов (Hori et al., 1989; Haabeth et al., 2016). Важно, что появление макрофагов M1 и лимфоцитов Th1 в опухолях положительно ассоциируются с улучшенным прогнозом и временами выживания при многих типах рака (Pages et al., 2010; Fridman et al. 2012; Senovilla et al., 2012). Действительно, предполагается, что индукция воспаления типа Th1/M1 существенно улучшает подходы на основе противораковой терапии (Haabeth et al., 2012). Ниже описывается действие соединения 1 при промотировании противоопухолевого иммунного ответа, подобного Th1/M1, в строме мышшиной модели с ксенотрансплантатом.

Строма мышцы в ксенотрансплантате опухоли человека от мышей. Клеточную линию меланомы человека SK-MEL-28 инъецируют подкожно (s.c) в 2 места на боках каждой мыши BALB/c Foxn1nu (2 миллиона клеток/место) и позволяют расти до приблизительно 7 мм в диаметре. Затем в каждую опухоль инъецируют 50 мкл 20% пропиленгликоля, содержащего 30 мкг соединения 1, или 50 мкл 20% пропиленгликоля. Мышей подвергают эвтаназии в различные моменты времени после инъекции, опухоли собирают, кожный покров удаляют, и интактные опухоли хранят при -80°C.

Экстракция РНК. РНК экстрагируют из 30 мг замороженной опухоли с использованием набора Qiagen RNeasy Plus Mini Kit согласно инструкциям изготовителя, затем определяют количественно с помощью прибора NanoDrop, и подтверждают целостность денатурацией в агарозных гелях, содержащих 1 кб маркера ДНК, и окрашивают бромидом этидия.

Аmplification РНК и мечение. Приблизительно 500 нг всей немеченной РНК доводят до конечного объема 11 мкл воды без нуклеазы. РНК инкубируют с 9 мкл мастермикса для обратной транскрипции (1 мкл праймера T7 Oligo (dT), 2 мкл 10x буфера для первой цепи, 4 мкл микса для dNTP, 1 мкл ингибитора РНКазы и 1 мкл ArrayScript) при 42°C в течение 2 час. За этим следует стадия синтеза второй цепи кДНК, которая включает дополнительную инкубацию при 16°C в течение 2 час с 80 мкл мастермикса для

второй цепи (63 мкл воды без нуклеазы, 10 мкл 10X буфера для второй цепи, 4 мкл микса для dNTP, 2 мкл ДНК-полимеразы и 1 мкл РНКазы Н). кДНК очищают фильтрацией через картридж для фильтрации кДНК с 250 мкл буфера для связывания кДНК и промывкой 500 мкл буфера для промывки, представленного в наборе. Очищенную кДНК элюируют при 20 мкл нагретой до 55°C воды без нуклеазы. Каждый образец кДНК инкубируют с 7,5 мкл мастермикса для IVT (2,5 мкл буфера для реакции T7 10X, 2,5 мкл ферментной смеси T7 и 2,5 мкл микса биотин-NTP) при 37°C в течение 16 час. Реакцию останавливают добавлением 75 мкл воды без нуклеазы к каждому образцу кРНК. Биотинилированную амплифицированную РНК очищают фильтрацией образцов кРНК через картриджи для фильтрации кРНК с 350 мкл буфера для связывания кРНК и 250 мкл of 100% этанола, смешанных перед загрузкой в фильтры. Затем картриджи для фильтрации кРНК с присоединенной РНК промывают 650 мкл буфера для промывки, и затем элюируют очищенную кРНК 200 мкл нагретой до 55°C воды без нуклеазы.

Гибридизация на Illumina Expression BeadChip. Образцы кРНК греют при 65°C в течение 5 мин и собирают импульсным центрифугированием. После нагревания при 65°C в течение 5 мин образцы кРНК приблизительно по 750 нг помещают в отдельные пробирки, в которые добавляют ~5 мкл воды без РНКазы и 10 мкл Hyb Mix. Приблизительно 15 мкл полученной смеси с кРНК загружают на Illumina Expression BeadChip. Последующие стадии гибридизации и промывки выполняют согласно руководству Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Assay Guide, поставляемому Illumina. Expression BeadChips с HumanHT-12 v4 покрывают более 47000 транскриптов и известных сплайс-вариантов транскриптома человека. Expression BeadChips MouseRef-8 v2.0 покрывают приблизительно 25600 хорошо аннотированных транскриптов RefSeq (эталонная последовательность), включая свыше 19000 уникальных генов.

Данные анализа. BeadChip считывают с помощью системы iScan System, и переносят через GenomeStudio в GeneSpring GX v12.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Величины экспрессии нормализуют с использованием квантильной нормализации с настройками по умолчанию. Элементы фильтруют на основании оценки обнаружения, вычисленной с помощью GenomeStudio, где $p \leq 0,05$ считают значимым.

Результаты показаны на фиг. 2. Фиг. 2А показывает, что некоторые цитокины/хемокины хозяина, которые важны для рекрутмента/активации иммунных клеток, апрегулируются в месте опухоли в ответ на обработку соединением 1. Заметим, что известно, что Sxcl1, который с трудом апрегулируется соединением 1, промотирует рекрутмент нейтрофилов и последующий киллинг оставшихся раковых клеток (Garg et al.,

2017). Кроме того, фиг. 2В показывает, что соединение 1 вызывает изменения экспрессии генов в хозяине, которые ассоциируются с развитием Th-1/М-подобного ответа, т.е., индукцию IFN- γ , TNF, IL-6 и IL-1 β . Данные также предполагают, что может происходить даунрегуляция передачи сигналов TGF-бета (фиг. 2С), которая является известным путем передачи иммуносупрессивных сигналов (Neuzillet et al., 2015).

Пример 3. Демонстрация того, что терапевтические концентрации соединения 1 и других эпокстиглианов индуцируют онкозис клеток

Онкозис является формой гибели клеток, характеризующейся набуханием и разрывом субклеточных органелл и последующей пермеабиллизацией плазматической мембраны из-за частичной потери АТФ-управляемой активности ионного насоса, который поддерживает осмотический баланс. Показано, что онкозис является иммуногенным по природе и ассоциируется с эффективностью некоторых онколитических вирусов и небольшими молекулами, разработанными как противораковые средства (см., например, Dyer et al., 2016).

Клеточные линии, реагенты и среды. Клетки A431 (эпидермоидная карцинома человека), MM649 (меланома человека), B16-OVA (клеточная линия меланомы мышей B16-F10, стабильно трансфицированная куриным овальбумином), MM415 (меланома человека) и FaDu (гипофарингеальный рак человека) культивируют с RPMI-1640, 10% FCS (полная среда), при 37°C, 5% CO₂, во влажном инкубаторе. Все клеточные линии, используемые в этом исследовании, подтверждают как отрицательные на микоплазму с использованием MycoAlert (Lonza). Также выполняют анализ профиля STR для того, чтобы подтвердить используемые клеточные линии человека.

Анализ на цитотоксичность с IncuCyte. Четыре раковые клеточные линии (A431, MM649 (меланома человека), FaDu (HNSCC) и MM415 (меланома человека) оценивают на их реакцию на обработку эпокстиглианами. Клетки высевают при плотности 10000 клеток на лунку (100 мкл полной среды) в темные 96-луночные планшеты с лунками с прозрачным дном (Corning, #3603). После 24-часовой инкубации среду из каждой лунки аспирируют и заменяют 50 мкл свежей среды, содержащей 1 мкг/мл иодида пропидия (PI). Исходные растворы (20 мг/мл в этаноле) четырех эпокстиглианов (соединения 1, 2, 3 и 4) разводят 2 $\times$ до конечной концентрации для анализа (1 мМ) в идентичных средах и включают в 96-луночный планшет с U-образными лунками в препарате для переноса. Разведение (50 мкл) добавляют в соответствующие лунки, и полученные планшеты вставляют в Essen Biosciences IncuCyte при подготовке для визуализации. Получают изображения в различные моменты времени (30 мин, 1 час и через часовые диапазоны) в целом в течение 24 ч.

Анализы на высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH). Измерение высвобождения LDH является хорошо известным анализом для оценки пермеабилзации к плазматической мембране и обнаружения гибели клеток через некроз (Chan et al., 2013). В этих анализах используют три клеточные линии (A431, MM649 и B16-OVA). Клетки высевают при плотности 10000 клеток на лунку (100 мкл полной среды) в прозрачные 96-луночные планшеты (Corning, #3595; 100 мкл полной среды), и полученные планшеты инкубируют в течение ночи, как подробно описано ранее. На следующий день среду из каждой лунки аспирируют и добавляют 50 мкл свежей среды. Исходные растворы соединения 1 разводят $2\times$ до конечных концентраций для анализа (1 mM и 600 мкM), и 50 мкл таких разведений добавляют в соответствующие лунки. Также составляют и включают контрольные растворы только этанола. В указанные моменты времени извлекают 50 мкл среды и анализируют на высвобождение LDH с использованием набора для анализа на цитотоксичность Pierce LDH (ThermoFisher Scientific). Регистрируют показания OD 490 нм и OD 690 нм для каждого образца с использованием планшет-ридера Hybrid Synergy H4. Показатели поглощения обработанных лекарством образцов нормализуют к контролям, обработанным детергентом, для определения % высвобождения LDH на лунку.

Анализ на внутриклеточный АТФ. Используют наборы для анализа CellTiter-Glo® 2.0 (Promega Corporation) для количественного определения на основе люминесценции АТФ, присутствующего в клетках, для определения уровней внутриклеточного АТФ в культурах A431 и MM649, подвергнутых воздействию двух концентраций (300 мкM и 500 мкM) соединения 1. Снова клетки высевают при плотности 10000 клеток на лунку в темные 96-луночные планшеты с лунками с прозрачным дном (в 100 мкл полной среды) и инкубируют при 37°C, 5% CO₂, в течение ночи. Во время анализа среду из каждой лунки аспирируют, и добавляют 50 мкл свежей среды. Исходные растворы соединения 1 разводят $2\times$ до конечных концентраций для анализа (1 mM и 600 мкM), и 50 мкл таких разведений добавляют в соответствующие лунки. Также составляют и включают контрольные растворы только этанола. В указанные моменты времени среду аккуратно извлекают, чтобы не разрушить клетки, и добавляют 100 мкл реагента CellTiter-Glo® 2.0. Полученный планшет помещают на орбитальный шейкер на 2 мин для того, чтобы вызвать лизис клеток, после чего его инкубируют в темноте в течение 10 мин. После этого определяют сигнал люминесценции в каждой лунке. Сигналы люминесценции из лунок, обработанных соединением, нормализуют к лункам, обработанным средой, и выражают в виде % внутриклеточного АТФ против времени.

Изображения, полученные из IncuCyte, показывают сильное окрашивание в

красный цвет через 120 минут в большинстве клеток всех четырех клеточных линий, обработанных 500 мкМ соединения 1, 2, 3 и 4 (A431, FaDu, MM649 и MM415). Не окрашиваются клетки, обработанные только средой, подтверждая, что утрата целостности плазматической мембраны ограничена клетками, обработанными соединением 1. Кроме того, также наблюдают значительное набухание цитоплазмы и «образование пузырьков» во всех клетках, обработанные соединением 1, 2, 3 и 4, хотя в различной степени и с различной кинетикой появления.

Результаты анализов на высвобождение LDH и оценки уровней внутриклеточного АТФ приводятся на фиг. 3А и 3В, соответственно. При сравнении с контролем имеется существенное высвобождение LDH из трех раковых клеточных линий при обеих концентрациях соединения 1, которые испытывали (300 мкМ и 500 мкМ) (фиг. 3А). Уровни внутриклеточного АТФ очень быстро уменьшаются после обработки 500 мкМ соединения 1, и через 60 минут почти не определяются (фиг. 3В). При 300 мкМ соединения 1 внутриклеточный АТФ спадает медленнее и менее катастрофично, чем в случае концентрации соединения 1 500 мкМ, составляя приблизительно 50% от уровня до обработки через 120 минут (фиг. 3В). Истощение АТФ ранее ассоциировалось с индукцией онкозиса (Kim et al., 2003).

