

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090786 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.07.01(22) Дата подачи заявки  
2018.09.14(51) Int. Cl. *A61K 31/4412* (2006.01)  
*A61K 31/45* (2006.01)  
*G01N 33/574* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61K 47/69* (2017.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/06* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

## (54) АНТАГОНИСТЫ TRPV2

(31) 1715008.7

(32) 2017.09.18

(33) GB

(86) PCT/PT2018/050035

(87) WO 2019/054891 2019.03.21

(88) 2019.10.24

(71) Заявитель:

ИНСТИТУТО ДИ МЕДИСИНА  
МОЛЕКУЛАР ЖУАН ЛОБО  
АНТУНЕС (PT)

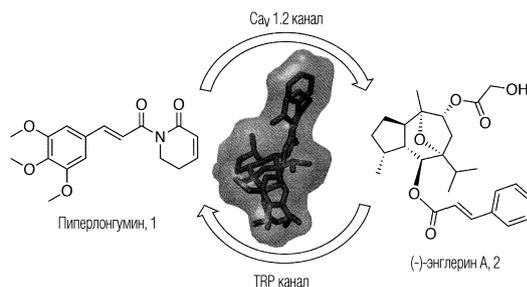
(72) Изобретатель:

Бернардес Гонсало, Родригес Тиаго,  
Конде Жуан, Бейкер Шарлотт (PT)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к обнаружению того, что соединения пиперлонгумина, такие как пиперлонгумин и его аналоги, производные и пролекарства, являются обратимыми аллостерическими антагонистами ваниллоидного канала с транзиторным рецепторным потенциалом 2 (TRPV2). Предложены способы лечения состояний, которые характеризуются экспрессией TRPV2, с использованием соединений пиперлонгумина и соединения пиперлонгумина для использования в таких способах лечения.



A1

202090786

202090786

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561983EA/061

### АНТАГОНИСТЫ TRPV2

#### Область

Настоящее изобретение относится к ингибированию ваниллоидного канала с транзиторным рецепторным потенциалом 2 (TRPV2) с применением соединений пиперлонгумина. Такое ингибирование может быть полезным, например, при лечении рака.

#### Уровень техники

Продукты природного происхождения (NP), в частности, их фрагментоподобное подмножество, обеспечивают отличные исходные точки для поиска новых лекарственных средств и зондов для исследования биологических систем.<sup>1-4</sup> Их биологически предварительно валидированные архитектуры часто содержат "скаффолды", которые не содержатся или лишь редко применяются в полностью синтетических химических веществах из-за сложных путей их синтеза.<sup>5</sup> Кроме того, фактические знания о рецепторах-мишенях для NP остаются ограниченными и серьезно препятствуют разработке рациональных подходов дизайна молекул на основе продуктов природного происхождения в химической биологии и молекулярной медицине.<sup>6</sup>

Лиганд-ориентированная информатика предоставляет жизнеспособную платформу для разворачивания показаний фенотипического анализа на макромолекулярном уровне. В частности, инструменты, использующие «нечеткие» дескрипторы фармакофоров, оказались полезными для обнаружения и идентификации целей в области NP.<sup>7-10</sup> (-)-Энглерин А, эффективное противораковое средство<sup>11</sup> и модулятор TRP,<sup>12-14</sup> как недавно сообщалось, является антагонистом Ca<sub>v</sub>1.2.<sup>15</sup>

Значительные усилия были предприняты для установления макромолекулярных мишеней, задействованных пиперлонгумином, с момента его раскрытия в качестве селективного противоракового средства.<sup>16,17</sup> Они недавно завершились сообщением о прямом ингибировании STAT3.<sup>18</sup> Тем не менее, было показано, что фрагмент-подобные NP могут поражать несколько целей, что приводит к сложным сетям полифармакологии.<sup>2,9</sup>

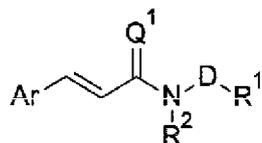
#### Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что фрагментоподобный противораковый алкалоид пиперлонгумин (1, фиг. 1A) является селективным аллостерическим антагонистом ваниллоидного канала 2 с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPV2) и что противораковая активность пиперлонгумина коррелирует с экспрессией TRPV2 в раковых клетках.

В аспекте изобретения предоставлен способ лечения рака, характеризующийся экспрессией ваниллоидного канала 2 с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPV2), включающий введение соединения пиперлонгумина пациенту, нуждающемуся в этом.

Предпочтительные соединения пиперлонгумина включают пиперлонгумин и его аналоги, производные и пролекарства.

Соединение пиперлонгумина может иметь формулу 1;



где Q<sup>1</sup> представляет собой O или S,

-Ar представляет собой необязательно замещенную арильную группу,

-D- выбран из -C(O)-, -C(S)-, -CH(OH)- и -CH(SH)-, и

-R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup>, вместе с -N-D-, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, или -R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup> каждый независимо выбран из водорода и необязательно замещенного алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклила и арила,

и их соли, сольваты и защищенные формы.

В другом аспекте изобретения предоставлено соединение пиперлонгумина для применения в способе лечения рака, характеризующегося экспрессией ваниллоидного канала 2 с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPV2).

В другом аспекте изобретения предоставлено применение соединения пиперлонгумина для получения лекарственного средства для применения в способе лечения рака, характеризующегося экспрессией ваниллоидного канала 2 с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPV2).

Аспекты и варианты осуществления изобретения описаны более подробно ниже.

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1А показаны структуры пиперлонгумина, 1, и (-)-энглерин А, 2, и взаимосвязь взаимного связывания с мишенью. Фиг. 1В представляет собой схему действия пиперлонгумина на раковые клетки.

На фиг.2 показано, что пиперлонгумин, 1, модулирует TRPV2. а) Кривая концентрация-ответ 1 против TRPV2 с использованием анализа на основе флуоресценции. IC<sub>50</sub>=4,6 ± 0,13 log единиц, n=2; контроль: траниласт, IC<sub>50</sub>=2,3 ± 0,25 log единиц, n=2. б) Ингибирование каннабидиола (CBD, 20 мкМ) вызывало приток кальция с помощью 1 (5 мкМ) в клетках НерG2 (0,5% DMSO). Для количественного определения пять наиболее сильно отвечающих клеток анализировали в каждой лунке (n=35-45 клеток) и нормализовали к исходному уровню. Изображены средние значения пяти наиболее сильно отвечающих клеток. \*\* Однофакторный дисперсионный анализ и ретроспективный анализ с HSD-критерием Тьюки: значимая разница между контролем и 1 (p <0,01) и между контролем и траниластом (p <0,01) через 120 с после стимуляции. Нет значимой разницы между 1 и траниластом. с) Ингибирование CBD (4 мкМ) вызывало приток кальция с помощью 1 (5 мкМ) в клетках НерG2 (0,5% DMSO). Статистически значимых различий между всеми образцами не наблюдается. d) Ингибирование CBD (4 мкМ) вызывало приток кальция с помощью 1 (5 мкМ) в клетках НЕК293 (0,5% DMSO). Отрицательный контроль: нетрансфицированные НЕК293, стимулированные CBD (4 мкМ). Для

количественной оценки проанализировали десять сильно выраженных клеточес- респондентов/лунку и нормализовали к исходному уровню (трансфицированные клетки:  $n=70-80$ , нетрансфицированные клетки:  $n=20$ ). Изображены средние значения десяти наиболее сильно отвечающих клеток. \*\* Однофакторный дисперсионный анализ и ретроспективный анализ с HSD-критерием Тьюки: значимая разница между контролем и 1 ( $p<0,001$ ), между контролем и нетрансфицированными клетками НЕК293 ( $p<0,001$ ) и между нетрансфицированными клетками НЕК293 и 1 ( $p<0,001$ ) через 300 с после стимуляции. е) Кальциевая визуализация НЕК293, трансфицированных человеческим слитым белком TRPV2-RFP, с поправкой на исходный уровень. ф) Уровень кальция после 5 минут стимуляции CBD 4 мкМ (цветовой код - синий=низкий уровень кальция; зеленый=средний; желтый=высокий средний; красный=высокий). Нетрансфицированные клетки отмечены точками. Клетки с артефактами (например, колебания кальция) отмечены стрелкой. Ни одна из нетрансфицированных клеток не демонстрирует сильного притока кальция. г) Десять наиболее сильно отвечающих клеток, помеченных квадратами, экспрессируют TRPV2-RFP на умеренных уровнях. h) Искусственно усиленный сигнал RFP: все десять выбранных клеток экспрессируют TRPV2-RFP. i) Кривая концентрация-ответ 1 против TRPV2, с использованием пэтч-кламп анализа.  $IC_{50}=1$  мкМ  $\pm 0,52$  log единиц,  $n=2$ , стимул: 4 мкМ CBD. j) Кривая концентрация-ответ 1 против TRPV2, с использованием пэтч-кламп анализа.  $IC_{50}>100$  мкМ,  $n=2$ , стимул: 10 мкМ CBD.

На фиг.3 показан пиперлонгумин, 1, являющийся селективным аллостерическим антагонистом TRPV2 человека. а) Пример кривой динамики фиксации потенциала, показывающий ингибирующий эффект 1 (100 мкМ) против каннабидиол (CBD)-активированных (4 мкМ) человеческих TRPV2 токов. Вымывание 1 достигается, и полная активность TRPV2 может быть восстановлена;  $n=2$ . б) Нормализованные ответы эксперимента по вымыванию лекарственного средства. в) Графики  $EC_{50}$  для CBD, с увеличением концентрации 1. д) Анализ Михаэлис-Ментена 1. е) График Schild для 1.

На фиг.4 показан скрининг NCI-60 и анализ биоинформатики. а) Распределение пиперлонгумина, 1, значения  $GI_{50}$  (-z оценка) в линиях раковых клеток NCI-60, сгруппированных по тканям происхождения. Горизонтальная пунктирная линия представляет среднее значение панели. б) Распределение 1 значения  $IC_{50}$  (-z оценка) в линиях раковых клеток NCI-60, сгруппированных по тканям происхождения. Горизонтальная пунктирная линия представляет среднее значение панели. в) Уровень транскрипции мРНК TRPV2 (log-интенсивность) как функция  $GI_{50}$  1 (-z оценки) на панели NCI-60. Клеточные линии, экспрессирующие TRPV2, более чувствительны к 1 (коэффициент корреляции Спирмена ( $\rho$ ) = 0,28,  $p < 0,05$ ). д) Уровень транскрипции мРНК TRPV2 (log-интенсивность) как функция  $IC_{50}$  1 (-z оценки) на панели NCI-60. Клеточные линии, экспрессирующие TRPV2, более чувствительны к 1 ( $\rho$  = 0,29,  $p < 0,05$ ). е) Анализ представленности наборов генов (GSEA) генов коррелировал с активностью 1. GSEA анализ проводили по генам, ранжированным в соответствии с коэффициентом корреляции Спирмена. При уровне ложноположительных результатов менее 5% 41 набор генов

считался значимым. Показаны 10 лучших генов, положительно (темно-серый) и отрицательно (светло-серый), коррелированные с активностью 1.

На фиг.5 показан анализ заживления ран с клетками НерG2. а) пиперлонгумин, 1, ингибирует миграцию раковых клеток в  $Ca^{2+}$ -зависимым образом при концентрации 5 мкМ. С - 0,5% DMSO контроль; Tr - траниласт (10 мкМ). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,01$ , непарный двусторонний t-критерий. С: n=5-7; 1: n=13-17; Tr: n=4-6. Никаких существенных различий между DMSO контролями обнаружено не было. б) Примерные изображения царапин (40x). в) Данные сортировки клеток при помощи флуоресценции клеток НерG2, показывающие конститутивную экспрессию TRPV2. Красный: неокрашенный контроль (средняя интенсивность флуоресценции, MFI=5), Синий: только вторичное антитело (MFI=62), Зеленый: первичное и вторичное антитело (MFI=1265). д) Анализ данных НерG2 RNA-seq для мишеней, вовлеченных в миграцию клеток. Из 175 протестированных генов представлены гены с уровнями экспрессии, равными или превышающими TRPV2, окрашенные по семейству генов. Вертикальная пунктирная линия представляет уровни экспрессии TRPV2.

На фиг. 6 показаны графики Каплана-Майера общей выживаемости для стратификации пациентов на основе медианной экспрессии hTRPV2 в глиоме низких степеней и мультиформной глиобластоме, что указывает на то, что TRPV2 является прогностическим маркером опухолей головного мозга. Показаны р-значения для логрангового критерия на различия в выживаемости.

На фиг.7 показано, что TRPV2 экспрессируется как в глиальных (белая стрелка), так и в компартментах эндотелиальных клеток (черная стрелка) диффузных глиом человека, с четко выраженным уровнем и паттерном экспрессии, особенно в эндотелиальных клетках GBM. Интенсивное окрашивание цитоплазматической мембраны эндотелиальных клеток при GBM контрастирует со слабым или отрицательным окрашиванием в эндотелии глиом II и III степени и с окрашиванием цитоплазмы и пунктата в глиальных клетках. Экспрессия TRPV2 в здоровом мозге (на краю опухоли) во внеклеточном, диффузном и слабом, в нейропиле (звездочка) и пунктат в нескольких глиальных клетках (белая стрелка) и нейронах.

На фиг. 8 показано (левая панель), что TRPV2 экспрессируется в опухолевых клетках головного мозга эндотелия и микроглии/макрофаге. Экспрессия TRPV2 ( $\log_2$  количества на миллион - CPM) в 3589 одиночных клетках, полученных из четырех образцов мультиформных глиобластом человека, сгруппированных по типу клеток. Данные показаны как средняя +/- стандартная ошибка. Фиг. 8 (правая панель) показывает, что транзиторная сверхэкспрессия hTRPV2 в клетках U251 увеличивает токсичность PL через 24 часа. Результаты были нормализованы для трансфицированных клеток, обработанных носителем DMSO, и сравнивали с клетками, обработанными только реагентом трансфекции, при различных концентрациях PL.

На фиг. 9 показан ход эксперимента по лечению мультиформной глиобластомы (GBM) *in vivo* с использованием PL нагруженного гидрогеля: клетки U251 вводили

внутричерепно (n=5 на группу), через 8 дней приживление было подтверждено с помощью биолюминесцентного изображения. На девятый день имплантировали PL загруженные или незагруженные гидрогели. Рост опухоли оценивали через регулярные интервалы с использованием биолюминесцентного изображения.

На фиг.10 показаны репрезентативные биолюминесцентные изображения мышей с ксенотрансплантатом U251, обработанных гидрогелем, нагруженным PL (50 мг/кг), или гидрогелем без нагрузки (контроль). Данные показывают, что лечение PL успешно уменьшает объем опухоли в течение 21 дня по сравнению с контролем, где опухоль растет экспоненциально.

На фиг.11 (левая панель) показана опухолевая нагрузка у мышей, получавших лечение гидрогелем с PL или без нагрузки, измеренная по активности люциферазы. Данные выражены в процентах от среднего размера опухоли в контрольной группе в каждый момент времени и представляют среднее значение по группе  $\pm$  SEM. Данные показывают значительную разницу опухолевой нагрузки в обеих группах ( $p=0,0159$ ,  $n=5$ , тест Манна-Уитни). На фиг. 11 также показана (правая панель) кривая выживаемости Каплана-Мейера, показывающая, что мыши, получавшие лечение гидрогелями, нагруженными PL, имеют увеличенную выживаемость ( $p=0,0494$ , логранговый критерий (тест Мантела-Кокса) по сравнению с контрольной группой. Критерии для исключения выживаемости включали увеличение размера опухоли на 554% по сравнению с исходным размером, измеренным для каждой мыши перед имплантацией гидрогеля.

На фиг. 12 показан qRT-PCR-анализ экспрессии TRPV2 относительно PGK1 в первичной и рецидивирующей GBM.

На фиг. 13 показана тепловая карта экспрессии набора генов высшего ранга (отличительный признак окислительного фосфорилирования) в первичной и рецидивирующей GBM.

На фиг. 14 показана схематическая диаграмма взаимодействий PPARGC1A.

На фиг. 15 показана тепловая карта экспрессии генов митохондриального биогенеза в первичной и рецидивирующей GBM.

На фиг. 16 показано, что экспрессия TRPV2 увеличивается одновременно со стадией опухоли головного мозга. Экспрессия TRPV2 ( $\log_2$  TPM) в образцах головного мозга GTEx здоровых и TCGA опухоли (сгруппированных в LGG степени II, LGG степени III и GBM). Черные точки и линии представляют среднее  $\pm$  стандартное отклонение. \*\* представляет  $p$ -значение  $<0,01$  и \*\*\*\*  $p$ -значение  $<0,0001$  (критерий суммы рангов Уилкоксона).

На фиг. 17 показано, что TRPV2 в основном экспрессируется в микроокружении опухоли. Диаграммы рассеяния, показывающие отрицательную корреляцию между экспрессией TRPV2 ( $\log_2$  RSEM) и чистотой опухоли в образцах TCGA GBM и LGG (коэффициент корреляции Спирмана,  $\rho = -0,36$  и  $-0,447$ ,  $p=3,1 \times 10^{-14}$  и  $7,5 \times 10^{-25}$ , соответственно). Серый оттенок вокруг синей линии локальной полиномиальной регрессии (лесса) представляет 95-процентный доверительный интервал.

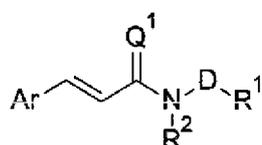
### Подробное описание

Данное изобретение относится к обнаружению того, что соединения пиперлонгумина являются обратимыми аллостерическими антагонистами ваниллоидного канала 2 с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPV2) и могут быть полезными при лечении состояний, связанных с экспрессией TRPV2.

Соединение пиперлонгумина может ингибировать TRPV2 и предпочтительно может быть обратимым антагонистом TRPV2. Соединение пиперлонгумина является селективным ингибитором TRPV2 и может ингибировать TRPV2 в большей степени, чем другие каналы TRP. Например, соединение пиперлонгумина может проявлять ингибирование TRPV2 по меньшей мере в 5 раз или более, по меньшей мере в 10 или по меньшей мере в 100 раз большее, чем одного или нескольких, предпочтительно всех TRPV1, TRPV3, TRPV4, TRPV5, TRPA1, TRPC1, TRPC3 или TRPC4.

Ваниллоидный канал с транзиторным рецепторным потенциалом 2 (TRPV2) (также известный как VRL и VRL1) представляет собой активируемый теплом кальциевый канал. TRPV2 может быть человеческим TRPV2. Человеческий TRPV2 (Gene ID 51393) имеет эталонную аминокислотную последовательность NP\_057197.2 и может кодироваться эталонной нуклеотидной последовательностью NM\_016113.4. Методы измерения активности TRPV2 и анализа ингибирующей активности описаны в другом месте настоящего документа и включают измерение индуцированного каннабидиолом притока кальция с использованием кальциевого зонда Fura2-AM.

Соединение пиперлонгумина может иметь формулу;



где Q<sup>1</sup> представляет собой O или S,

-Ar представляет собой необязательно замещенную арильную группу,

-D- выбран из -C(O)-, -C(S)-, -CH(OH)- и -CH(SH)-, и

-R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup> вместе с -N-D-, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, или -R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup> каждый независимо выбран из водорода и необязательно замещенного алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклила и арила,

и их соли, сольваты и защищенные формы.

Группа Q<sup>1</sup> предпочтительно представляет собой O.

Группа -Ar представляет собой арил, включая карбоарил или гетероарил, и арильная группа может представлять собой одно ароматическое кольцо или конденсированную систему, имеющую два или более ароматических кольца.

Карбоарильная группа может представлять собой C<sub>6-14</sub> карбоарильную группу, такую как фенил или нафтил, и наиболее предпочтительно, фенил.

Гетероарильная группа может представлять собой C<sub>5-14</sub> гетероарильную группу,

такую как C<sub>5-10</sub> гетероарильная группа, такая как C<sub>5-6</sub> гетероарильная группа, такая как C<sub>6</sub> гетероарильная группа, такая как пиридинил и пиримидинил, или C<sub>5</sub> гетероарильная группа, такая как фуранил, тиофенил и пирролил.

Арильная группа может быть арильной группой, содержащей 6 атомов ароматического кольца, такой как фенил или пиридинил.

Предпочтительно -Ar представляет собой карбоарил и наиболее предпочтительно представляет собой фенил.

Арильная группа может быть необязательно замещена, как например, одной или несколькими группами заместителей. Необязательные заместители могут быть выбраны из группы, состоящей из галогена, циано, -R<sup>S1</sup>, -OH, -OR<sup>S1</sup>, -SH, -SR<sup>S1</sup>, -NH<sub>2</sub>, -NHR<sup>S1</sup>, -NR<sup>S1</sup>R<sup>S2</sup>, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -CONHR<sup>S1</sup>, -CONR<sup>S1</sup>R<sup>S2</sup>, -NHCOR<sup>S1</sup>, -N(R<sup>S1</sup>)COR<sup>S1</sup>, где каждый -R<sup>S1</sup> и каждый -R<sup>S2</sup> независимо представляют собой алкил, алкенил, алкинил, арил или аралкил, которые необязательно замещены галогеном, таким как фтор, или -R<sup>S1</sup> и -R<sup>S2</sup> могут вместе образовывать гетероциклическое кольцо.

Арильная группа может быть необязательно замещена, например, замещена одной или несколькими группами, такими как одна, две или три группы.

Арильная группа может быть необязательно замещена одной или несколькими группами, выбранными из -OH, -OR<sup>S1</sup>, -SH и -SR<sup>S1</sup>, такими как -SR<sup>S1</sup> и -OR<sup>S1</sup>, такими как -OR<sup>S1</sup>.

Каждый -R<sup>S1</sup> и каждый -R<sup>S2</sup> предпочтительно выбирают из алкила, алкенила, алкинила, каждый из которых необязательно замещен галогеном, таким как фтор.

Алкильная, алкенильная или алкинильная группа может быть линейной или разветвленной.

Когда -R<sup>S1</sup> или -R<sup>S2</sup> представляет собой алкил, это может быть C<sub>1-6</sub> алкил, такой как C<sub>1-4</sub> алкил, такой как метил или этил, такой как метил.

Когда -R<sup>S1</sup> или -R<sup>S2</sup> представляет собой алкенил, это может быть C<sub>2-6</sub> алкенил, такой как C<sub>2-4</sub> алкил, такой как винил или аллил.

Когда -R<sup>S1</sup> или -R<sup>S2</sup> представляет собой алкинил, это может быть C<sub>2-6</sub> алкинил, такой как C<sub>2-4</sub> алкинил, такой как пропаргил.

Когда -R<sup>S1</sup> или -R<sup>S2</sup> представляет собой арил, это может быть карбоарил, такой как C<sub>6-10</sub> арил, такой как фенил, или гетероарил, такой как C<sub>5-14</sub> гетероарильная группа, такая как C<sub>5-10</sub> гетероарильная группа, такая как C<sub>5-6</sub> гетероарильная группа, такая как C<sub>6</sub> гетероарильная группа, такая как пиридинил.

Когда -R<sup>S1</sup> или -R<sup>S2</sup> представляет собой аралкил, это может быть арильная группа, такая как описано выше, связанная через C<sub>1-6</sub> алкенильную группу, такую как C<sub>1-2</sub> алкиленовая группа, такая как метилен. Наиболее предпочтительной аралкильной группой является бензил.

Когда -R<sup>S1</sup> и -R<sup>S2</sup> вместе образуют гетероциклическое кольцо, это может быть C<sub>5-7</sub> гетероциклическое кольцо, и гетероциклическое кольцо может необязательно содержать дополнительный гетероатом кольца, выбранный из O, S и N(H).

