

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091519** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.12

(51) Int. Cl. *A61K 47/62* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.19

**(54) БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ
СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К EphA2**

(31) 1721259.8; 1804102.0; 1818603.1

(32) 2017.12.19; 2018.03.14; 2018.11.14

(33) GB

(86) PCT/GB2018/053678

(87) WO 2019/122863 2019.06.27

(71) Заявитель:
БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Чэнь Люхун, Хаксли Филип, Паван
Сильвия, Ван Ритсотен Катерине (GB)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связываются с неароматическими молекулярными каркасами таким образом, что между точками присоединения к каркасу размещаются две или более пептидные петли. В частности, в изобретении описываются пептиды, которые проявляют высокую аффинность связывания с Eph-рецептор A2 тирозинкиназы (EphA2). Изобретение также включает конъюгаты лекарственных средств, содержащие указанные пептиды, конъюгированные с одной или более эффекторными и/или функциональными группами, фармацевтические композиции, содержащие указанные пептидные лиганды и конъюгаты лекарственных средств, и применение указанных пептидных лигандов и конъюгатов лекарственных средств с целью предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль).

A1

202091519

202091519

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563516EA/042

БИЦИКЛИЧЕСКИЕ ПЕПТИДНЫЕ ЛИГАНДЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К EphA2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к полипептидам, которые ковалентно связываются с неароматическими молекулярными каркасами таким образом, что между точками присоединения к каркасу размещаются две или более пептидных петель. В частности, в изобретении описываются пептиды, которые с высокой аффинностью связывают Eph-рецептор A2 тирозинкиназы (EphA2). Изобретение также относится к конъюгатам лекарственных средств, включающим указанные пептиды, конъюгированные с одной или более эффекторными и/или функциональными группами, к фармацевтическим композициям, включающим указанные пептидные лиганды и конъюгаты лекарственных средств, и к применению указанных пептидных лигандов и конъюгатов лекарственных средств для предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Циклические пептиды способны связываться с высокой аффинностью и специфичностью с белками-мишенями и, поэтому, являются перспективным классом молекул для создания терапевтических средств. И в действительности, несколько циклических пептидов уже успешно применяются в клинике, такие как, например, антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противораковое средство октреотид (Driggers et al. (2008), Nat Rev Drug Discov 7 (7), 608-24). Высокие характеристики связывания обусловлены относительно большой поверхностью взаимодействия, образованной между пептидом и мишенью, а также пониженной конформационной гибкости циклических структур. Как правило, макроциклы связываются с поверхностями в несколько сотен квадратных ангстрем, например, в случае циклического пептида CXCR4 антагониста CVX15 площадь связывания составляет 400 Å² (Wu et al. (2007), Science 330, 1066-71), в случае циклического пептида с мотивом Arg-Gly-Asp связывания с интегрином αVβ3-355 Å² (Xiong et al. (2002), Science 296 (5565), 151-5) или в случае циклического пептидного ингибитора связывания уПАИН-1 с активатор плазминогена урокиназного типа - 603 Å² (Zhao et al. (2007), J Struct Biol 160 (1), 1-10).

Вследствие циклической конфигурации, пептидные макроциклы являются менее гибкими, чем линейные пептиды, что приводит к меньшим потерям энтропии после связывания с мишенями и обуславливает более высокую аффинность связывания. Пониженная гибкость также приводит к фиксации специфичных к мишени конформаций, что повышает специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект был проиллюстрирован на примере высокоактивного и селективного ингибитора матричной металлопротеиназы 8 (ММР-8), который терял свою селективность в отношении

других матричных металлопротеиназ (ММР) в случае раскрытия его кольца (Cherney et al. (1998), J Med Chem 41 (11), 1749-51). Благоприятные характеристики связывания, которые достигаются в результате макроциклизации, проявляются в еще большей степени у полициклических пептидов, имеющих более чем одно пептидное кольцо, например, у ванкомицина, низина и актиномицина.

Ранее, различные группы исследователей осуществляли связывание полипептидов, содержащих остатки цистеина, с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), J. Org. Chem; Timmerman et al. (2005), ChemBioChem). Meloen с коллегами использовали трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной мимикрии поверхностей белков (Timmerman et al. (2005), ChemBioChem). Методы синтеза представляющих интерес лекарственных соединений, в которых указанные соединения синтезируют путем связывания содержащих цистеин полипептидов с молекулярным каркасом, таким как, например, ТАТА (1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он, описаны в публикации Heinis et al. Angew Chem, Int Ed. 2014; 53:1602-1606).

Для генерирования и изображения больших библиотек бициклических пептидов для представляющих интерес мишеней были разработаны основанные на комбинаторных подходах метод фагового дисплея (Heinis et al. (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7 и WO 2009/098450). Вкратце, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и две области шести рандомизированных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys) отображали на фаге и циклизировали путем ковалентного связывания боковых цепей цистеина с каркасом малой молекулы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом изобретения, предлагается пептидный лиганд, обладающий специфичностью к EphA2, включающий полипептид, содержащий, по меньшей мере, три остатка цистеина, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида, в результате чего образуются, по меньшей мере, две полипептидных петли на молекулярном каркасе.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается конъюгат лекарственного средства, включающий определенный выше пептидный лиганд, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая определенные выше пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается определенные выше пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства для применения для

предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Изменения массы тела после введения BCY6031 самкам бестимусных мышей линии Balb/C, несущих опухоль LU-01-0046. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела в группе.

Фигура 2. Объем остаточной опухоли после введения BCY6031 самкам бестимусных мышей линии Balb/C, несущих опухоль LU-01-0046. Экспериментальные точки представляют среднюю величину. Лечение прекращали со дня 28.

Фигура 3. Общая схема, демонстрирующая концепцию приготовления бициклических конъюгатов лекарственных средств (BDC).

Фигура 4. Графическая зависимость средней величины объема опухоли от времени для BCY6136 у мышей с ксенотрансплантатом HT1080. Дозы (2, 3 и 5 мг/кг) вводили в дни 0 и 7. Изменения массы тела в процессе проведения лечения, отражающие размер опухоли, токсическое действие, связанное с применением лекарственного средства, и общее состояние здоровья животного, приведены на графике в правом верхнем углу.

Фигура 5. Графическая зависимость средней величины объема опухоли от времени для BCY6136 у мышей с ксенотрансплантатом NCI-H1975. Дозы (1, 2 и 3 мг/кг) вводили в дни 0, 7, 14, 21, 28 и 35. Изменения массы тела в процессе проведения лечения, отражающие размер опухоли, токсическое действие, связанное с применением лекарственного средства, и общее состояние здоровья животного, приведены на графике в правом верхнем углу.

Фигура 6. Графическая зависимость средней величины объема опухоли от времени для BCY6136 у мышей с ксенотрансплантатом MDA-MB-231. Дозы (1, 2 и 3 мг/кг) вводили на день 0, 7, 14, 21, 28, 35 и 45. Изменения массы тела в процессе проведения лечения, отражающие размер опухоли, токсическое действие, связанное с применением лекарственного средства, и общее состояние здоровья животного, приведены на графике в правом верхнем углу.

Фигуры 7-9. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 (фигура 7), ADC (фигура 8) и BCY6033 (фигура 9) самкам бестимусных мышей линии Balb/C, несущих ксенотрансплантат PC-3. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигура 10. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136, EphA2-ADC или доцетаксела самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат PC-3. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигуры 11-13. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6033 (фигура 11), BCY6136 (фигура 12) и BCY6082 (фигура 13) самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат NCI-H1975. Экспериментальные точки представляют средний объем опухоли и среднюю массу тела в группе.

Фигуры 14 и 15. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 и ADC самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0251. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигура 16. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6033, BCY6136, BCY6082 и BCY6031 самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигура 17. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 или ADC самкам бестимусных мышей линии Balb/c в модели LU-01-0046 NSCLC PDX. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигуры 18-22. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6033 (фигура 18), BCY6136 (фигура 19), BCY6082 (фигура 20), BCY6173 (фигура 21) и BCY6175 and BCY6031 (фигура 22) самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигура 23. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 (обозначенного на фигуре 23 как BT5528), BCY8245 или BCY8781 самкам бестимусных мышей линии Balb/C, несущих ксенотрансплантат LU-01-0412. Экспериментальные точки представляют средний объем опухоли (левый график) и среднюю массу тела (правый график) в группе.

Фигура 24. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0486. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигуры 25-27. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6033 (фигура 25), BCY6136 (фигура 26) и BCY6082 (фигура 27) самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат MDA-MB-231-luc. Экспериментальные точки представляют средний объем опухоли и среднюю массу тела в группе.

Фигура 28. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам мышей линии BALB/c, несущих сингенную EMT-6. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела. Дозы в группе 3 и группе 4 изменяли до 5 мг/кг и 3 мг/кг со дня 14.

Фигура 29. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат NCI-N87. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигура 30. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат SK-OV-3. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигура 31. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат OE21. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигура 32. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6136 самкам мышей линии CB17-SCID, несущих ксенотрансплантат MOLP-8. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигура 33. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6082 самкам мышей линии CB17-SCID, несущих ксенотрансплантат MOLP-8. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

Фигуры 34-42. Изменения массы тела и объема остаточной опухоли после введения BCY6082 (фигура 34), BCY6031 (фигура 35), BCY6173 (фигура 36), BCY6135 (фигура 37), BCY6033 (фигура 38), BCY6136 (фигура 39), BCY6174 (фигура 40), BCY6175 (фигура 41) и ADC (фигура 42) самкам бестимусных мышей линии Balb/C, несущих ксенотрансплантат HT1080. Экспериментальные точки представляют среднюю величину массы тела.

В тех случаях, когда на описанных выше фигурах приведены отрезки погрешностей, они представляют стандартную ошибку среднего значения (SEM).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают 2, 3, 5, 6 или 7 аминокислот.

В еще одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, одна из которых состоит из 2 аминокислот, а другая состоит из 7 аминокислот (таких как аминокислоты, которые приведены в таблица 4).

В еще одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 5 аминокислот (таких как аминокислоты, которые приведены в таблицах 3 и 4).

В еще одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 6 аминокислот (таких как аминокислоты, которые приведены в таблицах 3 и 5).

В еще одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 6 аминокислот (таких как аминокислоты, которые приведены в таблице 10).

В еще одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, одна из которых состоит из 7 аминокислот, а другая состоит из 3 аминокислот (таких как аминокислоты, которые приведены в таблице 4).

В еще одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, одна

из которых состоит из 6 аминокислот, а другая состоит из 7 аминокислот (таких как аминокислоты, которые приведены в таблице 5).

В одном варианте осуществления, пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из:



где X_1 и X_2 представляют аминокислотные остатки между остатками цистеина, приведенные в таблицах 3-5, и C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

В еще одном варианте осуществления, пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из одного или более пептидных лигандов, приведенных в одной или более таблицах 3-5.

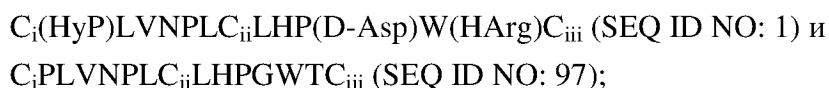
В еще одном варианте осуществления, пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из:



где X_1 и X_2 представляют аминокислотные остатки между остатками цистеина, приведенные в таблице 10, и C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

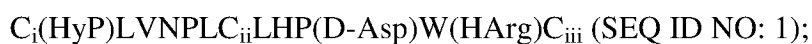
В еще одном варианте осуществления, пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из одного или более пептидных лигандов, приведенных в таблице 10.

В одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 6 аминокислот, и пептидный лиганд имеет аминокислотную последовательность, выбранную из:



где HyP представляет собой гидроксипролин, HArg представляет собой гомоаргинин, и C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

В еще одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 6 аминокислот, и пептидный лиганд имеет следующую аминокислотную последовательность:



где HyP представляет собой гидроксипролин, HArg представляет собой гомоаргинин, и C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

В одном варианте осуществления, пептидный лиганд по изобретению представляет собой пептидный лиганд, который не является аминокислотной последовательностью:

$C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1).

В одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 6 аминокислот, и пептидный лиганд имеет аминокислотную последовательность, выбранную из:

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 2) (BCY6099; соединение 66); и

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i\text{PLVNPLC}_{ii}\text{LHPGWTC}_{iii}$ (($\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}$ -(SEQ ID NO: 11)) (BCY6014; соединение 67);

где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин, и HyP представляет собой гидроксипролин.

В еще одном варианте осуществления, указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 6 аминокислот, и пептидный лиганд имеет следующую аминокислотную последовательность:

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 2) (BCY6099; соединение 66);

где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин, и HyP представляет собой гидроксипролин.

В одном варианте осуществления, пептидный лиганд по изобретению представляет собой пептидный лиганд, который не является аминокислотной последовательностью:

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 2) (BCY6099; соединение 66).

В одном варианте осуществления, молекулярный каркас выбирают из 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА), и пептидный лиганд выбирают из любого одного из пептидных лигандов, приведенных в таблицах 3-5.

В альтернативном варианте осуществления, молекулярный каркас выбирают из 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)-трипроп-2-ен-1-она (ТАТА), и пептидный лиганд выбирают из любого одного из пептидных лигандов, приведенных в таблицах 10.

В одном варианте осуществления, молекулярный каркас выбирают из 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА), и пептидный лиганд выбирают из:

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 2) (BCY6099; соединение 66); и

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i\text{PLVNPLC}_{ii}\text{LHPGWTC}_{iii}$ (($\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}$ -(SEQ ID NO: 11)) (BCY6014; соединение 67);

где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин, и HyP представляет собой гидроксипролин.

В еще одном варианте осуществления, молекулярный каркас выбирают из 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА), и пептидный лиганд представляет собой:

(β -Ala)-Sar₁₀-A(HArg)D-C_i(HyP)LVNPLC_{ii}LHP(D-Asp)W(HArg)C_{iii} (SEQ ID NO: 2);

где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин, и HyP представляет собой гидроксипролин.

В одном варианте осуществления, пептидный лиганд выбирают из любого одного из соединений 1-113, или его фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном варианте осуществления, пептидный лиганд представляет собой соединение 66 (BCY6099) или соединение 67 (BCY6014) или его фармацевтически приемлемую соль.

В еще одном варианте осуществления, пептидный лиганд представляет собой соединение 66 (BCY6099) или его фармацевтически приемлемую соль.

Если не указано иное, то все используемые в изобретении технические и научные термины имеют значение, которое является общепринятым для обычных специалистов в таких областях, как химия пептидов, культивирование клеток и фаговый дисплей, химия нуклеиновых кислот и биохимия. Стандартные методики, используемые в методах молекулярной биологии, в генетических и биохимических методах, описаны в руководствах Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., полное содержание которых включено в настоящее изобретение путем ссылок на них.

Номенклатура

Нумерация

При указании положений аминокислотного остатка в пептидах по изобретению, остатки цистеина (C_i, C_{ii} и C_{iii}) пропускают при нумерации, так как они являются инвариантными, и поэтому, нумерацию аминокислотных остатков в пептидах по изобретению указывают, как показано ниже:

-C_i-HyP₁-L₂-V₃-N₄-P₅-L₆-C_{ii}-L₇-H₈-P₉-(D-Asp)₁₀-W₁₁-(HArg)₁₂-C_{iii}- (SEQ ID NO: 1).

Применительно к целям этого изобретения, предполагается, что все бициклические пептиды циклизируют с 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-оном (ТАТА) с получением структуры тризамещенного 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипропан-1-она. Циклизация с ТАТА происходит на C_i, C_{ii}, и C_{iii}.

Молекулярный формат

N- или C-концевые удлинения к бициклической сердцевинной последовательности добавляют к левой и правой стороне последовательности через дефис. Например, N-концевой (β -Ala)-Sar₁₀-Ala хвост может обозначаться как:

(β -Ala)-Sar₁₀-A-(SEQ ID NO: X).

Инверсионные пептидные последовательности

В свете публикации Nair et al (2003) J Immunol 170(3), 1362-1373, предполагается, что раскрытые в изобретении пептидные последовательности могут также находить применение в их ретро-инверсной форме. Например, последовательность подвергают инверсии (то есть N-конец становится С-концом и наоборот), и их стереохимия аналогично также подвергается инверсии (то есть D-аминокислоты становятся L-аминокислотами и наоборот).

Пептидные лиганды

Указанный в изобретении пептидный лиганд относится к пептиду, пептидному фрагменту или пептидомиметику, ковалентно связанному с молекулярным каркасом. Обычно, такие пептиды, пептидные фрагменты или пептидомиметики включают пептид, имеющий природные или искусственные аминокислоты, в которых две или более реакционноспособных групп (то есть остатки цистеина) способны образовывать ковалентные связи с каркасом, и последовательность, расположенную между указанными реакционноспособными группами, которую называют петлевой последовательностью, так как она образует петлю, когда пептид, пептидный фрагмент или пептидомиметик связывается с каркасом. В данном случае, пептиды, пептидные фрагменты или пептидомиметики включают, по меньшей мере, три остатка цистеина (обозначаемых в изобретении как Si, Sii и Siii) и образуют, по меньшей мере, две петли на каркасе.

Преимущества пептидных лигандов

Конкретные бициклические пептиды по настоящему изобретению имеют ряд выгодных свойств, которые позволяют рассматривать их в качестве подходящих подобных лекарствам молекул для инъекционного, ингаляционного, назального, офтальмологического, перорального или местного введения. Такие выгодные свойства включают:

- Перекрестная реактивность с другими видами. Она является обычным требованием для преклинической оценки фармакодинамики и фармакокинетики;

- Устойчивость к воздействию протеазы. Бициклические пептидные лиганды должны в большинстве случаев демонстрировать устойчивость к воздействию протеаз плазмы, эпителиальных ("заякоренных на мембране") протеаз, желудочных и кишечных протеаз, протеаз поверхности легких, внутриклеточных протеаз и других подобных протеаз. Устойчивость к воздействию протеазы должна поддерживаться между различными видами, благодаря чему на животных моделях может быть разработан перспективный прототип бициклического пептида и, кроме того, он может быть введен без опасений людям;

- Требуемый профиль растворимости. Он представляет собой соотношение заряженных и гидрофильных остатков к гидрофобным остаткам и внутренним/межмолекулярным H-связям, которое является важной для приготовления лекарственной формы и для всасывания;

- Оптимальный период полувыведения из плазмы крови. В зависимости от клинических показаний и схемы лечения, может потребоваться разработка бициклического пептида с коротким или пролонгированным *in vivo* временем экспозиции для проведения

лечения либо хронических, либо острых болезненных состояний. Оптимальное время экспозиции будет определяться, с одной стороны, с учетом требования использования пролонгированного времени экспозиции (для максимальной терапевтической эффективности), а с другой стороны, с учетом требования использования короткого времени экспозиции для минимизации токсикологических воздействий, возникающих при использовании пролонгированного воздействия лекарственного средства;

- Селективность. Конкретные пептидные лиганды по изобретению характеризуются высокой селективностью в отношении других Eph-рецепторов тирозинкиназы, таких как EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphB1, фактора ХПА, карбоангидразы 9 и CD38 (данные по селективности для выбранных пептидных лигандов по изобретению представлены в таблицах 7 и 14). Следует также отметить, что выбранные пептидные лиганды по изобретению проявляют перекрестную реактивность с другими видами (например, с мышью и крысой), что позволяет проводить испытания на животных моделях (таблицы 3-6 и 15); и

- Безопасность. Сообщалось о случаях кровотечения при проведении преклинических исследований *in vivo* на моделях и при проведении клинических испытаний с использованием конъюгатов антитела EphA2. Например, было прекращено в фазе 1 открытое исследование препарата MEDI-547 вследствие случаев кровотечения и коагуляции, которые наблюдались у 5 из 6 пациентов (Annunziata et al, Invest New Drugs (2013) 31:77-84). Наблюдаемые случаи кровотечения у пациентов находились в соответствии с воздействиями на систему коагуляции, наблюдаемыми при проведении преклинических исследований на крысах и обезьянах: повышение активированного частичного тромбопластинового времени и увеличение продуктов деградации фибриногена/фибрина (Annunziata et al IBID). Как сообщалось, наблюдались случаи явно выраженных кровотечений при проведении токсикологических исследований на обезьянах (Annunziata et al, IBID). Взятые в совокупности, эти результаты позволяют сделать вывод, что MEDI-547 вызывает диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (DIC) как у видов животных при проведении преклинических исследований, так и у пациентов. Описанные в изобретении бициклические конъюгаты лекарственных средств (BDC) имеют короткие периоды полувыведения *in vivo* (< 30 минут) и, вследствие этого, маловероятно, что они будут вызывать диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (DIC) у пациентов. Приведенные в изобретении результаты (смотрите ДАННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ разделы 5 и 6 и таблицу 20) показывают, что выбранные бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению не влияют на параметры свертывания крови и не вызывают случаев кровотечения при проведении преклинических исследований.

Фармацевтически приемлемые соли

Следует иметь в виду, что солевые формы включены в объем этого изобретения, и ссылки на пептидные лиганды относятся и к солевым формам указанных лигандов.

Соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит фрагмент с основными или кислотными свойствами, традиционными химическими методами, такими как методы, описанные в монографии *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Обычно, такие соли могут быть приготовлены путем взаимодействия форм свободной кислоты или свободного основания этих соединений с соответствующим основанием или кислотой в воде или в органическом растворителе, или в смеси и того и другого.

Соли присоединения кислоты (моно- или дисоли) могут быть образованы с широким разнообразием кислот, как неорганических, так и органических. Примеры солей добавления кислоты включают моно- или дисоли, образованные с кислотой, выбранной из группы, состоящей из уксусной, 2,2-дихлоруксусной, адипиновой, альгиновой, аскорбиновой (например, L-аскорбиновой), L-аспарагиновой, бензолсульфоновой, бензойной, 4-ацетамидобензойной, бутановой, (+)-камфорной, камфорсульфоновой, (+)-(1S)-камфор-10-сульфоновой, каприновой, капроновой, каприловой, коричной, лимонной, цикламовой, додецилсерной, этан-1,2-дисульфоновой, этансульфоновой, 2-гидроксиэтансульфоновой, муравьиной, фумаровой, галактаровой, гентизиновой, глюкогептоновой, D-глюконовой, глюкуроновой (например, D-глюкуроновой), глутаминовой (например, L-глутаминовой), α -оксоглутаровой, гликолевой, гиппуровой, галогенводородных кислот (например, бромистоводородной, хлористоводородной, йодистоводородной), изетионовой, молочной (например, (+)-L-молочной, ($\pm$)-DL-молочной), лактобионовой, малеиновой, яблочной, (-)-L-яблочной, малоновой, ($\pm$)-DL-миндальной, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, нафталин-1,5-дисульфоновой, 1-гидрокси-2-нафтойной, никотиновой, азотной, олеиновой, оротовой, щавелевой, пальмитиновой, памовой, фосфорной, пропионовой, пировиноградной, L-пироглутаминовой, салициловой, 4-аминосалициловой, себациновой, стеариновой, янтарной, серной, дубильной, (+)-L-винной, тиоциановой, п-толуолсульфоновой, ундециленовой и валериановой кислот, а также ацилированных аминокислот и катионообменных смол.

Одна конкретная группа солей состоит из солей, образованных с уксусной, хлористоводородной, йодистоводородной, фосфорной, азотной, серной, лимонной, молочной, янтарной, малеиновой, яблочной, изетионовой, фумаровой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой, серной, метансульфоновой (мезилатом), этансульфоновой, нафталинсульфоновой, валериановой, пропановой, бутановой, малоновой, глюкуроновой и лактобионовой кислотами. Одна конкретная соль представляет собой гидрохлоридную соль. Другая конкретная соль представляет собой ацетатную соль.

Если соединение является анионным или имеет функциональную группу, которая может быть анионной (например, COOH может представлять собой COO⁻), то тогда соль может быть образована с органическим или неорганическим основанием, генерирующим подходящий катион. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но этим не

ограничивая, катионы щелочных металлов, такие как Li^+ , Na^+ и K^+ , катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{3+} или Zn^{2+} . Примеры подходящих органических катионов включают, но этим не ограничивая, ион аммония (то есть, NH_4^+) и ионы замещенного аммония (например, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих ионов замещенного аммония являются ионы, образованные из метиламина, этиламина, диэтиламина, пропиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером обычного иона четвертичного аммония является $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

Когда пептиды по изобретению содержат аминную функциональность, они могут образовывать четвертичные аммониевые соли, например, путем взаимодействия с алкилирующим реагентом в соответствии с методами, которые хорошо известны специалистам. Такие соединения четвертичного аммония включены в объем пептидов по изобретению.

Модифицированные производные

Следует иметь в виду, что модифицированные производные определенных выше пептидных лигандов входят в объем настоящего изобретения. Примеры таких подходящих модифицированных производных включают одну или более модификаций, выбранных из N-концевых и/или C-концевых модификаций; из замены одного или более аминокислотных остатков на один или более аминокислотных остатков неприродного происхождения (такой как замена одного или более полярных аминокислотных остатков на одну или более изостерических или изоэлектронных аминокислот; такой как замена одного или более полярных аминокислотных остатков на другие неприродные изостерические или изоэлектронные аминокислоты); из добавления спейсерной группы; из замены одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков на один или более устойчивых к окислению аминокислотных остатков; из замены одного или более аминокислотных остатков с одной или более заменами аминокислот, таких как аланин, из замены одного или более L-аминокислотных остатков на один или более D-аминокислотных остатков; из N-алкилирования одной или более амидных связей внутри бициклического пептидного лиганда; из замены одной или более пептидных связей на суррогатную связь; из модификации длины основной пептидной цепи; из замещения водорода на альфа-углероде одного или более аминокислотных остатков на другую химическую группу, из модификации аминокислот, таких как цистеин, лизин, глутамат/аспартат и тирозин, с помощью подходящих аминов, тиолов, карбоновых кислот и реакционноспособных фенольных реагентов, с целью функционализации указанных аминокислот и введения или замены аминокислот, которые придают подходящую для функционализации ортогональную реакционную способность, например, аминокислот, несущих азидную или алкиновую группу, что позволяет проводить

функционализацию с помощью фрагментов, несущих алкиновую или азидную группу, соответственно.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает N-концевую и/или C-концевую модификацию. В еще одном варианте осуществления, модифицированное производное включает N-концевую модификацию с использованием реакций с подходящими реакционноспособными аминами, и/или C-концевую модификацию с использованием реакций с подходящими реакционноспособными карбоксильными группами. В еще одном варианте осуществления, указанная N-концевая или C-концевая модификация включает введение эффекторной группы, включающей, но этим не ограничивая, цитотоксическое средство, вещество, образующее хелат с радиоактивным изотопом, или хромофор.

В еще одном варианте осуществления, модифицированное производное включает N-концевую модификацию. В еще одном варианте осуществления, N-концевая модификация включает N-концевую ацетильную группу. В этом варианте осуществления, N-концевой остаток блокируют с помощью уксусного ангидрида или других соответствующих реагентов в процессе проведения пептидного синтеза, что приводит к молекуле, ацетилированной по N-концу. Этот вариант осуществления дает преимущество, заключающееся в удалении возможной точки распознавания для аминопептидаз и в предотвращении возможного распада бициклического пептида.

В альтернативном варианте осуществления, N-концевая модификация включает введение группы молекулярного спейсера, которая облегчает конъюгацию эффекторных групп и сохранение активности бициклического пептида в отношении его мишени.

В еще одном варианте осуществления, модифицированное производное включает C-концевую модификацию. В еще одном варианте осуществления, C-модификация включает амидную группу. В этом варианте осуществления, C-концевой остаток синтезируют в форме амида в процессе проведения синтеза пептида, что приводит к молекуле, которая является амидированной на C-конце. Этот вариант осуществления дает преимущество, заключающееся в удалении возможной точки распознавания для аминопептидаз и в предотвращении возможного протеолитического распада бициклического пептида.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более аминокислотных остатков на один или более неприродных аминокислотных остатков. В этом варианте осуществления, могут быть выбраны неприродные аминокислоты, имеющие изостерические/ изоэлектронные боковые цепи, которые не распознаются деструктивными протеазами и не оказывают неблагоприятного воздействия на активность в отношении мишени.

В качестве варианта, могут быть использованы неприродные аминокислоты, имеющие ограниченные боковые цепи аминокислоты, вследствие чего затруднен конформационно и стерически протеолитический гидролиз находящейся рядом пептидной связи. В частности, это относится к аналогам пролина, объемным боковым цепям, C α -

дизамещенным производным (например, аминокислотой, Aib) и циклоаминокислотам, при этом простым производным является аминоклопропилкарбоновая кислота.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает введение спейсерной группы. В еще одном варианте осуществления, модифицированное производное включает введение спейсерной группы в N-концевой цистеин (C_i) и/или C-концевой цистеин (C_{iii}).

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более чувствительных к окислению аминокислотных остатков на один или более устойчивых к окислению аминокислотных остатков. В еще одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену остатка триптофана на остаток нафтилаланина или аланина. Этот вариант осуществления дает преимущество, заключающееся в улучшении профиля фармацевтической стабильности получаемого бициклического пептидного лиганда.

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более заряженных аминокислотных остатков на один или более гидрофобных аминокислотных остатков. В альтернативном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более гидрофобных аминокислотных остатков на один или более заряженных аминокислотных остатков. Правильный баланс между заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками является важной характеристикой бициклических пептидных лигандов. Например, гидрофобные аминокислотные остатки влияют на степень связывания белка плазмы и, соответственно, на концентрацию фракции свободного пептида при равновесии в плазме крови, в то время как заряженные аминокислотные остатки (в частности, аргинин) могут влиять на взаимодействие пептида с фосфолипидными мембранами на поверхностях клеток. Комбинация этих двух видов остатков могут влиять на период полувыведения, объем распределения и экспозицию пептидного лекарственного средства, и она может быть адаптирована в соответствии с требуемыми клиническими результатами. Кроме того, скорректированная комбинация и баланс между числом заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков может уменьшать разрежение в месте инъекции (если пептидное лекарственное средство вводили подкожно).

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает замену одного или более L-аминокислотных остатков на один или более D-аминокислотных остатков. Предполагают, что этот вариант осуществления позволяет повышать протеолитическую устойчивость, обусловленную стерическим затруднением и предрасположенностью D-аминокислот стабилизировать конформации β -поворота (Tugyi et al (2005) PNAS, 102(2), 413-418).

В одном варианте осуществления, модифицированное производное включает удаление любых аминокислотных остатков и замену их на аланины, такие как D-аланины.

Этот вариант осуществления дает преимущество, заключающееся в идентификации ключевых связывающих остатков и удалении места (мест) возможной протеолитической атаки.

Следует отметить, что каждая из упомянутых выше модификаций служит для продуманного улучшения активности или стабильности пептида. Дополнительные повышения активности за счет проведения модификаций может быть достигнуто путем использования следующих механизмов:

- Введение гидрофобных фрагментов, которые оказывают гидрофобный эффект и приводят к более низкой величине скорости диссоциации, благодаря чему достигаются более высокие величины аффиностей;

- Введение заряженных групп, которые вызывают дальнейшее межмолекулярное взаимодействие, приводящее к более высокой величине скорости ассоциации и к более высоким величинам аффиностей (смотрите, например, публикацию Schreiber et al, Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31); и

- Введение дополнительного ограничения в пептид, например, путем скорректированного ограничения боковых цепей аминокислот, в результате чего становится минимальной потеря энтропии после связывания мишени, путем ограничения углов поворота основной цепи, в результате чего становится минимальной потеря энтропии после связывания мишени, и путем введения в молекулу дополнительных циклизаций по тем же самым причинам (для более подробного ознакомления смотрите публикации Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, и Nestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418).

Изотопные варианты

Настоящее изобретение включает все фармацевтически приемлемые меченые изотопом (радиоактивным изотопом) пептидные лиганды по изобретению, в которых один или более атомов заменены на атомы, имеющие один и тот же атомный номер, но атомную массу или массовое число, отличающиеся от атомной массы или массового числа, обычно обнаруживаемых в природе, и пептидные лиганды по изобретению, к которым присоединены группы, образующие хелаты с металлами, (называемые "эффекторными"), которые способны удерживать соответствующие изотопы (радиоактивные изотопы), и пептидные лиганды по изобретению, в которых конкретные функциональные группы ковалентно заменены на соответствующие изотопы (радиоактивные изотопы) или меченые изотопом функциональные группы.

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

Конкретные меченые изотопом пептидные лиганды по изобретению, например, пептидные лиганды, в которые введен радиоактивный изотоп, применяют при исследовании распределения лекарственного средства и/или субстрата в ткани и для клинической оценки присутствия и/или отсутствия EphA2-мишени в пораженных тканях. Кроме того, пептидные лиганды по изобретению могут иметь важные с точки зрения диагностики свойства, благодаря которым они могут применяться для обнаружения или идентификации образования комплекса между меченым соединением и другими молекулами, пептидами, белками, ферментами или рецепторами. В методах обнаружения или идентификации могут применяться соединения, которые помечены с помощью реагентов для введения метки, таких как радиоактивные изотопы, ферменты, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества (например, люминол, производные люминола, люциферин, экворин и люцифераза), и другие подобные. Для этой цели особенно подходят радиоактивные изотопы тритий, то есть ^3H (Т), и углерод-14, то есть ^{14}C , с точки зрения легкости их введения и доступности средств для их детекции.

Замена на более тяжелые изотопы, такие как дейтерий, то есть ^2H (D), может давать определенные положительные терапевтические эффекты, обусловленные более высокой устойчивостью к инаktivации в процессе метаболизма, например, увеличение *in vivo* периода полувыведения или снижение уровня требуемых доз, и, следовательно, может быть предпочтительным при некоторых обстоятельствах.

Замена на позитронно-активные изотопы, такие как ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O и ^{13}N , может быть использована при исследованиях методом позитронной эмиссионной томографии (PET) с целью определения степени заполнения мишени.

Меченые изотопом соединения пептидных лигандов по изобретению могут быть приготовлены, как правило, традиционными методами, известными специалистам в данной области, или методами, аналогичными методам, описанным в примерах изобретения, путем использования соответствующего меченого изотопом реагента вместо ранее используемого немеченого изотопом реагента.

Неароматический молекулярный каркас

Используемый в изобретении термин "неароматический молекулярный каркас" относится к любому определенному выше молекулярному каркасу, который не содержит ароматической (то есть ненасыщенной) карбоциклической или гетероциклической кольцевой системы.

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

Как отмечается в упомянутых выше документах, молекулярный каркас может представлять собой малую молекулу, такую как малая органическая молекула.

В одном варианте осуществления, молекулярный каркас может представлять собой макромолекулу. В одном варианте осуществления, молекулярный каркас представляет собой макромолекулу, состоящую из аминокислот, нуклеотидов или углеводов.

В одном варианте осуществления, молекулярный каркас включает реакционноспособные группы, которые способны взаимодействовать с функциональной группой (группами) полипептида с образованием ковалентных связей.

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

Примером α ненасыщенного карбонилсодержащего соединения является 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (TATA) (Angewandte Chemie, International Edition (2014), 53(6), 1602-1606).

Эффекторные и функциональные группы

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается конъюгат лекарственного средства, включающий определенный выше пептидный лиганд, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами.

Эффекторные и/или функциональные группы могут быть присоединены, например, к N- и/или C- концам полипептида, к аминокислоте в полипептиде или к молекулярному каркасу.

Подходящие эффекторные группы включают антитела и их части или фрагменты. Например, эффекторная группа может включать константную область легкой цепи антитела (CL), домен CH1 тяжелой цепи антитела, домен CH2 тяжелой цепи антитела, домен CH3 тяжелой цепи антитела или любую их комбинацию, помимо одного или более доменов константной области. Эффекторная группа может также включать шарнирную область антитела (такую область обычно обнаруживают между доменами CH1 и CH2 в молекуле IgG).

В еще одном варианте осуществления этого аспекта изобретения, эффекторная группа по настоящему изобретению представляет собой Fc область молекулы IgG. Предпочтительно, чтобы, пептидный лиганд-эффекторная группа по настоящему изобретению включал или состоял из слитой конструкции пептидный лиганд-Fc, имеющей $t_{1/2}$ период полувыведения один день или более, два дня или более, 3 дня или более, 4 дня или более, 5 дней или более, 6 дней или более или 7 дней или более. Более предпочтительно, чтобы пептидный лиганд по настоящему изобретению включал или состоял из слитой конструкции пептидный лиганд-Fc, имеющей $t_{1/2}$ период полувыведения один день или более.