Такие результаты показывают, что эпокситиглиановые соединения вызывают онкозис в терапевтически релевантных концентрациях (т.е., концентрациях, которые являются эффективными для того, чтобы вызвать геморрагический некроз *in vivo*).

Пример 4. Онкозис, вызванный соединением 1 и другими эпокситиглиановыми соединениями, показывает характеристики иммуногенной гибели клеток

Иммуногенная гибель клеток (ICD) является специфическим типом регулируемой гибели клеток, которая приводит к высвобождению или экстернализации медиаторов, называемых молекулярными фрагментами, ассоциированными с повреждениями (DAMP), которые взаимодействуют с рецепторами, экспрессируемыми дендритными клетками/макрофагами для промотирования их рекрутмента и стимуляции поглощения/презентации опухолевых антигенов Т-клеткам. ICD является известным путем для активации иммунной системы против рака. Биохимические признаки ICD включают выставление кальретикулина (CALR) и других белков эндоплазматического ретикулума/митохондриальных белков на поверхность погибающих клеток и высвобождение больших количеств АТФ и бокса 1 группы белков с высокой подвижностью (HMGB1) во внеклеточную среду (Kroemer et al., 2013). Эти параметры используют для точного прогнозирования способности химиотерапевтических средств (включая доксорубицин, митоксантрон, оксалиплатин и бортезомиб) индуцировать ICD

(Kroemer et al., 2013; Galluzzi et al., 2017). Способность эпокситиглианов индуцировать такие характеристики описана подробно ниже.

Клеточные линии, реагенты и среды. Клетки A431 (эпидермоидная карцинома человека), MM649 (меланома человека) и B16-OVA (клеточная линия меланомы мышей B16-F10, стабильно трансфицированная куриным овальбумином) культивируют с RPMI-1640, 10% FCS (полная среда), при 37°C, 5% CO₂, во влажном инкубаторе. BMDC культивируют в среде R10 (RPMI, 10% FCS, 2 mM глутамина, 50 мкМ бета-меркаптоэтанола, Pen/Strep). Все клеточные линии, используемые в этом исследовании, подтверждают как отрицательные на микоплазму с использованием MycoAlert (Lonza). Также выполняют анализ профиля STR для того, чтобы подтвердить используемые клеточные линии человека.

Анализы на высвобождение АТФ. Клетки высевают при плотности 10000 клеток на лунку (100 мкл полной среды) в прозрачные 96-луночные планшеты (Corning, #3595; 100 мкл полной среды), и полученные планшеты инкубируют в течение ночи, как подробно описано ранее. На следующий день среду из каждой лунки аспирируют и добавляют 50 мкл свежей среды. Исходные растворы соединений 1, 2, 3 и 4 разводят 2× до конечных концентраций для анализа (1 mM и 600 мкМ), и 50 мкл таких разведений добавляют в соответствующие лунки. Также составляют и включают контрольные растворы только этанола. В указанные моменты времени извлекают 80 мкл среды, центрифугируют при 1200 об/мин в течение 4 мин для оседания клеточного дебриса, и 50 мкл анализируют на АТФ с использованием набора для анализа на АТФ на основе биолюминесценции (FLAA, Sigma-Aldrich). Регистрируют люминесценцию в относительных единицах для каждого образца, используя планшет-ридер Hybrid Synergy H4 (BioTek).

Анализы на высвобождение HMGB1. Клеточные линии (A431, MM649 и B16-OVA) высевают в T75-см² колбы (Nunc) в 10 мл полной среды и культивируют при 37°C, 5% CO₂, до тех пор, пока не достигнут 90% слияния. Соединения 1, 2, 3 и 4 разводят в 5 мл идентичных сред до конечной концентрации 500 и 300 мкМ и затем вводят в клетки. Готовят несколько колб с тем, чтобы можно было получить кинетическую кривую высвобождения HMGB1 в ответ на обработку лекарством. Также получают контроль только с этанолом. В нужный момент времени среду извлекают из колбы в 10-мл полипропиленовую пробирку, которую помещают на лед на 5 мин. Супернатанты клеточных культур центрифугируют при 1200 об/мин в течение 4 мин для удаления клеточного дебриса, после чего 4,5 мл супернатанта загружают во вращающуюся колонку концентратора (Amicon® Ultra, мембрана, отсекающая 50 кДа, Merck) для удаления FCS. Затем поток из этой колонки загружают в другую колонку концентратора (Amicon® Ultra,

мембрана, отсекающая 10 кДа, Merck) и центрифугируют при 3500 об/мин для концентрирования HMGB1 перед анализом ELISA (SEA399Hu/SEA399Mu, Cloud-Clone Corp). Определяют величины OD 450 нм с использованием планшет-ридера Hybrid Synergy H4 (BioTek). Величины поглощения образцов, обработанных лекарством, нормализуют к образцам, обработанным носителем, для определения кратности возрастания высвобождения HMGB1 в ответ на обработку эпокситиглианами.

Анализы на экстернализацию кальретикулина. Экстернализацию кальретикулина определяют так, как описано ранее (Gomez-Cadena et al., 2016). Коротко, клетки (A431, MM649, B16-OVA), культивированные в полной среде при 37°C, 5% CO₂, разъединяют через трипсинизацию, центрифугируют при 1200 об/мин и промывают ×2 свежей средой. После дополнительного цикла центрифугирования полученный клеточный осадок ресуспендируют в концентрации 1×10^6 клетки/мл, после чего добавляют эпокситиглиан в конечной концентрации 500 или 300 мкМ. Также выполняют контроль только с этанолом. Клеточные суспензии инкубируют при 37°C, 5% CO₂, и в указанные моменты времени извлекают 200 мкл образца и инкубируют с красителем LIVE/DEAD far red в течение 5 мин на льду. После этого клетки осаждают при 1200 об/мин в течение 4 мин и промывают ×1 PBS. Затем к каждому осадку добавляют 500 мкл PBS, 0,25% формальдегида, для выполнения легкой фиксации, не ставя под угрозу целостность плазматической мембраны. После этого клетки промывают ×1 PBS и добавляют 100 мкл PBS, 1% BSA, 2 мМ ЭДТК (буфер FACs), содержащего анти-кальретикулин (ab2907, Abcam; разведение 1:50). После 1-часовой инкубации при комнатной температуре клетки центрифугируют при 1200 об/мин в течение 4 мин и промывают ×1 буфером FACs перед инкубацией со 100 мкл буфера FACs, содержащего актикролиций Alexa488 в 1:750, в течение еще часа при комнатной температуре. Клетки снова осаждают и затем ресуспендируют в 500 мкл буфера FACs для подготовки к проточной цитометрии.

Образцы, сначала закрывают FSC-H v FSC-A для идентификации отдельных клеток, после чего анализируют популяцию отрицательных (интактных) клеток к красителю LIVE/DEAD (экст. 640 нм, исп. 670/14) на зеленую флуоресценцию (экст. 488 нм, эм. 530/30; экстернализация кальретикулина). Затем определяют средние величины интенсивности флуоресценции и строят график зависимости от времени.

Результаты показывают, что быстрый онкозис, вызванный эпокситиглиановыми соединениями, также индуцирует характеристики иммуногенной гибели клеток с высвобождением/экстернализацией критических DAMP, включая АТФ (фиг. 4А и 4В), HMGB1 (фиг. 4С) и кальретикулин (фиг. 4D). Имеет место значительное высвобождение АТФ в пределах 60 минут во всех трех раковых клеточных линиях, обработанных как

двумя концентрациями соединения 1 (фиг. 4А), так и соединений 2, 3 и 4 (фиг. 4В). Эти соединения также промотируют высвобождение HMGB1 из раковых клеточных линий. После анализа ELISA величины для обработанных клеток нормализуют к клеткам, обработанным носителем, для определения кратности возрастания, показано, что соединение 1 повышает высвобождение HMGB1 в пределах 120 минут на 40% для клеток A341 и MM649 (фиг. 4Ci и 4Cii) и более, чем в 3 раза для клеток B16-OVA (фиг. 4Ciii). Соединения 2, 3 и 4, которые также анализировали на клетках B16-OVA, показывают минимум 2-кратное возрастание высвобождения HMGB1 из этой клеточной линии через 120 минут (фиг. 4Civ). Данные для экстернализации кальретикулина после обработки 3 клеточных линий соединением 1 показывают значительное возрастание средней интенсивности флуоресценции в пределах 60 минут после обработки (фиг. 4D). Известно, что такие высвобождение/экстернализация DAMP промотируют рекрутмент антигенпредставляющих клеток, стимулируют эффективное поглощение антигенов, ассоциированных с раковыми клетками, и стимулируют презентацию подмножеств Т-клеток (Kolaczowska & Kubes, 2013).

Пример 5. Фрагменты обработанных эпокситигланом раковых клеток «проглатываются» популяциями клеток CD11c⁺, полученными из костного мозга

CD11c является хорошо описанным маркером DC/макрофагов (Merad et al., 2013). Один путь для исследования потенциала противораковых средств (и индуцируемых ими ассоциированных с гибелью процессов) для промотирования развития иммуногенных реакций включает определение того, ведут ли они к поглощению клеточных компонентов CD11c⁺ дендритными клетками/макрофагами и их последующему созреванию в bone fide антигенпредставляющие клетки (APC) (Guermonprez et al., 2002). В настоящем примере авторы демонстрируют, что онкозис, индуцированный соединением 1 и родственными эпокситиглианами, ведет к поглощению компонентов погибающих раковых клеток такими клетками.

Выделение и культивирование клеток, полученных из костного мозга (BMDC). Сначала у 7-8-недельных мышей C57Bl/6 в стерильных условиях хирургически удаляют большие и малые берцовые кости. Мозг вымывают из костной полости 10 мл охлажденной на льду среды R10 (с использованием иглы 27G/шприца в 50-мл полипропиленовую пробирку). Клетки осаждают при 1500 об/мин в течение 5 мин и промывают ×2 охлажденной на льду средой R10. После ресуспендирования осадка в 10 мл охлажденной на льду среды R10 клетки считают с использованием усовершенствованного гемоцитометра и высевают при плотности 2×10^6 клеток на планшет (чашка Петри) в 10 мл R10 с добавлением 20 нг/мл мышинового GM-CSF. Все чашки инкубируют при 37°C, 5%

CO₂, и в день 3 добавляют еще 10 мл R10 с 20 нг/мл GM-CSF. Клетки снова подкармливают в день 6 и используют в последующих анализах в день 7

Эксперименты по поглощению BMDC. Перед совместной инкубацией с BMDC клетки B16-OVA трипсинизируют, центрифугируют при 1200 об/мин в течение 4 мин для осаждения клеток и промывают $\times 2$ полной средой. Затем клетки окрашивают 2 мкМ Cell Tracker Green в полной среде в течение 45 мин, после чего их осаждают и промывают $\times 2$ как описано выше. Затем меченные клетки B16-OVA обрабатывают соединениями 1, 2, 3 и 4 в двух концентрациях (500 или 300 мкМ) в среде при плотности 1×10^6 клетки/мл в течение 30 и 60 мин, после чего клетки осаждают центрифугированием, супернатант удаляют аспирацией, и клеточный осадок промывают $\times 1$ полной средой. После промывки обработанные клетки ресуспендируют в среде R10, загружают в лунки 6-луночного планшета (Corning, #3471, ультраслабое приклепление к поверхности), и добавляют BMDC. Совместные культуры инкубируют в течение 4 час, после чего клеточные суспензии переносят в микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 1500 об/мин в течение 5 мин. Осадки ресуспендируют в 100 мкл буфера FACS, содержащего анти-CD11c-APC, и инкубируют в течение 10 мин при 4°C. Клетки снова осаждают, промывают $\times 1$ буфером FACS и затем фиксируют, используя PBS, 1% формальдегида, в течение 10 мин. После центрифугирования и удаления супернатанта клетки ресуспендируют в 500 мкл буфера FACS при подготовке для проточной цитометрии.