Когда -Ar представляет собой шестичленную арильную группу, она может быть замещена в одном или нескольких из 3-, 4- и 5-положениях. Здесь 2- и 6-положения могут быть незамещенными. В одном варианте осуществления два или каждое из 3-, 4- и 5-положений является замещенным. Здесь точка присоединения арильного радикала принимается за 1-положение.

Группа -Ar может представлять собой триалкоксифенил, такой как 3,4,5-триалкоксифенил.

Группа -Ar может представлять собой триметоксифенил, такой как 3,4,5-триметоксифенил.

Группа -D- предпочтительно выбрана из -C(O)- и -C(S)-, и предпочтительно представляет собой -C(O)-. Здесь группа -D- образует имид или тиимид вместе с азотом, к которому она присоединена, и -C(Q<sup>1</sup>)-.

Группы -R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup> вместе с -N-D-, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. Гетероциклическое кольцо может быть одним кольцом или может быть конденсированной кольцевой системой, имеющей по меньшей мере одно гетероциклическое кольцо, конденсированное с дополнительным кольцом. Дополнительное кольцо может представлять собой другое гетероциклическое кольцо, циклоалкильное кольцо или арильное кольцо.

Предпочтительно гетероциклическое кольцо представляет собой одиночное кольцо, и оно не конденсировано с другим кольцом.

Гетероциклическое кольцо может представлять собой 4-9-членное кольцо, такое как 4-6-членное кольцо, такое как 5- или 6-членное кольцо, такое как 6-членное кольцо.

Гетероцикл может содержать дополнительный кольцевой гетероатом, который может быть выбран из O, S и N(H). Если присутствует дополнительный гетероатом, он отделен от атома азота в -N-D- по меньшей мере одним атомом углеродного кольца. Как правило, дополнительные гетероатомы не присутствуют, а остальные кольцевые атомы являются углеродными атомами кольца.

Гетероциклическое кольцо может быть насыщенным или частично или полностью ненасыщенным. Гетероциклическое кольцо может быть ароматическим кольцом, но это не является предпочтительным.

Предпочтительно гетероциклическое кольцо является частично ненасыщенным. Например, гетероциклическое кольцо может содержать одну двойную связь, которая представляет собой углерод-углеродную двойную связь. Во избежание сомнений двойная связь является эндо к гетероциклу (то есть внутри кольца). Когда группа -D- представляет собой -C(O)- или -C(S)- предпочтительно, чтобы двойная связь была сопряжена с группой -D-.

Гетероциклическое кольцо представляет собой лактам, когда -D- представляет собой -C(O)- или -C(S)-. Это предпочтительнее.

Лактам может быть частично или полностью ненасыщенным. Лактам может быть  $\alpha,\beta$ -ненасыщенным и может быть дополнительно  $\gamma,\delta$ -ненасыщенным, когда присутствует

вторая двойная связь.

Предпочтительно  $-R^1$  и  $-R^2$  вместе с  $-N-D-$ , к которому они присоединены, образуют  $\alpha,\beta$ -ненасыщенный  $\delta$ -лактам (5,6-дигидропиридин-2-он-1-ил).

Альтернативно,  $-R^1$  и  $-R^2$  вместе с  $-N-D-$ , к которому они присоединены, образуют  $\alpha,\beta$ -ненасыщенный  $\delta$ -лактам.

Гетероциклическое кольцо, образованное  $R^1$  и  $-R^2$  вместе с  $-N-D-$ , может быть необязательно замещенным, таким как необязательно замещенный алкилом или галогеном, таким как алкил. Предпочтительно гетероциклическое кольцо не является дополнительно замещенным.

Альтернативно, каждый из  $-R^1$  и  $-R^2$  независимо выбран из водорода, алкила, алкенила, алкинила и необязательно замещенного циклоалкила, гетероалкила, гетероциклила и арила. Предпочтительно один из  $-R^1$  и  $-R^2$  не является водородом. Например,  $-R^2$  может быть водородом, в то время как  $-R^1$  не является водородом.

Оба  $-R^1$  и  $-R^2$  не могут быть водородом.

Циклоалкильная, гетероалкильная, гетероциклильная и арильная группы могут быть необязательно замещены алкилом, таким как  $C_{1-6}$  алкил, таким как метил.

Группа  $-R^1$  может быть алкилом или алкенилом, например, когда  $-R^2$  является водородом.

Когда  $-R^1$  или  $-R^2$  представляет собой алкильную группу, это может быть неразветвленная или разветвленная алкильная группа, такая как  $C_{1-10}$  алкильная группа, такая как  $C_{1-6}$ , такая как  $C_{1-4}$  алкильная группа, такая как  $C_{1-2}$  алкил. Примеры включают метил, этил и пропил.

Когда  $-R^1$  или  $-R^2$  представляет собой алкенильную группу, это может быть неразветвленная или разветвленная алкенильная группа, имеющая одну или несколько, предпочтительно одну углерод-углеродную двойную связь, такую как  $C_{2-10}$  алкенильная группа, такая как  $C_{2-6}$  алкенильная группа, такая как  $C_{2-4}$  алкенильная группа. Примеры включают винил и аллил.

Когда  $R^1$  или  $-R^2$  представляет собой алкинильную группу, это может быть неразветвленная или разветвленная алкинильная группа, имеющая одну или несколько, предпочтительно одну углерод-углеродную тройную связь, такая как  $C_{2-10}$  алкинильная группа, такая как  $C_{2-6}$  алкинильная группа, такой как  $C_{2-4}$  алкинильная группа. Примером является пропаргил.

Ссылка на циклоалкильную группу, это может быть циклическая алкильная группа, такая как  $C_{3-7}$  циклоалкильная группа, такая как  $C_{5-6}$  циклоалкильная группа. Циклоалкильная группа может быть насыщенной или частично или полностью насыщенной, но она не является ароматической. Примером является циклогексил.

Когда  $-R^1$  или  $-R^2$  представляет собой гетероалкильную группу, это может быть алкильная группа, где один или два атома углерода замещены гетероатомом, выбранным из O, S и N(H). Гетероалкильная группа может быть линейной или разветвленной и может представлять собой  $C_{2-10}$  гетероалкильную группу, такую как  $C_{2-6}$  гетероалкильная группа,

такую как C<sub>2-4</sub> гетероалкильная группа. Гетероалкильная группа может быть связана через атом углерода или атом азота, если он присутствует. Примером является метоксиметил.

Когда -R<sup>1</sup> или -R<sup>2</sup> представляет собой гетероциклическую группу, это может быть циклическая гетероциклическая группа, имеющая один или два гетероатома, каждый из которых независимо выбран из O, S и N(H). Гетероциклическая группа может быть C<sub>3-10</sub> гетероциклической группой, такой как C<sub>5-7</sub> гетероциклическая группа, такой как C<sub>5-6</sub> гетероциклическая группа. Гетероциклическая группа может быть насыщенной или частично или полностью насыщенной, но она не является ароматической. Гетероциклическая группа может быть связана через углеродный атом кольца или атом азота кольца, если он присутствует. Гетероциклическая группа может представлять собой пирролидинил, морфолинил и пиперидинил.

Когда -R<sup>1</sup> или -R<sup>2</sup> представляет собой арильную группу, это может быть ароматическая группа, которая может представлять собой карбоарил или гетероарил. Карбоарильная группа может быть фенилом или нафтилом. Гетероарильная группа может быть C<sub>5-10</sub> гетероарилом, таким как C<sub>5-6</sub> гетероарил. Примеры включают пиридинил, имидазоил и тиазоил.

Соединение может быть представлено в виде сольвата, такого как гидрат.

Соединение может быть предоставлено в форме соли, где это уместно, например, когда карбокси (-COOH) или amino (например, -NH- или -NH<sub>2</sub>) функциональная группа присутствует в соединении.

Соединение может быть предоставлено как защищенное от, где это необходимо. Например, если присутствует аминорфункциональная группа (такая как -NH- или -NH<sub>2</sub>), она может быть защищена карбаматной группой, такой как группа Boc, и, если присутствует гидроксильная функциональная группа (-OH), она может быть защищена силильной группой, такой как TBDMS. Использование защитных групп хорошо известно в данной области техники, и специалист в данной области может оценить, что другие функциональные группы могут быть защищены, где требуется, и другие защитные группы могут быть использованы, если требуется.

Таутомеры соединений формулы 1 также входят в объем изобретения.

Пролекарственные формы соединения формулы 1 также входят в объем изобретения. Например, если соединение имеет карбокси (-COOH) или гидроксильную (-OH) функциональную группу, эти группы могут быть представлены в форме сложного эфира, где такие сложные эфиры являются лабильными в физиологических условиях.

Соединение пиперлонгумина может представлять собой пиперлонгумин или аналог, производное или пролекарство пиперлонгумина. Пиперлонгумин (CAS 20069-09-04) может быть получен от коммерческих поставщиков, синтезирован с использованием стандартных методик или выделен из растения *Piper longum* в соответствии со стандартными методами. Например, Seo et al. (Bioorg. Med. Chem. Lett. 2014, 24, 5727) описывают получение производных пиперлонгумина.

В соединении формулы 1 пиперлонгумин представляет собой соединение, где Q<sup>1</sup>

представляет собой O, -Ar представляет собой 3,4,5-триметоксифенил, и -R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup>, вместе с -ND-, к которому они присоединены, образуют  $\alpha,\beta$ -ненасыщенный  $\delta$ -лактам (5,6-дигидропиридин-2-он-1-ил).

Пациент, подходящий для лечения, как описано в настоящем документе, может иметь рак, который характеризуется экспрессией TRPV2. Рак, подходящий для лечения, как описано в настоящем документе, может представлять собой любой тип солидной или не-солидной опухоли или злокачественной лимфомы и особенно лейкоза, саркомы, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака яичника, рака простаты, рака легкого, колоректального рака, рака шейки матки, рака печени, рака головы и шеи, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака почки, рака желудка и рака головного мозга. Рак может быть семейным или спорадическим. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления рак может представлять собой рак кожи, рак молочной железы, рак простаты, рак мозга, такой как глиома или глиобластома, или рак крови.

В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления рак может представлять собой рак головного мозга, такой как глиома, например, глиома II степени (диффузная астроглиома или астроцитомы), глиома III степени (анапластическая астроглиома или астроцитомы) или глиома IV степени (глиобластома), например, мультиформная глиобластома (GBM). Глиома может быть глиомой низкой или высокой степени.

Глиобластома может быть первичной или рецидивирующей глиобластомой.

Рак может быть метастатическим раком.

Рак, характеризующийся экспрессией TRPV2, может содержать одну или несколько раковых клеток у пациента, которые имеют повышенную экспрессию TRPV2 относительно контрольных клеток. Например, экспрессия TRPV2 в одной или нескольких раковых клетках у пациента может быть больше, чем экспрессия в контрольной клетке, или больше чем предварительно определенное пороговое значение.

Рак, характеризующийся экспрессией TRPV2, может быть идентифицирован любым подходящим способом. Например, может быть определена экспрессия TRPV2 в одной или нескольких раковых клетках пациента. Подходящие методы для определения экспрессии генов-мишеней в клетке хорошо известны в данной области и включают методы на основе ПЦР, такие как ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), количественная ОТ-ПЦР (qPCR), TaqMan™ или анализ TaqMan™ с низкой плотностью (TLDA), микрочипы, тестирование профиля нескольких аналитов, радиоиммуноанализ (РИА), анализ Нозерн-блоттинг, вестерн-блоттинг, иммунофлуоресцентный анализ, иммуноферментный анализ, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), анализ иммунопреципитации, хемилюминесцентный анализ, иммуногистохимическое исследование, дот-блот-анализ, или слот-блоттинг, или методы, основанные на протеомике. В некоторых вариантах осуществления рак, характеризующийся экспрессией TRPV2, может быть идентифицирован иммуногистохимией.

Пациент может быть предварительно идентифицирован как имеющий рак, характеризующийся экспрессией TRPV2, или подверженный риску наличия или риску развития рака, характеризующегося экспрессией TRPV2.

Способ может включать идентификацию пациента как имеющего или подверженного риску рака, характеризующегося экспрессией TRPV2 перед введением.

Индивидуум, подходящий для лечения, как описано выше, может быть млекопитающим, таким как грызун (например, морская свинка, хомяк, крыса, мышь), представитель подсемейства мышиных (например, мышь), представитель семейства псовых (например, собака), представитель семейства кошачьих (например, кошка), представитель семейства лошадиных (например, лошадь), примат, представитель обезьянообразных (например, мартышка или обезьяна), мартышка (например, сагуин, бабуин), обезьяна (например, горилла, шимпанзе, орангутанг, гиббон) или человек.

В некоторых предпочтительных вариантах индивидуумом является человек. В других предпочтительных вариантах осуществления могут использоваться млекопитающие, не являющиеся человеком, особенно млекопитающие, которые обычно используются в качестве моделей для демонстрации терапевтической эффективности у людей (например, мыши, приматы, свиньи, собаки или лепориды).

В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь минимальное остаточное заболевание (MRD) после начального лечения рака.

Индивидуум, имеющий рак, характеризующийся экспрессией TRPV2, может демонстрировать по меньшей мере один идентифицируемый признак, симптом или данные лабораторного исследования, достаточные для постановки диагноза рака, характеризующегося экспрессией TRPV2, в соответствии с клиническими стандартами, известными в данной области техники. Примеры таких клинических стандартов можно найти в учебниках по медицине, таких как *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th Ed., Fauci AS et al., eds., McGraw-Hill, New York, 2001. В некоторых случаях диагностика рака у индивидуума может включать идентификацию конкретного типа клеток (например, раковой клетки) в образце жидкости или ткани организма, полученной от индивидуума. В некоторых вариантах у индивидуума может быть ранее идентифицирован или диагностирован рак, характеризующийся экспрессией TRPV2, или способ изобретения может включать идентификацию или диагностику рака, характеризующегося экспрессией TRPV2 у индивидуума, например, путем определения наличия идентифицируемого признака, симптома или данных лабораторного исследования, свидетельствующих о раке, характеризующемся экспрессией TRPV2, у индивидуума.

Несмотря на то, что соединение пиперлонгумина, такое как пиперлонгумин, возможно вводить индивидуально одному человеку, предпочтительно представлять соединение в фармацевтической композиции или составе

Хотя пиперлонгуминовое соединение, такое как пиперлонгумин, может быть введено индивидууму отдельно, предпочтительно это соединение может иметь форму фармацевтической композиции или лекарственную форму.

Фармацевтическая композиция может содержать, в дополнение к соединению пиперлонгумина, один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, адъювантов, эксципиентов, разбавителей, наполнителей, буферов, стабилизаторов, консервантов, смазывающих веществ или других веществ, хорошо известных специалистам в данной области. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны мешать эффективности активного соединения. Определенная природа носителя или другого вещества будет зависеть от пути введения, который может быть болюсом, инфузией, инъекцией или любым другим подходящим путем, как описано ниже. Подходящие материалы должны быть стерильными и апирогенными, с подходящей изотоничностью и стабильностью. Примеры включают стерильный физиологический раствор (например, 0,9% NaCl), воду, декстрозу, глицерин, этанол или тому подобное, или их комбинации. Композиция может дополнительно содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты или тому подобное.

Подходящие носители, эксципиенты и т.п. могут быть найдены в стандартных фармацевтических источниках, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

Термин «фармацевтически приемлемый», используемый в настоящем документе, относится к соединениям, веществам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках здравого медицинского суждения пригодны для использования в контакте с тканями субъекта (например, человека) без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соизмеримых с разумным соотношением пользы/риска. Каждый носитель, эксципиент и т.п. также должны быть «приемлемыми» в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции.

Композиции могут быть удобно представлены в стандартной лекарственной форме и могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармации. Такие способы включают стадию объединения активного соединения с носителем, который составляет один или несколько вспомогательных ингредиентов. Как правило, композиции получают путем равномерного и тщательного объединения активного соединения с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или обоими, а затем, при необходимости, придания формы продукту.

Лекарственные формы могут быть в форме жидкостей, растворов, суспензий, эмульсий, эликсиров, сиропов, таблеток, пастилок, гранул, порошков, капсул, облаток, пилюль, ампул, суппозиториев, пессариев, мазей, гелей, паст, кремов, спреев, туманов, пены, лосьонов, масел, болюсов, электуариев или аэрозолей.

Соединение пиперлонгумина или фармацевтические композиции, содержащие соединение пиперлонгумина, можно вводить субъекту любым удобным путем введения, системно/периферически или в место желаемого действия, в том числе включая, но без ограничения, перорально (например, путем проглатывания); и парентерально, например,

путем инъекции, включая подкожную, интрадермальную, внутримышечную, внутривенную, внутриартериальную, интракардиальную, интратекальную, интраспинальную, интракапсулярную, субкапсулярную, интраорбитальную, внутрибрюшинную, интратрахеальную, субкутикулярную, внутрисуставную, субарахноидальную и интрастернальную; путем имплантирования депо, например, подкожно или внутримышечно. Обычно введение осуществляется пероральным путем, хотя другие пути, такие как внутрибрюшинный, подкожный, трансдермальный, внутривенный, назальный, внутримышечный или другие удобные пути, не исключаются.

Фармацевтические композиции, содержащие соединения пиперлонгумина, могут быть составлены в виде дозированной лекарственной формы, которая подходит для предполагаемого пути введения.

Лекарственные формы, пригодные для перорального введения (например, путем проглатывания), могут быть представлены в форме отдельных единиц, таких как капсулы, саше или таблетки, каждая из которых содержит предварительно определенную дозу активного соединения; в форме порошка или гранул, в форме раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или в форме жидкой эмульсии масло-в-воде или жидкой эмульсии вода-в-масле; в форме болус; в форме электуария; или в форме пасты.

Таблетка может быть получена традиционными способами, например, прессованием или формовкой, необязательно, с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены путем прессования в соответствующем устройстве активного соединения в сыпучей форме, в частности, порошка или гранул, необязательно, смешанных с одним или более связующими (например, повидон, желатин, гуммиарабик, сорбит, трагакант, гидроксипропилметилцеллюлоза); наполнителями или разбавителями (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза, гидрофосфат кальция); лубрикантами (например, стеарат магния, тальк, кремнезем); разрыхлителями (например, натриевой солью гликолята крахмала, сшитым повидоном, сшитой натриевой карбоксиметилцеллюлозой); поверхностно-активными или диспергирующими или смачивающими агентами (например, лаурилсульфат натрия); и консервантами (например, метил-р-гидроксибензоат, пропил-р-гидроксибензоат, аскорбиновая кислота). Формованные таблетки могут быть получены путем формования в соответствующем устройстве смеси порошкообразного соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем. Таблетки могут иметь покрытие или линию разлома и могут быть приготовлены таким образом, чтобы обеспечивать медленное или контролируемое высвобождение активного соединения за счет использования, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях для получения желаемого профиля высвобождения. На таблетки можно необязательно нанести энтеросолюбильное покрытие для обеспечения высвобождения в других отделах кишечника, кроме желудка.

Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения (например, путем инъекции, включая кожные, подкожные, внутримышечные, внутривенные и

интрадермальные), включают водные и неводные изотонические, апирогенные, стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, консерванты, стабилизаторы, бактериостаты и растворенные вещества, которые делают композицию изотонической с кровью предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загущающие агенты, и липосомы или другие системы микрочастиц, которые предназначены для нацеливания соединения на компоненты крови или один или несколько органов. Примеры подходящих изотонических носителей для использования в таких лекарственных формах включают физиологический раствор для инъекций, раствор Рингера или лактатный раствор Рингера для инъекций. Обычно концентрация активного соединения в растворе составляет от примерно 1 нг/мл до примерно 10 мкг/мл, например, от примерно 10 нг/мл до примерно 1 мкг/мл. Композиции могут быть представлены в герметичных контейнерах с однократными или многократными дозами, например, в ампулах и флаконах, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекции, непосредственно перед использованием. Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток. Лекарственные формы могут быть в форме липосом или других систем микрочастиц, которые предназначены для нацеливания активного соединения на компоненты крови или один или несколько органов.

В некоторых вариантах осуществления соединение пиперлонгумина, описанное в настоящем документе, может быть инкапсулировано, например, в циклический олигосахарид, такой как циклодекстрин. Инкапсулированное соединение пиперлонгумина может содержаться в гидрогеле, например, для использования в качестве послеоперационного имплантата.

Необязательно, другие фармацевтические или профилактические средства могут быть включены в фармацевтическую композицию или лекарственную форму.

Соединения пиперлонгумина, описанные в настоящем документе, полезны при лечении рака, например, рака, характеризующегося экспрессией TRPV2.

Лечение может быть любым лечением или терапией, человека или животного (например, в ветеринарных применениях), при котором достигается некоторый желаемый терапевтический эффект, например, ингибирование или задержка наступления или прогрессирования состояния, и включает снижение скорости прогрессирования, остановку скорости прогрессирования, ингибирование метастазирования, улучшение состояния, излечение или ремиссия (частичная или полная) состояния, предотвращение, задержка, ослабление или остановка одного или нескольких симптомов и/или признаков состояния или продление выживаемости субъекта или индивидуума сверх ожидаемого в отсутствие лечения.

Рост рака обычно относится к любому из ряда показателей, которые указывают на изменение рака на более развитую форму. Таким образом, показатели для измерения

ингибирования роста рака включают уменьшение выживаемости раковых клеток, уменьшение объема опухоли или морфологии (например, как определено с использованием компьютерной томографии (КТ), сонографии или другого метода визуализации), задержку роста опухоли, разрушение сосудистой сети опухоли, улучшение показателей в замедленной гиперчувствительности кожной пробы, повышение активности цитолитических Т-лимфоцитов и снижение уровней опухолеспецифических антигенов. Ингибирование TRPV2 у индивидуума с раком, как описано здесь, может улучшить способность индивидуума противостоять росту рака, в частности, росту рака, уже присутствующего у субъекта, и/или уменьшить предрасположенность к росту рака у индивидуума.

Лечение, как описано в настоящем документе, может включать профилактическое лечение (т.е. профилактику), т.е. индивидуум, который получает лечение, может не иметь или не быть диагностирован как имеющий рак, характеризующийся TRPV2 экспрессией во время лечения. Например, индивидуум, восприимчивый к или подверженный риску возникновения или повторного возникновения рака, характеризующегося экспрессией TRPV2, может получать лечение, как описано в настоящем документе. Такое лечение может предотвратить или отсрочить возникновение или повторное возникновение рака, характеризующегося экспрессией TRPV2 у индивидуума, или уменьшить его симптомы или тяжесть после возникновения или повторного возникновения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может быть ранее идентифицирован как имеющий повышенную восприимчивость или риск развития рака, характеризующегося экспрессией TRPV2, по сравнению с общей популяцией, или способ может включать идентификацию индивидуума, который имеет повышенную восприимчивость или риск развития рака, характеризующийся экспрессией TRPV2. В некоторых вариантах осуществления предпочтительным может быть профилактическое или превентивное лечение.

Соединения пиперлонгумина можно вводить, как описано в настоящем документе, в терапевтически эффективных количествах.

Термин «терапевтически эффективное количество», как используется в настоящем документе, относится к такому количеству активного соединения или комбинации, вещества, композиции или лекарственной формы, содержащей активное соединение, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического эффекта, соразмерного с разумным соотношением польза/риск.

Подходящая дозировка соединений пиперлонгумина может варьироваться от индивидуума к индивидууму. Определение оптимальной дозировки, как правило, будет включать баланс уровня терапевтической пользы с любым риском или вредными побочными эффектами введения. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая, но не ограничиваясь этим, путь введения, время введения, скорость выведения активного соединения, других лекарственных средств, соединений и/или веществ, используемых в комбинации, и возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни индивидуума. Количество

активных соединений и способ их введения в конечном итоге будут оставлены на усмотрение врача, хотя обычно дозировка должна достигать терапевтических концентраций активного соединения в плазме, не вызывая существенных опасных или вредных побочных эффектов.