Функциональные группы включают, как правило, связывающие группы, лекарственные средства, реакционноспособные группы для присоединения других структурных фрагментов, функциональные группы, которые способствуют захвату макроциклических пептидов клетками, и другие подобные группы.

Способность пептидов проникать в клетки позволяет пептидам быть эффективными в отношении внутриклеточных мишеней. Мишени, доступ пептидов к которым обеспечивается способностью пептидов проникать в клетки, включают факторы

транскрипции, внутриклеточные сигнальные молекулы, такие как тирозинкиназы, и молекулы, принимающие участие в апоптозном сигнальном пути. Функциональные группы, которые способны проникать в клетки, включают пептиды или химические группы, которые были добавлены либо к пептиду, либо к молекулярному каркасу. Пептиды, такие как пептиды, полученные из VP22, HIV-Tat, гомеобокса белка дрозофилы (локус *Antennapedia*), описаны, например в публикациях Chen and Harrison, *Biochemical Society Transactions* (2007) Volume 35, part 4, p821; Gupta et al. in *Advanced Drug Discovery Reviews* (2004) Volume 57 9637. Примеры коротких пептидов, которые, как было показано, являются эффективными при транслокации через клеточные цитоплазматические мембраны, включают пептид пенетратина из белка дрозофилы локуса *Antennapedia* с длиной 16 аминокислот (Derossi et al (1994) *J Biol. Chem.* Volume 269 p10444), "модель амфипатического пептида" с длиной 18 аминокислот (Oehlke et al (1998) *Biochim Biophys Acts* Volume 1414 p127) и обогащенные аргинином области белка ТАТ вируса иммунодефицита человека (HIV). Непептидные подходы включают применение имитаторов малых молекул или кальциевых каналов, управляемых вторичным мессенджером (SMOC), которые могут быть легко присоединены к биомолекулам (Okuyama et al (2007) *Nature Methods* Volume 4 p153). Другие химические стратегии добавления к молекулам групп гуанидиния также усиливают проникновение в клетки (Elson-Schwab et al (2007) *J Biol Chem* Volume 282 p13585). Молекулы с низкой молекулярной массой, такие как стероиды, могут быть добавлены к молекулярному каркасу для усиления усвоения в клетках.

Один класс функциональных групп, которые могут быть присоединены к пептидным лигандам, антитела и их связывающие фрагменты, такие как Fab, Fv, или однодоменные фрагменты. В частности, могут быть использованы антитела, которые связываются с белками, способные увеличивать период полувыведения пептидного лиганда *in vivo*.

В одном варианте осуществления, пептидный лиганд-эффекторная группа по изобретению имеет $t_{1/2}$ период полувыведения, выбранный из группы, состоящей из 12 часов или более, 24 часов или более, 2 дней или более, 3 дней или более, 4 дней или более, 5 дней или более, 6 дней или более, 7 дней или более, 8 дней или более, 9 дней или более, 10 дней или более, 11 дней или более, 12 дней или более, 13 дней или более, 14 дней или более, 15 дней или более или 20 дней или более. Предпочтительно, чтобы пептидный лиганд-эффекторная группа или композиция по изобретению имела $t_{1/2}$ в диапазоне от 12 до 60 часов. В еще одном варианте осуществления, $t_{1/2}$ период полувыведения составляет один день или более. В еще одном варианте осуществления, $t_{1/2}$ период полувыведения составляет от 12 до 26 часов.

В одном конкретном варианте осуществления изобретения, функциональную группу выбирают из реагента, образующего хелат с металлом, который применяют для комплексообразования с радиоактивными изотопами металлов медицинского назначения.

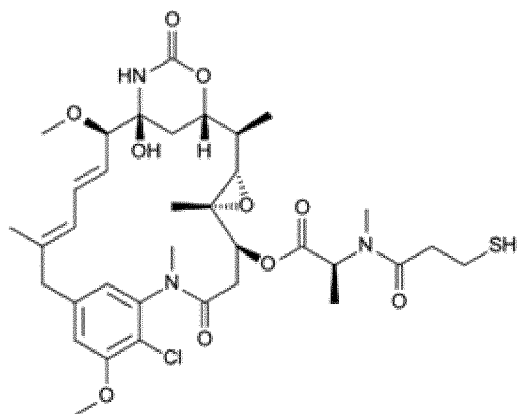
Возможные эффекторные группы также включают ферменты, например, такие как карбоксипептидаза G2, для применения в антитело-опосредованной терапии с

использованием фермента и пролекарства (ADEPT), в которой антитела заменяют на пептидный лиганд.

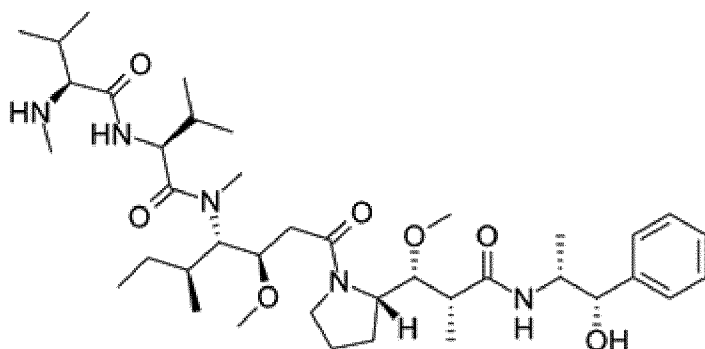
В одном конкретном варианте осуществления изобретения, функциональную группу выбирают из лекарственного средства, такого как цитотоксическое средство для противораковой терапии. Подходящие примеры включают алкилирующие агенты, такие как цисплатин и карбоплатин, а также оксалиплатин, мехлорэтамин, циклофосфамид, хлорамбуцил, ифосфамид; антиметаболиты, в том числе аналоги пурина, азатиоприн и меркаптопурин или аналоги пиримидина; растительные алкалоиды и терпеноиды, в том числе алкалоиды барвинка, такие как винкристин, винбластин, винорелбин и виндезин; подофиллотоксин и его производные этопозид и тенипозид; таксаны, включая паклитаксел, ранее известный как таксол; ингибиторы топоизомеразы, в том числе камптотецины; иринотекан и топотекан, и ингибиторы типа II, в том числе амсакрин, этопозид, этопозидофосфат и тенипозид. Другие средства могут включать противоопухолевые антибиотики, которые включают иммунодепрессант дактиномицин (который используется при трансплантациях почки), доксорубин, эпирубин, блеомицин, калихеамицины, и другие средства.

В еще одном конкретном варианте осуществления изобретения, цитотоксическое средство выбирают из майтанзиноидов (таких как DM1) или монометил ауристатинов (таких как MMAE).

DM1 представляет собой цитотоксическое средство, которое является тиолсодержащим производным майтансина и имеет следующую структуру:



Монометил ауристатин Е (MMAE) представляет собой синтетическое противоопухолевое средство и имеет следующую структуру:



В еще одном дополнительном конкретном варианте осуществления изобретения, цитотоксическое средство выбирают из майтанзиноидов (таких как DM1). Представленные в изобретении данные в таблице 6 иллюстрируют эффекты пептидных лигандов, конъюгированных с токсическими средствами, содержащими DM1.

В одном варианте осуществления, цитотоксическое средство связано с бициклическим пептидом легко расщепляемой связью, такой как дисульфидная связь или чувствительная к воздействию протеазы связь. В еще одном варианте осуществления, модифицируют группы, расположенные рядом с дисульфидной связью, с целью регулирования стерического затруднения при доступе к дисульфидной связи и тем самым скорости расщепления и одновременного высвобождения цитотоксического средства.

Были опубликованы результаты исследования по возможности модифицирования подверженности дисульфидной связи к разрушению путем введения стерического затруднения с обеих сторон дисульфидной связи (Kellogg et al (2011) *Bioconjugate Chemistry*, 22, 717). Более высокая степень стерического затруднения приводит к снижению скорости разрушения дисульфидной связи под воздействием внутриклеточного глутатиона, а также внеклеточных (системных) восстановителей, в результате чего возрастает затруднения при высвобождении токсического средства как внутри, так и снаружи клетки. Таким образом, путем тщательного выбора степени стерического затруднения с обеих сторон дисульфидной связи может быть достигнуто оптимальное соотношение между стабильностью дисульфидной связи в кровотоке (которая минимизирует нежелательные побочные эффекты токсина) и эффективностью высвобождения во внутриклеточной среде (которое максимизирует терапевтический эффект).

Стерическое затруднение с обеих сторон дисульфидной связи регулируют путем введения одной или более метильных групп либо в тагетирующий структурный фрагмент (в данном случае, в бициклический пептид), либо на стороне токсического средства молекулярной конструкции.

В одном варианте осуществления, конъюгат лекарственного средства дополнительно включает линкер между указанным пептидным лигандом и указанными цитотоксическими средствами.

В одном варианте осуществления, цитотоксическое средство и линкер выбирают из их любых комбинаций, описанных в патентном документе WO 2016/067035 (полное содержание которого включено в настоящее изобретение путем ссылки на него).

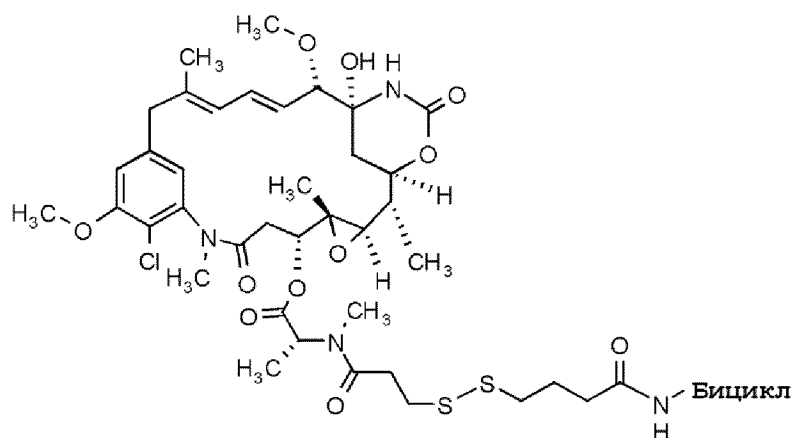
В одном варианте осуществления, цитотоксическое средство выбирают из DM1 или MMAE.

В одном варианте осуществления, линкер между указанным цитотоксическим средством и указанным бициклическим пептидом включает один или более аминокислотных остатков. Так, в одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер выбирают из -Val-Cit-, -Trp-Cit-, -Val-Lys-, -D-Trp-Cit-, -Ala-Ala-Asn-, D-Ala-Phe-Lys- или -Glu-Pro-Cit-Gly-hPhe-Tyr-Leu- (SEQ ID NO: 98). В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер выбирают из -Val-Cit-, -Trp-Cit-, -Val-Lys- или -D-Trp-Cit-. В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер представляет собой -Val-Cit- или -Val-Lys-. И еще в одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE и линкер представляет собой -Val-Cit-.

В альтернативном варианте осуществления, линкер между указанным цитотоксическим средством включает дисульфидную связь, такую как способную к расщеплению дисульфидную связь. Так, в еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и линкер выбирают из -S-S-, -SS(SO₃H)-, -SS(Me)-, -(Me)-SS-(Me)-, -SS(Me)₂- или -SS(Me)-SO₃H-. В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и линкер включает -S-S- фрагмент, такой как N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDB), или -SS(SO₃H)- фрагмент, такой как SO₃H-SPDB. В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и линкер включает -S-S- фрагмент, такой как -S-S- или -S-S-(SO₃H)-.

В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство включает нерасщепляемое цитотоксическое средство. Так, в одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой нерасщепляемое MMAE (такое как цитотоксическое средство внутри BCY6063) или нерасщепляемое DM1 (такое как цитотоксическое средство внутри BCY6064).

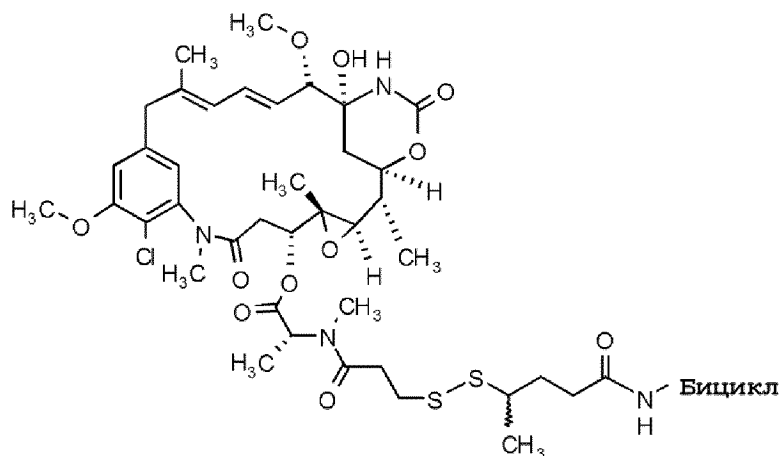
В одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (A):



(A)

где указанный бицикл выбирают из любого одного из определенных выше BCY6099 и BCY6014.

В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (B):



(B)

где указанный бицикл выбирают из любого одного из определенных выше BCY6099 и BCY6014.

В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (A), где указанный бицикл выбирают из определенного выше BCY6099. Этот бициклический конъюгат лекарственного средства (BDC) обозначен в изобретении как BCY6027. Представленные в изобретении данные иллюстрируют отличное конкурирующее связывание для BCY6027 в анализе конкурирующего связывания EphA2, результаты которого приведены в таблице 6.

В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (B), где указанный бицикл выбирают из определенного выше BCY6099. Этот бициклический конъюгат лекарственного средства (BDC) обозначен в изобретении как BCY6028.

Представленные в изобретении данные иллюстрируют отличное конкурирующее связывание для BCY6028 в анализе конкурирующего связывания EphA2, результаты которого приведены в таблице 6.

В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (A), где указанный бицикл выбирают из определенного выше BCY6014. Этот BDC обозначен в изобретении как BCY6031. Представленные в изобретении данные иллюстрируют отличное конкурирующее связывание для BCY6031 в анализе конкурирующего связывания EphA2, результаты которого приведены в таблице 6. Также представленные в изобретении данные в таблице 11 и на фигурах 1 и 2 показывают, что лечение с помощью BCY6031 полностью уничтожало немелкоклеточные карциномы легкого со дня 32, и не происходило возобновления роста опухоли после временного прекращения дозирования на день 28.

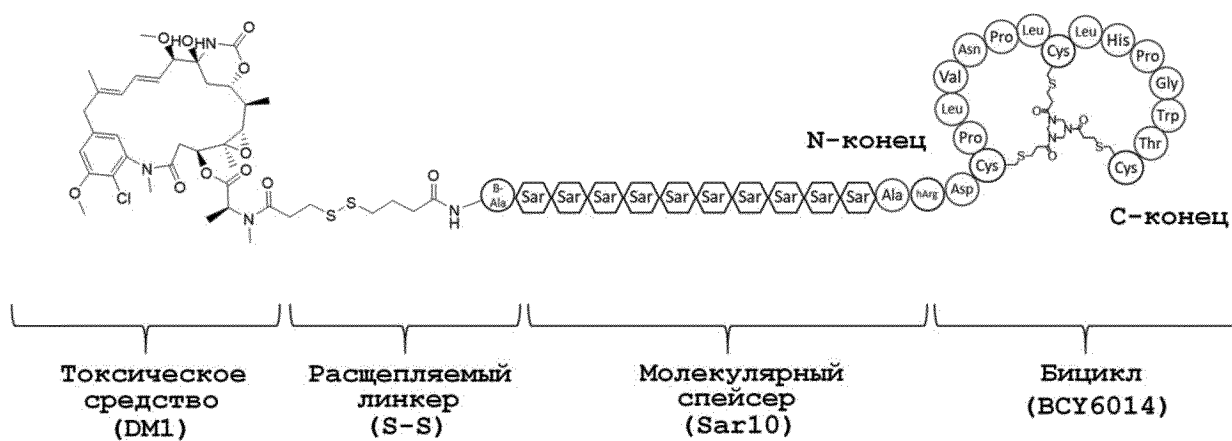
В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой DM1, и конъюгат лекарственного средства включает соединение формулы (B), где указанный бицикл выбирают из определенного выше BCY6014. Этот BDC обозначен в изобретении как BCY6032. Представленные в изобретении данные иллюстрируют отличное конкурирующее связывание для BCY6032 в анализе конкурирующего связывания EphA2, результаты которого приведены в таблице 6.

В альтернативном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE или DM1, и конъюгат лекарственного средства выбирают из любого из BDC, приведенных в таблице 11. Представленные в изобретении данные показывают, что эти BDC проявляли отличную перекрестную реактивность между EphA2 человека, мыши и грызунами, как это показано в таблице 11.

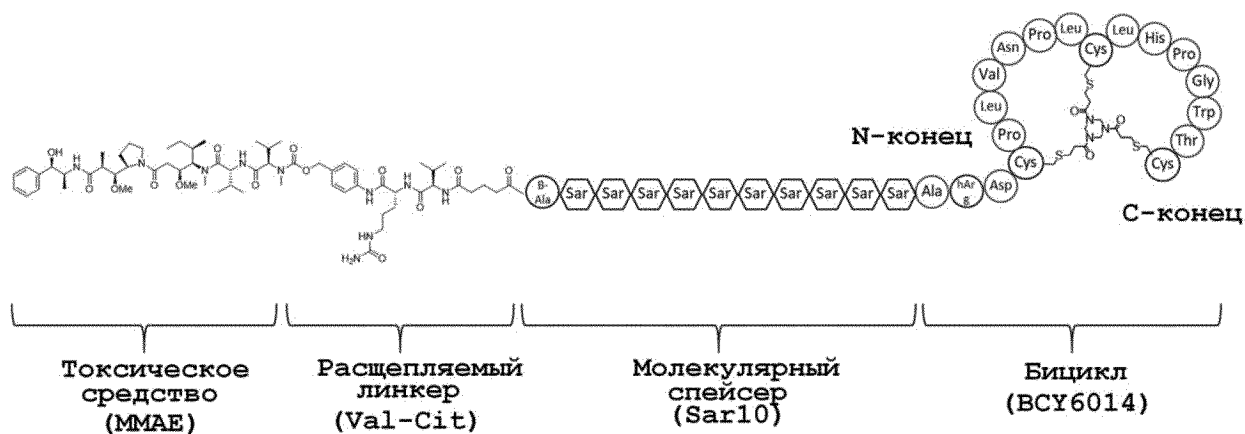
В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE или DM1, и конъюгат лекарственного средства выбирают из любого из BDC, приведенных в таблице 13.

В еще одном варианте осуществления, цитотоксическое средство представляет собой MMAE или DM1, и конъюгат лекарственного средства выбирают из BCY6033, BCY6082, BCY6136 и BCY6173. Представленные в изобретении данные показывают, что эти четыре бициклических конъюгата лекарственных средств не проявляли значительного связывания с близкородственными гомологами EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7 и EphB4 человека, EphA3 и EphA4 мыши и EphA3 и EphB1 крысы, как это показано в таблицах 14 и 15.

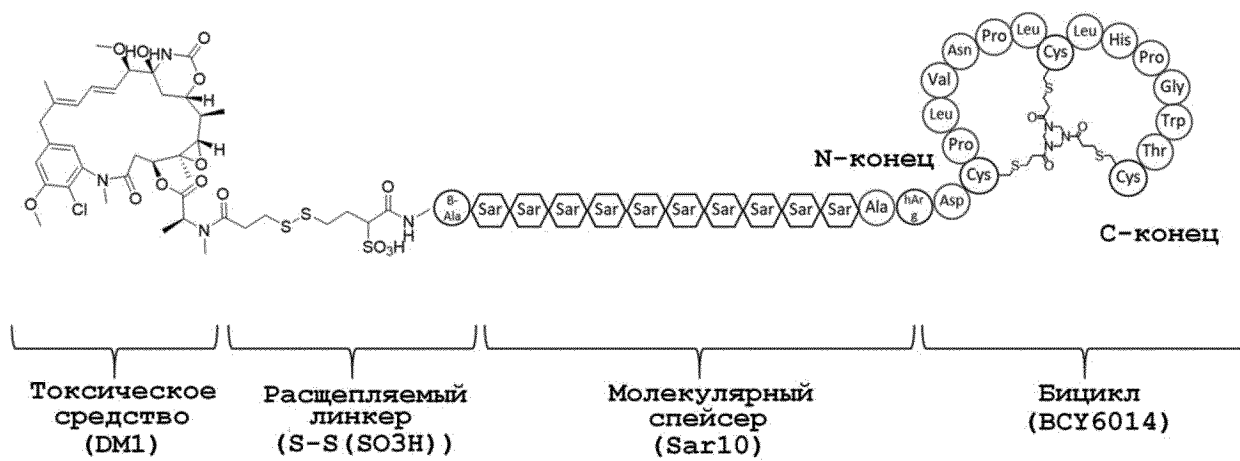
В еще одном варианте осуществления, конъюгат лекарственного средства выбирают из любого одного из BCY6031, BCY6033, BCY6082, BCY6135, BCY6136, BCY6173, BCY6174 и BCY6175:



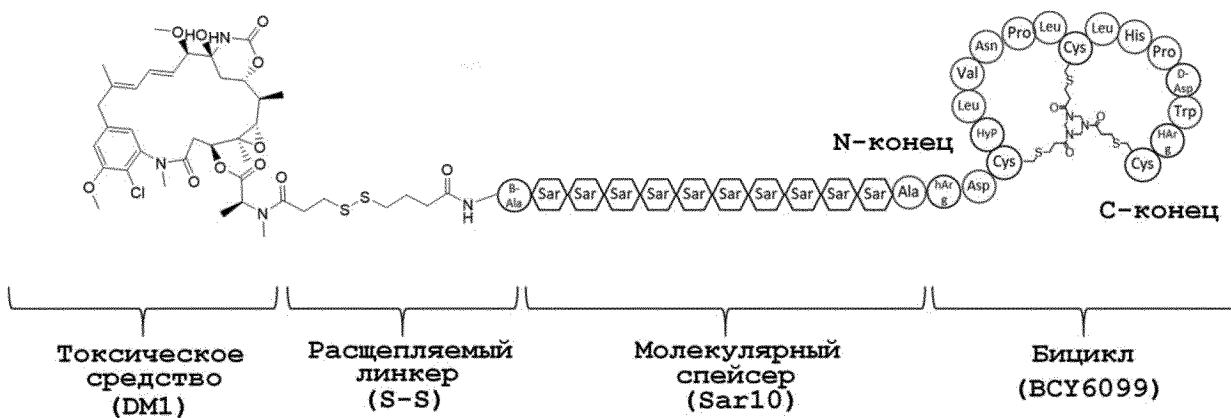
BCY6031



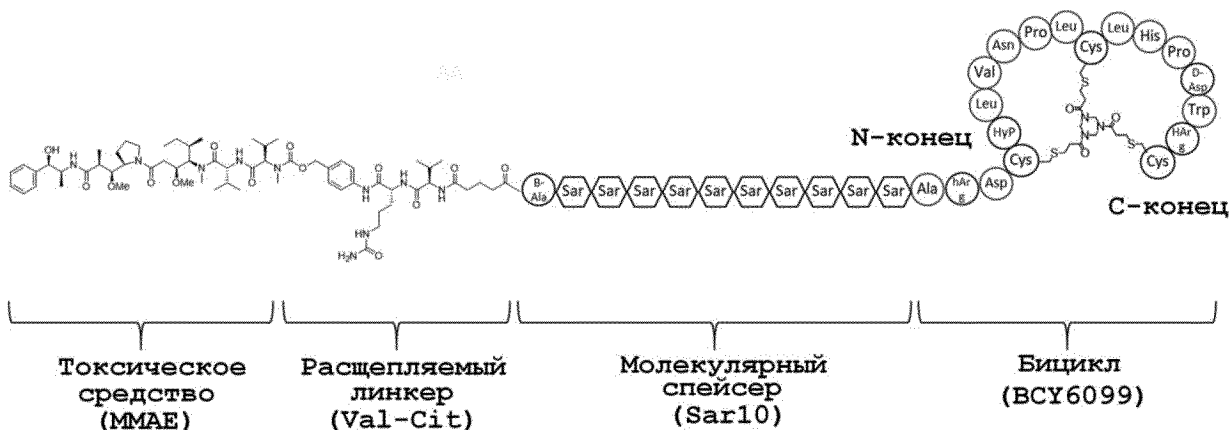
BCY6033



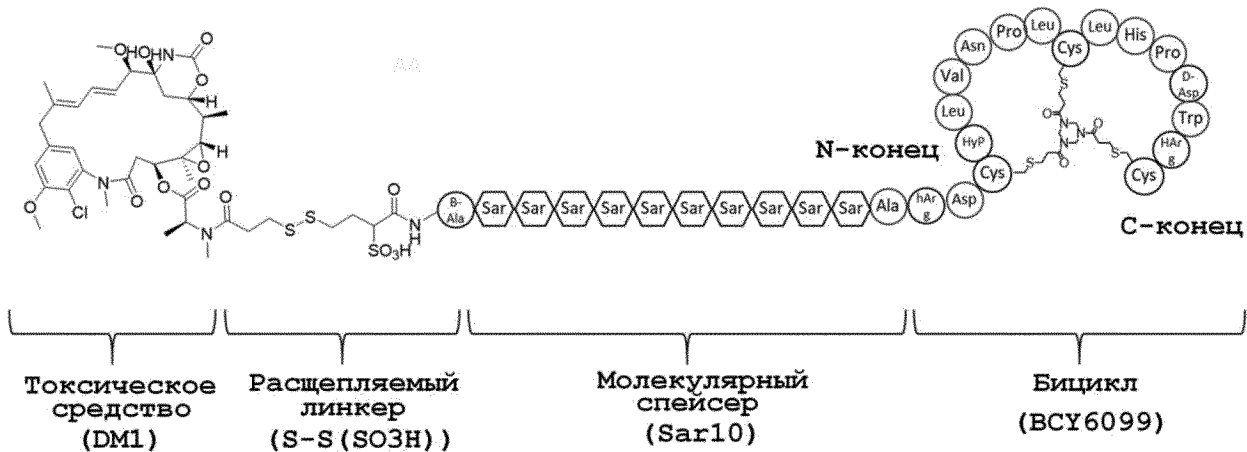
BCY6082



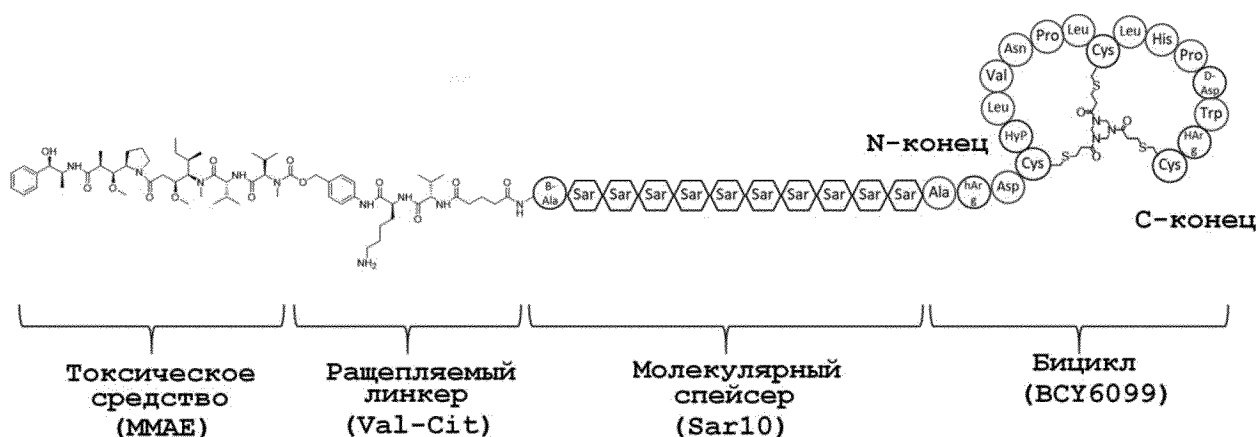
BCY6135



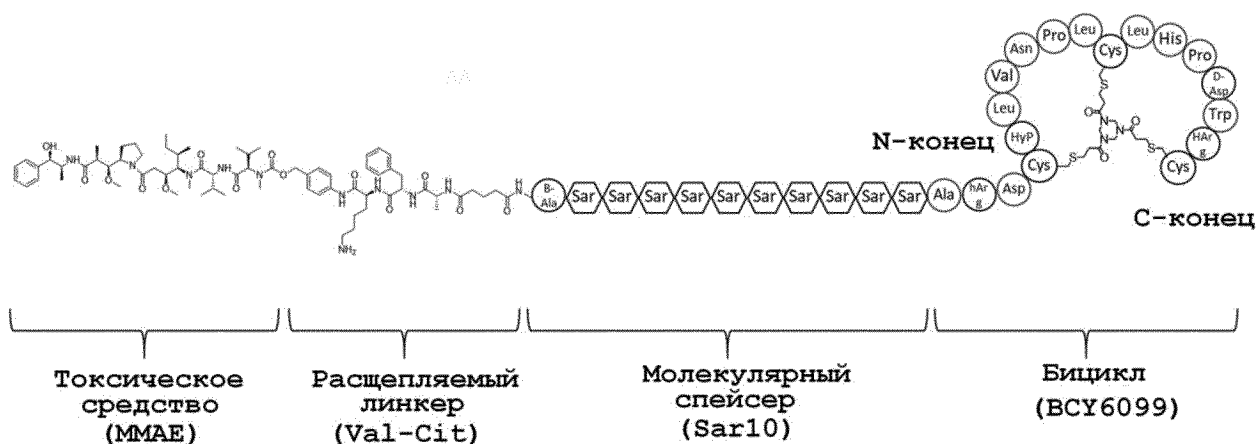
BCY6136



BCY6173



BSY6174



BSY6175

В одном варианте осуществления, конъюгат лекарственного средства не является BSY6027, BSY6028, BSY6135, BSY6136, BSY6173, BSY6174 и BSY6175.

И еще в одном варианте осуществления, конъюгат лекарственного средства представляет собой BSY6136. Данные, представленные в изобретении в исследованиях 7 и 8, показывают, что BSY6136 проявлял значительную и высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака предстательной железы PC-3 (смотрите фигуры 7-10 и таблицы 21-24). Представленные в изобретении данные также показывают, что BSY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака легкого NCI-H1975 (немелкоклеточного рака легкого) (смотрите фигуры 11-13 и таблицы 25-30). Данные, представленные в изобретении в исследованиях 10 и 11, также показывают, что BSY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в моделях рака легкого LU-01-0251 PDX (немелкоклеточного рака легкого) как в случае опухоли большого размера, так и опухоли малого размера (смотрите фигуры 14 и 15 и таблицы 31 и 34), в которых наблюдался полный регресс опухоли. Данные, представленные в изобретении в исследовании 12, также показывают, что BSY6136 проявлял статистически значимое противоопухолевое действие в модели рака легкого LU-01-0046 PDX (немелкоклеточного

рака легкого) (смотрите фигуру 16 и таблицы 35-36), в которой наблюдался полный регресс опухоли в случае использования BCY6136. Данные, представленные в изобретении в исследовании 13, также показывают, что BCY6136 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность в модели рака легкого LU-01-0046 PDX (немелкоклеточного рака легкого) (смотрите фигуру 17 и таблицы 37 и 38). Данные, представленные в изобретении в исследовании 14, также показывают, что использование BCY6136 приводило к полному уничтожению опухолей в модели рака легкого LU-01-0046 PDX (немелкоклеточного рака легкого) (смотрите фигуры 18-22 и таблицы 39-42). Данные, представленные в изобретении в исследованиях 15 и 16, также иллюстрируют эффекты BCY6136 в двух моделях, в которых используются клеточные линии с низкой/пренебрежимо малой экспрессией EphA2 (а именно Lu-01-0412 и Lu-01-0486). Эти данные, приведенные на фигурах 23 и 24 и в таблицах 43-46, показывают, что использование BCY6136 не приводило к регрессу опухоли ни в одной из клеточных линий, но использование BCY8245 и BCY8781, которые связываются с мишенью, в высокой степени экспрессированной в клеточной линии Lu-01-0412, приводило к полному уничтожению опухоли. Данные, представленные в исследовании 17, показывают, что BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака молочной железы MDA-MB-231 (смотрите фигуры 25-27 и таблицы 47-50). Данные, представленные в изобретении в исследовании 18, иллюстрируют воздействия BCY6136 в модели рака молочной железы, в которой используются клеточная линия с низкой/пренебрежимо малой экспрессией EphA2 (а именно EMT6). Эти данные, представленные на фигуре 28 и в таблицах 51 и 52, показывают, что использование BCY6136 не приводило к регрессу опухоли в случае этой клеточной линии. Данные, представленные в изобретении в исследовании 19, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака желудка NCI-N87 (смотрите фигуру 29 и таблицы 53 и 54). Данные, представленные в изобретении в исследовании 20, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака яичников SK-OV-3 (смотрите фигуру 30 и таблицы 55 и 56) по сравнению с ADC MEDI-547, который проявлял умеренную противоопухолевую активность. Данные, представленные в изобретении в исследовании 21, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака пищевода OE-21 (смотрите фигуру 31 и таблицы 57 и 58). Данные, представленные в изобретении в исследовании 22, показывают, что BCY6136 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели множественной миеломы MOLP-8 (смотрите фигуры 32 и 33 и таблицы 59 и 60). Данные, представленные в изобретении в исследовании 23, показывают, что BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели фибросаркомы HT-1080 (смотрите фигуры 34-41 и таблицы 61 и 62).

Синтез

Пептиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы с использованием стандартных методик и затем подвергнуты реакции с молекулярным каркасом *in vitro*. Для этого могут быть использованы стандартные химические методы. Такой подход позволяет проводить препаративный синтез растворимого материала для проведения последующих экспериментов или валидации. Такие методы могут быть реализованы с использованием традиционных химических подходов, таких как раскрытые в публикации Timmerman et al (*supra*).

Соответственно, изобретение также относится к получению полипептидов или конъюгатов, выбранных, как это указано в изобретении, где получение включает, необязательно, дополнительные стадии, которым приводятся разъяснения ниже. В одном варианте осуществления, эти стадии проводят на конечном продукте полипептид/конъюгат, который был получен методом химического синтеза.

При получении конъюгата или комплекса, в представляющем интерес полипептиде могут быть, необязательно, заменены аминокислотные остатки.

Пептиды могут быть также удлинены с целью введения, например, еще одной петли и, вследствие этого, придания пептидам полиспецифичности.

Удлинение пептида может быть осуществлено простым химическим путем на его N-конце или C-конце или в пределах его петель с использованием ортогонально защищенных лизинов (и аналогов) стандартными методами твердофазного или жидкофазного химического синтеза. Для введения активированного или активируемого N- или C-конца могут быть использованы стандартные методы (био)конъюгации. В качестве варианта, могут быть сделаны дополнительные удлинения путем конденсации фрагментов или нативного химического лигирования, например как описано в публикации Dawson et al. 1994. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. Science 266:776-779, или с помощью ферментов, например, с использованием субтилигазы, как описано в публикации Chang et al Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8, или в публикации Hikari et al Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003).

В качестве варианта, пептиды могут быть удлинены или модифицированы путем последующей конъюгации с использованием дисульфидных связей. Такой подход имеет дополнительное преимущество, позволяющее первому и второму пептиду диссоциировать друг от друга при попадании в восстановительную среду клетки. В этом случае, молекулярный каркас (например, ТВМВ) может быть добавлен в процессе химического синтеза первого пептида, для того чтобы он вступал в реакцию с тремя группами цистеина; затем к N- или C-концу первого пептида может быть присоединен дополнительный цистеин или тиол, для того чтобы этот цистеин или тиол взаимодействовал только со свободным цистеином или тиолом второго пептида, образуя связанный дисульфидной связью конъюгат бициклического пептида-пептида.

Аналогичные методы применимы в равной степени к синтезу/сопряжению двух бициклических и биспецифических макроциклов, что потенциально позволяет создавать тетраспецифическую молекулу.

Кроме того, может быть осуществлено таким же способом добавление других функциональных групп или эффекторных групп, используя соответствующие химические методы, присоединение на N- или C-концах или через боковые цепи. В одном варианте осуществления, присоединение проводят таким образом, что оно не блокирует активность любого из структурных фрагментов.