Образцы, сначала закрывают FSC-H v FSC-A, затем SSC-H v SS-A для идентификации отдельных клеток. Затем определяют долю клеток CD11c⁺ (экст. 640 нм, исп. 670/14) с CMFDA_{mid} (экст. 488 нм, исп. 530/30) для обработанных и необработанных клеток, как процент от всех клеток CD11c⁺.

Результаты (фиг. 5A и 5B) показывают, что онкозис, вызванный соединением 1, промотирует поглощение (т.е. эффективное «проглатывание») фрагментов погибающих раковых клеток CD11c⁺ дендритными клетками/макрофагами. Оказывается, что такое поглощение зависит как от концентрации соединения 1, так и от времени обработки, так что при 500 мкМ соединения 1 поглощение антигена происходит в большей степени за более короткий период времени по сравнению с применением 300 мкМ. Это согласуется с кинетикой онкозиса, наблюдаемой в примере 3. Фиг. 5C показывает, что соединения 2, 3 и 4 также способны индуцировать реакцию гибели клеток, которая является иммуногенной *in vitro*, т.е. промотируют поглощение CD11c⁺ BMDC.

Пример 6. Комбинация соединения 1 с ингибиторами контрольных точек иммунитета

Виды терапии с ингибиторами контрольных точек иммунитета, в частности точек,

таргетирующих рецепторы, вовлеченные в Т-клеточную иммуносупрессию (например, цитотоксический Т-лимфоцитассоциированный белок 4 (CTLA-4) или белок запрограммированной гибели 1 (PD-1) и его лиганд PD-L1), значительно улучшили результаты пациентов при некоторых типах рака на поздней стадии, включая меланому, почечно-клеточный рак, рак мочевого пузыря и плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC) (Msaouel & Massarelli, 2016; Sharma & Allison, 2015). Однако первичная и *de novo* резистентность к таким ICI лекарствам является значительной клинической проблемой. Кроме того, широкое клиническое изучение отдаленных результатов показывает, что у некоторых пациентов с меланомой развивается резистентность к лечению и происходят рецидивы заболевания (O'Donnell et al., 2017). Терапии, комбинирующие ICI с соединениями, которые могут действовать как адъюванты путем промотирования гибели иммуногенных клеток (в частности, в результате повышенной инфильтрации иммунных клеток в паренхиму опухоли и поглощения/презентации антигена), дают надежду на преодоление некоторых ограничений ICI и улучшение общих клинических результатов (Workenhe et al., 2014; Ribas et al., 2017). В этом примере и в примере 7 проверяют результаты комбинаций ICI и инъекции в очаг поражения соединения 1.

Схему экспериментального подхода можно видеть на фиг. 6А. Коротко, 6-7 недельным мышам C57BL/6 инъецируют подкожно (s.c.) в оба бока клетки мышинной меланомы B16-F10-OVA (2×10^5 клеток на место в 100 мкл). Опухолям позволяют развиваться до приблизительно 5-50 мм³, после чего инъецируют i.p. 200 мкг анти-PD-1 (RMP1-14, BioXCell), анти-CTLA-4 (9H10, BioXCell) или изотип контрольного антитела (2A3 и IgG сирийского хомячка, BioXCell) на мышь (день -2). В день 0 в обе опухоли инъецируют I.T. или соединение 1 (15 мкг в 50 мкл) или только носитель (носит.). Каждая мышь получает дополнительную i.p. инъекцию того же антитела, которое вводили в день -2 (снова 200 мкг). Антитела вводят еще 3 раза i.p. инъекцией каждые 2 дня. Измеряют объем обработанных опухолей с использованием штангенциркулей, как описано ранее (Boyle et al., 2014), и определяют выживание мышей со временем.

Результаты, представленные на фиг. 6В и 6С, показывают, что соединение 1 можно комбинировать с анти-PD-1 и анти-CTLA-4 для ограничения роста опухоли и улучшения выживания мышей до более высокой степени, чем при лечении одним агентом. Оказывается, что этот эффект зависит от концентрации для каждой комбинации соединения 1/ICI. Например, инъекция 30 мкг соединения 1 вместе с анти-PD-1 ведет к улучшению выживания/уменьшенному росту опухоли по сравнению с применением 30 мкг одного соединения 1 (фиг. 6Вiii, iv). Этого не наблюдают, когда используют 15 мкг

соединения 1 в тех же комбинациях, т.е., не происходит улучшения в выживании или росте опухоли (фиг. 6Bi, ii). Ситуация обратная, когда используют анти-CTLA4, где 15 мкг соединения 1 в комбинированной обработке (фиг. 6Ci, ii) дают оптимальную реакцию, а 30 мкг соединения 1 не дают (фиг. 6Ciii, iv).

Пример 7. Наблюдение абскопального эффекта при использовании соединения 1 в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунитета

Схему экспериментального подхода можно видеть на фиг. 7A. Коротко, 6-7 недельным мышам C57BL/6 инъецируют s.c. в оба бока клетки мышинной меланомы B16-F10-OVA (2×10^5 клеток на место в 100 мкл). Опухолям позволяют развиваться до приблизительно 5-50 мм³, после чего инъецируют i.p. 200 мкг анти-PD-1 (RMP1-14, BioXCell), анти-CTLA-4 (9H10, BioXCell) или изотип контрольного антитела (2A3, BioXCell) на мыш (день -2). В день 0 в самую большую из двух опухолей (приблизит. 50-75 мм³) инъецируют I.T. или соединение 1 (15 мкг в 50 мкл) или только носитель (носит.). Оставшуюся опухоль оставляют необработанной, и каждая мыш получает дополнительную i.p. инъекцию того же антитела, которое вводили в день -2 (снова 200 мкг). Антитела вводят еще 3 раза i.p. инъекцией каждые 2 дня. В ходе эксперимента измеряют объем как обработанных, так и необработанных опухолей, как подробно описано ранее.

Результаты показаны на фиг. 7B. Результаты показывают, что эффективно удаляются не только опухоли, обработанные комбинацией антител и соединения 1, но что некоторые необработанные соседние опухоли также показывают реакцию на комбинированную терапию, которую не наблюдают с любым одним средством.

Пример 8. Супрессорные клетки миелоидного происхождения влияют на эффективность низкой дозы соединения 1

Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) являются незрелыми миелоидными клетками, которые могут подавлять иммунный ответ хозяина на опухоли несколькими путями (Qu et al., 2016). Авторы изобретения использовали нокаутированных мышей C57BL/6 с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (GCSF) для получения модели для оценки будущего потенциала для возможных комбинированных терапий, включающих соединение 1 с молекулами, которые ингибируют или блокируют белки (например, индолеамин-2,3-диоксигеназу (IDO)), ассоциированные с рекрутментом и функцией MDSC. GCSF – основной регулятор продуцирования и движения нейтрофилов также играет критическую роль в миграции и пролиферации MDSC (Li et al., 2016). С использованием GCSFR нокаутированной модели, предложенной авторами изобретения, проверяют возможную роль гранулоцитарных

MSDC в ограничении эффективности монотерапии (в субоптимальной дозе) соединения 1 против колоректальной аденокарциномы MC38.

Коротко, 6-7 недельным мышам дикого типа C57BL/6 и *gcsfr^{-/-}* инъецируют с.с. в оба бока клетки мышиногo колоректального рака MC38 (1×10^6 клеток на место в 100 мкл). Опухолям позволяют развиваться до приблизительно 5-50 мм³, после чего инъецируют I.T. 15 мкг соединения 1 или носитель (носит.) (50 мкл). Объем обработанных опухолей отслеживают так, как описано ранее в примерах 6 и 7. Сравнение размера опухолей и выживания между инъецированными соединением 1 опухолями у дикого типа (wt) и нокаутированных мышей с GCSFR можно видеть на фиг. 8.

С учетом роли GCSFR в рекрутменте гранулоцитов эти данные предполагают, что такая инфильтрация клеток иммунной системы может ограничиваться противораковой эффективностью соединения 1 в известной субоптимальной дозе (15 мкг). Комбинации соединения 1 или аналогов с соединениями, которые предотвращают развитие таких иммуносупрессивных клеточных популяций (например, ингибиторами IDO), таким образом могут привести к более хорошей противораковой эффективности и улучшить выживание пациентов.

Специалистам в области техники, к которой относится изобретение, следует иметь в виду, что возможны многочисленные его модификации, не выходящие за пределы сущности и объема изобретения.

Ссылки

Следует иметь в виду, что если в настоящем описании дается ссылка на любую публикацию из уровня техники, эта ссылка не является признанием того, что эта публикация образует часть общих знаний в данной области техники, будь то в Австралии или любой другой стране.

Adams et al., 2015. Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, 603-622.

Anel et al., 2012. Protein kinase C θ (PKC θ) in natural killer cell function and anti-tumour immunity. *Frontiers in Immunology*, 3, 187.

Beyaert R. & Fiers W., 1994. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Letters*, 340: 9-16.

Bos & Sherman, 2010. CD4⁺ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8⁺ T lymphocytes. *Cancer Research*, 70: 8368-8377.

Boyle et al., 2014. Intralesional injection of the novel PKC activator EBC-46 rapidly ablates tumours in mouse models. *PLoS One*, 9, e108777.

Brezar et al., 2015. PKC-Theta in regulatory and effector T-cell functions. *Frontiers in*

Immunology, 6, 530.

Burkholder et al., 2014. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *BBA-Reviews on Cancer*, 1845: 182–201.

Chan et al., 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Molecular Biology*, 979: 65-70.

Cohen et al., 2000. CD4+ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection. *Critical Reviews Immunology*, 2: 85–95.

DeNardo et al., 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29: 309–316.

Dyer et al., 2016. Oncolytic group B enadenotucirev mediates non-apoptotic cell death with membrane disruption and release of inflammatory mediators. *Molecular Therapy Oncolytics*, 4: 18-30.

Fridman et al., 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* 12: 298-306.

Gabrilovic et al., 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature Reviews Immunology*, 12: 253-268.

Galluzzi et al., 2017. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 17: 97-111.

Garg et al., 2017. Pathogen response-like recruitment and activation of neutrophils by sterile immunogenic dying cells drives neutrophil-mediated residual cell killing. *Cell Death Differentiation*. Advance online publication 24 February 2017.

Gomez-Cadena et al., 2016. Immune-system-dependent anti-tumour activity of a plant-derived polyphenol rich fraction in a melanoma mouse model. *Cell Death and Disease*, 7: e2243.

Guermónprez et al., 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 20: 621-667.

Haabeth et al., 2011. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature Communications*, 2: 240.

Haabeth et al., 2016. Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells. *Oncoimmunology*, 5 (1): e1039763.

Haabeth OA & Corthnay A., 2012. A model for cancer-suppressive inflammation. *Oncoimmunology*, 1 (7): 1146-1155.

Hori et al., 1989. Role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in gamma-interferon-promoted activation of mouse tumoricidal macrophages. *Cancer Research*, 49:2606-2614.

Hu-Lieskovan et al., 2017. New combination strategies using Programmed Cell Death 1/Programmed Cell Death Ligand 1 checkpoint inhibitors as a backbone. *The Cancer Journal*,

23, 10-22.

Kang et al., 2001. PKC β modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localisation. *EMBO J.*, 20, 5692-5702.

Kim et al., 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 304: 463-470.

Knutson KL & Disis ML, 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.*, 54: 721-728.

Kolaczkowska E & Kubes P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13: 159–175.

Kroemer et al., 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual Reviews Immunology*, 31: 51-72.

Li et al., 2016. G-CSF is a key modulator of MSC and could be a potential therapeutic target in colitis-associated colorectal cancers. *Protein Cell*, 7: 130-140.

Lim et al., 2015. Protein kinase C in the immune system: from signaling to chromatin regulation. *Immunology*, 146, 508-522.