Обычно подходящая доза активного соединения находится в диапазоне от около 100 мкг до около 400 мг на килограмм массы тела субъекта в день, предпочтительно от 200 мкг до около 200 мг на килограмм массы тела субъекта в день. Когда активное соединение представляет собой соль, сложный эфир, пролекарство или тому подобное, вводимое количество рассчитывают на основе исходного соединения, и, таким образом, фактическая используемая масса увеличивается пропорционально. Например, 50-100 мг соединения пиперлонгумина можно вводить перорально два раза в день в форме капсул или таблеток.

Соединение пиперлонгумина можно вводить перорально в количестве, достаточном для поддержания концентрации в сыворотке на уровне, который обеспечивает >50% ингибирование TRVP2.

Введение *in vivo* может быть осуществлено в одной дозе, непрерывно или периодически (например, в разделенных дозах с подходящими интервалами).

Способы определения наиболее эффективных средств и дозировки введения хорошо известны в данной области и будут варьироваться в зависимости от лекарственной формы, используемой для терапии, цели терапии, клетки-мишени, подвергаемой лечению, и субъекта, подвергаемого лечению. Однократное или многократное введение может быть осуществлено с учетом того, что уровень дозы и схема выбираются врачом.

Можно вводить несколько доз соединения пиперлонгумина, например, 2, 3, 4, 5 или более 5 доз. Введение соединения пиперлонгумина может продолжаться в течение продолжительных периодов времени. Например, лечение соединением пиперлонгумина может продолжаться в течение, по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 3 недели, по меньшей мере 1 месяца или по меньшей мере 2 месяцев. Лечение соединением пиперлонгумина может продолжаться до тех пор, пока это необходимо для уменьшения симптомов рака или достижения полной ремиссии.

Соединение пиперлонгумина можно вводить отдельно или в сочетании с другими видами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от конкретных обстоятельств. Например, соединение пиперлонгумина, как описано здесь, можно вводить в комбинации с одним или несколькими дополнительными активными соединениями.

Соединение пиперлонгумина можно вводить в комбинации со вторым терапевтическим средством. Второе терапевтическое средство может представлять собой противораковое соединение, например, противораковое соединение выбрано из антрациклина, цитарабина, винкристина, L-аспарагиназы, циклофосфамида, фибромуна, дакарбазина, метотрексата и 6-меркаптопурина, хлорамбуцила, алкилирующего средства, циклофосфамида, кортикостероидов, иматиниба, кладрибина, пентостатина, ритуксимаба,

хлорамбуцила, таксана и доксорубицина.

Соединение пиперлонгумина можно вводить в сочетании с лучевой терапией. Применение лучевой терапии для лечения раковых состояний хорошо известно в данной области.

Экспрессия TRPV2 также может быть полезна для выявления раковых заболеваний, которые могут быть реагирующими («чувствительными») или невосприимчивыми («резистентными») к лечению соединением пиперлонгумина и для отбора пациентов, подходящих для лечения соединением пиперлонгумина. Способ выбора больного раком для лечения соединением пиперлонгумина, включающий предоставление образца раковых клеток от больного раком, и определение наличия или количества экспрессии TRPV2 в раковых клетках.

Больные раком с раковыми клетками, экспрессирующими TRPV2; экспрессирующими TRPV2 на уровне выше порогового значения или на более высоких уровнях, чем контрольная клетка, может быть выбран для лечения соединением пиперлонгумина. Методы, подходящие для определения наличия или количества экспрессии TRPV2 в клетках, хорошо известны в данной области.

У пациента может быть рак, как описано выше, например, рак головного мозга, такой как глиобластома.

Авторы настоящего изобретения также выявили корреляцию между экспрессией TRPV2 и плохим прогнозом у пациентов со злокачественным новообразованием (например, коэффициент выживаемости менее 50% в течение 3 лет), в частности, у пациентов с раком головного мозга, таким как глиобластома.

В другом аспекте изобретения предоставлен способ прогнозирования рака у пациента, включающий предоставление образца раковых клеток от больного раком, и, определение уровня экспрессии TRPV2 в раковых клетках, причем уровень экспрессии TRPV2 указывает на прогноз пациента.

У пациента может быть рак, как описано выше, например, рак мозга, такой как глиобластома.

Количество экспрессии TRPV2 в раковых клетках может быть определено с использованием любой подходящей методики.

Другие аспекты и варианты осуществления изобретения предоставляют аспекты и варианты осуществления, описанные выше, с термином «содержащий», замененный термином «состоящий из», а аспекты и варианты осуществления, описанные выше, с термином «содержащий», замененный термином «состоящий по существу из».

Следует понимать, что описание раскрывает все комбинации любого из вышеперечисленных аспектов и вариантов осуществления, описанных выше, друг с другом, если только контекст не требует иного. Аналогично, в описании раскрываются все комбинации предпочтительных и/или необязательных признаков либо по отдельности, либо вместе с любым из других аспектов, если контекст не требует иного.

Модификации вышеупомянутых вариантов осуществления, дополнительные варианты осуществления и их модификации будут очевидны для специалиста при прочтении настоящего изобретения, и, как таковые, они входят в объем настоящего изобретения.

Все документы и записи в базе данных последовательностей, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей.

«И/или» в том случае, когда он используется в настоящем документе, должен рассматриваться как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с или без другого. Например, «А и/или В» следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждый из них был изложен в настоящем описании отдельно.

Некоторые аспекты и варианты осуществления изобретения теперь будут проиллюстрированы в качестве примера и со ссылкой на фигуры, описанные выше.

#### Эксперименты

##### Способы

##### *Целевой прогноз*

Целевые прогнозы с помощью SPiDER выполняли на общедоступном веб-сервере ([www.modlab-cadd.ethz.ch/software/spider](http://www.modlab-cadd.ethz.ch/software/spider)), как сообщалось ранее.<sup>2,11,14,20</sup> Кратко, пиперлонгумин проецировали на самоорганизующиеся карты вместе с эталонными соединениями из базы данных COBRA.<sup>31</sup> Химические структуры обрабатываются с помощью функции «промывки» молекулярной рабочей среды (MOE, Chemical Computing Group, Montreal, Canada), а затем описывали дескрипторами CATS2<sup>32</sup> и MOE2D. Прогноз осуществляли путем расчета евклидовых расстояний молекул до эталонных соединений в COBRA. Выходные данные включают целевые множества с уровнем значимости  $p < 0,05$ . Расстояния преобразуются в значения  $p$  в соответствии с предварительно рассчитанным фоновым распределением расстояний между молекулами, аннотированными для связывания различных целей. Среднее арифметическое этих значений  $p$  служит доверительной оценкой для целевого прогноза. С фоновым распределением доверительных оценок каждое предсказание может быть связано с другим значением  $p$ , которое указывает на статистическую значимость прогноза.<sup>14</sup>

Стохастическое вложение соседей с  $t$ -распределением ( $t$ -SNE).

Лиганды, аннотированные по человеческим каналам транзиторного рецепторного потенциала (TRP), собирали из ChEMBL23<sup>33</sup> и фильтровали, как описано ранее. Дескрипторы CATS2<sup>32</sup> и ECFP4-подобные отпечатки Моргана (радиус 2, 2048 бит) были рассчитаны для всех лигандов TRP и пиперлонгумина с использованием MOE2018 (Chemical Computing Group, Canada) и RDKit, соответственно. Основные компоненты анализа были выполнены для дескрипторов CATS2 и расширенные отпечатки, индивидуально. Основные компоненты, описывающие по меньшей мере 80% дисперсии данных, были сохранены для обучения на базе многообразий. Для  $t$ -SNE главные

компоненты были масштабированы до вероятностного анализа (1000 итераций и скорость обучения 600-1000). Анализ проводили в Python 2.7.13 с использованием библиотек NumPy 1.13.3, Pandas 0.21.0 и Scikit-learn 0.18.1. Графики были рассчитаны с использованием Matplotlib 1.5.3.

#### Анализы на основе флуоресценции клеток

Анализы проводили в SB Discovery (Glasgow, UK) на коммерческой основе. Клетки человеческого TRP трипсинизировали, подсчитывали и высевали в черные 96-луночные планшеты с прозрачным дном при плотности 50000 клеток на лунку в объеме 100 мкл и инкубировали в течение ночи. На следующий день клетки загружали кальциевым красителем 5 или красителем мембранного потенциала. TRPV1-5, TRPA1, TRPM2, TRPM3 и TRPM8 тестировали с использованием кальциевого красителя 5. TRPC1, TRPC3-7 и TRPM4-5 тестировали с использованием красителя мембранного потенциала. Оба раствора красителей были приготовлены в сбалансированном солевом растворе Хенкса (HBSS) с буфером HEPES. Раствор красителя (90 мкл) добавляли в лунки и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Тестируемые соединения и стандартные ингибиторы (10 мкл) затем добавляли в лунки и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем планшеты помещали на flexstation и контролировали флуоресценцию каждые 1,52 секунды. Через 20 секунд добавляли агонист и флуоресценцию контролировали в течение 2 минут при 485 нм/525 нм и 530 нм/565 нм, Ex/Em, для кальциевого красителя 5 и красителя мембранного потенциала, соответственно. Контроли - TRPV1: капсазепин; TRPV2: траниласт; TRPV3: рутениевый красный; TRPV4: рутениевый красный; TRPV5: Gd<sup>3+</sup>; TRPA1, рутениевый красный; TRPC1: Gd<sup>3+</sup>; TRPC3: Pyz3; TRPC4: ML 204; TRPC5: ML 204; TRPC6: ML 204; TRPC7: SKF 96365; TRPM2: 2-APB; TRPM3: MeF кислота; TRPM4: клотримазол; TRPM5: TPPO; TRPM8: 2-APB. Контрольные данные были во всех случаях за период регистрации.

#### Пэтч-кламп анализы

Анализы проводились в SB Discovery (Glasgow, UK) на коммерческой основе. Кривые концентрация-ответ и анализы отмывания проводили с использованием метода пэтч-кламп. Клетки НЕК-293 выращивали и готовили в соответствии с адаптированной процедурой для стабильных клеточных линий hTRPV2 в SB Discovery. Клетки подвергали сывороточному голоданию в течение приблизительно 24 часов и затем заменяли средой, содержащей сыворотку, перед электрофизиологическим тестированием. Ручной пэтч-кламп анализ проводили при комнатной температуре с использованием стандартной электрофизиологической установки. Клетки использовали в течение 2-3 часов после добавления сыворотки, содержащей среду, к клеткам. Стандартный внеклеточный раствор содержал 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES и 10 mM глюкозы. Значение pH доводили до 7,4 с помощью NaOH, и осмолярность измеряли как 311 мОсм/л. Стандартный внутриклеточный раствор содержал 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 60 mM KF, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM EGTA и 10 mM HEPES. Значение pH доводили до 7,2 с помощью KOH, и осмолярность измеряли как 286 мОсм/л. Для контроля токов при

добавлении контрольного (внеклеточного раствора) и растворов соединения использовали стандартный протокол линейного изменения. Протокол напряжения состоял из серий линейного изменения напряжения от -100 мВ до +100 мВ каждые 5 секунд при исходном потенциале -60 мВ. Максимальные значения исходящего тока во время записи при +100 мВ были использованы для анализа. Эксперименты с ручным пэтч-клампом проводили с использованием усилителя Axon 200B и системы сбора данных Digidata 1440A от Axon Instruments (Molecular Devices, USA). Для стимуляции и записи электрической активности использовали программное обеспечение pClamp (версия 10) от Axon Instruments. Емкостные переходные процессы были скомпенсированы электронным способом из записей, однако падение напряжения на последовательном сопротивлении и потенциал жидкостного перехода не были скомпенсированы. Добавочное сопротивление, как правило, составляло менее 10 МОм, а средняя емкость элемента составляла приблизительно 25 пФ. Программное обеспечение GraphPad Prism (версия 5) использовали для анализа и построения всех графиков. Агонист (каннабидиол; Abcam #ab120448) получали в виде 100 мМ исходного раствора в 100% DMSO и разбавляли до 4 мкМ или 10 мкМ в физиологическом растворе перед тестированием. Пиперлонгумин получали в виде 100 мМ исходного раствора в 100% DMSO и разбавляли до указанных концентраций в физиологическом растворе (100, 50, 10, 1 и 0,1 мкМ), также содержащем 4 мкМ или 10 мкМ каннабидиола. Рутениевый красный (Sigma, #R2751) готовили ежедневно в виде 10 мМ исходной ионной дистиллированной воды и разбавляли до 100 мкМ в физиологическом растворе.

#### Внутриклеточная кальциевая визуализация

Клетки (ATCC) выращивали до 50% конfluence в DMEM (Gibco), дополненной 10% FBS (Gibco), GlutaMax (Gibco), MEM и NEAA (Gibco), 4,5 г/л глюкозы и 0,11 г/л пирувата натрия. Клетки высевали в 8-луночные планшеты  $\mu$ -ibidi и трансфицировали TRPV2-RFP<sup>34</sup> (любезно предоставлен Prof. Itaru Kojima, Gunma University, Japan). После 48 ч инкубации клетки подвергали кальциевой визуализации. Измерения внутриклеточного кальция осуществляли с помощью Fura-2 AM (Life Technologies) и модифицировали из ранее описанных исследований.<sup>12</sup> Кратко, за 1 час до измерения клетки нагружали 5 мкМ Fura-2-AM в течение 45 минут. Клеточную среду заменяли раствором Тироды (119 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 6 г/л глюкозы, 25 мМ HEPES, pH 7,4). Одновременно с этим к клеткам добавляли соответствующую обработку (конечная концентрация 1% DMSO (контроль), 5 мкМ пиперлонгумина и 10 мкМ траниласта) и клеткам давали восстанавливаться в течение 15 минут. Эмиссии Fura-2 AM при возбуждении 340 нм и 380 нм регистрировали в течение 1 минуты перед тем, как TRPV2 активировали добавлением 4 мкМ или 20 мкМ каннабидиола (CBD). Анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения MetaFluor Analyst. Статистический анализ осуществляли с помощью [astatsa.com](http://astatsa.com). После получения кальциевой визуализации клетки немедленно фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 мин. Клетки трижды промывали PBS и встраивали

во Fluoromount G. Получали изображение образцов с помощью микроскопа LSM Zeiss 880.

#### *Иммуноблоттинг*

Клетки HEK293 трансфицировали TRPV2-RFP и котрансфицировали либо миРНК отрицательного контроля (5 нМ), либо миРНК TRPV2 (5 нМ) и инкубировали в течение 48 ч. Клетки промывали PBS и лизировали в буфере для лизиса (20 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 1 mM EDTA, 0,5% дезоксихолата натрия и смесь ингибиторов протеаз (Roche)), пропускали 10 раз через шприц с иглой 25g, инкубировали на льду в течение 30 мин и центрифугировали при 18000g и 4°C в течение 20 мин. Супернатант осаждали 3 объемами ацетона при -20°C в течение ночи. Осажденный осадок белка ресуспендировали в соответствующем объеме буфера для лизиса, объединяли с 5-кратным восстанавливающим буфером для образцов SDS и кипятили в течение 10 мин. Белки разделяли с использованием SDS PAGE с трис-глициновым буфером и переносили на PVDF-мембрану в течение 90 минут при постоянной 350 мА. Мембраны блокировали с помощью 10% сухого молока в трис-буферном солевом растворе с 0,1% Tween20 в течение 1 часа и проводили иммунодетекцию с антителами к TRPV2 (Atlas антитела) и тубулину (Thermofisher).

#### Метод динамического рассеяния света

Метод динамического рассеяния света (Zetasizer Nano S, Malvern, UK) использовали для определения коллоидной агрегации соединений. Размеры частиц измеряли при 25°C. Растворимость в воде измеряли, как описано в другом месте, с последовательными измерениями в течение 60 минут.<sup>35</sup> 100 mM маточный раствор пиперлонгумина получали в DMSO, после разбавления с деионизированной водой для получения раствора аналита 100 мкМ (0,1% DMSO). Коллоидную агрегацию измеряли путем последовательных разведений.

#### NCI-60 скрининг активности пиперлонгумина

Пиперлонгумин подвергали скринингу клеточных линий опухолей человека NCI-60, и его активность измеряли при пяти уровнях концентрации (0,01, 0,1, 1, 10 и 100 мкМ) в 59 клеточных линиях NCI-60 с четырьмя параметрами доза-ответ ( $GI_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $LC_{50}$  и TGI). Нормированная экспрессия гена TRPV2 (усредненные интенсивности зондов в сочетании с пятью микроматричными платформами) в клеточных линиях NCI-60 была загружена из базы данных CellMiner<sup>36,37</sup>. Корреляция Спирмена была использована для проверки взаимозависимости между уровнями экспрессии TRPV2 и значениями  $IC_{50}$  пиперлонгумина против 57 линий раковых клеток.

#### СТРП скрининг активности пиперлонгумина

Были получены данные о робастной многоматричной средней (RMA)-нормализованной экспрессии TRPV2 и чувствительности к пиперлонгумину для 775 линий раковых клеток человека из портала Cancer Therapeutics Response Portal (CTRP) v2<sup>23</sup>. Площадь под кривой доза-ответ (AUC) использовали как показатель чувствительности клеточной линии к пиперлонгумину, измеренный в 16-точечном

диапазоне концентраций. Более низкие значения AUC означают более высокую активность препарата. Корреляция Спирмена была использована для проверки взаимозависимости между уровнями экспрессии TRPV2 и AUC пиперлонгумина.

#### Анализ прогностической ценности TRPV2 в когортах рака человека

Нормализованная экспрессия гена TRPV2 (количественно определенная посредством РНК-секвенирования с помощью Expectation Maximization - RSEM)<sup>38</sup>, и клинические данные для 9785 образцов опухолей, принадлежащих к 30 когортам из Атласа ракового генома (TCGA), были загружены с Firebrowse. Используя медианное экспрессию TRPV2 для разделения пациентов на две подгруппы, прогностическую значимость оценивали с использованием графиков Каплана-Мейера и тестов логарифмического ряда для каждого типа рака через пакет выживаемости R<sup>39</sup>.

#### Сравнение GTEX-TCGA

Сравнение экспрессии гена TRPV2 между опухолями головного мозга из TCGA (образцы 507 глиома низких степеней (LGG) и 153 мультиформная глиобластома (GBM)) и нормальными тканями мозга из проекта Genotype-Tissue Expression (GTEX) (1141 образцов) было выполнено с использованием TPM (транскрипты на миллион) значения, рассчитанные Toil<sup>40</sup>.

#### Анализ TCGA чистоты опухоли

Корреляционный анализ между экспрессией гена TRPV2 ( $\log_2$  RSEM) и чистотой опухоли в образцах LGG и GBM осуществляли с использованием TIMER (Tumor Immune Estimation Resource)<sup>41</sup>.

#### Экспрессия TRPV2 в отдельных клетках мозга

Нормализованная экспрессия гена TRPV2 ( $\log_2$  количества на миллион) в 3589 отдельных клетках, полученных из 4 образцов GBM человека, была получена из общедоступной базы данных<sup>26</sup>. Нормализованную экспрессию TRPV2 (фрагменты на килобазу на миллион - FPKM) в различных очищенных типах клеток из здоровых тканей головного мозга взрослого человека была получена из (Gene Expression Omnibus dataset accession GSE73721)<sup>42</sup>.

#### Анализ токсичности

5000 клеток/лунку высевали в 96-луночные планшеты с DMEM, содержащей 2% FBS. На следующий день добавляли пиперлонгумин в различных концентрациях. Общая концентрация DMSO в каждой лунке не превышала 1%. Через 24, 48 и 72 часа среду удаляли и заменяли CellTiter-Blue (Promega, 1:20 в среде). Планшет инкубировали в течение 90 минут перед измерением интенсивности флуоресценции.

#### Иммуногистохимическое окрашивание

Образцы, погруженные в парафин, разрезали на части и проводили демаскировку антигена (Dako PT link, pH 6, 95°C, 20 минут). После блокирования 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в MeOH в течение 30 минут срезы инкубировали с анти-TRPV2 (Atlas антитела HPA044993, 1:300) в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем с вторичным антителом, конъюгированным с HRP (Dako envision anti-rabbit, готовый к использованию) в течение

30 минут при комнатной температуре. Срезы визуализировали с помощью DAB-хромогена (3,3'-диаминобензидин, Dako) и контр-окрашивали гематоксилином Харриса. Слайды оцифровывали с использованием NanoZoomer SQ (Hamamatsu).

#### Сверхэкспрессия в HEK293 и U251

75000 клеток HEK293 высевали в каждую лунку 24-луночного планшета. На следующий день клетки трансфицировали плазмидой hTRPV2-RFP (любезно предоставленная Prof. Itaru Kojima, Gunma University, Japan). После инкубации в течение 24 часов среду меняли и добавляли PL при 5 и 10 мкМ. Через 24 часа жизнеспособность клеток оценивали с использованием окрашивания CellTiter-Blue (Promega) или Annexin V, 7-AAD. Эффективность трансфекции оценивали с помощью проточной цитометрии.

50000 клеток U251 высевали в каждую лунку 24-луночного планшета. На следующий день клетки трансфицировали плазмидой hTRPV2-RFP. После инкубации в течение 48 часов среду меняли и добавляли PL при 5 и 10 мкМ. Через 24 часа жизнеспособность клеток оценивали с использованием CellTiter-Blue (Promega). Эффективность трансфекции оценивали с помощью проточной цитометрии.

#### Проточная цитометрия

Клетки собирали и фиксировали метанолом в течение 10 минут при  $-20^{\circ}\text{C}$ , а затем промывали PBS (0,05% Tween 20). Образцы инкубировали с анти-TRPV2 (Atlas антителами, 1:100 в PBS) в течение 20 минут с последующим добавлением козлиного анти-кроличьего вторичного антитела Alexa 488 (Abcam, ab150077, 1:500 в PBS). Для анализа использовали BD LSRFortessa X-20 с программным обеспечением FACS Diva.

#### Анализ жизнеспособности с помощью аннексин V, 7-AAD

Клетки собирали с планшетов, промывая их средой (HEK293) или TrypLE express (Gibco). Среду удаляли после центрифугирования и клетки дважды промывали связывающим буфером, после чего инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с аннексин V-APC (eBiosciences, 1:100) и 7-AAD (Pharmigen, 1:50). Образцы разбавляли связывающим буфером и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием BD LSRFortessa X-20 с программным обеспечением FACS Diva. Образцы с единичными пятнами использовали в качестве контролей.

#### Инкапсуляция пиперлонгумина в $\beta$ -циклодекстрин

Пиперлонгумин (abcГ GmbH) в этаноле инкубировали с 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином (Carbosynth Ltd) в воде в соотношении 1:2 и перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем раствор выпаривали досуха.

#### Синтез каркаса гидрогеля пиперлонгумина и внутричерепная имплантация *in vivo*.

Каркасы гидрогеля получали, как было описано ранее<sup>27-30</sup>. Вкратце, равные части дендример амина с 12,5% содержанием твердого вещества и декстран альдегидом с 5% содержанием твердого вещества были смешаны с образованием предварительно отвержденных дисков. Для допированных каркасов 50 мг/кг пиперлонгумина, предварительно инкапсулированного с  $\beta$ -циклодекстрином, добавляли к раствору декстрана для образования гидрогеля. Предварительно отвержденные диски были

сформированы и имплантированы внутрочерепно в правое полушарие головного мозга мышей с опухолями GBM или использованы для анализов *in vitro*.