Фармацевтические композиции

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается фармацевтическая композиция, включающая определенные выше пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Обычно, представленные пептидные лиганды должны использоваться в очищенной форме совместно с фармакологически приемлемыми вспомогательными веществами или носителями. Как правило, эти вспомогательные вещества или носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и/или забуференные среды. Среда для парентерального введения включает раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу и хлорид натрия, и раствор Рингера с лактатом. Подходящие физиологически приемлемые вспомогательные средства, если требуется поддерживать полипептидный комплекс в суспензионной форме, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Среды для внутривенного введения включают восполнители недостатка жидкости и питательных веществ и восполнители недостатка электролитов, такие как восполнители на основе раствора Рингера с декстрозой. Кроме того, могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие реагенты и инертные газы (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут применять в форме отдельно вводимых композиций или в сочетании с другими лекарственными средствами. Эти лекарственные средства могут включать антитела, фрагменты антител и различные иммунотерапевтические лекарственные средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "коктейли" различных цитотоксических или других средств в сочетании с белковыми лигандами по настоящему изобретению, или даже комбинации выбранных полипептидов по настоящему изобретению, имеющих различную специфичность, таких как полипептиды, выбранные с использованием различных целевых лигандов, независимо от того, будут ли их объединять вместе перед введением или не будут.

Способ введения фармацевтических композиций согласно изобретению может быть любым из способов, которые хорошо известны специалистам в данной области. С целью проведения терапии, пептидные лиганды по изобретению могут быть введены любому пациенту стандартными способами. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, включая парентеральный, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, трансдермальный, ингаляционный способы, или же, соответственно, путем прямой инфузии с использованием катетера. Доза и частота введения будет зависеть от возраста, пола и состояния больного, от одновременного введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должны приниматься во внимание лечащим врачом.

Пептидные лиганды по настоящему изобретению могут быть лиофилизированы с целью хранения и затем восстановления в подходящем носителе перед использованием. Было показано, что этот метод является эффективным, и известные методы лиофилизации и восстановления могут быть использованы в изобретении. Для специалистов в данной области является очевидным, что лиофилизация и восстановление могут приводить к различной степени потери активности, и что для компенсации этих потерь, необходимо проводить корректировку концентрации пептидных лиганд в сторону повышения.

Композиции, содержащие представленные в изобретении пептидные лиганды или их коктейль, могут быть введены с целью профилактического и/или терапевтического лечения. При конкретных вариантах применения в терапевтических целях, под "терапевтически эффективной дозой" подразумевают соответствующее количество, применение которого позволяет достигать, по меньшей мере, частичного ингибирования, подавления, модуляции, уничтожения или какого-либо другого измеримого параметра популяции выбранных клеток. Количества, необходимые для достижения этой дозы, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния собственной иммунной системы пациента, но обычно эти количества находятся в диапазоне от 0,005 до 5,0 мг выбранного пептидного лиганда на килограмм массы тела, причем чаще всего используются дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических целей, композиции, включающие представленные в изобретении пептидные лиганды или их смеси, также могут быть введены в аналогичных или слегка более низких дозах.

Композиция, содержащая пептидный лиганд по настоящему изобретению, может применяться в профилактических и терапевтических целях, для того чтобы способствовать изменению, инактивации, уничтожению или удалению выбранной популяции клеток-мишеней в организме млекопитающего. Кроме того, пептидные лиганды, описанные в изобретении, могут селективно применяться экстракорпорально или *in vitro* для избирательного уничтожения, истощения или эффективного удаления иным образом популяции клеток-мишеней из гетерогенной популяции клеток. Взятая у млекопитающего кровь может быть экстракорпорально объединена с выбранными пептидными лигандами, в

результате чего нежелательные клетки уничтожаются или иным образом удаляются из крови, которую возвращают млекопитающему с использованием стандартных методов.

Терапевтическое применение

Бициклические пептиды по изобретению обладает специфической способностью связывать EphA2.

Eph-рецепторы тирозинкиназы (Eph) относятся к большой группе рецепторных тирозинкиназ (RTK), киназы которых фосфорилируют белки на остатках тирозина. Ephs и их мембраносвязанные эфринные лиганды (эфрины) контролируют позиционирование клеток и организацию тканей (Poliakov et al. (2004) *Dev Cell* 7, 465-80). Функциональные и биохимические Eph-ответы возникают при более высоких состояниях олигомеризации лигандов (Stein et al. (1998) *Genes Dev* 12, 667-678).

Было показано, что среди других функций формирования паттернов, различные Ephs и эфрины играют определенную роль в развитии сосудов. Нокаут EphB4 и эфрин-B2 приводит к отсутствию способности ремоделировать капиллярные русла в кровеносные сосуды (Poliakov et al., *supra*) и к эмбриональной летальности. Персистирующая экспрессия некоторых рецепторов Eph и эфринов также наблюдалась во вновь образованных микрососудах у взрослых (Brantley-Sieders et al. (2004) *Curr Pharm Des* 10, 3431-42; Adams (2003) *J Anat* 202, 105-12).

Также было обнаружено, что нерегулированное повторное появление некоторых эфринов и их рецепторов у взрослых людей способствует инвазии опухоли, метастазированию и неоангиогенезу (Nakamoto et al. (2002) *Microsc Res Tech* 59, 58-67; Brantley-Sieders et al., *supra*). Кроме того, было обнаружено, что некоторые представители семейства Eph сверхэкспрессируются в опухолевых клетках из различных опухолей человека (Brantley-Sieders et al., *supra*); Marme (2002) *Ann Hematol* 81 Suppl 2, S66; Booth et al. (2002) *Nat Med* 8, 1360-1).

ЕРН рецептор А2 (эфрин типа-А рецептор 2) представляет собой белок, который у людей кодируется геном ЕРНА2.

EphA2 активируется при наличии множественных злокачественных заболеваний у человека, часто коррелируя с прогрессированием заболевания, метастазированием и неблагоприятным прогнозом, например, при раке молочной железы (Zelinski et al (2001) *Cancer Res.* 61, 2301-2306; Zhuang et al (2010) *Cancer Res.* 70, 299-308; Brantley-Sieders et al (2011) *PLoS One* 6, e24426), раке легкого (Brannan et al (2009) *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 1039-1049; Kinch et al (2003) *Clin Cancer Res.* 9, 613-618; Guo et al (2013) *J Thorac Oncol.* 8, 301-308), раке желудка (Nakamura et al (2005) *Cancer Sci.* 96, 42-47; Yuan et al (2009) *Dig Dis Sci* 54, 2410-2417), раке поджелудочной железы (Mudali et al (2006) *Clin Exp Metastasis* 23, 357-365), раке предстательной железы (Walker-Daniels et al (1999) *Prostate* 41, 275-280), раке печени (Yang et al (2009) *Hepatol Res.* 39, 1169-1177) и глиобластоме (Wykosky et al (2005) *Mol Cancer Res.* 3, 541-551; Li et al (2010) *Tumour Biol.* 31, 477-488).

Полностью роль EphA2 в прогрессировании рака до сих пор не выяснена, хотя и существуют доказательства его влияния на многочисленных этапах прогрессирования рака, включая рост опухолевых клеток, выживание, инвазию и ангиогенез. Понижающая регуляция экспрессии EphA2 подавляет размножение опухолевых раковых клеток (Binda et al. (2012) *Cancer Cell* 22, 765-780), в то время как блокада EphA2 ингибирует VEGF-индуцированную миграцию клеток (Hess et al (2001) *Cancer Res.* 61, 3250-3255), прорастание и ангиогенез (Cheng et al. (2002) *Mol Cancer Res.* 1, 2-11; Lin et al. (2007) *Cancer* 109, 332-40), и прогрессирование метастазирования (Brantley-Sieders et al. (2005) *FASEB J.* 19, 1884-1886).

Было показано, что конъюгат лекарственного средства с антителом против EphA2 значительно снижает рост опухоли в ксенотрансплантатных моделях на крысах и мышах (Jackson et al (2008) *Cancer Research* 68, 9367-9374), и аналогичный подход был опробован на мужчине, хотя лечение пришлось прервать из-за необходимости проведения лечения взаимосвязанных неблагоприятных побочных эффектов (Annunziata et al (2013) *Invest New drugs* 31, 77-84).

Полипептидные лиганды, выбранные в соответствии со способом по настоящему изобретению, могут быть использованы при *in vivo* терапевтическом и профилактическом применении, *in vitro* и *in vivo* диагностических применениях, при проведении *in vitro* исследования и в качестве реагента, и в других подобных целях. Лиганды с выбранными уровнями специфичности могут применяться при проведении испытаний на животных, не относящихся к человеку, когда желательно наличие перекрестной реактивности, или при диагностике, когда необходимо тщательно контролировать перекрестную реактивность с гомологами или паралогами. При некоторых применениях, таких как применение вакцин, может быть использована способность пептидных лигандов вызывать иммунный ответ на заранее определенные ряды антигенов, для того чтобы адаптировать вакцину к конкретным заболеваниям и патогенам.

Практически чистые пептидные лиганды с гомогенностью, по меньшей мере, от 90 до 95% являются предпочтительными для введения млекопитающему, и с гомогенностью от 98 до 99% или более являются наиболее предпочтительными для фармацевтического применения, в частности, когда млекопитающим является человек. После очистки, частичной или до состояния гомогенности, в зависимости от требований, выбранные полипептиды могут быть использованы в диагностике или терапии (в том числе экстракорпорально), или при разработке и проведении методик анализа, иммунофлуоресцентных окрашиваний и для других подобных целей (Lefkovite and Pernis, (1979 and 1981) *Immunological Methods*, Volumes I and II, Academic Press, NY).

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается определенный выше пептидный лиганд или конъюгат лекарственного средства для применения для предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль).

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается способ предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани (такой как опухоль), который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффекторной группы и определенного выше конъюгата лекарственного средства с пептидным лигандом.

В одном варианте осуществления, EphA2 представляет собой EphA2 млекопитающего. В еще одном варианте осуществления, EphA2 млекопитающего представляет собой EphA2 человека.

В одном варианте осуществления, заболевание или нарушение, характеризующееся сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани, выбирают из рака.

Примеры раковых заболеваний (и их доброкачественных типов), которые могут быть подвергнуты лечению (или ингибированию), включают, но этим не ограничивая, опухоли эпителиального происхождения (аденомы и карциномы различных типов, включая аденокарциномы, плоскоклеточные карциномы, переходные клеточные карциномы и другие карциномы), такие как карциномы мочевого пузыря и мочевых путей, молочной железы, желудочно-кишечного тракта (включая карциномы пищевода, желудка (желудочные), тонкой кишки, толстой кишки, прямой кишки и заднего прохода), печени (гепатоцеллюлярная карцинома), желчного пузыря и билиарной системы, экзокринной части поджелудочной железы, почек, легких (например, аденокарциномы, мелкоклеточные карциномы легких, немелкоклеточные карциномы легких, бронхоальвеолярные карциномы и мезотелиомы), карциномы головы и шеи (например, рак языка, ротовой полости, гортани, глотки, носоглотки, миндалин, слюнных желез, полости носа и околоносовых пазух), яичников, маточных труб, брюшины, влагалища, вульвы, пениса, шейки матки, миометрия, эндометрия, щитовидной железы (например, фолликулярную карциному щитовидной железы), надпочечников, предстательной железы, кожи и прилежащих органов (например, меланому, базальноклеточный рак, плоскоклеточный рак, кератоакантому, диспластический невус); гематологические злокачественные опухоли (например, лейкозы, лимфомы) и предраковые гематологические нарушения и нарушения с пограничной злокачественностью, включая гематологические злокачественные заболевания и связанные с ними состояния клеток лимфоидного ряда (например, острый лимфоцитарный лейкоз [ALL], хронический лимфоцитарный лейкоз [CLL], В-клеточные лимфомы, такие как диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома [DLBCL], фолликулярная лимфома, лимфома Беркитта, лимфома клеток мантии, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, лимфомы с природными клетками-киллерами [NK], лимфомы Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, моноклональную гаммапатию неясного генеза, плазмцитому, множественную миелому и лимфопролиферативные нарушения после трансплантации), а также гематологические злокачественные и родственные состояния клеток миелоидного ряда (например, острый миелолейкоз [AML], хронический миелолейкоз [CML], хронический миеломоноцитарный лейкоз [CMML], гиперэозинофильный синдром, миелопролиферативные расстройства, такие

как полицитемия вера, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, миелопролиферативный синдром, синдром миелодисплазии и промиелоцитарный лейкоз); опухоли мезенхимального происхождения, например, саркомы мягких тканей, кости или хряща, такие как остеосаркомы, фибросаркомы, хондросаркомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы, липосаркомы, ангиосаркомы, саркому Капоши, саркому Юинга, синовиальную саркому, эпителиоидные саркомы, желудочно-кишечные стромальные опухоли, доброкачественные и злокачественные гистiocитомы и дерматофибросаркому протуберанс; опухоли центральной или периферической нервной системы (например, астроцитомы, глиомы и глиобластомы, менингиомы, эпендимомы, опухоли эпифиза и шванномы); эндокринные опухоли (например, опухоли гипофиза, опухоли надпочечников, опухоли островковых клеток, опухоли паращитовидных желез, карциноидные опухоли и медуллярную карциному щитовидной железы); опухоли глаз и их придатков (например, ретинобластому); опухоли зародышевых клеток и трофобласта (например, тератомы, семиномы, дисгерминомы, пузырьный занос и хориокарциному); и педиатрические и эмбриональные опухоли (например, медуллобластомы, нейробластомы, опухоль Вильмса и примитивные нейроэктодермальные опухоли); или синдромы, врожденные или иные, которые делают пациента восприимчивым к возникновению злокачественного новообразования (например, пигментную ксеродерму).

В еще одном варианте осуществления, рак выбирают из рака молочной железы, рака легкого, рака желудка, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака печени, глиобластомы и ангиогенеза.

В еще одном варианте осуществления, рак выбирают из рака предстательной железы, рака легкого (такого как немелкоклеточная карцинома легкого (NSCLC)), рака молочной железы (такого как трижды негативный рак молочной железы), рака желудка, рака яичников, рака пищевода, множественной миеломы и фибросаркомы.

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак предстательной железы. Данные, представленные в изобретении в исследованиях 7 и 8, показывают, что BCY6136 проявлял значительную и высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака предстательной железы PC-3 (смотрите фигуры 7- 10 и таблицы 21-24).

В еще одном варианте осуществления, конъюгат лекарственного средства применяют для предотвращения, торможения развития или лечения солидных опухолей, таких как фибросаркомы и карциномы молочной железы, и немелкоклеточные карциномы легкого.

В еще одном варианте осуществления, рак выбирают из рака легкого, такого как немелкоклеточные карциномы легкого (NSCLC). Представленные в изобретении данные показывают, что BDC по изобретению (BCY6031) полностью уничтожал немелкоклеточные карциномы легкого со дня 32, и не возникало возобновления роста опухоли после временного прекращения дозирования на день 28. Эти данные однозначно подтверждают возможность клинического применения BDC по настоящему изобретению при раке, таком

как рак легкого, в частности, немелкоклеточные карциномы легкого. Данные, представленные в изобретении в исследовании 9, показывают, что BCY6033 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность, BCY6082 проявлял значительную противоопухолевую активность, и BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака легкого (NSCLC) NCI-H1975 (смотрите фигуры 11-13 и таблицы 25-30). Данные, также представленные в изобретении в исследованиях 10 и 11, показывают, что BCY6136 проявлял мощный противоопухолевый эффект в моделях рака легкого (NSCLC) LU-01-0251 PDX как в случае опухоли большого размера, так и в случае опухоли малого размера (смотрите фигуры 14 и 15 и таблицы 31-34), когда обнаруживали полный регресс опухоли. Данные, представленные в изобретении в исследовании 12, показывают, что BCY6033, BCY6136, BCY6082 и BCY6031 проявляли значительный противоопухолевый эффект в модели рака легкого (NSCLC) LU-01-0046 PDX (смотрите фигуру 16 и таблицы 35 и 36), когда обнаруживали регресс опухоли для BCY6033 и BCY6136. Данные, представленные в изобретении в исследовании 13, показывают, что BCY6136 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность в модели рака легкого (NSCLC) LU-01-0046 PDX (смотрите фигуру 17 и таблицы 37 и 38). Данные, представленные в изобретении в исследовании 14, показывают, что BCY6082 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность, BCY6031 и BCY6173 проявляли противоопухолевую активность, и BCY6033, BCY6136 и BCY6175 уничтожали опухоли в модели рака легкого (NSCLC) LU-01-0046 PDX (смотрите фигуры 18-22 и таблицы 39-42). Данные, также представленные в изобретении в исследованиях 15 и 16, иллюстрируют эффекты BCY6136 в двух моделях, в которых используются клеточные линии с низкой/пренебрежимо малой экспрессией EphA2 (а именно Lu-01-0412 и Lu-01-0486). Эти данные, представленные на фигурах 23 и 24 и в таблицах 43 и 46, показывают, что использование BCY6136 не приводило к регрессу опухоли ни в одном из случаев этой клеточной линии, но BCY8245 и BCY8781, которые связываются с мишенью, сверхэкспрессирующей в клеточной линии Lu-01-0412, полностью уничтожали опухоль. В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак молочной железы. В еще одном варианте осуществления, рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы. Данные, представленные в изобретении в исследовании 17, показывают, что BCY6082 проявлял противоопухолевую активность, BCY6033 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность, и BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака молочной железы MDA-MB-231 (смотрите фигуры 25-27 и таблицы 47-50). Данные, представленные в изобретении в исследовании 18, иллюстрируют эффекты BCY6136 в модели рака молочной железы, в которой используются клеточные линии с низкой/пренебрежимо малой экспрессией EphA2 (а именно EMT6). Эти данные, представленные на фигуре 28 и в таблицах 51 и 52, показывают, что BCY6136 не оказывал воздействия на регресс опухоли в этой клеточной линии. В альтернативном варианте осуществления, рак молочной железы представляет собой резистентный к герцептину рак

молочной железы. Не ссылаясь в качестве доказательства на какую-либо теорию, тем не менее, предполагают, что EphA2 имеет непосредственное отношение к возникновению резистентности к герцептину, и поэтому, нацеленный на EphA2 структурный фрагмент имеет перспективу использования у пациентов, у которых не достигается ответ при лечении герцептином.

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак желудка. Данные, представленные в изобретении в исследовании 19, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака желудка NCI-N87 (смотрите фигуру 29 и таблицы 53 и 54).

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак яичников. Данные, представленные в изобретении в исследовании 20, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака яичников SK-OV-3 (смотрите фигуру 30 и таблицы 55 и 56) по сравнению с ADC MEDI-547, который проявлял умеренную противоопухолевую активность.

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак пищевода. Данные, представленные в изобретении в исследовании 21, показывают, что BCY6136 проявлял значительную противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели рака пищевода OE-21 (смотрите фигуру 31 и таблицы 57 и 58).

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой множественную миелому. Данные, представленные в изобретении в исследовании 22, показывают, что BCY6136 проявлял дозозависимую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели множественной миеломы MOLP-8, а BCY6082 проявлял значительную противоопухолевую активность (смотрите фигуры 32 и 33 и таблицы 59 и 60).

В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой фибросаркому. Данные, представленные в изобретении в исследовании 23, показывают, что BCY6173, BCY6135, BCY6174 и BCY6175 проявляли дозозависимую противоопухолевую активность, а BCY6136 проявлял высокую противоопухолевую активность в ксенотрансплантатной модели фибросаркомы HT-1080 (смотрите фигуры 34-41 и таблицы 61 и 62).

Используемый в изобретении термин "предотвращение" подразумевает введение защитной композиции до возникновения заболевания. "Торможение развития" относится к введению композиции после возникновения заболевания, но до клинического проявления заболевания. "Лечение" подразумевает введение защитной композиции после проявления симптомов заболевания.

Доступны экспериментальные модели на животных, в которых можно проводить исследования по эффективности пептидных лигандов при предотвращении или лечении заболевания. Использованию экспериментальных моделей на животных способствует настоящее изобретение, которое позволяет разрабатывать полипептидные лиганды, способные перекрестно реагировать с мишенями человека и животных, что делает

возможным использование моделей на животных с последующей интерпретацией полученных данных в отношении человека.

Кроме того, данные, представленные в изобретении, иллюстрируют взаимосвязь между вариацией числа копий (CNV) и экспрессией гена для EphA2 для типов множественных опухолей. Так, в соответствии с еще одним аспектом изобретения, предлагается способ предотвращения, торможения развития или лечения рака, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффекторной группы и определенного выше конъюгата лекарственного средства с пептидным лигандом, где указанный пациент идентифицируется как имеющий повышенную вариацию числа копий (CNV) EphA2.

В одном варианте осуществления, рак выбирают из тех типов рака, которые идентифицируются в изобретении как имеющие повышенную вариацию числа копий (CNV) EphA2. В еще одном варианте осуществления, рак представляет собой рак молочной железы.

Далее приводится дополнительное описание изобретения с использованием следующих примеров.

Примеры

Условные сокращенные обозначения	Название	Название прекурсора	Прекурсор CAS	Фирма-производитель
1Nal	1-Нафтилаланин	Fmoc-3-(1-нафтил)-L-аланин	96402-49-2	Fluorochem
2FuAla	2-Фурилаланин	Fmoc-L-2-фурилаланин	159611-02-6	Combi Blocks
2Nal	2-Нафтилаланин	Fmoc-3-(2-нафтил)-L-аланин	112883-43-9	Alfa Aesar
3,3-DPA	3,3-Дифенилаланин	Fmoc-3,3-дифенилаланин	189937-46-0	Alfa Aesar
3,4-DCPhe	3,4-Дихлорфенилаланин	Fmoc-3,4-дихлор-L-фенилаланин	17766-59-5	PolyPeptide
3Pal	3-(3-Пиридил)-аланин	N-Fmoc-3-(3-пиридил)-аланин	175453-07-3	Fluorochem
4,4-BPA	4,4'-Бифенилаланин	Fmoc-L-4,4'-бифенилаланин	199110-64-0	Alfa Aesar
4БензилPго	4-Бензилпирролидин-2-карбоновая кислота	Fmoc-4-Бензилпирролидин-2-карбоновая кислота		PolyPeptide

4BrPhe	4-Бромфенилаланин	Fmoc-4-Бром-L-фенилаланин	198561-04-5	PolyPeptide
4FlPro	4-Фтор-пирролидин-2-карбоновая кислота	Fmoc-4-фтор-пирролидин-2-карбоновая кислота	203866-19-7	PolyPeptide
4MeoPhe	4-Метоксифенилаланин	Fmoc-4-Метоксифенилаланин	77128-72-4	Iris Biotech
4Pal	3-(4-Пиридил)-аланин	N-Fmoc-3-(4-пиридил)-L-аланин	169555-95-7	Fluorochem
4ФенилPro	4-Фенил-пирролидин-2-карбоновая кислота	Fmoc-4-фенил-пирролидин-2-карбоновая кислота	269078-71-9	Cambridge Bioscience
Ac	Ацетил			
AC3C	1-Аминоциклопропан-1-карбоновая кислота	1-(Fmoc-амино)-циклопропанкарбоновая кислота	126705-22-4	Iris Biotech
AC4C	1-Амино-1-циклобутанкарбоновая кислота	1-(Fmoc-амино)-циклобутанкарбоновая кислота	885951-77-9	Fluorochem
AC5C	1-Амино-1-циклопентанкарбоновая кислота	1-(Fmoc-амино)-циклопентанкарбоновая кислота	117322-30-2	Iris Biotech
AF488	AlexaFluor488	AlexaFluor488-NHS эфир		Fisher Scientific
Aib	2-Аминоизомасляная кислота	Fmoc- α -аминоизомасляная кислота	94744-50-0	Fluorochem
Aza-Gly	Азаглицин			
Aze	Азетидин	Fmoc-L-азетидин-2-карбоновая кислота	136552-06-2	Combi Blocks
β -Ala	β -Аланин	Fmoc- β -аланин	35737-10-1	Fluorochem
β -AlaSO ₃ H	β -Аланин(SO ₃ H)	Fmoc-альфа-сульфо-бета-аланин	1005412-03-2	Iris Biotech
C5g	Циклопентилглицин	Fmoc-L-циклопентилглицин	220497-61-0	Fluorochem
Cba	β -Циклобутилаланин	Fmoc- β -циклобутил-L-аланин	478183-62-9	IRIS Biotech GmbH
Cpa	β -Циклопропилаланин	Fmoc- β -циклопропил-L-аланин	214750-76-2	Fluorochem

Cpg	Циклопропилглицин	Fmoc-L-циклопропилглицин	1212257-18-5	Apollo Scientific
Cya	Цистеиновая кислота	Fmoc-L-цистеиновая кислота	320384-09-6	
D-3,3-DPA	3,3-дифенил-D-аланин	Fmoc-3,3-дифенил-D-аланин	189937-46-0	Chem-Impex international
D-Arg	D-Аргинин	Fmoc-D-аргинин(Pbf)	187618-60-6	Iris Biotech
D-Asp	D-Аспарагиновая кислота	Fmoc-D-аспарагиновой кислоты 4-третбутиловый эфир	112883-39-3	Sigma Aldrich
D-Cya	D-цистеиновая кислота	Fmoc-D-цистеиновая кислота		Costom synthesis
D-K	D-Лизин	Fmoc-D-Лизин(Boc)	92122-45-7	Sigma Aldrich
DOTA	1,4,7,10-тетраазаациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота			
Fl	5(6)-карбокси-флуоресцеин			Sigma
HArg	Гомоаргинин	Fmoc-L-НомоArg(Pbf)-ОН	401915-53-5	Fluorochem
HPhe	Гомофенилаланин	Fmoc-L-гомофенилаланин	132684-59-4	Iris Biotech
HyP	Гидроксипролин	Fmoc-гидроксипролин(tBu)-ОН	122996-47-8	Sigma
hSerMe	Гомосерин(метил)	Fmoc-O-метил-L-гомосерин	173212-86-7	Iris Biotech
Lys(Dde)	Лизин(Dde)	N- α -Fmoc-N- ϵ -1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)этил-L-лизин	150629-67-7	Sigma Aldrich
NO2Phe	4-нитрофенилаланин	Fmoc-4-нитро-L-фенилаланин	95753-55-2	PolyPeptide
Phg	Фенилглицин	Fmoc-L-фенилглицин	102410-65-1	Combi Blocks
Pip	Пипеколиновая кислота	Fmoc-L-пипеколиновая кислота	86069-86-5	Peptech
Sar	Саркозин, так что Sar _x представляет х остатков Sar	Fmoc-саркозин-ОН	77128-70-2	Sigma

tBuGly	Трет-лейцин	Fmoc-L-трет-лейцин	132684-60-7	Fluorochem
Thi	2-Тиенилаланин	Fmoc-2-тиенилаланин	130309-35-2	Novabiochem
ThiAz	3-(1,2,4-триазол-1-ил)-аланин	Fmoc-3-(1,2,4-триазол-1-ил)-Ala-OH	1217449-37-0	Sigma
ΨAla	Восстановленный амид на основной цепи			

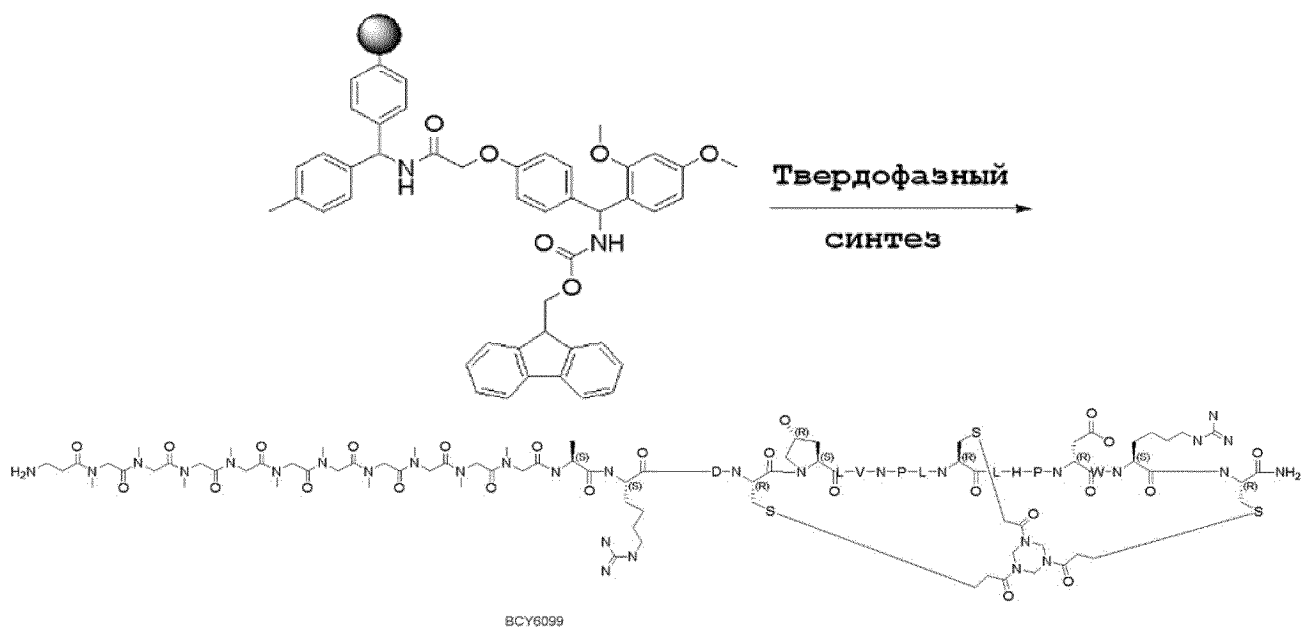
Материалы и методы

Синтез пептидов

Пептиды синтезировали методом твердофазного синтеза. Использовали смолу Rink Amide MBHA. К смеси, содержащей смолу Rink Amide MBHA (0,4-0,45 ммоль/г) и Fmoc-Cys(Trt)-OH (3,0 экв) добавляли DMF, затем добавляли DIC (3 экв) и HOAt (3 экв) и смешивали в течение 1 часа. Для разблокирования использовали 20% пиперидина в DMF. Каждую последующую аминокислоту присоединяли с использованием 3 экв активирующих реагентов, DIC (3,0 экв) и HOAT (3,0 экв) в DMF. Контролировали протекание реакции с использованием цветной реакции нингидрина или цветной реакции tetrachlor. После завершения синтеза, пептидную смолу промывали с помощью DMF x 3, MeOH x 3, и затем сушили при барботировании N₂ в течение ночи. Затем пептидную смолу обрабатывали с помощью 92,5% TFA/2,5% TIS/2,5% EDT/2,5% H₂O в течение 3 часов. Пептид осаждали холодным изопропиловым эфиром и центрифугировали (3 минуты при 3000 об/мин). Осадок промывали два раза изопропиловым эфиром, и неочищенный пептид сушили под вакуумом в течение 2 часов и затем лиофилизировали. Лиофилизированный порошок растворяли в смеси ACN/H₂O (50:50), и добавляли раствор 100 mM TATA в ACN, затем бикарбонат аммония в H₂O (1M), и раствор перемешивали в течение 1 часа. После завершения циклизации, реакцию останавливали 1M водным раствором гидрохлорида цистеина (10 экв относительно TATA), затем перемешивали и выдерживали в течение одного часа. Раствор лиофилизировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный пептид очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) и лиофилизировали с получением продукта.

Если не указаны иначе, то все аминокислоты использовали в L-конфигурациях.

BCY6099 (соединение 66)



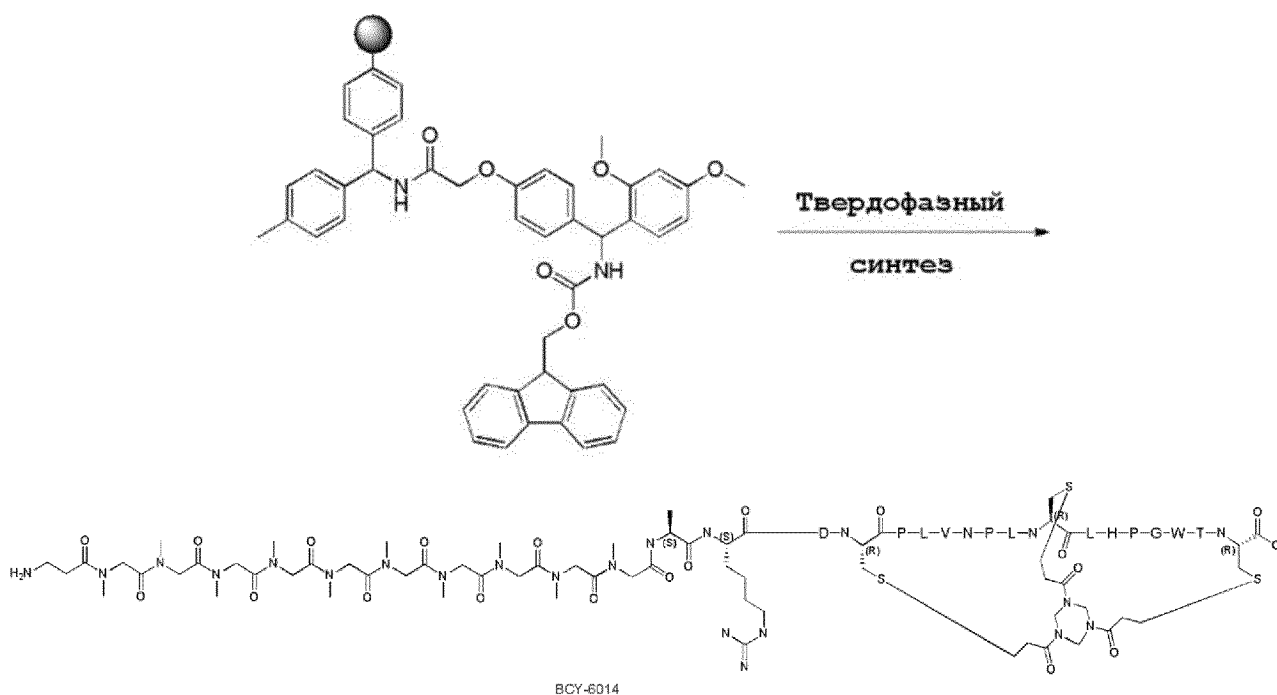
Последовательность: (β -Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 2)-CONH₂

8,0 г смолы использовали для генерации 2,1 г BSY6099 (чистота 99,2%; выход 16,3%)

в виде белого твердого вещества.

Данные анализа BSY6099	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	15-45% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,31 мин
LCMS (ESI):	m/z 1061,8 [M+3H] ³⁺ , 796,5 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3183,68

BSY6014 (соединение 67)

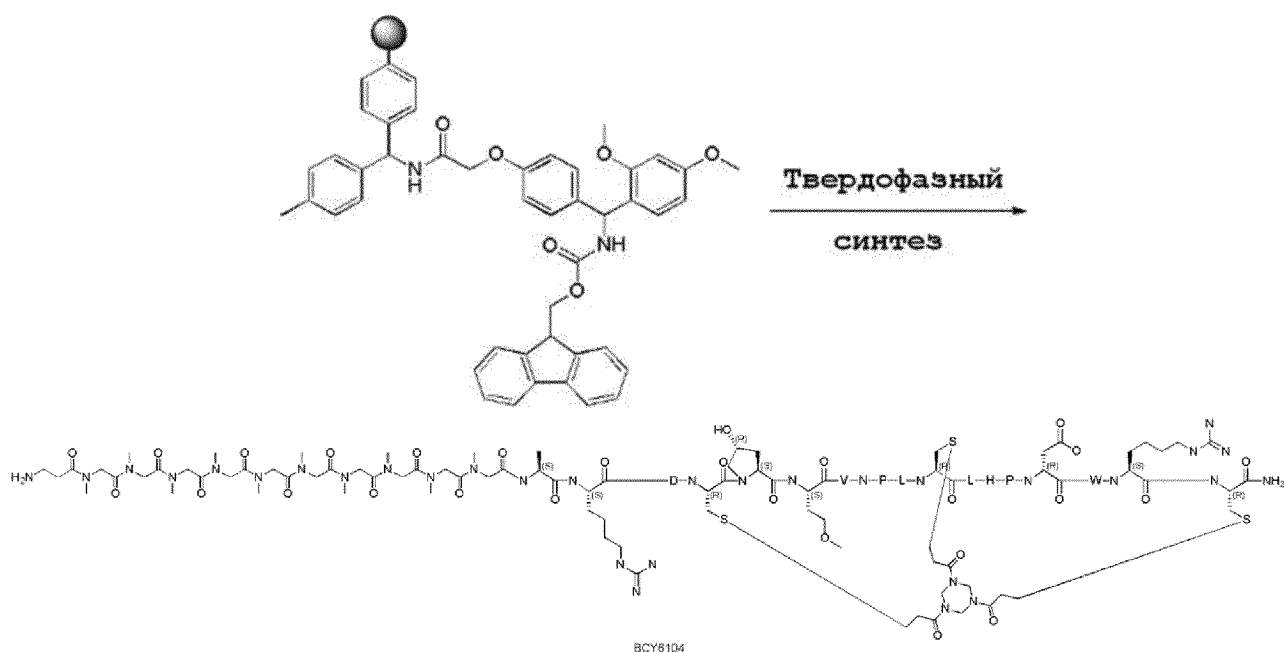


Последовательность: (β-Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 11)-CONH₂

4,79 г смолы использовали для генерации 1,07 г BCY6014 (Q1: 131,9 мг, чистота 97,99%; Q2: 141,7 мг, чистота 99,04%; Q3: 800,7 мг, чистота 92,35%; выход 16,9%) в виде белого твердого вещества.