Mahoney et al., 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, 561-585.

Merad et al., 2013. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology*, 31: 563-604.

Msaouel P. & Massarelli E., 2016. Immune Checkpoint Therapy in Head and Neck Cancers. *The Cancer Journal*, 22: 108-116.

Neuzillet et al., 2015. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 147: 22–31.

O'Brien et al., 2014. Local ablative therapies: Opportunities for maximising immune engagement and activation. *BBA Reviews Cancer*, 1846: 510-523.

O'Donnell et al., 2017. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treatment Reviews*, 52: 71-81.

Pages et al., 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29: 1093-1102.

Pfeifhofer et al., 2006. PKC α is expressed in T-cells and knockout mice have T-cell activation and immunity defects. *Journal of Immunology*, 176, 6004-6011.

Qu et al., 2016. Expansion and functions of myeloid derived suppressor cells in the tumour microenvironment. *Cancer Letters*, 380: 253-256.

Ribas et al., 2017. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and

Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell*, 170(6):1109-19.e10.

Senovilla et al., 2012. Trial watch: prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology* 1: 1323-1343.

Sharma P. & Allison JP, 2015. The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348(6230):56-61.

Smyth et al., 2015. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13, 143-158.

Sugarman et al., 1985. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*, 230:943–945.

Workenhe et al., 2014. Immunogenic HSV-mediated oncolysis shapes the antitumor immune response and contributes to therapeutic efficacy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 22: 123-31.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения опухоли, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора контрольной точки иммунитета.

2. Способ лечения или предупреждения одной или нескольких сторонних опухолей у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эпокситиглианового соединения или его фармацевтически приемлемой соли и ингибитора контрольной точки иммунитета, причем указанное эпокситиглиановое соединение вводят локально в опухоль, отличную от указанной одной или нескольких сторонних опухолей.

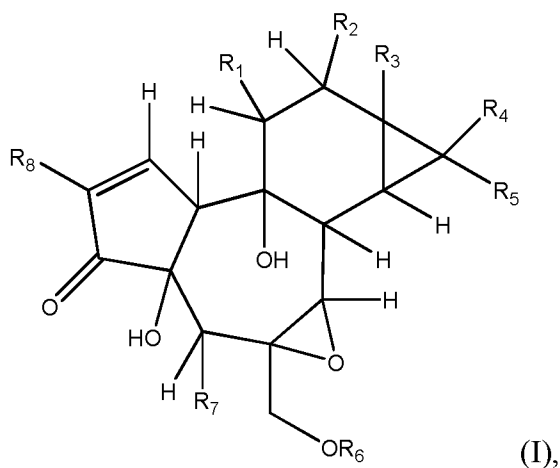
3. Способ по п. 1 или 2, в котором эпокситиглиановое соединение вводят локально в опухоль.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором эпокситиглиановое соединение вводят посредством интратуморальной инъекции.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором ингибитор контрольной точки иммунитета вводят системно.

6. Способ по п. 5, в котором ингибитор контрольной точки иммунитета вводят посредством парентеральной инъекции.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором эпокситиглиановое соединение представляет собой соединение формулы (I)



или его геометрический изомер или стереоизомер или фармацевтически приемлемую соль, где

R₁ представляет собой водород или C₁₋₆-алкил;

R₂ представляет собой -OH или -OR₉;

R₃ представляет собой -OH или -OR₉;

R₄ и R₅ выбирают независимо из водорода и C₁₋₆-алкила;

R₆ представляет собой водород или -R₁₀;

алкилциклоалкила; $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкенилциклоалкила, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-10}$ -алкинилциклоалкила и $-\text{OC}(\text{O})$ арила.

11. Способ по п. 9 или 10, в котором R_2 и R_3 выбирают независимо из $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-20}$ -алкила, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкенила и $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-20}$ -алкинила.

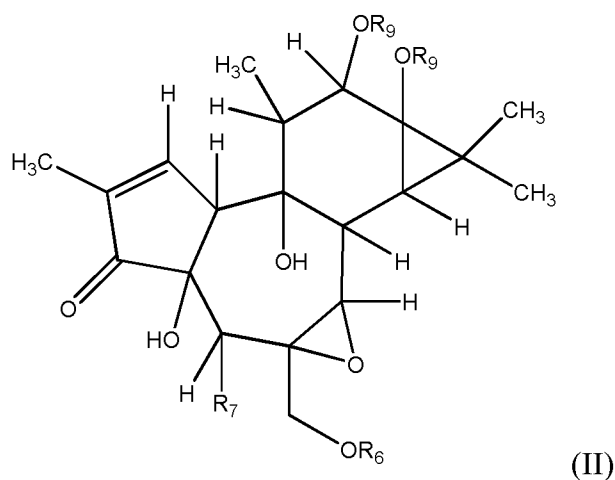
12. Способ по любому из пп. 7-11, в котором R_4 и R_5 выбирают, каждый независимо, из H и $-\text{CH}_3$.

13. Способ по любому из пп. 7-12, в котором R_6 представляет собой водород, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -алкил, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{2-6}$ -алкенил, $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{2-6}$ -алкинил или $-\text{C}(\text{O})$ арил.

14. Способ по любому из пп. 7-13, в котором R_7 представляет собой гидроксил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-6}$ -алкил, $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-6}$ -алкенил или $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{2-6}$ -алкинил.

15. Способ по любому из пп. 7-14, в котором R_8 представляет собой H или $-\text{CH}_3$.

16. Способ по п. 7, в котором соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (II)



или его геометрический изомер или стереоизомер или фармацевтически приемлемую соль;

где R_6 , R_7 и R_9 имеют значения, указанные в п. 7.

17. Способ по любому из пп. 7-16, в котором эпокситиглиановое соединение формулы (II) выбирают из группы, включающей

12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он;

12,13-ди(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он;

12-гексаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он;

12,13-дигексаноил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он;

12-миристоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-

тиглиен-3-он;

12-тиглоил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13-пентагидрокси-20-ацетилокси-1-тиглиен-3-он;

12-миристоил-13-ацетилокси-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он;

12-пропаноил-13-(2-метилбутаноил)-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он;

12,13-дитиглоил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он и
12-(2-метилбутаноил)-13-тиглоил-6,7-эпокси-4,5,9,12,13,20-гексагидрокси-1-тиглиен-3-он;

или их фармацевтически приемлемых солей.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором ингибитор контрольной точки иммунитета представляет собой антагонист рецептора запрограммированной гибели 1 (PD-1), цитотоксического Т-лимфоцитассоциированного белка 4 (CTLA-4), рецептора аденозина A2A, B7-H3, B7-H4, индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), иммуноглобулин-подобного рецептора клетки-киллера (KIR), гена 3 активации лимфоцитов (LAG3), Т-клеточного иммунорецептора с доменами IG и ITIM (TIGIT), Т-клеточного иммуноглобулина и домена муцина 3 (TIM-3), CD96 и иммуноглобулинового супрессора активации Т-клеток домена V (VISTA).

19. Способ по п. 18, в котором ингибитор контрольной точки иммунитета представляет собой антагонист рецептора запрограммированной гибели 1 (PD-1) или цитотоксического Т-лимфоцитассоциированного белка 4 (CTLA-4).

20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором ингибитор контрольной точки иммунитета вводят в виде нескольких доз.

21. Способ по п. 20, в котором несколько доз вводят до, одновременно и/или после введения эпокситиглианового соединения.

22. Способ по п. 21, в котором первую дозу ингибитора контрольной точки иммунитета вводят до введения эпокситиглианового соединения.

23. Способ по п. 21 или 22, в котором дозу ингибитора контрольной точки иммунитета вводят одновременно с эпокситиглиановым соединением.

24. Способ по любому из пп. 21-23, в котором одну или несколько доз ингибитора контрольной точки иммунитета вводят после введения эпокситиглианового соединения.

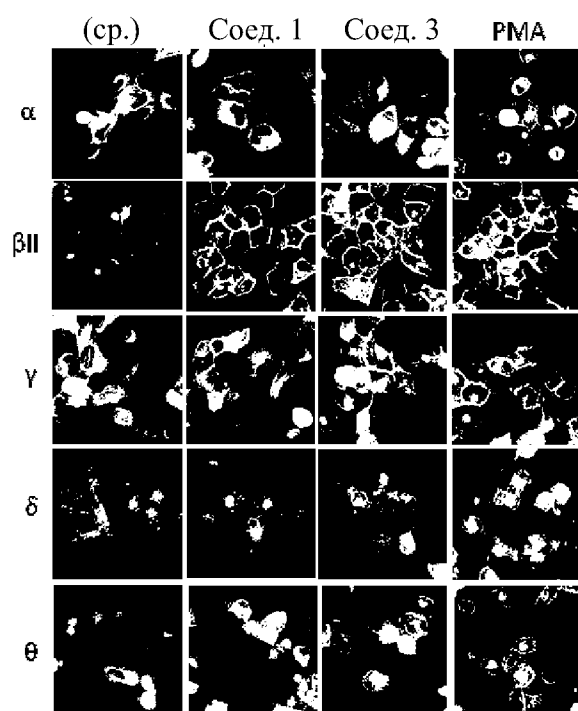
25. Фармацевтическая композиция, включающая эпокситиглиановое соединение или его фармацевтически приемлемую соль и ингибитор контрольной точки иммунитета и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель.

26. Набор, включающий композицию, содержащую эпокситиглиановое соединение, и композицию, содержащую ингибитор контрольной точки иммунитета.

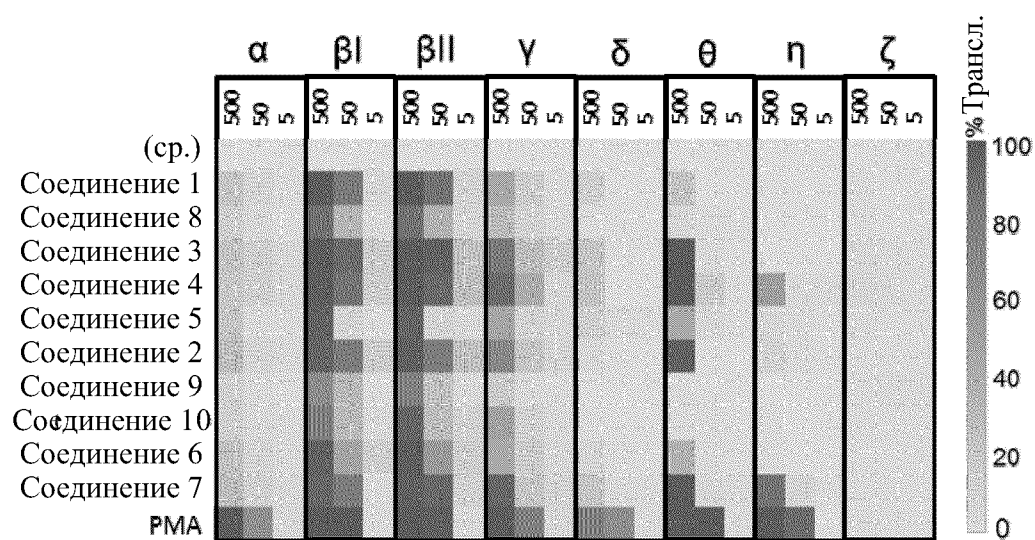
27. Набор по п. 26, включающий одну или несколько доз эпокситиглианового соединения и одну или несколько доз ингибитора контрольной точки иммунитета.

28. Набор по п. 26 или 27, включающий одну или несколько доз эпокситиглианового соединения в составе для топического введения, и одну или несколько доз ингибитора контрольной точки иммунитета в составе для введения посредством инъекции.