Высвобождение пиперлонгумина из гидрогелевого каркаса *in vitro*

Предварительно отвержденные диски из гидрогелевого каркаса отдельно или с добавлением пиперлонгумина, предварительно инкапсулированного с  $\beta$ -циклодекстрином, инкубировали в PBS при 37°C. В разные моменты времени образцы отбирали из PBS и выделенный пиперлонгумин количественно определяли с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии, интегрируя область под пиком, соответствующую пиперлонгумину. Данные были представлены в виде процентного содержания общего количества инкапсулята пиперлонгумина в гидрогеле для каждой временной точки.

*Тесты жизнеспособности клеток с использованием гидрогеля, допированного пиперлонгумином.*

В 24-луночные планшеты высевали 50000 клеток U251 на лунку. Через 24 часа в лунки добавляли transwell проницаемые подложки вкладыши (вкладыши 6,5 мм, ПЭТ-мембрана 8,0 мкм, Costar), содержащие предварительно отвержденные диски из гидрогелевого каркаса отдельно или с добавлением пиперлонгумина, предварительно инкапсулированного с  $\beta$ -циклодекстрином. Через 24, 48 и 72 часа жизнеспособность клеток измеряли с использованием реагента CellTiter-Blue (Promega, 1:20 в среде).

Получение линии клеток U251-GFP-люцифераза.

50000 клеток на лунку высевали в 6-луночные планшеты. На следующий день в лунку добавили 3 мл лентивирус-GFP-люциферазы (производства Carlos Custodia November 2016) и 4 мкл полибрена. Вирусосодержащую среду удаляли через 48 часов и заменяли свежей средой DMEM с 10% FBS. Клетки экспандировали и отсортировывали с использованием FACS. Флаконы конфлюэнтных клеток замораживали до тех пор, пока они не потребуются для экспериментов *in vivo*.

Гидрогель, допированный пиперлонгумином, для лечения GBM на ксенотрансплантатной модели у мышей.

Все исследования на мышах были одобрены этическим комитетом, и эксперименты проводили в соответствии с их правилами и политикой. Ксенотрансплантаты глиобластомы вводили самцам бестимусных мышей 8-недельного возраста (Charles River Laboratories). После того, как мышью анестезировали изофлураном и иммобилизовали на стереотаксической рамке, трепанационное отверстие диаметром 2,7 мм было сделано на 2,5 мм латерально и на 1,5 мм кзади от брегмы, над правым полушарием головного мозга. 250000 клеток глиобластомы (U251-GFP-luc) в объеме 3 мкл PBS инъецировали в мозг на глубину 2,5 мм (игла опускалась на 3 мм, затем втягивалась на 0,5 мм для создания кармана для клеток) с использованием иглы с тупым концом и шприца Гамильтона. Иглу держали на месте в течение 5 минут, чтобы свести к минимуму рефлюкс клеток. После удаления иглы разрез зашивали и животным давали возможность восстановиться. Через восемь дней после индукции опухоли мышью визуализировали с помощью системы IVIS

Lumina. Мышей ранжировали по их биолюминесцентному сигналу и делили на 2 равные группы. Через девять дней после индукции опухоли мышей анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции медетомидина и кетамина и швы вновь открывали. Для обеспечения контакта гидрогеля с тканью головного мозга перед применением гидрогеля (предварительно отвержденные диски гидрогелевого каркаса отдельно для контрольной группы или допированные пиперлонгумином (50 мг/кг), предварительно инкапсулированные  $\beta$ -циклодекстрином) было сделано отверстие в черепе и повреждена ткань на поверхности. Кожу повторно зашивали, и анестезию устраняли антипамезолом. Оценку токсичности *in vivo* с помощью оценки массы тела мышей проводили на всех группах животных во время эксперимента. Через три недели после имплантации гидрогеля мышей умерщвляли, чтобы размер опухоли не превышал гуманные конечные точки. Органы, включая головной и спинной мозг, собирали для гистологической оценки. Гистологические срезы опухолей (n=5) окрашивали гематоксилином и эозином, и для иммуногистохимического анализа опухоли (n=5) окрашивали антителами анти-TRPV2 (Atlas антитела, HPA044993, разведение 1:200) и анти-Ki67 (Abcam ab15580, разведение 1:200). Кривая выживаемости была построена на основе порогового значения увеличения исходного размера опухоли на 554%, измеренного с помощью IVIS lumina через 8 дней после индукции опухоли. Это значение было установлено, так как в предыдущих экспериментах опухоли смогли вырасти до такого объема, что череп стал деформироваться. Это было видно только после того, как были проанализированы гистологические срезы головы, и было решено установить значение, чтобы конечная точка была гуманной и клинически значимой.

#### *Анализ роста опухоли.*

Неинвазивный продольный мониторинг прогрессирования опухоли сопровождался сканированием мышей с помощью системы IVIS Lumina-биолюминесцентной и флуоресцентной визуализации (Xenogen IVIS Lumina, Perkin Elmer). За пятнадцать минут до визуализации мышам подкожно инъецировали 150 мкл D-люциферина (30 мг/мл, Perkin Elmer) в PBS (Lonza). Визуализацию интактного животного осуществляли в указанные моменты времени (-1, 3, 6, 10, 13, 18 и 21 день после внутричерепной имплантации гидрогелевых дисков).

#### ОТ-ПЦР в реальном времени (QPCR)

Тотальную РНК выделяли с использованием реагента TRIzol™ в соответствии с протоколом производителя (Sigma, Darmstadt, Germany). 500 нг РНК превращали в кДНК с использованием Superscript III (Promega, Mannheim, Germany) и 25 нг кДНК в качестве матрицы для количественной ПЦР с GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Mannheim, Germany). Количественная ПЦР осуществляли для TRPV2 с системой детектирования (Applied Biosystems, Foster City, USA). Условия термоциклера составляли 95°C в течение 20 минут, затем 40 циклов по 3 минуты при 95°C, затем 30 секунд при 60°C. Экспрессию мРНК рассчитывали с использованием метода 2- $\Delta\Delta$ CT и нормализовали к внутреннему контролю PGK1.

### *Получение образца*

Белки экстрагировали из замороженных срезов ткани, как описано в другом месте (Poschmann et al.[1]). Вкратце, клетки гомогенизировали в мочевином буфере с TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany) и затем обрабатывали ультразвуком. После центрифугирования в течение 15 минут при 14000x g и 4°C супернатанты собирали и содержащиеся в них белки осаждали в течение ночи при -20°C с ацетоном в соотношении 1:4 (об./об.). Концентрацию белка определяли с помощью анализа белка Pierce 660 нм (Fischer Scientific, Schwerte, Germany) и 10 мкг белка на образец обессоливали путем электрофоретической миграции при 50 В в течение 10 минут на 4-12% бис-Трис-полиакриламидном геле (Novex NuPAGE, Thermo Scientific, Darmstadt, Germany). После окрашивания серебром полосы белка вырезали, восстанавливали, алкилировали и расщепляли трипсином перед экстракцией пептида посредством обработки ультразвуком. Пептиды растворяли в 16 мкл 0,1% TFA (об./об.) и концентрацию пептида измеряли с применением анализа о-фталевого диальдегида.

### *LC-MS анализ*

Для масс-спектрометрического анализа 15 мкл раствора пептида на образец анализировали с помощью масс-спектрометра с ионизацией с применением нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрораспылением. Аналитическая система состояла из ВЭЖХ RSLCnano U3000, соединенной с масс-спектрометром QExactive plus через нано-электрораспылительный источник ионов (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany). Инжектированные пептиды концентрировали и обессоливали при скорости потока 6 мкл/мин на улавливающей колонке (Acclaim PepMap C18, размер частиц 2 см x 100 мкм x 3 мкм, размер пор 100 Å, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) с 0,1% TFA (об./об.) в течение 10 мин. Затем пептиды разделяли при постоянной скорости потока 300 нл/мин в градиенте 120 мин на аналитической колонке (Acclaim PepMap RSLC C<sub>18</sub>, размер частиц 25 см x 75 мкм x 2 мкм, размер пор 100 Å, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) при 60°C. Разделение достигалось с помощью градиента от 4 до 40% растворителя В (растворитель А: 0,1% (об./об.) муравьиная кислота в воде, растворитель В: 0,1% (об./об.) муравьиная кислота, 84% (об./об.) ацетонитрил в воде). Затем пептиды ионизировали при напряжении 1400 В и вводили в масс-спектрометр, работающий в положительном режиме. Сканирования MS записывали в режиме профиля в диапазоне 350-2000 m/z с разрешением 70000, в то время как тандемные масс-спектры записывали с разрешением 17500. Тандемные масс-спектры были записаны с использованием метода Top10, зависящего от данных, и 30% нормализованной энергии столкновения. Динамическая эксклюзия активировалась с количеством повторов 1 в течение 100 мс.

### *Вычислительный анализ масс-спектрометрических данных*

Применяли Proteome Discoverer (версия 2.1.0.81, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) для идентификации пептидов/белков с Mascot (версия 2.4.1, Matrix Science, London, UK) в качестве поисковой системы, использующей базу данных UniProt (человек;

включая изоформы; дата 2018-05-01). Уровень ложноположительных результатов 1% ( $p \leq 0,01$ ) на уровень пептида был установлен в качестве порога идентификации. Белки определяли количественно с помощью Progenesis QI for Proteomics (версия 2.0, Nonlinear Dynamics, Waters Corporation, Newcastle upon Tyne, UK).

#### Анализ пути

Наборы генов состояли из курируемых путей из нескольких баз данных, включая GO, Reactome, KEGG (24 марта 2016 г. и визуализированных с использованием Cytoscape ([www.cytoscape.org](http://www.cytoscape.org);  $p \leq 0,001$ ,  $q \leq 0,05$ , отсечение подобия 0,5). Данные масс-спектрометрии анализировали в первичной и рецидивирующей парах, и значение T использовали для выполнения ранжированного анализа. При анализе путей изобретательности (IPA) использовали значимые гены из парного T-критерия ( $p \leq 0,05$  и кратность изменения  $\pm 2$ ). Значимость IPA определяли на основании  $p \leq 0,05$ . Тепловые карты и иерархическую кластеризацию выполняли путем нормализации средней экспрессии до 0 со стандартным отклонением 1 и использования алгоритма несходства Пирсона и средней связи в Partek Genomic Suite (Partek Incorporated, Missouri, USA).

Авторы изобретения предположили, что фармакофорная взаимосвязь между 1 и 2 (фиг. 1A) охватывает схему для модуляции TRP, неизвестного до сих пор семейства мишеней для 1, которое может частично объяснить его сильную противоопухолевую и/или антиметастатическую активность. Авторы изобретения также мотивировали тестирование 1 против TRP каналов посредством уверенного связывающего прогнозирования посредством машинного обучения. Уникальная архитектура алгоритма, основанного на лиганде, которую использовали авторы изобретения, оказалась эффективной для распознавания отношений лиганд-мишень для NP, которые игнорируются конкурирующими инструментами.<sup>2</sup> Имея в руках гипотезу связывания, авторы изобретения предприняли попытку скрининга группы человеческих лиганд-управляемых каналов TRP, включая ваниллоидные (TRPV), канонические (TRPC), меластатиновые (TRPM) и анкириновые (TRPA) аналоги, используя клеточную экспрессионную систему в сочетании с флуоресцентным кальциевым детекторным зондом. Стоит отметить, что 1 не активировал ни один из проанализированных каналов и только сильно ингибировал дозозависимо вызванный каннабидиолом приток кальция через TRPV2 ( $IC_{50} = 4,6 \text{ мкМ} \pm 0,13 \text{ log единицы}$ , эффективность лиганда = 0,32; таблица 1 и фиг. 2a). Авторы изобретения провели эксперименты по визуализации кальция с использованием кальциевого зонда Fura2-AM в клетках HepG2, который подтвердил экспрессию TRPV2 (фиг. 2b, c). Приток кальция вызванный каннабидиолом 20 мкМ может быть значительно ингибирован при обработке клеток 5 мкМ из 1 ( $p < 0,01$ , однофакторный дисперсионный анализ и ретроспективный анализ с HSD-критерием Тьюки), аналогично контрольному соединению траниласт в концентрации 10 мкМ (фиг. 2b). Интересно, что стимуляция 4 мкМ каннабидиолом не вызывала увеличения внутриклеточного кальция (фиг. 2в), что свидетельствует о низком количестве копий каналов TRPV2 в HepG2 и ограничениях его использования в качестве модельной системы.

Затем авторы изобретения трансфицировали клетки НЕК293 необходимой плазмидной ДНК, чтобы обеспечить временную сверхэкспрессию слитого белка TRPV2-RFP (фиг. 2d-h). Затем трансфицированные клетки стимулировали 4 мкМ каннабидиола и обрабатывали 1 для подтверждения ранее наблюдаемых функциональных эффектов (фиг. 2d). Помимо активации TRPV2, каннабидиол модулирует рецептор, связанный с CB1 G-белком, и проявляет сложную полифармакологию в микромолярных концентрациях.<sup>19</sup> Для исключения притока кальция из-за модуляции мишеней, отличных от TRPV2, авторы изобретения также стимулировали нетрансфицированные НЕК293 каннабидиолом. Действительно, несмотря на модуляцию других мишеней, основная часть притока кальция в трансфицированных клетках НЕК293 возникает из-за вовлечения каналов TRPV2.

Данные авторов также показывают, что ингибирование притока кальция 1 в трансфицированных клетках НЕК293 значительно отличается от притока кальция в нетрансфицированных контрольных клетках ( $p < 0,001$ , однофакторный дисперсионный анализ и ретроспективный анализ с HSD-критерием Тьюки). Таким образом, эффекты, проявляемые 1, приписываются модуляции TRPV2.

Используя пэтч-кламп в качестве ортогональной технологии, авторы изобретения подтвердили связывание с каналом TRPV2 и функциональный антагонизм через прерывание кальциевых токов, вызванных 4 мкМ каннабидиола ( $IC_{50} = 1 \text{ мкМ} \pm 0,52 \log$  единиц, фиг. 2i). Важно отметить, что ингибирующий эффект 1 отменяется после предварительной стимуляции TRPV2 10 мкМ каннабидиола ( $IC_{50}(1) > 100 \text{ мкМ}$ ,  $n=2$ ;  $EC_{50}$  (каннабидиол) = 3,8 мкМ,  $n_{Hill}=0,6$ ,  $n=3$ ; фиг. 2j). Таким образом, данные авторов изобретения свидетельствуют о специфическом и направленном молекулярном распознавании 1 и отсутствие артефактного ингибирования TRPV2. Данные динамического рассеяния света также подтверждают отсутствие ингибирования, вызванного коллоидным агрегатом, - обычное явление для ложноположительных показаний.

Значительная селективность, показанная 1, была частично неожиданной. В то время как 1 имеет низкое субструктурное сходство с известными лигандами TRPV (средний индекс Танимото=0,10, отпечатки Моргана, радиус 2, 2048 бит) он все же заполняет обозначенное биоактивное пространство TRPV, в соответствии с автокорреляционным топологическим дескриптором фармакофора CATS (MOE 2016.10, Chemical Computing Group implementation). Полученный профиль активности также является интригующим и создает проблемы для систем определения приоритетности химических веществ в программах раннего обнаружения. Пиперлонгумин легко помечается обычными фильтрами на основе субструктуры, такими как фильтры в rap assay interference compounds (PAINS)<sup>20</sup>, и быстрое устранение промывки (REOS)<sup>21</sup>, которые идентифицируют, среди прочего, акцепторы Михаэля как структурный признак токсичности. Инкубация 1 с N- и C-защищенным цистеином в биоортогональных условиях давала стабильные аддукты цистеина, оцененные с помощью масс-спектрометрии. Подобное наблюдение уже было сделано Adams et al.<sup>17</sup> Таким образом,

было бы разумно рассмотреть беспорядочное зацепление с мишенью и общую реакционную способность 1 со свободными остатками цистеина в протеоме человека. Для рассмотрения возможности необратимого связывания 1 с TRPV2, авторы изобретения провели серию экспериментов по инкубации и вымыванию (фиг. 3а, б). Отрадно, что активность TRPV2 может быть полностью восстановлена после вымывания, предоставляя убедительные доказательства того, что связывание является нековалентным или что 1 представляет быструю скорость диссоциации после ковалентной модификации TRPV2.

На основе полученных данных авторы изобретения затем попытались получить представление о способе связывания 1 с TRPV2, для которого авторы изобретения провели эксперименты по совместной инкубации с каннабидиолом. При увеличении концентрации 1 максимальный эффект на кривых EC<sub>50</sub> каннабидиола снижался, что типично для неконкурентного (аллостерического) антагонизма (фиг. 3с).<sup>22</sup> Кроме того, при концентрациях 1, превышающих 5 мкМ, наблюдаемое значение  $v_{max}$  каннабидиола снижается, что также согласуется с аллостерическим ингибированием - увеличение концентрации агониста не может преодолеть функциональные эффекты 1 (фиг. 3d). Графики Шильда также поддерживают режим ингибирования, учитывая, что и кривые, и угловой коэффициент Хилла полностью соответствуют предыдущими данными авторов изобретения (фиг. 3е).

Затем авторы изобретения использовали изотермическую титрационную калориметрию для скрининга 1 при 100 мкМ против различных конструкций ортологов TRPV2 кролика, кашалота и чиру. Соединение 1 не связывалось ни с одной из конструкций. Хотя и предварительные, эти данные указывают на ключевые особенности молекулярного распознавания. Авторы изобретения выровняли последовательности белка TRPV2 изученных видов, чтобы идентифицировать различия и, таким образом, потенциальные домены связывания для 1. Поразительно, что так называемый TRPV2 поровый тунельный участок значительно отличается между ортологами. Было показано, что связывание с тунелем природным пептидом имеет значение для захвата TRPV1.<sup>23</sup> Однако для лигандов TRPV2 такая связь не была установлена, что в дальнейшем побудило авторов изобретения построить химеру TRPV2, заменив нативный человеческий TRPV2 тунель аналогом кролика. Важно отметить, что клетки HEK293, трансфицированные химерным каналом TRPV2, были одинаково чувствительны к каннабидиолу при 4 мкМ в экспериментах по визуализации кальция, что свидетельствует о том, что топология его связывающего сайта не была нарушена.

Затем авторы изобретения исследовали, коррелирует ли модуляция TRPV2 1 с его цитостатической активностью. С этой целью предполагаемая антипролиферативная активность 1 была протестирована на панели NCI-60 линий раковых клеток человека, представляющих 9 различных типов рака (фиг. S3),<sup>24</sup> в пяти различных концентрациях. Авторы изобретения преобразовали параметры антипролиферативной активности GI<sub>50</sub> и IC<sub>50</sub> в их -z оценки, при этом высокие значения соответствуют высокой чувствительности клеточных линий к 1. В целом было обнаружено, что наиболее чувствительными к 1

являются линии клеток рака крови, толстой кишки и кожи (фиг. 4а, b).

Для определения роли TRPV2 в антипролиферативных эффектах 1 авторы изобретения стремились установить корреляцию между цитостатическими эффектами, вызванными 1 и TRPV2 мРНК экспрессией. В соответствии с исследованиями *in vitro* авторов изобретения, клеточные линии, экспрессирующие TRPV2, были очень чувствительны к 1, основываясь на обоих показателях  $GI_{50}$  (коэффициент корреляции Спирмена ( $\rho$ ) = 0,28,  $p < 0,05$ ; фиг. 4с) и  $IC_{50}$  ( $\rho$  = 0,29,  $p < 0,05$ ; фиг. 4d). Насколько известно авторам изобретения, ранее не было выявлено никакой связи между TRPV2 антагонизмом и ингибированием роста раковых клеток. Однако чувствительность к 1 клеточных линий, не экспрессирующих TRPV2, предполагает модуляцию дополнительных мишеней. Интересно, что не было обнаружено значительной корреляции для других известных целей 1, т.е. STAT3<sup>18,25</sup> и NF- $\kappa$ B<sup>26</sup>. Тем не менее, анализ авторов изобретения уровня экспрессии мРНК не отражает высокую зависимость активности этих белков от других уровней регуляции, например, фосфорилирование STAT3 или деградация ингибитора NF- $\kappa$ B. Впоследствии авторы изобретения расширили анализ по отношению ко всем данным об экспрессии мРНК, общедоступных для панели NCI-60. Гены, ранжированные в соответствии с коэффициентом корреляции Спирмена между их экспрессией и  $GI_{50}$  1, использовали для запуска набора генов

Анализ представленности (GSEA),<sup>27,28</sup> позволяющий нам идентифицировать пути (уровень ложного обнаружения <5%), предполагающий потенциальную цель (наборы генов с положительным нормализованным показателем обогащения (NES), фиг. 4е) и механизмы лекарственную устойчивость (отрицательный NES, фиг. 4е). Процессинг РНК - например, сплайсосома, рибосома, деградация РНК, РНК-полимераза - являются одними из положительно ассоциированных путей (фиг. 4е), вероятно, из-за их более высокой активации в быстро делящихся клетках, где активность 1 выше. Гены в позитивно обогащенном пути процессирования и презентации антигена не перекрываются с мишенями NF- $\kappa$ B, центрального медиатора иммунного ответа человека,<sup>29</sup> предполагая, что 1 может влиять на разные механизмы иммунитета.

Заинтригованные высокой экспрессией мРНК TRPV2 при раке крови и кожи на панели NCI-60, авторы изобретения исследовали использование TRPV2 в качестве прогностического маркера и потенциальной мишени лекарственного средства. Анализируя данные секвенирования РНК из проекта Genotype-Tissue Expression project,<sup>30,31</sup> авторы изобретения подтвердили более высокую экспрессию TRPV2 в крови, но не в здоровой ткани кожи. Авторы изобретения также исследовали экспрессию TRPV2 в опухолевых образцах Атласа ракового генома (TCGA, <https://cancergenome.nih.gov/>). Действительно, TRPV2 высоко экспрессируется при человеческих гематологических злокачественных опухолях и раке кожи, но отсутствие данных о экспрессии для нормальной ткани в обеих соответствующих когортах TCGA не позволяет тестировать сверхэкспрессию TRPV2 при этих типах рака. Интересно, что легкие демонстрируют самую высокую экспрессию TRPV2 среди нормальных тканей, в отличие от очень низких

уровней экспрессии в образцах опухоли легкого TCGA, что также наблюдается в линиях раковых клеток NCI-60. Соответственно, анализ выживаемости выявил прогностическую ценность для TRPV2 только в типах рака легкого в четырех разных группах ( $p < 0,05$ ).<sup>32-35</sup> Более низкая экспрессия связана с более низкой выживаемостью пациентов.

В целом эти результаты указывают на то, что TRPV2 является потенциальным прогностическим маркером рака легких. Принимая во внимание предостережения анализа экспрессии генов, например, уровни мРНК не могут быть полностью переведены в содержание белка, данные авторов изобретения остаются ориентировочными и должны интерпретироваться со здоровым скептицизмом. Учитывая, что TRPV2 был показан сверхэкспрессированным на уровне белка, в линиях раковых клеток и стадиях, отличных от тех, которые были отобраны в панели NCI-60,<sup>36</sup> возможно, что 1 индуцирует изменения фенотипа посредством модуляции TRPV2 в других примерах.