BCY6014 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	9,95 мин
LCMS (ESI):	m/z 1013,8 [M+3H] ³⁺ , 760,4 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3039,53

BCY6104 (соединение 99)

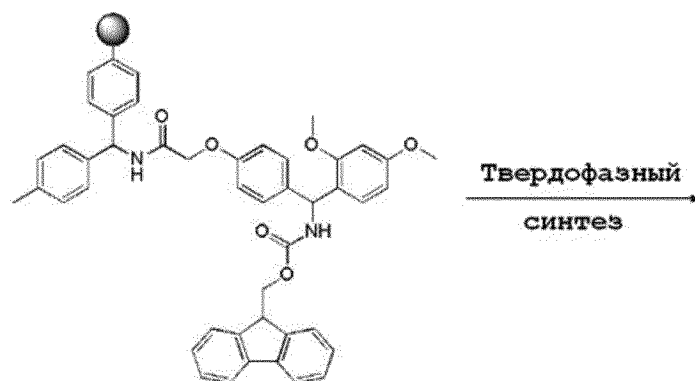


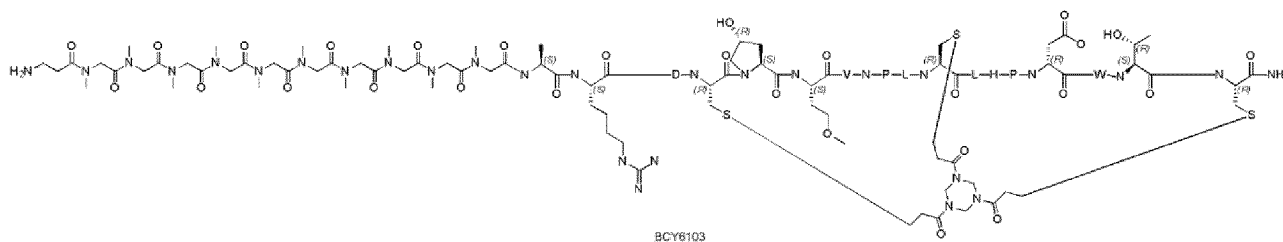
Последовательность: (β-Ala)-Sar₁₀-A(HArg)DC(HyP)(Hse(Me))VNPLCLHP(D-Asp)W(HArg)C ((β-Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 85))

4,44 г смолы использовали для генерации 700 мг BSY6104 (чистота 95,87%, выход 10,5%) в виде белого твердого вещества.

BCY6104 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	7,06 мин
LCMS (ESI):	m/z 1062,1 [M+3H] ³⁺ , 796,8 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3185,65

BCY6103 (соединение 100)





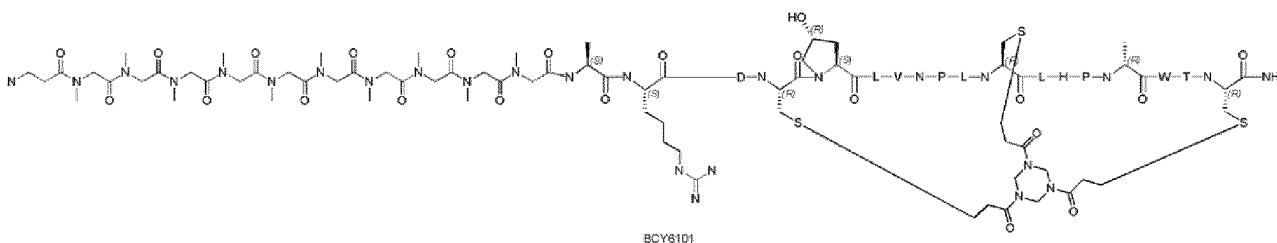
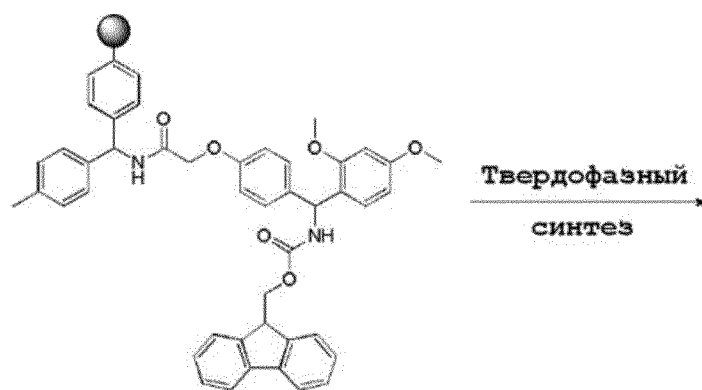
Последовательность: (β-Ala)-Sar₁₀-A(HArg)DC(HyP)(Hse(Me))VNPLCLHP(D-Asp)WTC ((β-Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 86))

4,44 г смолы использовали для генерации 700 мг BCY6103 (чистота 98,9%, выход 11,1%) в виде белого твердого вещества.

BCY6103 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	8,02 мин
LCMS (ESI):	m/z 1039,1 [M+3H] ³⁺ , 779.,5 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3117,55

BCY6101 (соединение 101)

Последовательность: (β-Ala)-Sar₁₀-A(HArg)DC(HyP)LVNPLCLHP(D-Ala)WTC ((β-Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 87))



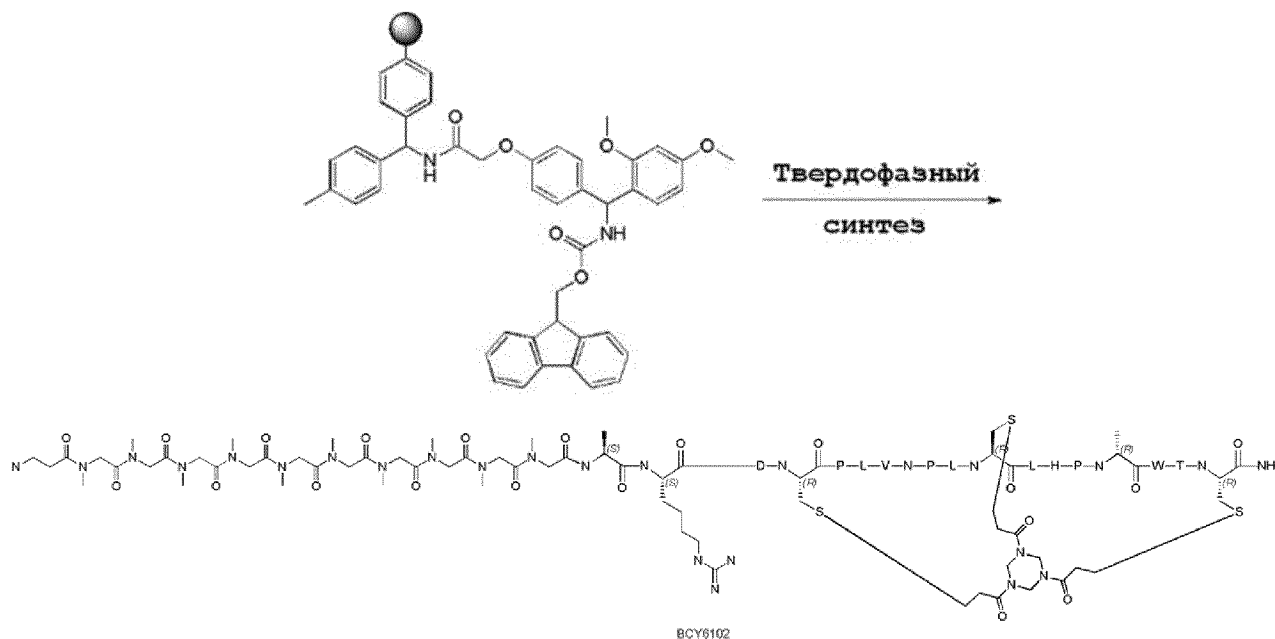
4,44 г смолы использовали для генерации 700 мг BCY6101 (чистота 95,9%, выход 10,9%) в виде белого твердого вещества.

BCY6101 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм

Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% В в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% В
Время удерживания:	9,79 мин
LCMS (ESI):	m/z 1023,6 [M+3H] ³⁺ , 768,0 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3069,55

BCY6102 (соединение 102)

Последовательность: (β-Ala)-Sar₁₀-A(HArg)DCPLVNPLCLHP(D-Ala)WTC ((β-Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 88))

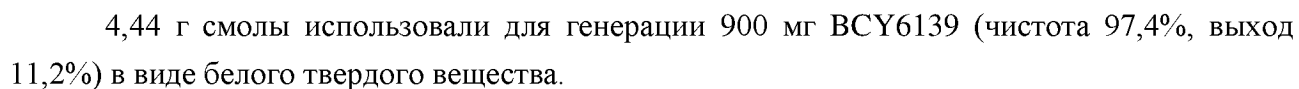


4,44 г смолы использовали для генерации 900 мг BCY6102 (чистота 95,9%, выход 14,1%) в виде белого твердого вещества.

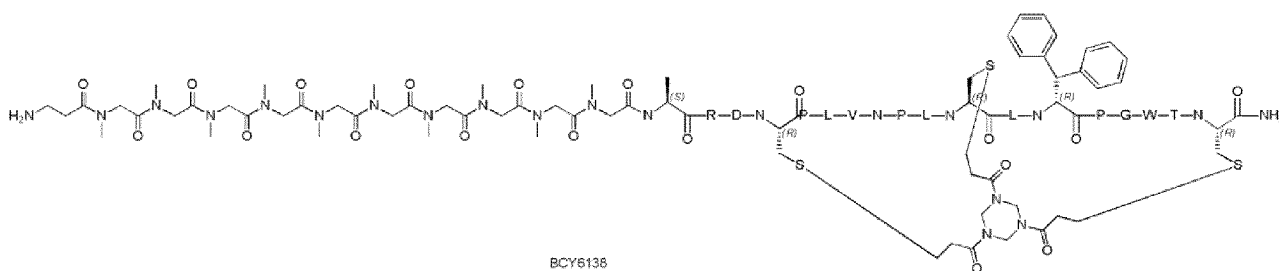
BCY6102 Данные анализа	
Подвижная фаза:	А: 0,1% TFA в H ₂ O В: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% В в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% В
Время удерживания:	9,89 мин
LCMS (ESI):	m/z 1018 [M+3H] ³⁺ , 763,9 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3053,56

BCY6139 (соединение 103)

Последовательность: (β-Ala)-Sar₁₀-ARDC(HyP)LVNPLCLHPGWTC ((β-Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 89))



BCY6138 (соединение 104)

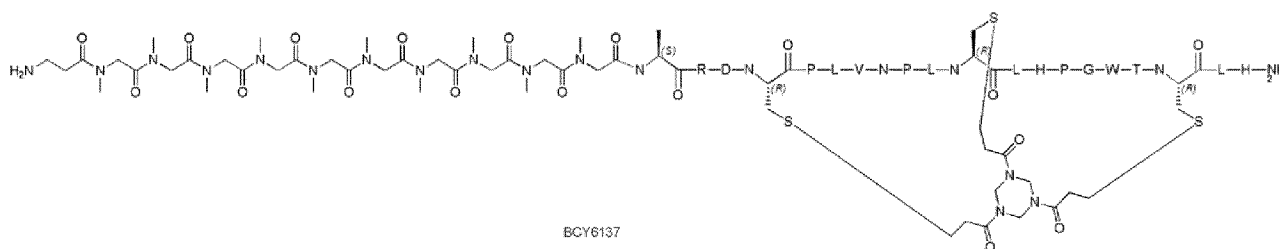
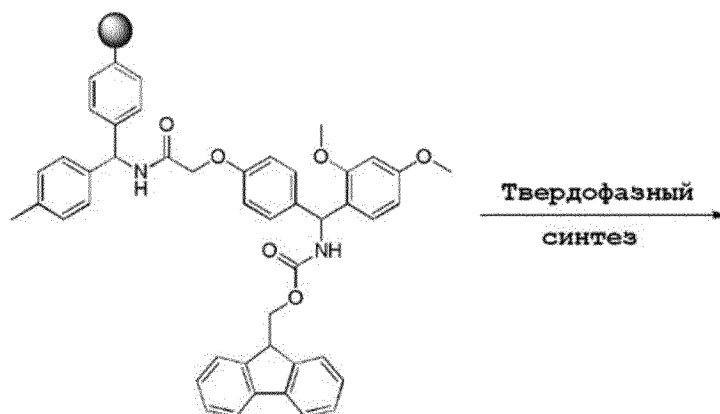


1,11 г смолы использовали для генерации 200 мг BSY6138 (чистота 95,2%, выход 12,2%) в виде белого твердого вещества.

BSY6138 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	14,46 мин
LCMS (ESI):	m/z 1037,6 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	3111,63

BSY6137 (соединение 105)

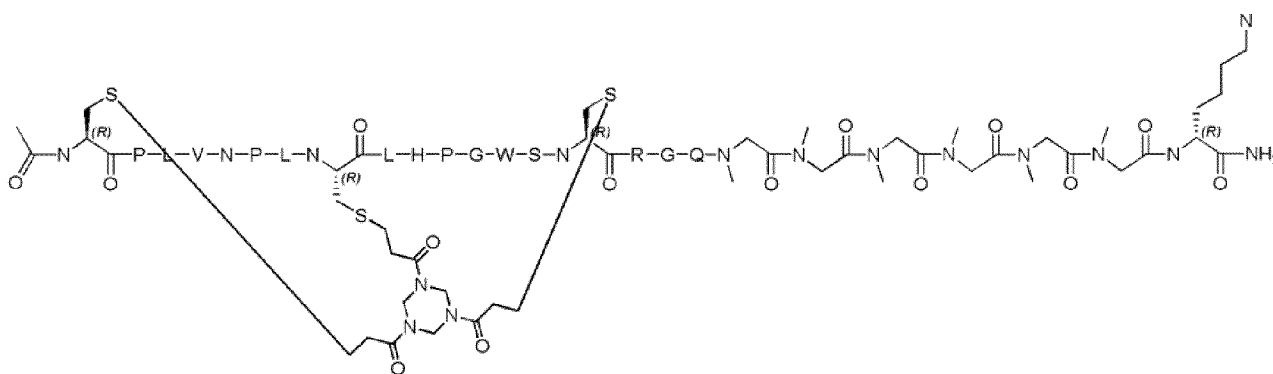
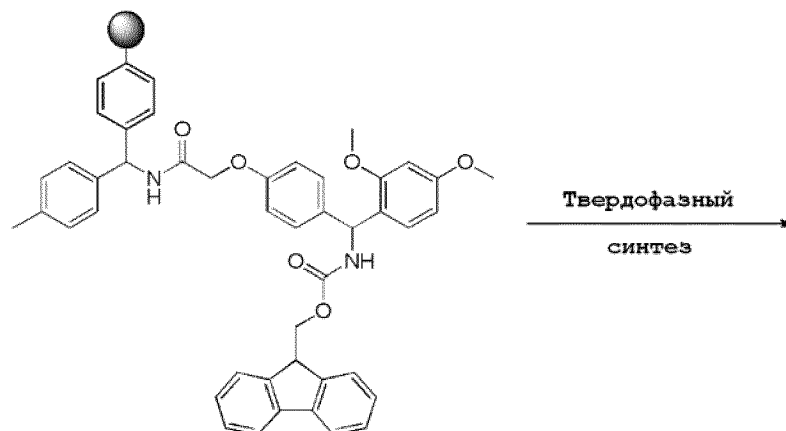
Последовательность: (β-Ala)-Sar₁₀-ARDCPLVNPLCLHPGWTCLH ((β-Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 91))



4,44 г смолы использовали для генерации 600 мг BSY6137 (чистота 98,9%, выход 9,06%) в виде белого твердого вещества.

BSY6137 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B

Время удерживания:	14,46 min
LCMS (ESI):	m/z 1092,7 [M+3H] ³⁺ , 819,6 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3275,8

BCY6042 (соединение 91)

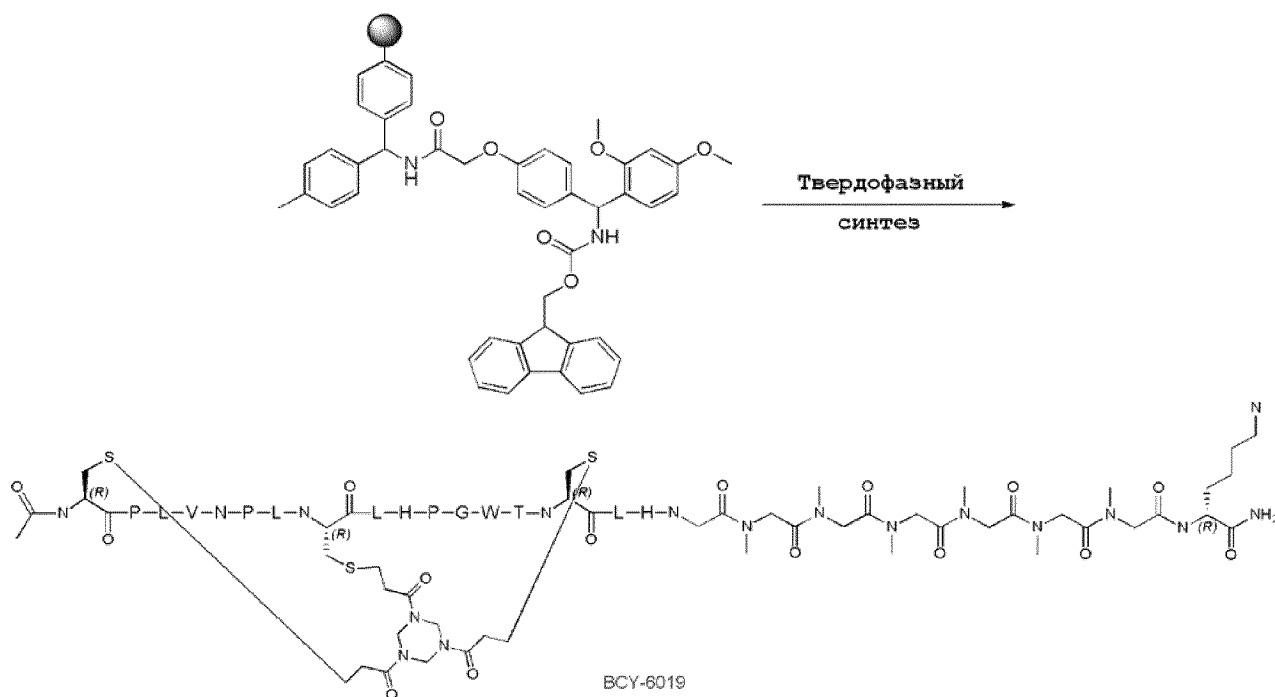
BCY6042

Последовательность: Ac-(SEQ ID NO: 14)-Sar₆-(D-K)

1,11 г смолы использовали для генерации 99,2 мг BCY6042 (чистота 99,2%, выход 7,0%) в виде белого твердого вещества.

BCY6042 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	9,12 мин
LCMS (ESI):	m/z 943,5 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	2825,31

BCY6019 (соединение 77)

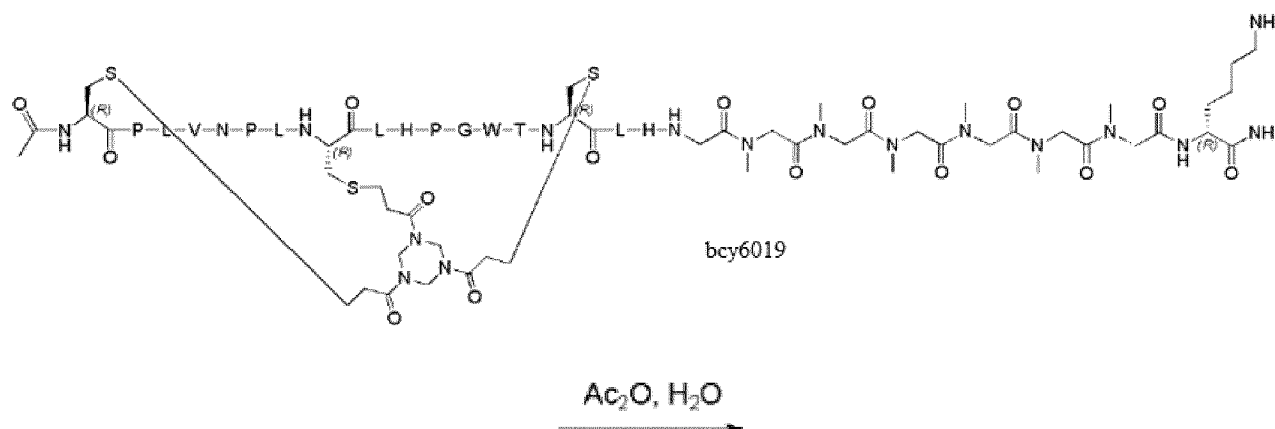


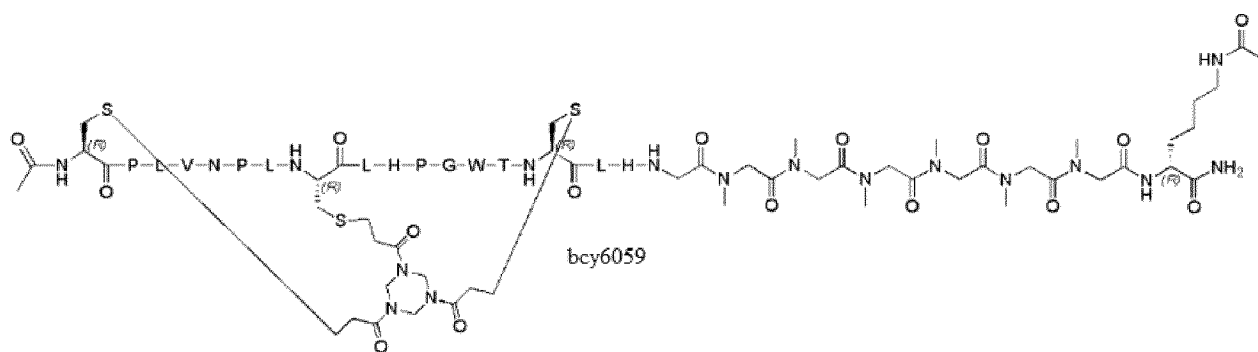
Последовательность: Ac-(SEQ ID NO: 12)-Sar₆-(D-K)

4,79 г смолы использовали для генерации 732,0 мг BCY6019 (чистота 92,82%, выход 12,2%) в виде белого твердого вещества.

BCY6019 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,36 мин
LCMS (ESI):	m/z 935,5 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	2805,32

BCY6059 (соединение 106)



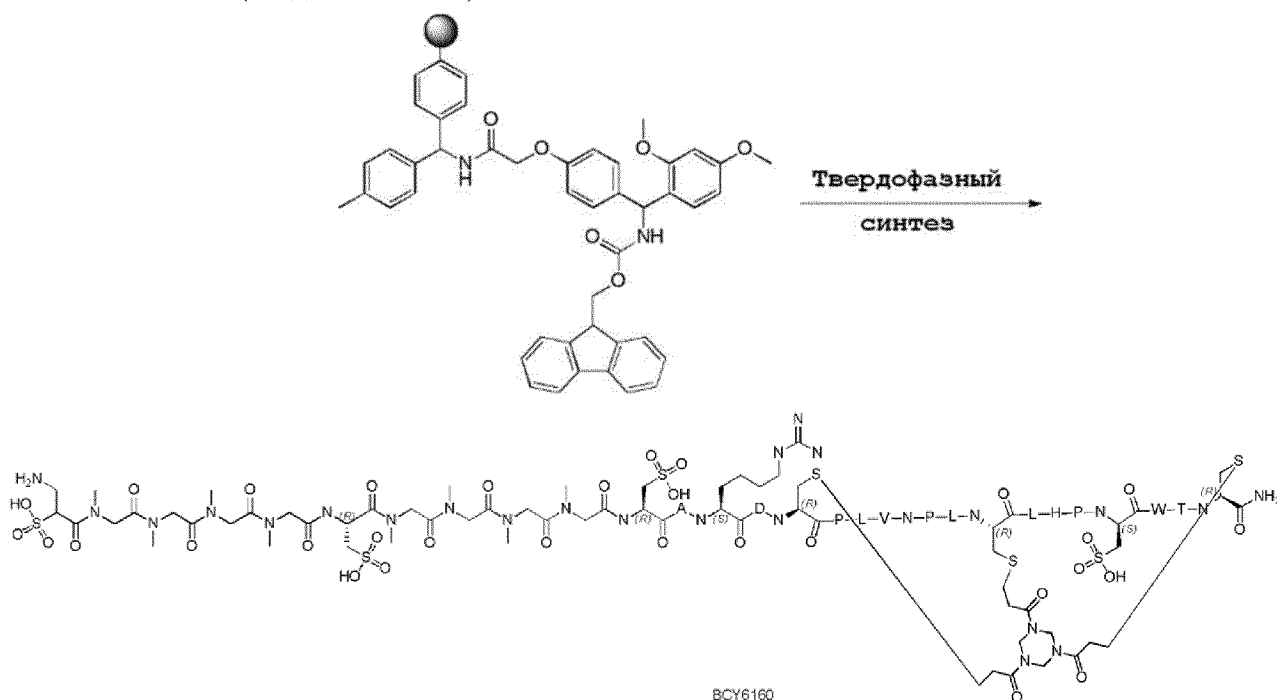


Последовательность: Ac-(SEQ ID NO: 12)-Sar₆-(D-K[Ac])

К раствору BCU6019 (0,05 г, 17,82 мкмоль, 1,00 экв) в H₂O (3 мл), доведенному до pH 11 с помощью водного раствора Na₂CO₃, добавляли ацетилацетат (5,46 мг, 53,46 мкмоль, 5,01 мкл, 3,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что BCU6019 был полностью израсходован, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Реакционную смесь доводили до pH 7 с помощью 1 N HCl, и непосредственно очищали методом препаративной HPLC (условие TFA). Соединение BCU6059 (18,1 мг, 6,36 мкмоль, 35,67% выход) получали в виде белого твердого вещества.

BCU6059 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	6,67 мин
LCMS (ESI):	m/z 949,8 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	2848,36

BCU6160 (соединение 107)

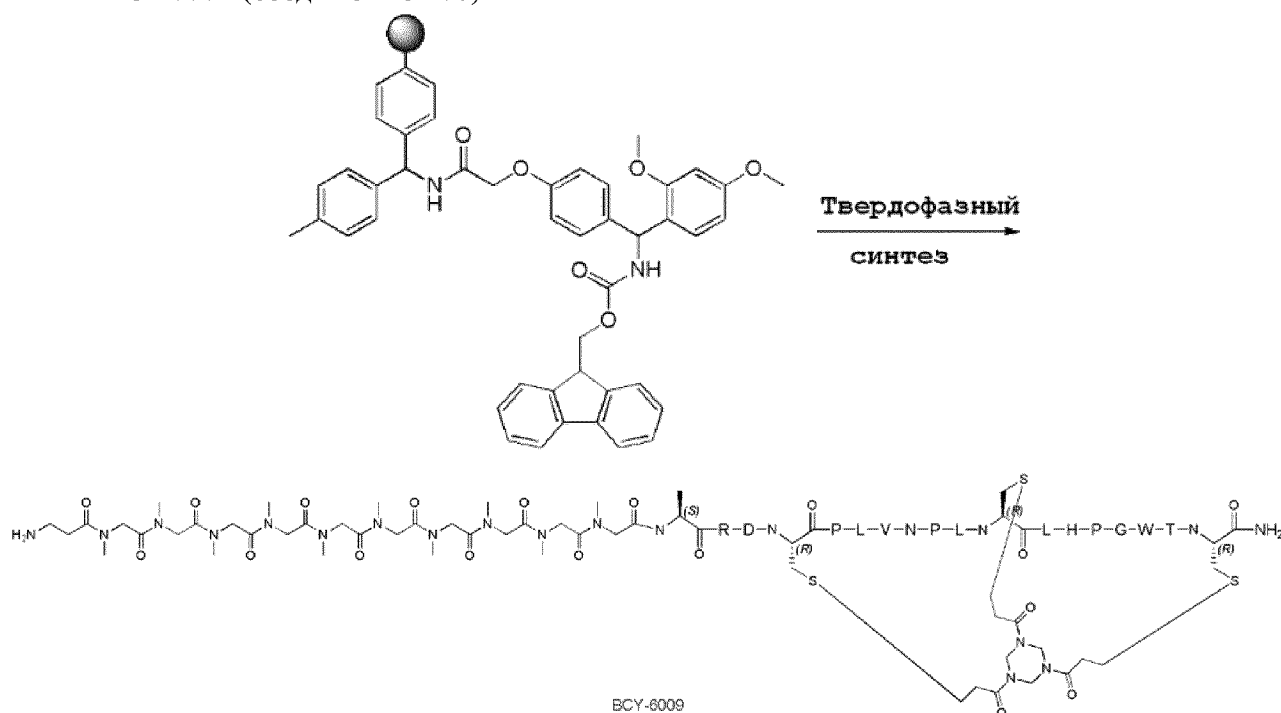


Последовательность: (β-AlaSO₃H)-Sar₄-(Cya)-Sar₄-(Cya)-A(HArg)DCPLVNPLCLHP(D-Cya)WTC ((β-AlaSO₃H)-Sar₄-(Cya)-Sar₄-(Cya)-(SEQ ID NO: 92))

1,11 г смолы использовали для генерации 45,2 мг BCY6160 (чистота 95,5%, выход 2,5%) в виде белого твердого вещества.

BCY6160 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,38 мин
LCMS (ESI):	m/z 1124,9 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	3376,83

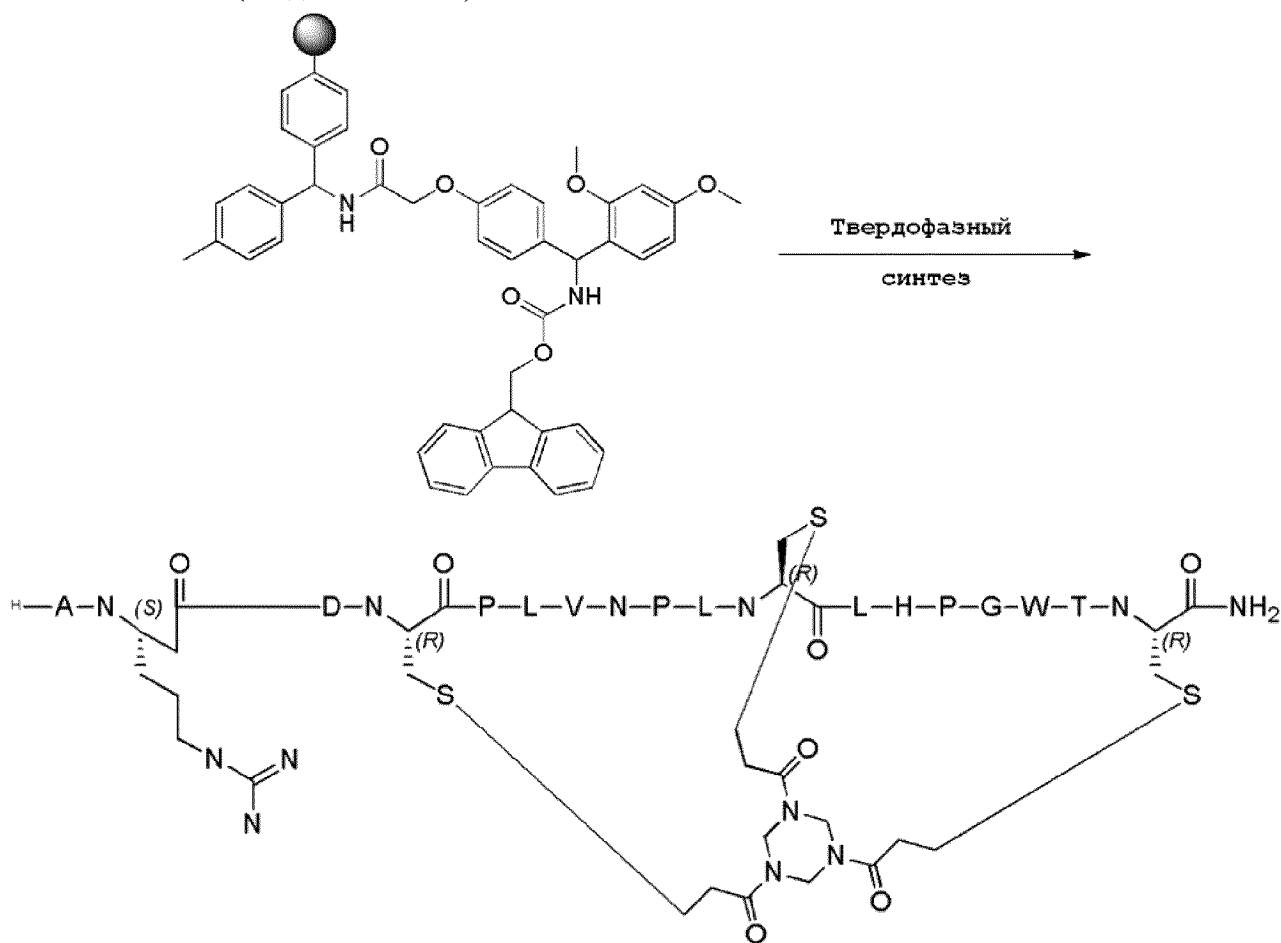
BCY6009 (соединение 108)



Последовательность: (β-Ala)-Sar₁₀-ARDCPLVNPLCLHPGWTC ((β-Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 10))

4,79 г смолы использовали для генерации 2,42 г BCY6009 (чистота >88,92%, выход 36,0%) в виде белого твердого вещества.