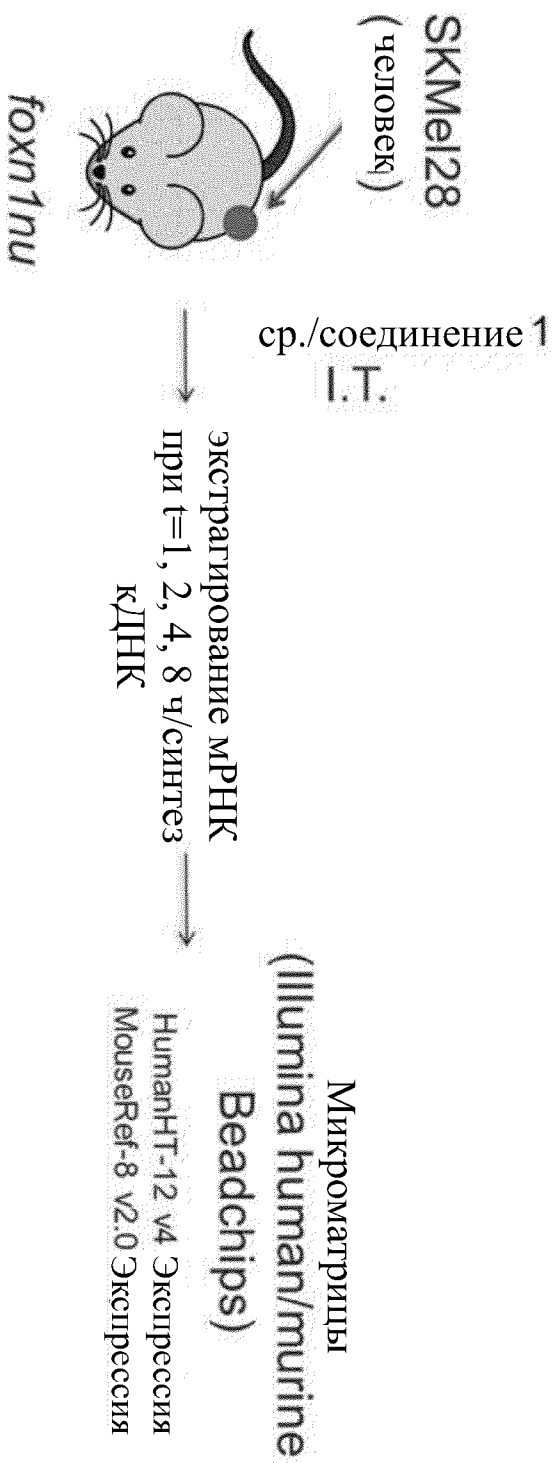
29. Набор по п. 26 или 27, включающий одну дозу эпокситиглианового соединения в составе для интратуморальной инъекции и одну или несколько доз ингибитора контрольной точки иммунитета в составе для введения посредством инъекции.



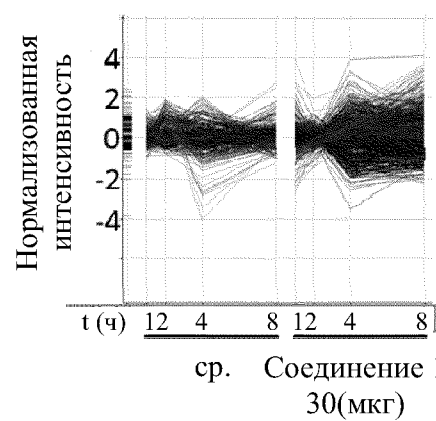
Фиг. 1А



Фиг. 1В



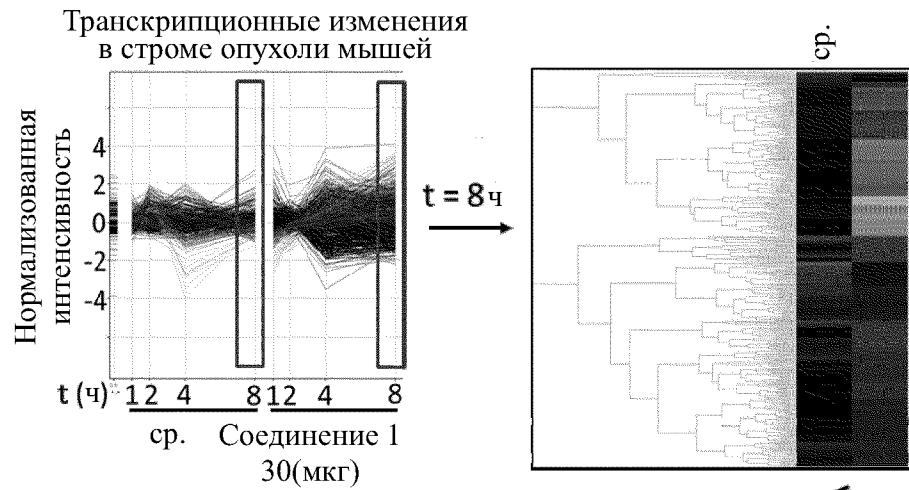
Фиг. 2А



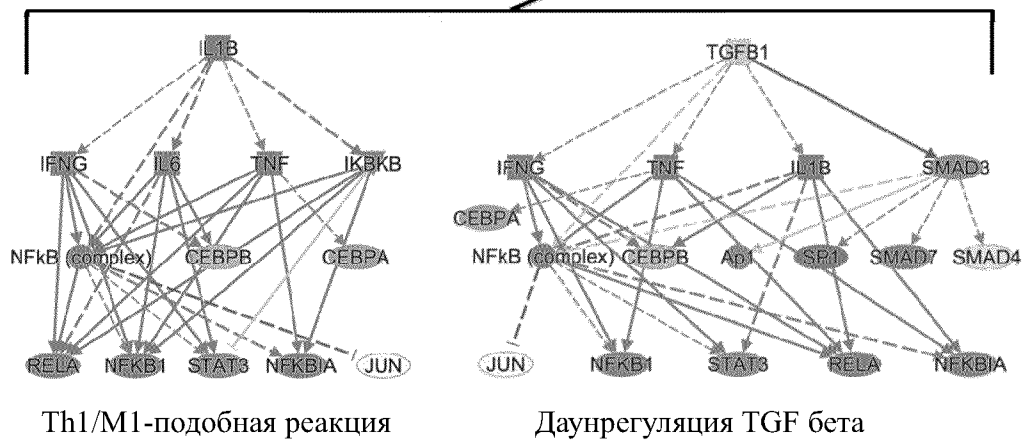
Соединение 1 индуцирует
цитокины/хемокины

	4 ч	8 ч	Функция ?
Cxcl1	↑12.5x	↑ 20.7x	Привлечение нейтрофилов, моноцитов
Ccl4	↑ 3.2x	↑ 5.8x	Привлечение NK, моноцитов
Ccl27	↑ 2.4x		Привлечение Т-клеток
Ccl9	↑ 2.2x		Привлечение дендритных клеток
Ccl21a	↑ 2.1x		В/Т/дендритный таргетинг лимфоидных органов
Il-6		↑ 3.9x	Супрессия Treg и подв. Т-клеток