TRPV2 был безусловно вовлечен в метастатический рак молочной железы и предстательной железы как медиатор клеточной миграции.<sup>36-39</sup> Для исследования важности взаимодействия соединения 1-TRPV2 на миграцию клеток, авторы изобретения сначала протестировали клеточные линии рака предстательной железы PC3 и LNCaP на чувствительность к 1. Авторы изобретения обработали клетки 5 и 10 мкМ 1, в соответствии с ранее определенным значением  $IC_{50}$  против TRPV2. В обоих случаях жизнеспособность клеток была нарушена в течение 24 часов. Вместо этого авторы изобретения провели 24-часовой анализ царапин на заживление ран с помощью TRPV2-экспрессирующей клеточной линии НерG2, где обработка 5 мкМ 1 в течение экспериментального периода времени не вызывала значительной гибели клеток. Соединение 1 значительно уменьшало миграцию клеток НерG2 с течением времени, аналогично контрольному ингибитору TRPV2 траниласт (фиг. 5а-с). Результаты были воспроизведены в другой клеточной линии гепатокарциномы - Huh-7. Более того, анти-миграционный эффект, показанный 1, зависит от средней концентрации кальция, что предполагает нарушение транспорта кальция в качестве одного из механизмов действия.<sup>40,41</sup> Для дальнейшей оценки важности модуляции TRPV2 в контексте миграции НерG2 авторы изобретения вручную собрали панель из 175 макромолекул, коррелирующих с миграцией раковых клеток.<sup>42-46</sup> Например, они включали киназы, GPCR, ионные каналы и факторы транскрипции, которые играют ключевую роль в передаче сигнала по кальциевым каналам (фиг. 5d). Данные РНК-секвенирования НерG2 были получены из ENCODE<sup>47</sup>, и для каждой из мишеней была рассчитана средняя экспрессия гена. Данные авторов изобретения показывают, что TRPV2 сверхэкспрессируется по сравнению с 89% анализируемых мишеней. В то время как полифармакология объясняет результирующий эффект 1 на миграцию раковых клеток, ингибирование TRPV2 относится к числу наиболее важных механизмов.

*hTRPV2 является маркером плохого прогноза при GBM.*

Для исследования роли hTRPV2 в антипролиферативном действии пиперлонгумина (PL), авторы изобретения попытались найти корреляцию между

цитостатическими эффектами, вызванными PL и hTRPV2 мРНК экспрессией. С этой целью авторы изобретения провели скрининг PL на панели NCI-60 линий раковых клеток и проанализировали общедоступные данные STRP<sup>23</sup>. Отрадно, клеточные линии, экспрессирующие hTRPV2, были очень чувствительны к PL в обоих скринингах лекарственного средства, что свидетельствует о важности hTRPV2 в качестве мишени лекарственного средства при раке (коэффициент корреляции Спирмана,  $\rho=0,29$  и  $0,24$ ,  $p=0,03$  и  $1,5 \times 10^{-11}$ , для NCI-60 и STRP панелей, соответственно; фиг. 4d).

Для дальнейшего изучения роли hTRPV2 при раке авторы изобретения проверили его прогностическую ценность в 30 когортах из Атласа ракового генома (TCGA). Действительно, высокая экспрессия hTRPV2, как было установлено, тесно связана с плохой выживаемостью пациентов при опухолях головного мозга ( $p=4,37 \times 10^{-13}$ , логранговый критерий), в том числе в когортах глиомы низких степеней (LGG)<sup>24</sup> и GBM<sup>25</sup> по отдельности ( $p=0,028$  и  $0,0087$ , соответственно, логранговый критерий; фиг. 6). Кроме того, авторы изобретения обнаружили значительное увеличение экспрессии hTRPV2, сопутствующее стадии опухоли (фиг.16). В образцах LGG и GBM экспрессия hTRPV2 отрицательно связана с чистотой опухоли (коэффициент корреляции Спирмана,  $p = -0,45$  и  $-0,36$ ,  $p=7,5 \times 10^{-25}$  и  $3,1 \times 10^{-14}$ , соответственно; фиг. 17), что указывает на то, что она в основном экспрессируется в микроокружении опухоли. Затем авторы изобретения проанализировали экспрессию hTRPV2 в образцах ткани опухоли головного мозга от группы пациентов с GBM II-IV степени. Иммуногистохимический анализ показал, что hTRPV2 действительно экспрессируется в опухолевых клетках (точечное окрашивание) в большей степени, чем на краю опухоли (фиг. 7). Наиболее важно, что авторы изобретения наблюдали, что GBM высокого уровня сверхэкспрессирует hTRPV2 на поверхности и в цитоплазме эпителиальных клеток в опухоли. В целом это связано с тем фактом, что высокая экспрессия hTRPV2 играет роль в ангиогенезе и прогрессировании опухоли и ассоциируется с плохим прогнозом. Действительно, результаты авторов изобретения совпадают с результатами, полученными в результате анализа биоинформатики полностью независимого набора данных<sup>26</sup> (фиг. 8, левая панель).

*Сверхэкспрессия hTRPV2 приводит к повышенной токсичности PL.*

Выявив *in silico* корреляцию между экспрессией hTRPV2 и степенями GBM, авторы изобретения подвергли клетки TRPV2<sup>+</sup> глиомы U251 временной экспрессии hTRPV2 с целью обострения сигнальных путей с участием hTRPV2. Обработка трансфицированных клеток 5 мкМ PL показала снижение жизнеспособности по сравнению с нетрансфицированными контролями ( $p=0,0002$ ,  $n=9$ , тест Манна-Уитни), как оценивали окрашиванием CellTiter Blue, аннексин V и 7-AAD (фиг. 8, правая панель). Эти данные полностью подтверждают анализы авторов изобретения и подтверждают, что hTRPV2 является не только клеточной мишенью PL, но также и то, что взаимодействие лиганд-мишень приводит к гибели клеток. Важно отметить, что клетки U251 были чувствительны к PL в зависимости от дозы и времени, при котором может учитываться модуляция hTRPV2. Идентичный результат может быть достигнут с временно

трансфицированными TRPV2 клетками НЕК.

Гидрогель, допированный пиперлонгумином, как новое локальное средство для лечения GBM

Затем авторы изобретения исследовали терапевтический потенциал PL на мышинной модели ксенотрансплантата GBM. Авторы изобретения инкапсулировали PL в циклодекстрин в отношении 1:2, что значительно улучшило его растворимость в воде. Кроме того, для повышения терапевтической эффективности авторы изобретения создали терапию, подходящую для послеоперационного введения. С этой целью авторы изобретения разработали имплантируемые гидрогели, которые допировали PL, инкапсулированным в  $\beta$ -циклодекстрин. Используя этот новый материал для локальной и устойчивой доставки PL в головной мозг, авторы изобретения получили высокую концентрацию PL в месте опухоли и минимальную миграцию в здоровые ткани и органы. Чтобы обеспечить высвобождение PL в опухолевую ткань и избежать миграции вещества и высвобождения в соседние участки, гидрогель получал альдегидные группы, которые взаимодействуют с аминами ткани с образованием адгезивных связей, как сообщалось ранее<sup>27-30</sup>. Профилирование гидрогелевого материала для скорости высвобождения PL в физиологических условиях (PBS, pH 7,4, при 37°C) показало значительное высвобождение выпуска в первые 4 часа с последующим устойчивым высвобождением небольших количеств PL (3% от общего количества) не менее 192 часов. Эти данные дают обоснование экспериментам по токсичности *in vitro*, в которых гидрогели, допированные PL, могли вызывать почти полную гибель клеток после инкубации с клетками U251 в течение всего 24 часов. Пустые гидрогели не влияли на жизнеспособность клеток.

Авторы изобретения приступили к изучению *in vivo* терапевтической эффективности гидрогелей, допированных PL, на мышинной модели GBM. Гидрогелевые каркасы, нагруженные PL, имплантировали в супратенториальную область мозга бестимусных мышей (Crl:NU(NCr)-Foxn1<sup>tm</sup>) через 8 дней после индукции опухоли с  $2,5 \times 10^5$  клеток U251-GFP-luc (фиг. 9). Для контрольной группы в качестве имплантатов авторы изобретения использовали пустые гидрогели, т.е. без компонента PL. Затем измеряли ингибирование прогрессирования опухоли по биолюминесценции клеточной линии GBM, экспрессирующей люциферазу, через систему визуализации в реальном времени с регулярными интервалами в течение 21 дня после имплантации гидрогеля и 30 дней после индукции опухоли. Гидрогель, допированный PL, приводил к почти полной ремиссии, о чем свидетельствует биолюминесцентная визуализация ( $p=0,0159$ ,  $n=5$ , тест Манна-Уитни, фиг. 10) через 21 день после имплантации гидрогеля. Действительно, разница в выживаемости между двумя группами была значимой ( $p=0,0494$ , логранговый критерий (тест Мантела-Кокса; фиг. 11), что может представлять собой важное достижение в терапии GBM. Кроме того, для подтверждения безопасности конструкций органы собирали у мышей через 21 день после имплантации гидрогеля и окрашивали для анализов патологий. Данные авторов изобретения ясно показывают, что применение допированных гидрогелей *in vivo* не вызывало каких-либо повреждений в легких, печени,

почках, селезенке, сердце и кишечнике по сравнению с контрольной группой пустого гидрогеля. Тем не менее, опухолевая ткань демонстрирует значительное уменьшение васкуляризации в соответствии с уменьшением размера опухоли после лечения. Во всех группах животных не наблюдалось токсичности *in vivo* или других физиологических осложнений в течение 21 дня после воздействия гидрогеля, о чем свидетельствует поддержание стабильной массы тела и отсутствие некроза в месте введения. Таким образом, данные указывают на то, что гидрогель, содержащий PL, является биосовместимым. На основании этих результатов можно сделать вывод, что внутрочерепное введение PL с помощью декстран-дендример гидрогеля дает новый альтернативный вариант лечения GBM.

#### *TRPV2 экспрессируется на высоком уровне в парных рецидивирующих GBM*

TRPV2 связан с более агрессивным фенотипом, и поэтому авторы изобретения решили протестировать первичные и рецидивирующие пары GBM для TRPV2. Одиннадцать первичных и рецидивирующих опухолей парных образцов анализировали на масс-спектрометре с применением нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрораспылительной ионизационной. TRPV2 не был дифференциально отрегулирован между образцами от первичных и рецидивирующих. На самом деле, в масс-спектрометрии не было обнаружено пептидов. При просмотре архивных данных можно увидеть, что TRPV2 обнаружен только в 88 из 3299 депонированных исследований на людях, в то время как GAPDH можно увидеть 336 раз. Поскольку TRPV2 имеет 6 трансмембранных доменов, которые являются высоко гидрофобными, только исследования с использованием гидрофобного специфического буфера для лизиса могут обнаружить TRPV2. Поэтому авторы изобретения осуществили qRT-PCR для тестирования уровней мРНК, и действительно, TRPV2 более высоко экспрессируется в рецидивирующей популяции (фиг. 12). После нормализации сигнала белки с пропущенными значениями удаляли и проводили парный t-критерий. Ранжированное значение T анализировали с использованием предварительно ранжированного анализа представленности наборов генов (GSEA), тогда как значимые белки ( $p \leq 0,05$  и кратность изменения  $\pm 1,5$ ) обрабатывали с использованием анализа путей изобретательности (IPA). В первичных образцах авторы изобретения наблюдали показатели, касающиеся регуляции генов и мРНК, а также адгезии и локализации белка. Окислительное фосфорилирование и передача сигналов нейротрансмиттерами, оба из которых включают транспорт кальция, были активированы в рецидивирующих образцах, подтверждая, что TRPV2 более активен в рецидивирующих образцах. Тепловая карта для отличительного признака окислительного фосфорилирования, набора генов высшего ранга, отображается, показывая, что экспрессия действительно повышена, однако, на уровне отдельного образца. Затем авторы изобретения проанализировали результаты IPA и обнаружили, что аналогичные канонические пути регулируются (фиг. 13). Как видно из таблицы 2, митохондриальная дисфункция и окислительное фосфорилирование являются первыми результатами. Затем авторы изобретения осуществили предварительный анализ и

отобрали 4 лучших кандидата, которые включали митохондриальную дисфункцию. Авторы изобретения наблюдали, что RICTOR был активен в первичных образцах, что привело бы к репрессии генов, участвующих в окислительном фосфорилировании. Однако примерно треть белков не может быть понижающе регулирована, что позволяет предположить, что RICTOR не может быть апстрим-регулятором митохондриальной дисфункции. Однако результаты авторов изобретения показывают, что PPARGC1A (показаны на фиг. 14 и тепловая карта на фиг. 15), который участвует в митохондриальном биогенезе, является потенциальным апстрим-регулятором, ответственным за митохондриальную дисфункцию и увеличение окислительного фосфорилирования в рецидивирующих опухолях.

NP и их биологически предварительно валидированные архитектуры предоставляют часто неиспользуемые возможности для разработки зондов и прототипов лекарственного средства для химической биологии и молекулярной медицины. Тем не менее, только часть NP была проверена на биологическую активность, в частности, с помощью фенотипических анализов. Таким образом, существует острая необходимость в определении целей, задействованных в биологически значимых концентрациях, для предоставления возможности разработки обоснованных лекарственных средств. Глубокое понимание фармакологических сетей, т.е. взаимосвязи между целевыми и нецелевыми, предлагает решение для разработки лигандов с предпочтительными полифармакологическими профилями и смягчения особенностей, которые могут привести к неблагоприятным реакциям на лекарственный препарат и потере. Соединение 1 показало многообещающий противораковый профиль, несмотря на структурные особенности. Используя принципы фармакофорного сходства и общедоступный метод машинного обучения, авторы изобретения связали соединение 1 с функциональным, лигандоэффективным и аллостерическим антагонизмом TRPV2. Важно отметить, что соединение 1 продемонстрировало исключительную селективность в семействе каналов TRP и может стать основным источником вдохновения для рационального молекулярного проектирования. Более того, результат является беспрецедентным, учитывая предшествующее отсутствие антагонистов TRPV2 в химическом пространстве NP. Описанный в настоящем документе механизм предлагает ранее неизвестное объяснение наблюдаемых противоопухолевых и антимагистатических эффектов<sup>16</sup> и потенциальной возможности поражения цели. Каналы TRP являются новым классом потенциальных мишеней лекарственного средства в контексте рака<sup>48</sup>, но TRPV2 остается в значительной степени неизученным.<sup>36</sup> Хотя соединение 1 имеет особенности для селективной модуляции TRPV2, его не следует напрямую использовать в качестве химического зонда TRPV2. Фактически, включение STAT3 в идентичных концентрациях<sup>18</sup> может привести к искажению результатов анализа.

С вычислительной точки зрения подход зависит от инструмента машинного обучения, алгоритма наложения и минимизации энергии силового поля. Следовательно, следует также ожидать ложноположительных прогнозов. Тем не менее результаты

авторов изобретения показывают, что 2D и 3D фармакофорные дескрипторы могут быть оперативно использованы для разработки и раскрытия новой биологии для биологически активных химических веществ.

Данные, раскрытые в настоящем документе, предоставляют платформу для будущего исследования TRPV2 в контексте открытия лекарственного средства от рака и потенциальной ценности 1 в качестве прототипа лекарственного средства. В конечном счете, мы предвидим широкий спектр и первостепенную полезность связанных вычислительных технологий для разворачивания показаний фенотипического анализа на макромолекулярном уровне. Эта и связанные с ней концепции могут найти применение в качестве общего подхода в системной биологии, используя создание фармакологических сетей в молекулярной медицине.

Таблица 1

TRP канал	IC <sub>50</sub> /мкМ±SD	TRP канал	IC <sub>50</sub> /мкМ±SD
TRPV1	> 100	TRPC5	> 100
TRPV2	4,6±0,13 log единиц	TRPC6	> 100
TRPV3	> 100	TRPC7	64±0,06 log единиц
TRPV4	> 100	TRPM2	> 100
TRPV5	> 100	TRPM3	> 100
TRPA1	39±0,15 log единиц	TRPM4	> 100
TRPC1	> 100	TRPM5	> 100
TRPC3	> 100	TRPM8	> 100
TRPC4	> 100		

Контроли - TRPV2: триласт (IC<sub>50</sub>=2,3 мкМ±0,25 log единиц); TRPA1: рутениевый красный (IC<sub>50</sub>=2,3 мкМ±0,19 log единиц); TRPC7: SKF 96365 (IC<sub>50</sub>=103 мкМ±0,27 log единиц). Все эксперименты были выполнены в двух повторах.

Таблица 2

Изобретательность канонического пути	p-значение	понижающая регуляция	повышающая регуляция	без изменений
митохондриальная дисфункция	6,3×10 <sup>-13</sup>	14/171	2/171	0/171
окислительное фосфорилирование	7,9×10 <sup>-11</sup>	12/109	0/109	0/109
сиртуин сигнальный путь	2,3×10 <sup>-10</sup>	14/292	3/292	0/292
болезнь Гентингтона сигнальный путь	3,5×10 <sup>-5</sup>	8/250	2/250	0/250
деградация лейцина I	4,1×10 <sup>-15</sup>	1/9	2/9	0/9

GR6 сигнальный путь	0,00010	3/134	4/134	0/134
деградация глутамата II	0,00019	2/3	0/3	0/3
биосинтез аспартата	0,00019	2/3	0/3	0/3
деградация L-цистеина I	0,00038	2/4	0/4	0/4
mTOR сигнальный путь	0,00123	3/201	4/201	0/201

## ССЫЛКИ

- (1) Over, B.; Wetzel, S.; Grutter, C.; Nakai, Y.; Renner, S.; Rauh, D.; Waldmann, H. *Nat. Chem.* 2013, 5, 21-8.
- (2) Rodrigues, T.; Reker, D.; Schneider, P.; Schneider, G. *Nat. Chem.* 2016, 8, 531-41.
- (3) Clemons, P. A.; Bodycombe, N. E.; Carrinski, H. A.; Wilson, J. A.; Shamji, A. F.; Wagner, B. K.; Koehler, A. N.; Schreiber, S. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107, 18787-92.
- (4) Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015, 14, 111-29.
- (5) van Hattum, H.; Waldmann, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 11853-9.
- (6) Kapoor, S.; Waldmann, H.; Ziegler, S. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24, 3232-45.
- (7) Reker, D.; Perna, A. M.; Rodrigues, T.; Schneider, P.; Reutlinger, M.; Monch, B.; Koeberle, A.; Lamers, C.; Gabler, M.; Steinmetz, H.; Muller, R.; Schubert-Zsilavec, M.; Werz, O.; Schneider, G. *Nat. Chem.* 2014, 6, 1072-8.
- (8) Schneider, G.; Reker, D.; Chen, T.; Hauenstein, K.; Schneider, P.; Altmann, K. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 12408-11.
- (9) Rodrigues, T.; Reker, D.; Kunze, J.; Schneider, P.; Schneider, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 10516-20.
- (10) Reker, D.; Rodrigues, T.; Schneider, P.; Schneider, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014, 111, 4067-72.
- (11) Ratnayake, R.; Covell, D.; Ransom, T. T.; Gustafson, K. R.; Beutler, J. A. *Org. Lett.* 2009, 11, 57-60.
- (12) Akbulut, Y.; Gaunt, H. J.; Muraki, K.; Ludlow, M. J.; Amer, M. S.; Bruns, A.; Vasudev, N. S.; Radtke, L.; Willot, M.; Hahn, S.; Seitz, T.; Ziegler, S.; Christmann, M.; Beech, D. J.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 3787-91.
- (13) Carson, C.; Raman, P.; Tullai, J.; Xu, L.; Henault, M.; Thomas, E.; Yeola, S.; Lao, J.; McPate, M.; Verkuyl, J. M.; Marsh, G.; Sarber, J.; Amaral, A.; Bailey, S.; Lubicka, D.; Pham, H.; Miranda, N.; Ding, J.; Tang, H. M.; Ju, H.; Tranter, P.; Ji, N.; Krastel, P.; Jain, R. K.; Schumacher, A. M.; Loureiro, J. J.; George, E.; Berellini, G.; Ross, N. T.; Bushell, S. M.; Erdemli, G.; Solomon, J. M. *PLoS One* 2015, 10, e0127498.
- (14) Friedrich, L.; Rodrigues, T.; Neuhaus, C. S.; Schneider, P.; Schneider, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 6789-92.
- (15) Rodrigues, T.; Sieglitz, F.; Somovilla, V. J.; Cal, P. M.; Galione, A.; Corzana, F.; Bernardes, G. J. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 11077-81.

- (16) Raj, L.; Ide, T.; Gurkar, A. U.; Foley, M.; Schenone, M.; Li, X.; Tolliday, N. J.; Golub, T. R.; Carr, S. A.; Shamji, A. F.; Stern, A. M.; Mandinova, A.; Schreiber, S. L.; Lee, S. W. *Nature* 2011, 475, 231-4.
- (17) Adams, D. J.; Dai, M.; Pellegrino, G.; Wagner, B. K.; Stern, A. M.; Shamji, A. F.; Schreiber, S. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, 109, 15115-20.
- (18) Bharadwaj, U.; Eckols, T. K.; Kolosov, M.; Kasembeli, M. M.; Adam, A.; Torres, D.; Zhang, X.; Dobrolecki, L. E.; Wei, W.; Lewis, M. T.; Dave, B.; Chang, J. C.; Landis, M. D.; Creighton, C. J.; Mancini, M. A.; Twardy, D. J. *Oncogene* 2015, 34, 1341-53.
- (19) Pertwee, R. G. *Br. J. Pharmacol.* 2008, 153, 199-215.
- (20) Baell, J. B.; Holloway, G. A. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 2719-40.
- (21) Walters, W. P.; Ajay; Murcko, M. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999, 3, 384-7.
- (22) Witte, D. G.; Cassar, S. C.; Masters, J. N.; Esbenshade, T.; Hancock, A. A. *J. Biomol. Screen.* 2002, 7, 466-75.
- (23) Yang, S.; Yang, F.; Wei, N.; Hong, J.; Li, B.; Luo, L.; Rong, M.; Yarov-Yarovoy, V.; Zheng, J.; Wang, K.; Lai, R. *Nat. Commun.* 2015, 6, 8297.
- (24) Shoemaker, R. H. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6, 813-23.
- (25) Yuan, H.; Houck, K. L.; Tian, Y.; Bharadwaj, U.; Hull, K.; Zhou, Z.; Zhu, M.; Wu, X.; Twardy, D. J.; Romo, D.; Fu, X.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Dong, J. F. *PLoS One* 2015, 10, e0143964.
- (26) Zheng, J.; Son, D. J.; Gu, S. M.; Woo, J. R.; Ham, Y. W.; Lee, H. P.; Kim, W. J.; Jung, J. K.; Hong, J. T. *Sci. Rep.* 2016, 6, 26357.
- (27) Mootha, V. K.; Lindgren, C. M.; Eriksson, K. F.; Subramanian, A.; Sihag, S.; Lehar, J.; Puigserver, P.; Carlsson, E.; Ridderstrale, M.; Laurila, E.; Houstis, N.; Daly, M. J.; Patterson, N.; Mesirov, J. P.; Golub, T. R.; Tamayo, P.; Spiegelman, B.; Lander, E. S.; Hirschhorn, J. N.; Altshuler, D.; Groop, L. C. *Nat. Genet.* 2003, 34, 267-73.
- (28) Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V. K.; Mukherjee, S.; Ebert, B. L.; Gillette, M. A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S. L.; Golub, T. R.; Lander, E. S.; Mesirov, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, 102, 15545-50.
- (29) Hayden, M. S.; West, A. P.; Ghosh, S. *Oncogene* 2006, 25, 6758-80.
- (30) The GTEx Consortium. *Nat. Genet.* 2013, 45, 580-5.
- (31) The GTEx Consortium. *Science* 2015, 348, 648-60.
- (32) Tomida, S.; Takeuchi, T.; Shimada, Y.; Arima, C.; Matsuo, K.; Mitsudomi, T.; Yatabe, Y.; Takahashi, T. *J. Clin. Oncol.* 2009, 27, 2793-9.
- (33) Baty, F.; Facompre, M.; Kaiser, S.; Schumacher, M.; Pless, M.; Bubendorf, L.; Savic, S.; Marrer, E.; Budach, W.; Buess, M.; Kehren, J.; Tamm, M.; Brutsche, M. H. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010, 181, 181-8.
- (34) Rousseaux, S.; Debernardi, A.; Jacquiau, B.; Vitte, A. L.; Vesin, A.; Nagy-Mignotte, H.; Moro-Sibilot, D.; Brichon, P. Y.; Lantuejoul, S.; Hainaut, P.; Laffaire, J.; de Reynies, A.; Beer, D. G.; Timsit, J. F.; Brambilla, C.; Brambilla, E.; Khochbin, S. *Sci. Transl. Med.* 2013, 5, 186ra66.