BCY6009 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	10,16 мин
LCMS (ESI):	m/z 1008,9 [M+3H] ³⁺ , 756,9 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3025,5

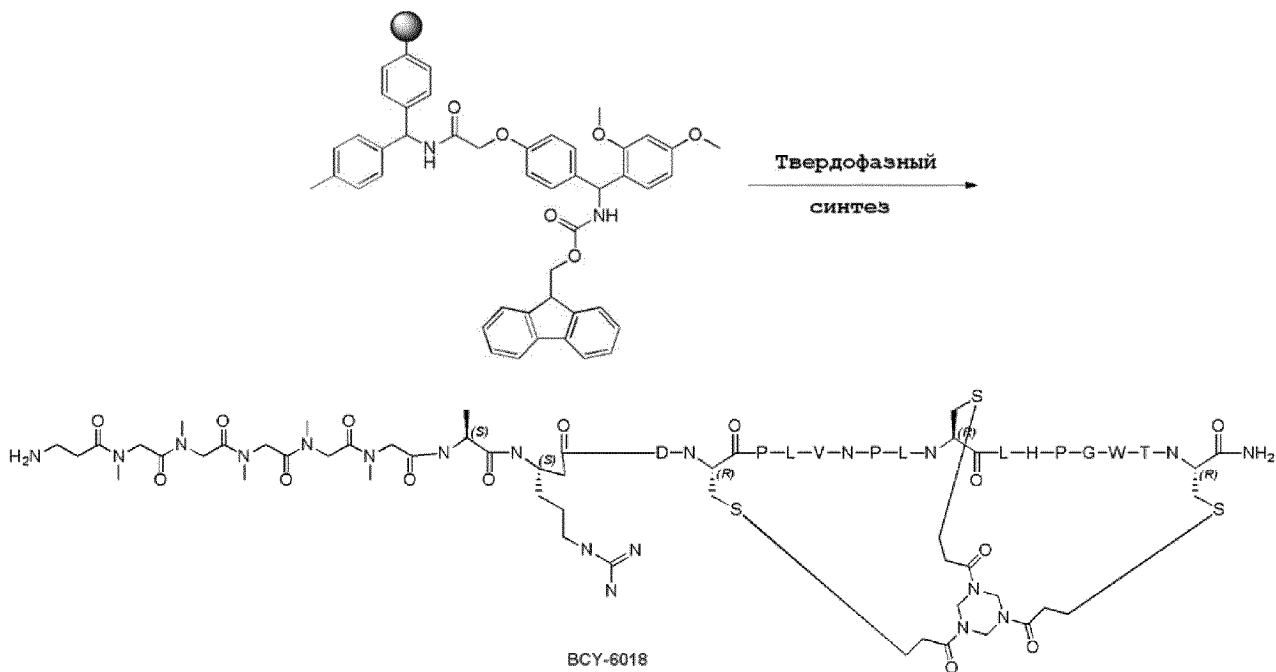
BCY6017 (соединение 109)

Последовательность: A(HArg)DCPLVNPLCLHPGWTC (SEQ ID NO: 11)

1,19 г смолы использовали для генерации 189,9 мг BCY6017 (чистота 95,05%, выход 16,8%) в виде белого твердого вещества.

BCY6017 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	10,01 min
LCMS (ESI):	m/z 1129,1 [M+2H] ²⁺ , 753,0 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	2257,67

BCY6018 (соединение 110)

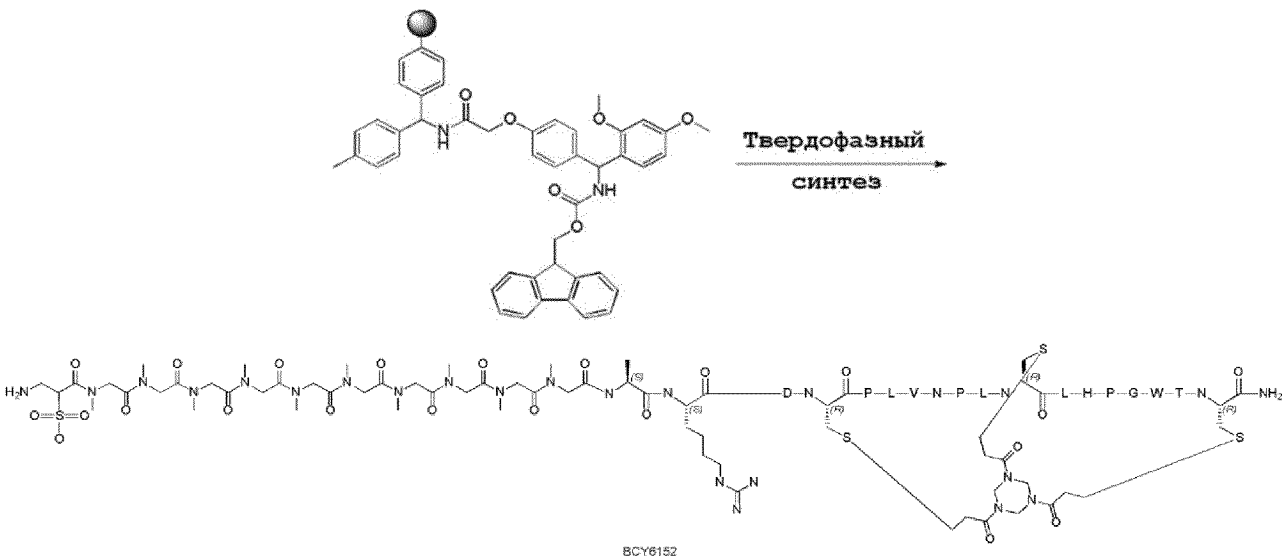


Последовательность: (β-Ala)-Sar₅-(SEQ ID NO: 11)

1,19 г смолы использовали для генерации 289,1 мг ВСУ6018 (97,92% чистота, 21,0% выход) в виде белого твердого вещества.

ВСУ6018 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	9,77 мин
LCMS (ESI):	m/z 1342,9 [M+2H] ²⁺ , 895,3 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	2684,14

BCY6152 (соединение 111)

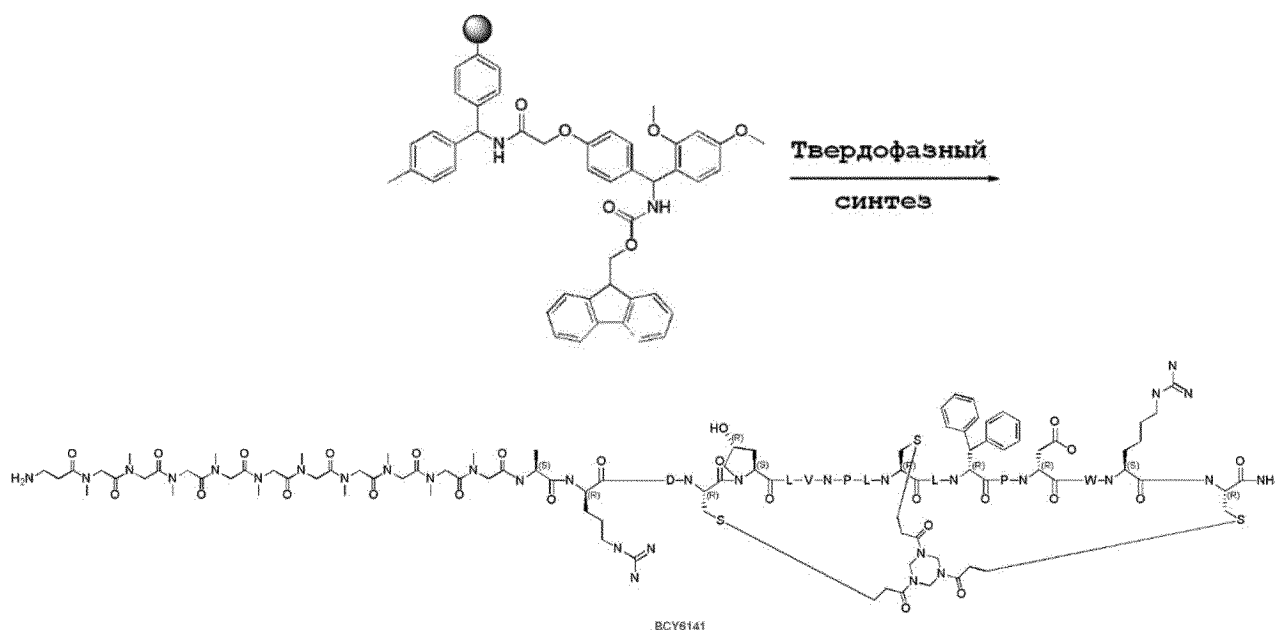


Последовательность: (β-AlaSO₃H)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 11)

1,11 г смолы использовали для генерации 150,0 мг BCY6152 (чистота 98,75%; выход 9,5%) в виде белого твердого вещества.

BCY6152 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	10,09 мин
LCMS (ESI):	m/z 1040,3 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	3119,59

BCY6141 (соединение 112)

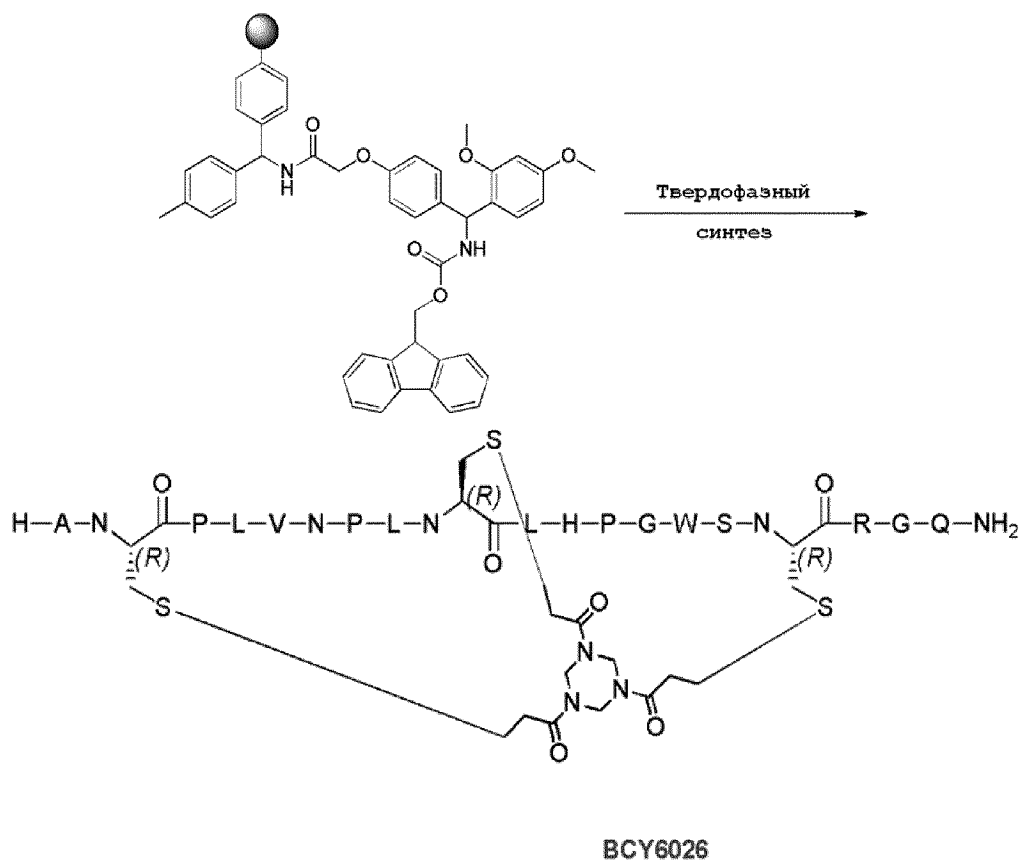


Последовательность: (β-Ala)-Sar₁₀-A(D-Arg)DC(HyP)LVNPLCL(D-3,3-DPA)P(D-Asp)W(HArg)C((β-Ala)-Sar₁₀-(SEQ ID NO: 93))

1,11 г смолы использовали для генерации 120,0 мг BCY6141 (чистота 97,91%; выход 7,3%) в виде белого твердого вещества.

BCY6141 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,41 мин
LCMS (ESI):	m/z 1085,5 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	3255,78

BCY6026 (соединение 87)



Последовательность: ACPLVNPLCLHPGWSCRGQ (SEQ ID NO: 77)

1,11 г смолы использовали для генерации 285,0 мг BCU6026 (чистота 97,7%; выход 24,2%) в виде белого твердого вещества.

BCU6026 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	20-50% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	9,31 мин
LCMS (ESI):	m/z 1150 [M+2H] ²⁺ , 767,0 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса пептида	2299,71

BCU6153 (соединение 113)

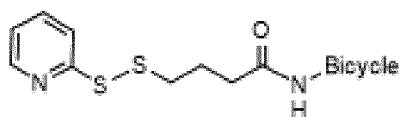


6037	6019	
6030	6009	TrpCit-MMAE
6034	6014	
6050	6017	
6054	6018	
6038	6019	
6061	6014	ValLys-MMAE
6174	6099	
6062	6014	D-TrpCit-MMAE
6135	6099	DM1-SS-
6031	6014	
6134	6104	
6027	6009	
6047	6017	
6035	6019	
6051	6018	
6154	6152	
6155	6153	
6173	6099	
6082	6014	DM1-SS(SO3H)-
6150	6018	
6151	6104	
6162	6138	
6161	6137	
6032	6014	
6052	6018	DM1-SS-(Me)-
6048	6017	
6036	6019	
6028	6009	
6039	6014	
6055	6014	DM1-SS-(Me2)-
6077	6014	DM1-SS-(Me)-SO3H-
6063	6014	Нерасщепляемое (MMAE)

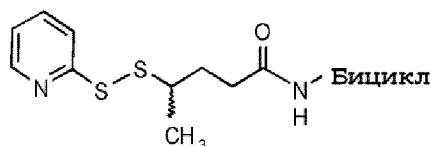
6064	6014	Нерасщепляемое (DM1)
6105	6014	MMAE-Ala-Ala-Asn
6106	6014	MMAE-D-Ala-Phe-Lys-
6175	6099	
6107	6014	MMAE-Glu-Pro-Cit-Gly-hPhe-Tyr-Leu-

Синтез конъюгатов лекарственных средств с бициклическими пептидами BCY6027, BCY6028, BCY6031 и BCY6032, представленными в таблице 6, проводили с использованием протокола, раскрытого в патентном документе WO 2016/067035.

Активированные бициклические пептиды с формулой (C) и (D):



(C)



(D)

синтезировали путем реакции свободной аминогруппы бициклических прекурсоров, соответственно, с SPP (N-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)пентаноатом, Annova Chem) и SPDB (N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионатом, Annova Chem) в DMSO. Концентрации бициклических прекурсоров составляли 10 мМ или выше, при 1,3-кратном избытке SPP или SPDB 20-кратном избытке диизопропилэтиламина, при комнатной температуре. На основании данных анализа методом LCMS, реакция завершалась через 1 час. Очистку проводили высокоэффективной хроматографией с обращенной фазой, как описано выше. Соответствующие фракции лиофилизировали.

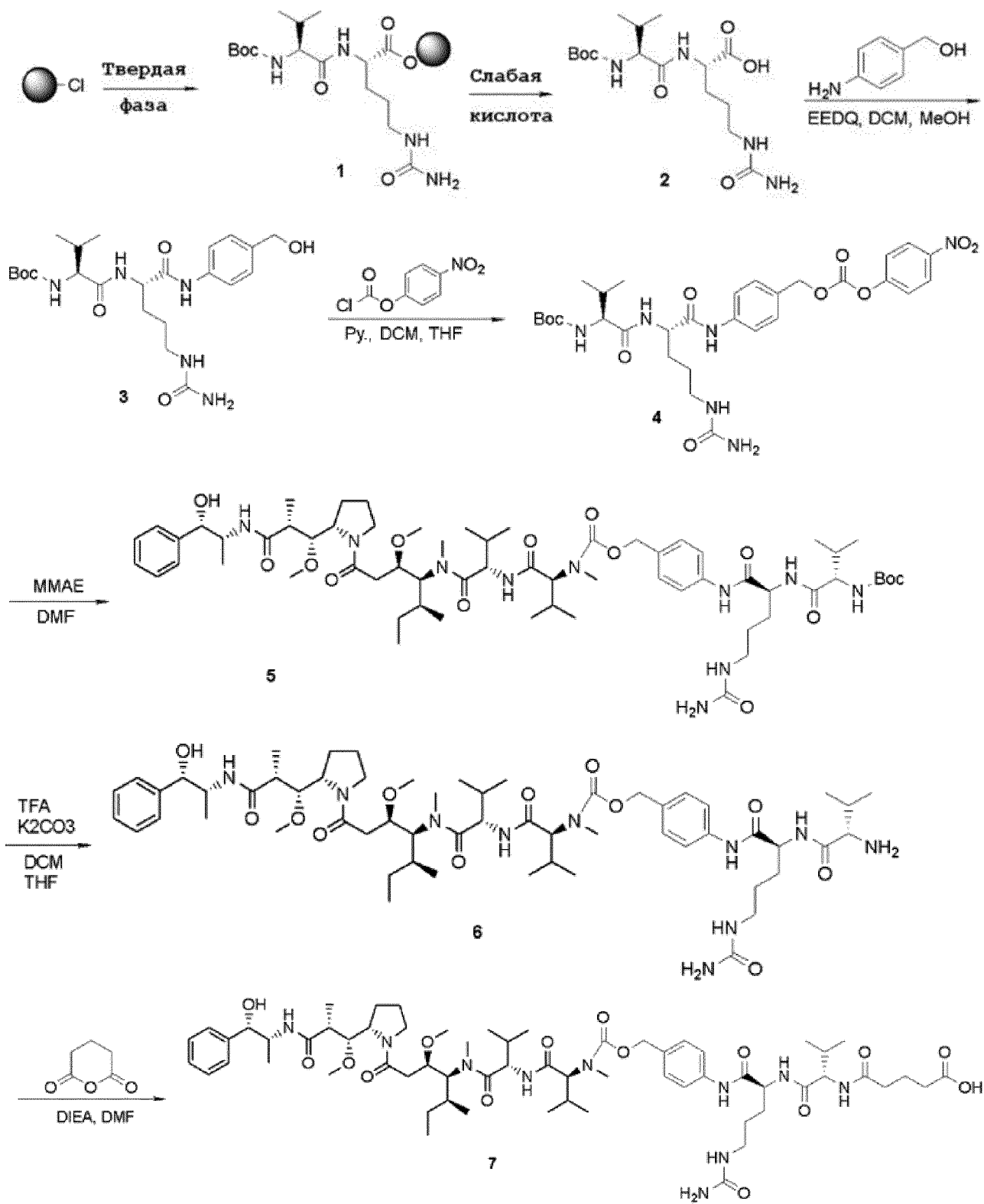
Активированные бициклические пептиды с формулой (C) и (D) подвергали реакции замена дисульфида на 1,15 эквивалента DM1 (в форме свободного триола) в полуводных условиях (50% диметилацетамид и 50% 100мМ ацетат натри pH 5,0, дополненные 2мМ EDTA) в течение 21 часа при комнатной температуре в атмосфере азота. Концентрации активированных бициклических пептидов со структурой Си D в реакции составляли 10 мМ или выше.

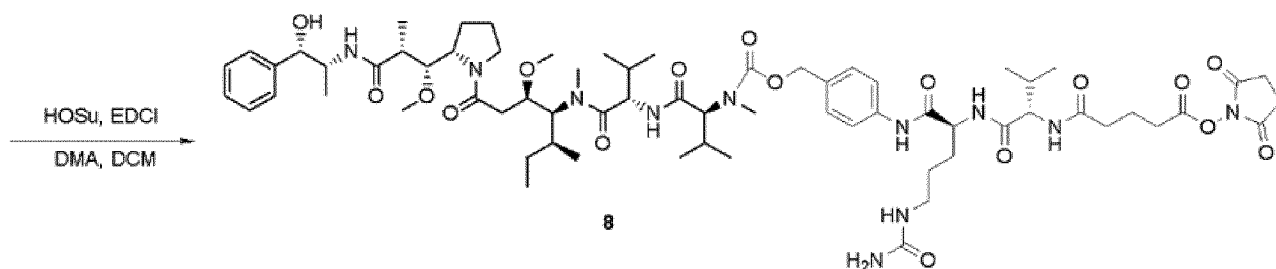
Затем следовала стандартная очистка методом высокоэффективной хроматографией с обращенной фазой с использованием колонки C18. Выделяли фракции с чистотой выше чем 95% и лиофилизировали их. Материалы не содержали обнаруживаемых количеств свободного токсического вещества.

Серии MMAE

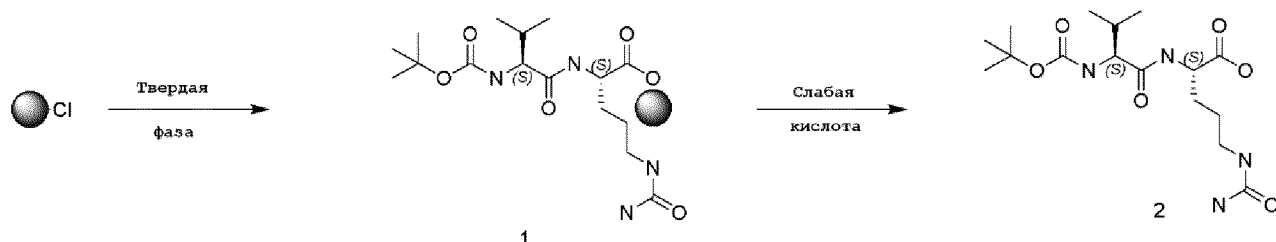
Серии Val-Cit-MMAE

Val-Cit-MMAE Линкер





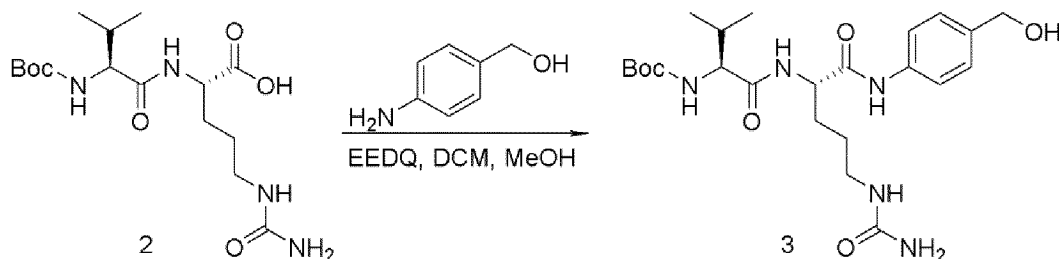
Соединение 2



Пептид синтезировали методом твердофазного синтеза. Использовали 50 г смолы CTC Resin (концентрация: 1,0 ммоль/г). К смеси, содержащей смолу CTC Resin (50 ммоль, 50 г, 1,0 ммоль/г) и Fmoc-Cit-OH (19,8 г, 50 ммоль, 1,0 экв) добавляли DCM (400 мл), затем добавляли DIEA (6,00 экв) и смешивали в течение 3 часов. И затем добавляли MeOH (50 мл) и смешивали в течение 30 минут для блокирования. Для деблокирования использовали 20% пиперидина в DMF. Boc-Val-OH (32,5 г, 150 ммоль, 3 экв) подвергали реакции связывания с HBTU (2,85 экв) и DIPEA (6,0 экв) в DMF (400 мл). Контролировали протекание реакции с использованием цветной реакции нингидрина. После завершения синтеза, пептидную смолу промывали с помощью DMF x 3, MeOH x 3, и затем сушили при барботировании N₂ в течение ночи. После чего пептидную смолу обрабатывали 2 раза с помощью 20% HFIP/DCM в течение 30 минут. Растворитель удаляли на ротаторном испарителе с получением неочищенного вещества. Неочищенный пептид растворяли в ACN/H₂O, затем дважды лиофилизировали с получением пептидного продукта (17,3 г неочищенный).

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

Соединение 3

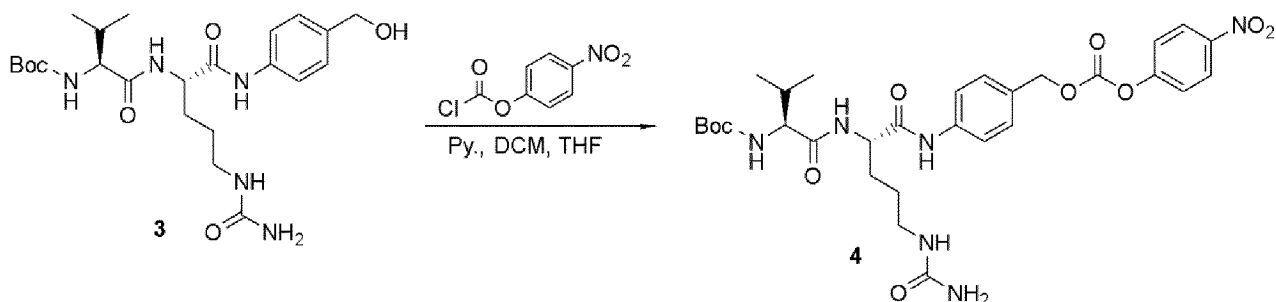


Раствор соединения 2 (4,00 г, 10,68 ммоль, 1,00 экв) в DCM (40,00 мл) и MeOH (20,00 мл) перемешивали при комнатной температуре, затем добавляли (4-аминофенил)метанол (1,58 г, 12,82 ммоль, 1,20 экв) и EEDQ (5,28 г, 21,37 ммоль, 2,00 экв), и смесь перемешивали в темноте в течение 9 часов. Анализ методом тонкослойной хроматографии (TLC)

(дихлорметан/метанол=5/1, $R_f=0,56$) показал, что образовалась новое пятно. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением растворителя. Полученный остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; колонка 120 g SepaFlash® Silica Flash, элюент 0~20% MeOH/DCM и 80 мл/мин). Соединение 3 (3,00 г, 6,26 ммоль, выход 58,57%) получали в виде белого твердого вещества.

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

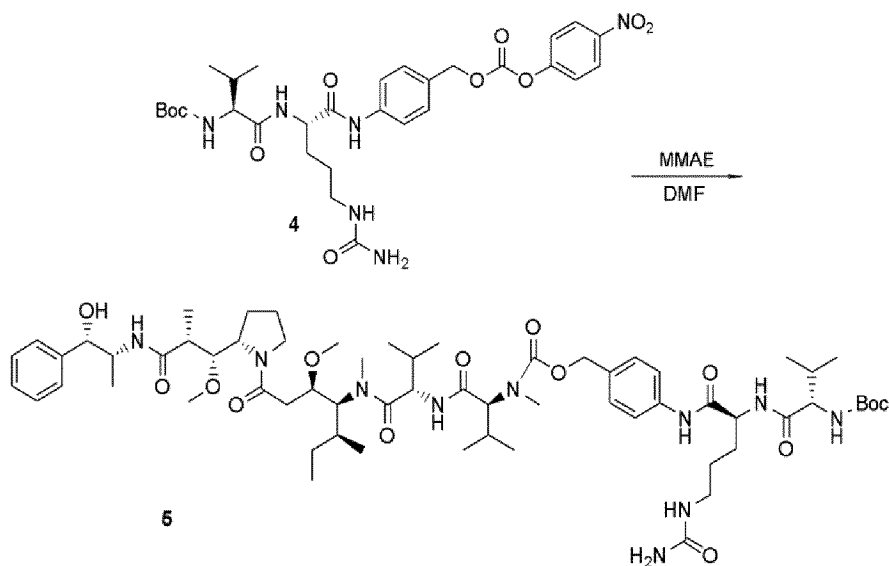
Соединение 4



К раствору соединения 3 (3,00 г, 6,26 ммоль, 1,00 экв) в безводном THF (35,00 мл) и безводном DCM (15,00 мл) добавляли (4-нитрофенил)хлорформиат (6,31 г, 31,30 ммоль, 5,00 экв) и пиридин (2,48 г, 31,30 ммоль, 2,53 мл, 5,00 экв), и смесь перемешивали при 25°C в течение 5 часов. Анализ методом TLC (дихлорметан/метанол= 10/1, $R_f=0,55$) показал, что образовалось новое пятно. Реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; колонка 120 g SepaFlash® Silica Flash, элюент 0~10% DCM/MeOH и 80 мл/мин). Соединение 4 (2,00 г, 3,10 ммоль, выход 49,56%) получали в виде белого твердого вещества.

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

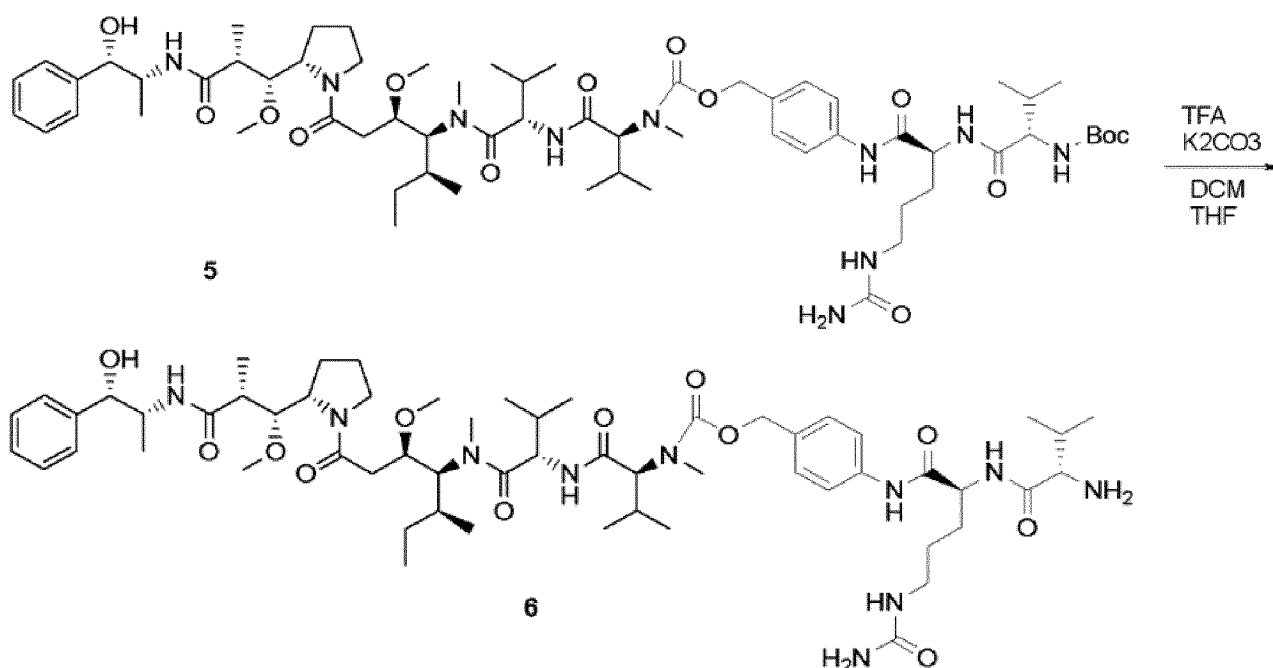
Соединение 5



Смесь соединения 4 (278,43 мг, 387,80 мкмоль, 1,00 экв) и DIEA (501,19 мг, 3,88 ммоль, 677,29 мкл, 10,00 экв) в DMF (5,00 мл) перемешивали в атмосфере азота в течение 10 минут. Добавляли MMAE (250,00 мг, 387,80 мкмоль, 1,00 экв) и HOBt (52,40 мг, 387,80 мкмоль, 1,00 экв), и смесь перемешивали при 0°C в атмосфере азота в течение 20 минут и перемешивали при 30°C в течение еще 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Полученную смесь очищали флэш-гельхроматографией C18 (ISCO®; 130 г колонка SepaFlash® C18 Flash, элюент 0~50% MeCN/H₂O и 75 мл/мин). Соединение 5 (190,00 мг, 155,29 мкмоль, выход 40,04%) получали в виде белого твердого вещества.

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

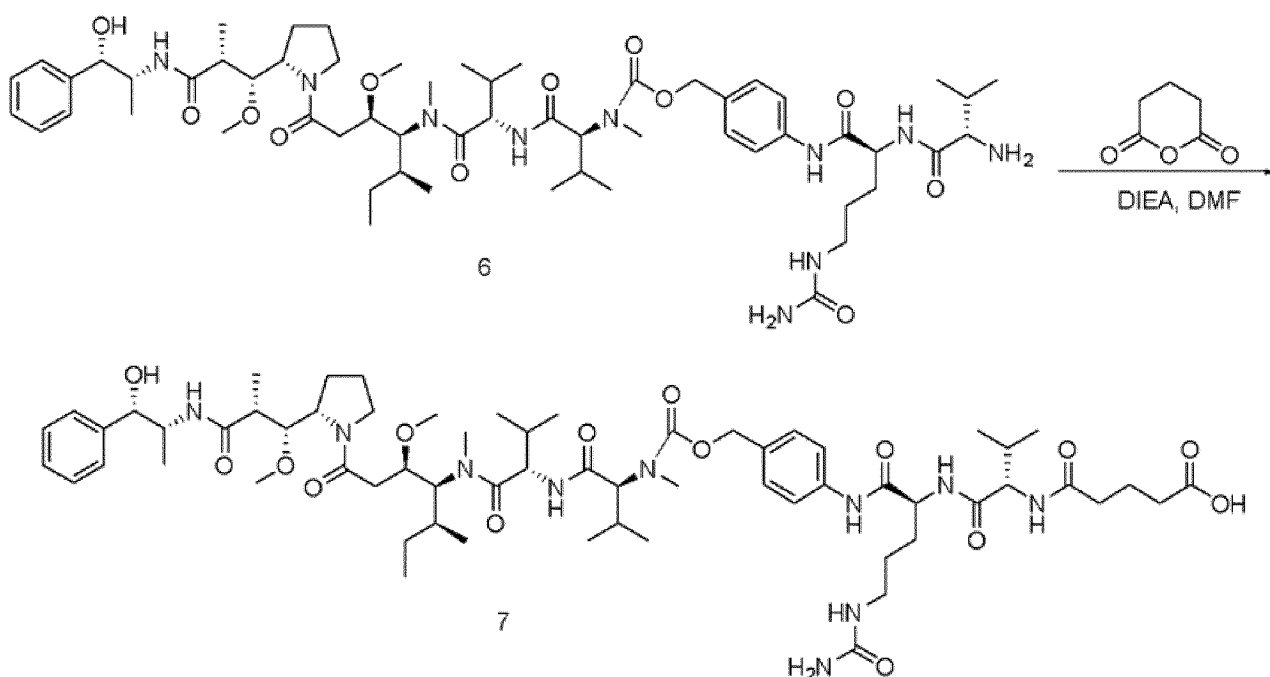
Соединение 6



К раствору соединения 5 (170,00 мг, 138,94 мкмоль, 1,00 экв) в DCM (2,70 мл) добавляли 2,2,2-трифторуксусную кислоту (413,32 мг, 3,62 ммоль, 268,39 мкл, 26,09 экв), и смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 5 было полностью израсходовано. Смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток растворяли в THF (10,00 мл) и добавляли K₂CO₃ (192,03 мг, 1,39 ммоль, 10,00 экв), смесь перемешивали при комнатной температуре в течение еще 3 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Полученную реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали флэш-гельхроматографией C18 (ISCO®; колонка 130 g SepaFlash® C18 Flash, элюент 0~50% MeCN/H₂O и 75 мл/мин). Соединение 6 (110,00 мг, 97,92 мкмоль, выход 70,48%) получали в виде белого твердого вещества.

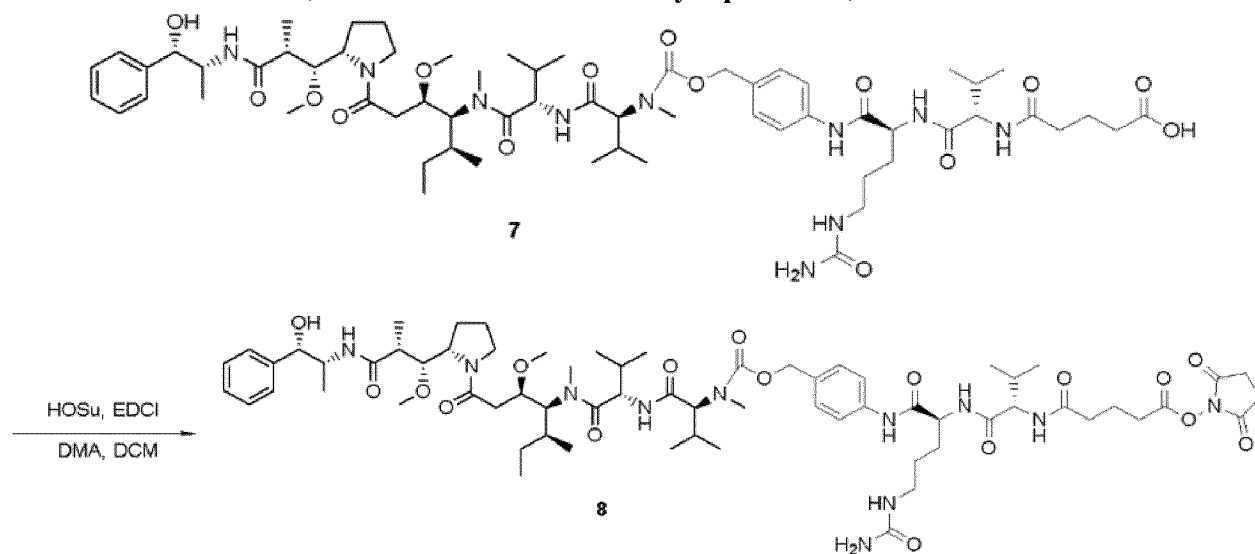
LCMS (ESI):	m/z 1123,4 [M+H] ⁺
-------------	-------------------------------

Молекулярная масса	1123,45
--------------------	---------

Соединение 7

К раствору соединения 6 (110,00 мг, 97,92 мкмоль, 1,00 экв) в DMA (5 мл) добавляли DIEA (25,31 мг, 195,83 мкмоль, 34,20 мкл, 2,00 экв) и тетрагидропиран-2,6-дион (22,34 мг, 195,83 мкмоль, 2,00 экв). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 6 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Реакционную смесь очищали флэш-гельхроматографией (ISCO®; колонка 130 g SepaFlash® C18 Flash, элюент 0~50% MeCN/H₂O и 75 мл/мин). Соединение 7 (100,00 мг, 80,81 мкмоль, 82,53% выход) получали в виде белого твердого вещества.