Фиг. 2В



Ingenuity Pathway Analysis



Более достоверно

менее

Прогнозируемая активация

Прогнозируемое ингибирование

Соотношения

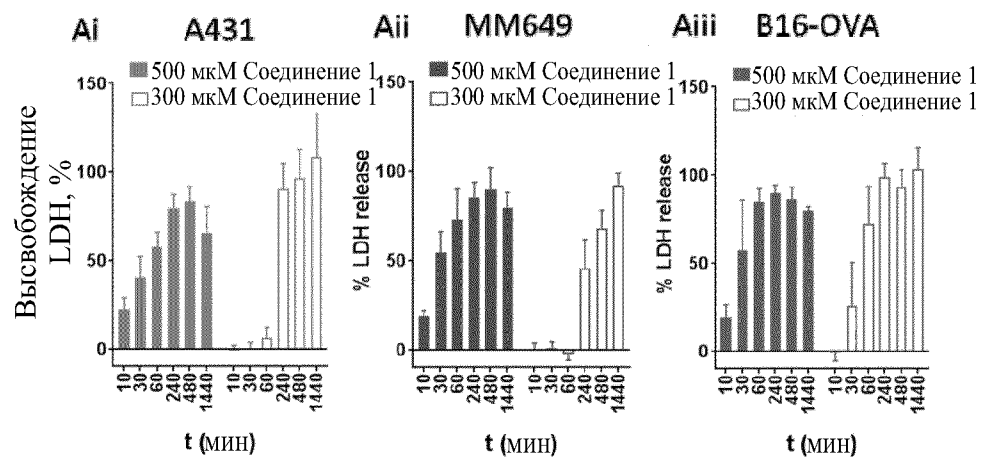
— Ведет к активации

— Ведет к ингибированию

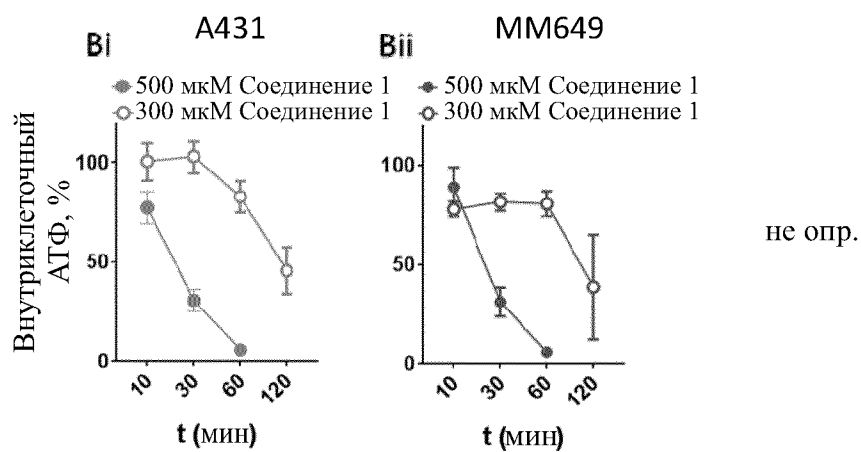
— Данные противоречивы

— Эффекты не прогнозированы

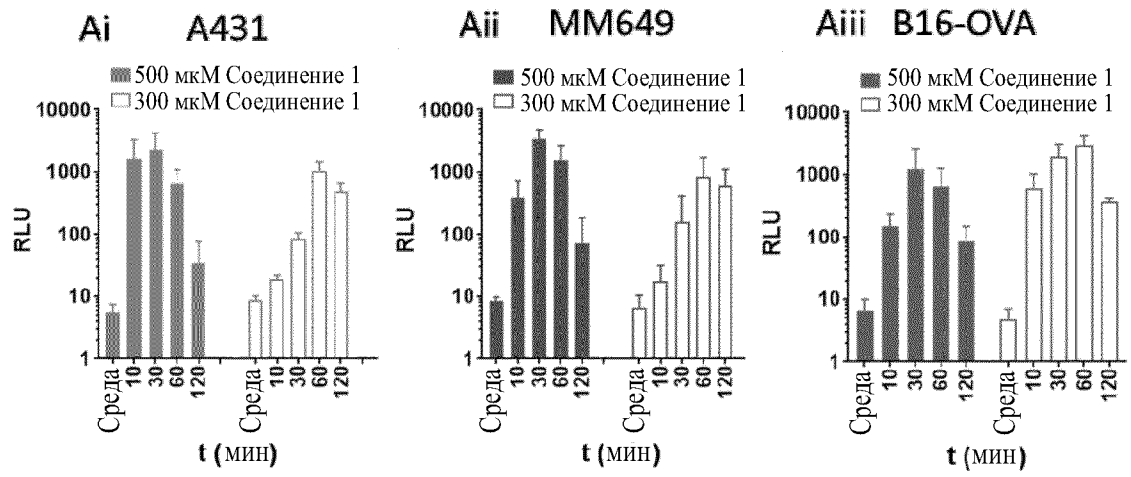
Фиг. 2С



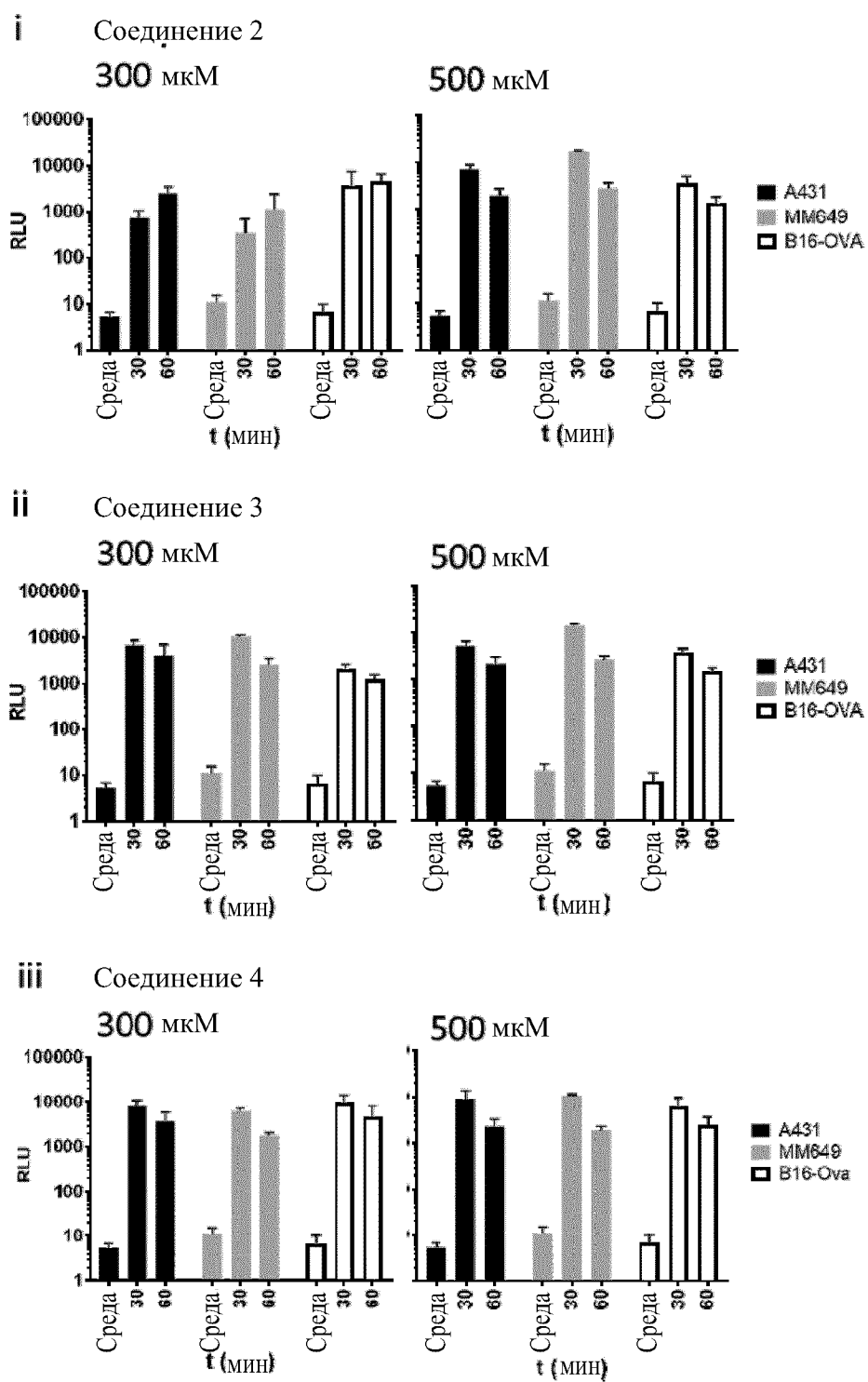