(35) Girard, L.; Rodriguez-Canales, J.; Behrens, C.; Thompson, D. M.; Botros, I. W.; Tang, H.; Xie, Y.; Rekhtman, N.; Travis, W. D.; Wistuba, II; Minna, J. D.; Gazdar, A. F. *Clin. Cancer Res.* 2016, 22, 4880-9.

(36) Peralvarez-Marin, A.; Donate-Macian, P.; Gaudet, R. *FEBS J.* 2013, 280, 5471-87.

(37) Gambade, A.; Zreika, S.; Gueguinou, M.; Chourpa, I.; Fromont, G.; Bouchet, A. M.; Burlaud-Gaillard, J.; Potier-Cartereau, M.; Roger, S.; Aucagne, V.; Chevalier, S.; Vandier, C.; Goupille, C.; Weber, G. *Oncotarget* 2016, 7, 23785-800.

(38) Monet, M.; Gkika, D.; Lehen'kyi, V.; Pourtier, A.; Vanden Abeele, F.; Bidaux, G.; Juvin, V.; Rassendren, F.; Humez, S.; Prevarsakaya, N. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1793, 528-39.

(39) Liberati, S.; Morelli, M. B.; Amantini, C.; Farfariello, V.; Santoni, M.; Conti, A.; Nabissi, M.; Cascinu, S.; Santoni, G. *Cells* 2014, 3, 112-28.

(40) Ma, W.; Li, C.; Yin, S.; Liu, J.; Gao, C.; Lin, Z.; Huang, R.; Huang, J.; Li, Z. *Free Radic. Biol. Med.* 2015, 89, 1003-13.

(41) Transfection of HepG2 cells with the TRPV2-RFP fusion protein, and TRPV2 gene silencing with siRNA were not successful. Taking into account reports correlating TRPV2 expression with migration, our data supports target tractability and provides a rationale for hit-to-lead and lead optimization campaigns.

(42) Dorsam, R. T.; Gutkind, J. S. *Nat. Rev. Cancer* 2007, 7, 79-94.

(43) O'Hayre, M.; Salanga, C. L.; Handel, T. M.; Allen, S. J. *Biochem. J.* 2008, 409, 635-49.

(44) Wu, J.; Xie, N.; Zhao, X.; Nice, E. C.; Huang, C. *Cancer Genomics Proteomics* 2012, 9, 37-50.

(45) Huang, C.; Jacobson, K.; Schaller, M. D. *J. Cell. Sci.* 2004, 117, 4619-28.

(46) Schwab, A.; Fabian, A.; Hanley, P. J.; Stock, C. *Physiol. Rev.* 2012, 92, 1865-913.

(47) ENCODE Project Consortium. *Nature* 2012, 489, 57-74.

(48) Rodrigues, T.; Sieglitz, F.; Bernardes, G. J. *Chem. Soc. Rev.* 2016, 45, 6130-7.

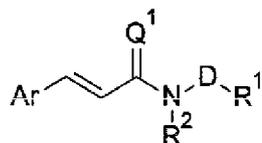
### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, характеризующегося экспрессией ваниллоидного канала 2 с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPV2), включающий: введение соединения пиперлонгумина пациенту, нуждающемуся в этом.

2. Способ по п.1, где соединение пиперлонгумина является обратимым антагонистом TRPV2.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где соединение пиперлонгумина представляет собой пиперлонгумин или его аналог, производное или пролекарство.

4. Способ по п. 3, где соединение пиперлонгумина имеет формулу 1:



где Q<sup>1</sup> представляет собой O или S,

-Ar представляет собой необязательно замещенную арильную группу,

-D- выбран из -C(O)-, -C(S)-, -CH(OH)- и -CH(SH)-, и

-R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup>, вместе с -N-D-, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, или -R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup> каждый независимо выбран из водорода и необязательно замещенного алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклила и арила,

и их соли, сольваты и защищенные формы.

5. Способ по п.4, где Q<sup>1</sup> представляет собой O.

6. Способ по п. 3 или п. 5, где -D- представляет собой -C(O)- или -(S)-, такую как -C(O)-.

7. Способ по любому из п.п. 4-6, где -R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup>, вместе с -N-D-, к которому они присоединены, образуют необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, такое как гетероциклическое кольцо.

8. Способ по п. 7, где гетероциклическое кольцо является частично ненасыщенным.

9. Способ по п. 8, где -D- представляет собой -C(O)- или -C(S)-, и ненасыщенность конъюгирована с -C(O)- или -C(S)-.

10. Способ по любому из п.п. 7-9, где гетероциклическое кольцо представляет собой одиночное кольцо, такое как 4-9-членное кольцо, такое как 4-6-членное кольцо, такое как 5- или 6-членное кольцо, такое как 6-членное кольцо.

11. Способ по любому из п.п. 7-10, где -R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup>, вместе с -ND-, к которому они присоединены, образуют α,β-ненасыщенный δ-лактам, такой как где -R<sup>1</sup> и -R<sup>2</sup>, вместе с -ND-, к которому они присоединены, представляет собой 5,6-дигидропиридин-2-он-1-ил.

12. Способ по любому из п.п. 4-11, где Ar- представляет собой необязательно замещенную карбоарильную группу, такую как фенил, или необязательно замещенную гетероарильную группу, такую как пиридинил, пиримидинил, фуранил, тиофенил и пирролил.

13. Способ по п. 12, где Ar- представляет собой необязательно замещенный фенил.
14. Способ по любому из п.п. 4-13, где Ar- представляет собой арильную группу, необязательно замещенную одной или несколькими группами, такими как одна, две или три группы, выбранные из галогена, циано,  $-R^{S1}$ ,  $-OH$ ,  $-OR^{S1}$ ,  $-SH$ ,  $-SR^{S1}$ ,  $-NH_2$ ,  $-NHR^{S1}$ ,  $-NR^{S1}R^{S2}$ ,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ ,  $-CONHR^{S1}$ ,  $-CONR^{S1}R^{S2}$ ,  $-NHCOR^{S1}$ ,  $-N(R^{S1})COR^{S1}$ , где каждый  $-R^{S1}$  и каждый  $-R^{S2}$  независимо представляют собой алкил, алкенил, алкинил, арил или аралкил, которые необязательно замещены галогеном, или  $-R^{S1}$  и  $-R^{S2}$  могут вместе образовывать гетероциклическое кольцо.
15. Способ по п. 14, где Ar- представляет собой арильную группу, необязательно замещенную одной или несколькими группами, такими как одна, две или три группы, выбранные из  $-OH$ ,  $-OR^{S1}$ ,  $-SH$  и  $-SR^{S1}$ , такие как  $-SR^{S1}$  и  $-OR^{S1}$ , такие как  $-OR^{S1}$ .
16. Способ по любому из п.п.4-15, где Ar- представляет собой триалкоксифенил, такой как триметоксифенил.
17. Способ по любому из п.п.1-16, где соединение пиперлонгумина представляет собой пиперлонгумин.
18. Способ по любому из п.п. 1-17, где пациент предварительно идентифицирован как имеющий или имеющий риск развития рака, характеризующегося экспрессией TRPV2.
19. Способ по любому из п.п. 1-17, дополнительно включающий идентификацию пациента как имеющего риск или подверженного по риску рака, характеризующегося экспрессией TRPV2 перед указанным введением.
20. Способ по любому из п.п. 1-19, где одна или несколько раковых клеток у пациента имеют повышенную экспрессию TRPV2 относительно контрольных клеток.
21. Способ по любому из п.п. 1-20, где экспрессия TRPV2 в одной или нескольких раковых клетках у пациента превышает предварительно определенное пороговое значение.
22. Способ по любому из п.п. 1-21, где рак представляет собой рак кожи, рак молочной железы, рак простаты, рак мозга или рак крови.
23. Способ по п. 22, где рак головного мозга представляет собой глиобластому.
24. Способ по п. 23, где глиобластома является первичной или рецидивирующей.
25. Способ по любому из п.п. 1-24, где рак представляет собой метастатический рак.
26. Способ по любому из п.п. 1-25, где соединение пиперлонгумина вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.
27. Способ по п. 26, где второе терапевтическое средство представляет собой противораковое соединение.
28. Способ по п. 27, где противораковое соединение выбрано из антрациклина, цитарабина, винкристина, L-аспарагиназы, циклофосфамида, фибромуна, дакарбазина, метотрексата и 6-меркаптопурина, хлорамбуцила, алкилирующего средства, циклофосфамида, кортикостероидов, иматиниба, кладрибина, пентостатина, ритуксимаба,

хлорамбуцила, таксана и доксорубицина.

29. Способ по любому из п.п. 1-25, где соединение пиперлонгумина вводят в комбинации с лучевой терапией.

30. Способ по любому из п.п. 1-29, где соединение пиперлонгумина инкапсулировано в гидрогель.

31. Способ по п. 30, где гидрогель представляет собой циклодекстрин.

32. Соединение пиперлонгумина для применения в способе лечения рака, характеризующегося экспрессией ваниллоидного канала 2 с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPV2), по любому из п.п.1-31.

33. Применение соединения пиперлонгумина в изготовлении лекарственного средства для применения в способе лечения рака, характеризующегося экспрессией ваниллоидного канала 2 с транзиторным рецепторным потенциалом (TRPV2), по любому из п.п.1-31.

34. Соединение пиперлонгумина для применения по п.32 или п.33, где соединение пиперлонгумина инкапсулировано в циклодекстрин.

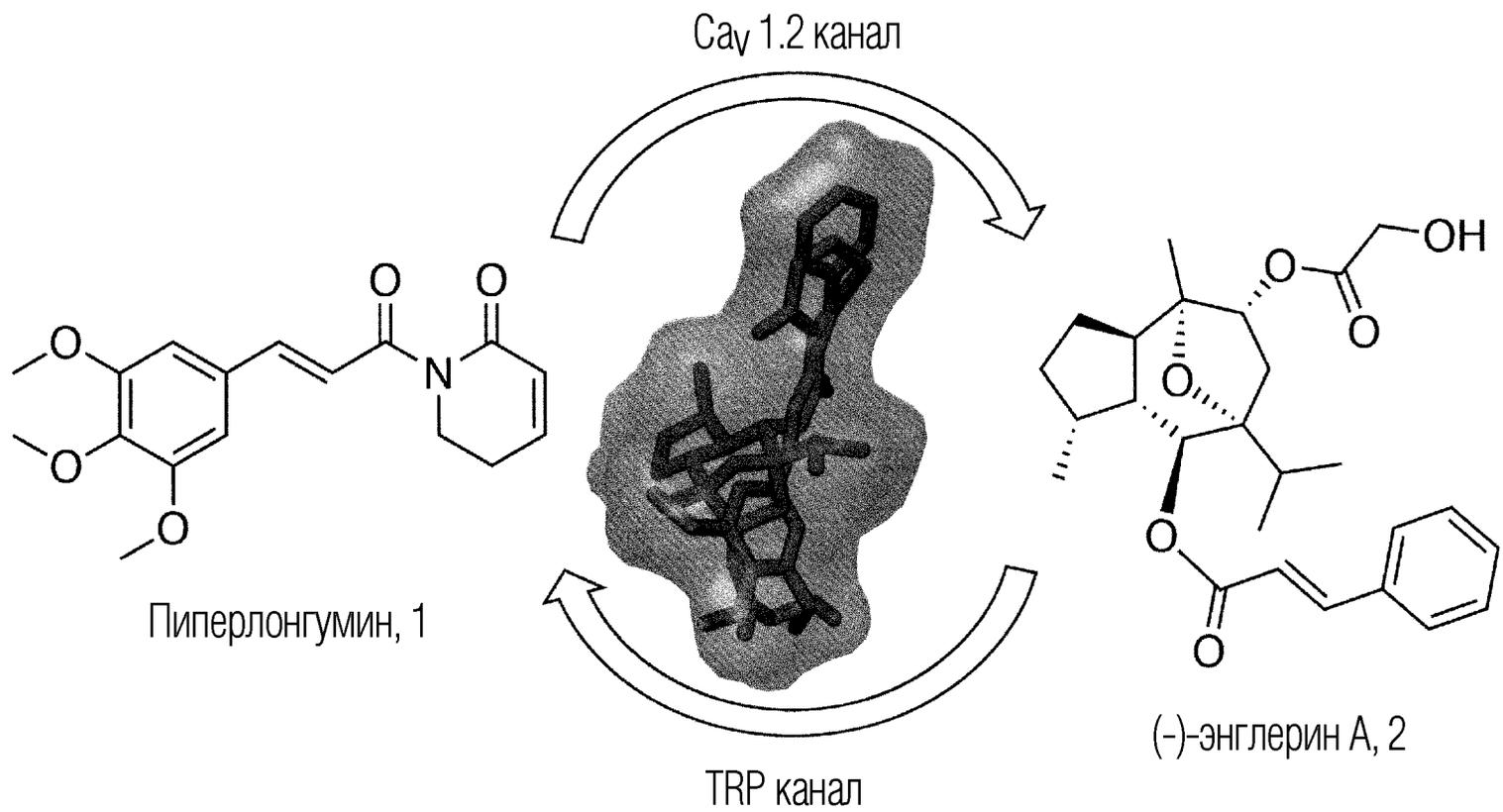
35. Соединение пиперлонгумина для применения или применения по п.34, где инкапсулированное соединение пиперлонгумина содержится в гидрогеле.

36. Способ выбора больного раком для лечения соединением пиперлонгумина, включающий

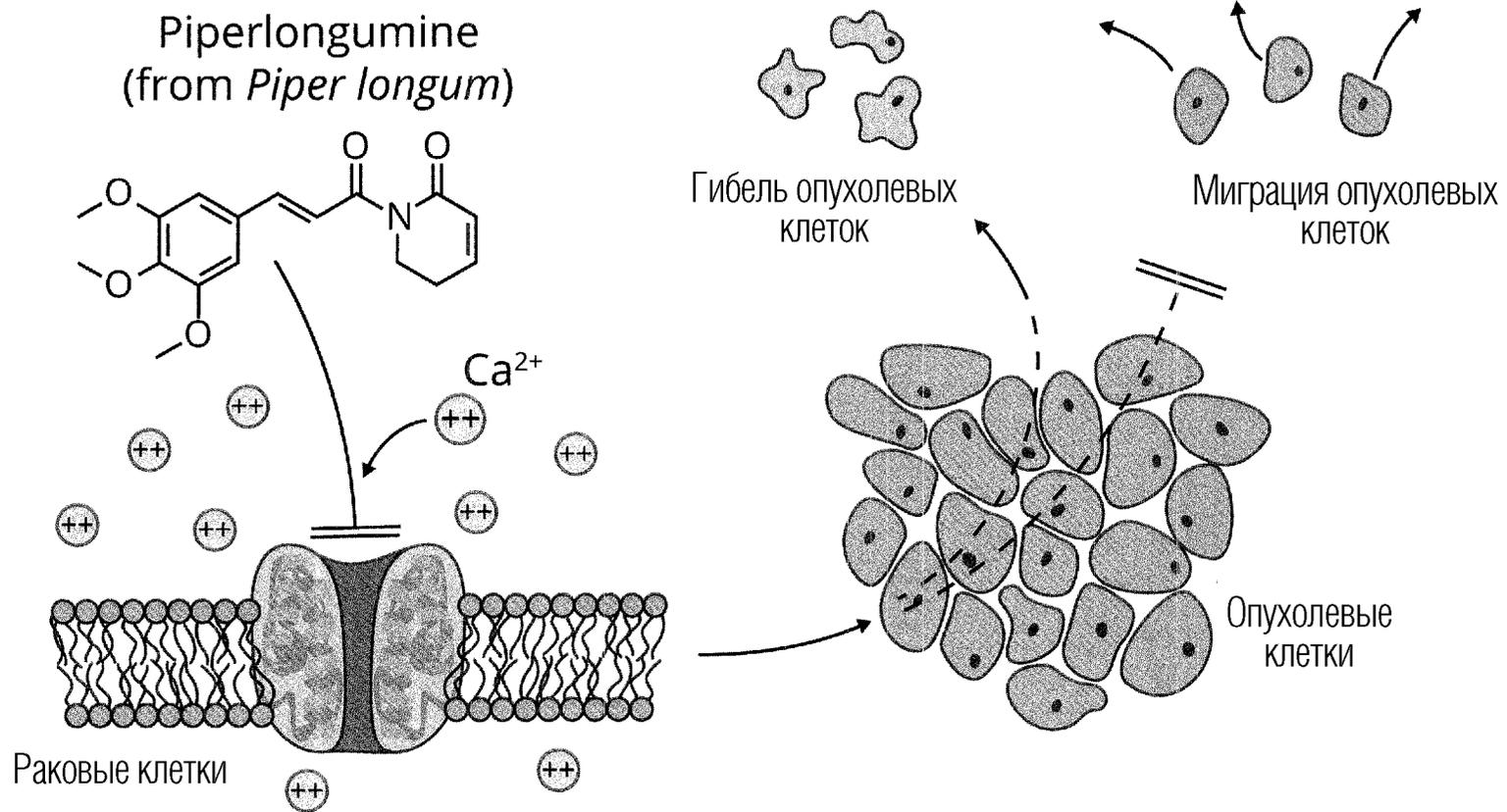
предоставление образца раковых клеток от больного раком,  
определение наличия экспрессии TRPV2 в раковых клетках и  
отбор больного раком с раковыми клетками, которые экспрессируют TRPV2, для  
лечения соединением пиперлонгумина.

37. Способ прогнозирования рака у пациента, включающий  
предоставление образца раковых клеток от больного раком, и,  
определение уровня экспрессии TRPV2 в раковых клетках, причем уровень  
экспрессии TRPV2 является показателем прогноза пациента.