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

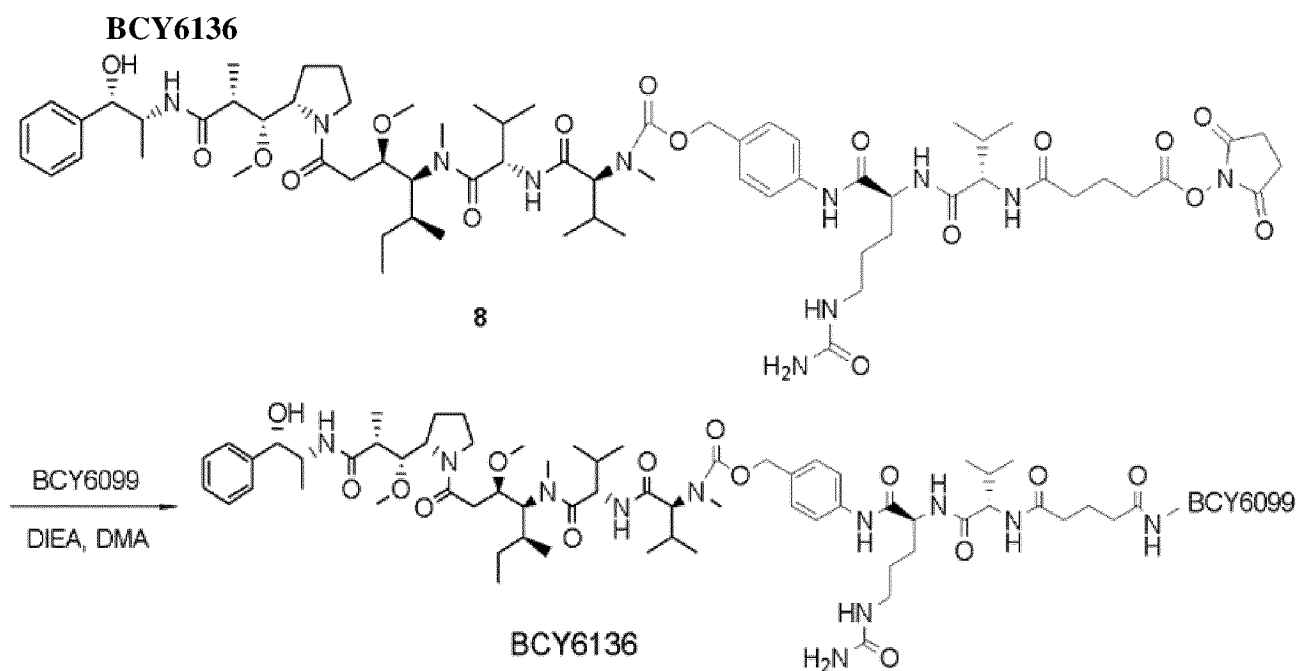
Соединение 8 (MMAE-PABC-Cit-Val-Глутарат-NHS)

К раствору соединения 7 (100,00 мг, 80,81 мкмоль, 1,00 экв) в DMA (4,5 мл) и DCM (1,5 мл) добавляли 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (27,90 мг, 242,42 мкмоль, 3,00 экв) в атмосфере N₂, смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут. К смеси добавляли EDCI (46,47 мг, 242,43 мкмоль, 3,00 экв), и смесь перемешивали при 25°C в течение еще 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 7 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Реакционную смесь очищали флэш-гельхроматографией (ISCO®; колонка 130 g SepaFlash® C18 Flash, элюент 0~50% MeCN/H₂O и 75 мл/мин). Соединение 8 (90,00 мг, 60,69 мкмоль, 75,11% выход) получали в виде белого твердого вещества.

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

Общая методика для связывания MMAE-PABC-Cit-Val-Глутарат-NHS с таргетирующими бициклами

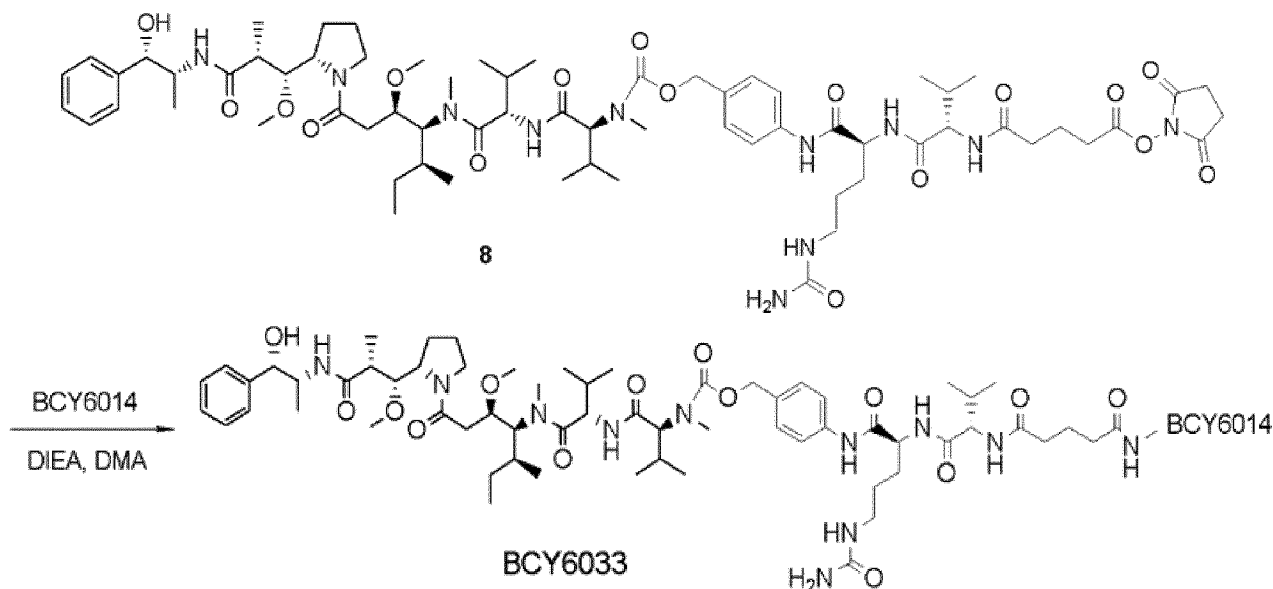
К раствору бицикла (1,0-1,3 экв) в DMA добавляли DIEA (3 экв) и MMAE-PABC-Cit-Val-Глутарат-NHS (1 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. Ход реакции контролировали методом LC-MS, и после ее окончания, реакционную смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).



BCY6099 (71,5 мг, 22,48 мкмоль) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BCY6136 (40,9 мг, 9,05 мкмоль, выход 40,27%, чистота 97,42%) получали в виде белого твердого вещества.

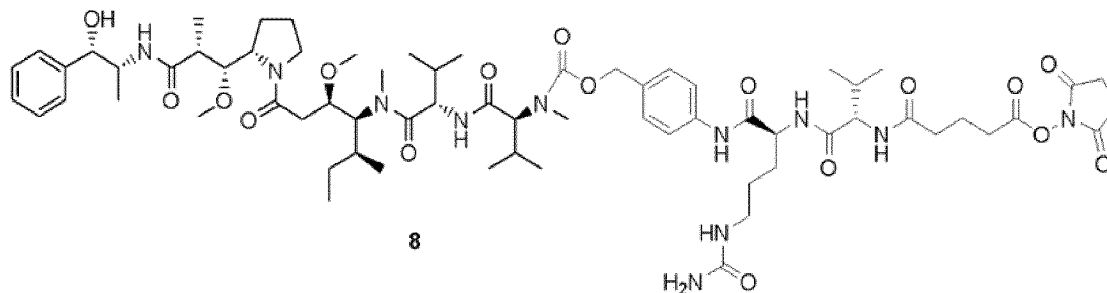
BCY6136 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)

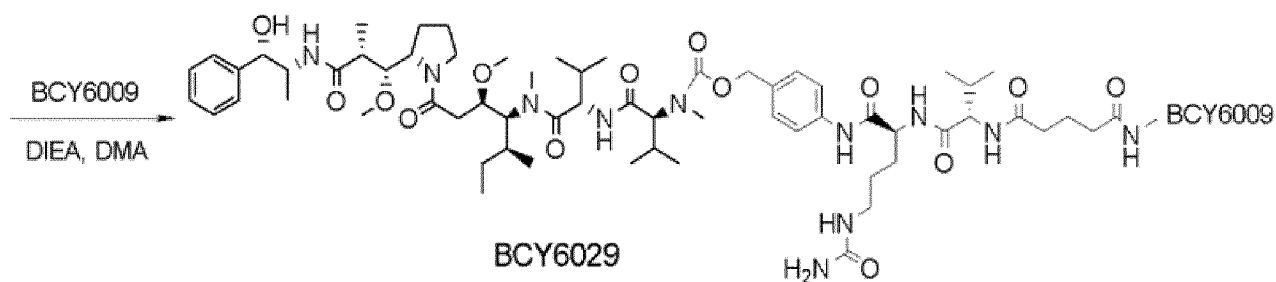
Метод:	28-68% В в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% В
Время удерживания:	11,35 мин
LCMS (ESI):	m/z 1468,1 [M+3H] ³⁺ , 1101,2 [M+4H] ⁴⁺ , 881,3 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса пептида	4404,2

BCY6033

BCY6014 (70,00 мг, 22,47 мкмоль, 1,00 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BCY6033 (33,90 мг, 7,96 мкмоль, выход 34,57%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6033 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% В в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% В
Время удерживания:	7,47 мин
LCMS (ESI):	m/z 1065,2 [M+4H] ⁴⁺ , 852,2 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса пептида	4259,04

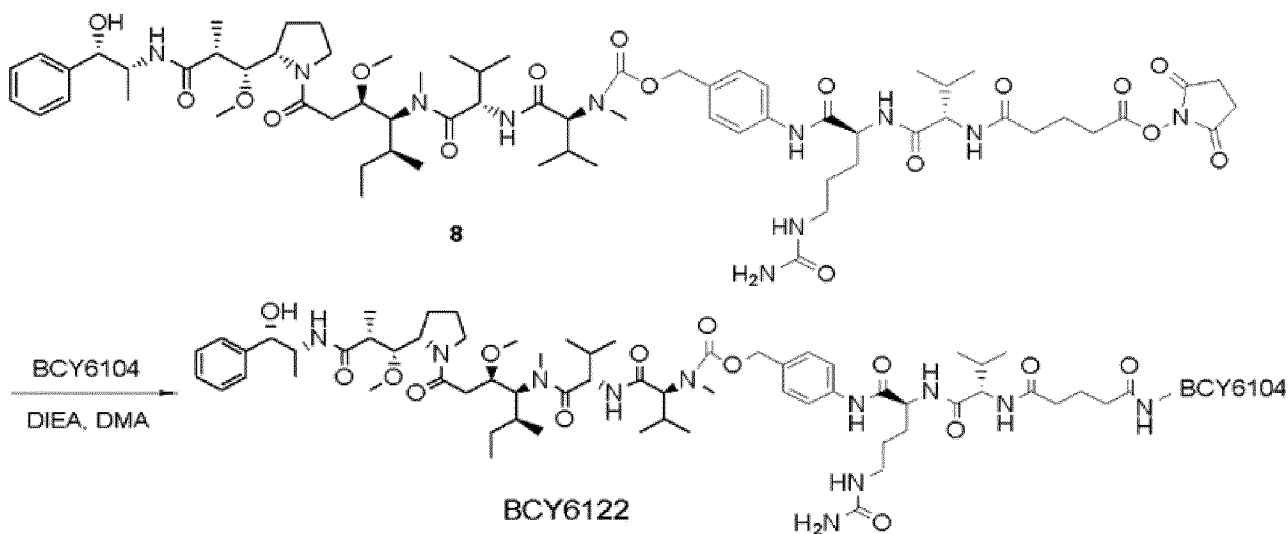
BCY6029



BSY6009 (70,0 мг, 22,47 мкмоль, 1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BSY6029 (32,9 мг, 7,75 мкмоль, выход 33,49%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY6029 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	7,46 мин
LCMS (ESI):	m/z 1061,7 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	4245,02

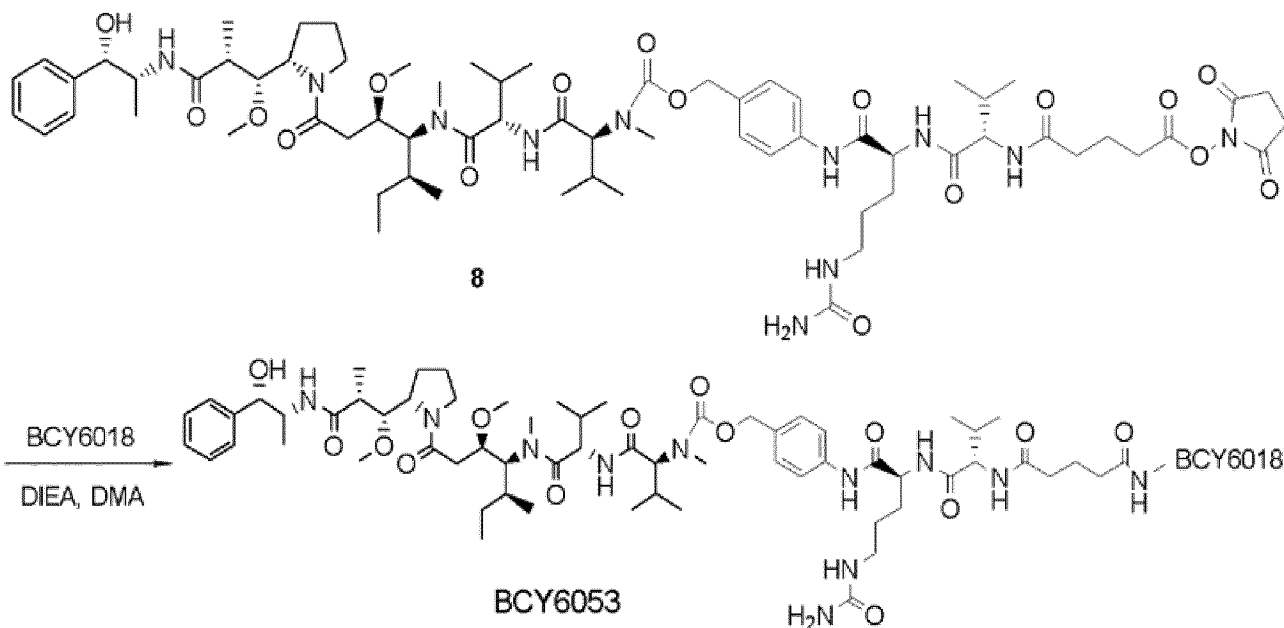
BSY6122



BSY6104 (71,59 мг, 22,48 мкмоль, 1,00 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BSY6122 (38,30 мг, 8,57 мкмоль, выход 38,14%, чистота 98,58%) получали в виде белого твердого вещества.

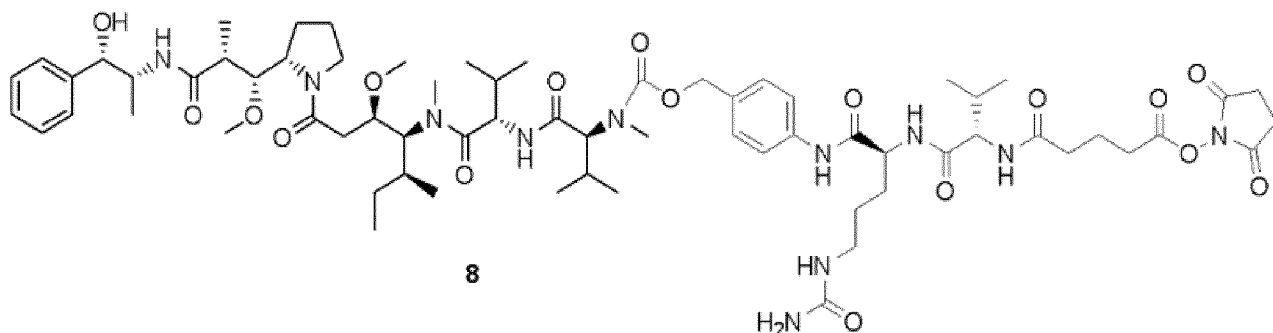
BSY6122 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	10,72 мин
LCMS (ESI):	m/z 1101,8 [M+4H] ⁴⁺ , 881,5 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса	4406,18

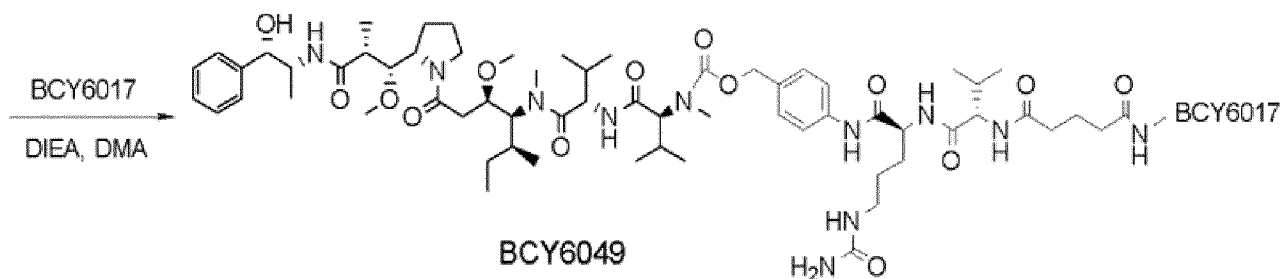
пептида

BCY6053

BCY6018 (72,40 мг, 26,97 мкмоль, 1,2 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BCY6053 (38,3 мг, 9,81 мкмоль, 43,65% выход) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6053 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	12,95 мин
LCMS (ESI):	m/z 1301,7 [M+3H] ³⁺ , 976,5 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3905,67

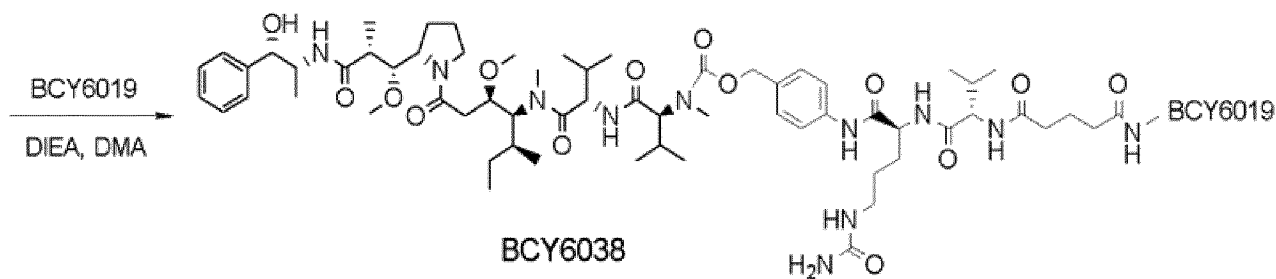
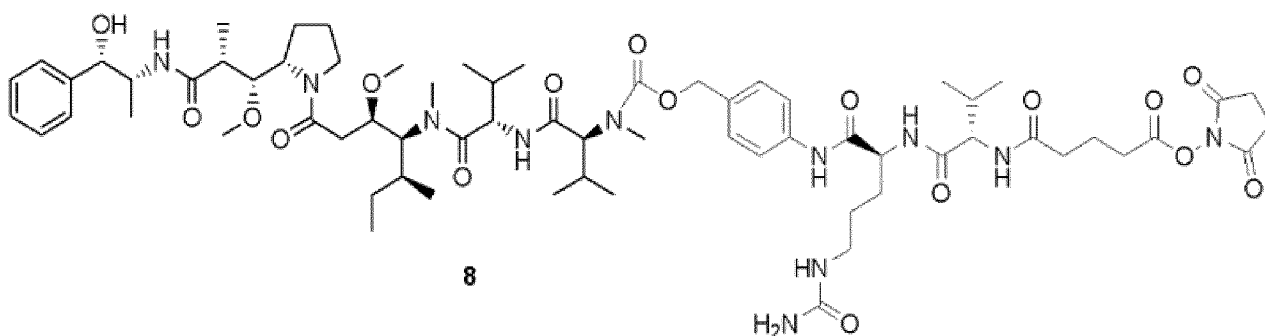
BCY6049



BCY6017 (50,75 мг, 22,48 мкмоль, 1,2 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BCY6049 (22,5 мг, 6,47 мкмоль, выход 34,54%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6049 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	14,28 мин
LCMS (ESI):	m/z 1159,6 [M+3H] ³⁺ , 869,8 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3479,2

BCY6037



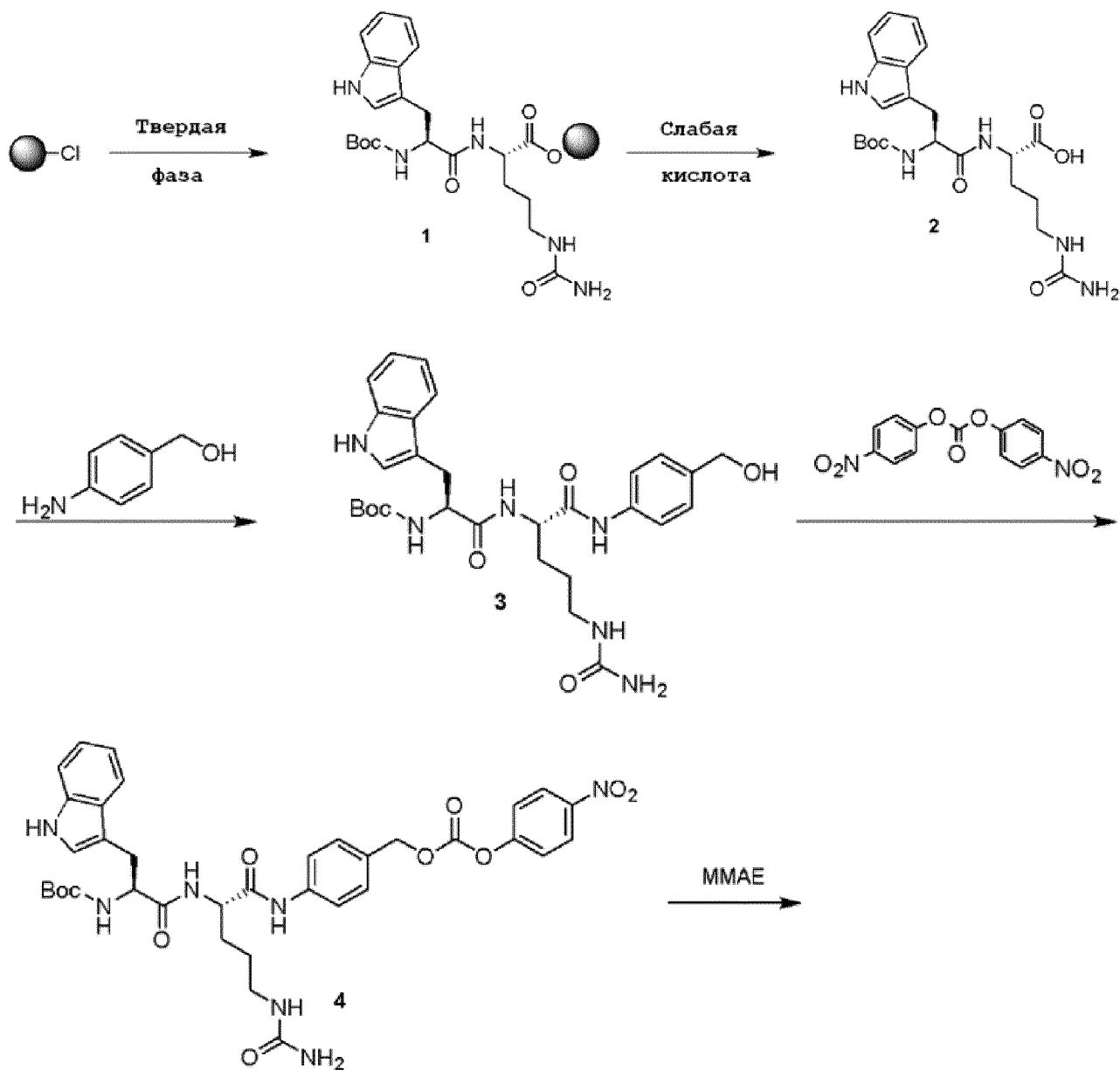
BCY6019 (65,00 мг, 22,47 мкмоль, 1,00 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BCY6037 (26,80 мг, 6,66 мкмоль, выход 28,74%) получали в виде белого твердого вещества.

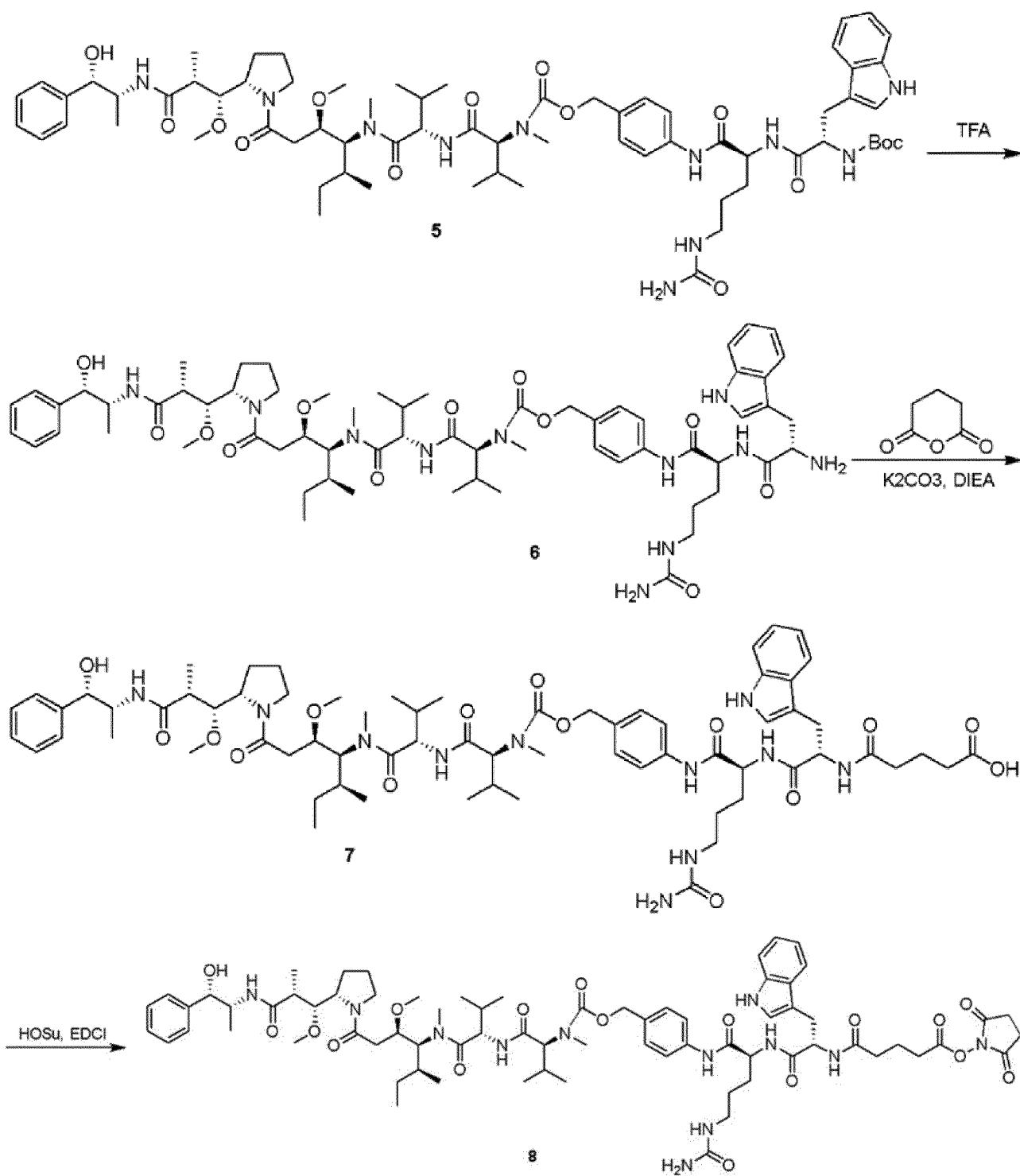
BCY6037 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B

Время удерживания:	8,79 мин
LCMS (ESI):	m/z 1342,1 [M+3H] ³⁺ , 1006,6 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	4025,84

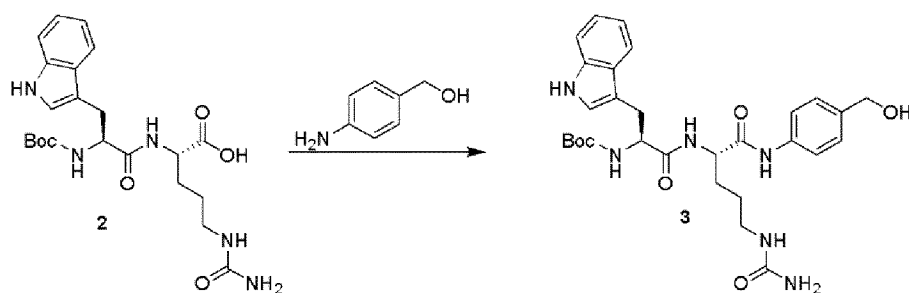
Trp-Cit-MMAE серии

Trp-Cit-MMAE линкер





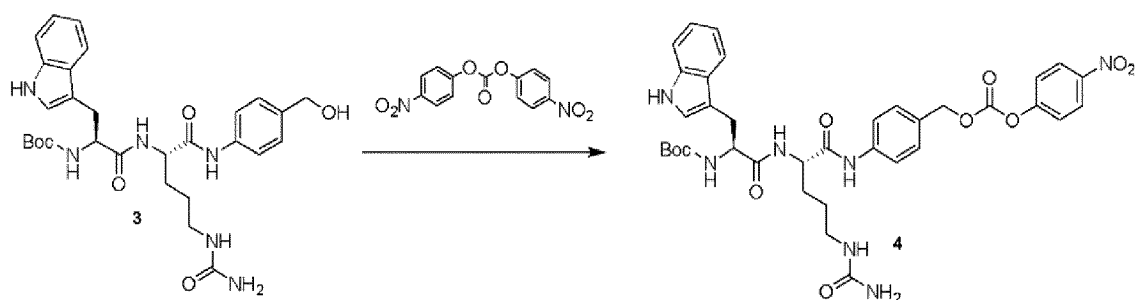
Общая методика получения соединения 3



К раствору соединения 2 (4,00 г, 8,67 ммоль, 1,00 экв), DIC (1,61 г, 12,78 ммоль, 1,97 мл, 9,00 экв) и HOBt (10,54 г, 78,00 ммоль, 9,00 экв) в DMF (30,00 мл) добавляли (4-аминофенил)метанол (9,61 г, 78,00 ммоль, 9,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Смесь очищали методом препаративной HPLC. Соединение 3 (4,20 г, 7,41 ммоль, выход 85,49%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 566,9 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	566,66

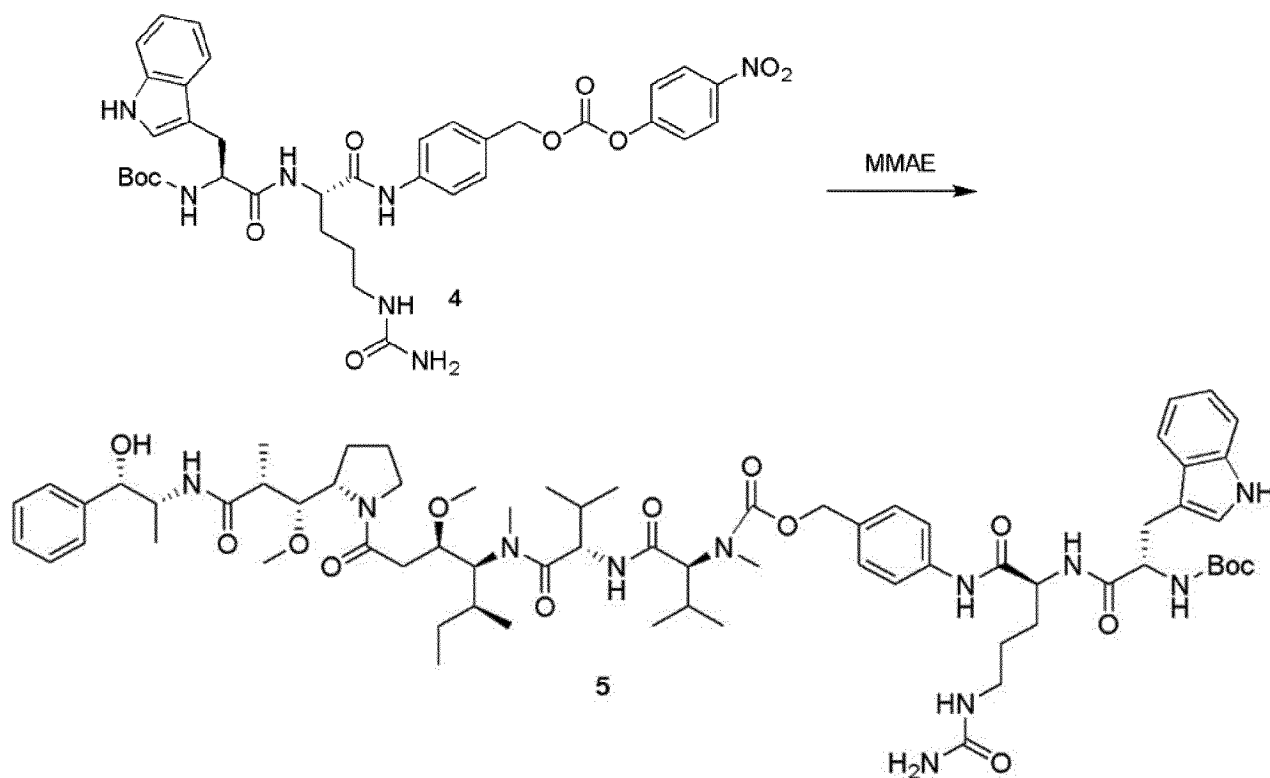
Общая методика получения соединения 4



К раствору соединения 3 (4,20 г, 6,30 ммоль, 1,00 экв), DIPEA (1,09 г, 8,40 ммоль, 1,47 мл, 7,00 экв) в DMF (30,00 мл) добавляли одной порцией бис(4-нитрофенил)карбонат (11,50 г, 37,79 ммоль, 6,00 экв). Смесь перемешивали при 0-15°C в течение 1,5 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (TFA условие). Соединение 4 (2,00 г, 2,40 ммоль, выход 38,16%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 732,0 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	731,76