Фиг. 3А



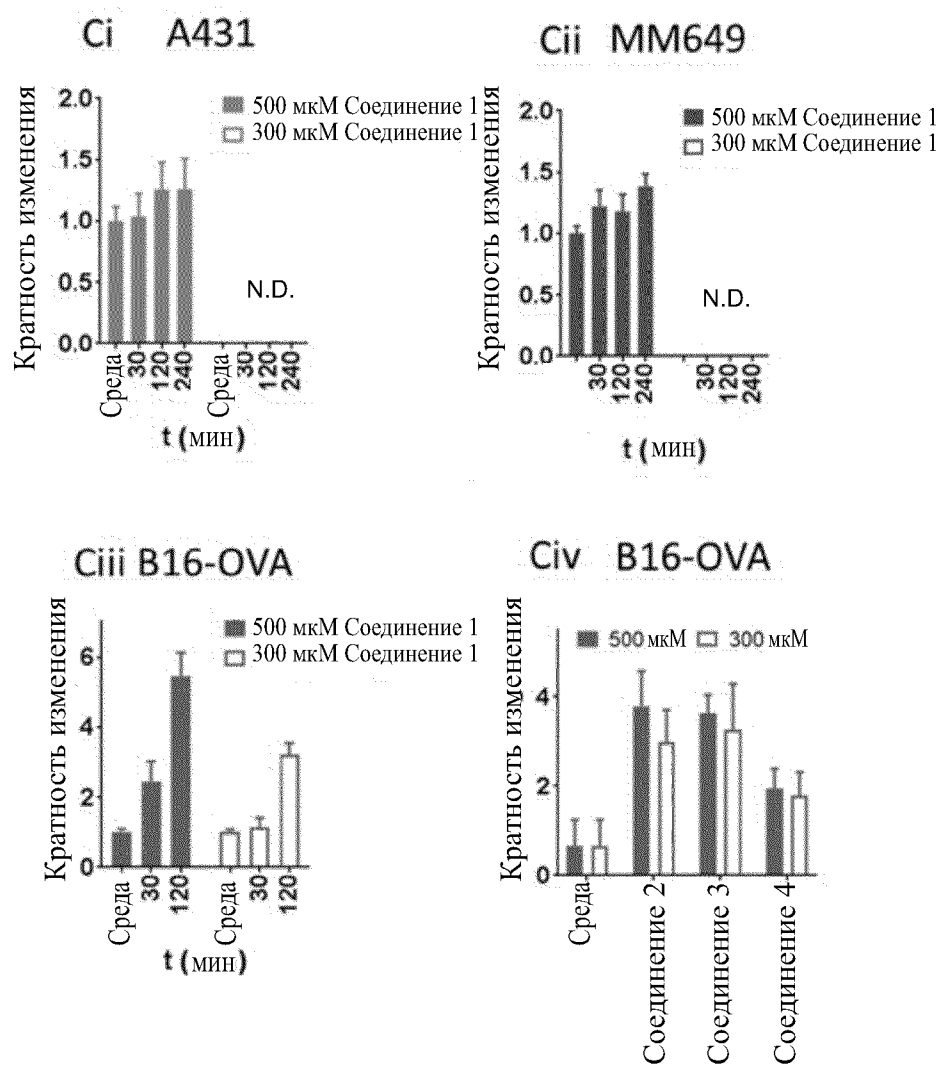
Фиг. 3В



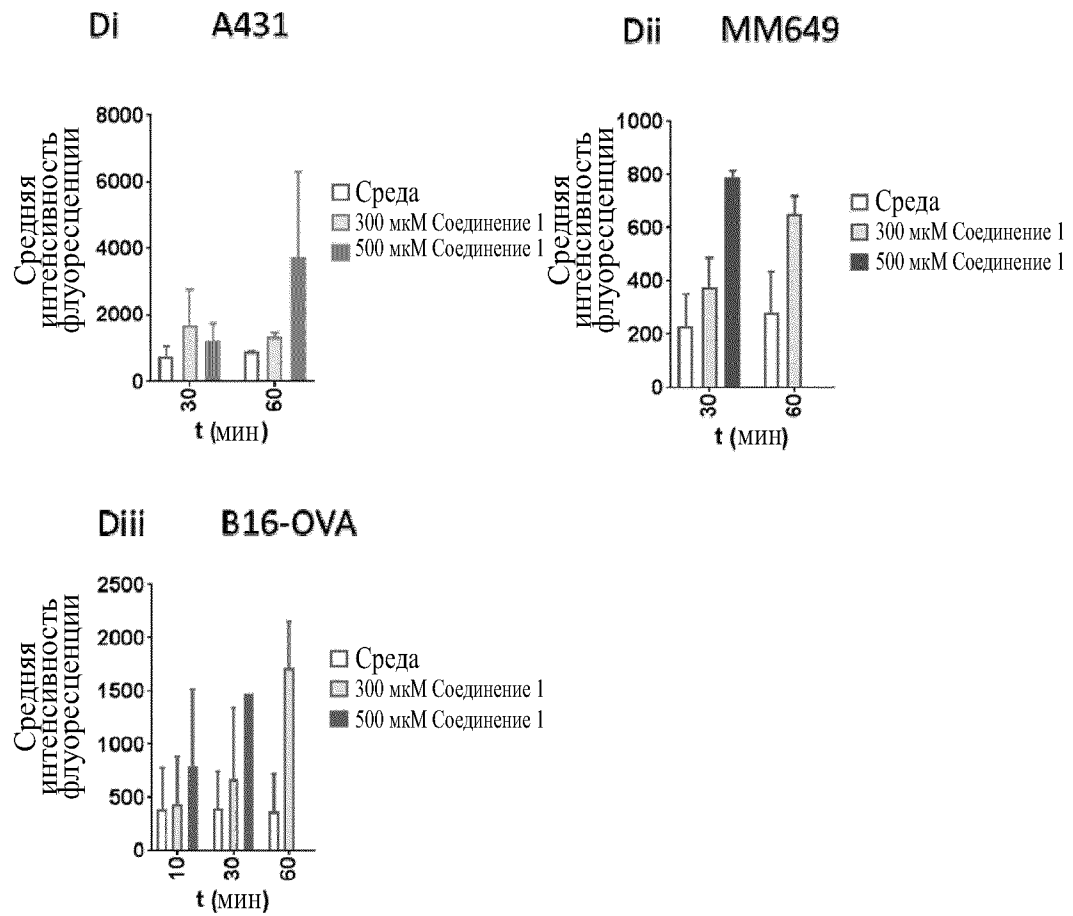
Фиг. 4А



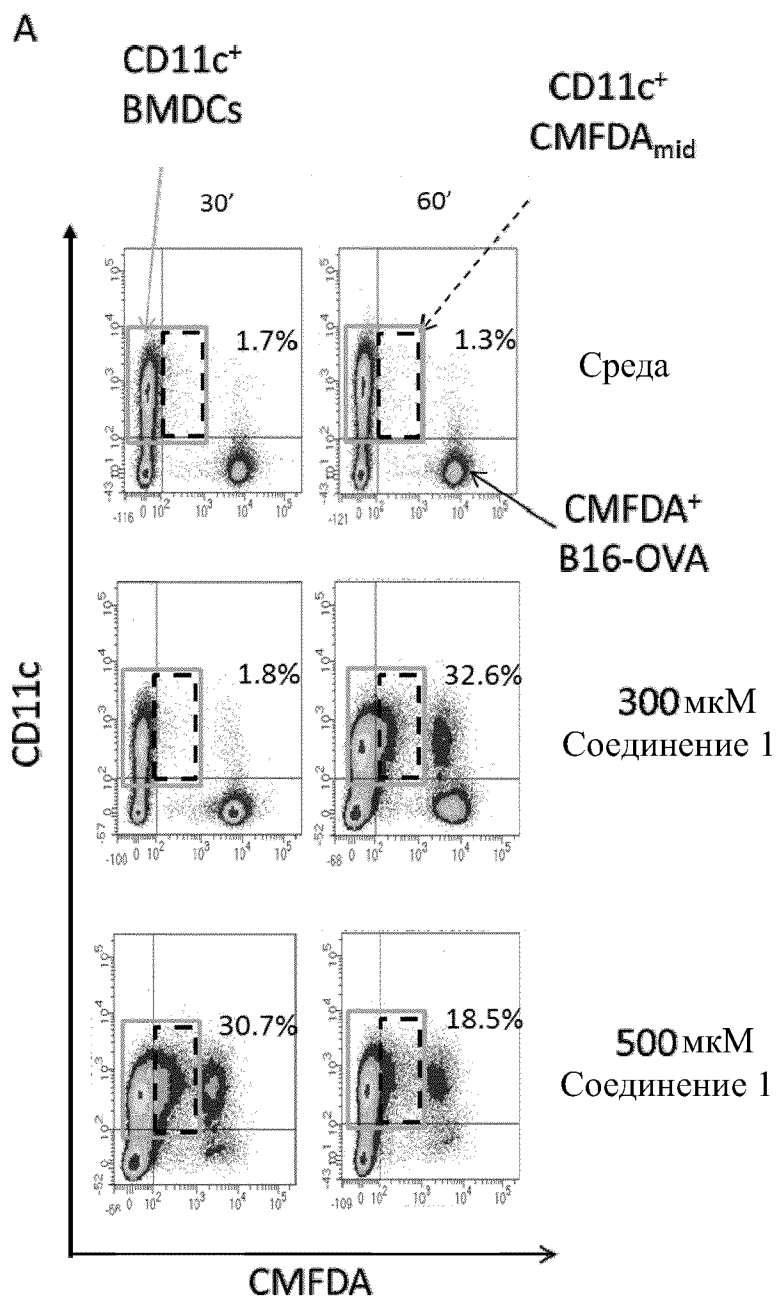
Фиг. 4В



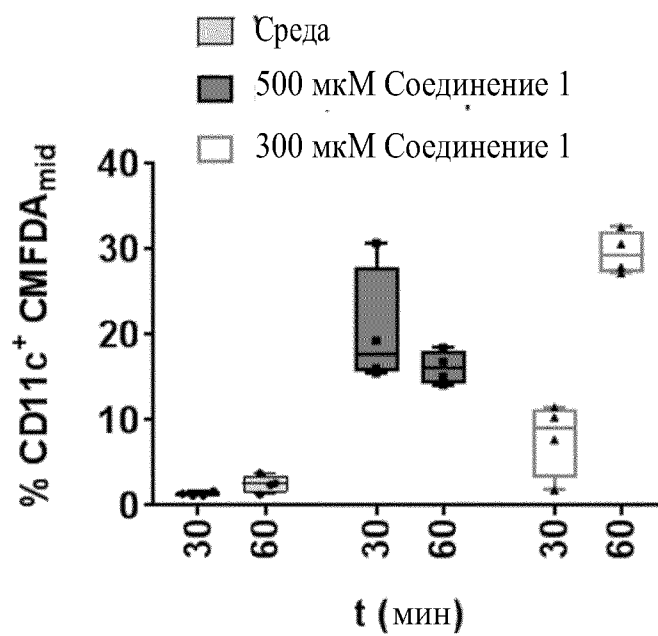
Фиг. 4С



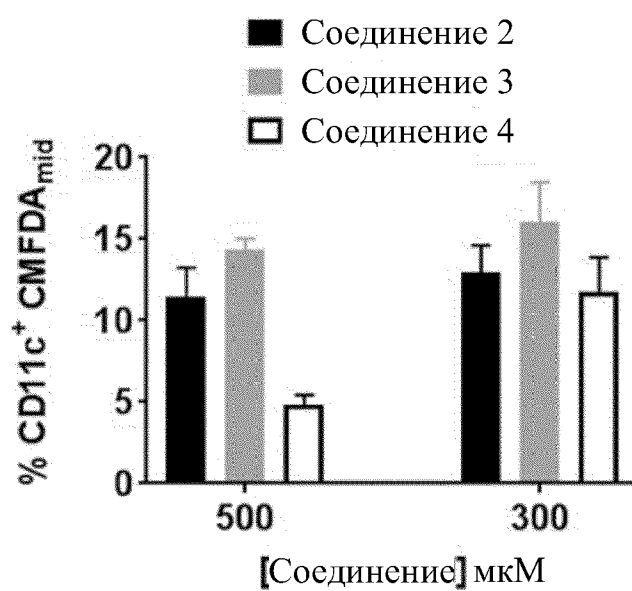
Фиг. 4D



Фиг. 5А



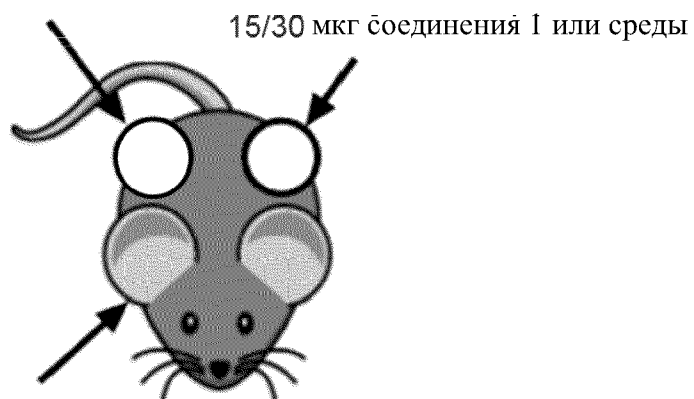
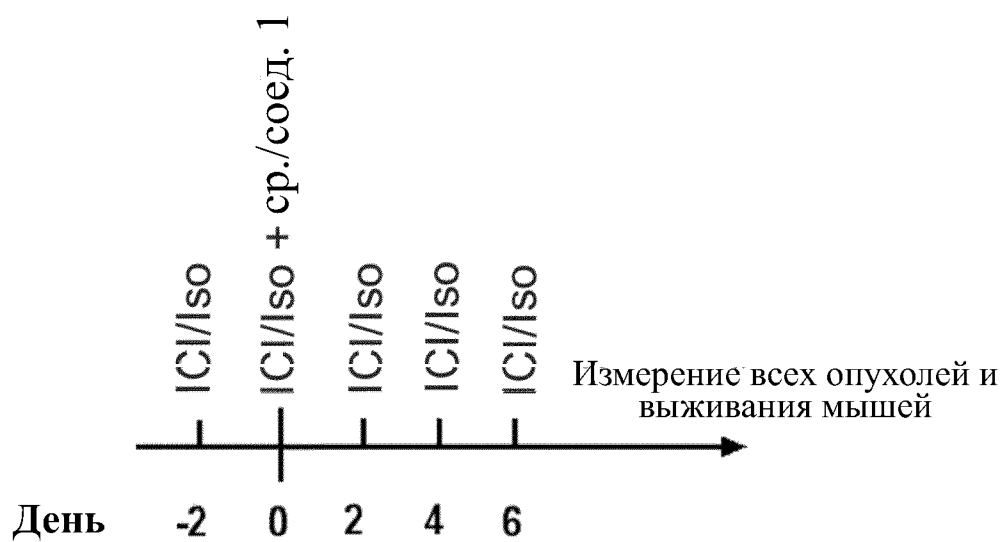
Фиг. 5В