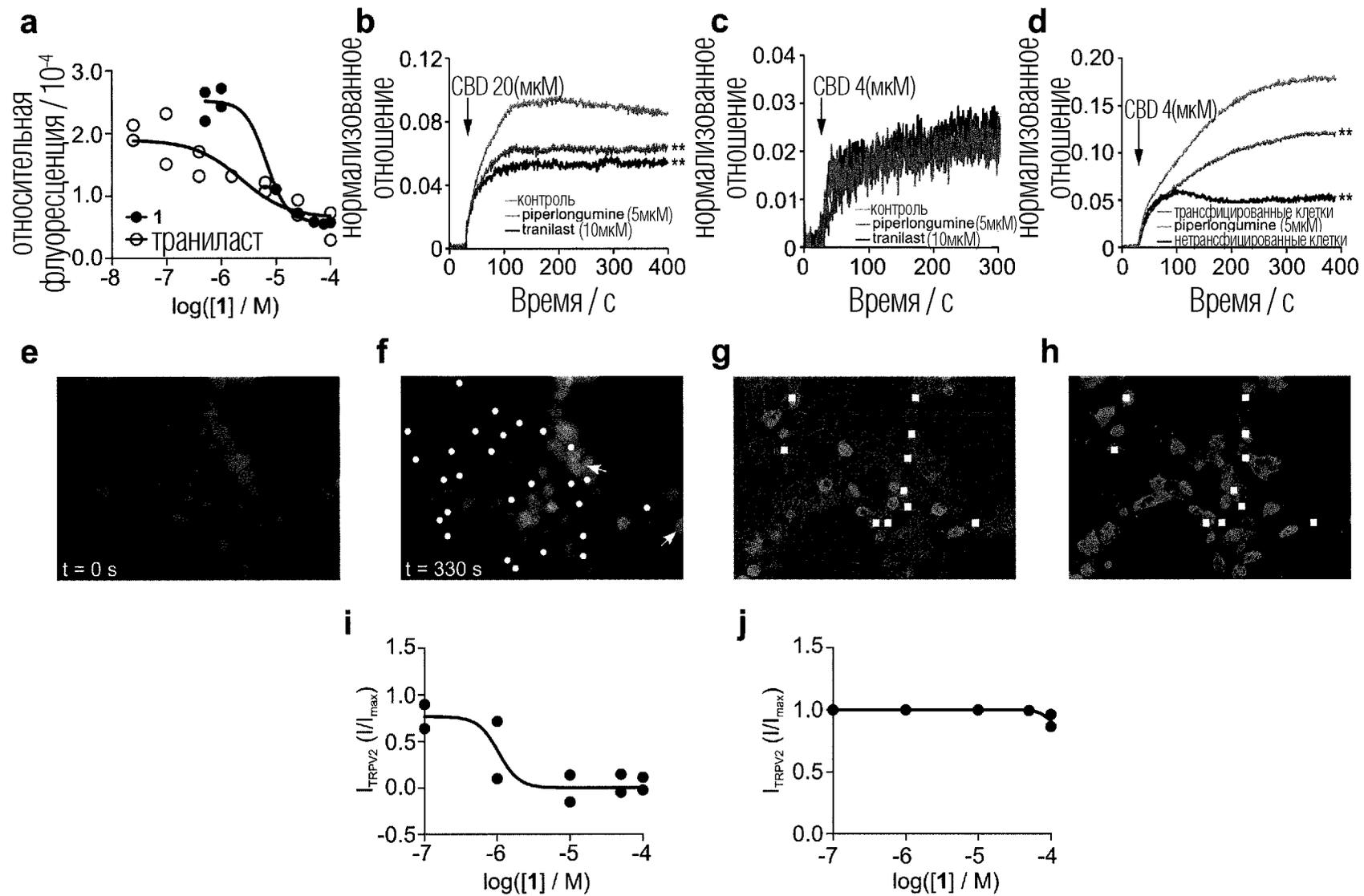
По доверенности



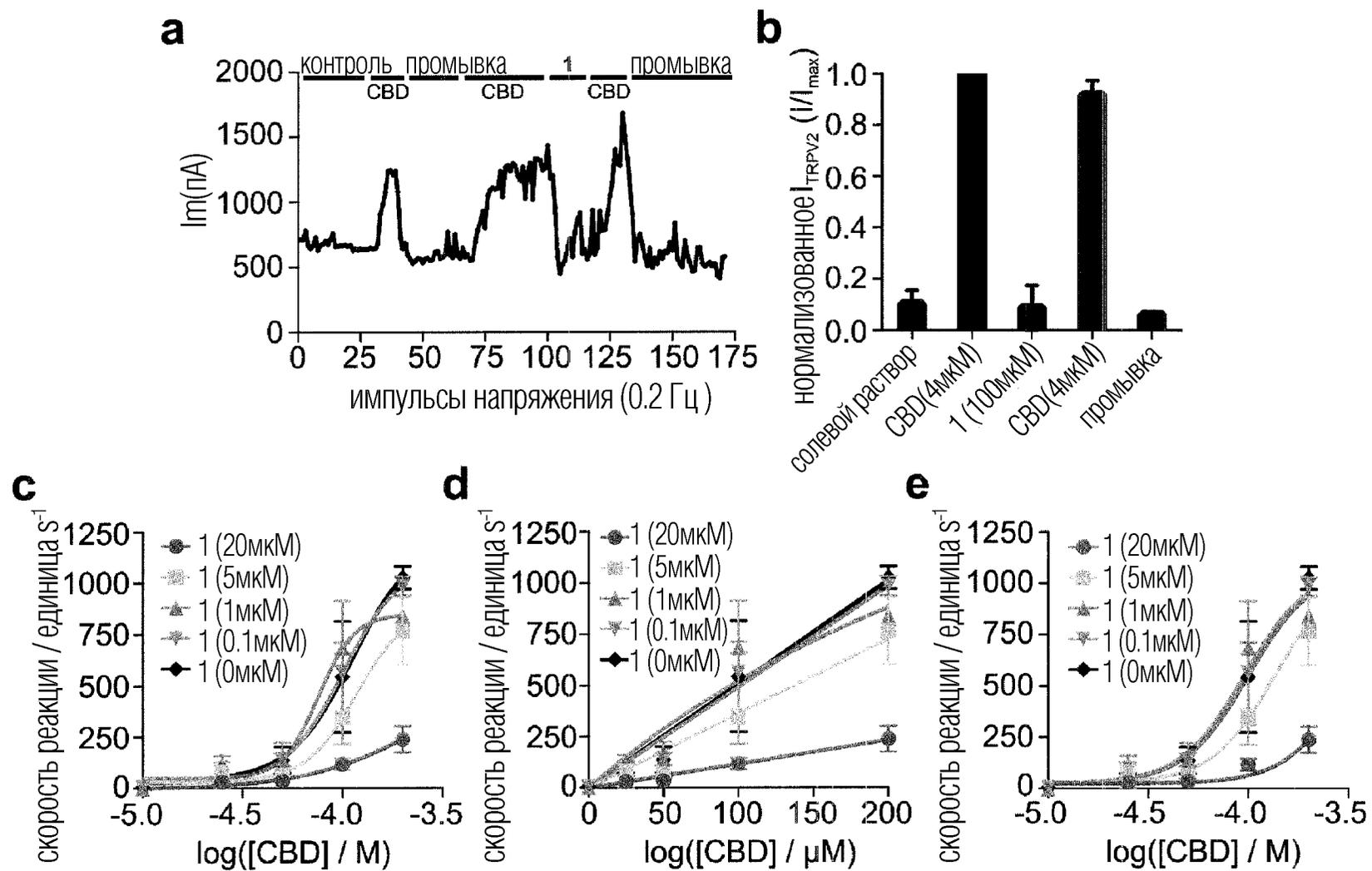
ФИГ. 1А



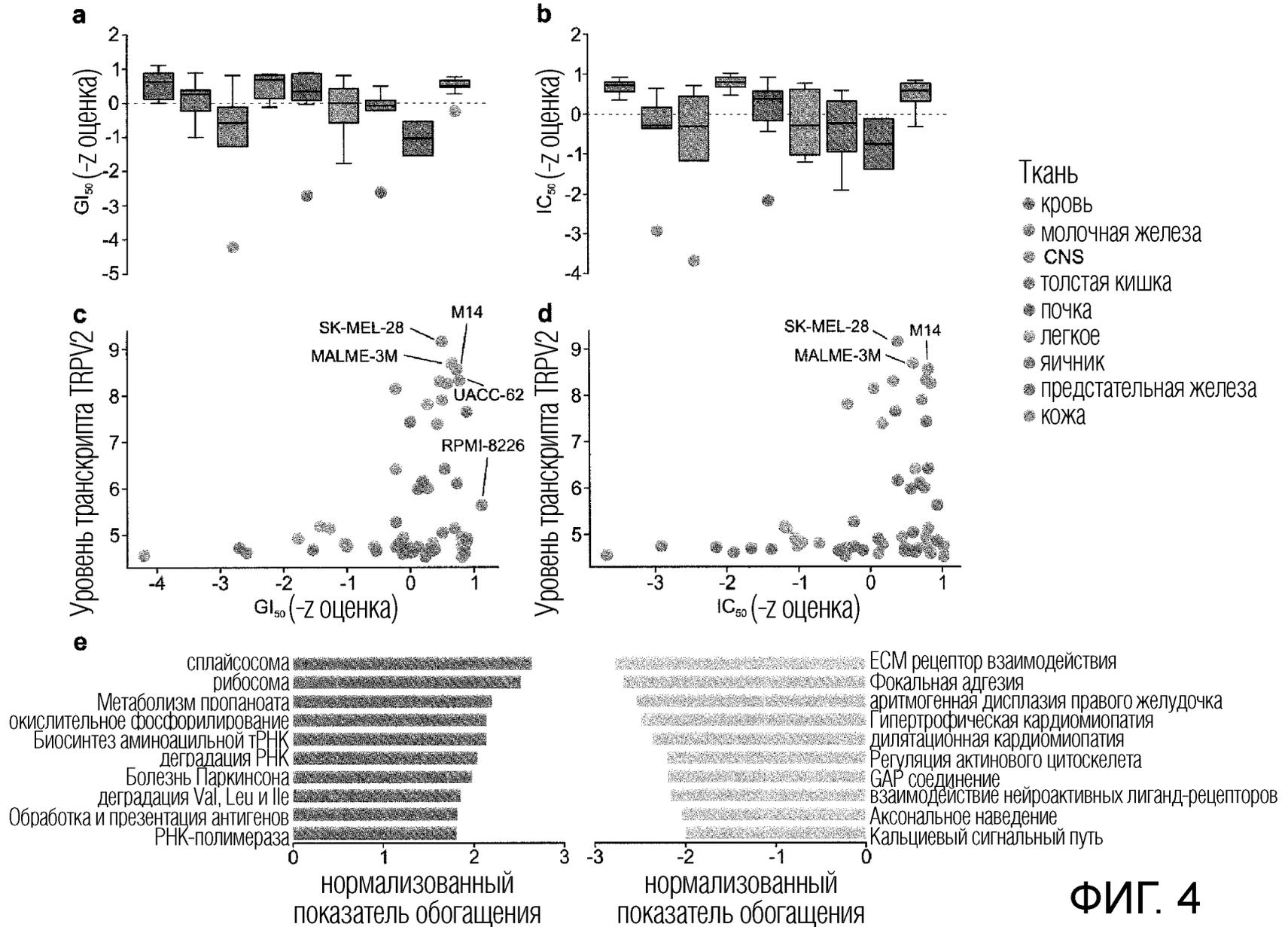
ФИГ. 1В



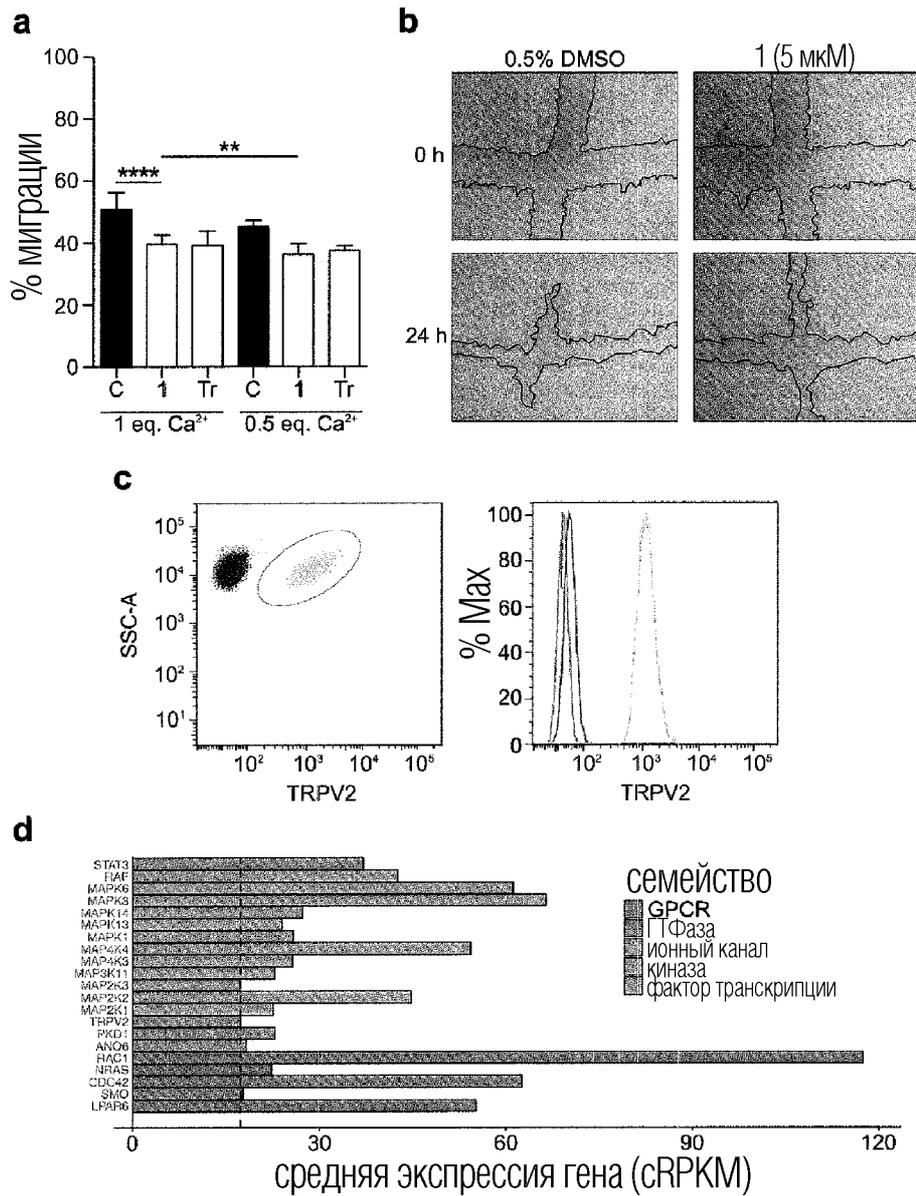
ФИГ. 2



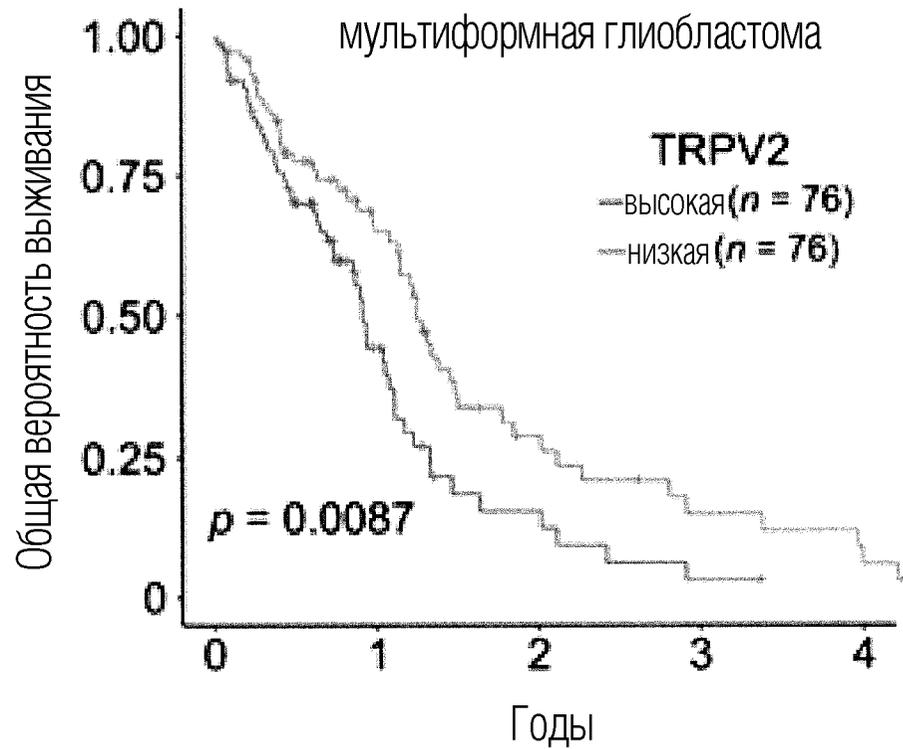
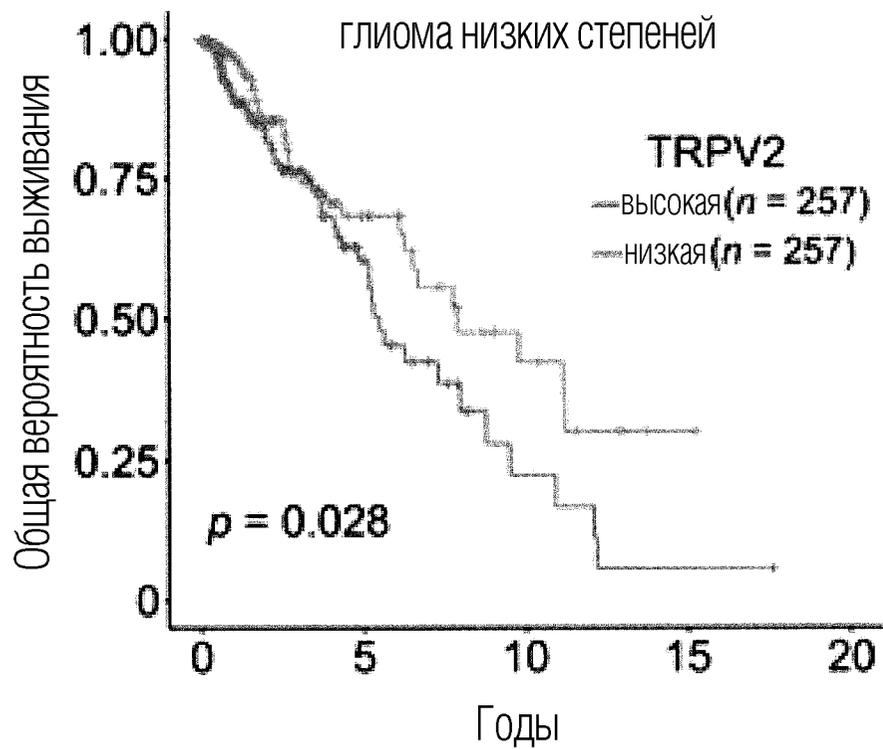
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6

глиома низких степеней

мультиформная глиобластома

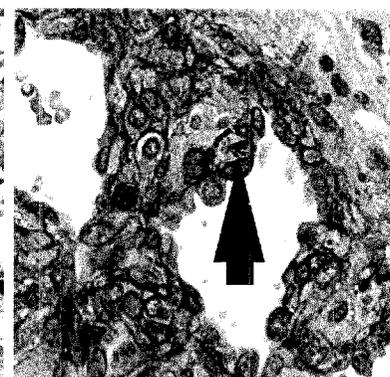
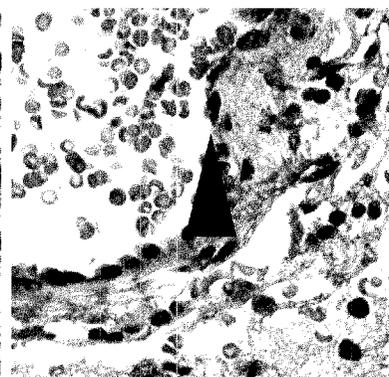
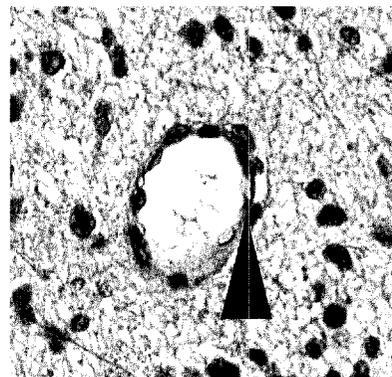
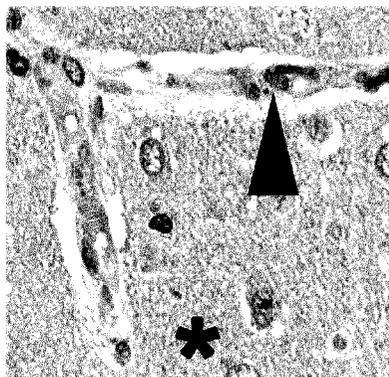
Край опухоли

степень II

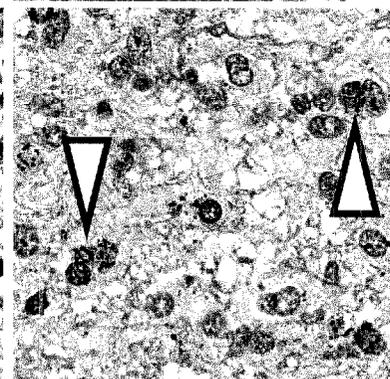
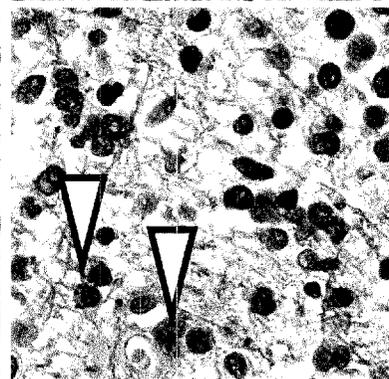
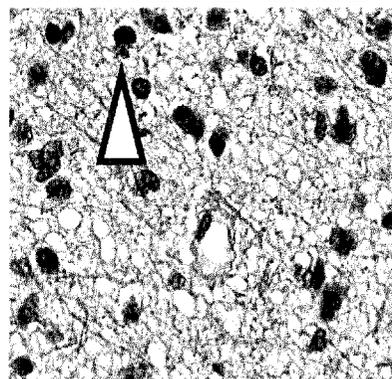
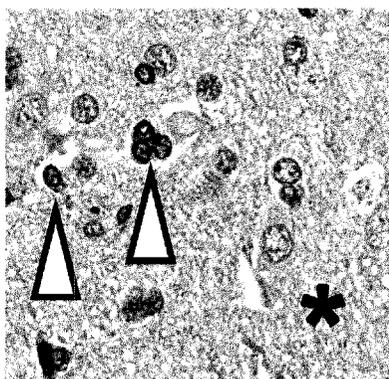
степень III

степень IV

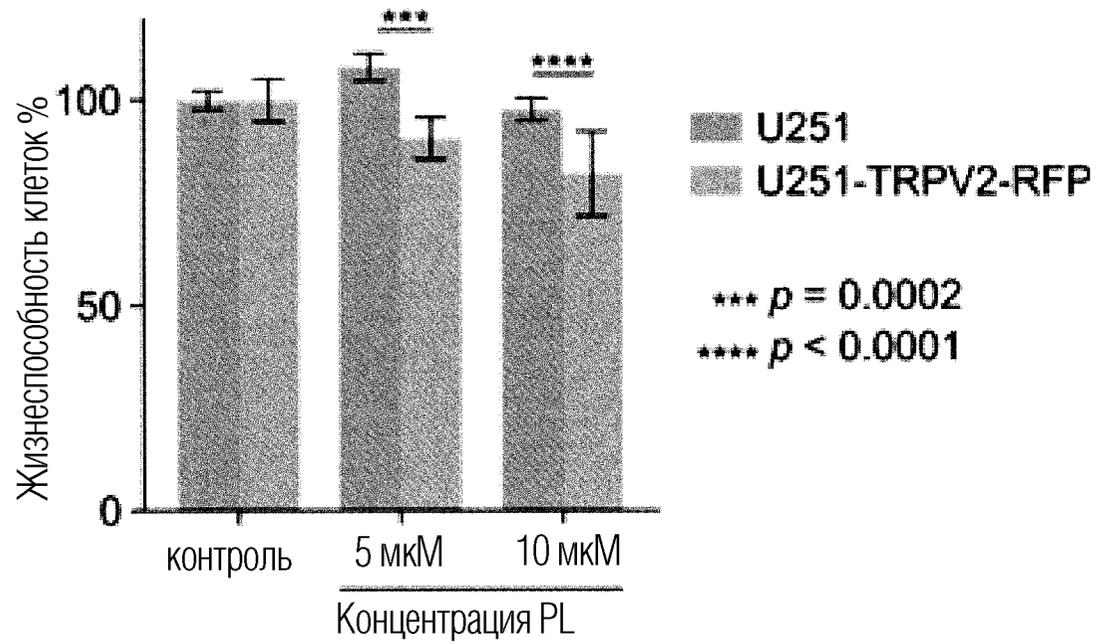
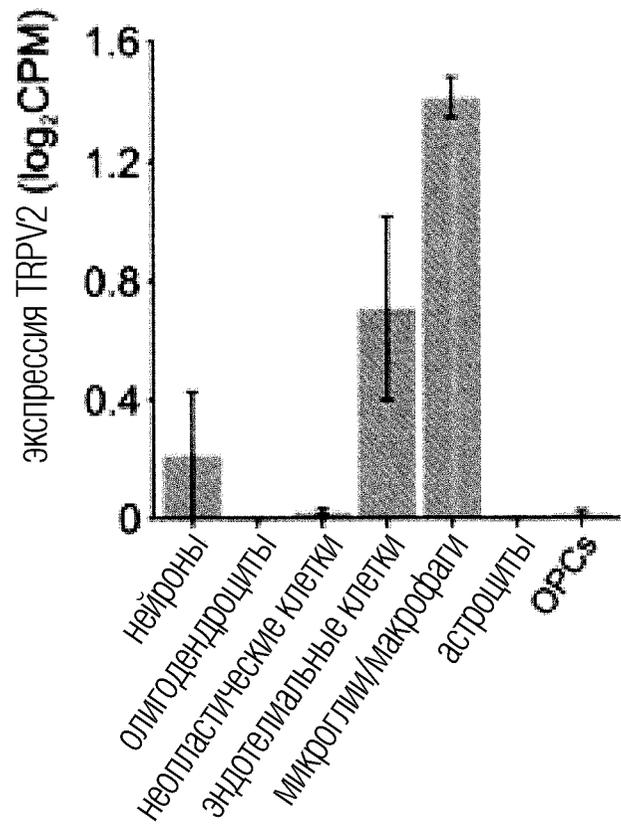
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ



ГЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ



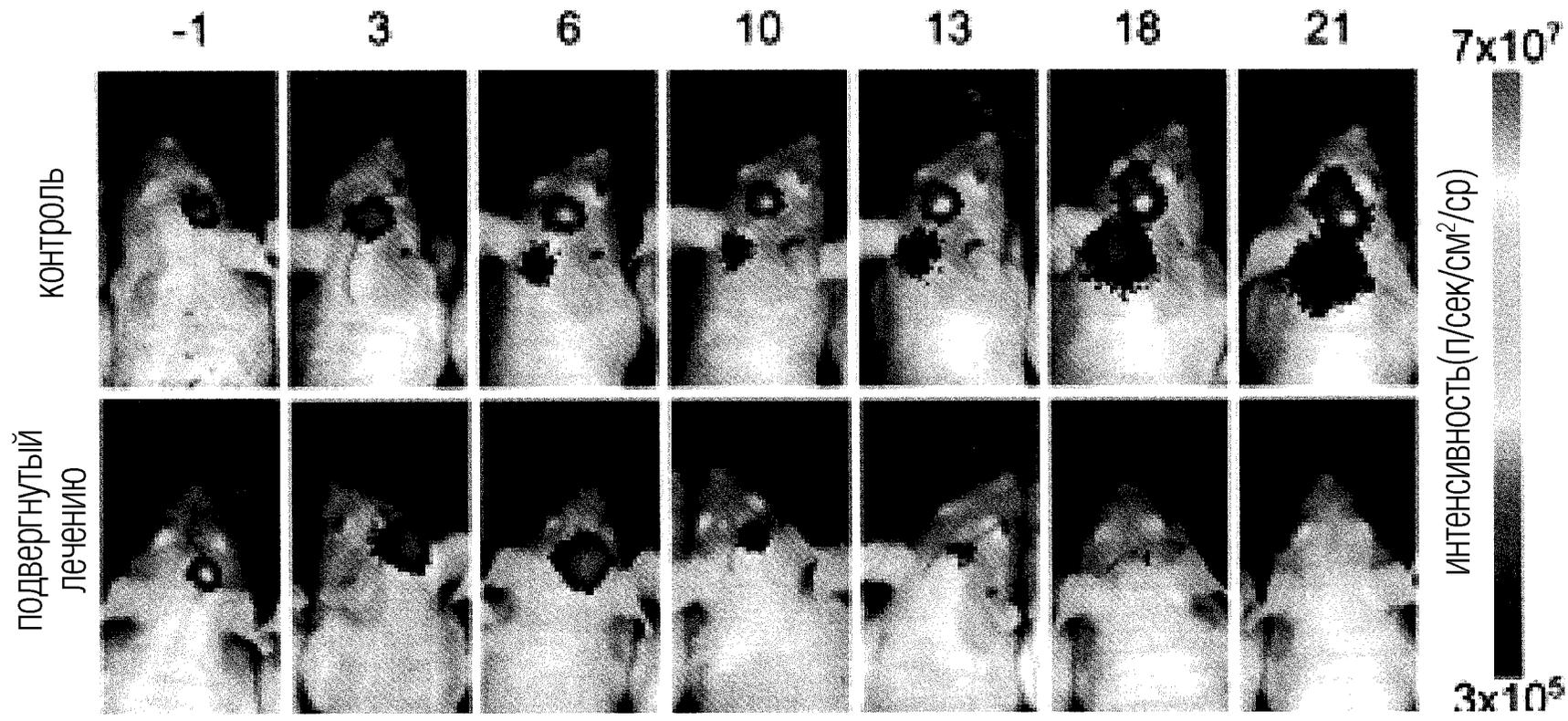
ФИГ. 7



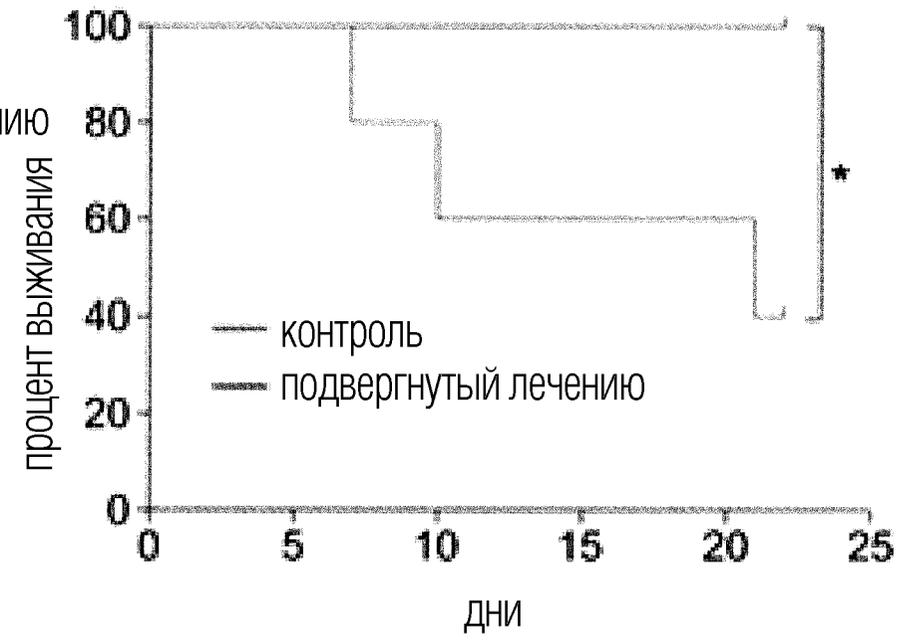
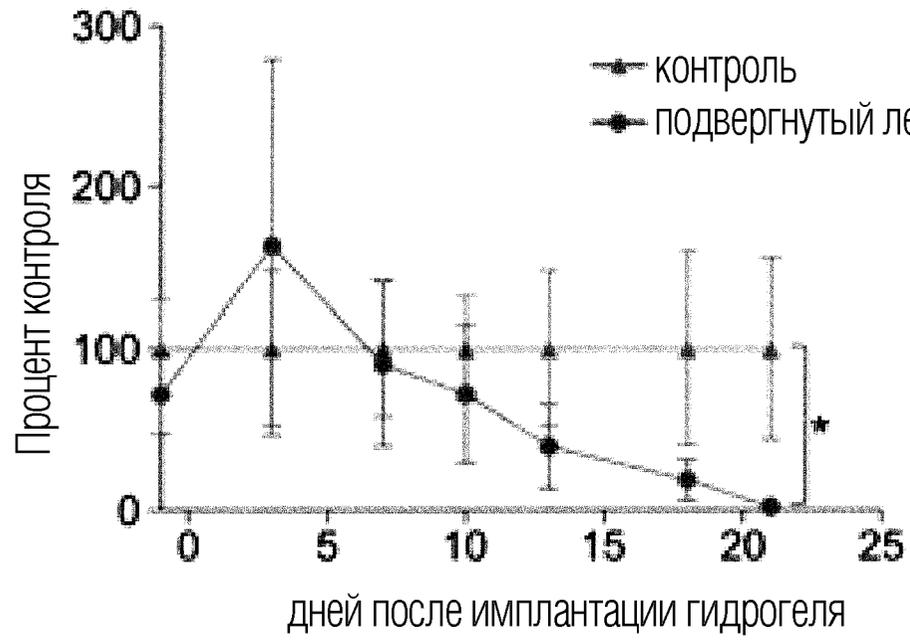
ФИГ. 8



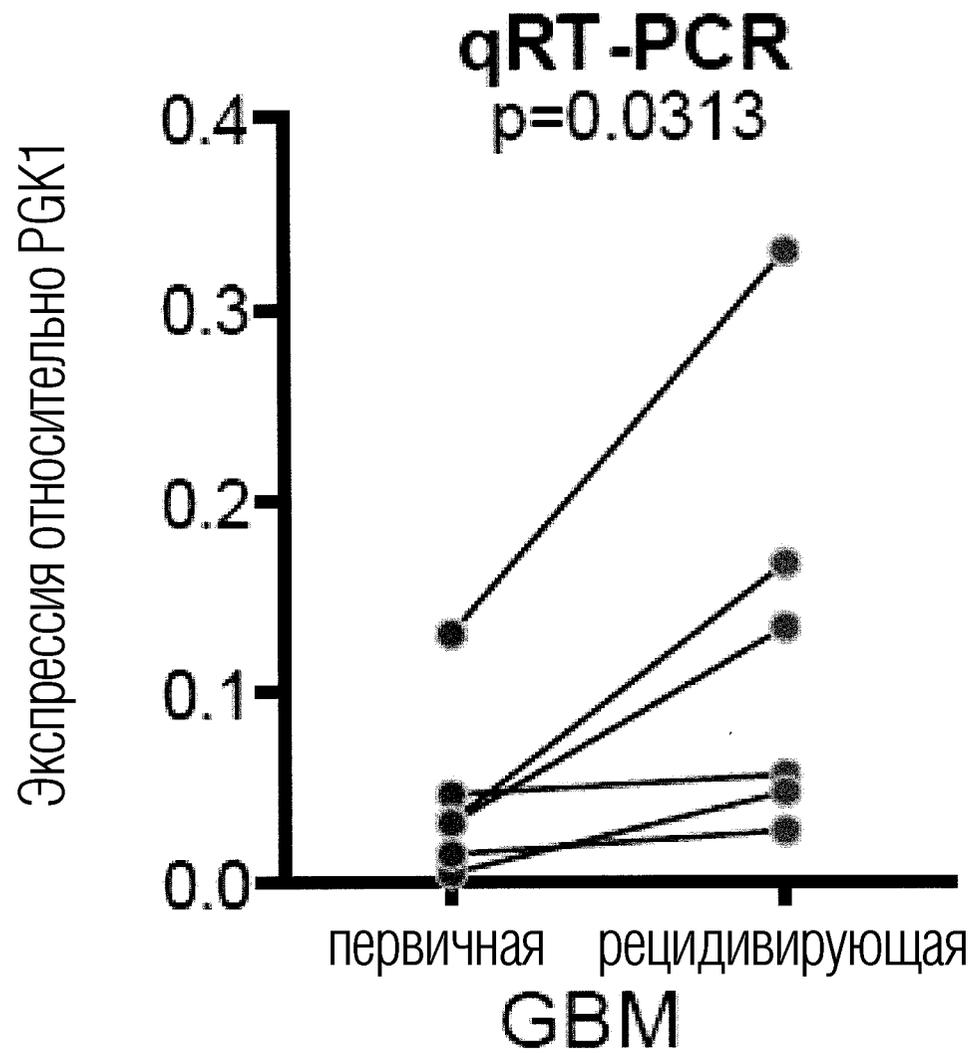
ФИГ. 9



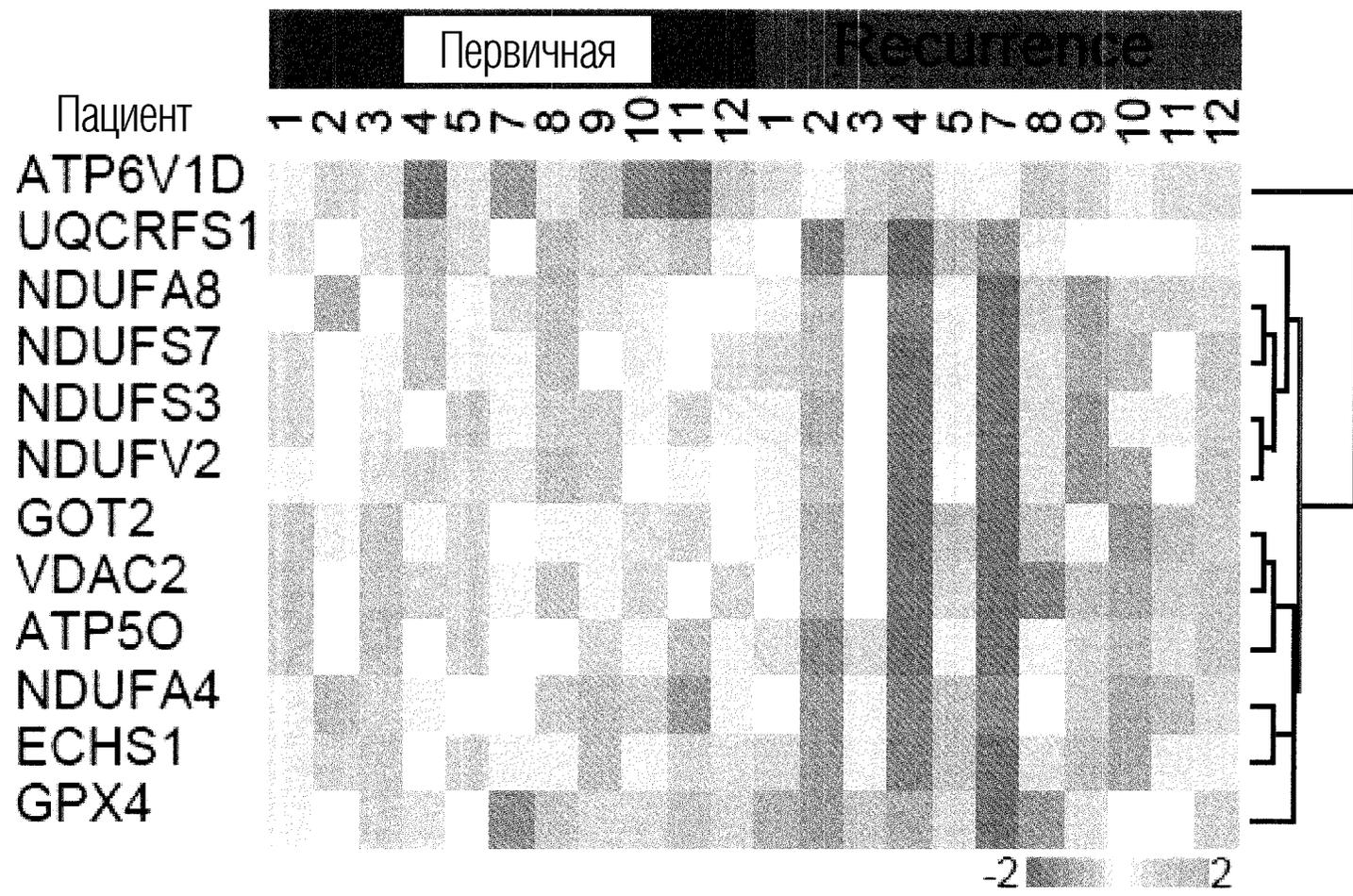
ФИГ. 10



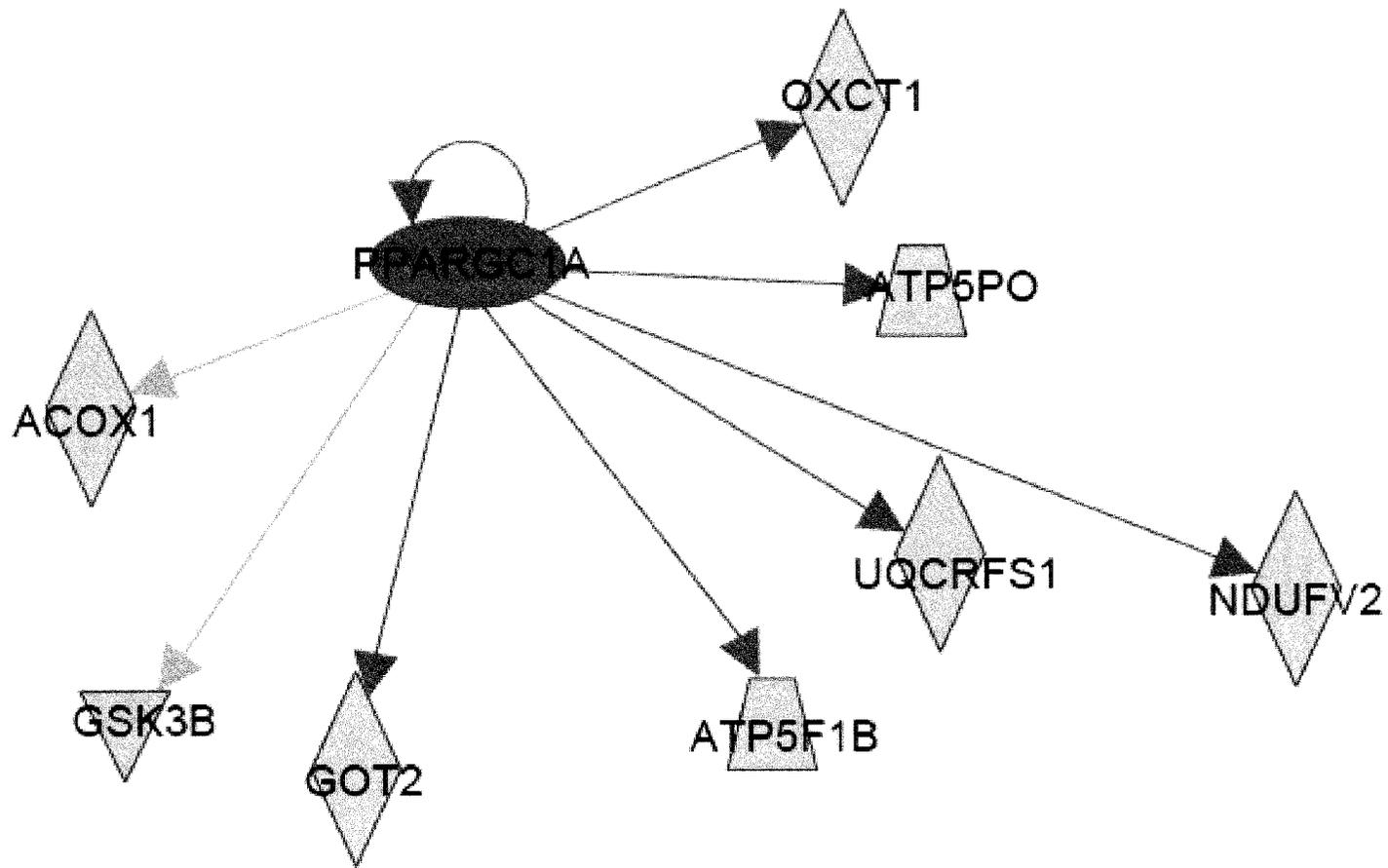
ФИГ. 11



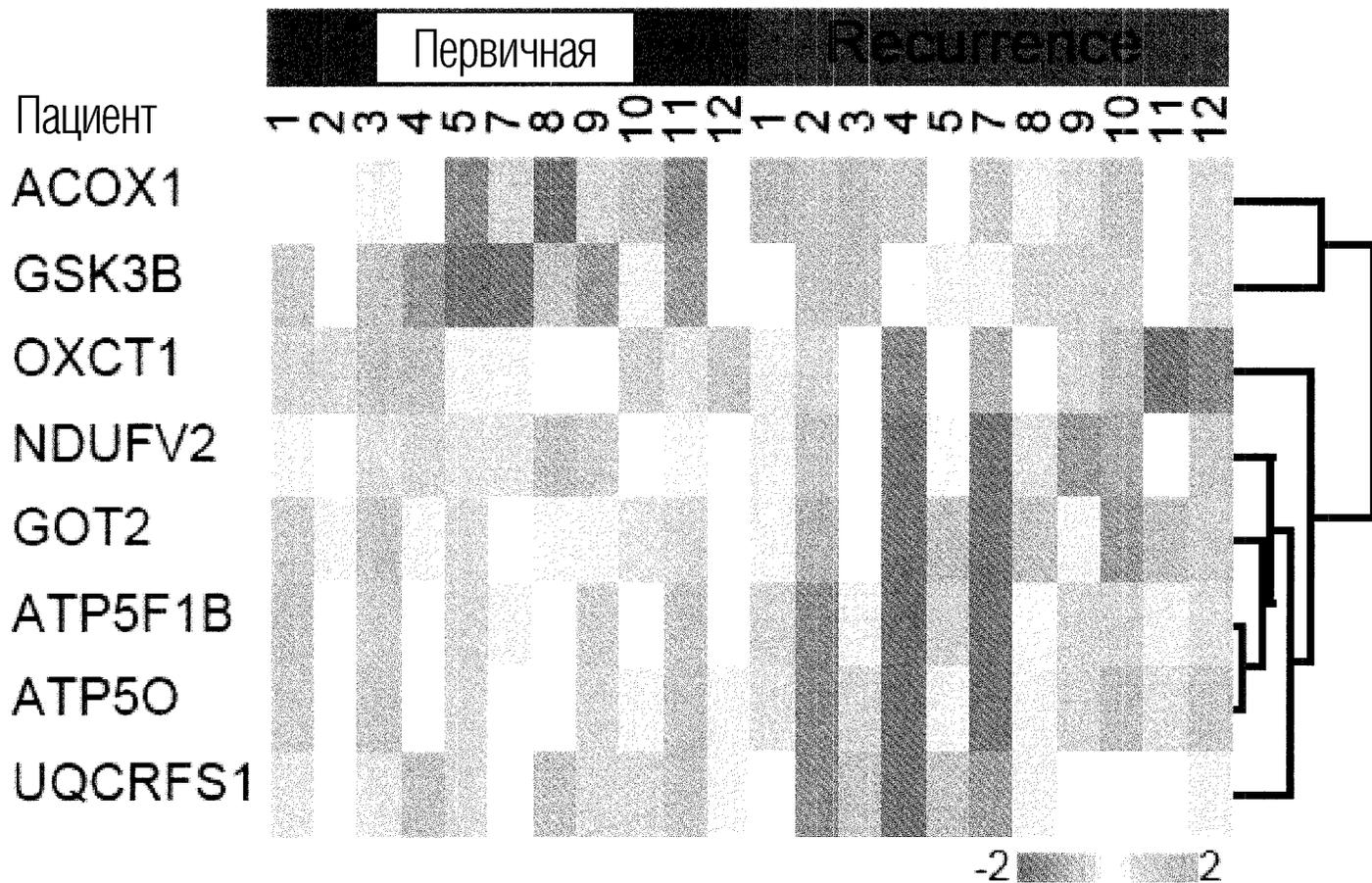
ФИГ. 12



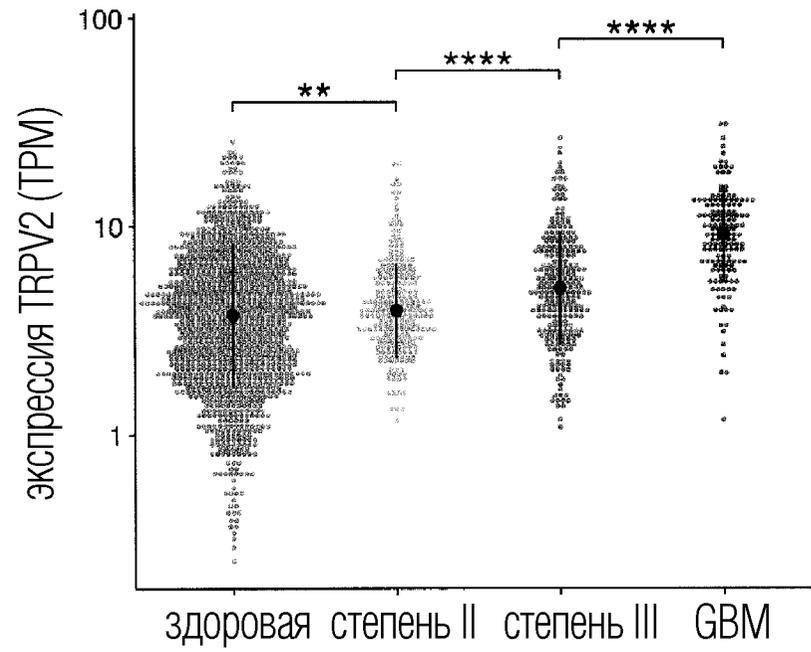
ФИГ. 13



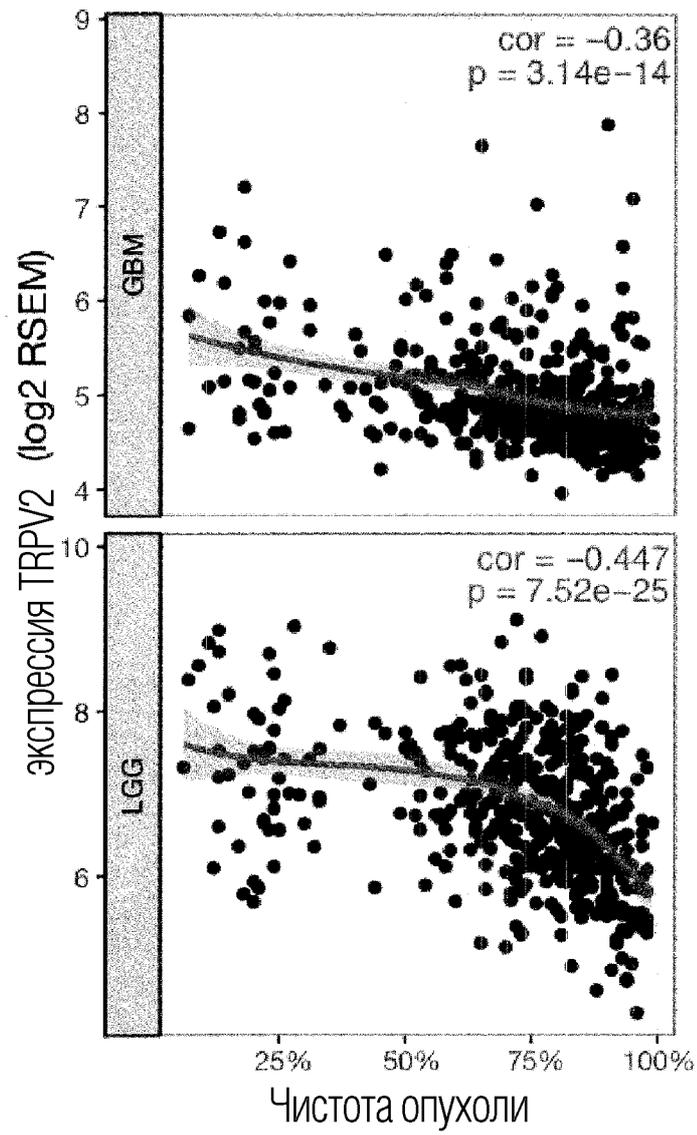
ФИГ. 14



ФИГ. 15



ФИГ. 16



ФИГ. 17