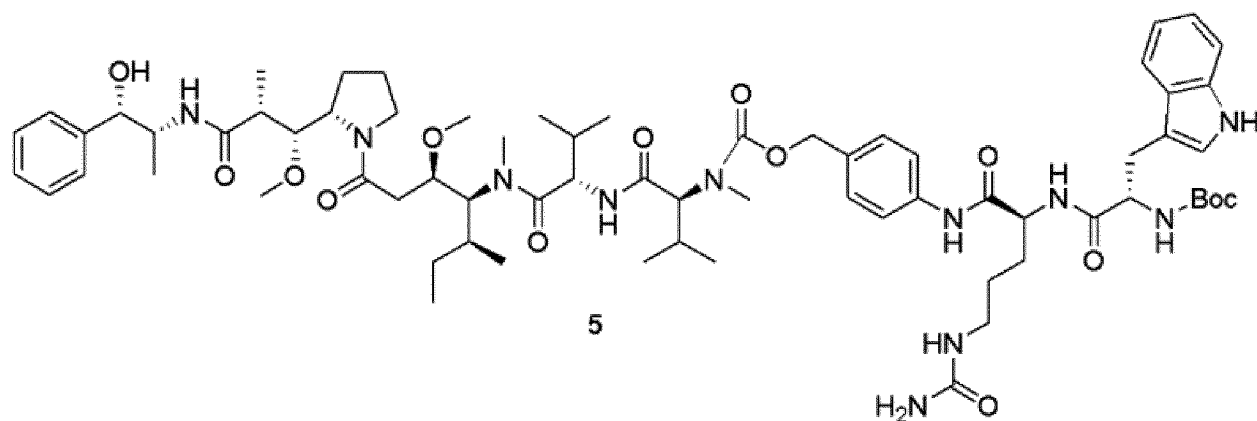
Общая методика получения соединения 5

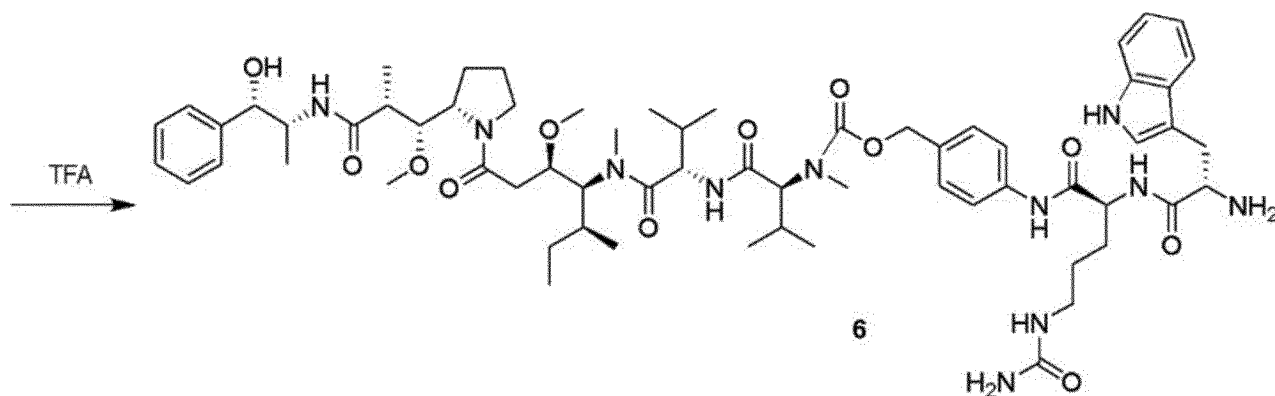


К раствору соединения 4 (300,00 мг, 360,63 мкмоль, 1,00 экв), DIEA (93,22 мг, 721,27 мкмоль, 125,97 мкл, 3,00 экв) в DMF (10,00 мл) добавляли MMAE (233,03 мг, 324,57 мкмоль, 0,90 экв) и HOBT (48,73 мг, 360,63 мкмоль, 1,00 экв) при 0°C. Смесь перемешивали при 30°C в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 4 был полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 5 (250,00 мг, 190,75 мкмоль, выход 52,89%) получали в виде желтого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 1310,5 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	1310,65

Общая методика получения соединения 6

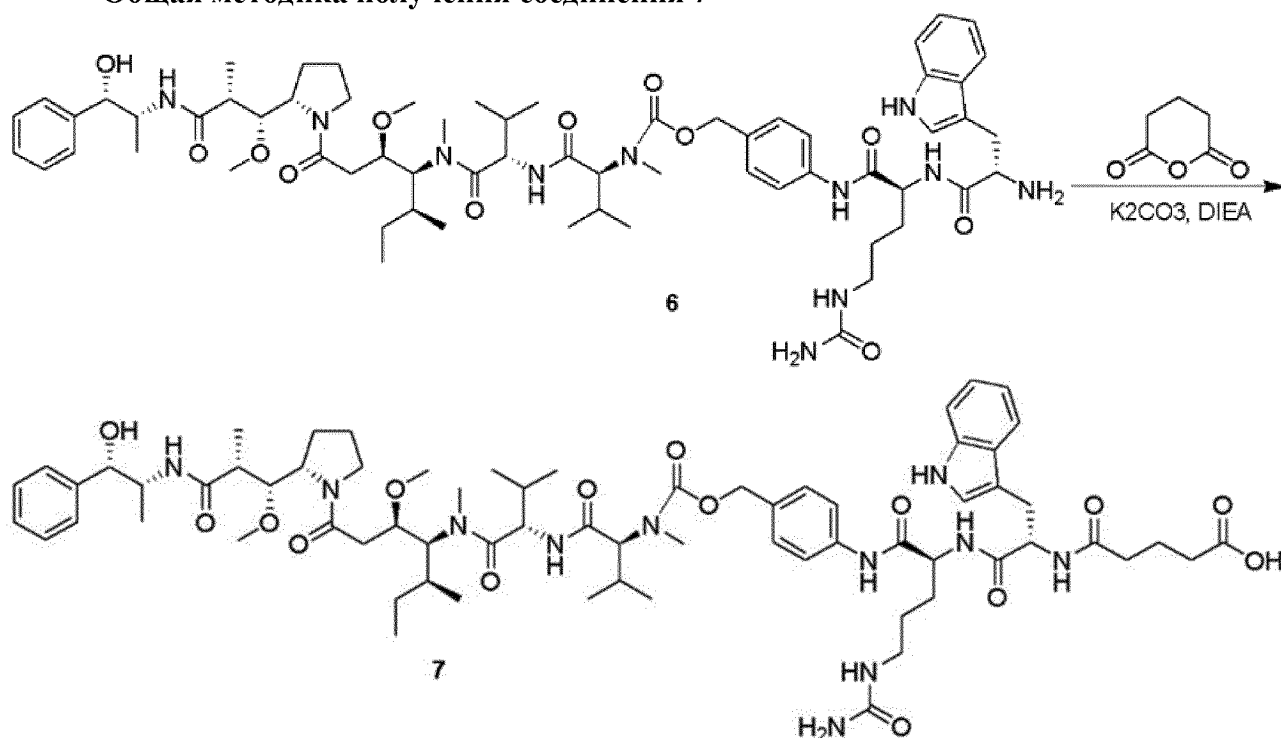




К раствору соединения 5 (240,00 мг, 183,12 мкмоль, 1,00 экв) в DCM (10,00 мл) добавляли TFA (1,54 г, 13,51 ммоль, 1,00 мл, 73,76 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 2 часов. И смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка, остаток растворяли в THF и добавляли K₂CO₃, и перемешивали при 15°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 5 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Неочищенный продукт 6 (125,00 мг, 94,37 мкмоль, выход 51,53%, TFA) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

LCMS (ESI):	m/z 1210,4 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	1209,53

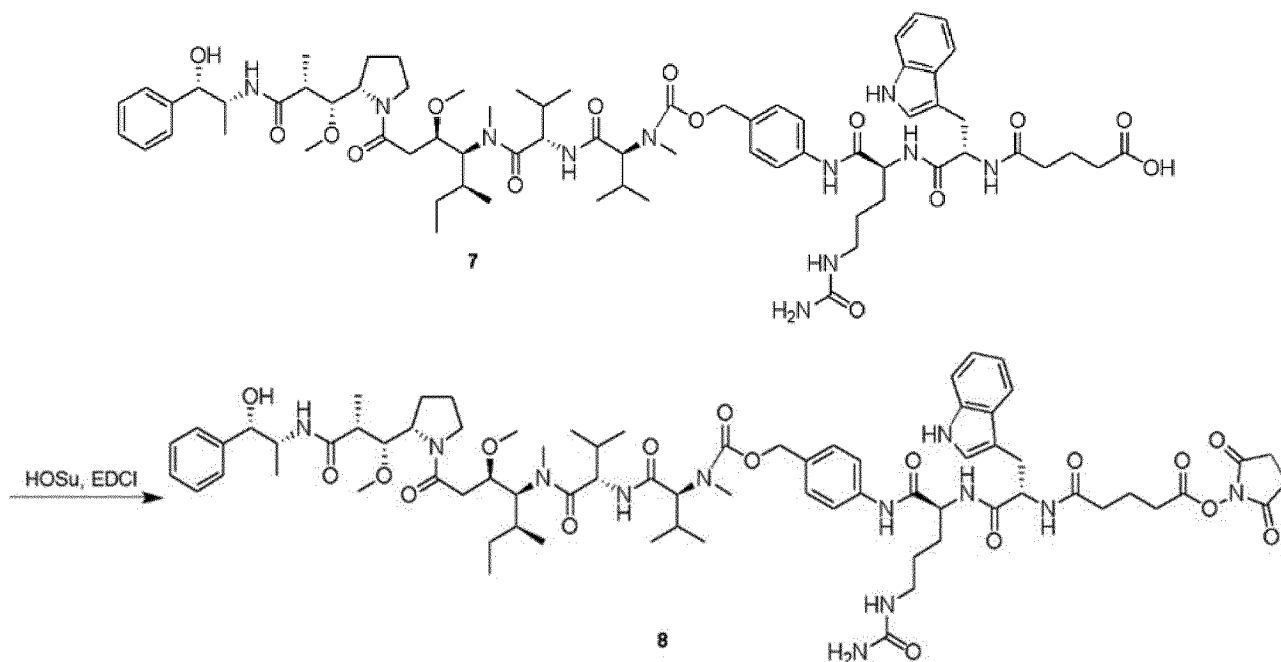
Общая методика получения соединения 7



К раствору соединения 6 (125,00 мг, 94,37 мкмоль, 1,00 экв, TFA) в DMA (5,00 мл) добавляли DIEA (24,39 мг, 188,75 мкмоль, 32,96 мкл, 2,00 экв), тетрагидропиран-2,6-дион (21,54 мг, 188,75 мкмоль, 2,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 6 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 7 (100,00 мг, 75,49 мкмоль, выход 80,00%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 1324,5 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	1324,63

Общая методика получения соединения 8 (MMAE-PABC-Cit-Trp-Глутарат-NHS)



К раствору соединения 7 (100,00 мг, 75,49 мкмоль, 1,00 экв), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (26,07 мг, 226,48 мкмоль, 3,00 экв) в DMA (3,00 мл) and DCM (1,00 мл) добавляли EDCI (43,42 мг, 226,48 мкмоль, 3,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 4 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 7 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. DCM удаляли. Непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 8 (60,00 мг, 42,20 мкмоль, выход 55,91%) получали в виде белого твердого вещества.

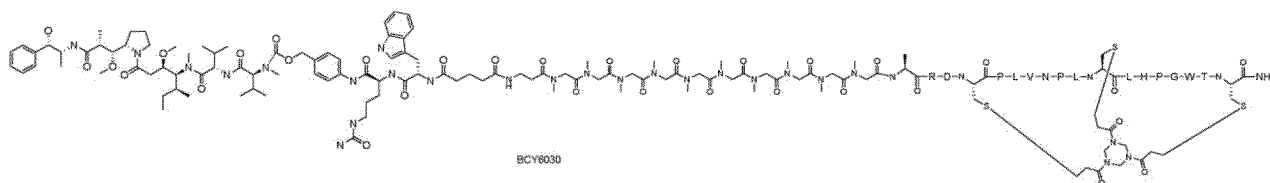
LCMS (ESI):	m/z 711,2 [M+2H] ²⁺
Молекулярная масса	1421,7

Общая методика связывания MMAE-PABC-Cit-Trp-Глутарат-NHS с таргетными бициклами

К раствору бицикла (1,0-1,3 экв) в DMA добавляли DIEA (3 экв) и MMAE-PABC-Cit-Trp-Глутарат-NHS (1 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. Ход реакции контролировали методом LC-MS, и после завершения реакции, реакционную смесь

непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

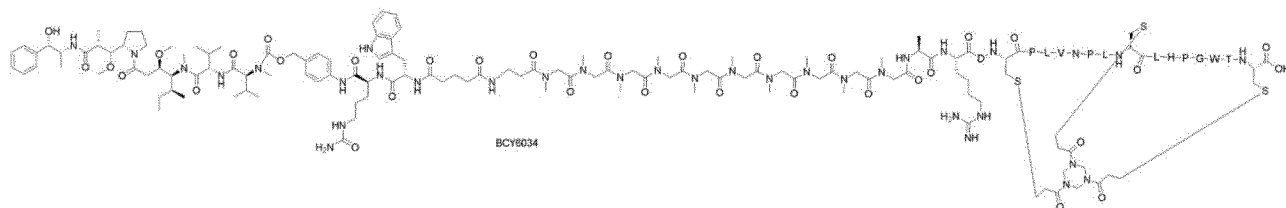
BCY6030



BSY6009 (47,29 мг, 14,07 мкмоль, 1,00 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BSY6030 (0,0156 г, 3,51 мкмоль, выход 24,93%, чистота 97,41%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY6030 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	7,90 мин
LCMS (ESI):	m/z 1083,7 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	4332,17

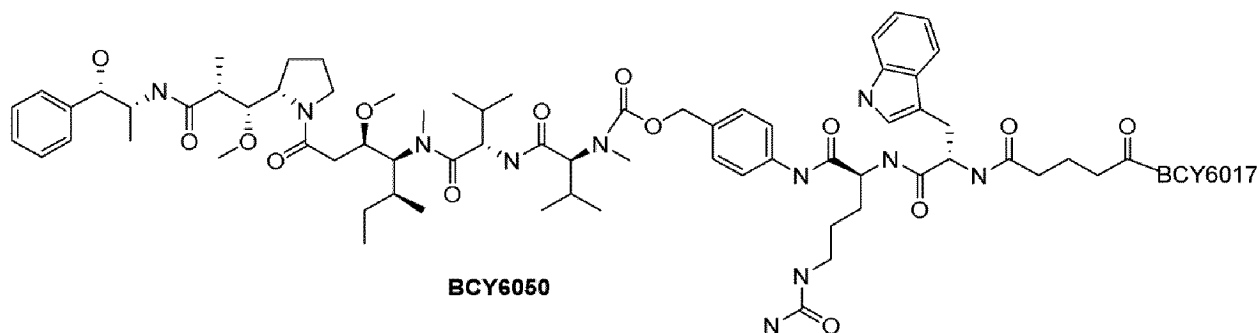
BSY6034



BSY6014 (88,21 мг, 23,21 мкмоль, 1,10 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BSY6034 (27,70 мг, 6,05 мкмоль, выход 28,70%, чистота 95,02%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY6034 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	30-60% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,49 мин
LCMS (ESI):	m/z 1449,3 [M+3H] ³⁺ , 1087,4 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	4346,13

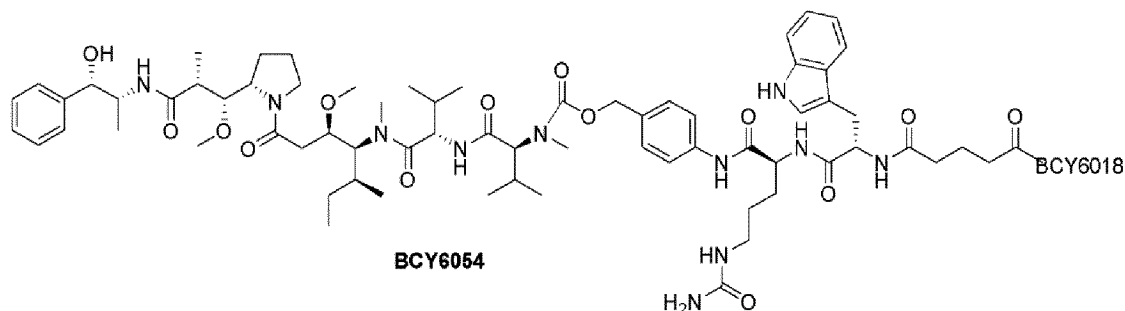
BSY6050



BSY6017 (57,17 мг, 25,32 мкмоль, 1,2 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BSY6050 (0,0519 г, 14,56 мкмоль, выход 69,01%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY6050 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	13,55 мин
LCMS (ESI):	m/z 1188,5 [M+3H] ³⁺ , 891,7 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3564,25

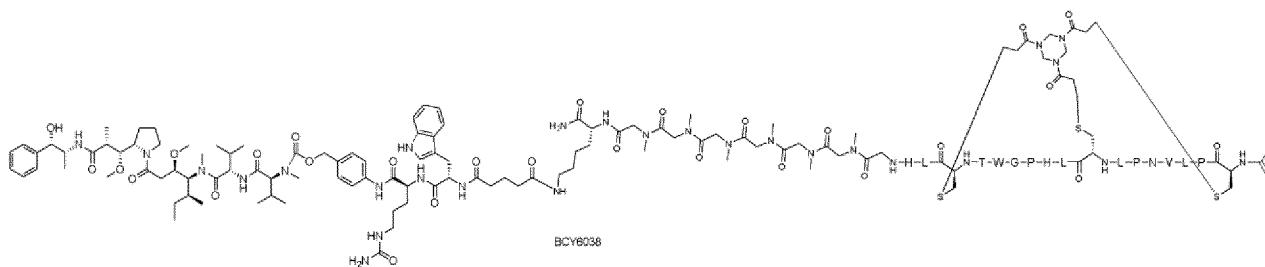
BSY6054



BSY6018 (67,97 мг, 25,32 мкмоль, 1,2 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BSY6054 (40,10 мг, 10,05 мкмоль, выход 47,62%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY6054 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	13,73 мин
LCMS (ESI):	m/z 1330,4 [M+3H] ³⁺ , 998,1 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3990,72

BSY6038

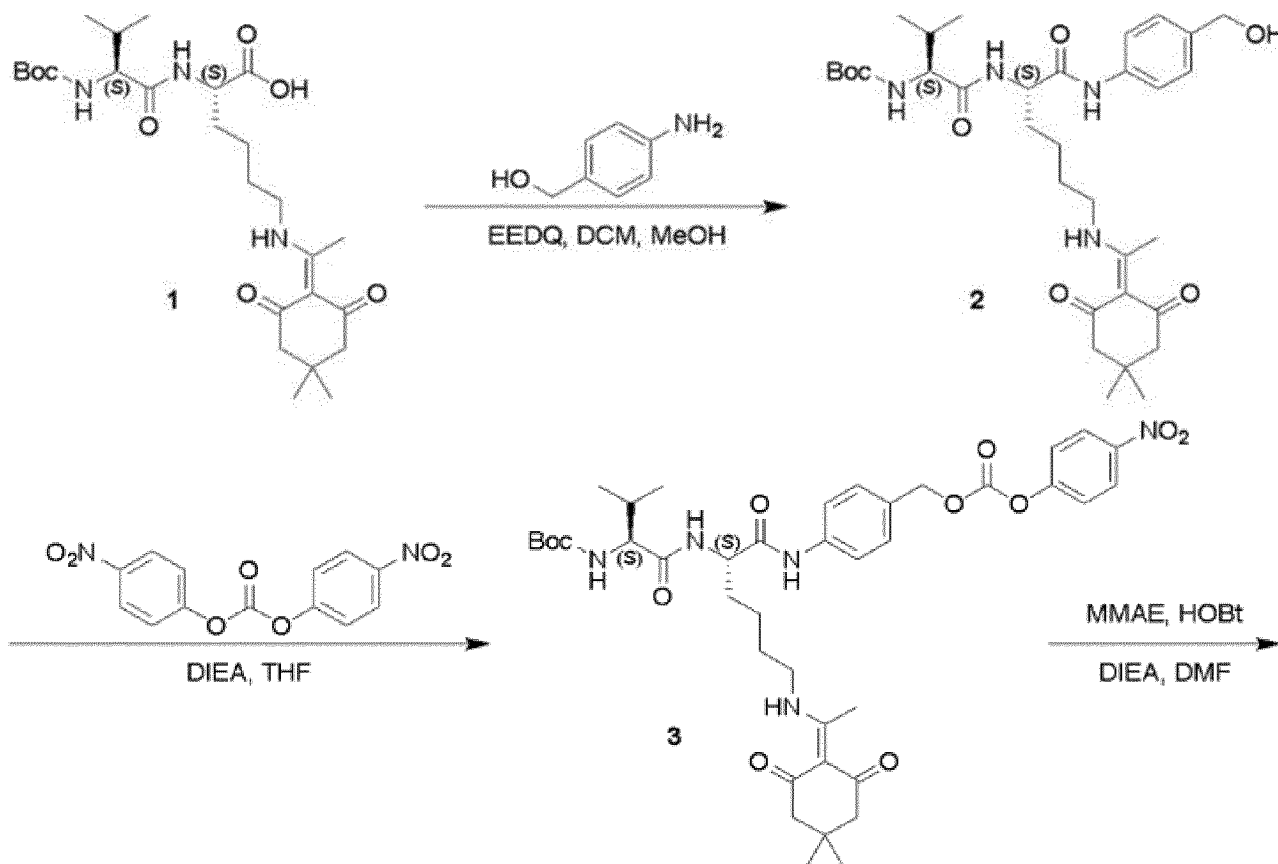


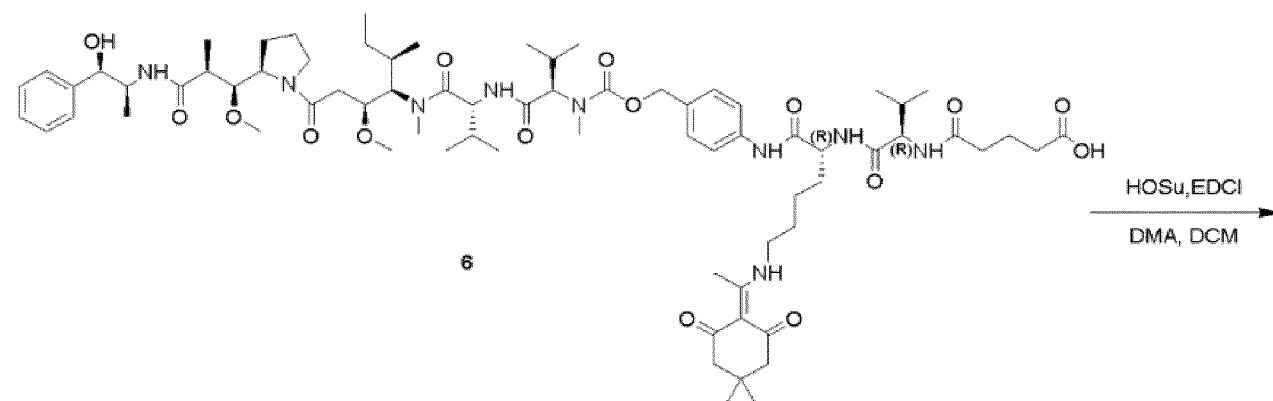
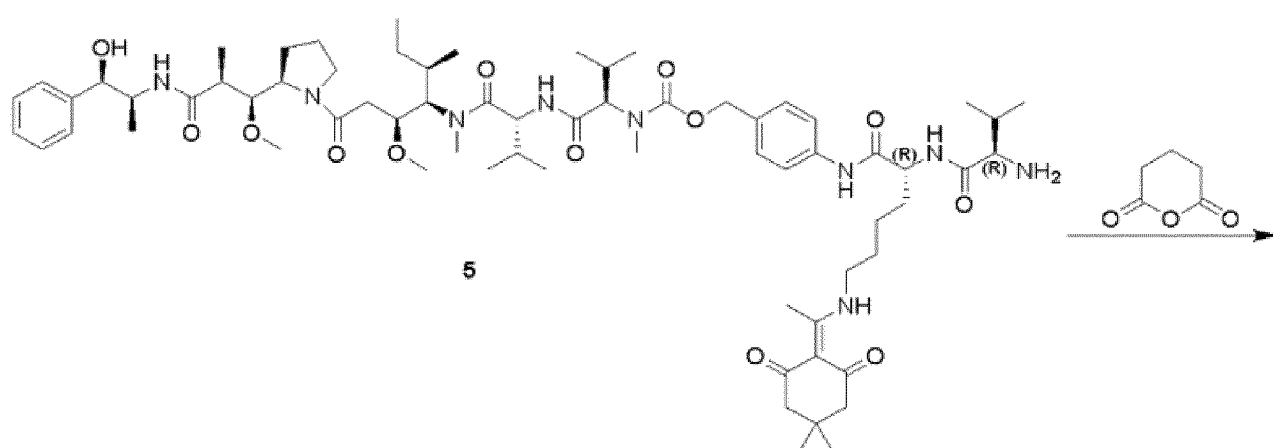
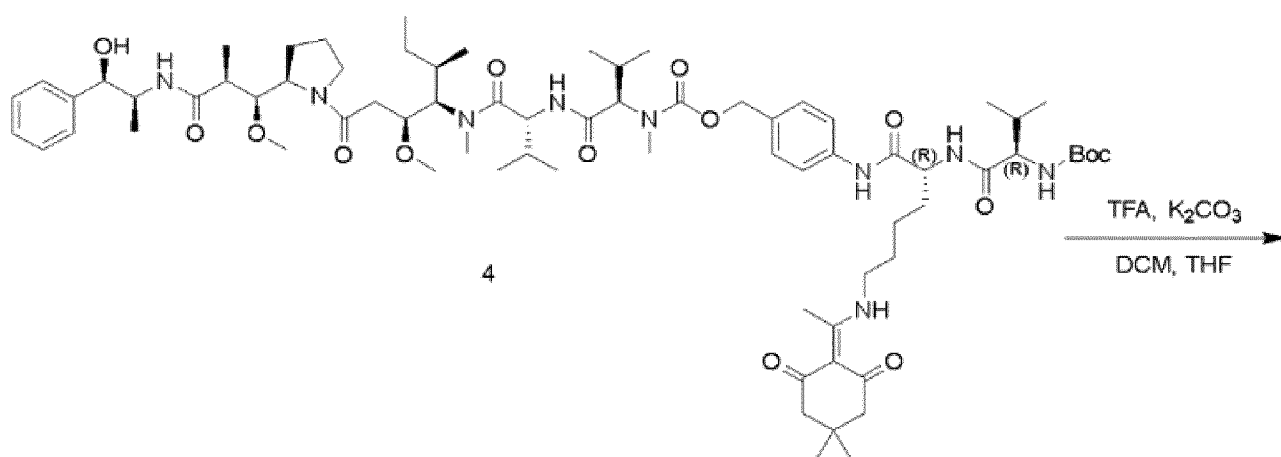
BSY6019 (81,39 мг, 23,21 мкмоль, 1,10 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Соединение BSY6038 (34,10 мг, 8,02 мкмоль, выход 38,00%, чистота 96,68%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY6038 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	9,56 мин
LCMS (ESI):	m/z 1371,0 [M+3H] ³⁺ , 1028,3 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	4111,9

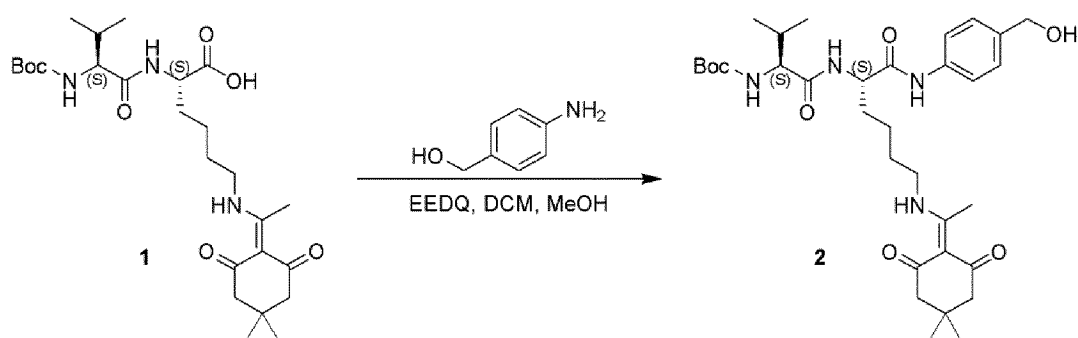
Val-Lys-MMAE серии

Val-Lys-MMAE Линкер





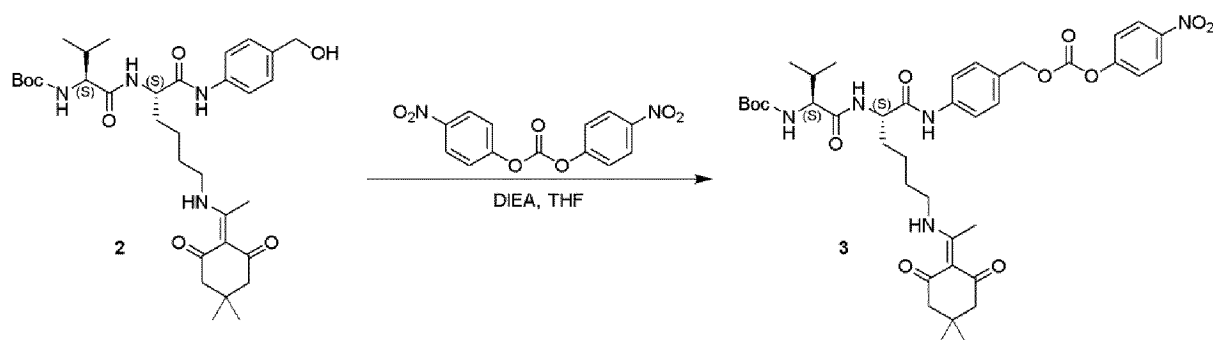
Общая методика получения соединения 2



К смеси соединения 1 (3,00 г, 5,89 ммоль, 1 экв) и (4-аминофенил)метанола (869,93 мг, 7,06 ммоль, 1,2 экв) в DCM (35 мл) и MeOH (18 мл) добавляли EEDQ (2,91 г, 11,77 ммоль, 2 экв) в темноте в атмосфере азота, смесь перемешивали при 25°C в течение 5 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Полученную реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; колонка 120 g SepaFlash® Silica Flash, элюент 0~20% MeOH/DCM и 80 мл/мин). Соединение 2 (2,2 г, 3,58 ммоль, выход 60,79%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 615,0 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	614,78

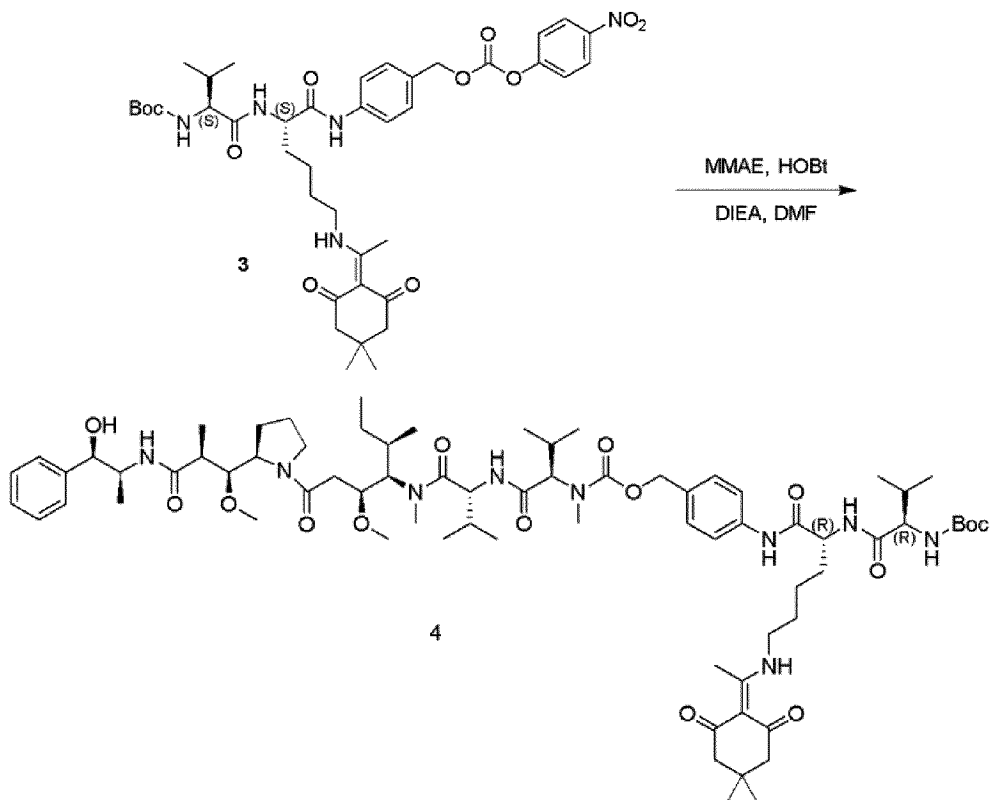
Общая методика получения соединения 3



К раствору соединения 2 (500 мг, 813,31 мкмоль, 1 экв) в THF (10 мл) добавляли DIEA (630,69 мг, 4,88 ммоль, 849,98 мкл, 6 экв) при 0°C в атмосфере азота с перемешиванием в течение 30 минут. Затем добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (1,48 г, 4,88 ммоль, 6 экв), смесь перемешивали при 25°C в атмосфере азота в течение еще 21 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Полученную реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; колонка 40 g SepaFlash® Silica Flash, элюент 0~20% MeOH/DCM и 40 мл/мин). Соединение 3 (500 мг, 641,13 мкмоль, выход 78,83%) получали в виде желтого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 780,0 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	779,89

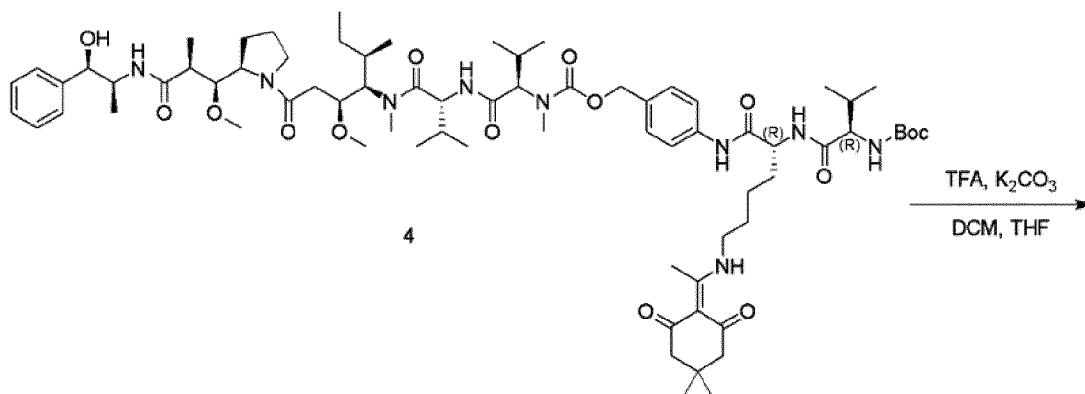
Общая методика получения соединения 4

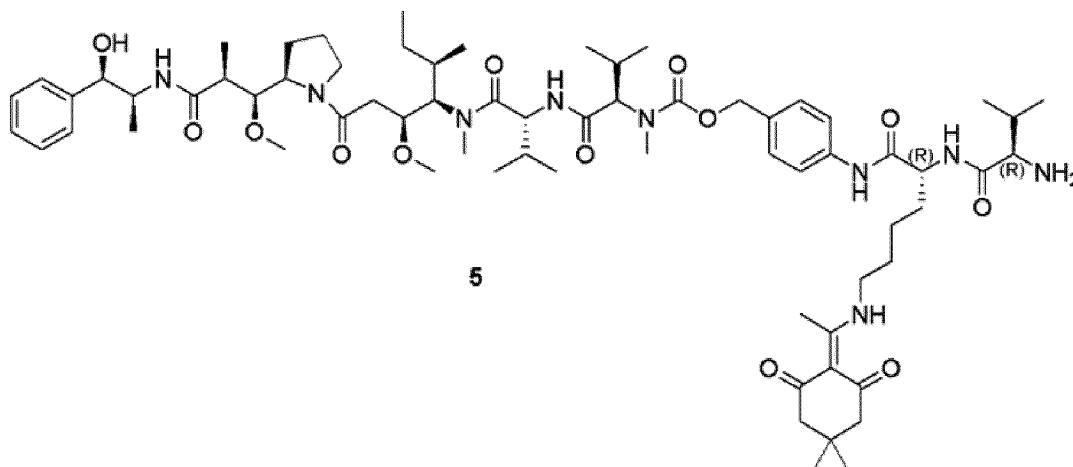


К смеси соединения 3 (500 мг, 512,90 мкмоль, 1,23 экв) в DMF (8 мл) добавляли DIEA (135,01 мг, 1,04 ммоль, 181,95 мкл, 2,5 экв) с перемешиванием при 0°C в течение 30 минут. Затем добавляли MMAE (300 мг, 417,84 мкмоль, 1 экв) и HOBT (84,69 мг, 626,76 мкмоль, 1,5 экв), и смесь перемешивали при 40°C в течение 15 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Остаток очищали флэш-гельхроматографией (ISCO®; колонка 130 g SepaFlash® C18 Flash, элюент 0~60% MeCN/H₂O и 75 мл/мин). Соединение 4 (330 мг, 242,87 мкмоль, 58,13% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 679,7 [M+2H] ²⁺
Молекулярная масса	1358,77