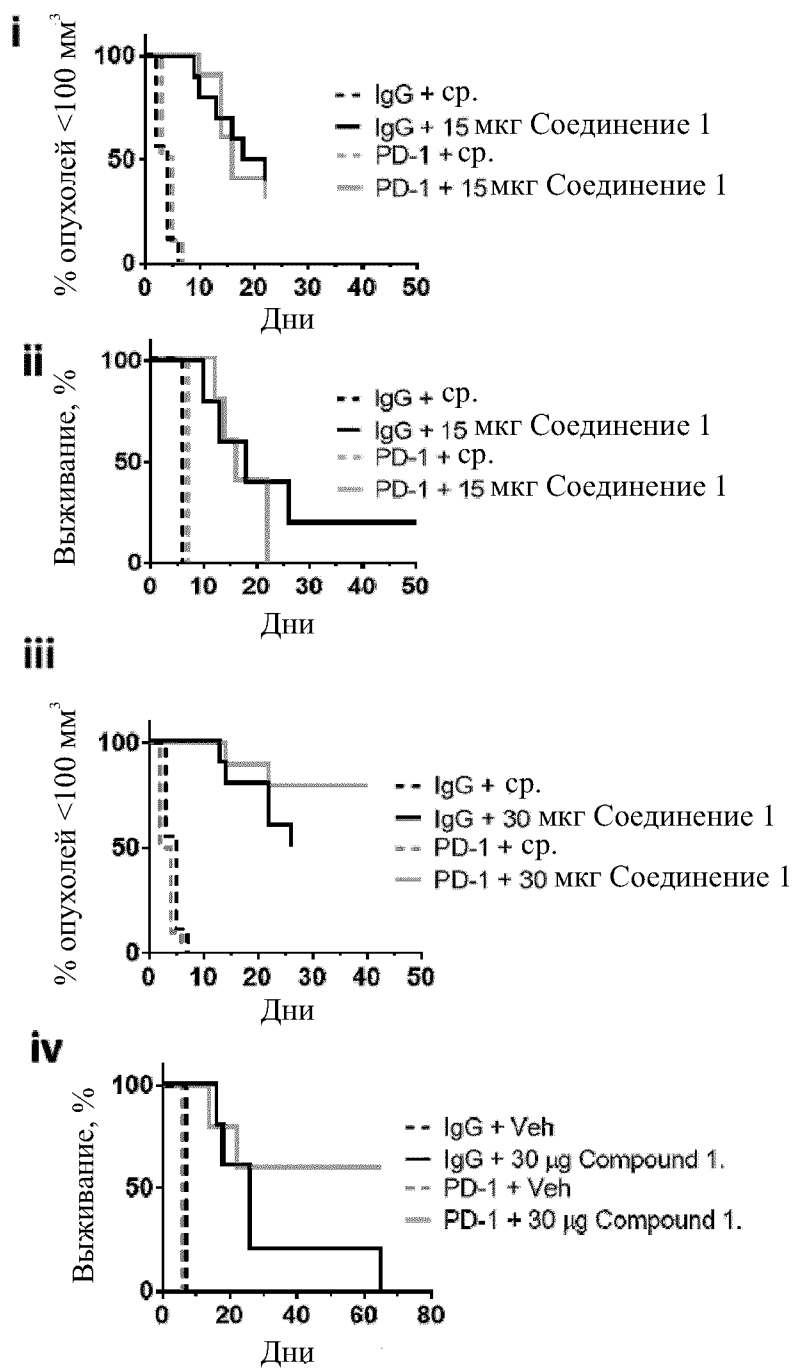
Фиг. 5С

B16-F10-OVA

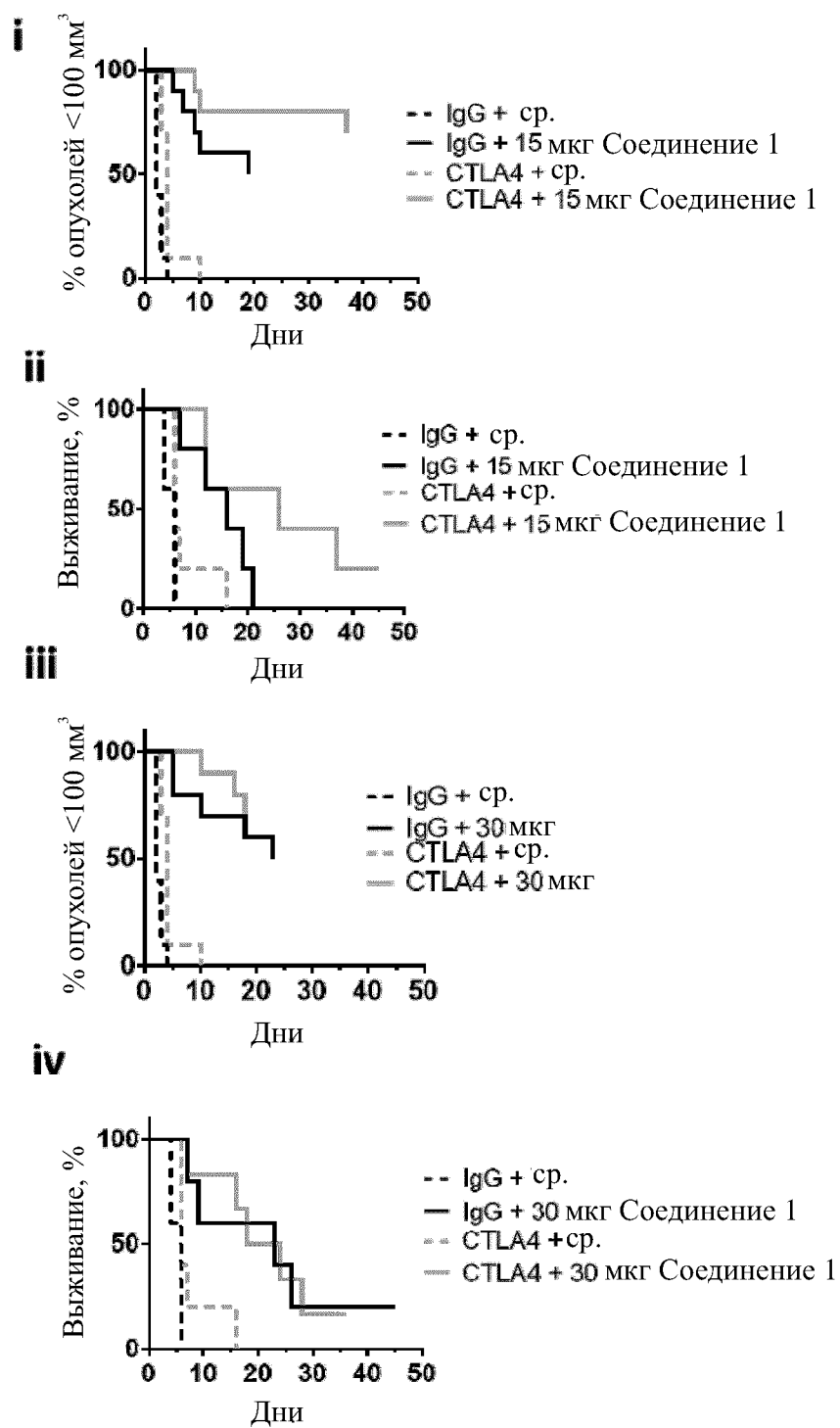
15/30 мкг соединения 1 или среды

 α -PD-1 или α -CTLA-4 (200 мкг)
i.p.

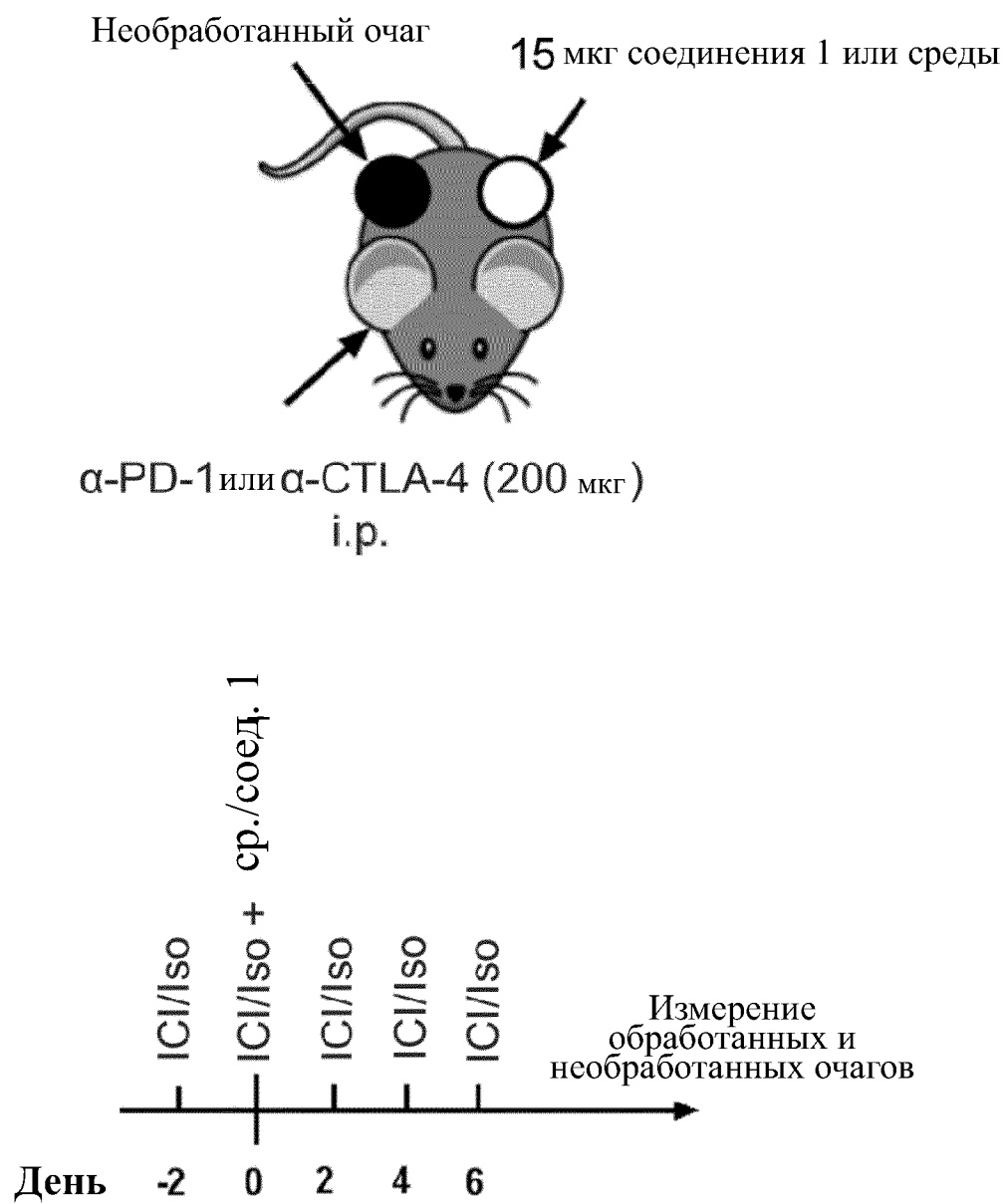
Фиг. 6А



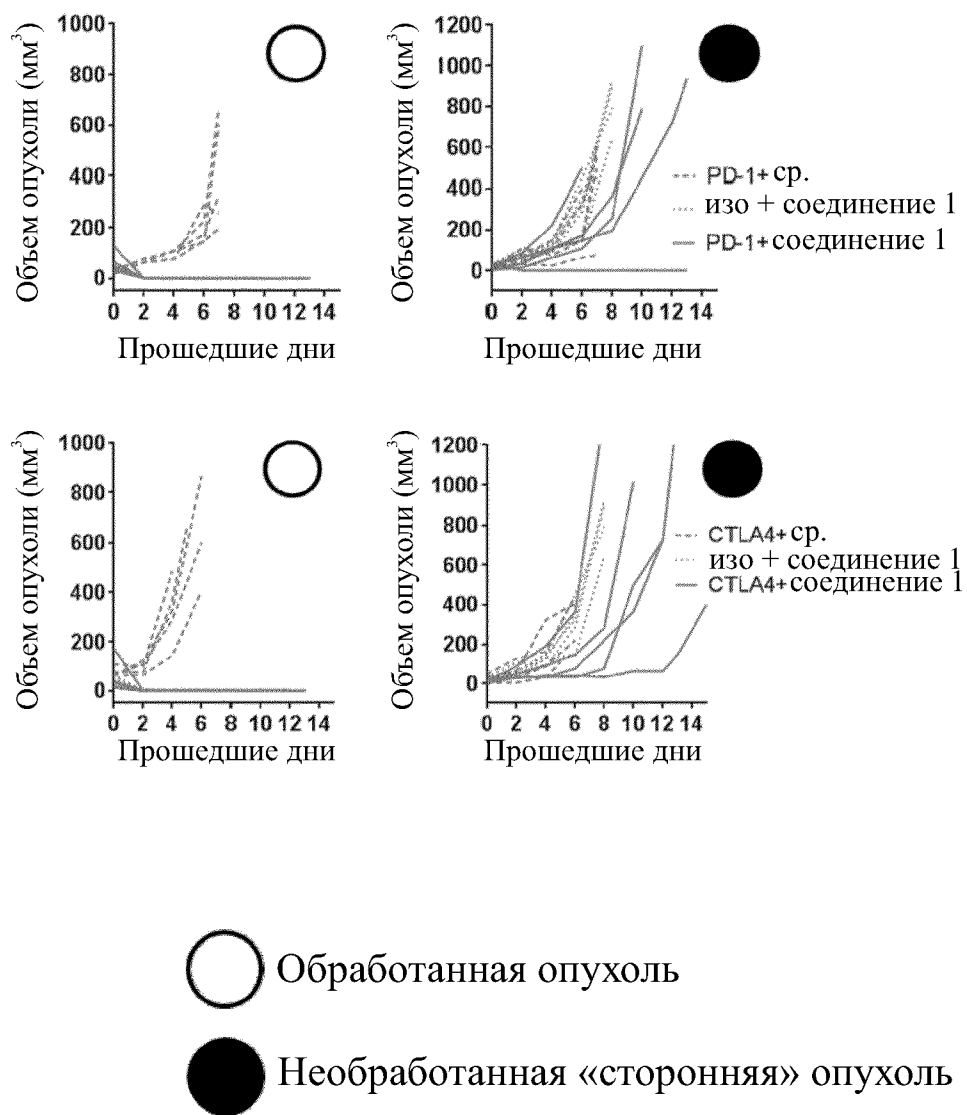
Фиг. 6В



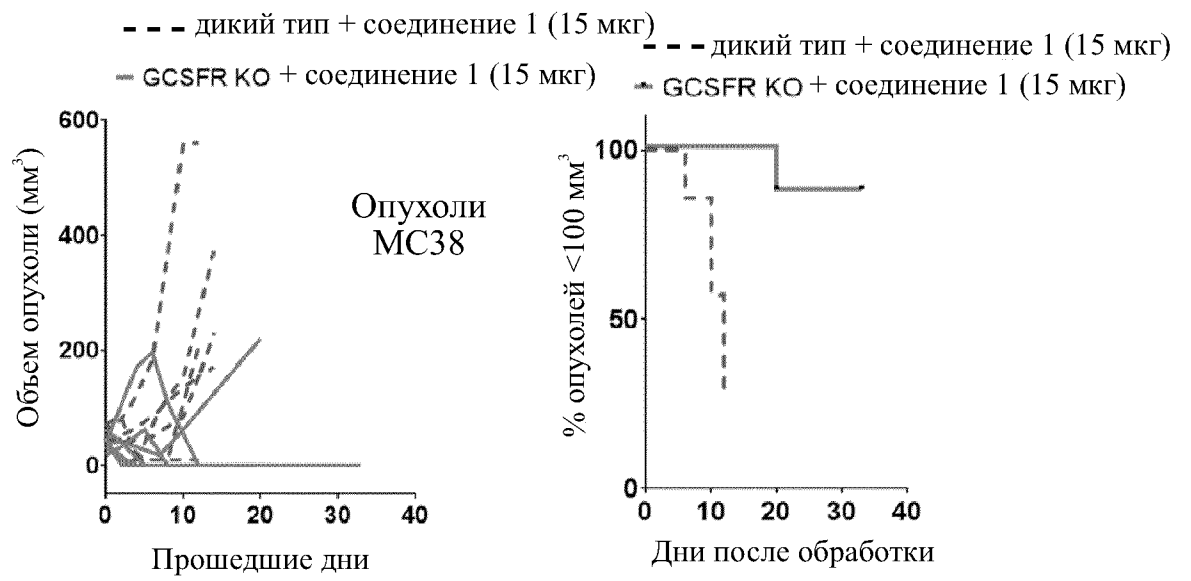
Фиг. 6С

B16-F10-OVA

Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8