Общая методика получения соединения 5

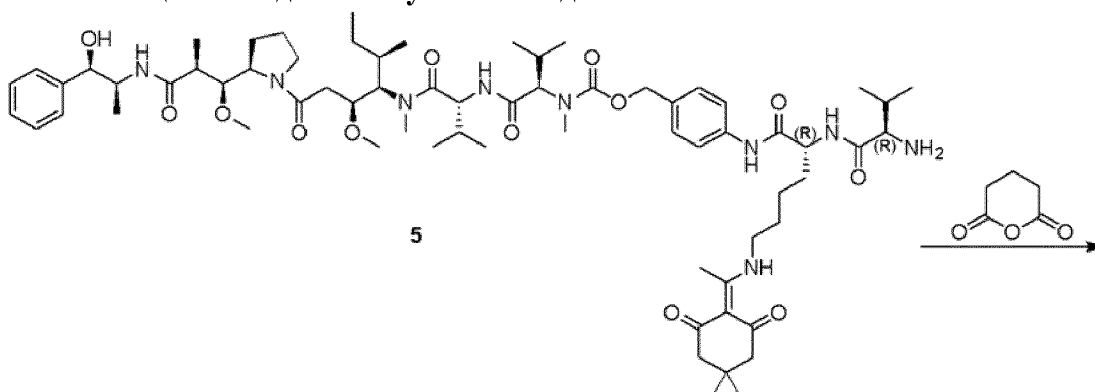


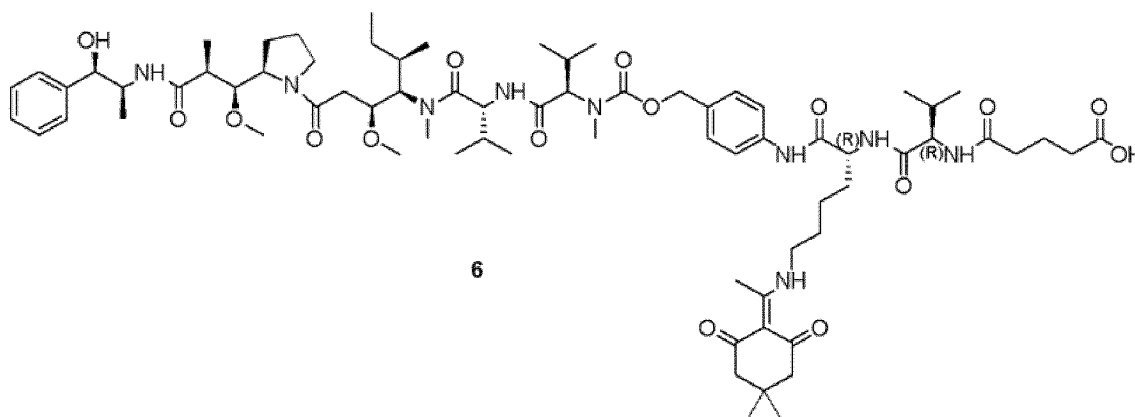


К раствору соединения 4 (325 мг, 239,19 мкмоль, 1 экв) в DCM (18 мл) добавляли TFA (3,03 г, 26,60 ммоль, 1,97 мл, 111,22 экв) при 0°C, смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 4 было полностью израсходовано. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, остаток растворяли в THF (10 мл) и добавляли K₂CO₃ (661,16 мг, 4,78 ммоль, 20 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 15 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Полученную реакционную смесь фильтровали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-гельхроматографией (ISCO®; колонка 130 g SepaFlash® C18 Flash, элюент 0~60% MeCN/H₂O и 75 мл/мин). Соединение 5 (170 мг, 135,07 мкмоль, выход 56,47%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 629,7 [M+2H] ²⁺
Молекулярная масса	1258,65

Общая методика получения соединения 6

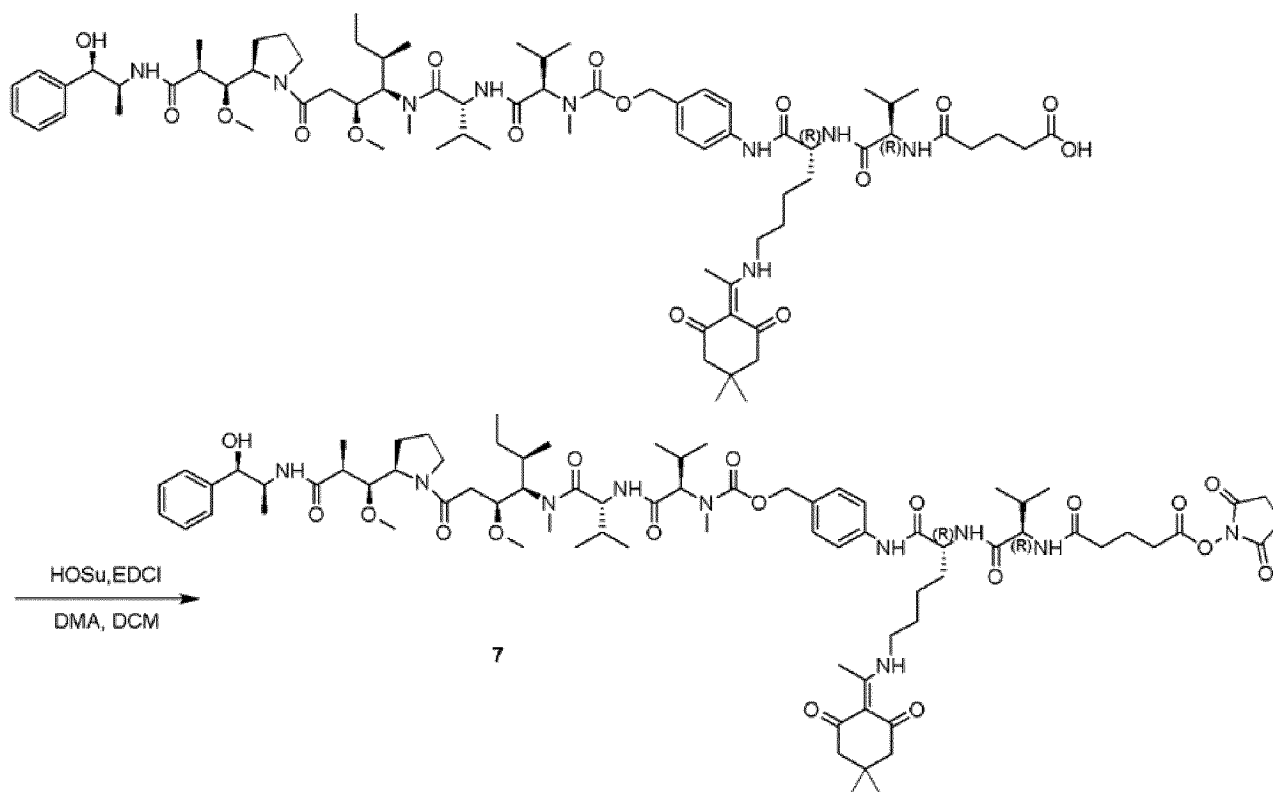




Круглодонную колбу, содержащую раствор соединения 5 (140 мг, 111,23 мкмоль, 1 экв) в DMA (5 мл), продували азотом из баллона и добавляли в нее DIEA (28,75 мг, 222,46 мкмоль, 38,75 мкл, 2 экв) при 0°C с перемешиванием в течение 10 минут, добавляли тетрагидропиран-2,6-дион (25,38 мг, 222,46 мкмоль, 2 экв) в виде раствора в DMA. Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 5 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Полученную реакционную смесь очищали флэш-гельхроматографией (ISCO®, колонка 43 g SepaFlash® C18 Flash, элюент 0~60% MeCN/H₂O и 40 мл/мин). Соединение 6 (120 мг, 87,42 мкмоль, выход 78,59%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 686,7 [M+2H] ²⁺
Молекулярная масса	1372,75

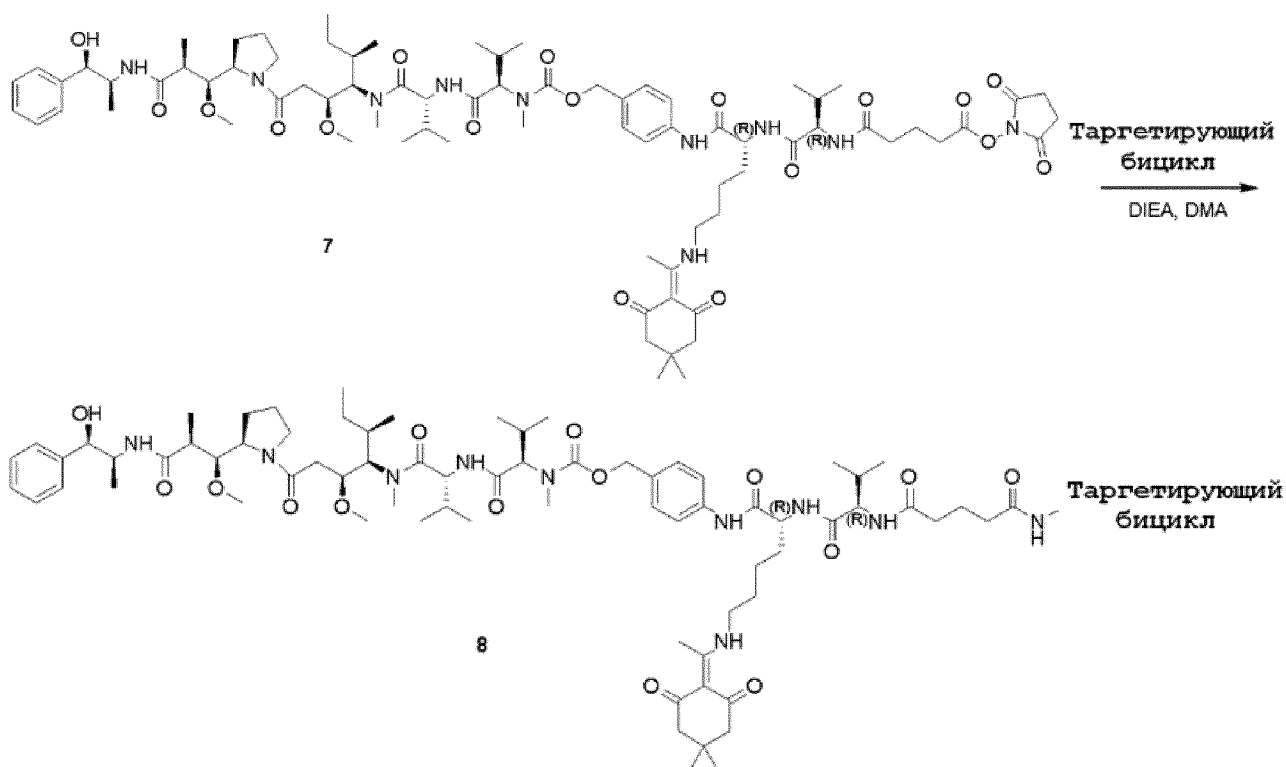
Общая методика получения соединения 7 (MMAE-PABC-Lys(Dde)-Val-Глутарат-NHS)



К раствору соединения 6 (120 мг, 87,42 мкмоль, 1 экв) в DMA (9 мл) и DCM (3 мл) добавляли 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (30,18 мг, 262,25 мкмоль, 3 экв) с перемешиванием, и добавляли EDCI (50,27 мг, 262,25 мкмоль, 3 экв), смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут и при 25°C в течение еще 19 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 6 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Полученную реакцию смесь концентрировали при пониженном давлении с удалением DCM. Смесь очищали флэш-гельхроматографией (ISCO®; колонка 43 g SepaFlash® C18 Flash, элюент 0~60% MeCN/H₂O и 40 мл/мин). Соединение 7 (60 мг, 40,82 мкмоль, 46,70% выход) получали в виде белого твердого вещества.

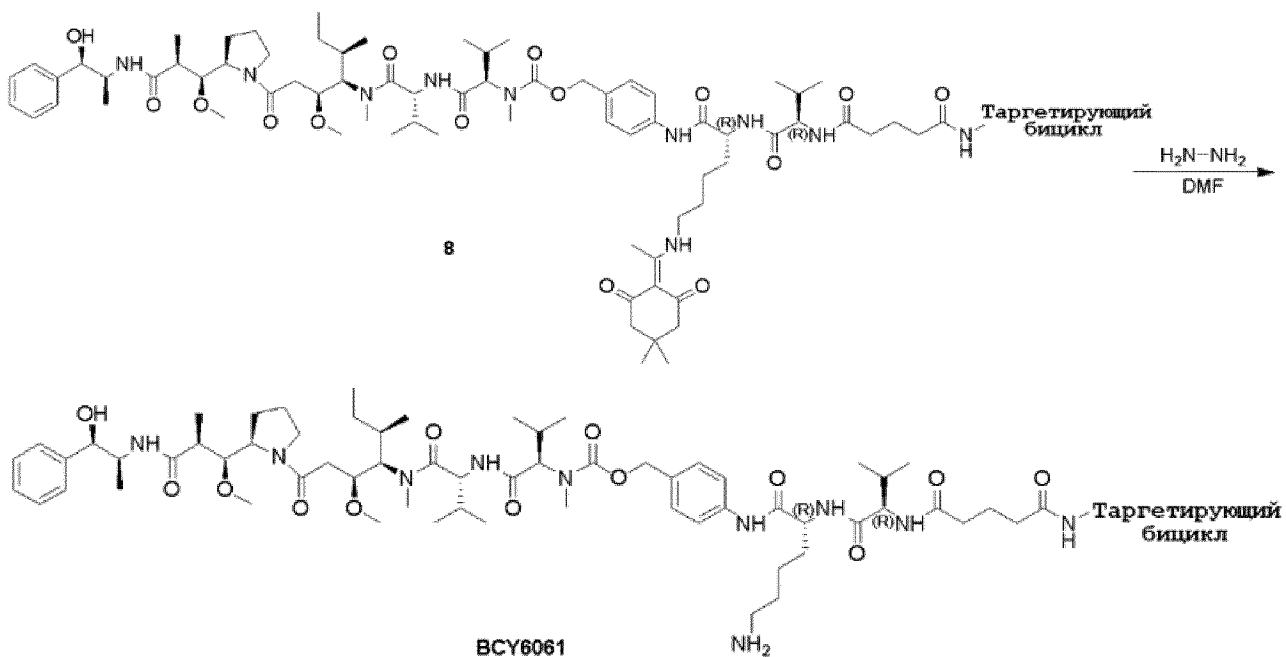
LCMS (ESI):	m/z 735,3 [M+2H] ²⁺
Молекулярная масса	1469,83

Общая методика связывания MMAE-PABC-Lys(Dde)-Val-Глутарат-NHS с таргетными бициклами



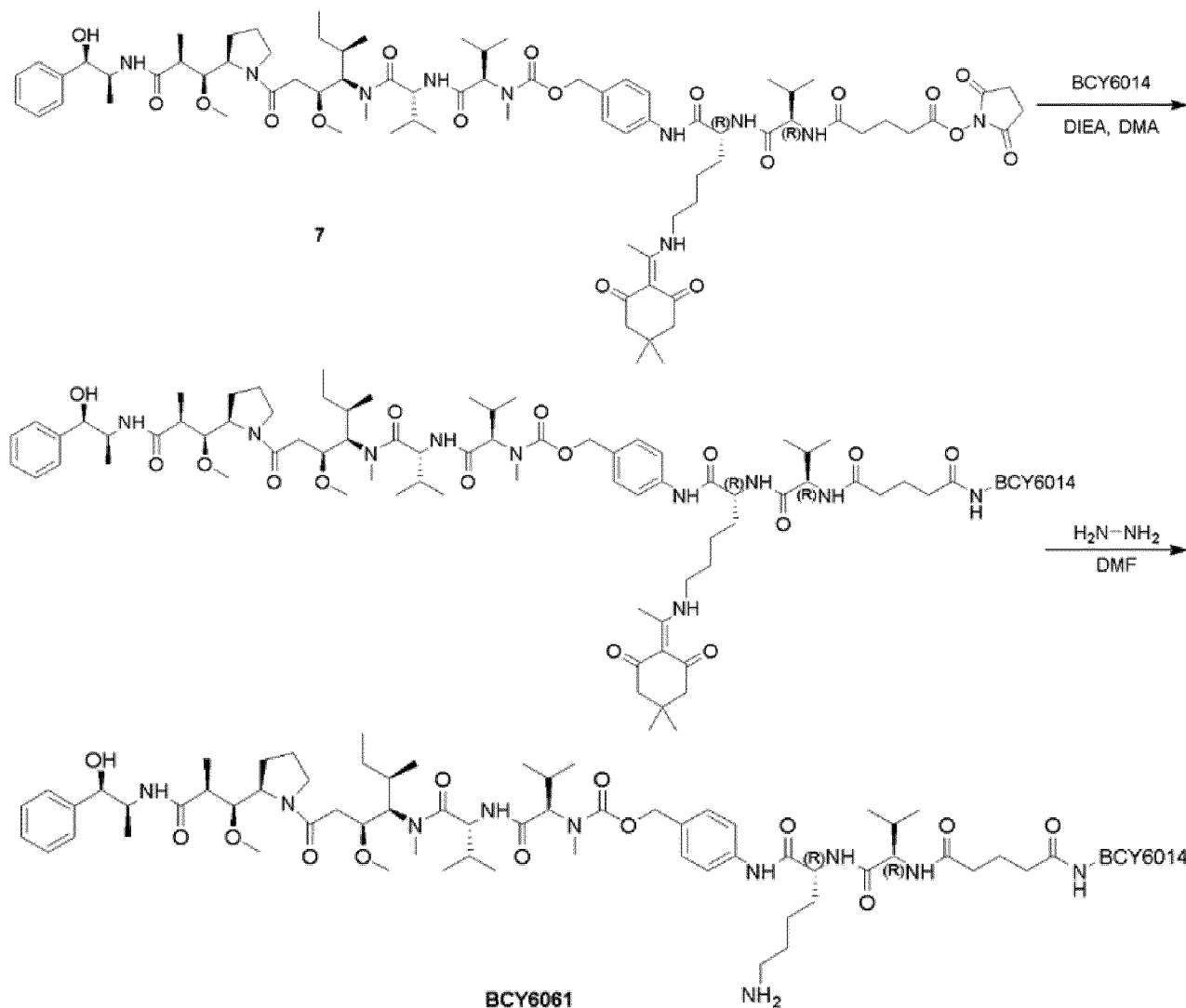
К раствору бицикла (1,0-1,3 экв) в DMA добавляли DIEA (3 экв) и MMAE-PAVC-Lys(Dde)-Val-Глутарат-NHS (1 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. Ход реакции контролировали методом LC-MS, и после завершения реакции, реакционную смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

Общая методика удаления защитной группы Dde (N- α -1-(4,4-диметил-2,6-диоксо-циклогексен))



К раствору пептида, защищенного группой Dde, (1 экв) в DMF добавляли гидрат гидразина (6500 экв), и смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Ход реакции контролировали методом LC-MS, и после окончания реакции, смесь очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), и очищенные фракции лиофилизировали.

BCY6061



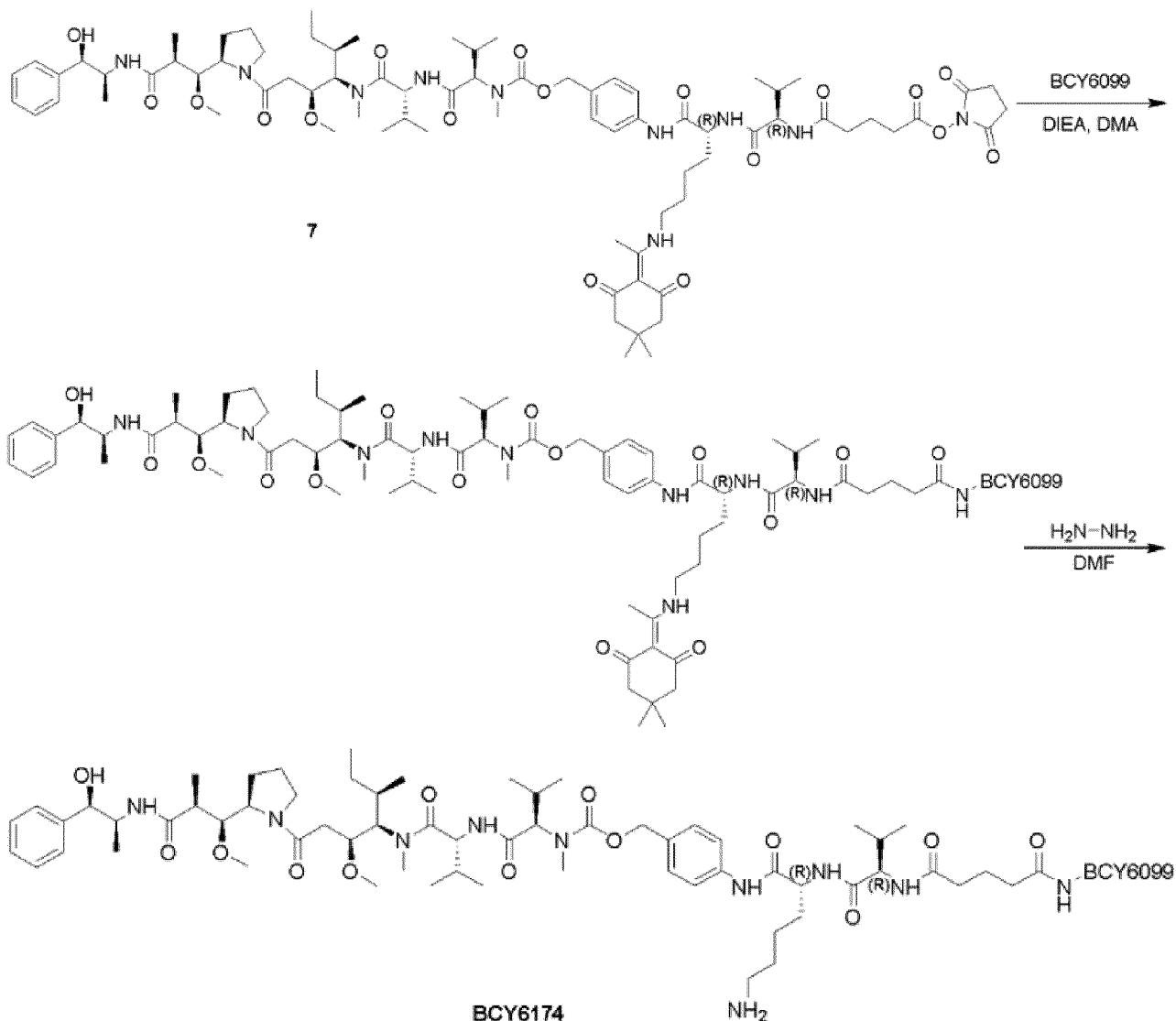
BCY6014 (124,12 мг, 40,82 мкмоль, 1,2 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Dde-BCY6038 (80 мг, 18,20 мкмоль, 53,51% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 1099,0 [M+4H] ⁴⁺ , 879,4 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса	4395,24

Dde-BCY6061 (78 мг, 17,75 мкмоль) подвергали реакции удаления защитной группы в соответствии с общей методикой с получением BCY6061 (47,1 мг, 11,13 мкмоль, выход 62,73%) в виде белого твердого вещества.

BCY6061 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN

Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% В в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% В
Время удерживания:	12,01 мин
LCMS (ESI):	m/z 1058,1 [M+4H] ⁴⁺ , 846,5 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса пептида	4230,03

BCY6174

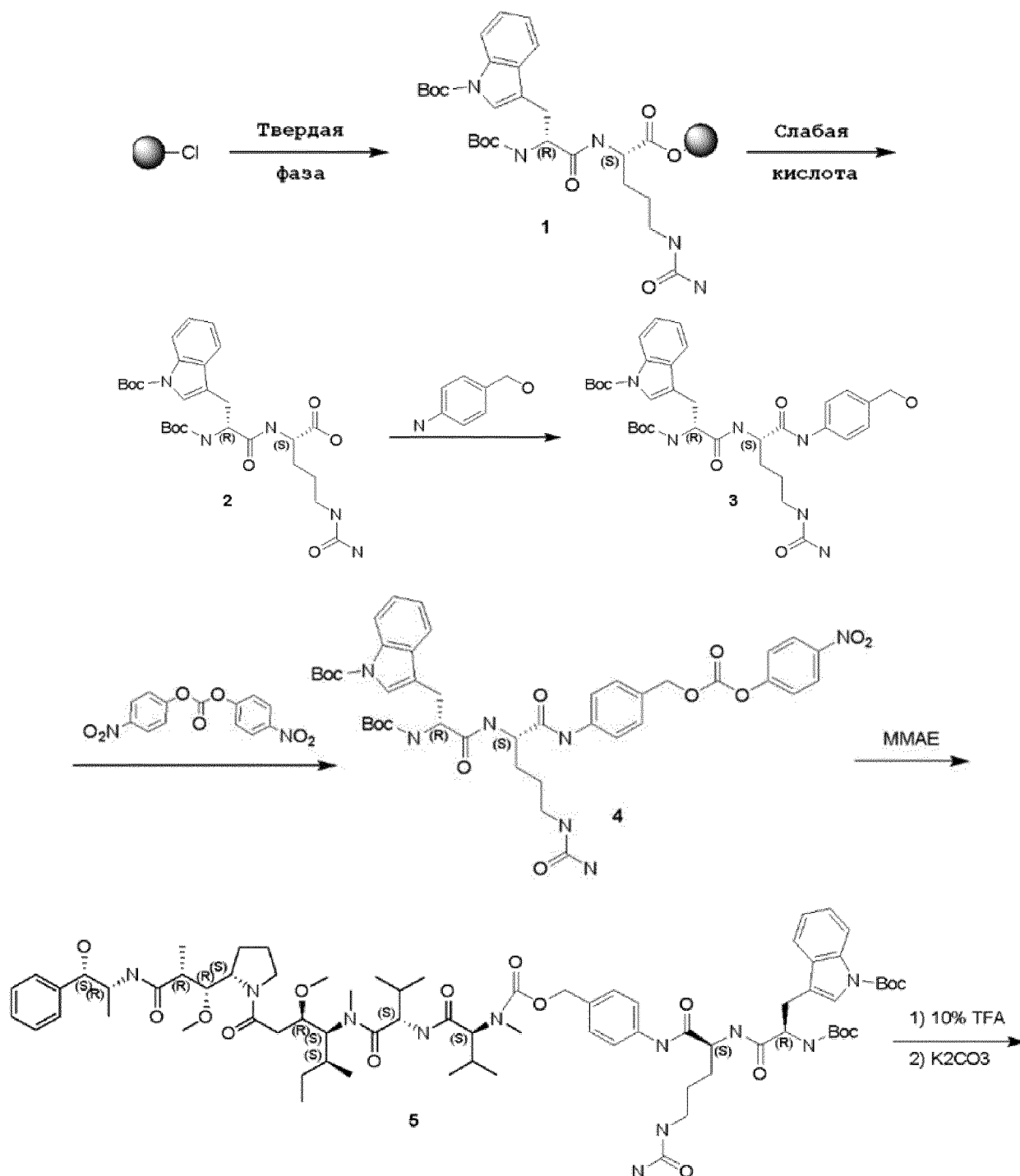
BCY6099 (389,77 мг, 122,47 мкмоль, 1,2 экв) использовали в качестве бициклического реагента. Dde-BCY6174 (0,250 г, 55,10 мкмоль, выход 53,99%) получали в виде белого твердого вещества.

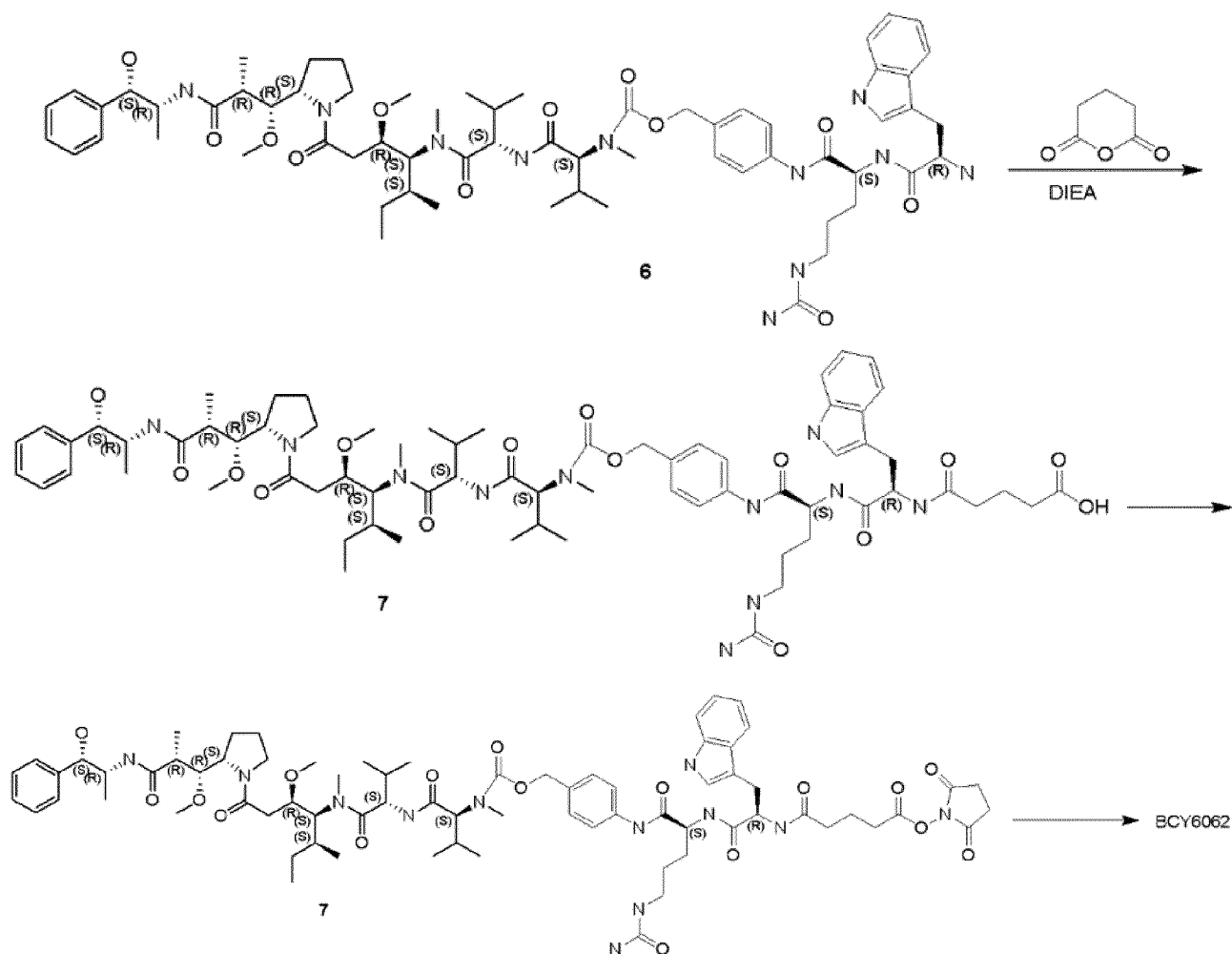
LCMS (ESI):	m/z 1513,0 [M+3H] ³⁺ , 1135,0 [M+4H] ⁴⁺ , 908,2 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса	4538,38

Dde-BCY6174 (0,250 г, 55,10 мкмоль, 1,0 экв) подвергали реакции удаления защитной группы в соответствии с общей методикой с получением BCY6174 (0,1206 г, 27,45 мкмоль, выход 49,82%) в виде белого твердого вещества.

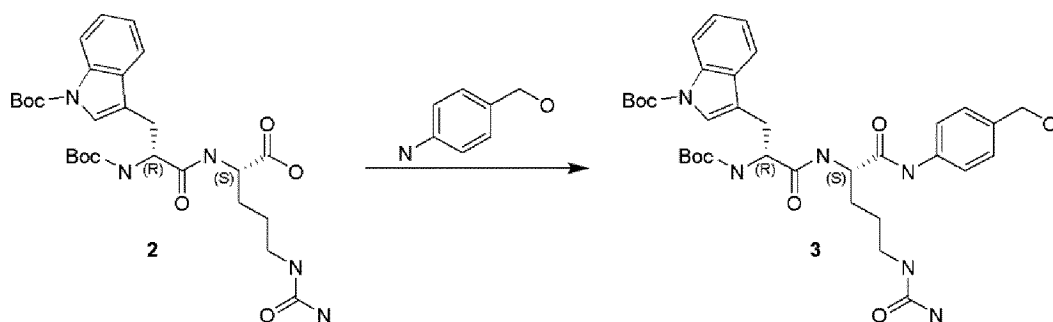
BCY6174 Данные анализа

Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	9,85 мин
LCMS (ESI):	m/z 1458,5 [M+3H] ³⁺ , 1094,1 [M+4H] ⁴⁺ , 875,4 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса пептида	4373,17

D-Trp-Cit-MMAE серии**D-Trp-Cit-MMAE Линкер**



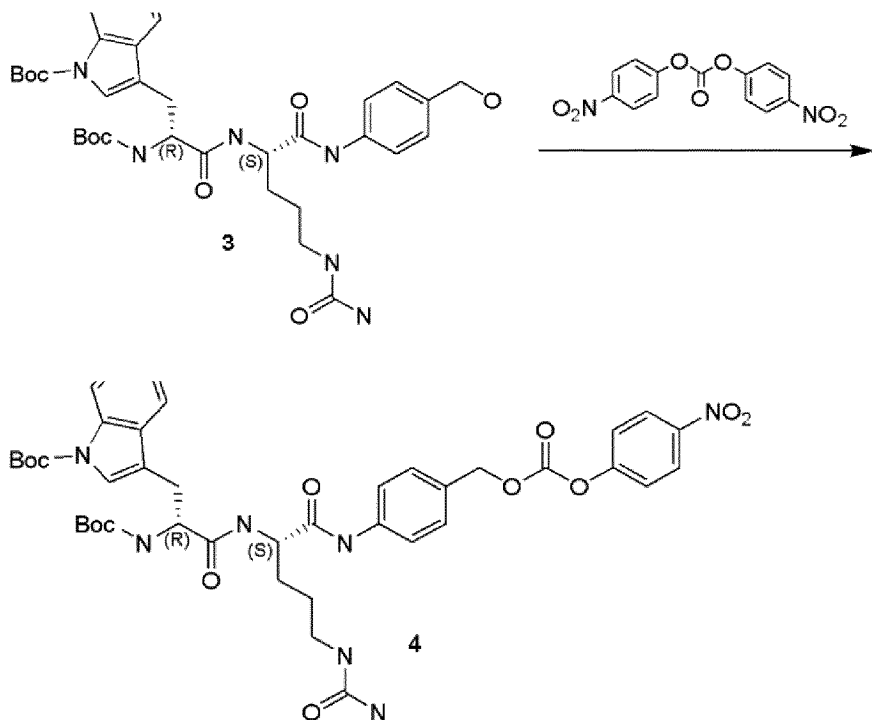
Общая методика получения соединения 3



К раствору соединения 1 (2 г, 4,33 ммоль, 1,00 экв), DIC (4,92 г, 39,00 ммоль, 6,00 мл, 9,00 экв), HOBT (5,27 г, 39,00 ммоль, 9,00 экв) в DMF (30,00 мл) добавляли (4-аминофенил)метанол (4,80 г, 39,00 ммоль, 9,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 2 (2 г, 3,53 ммоль, 81,45% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 666,9 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	666,78

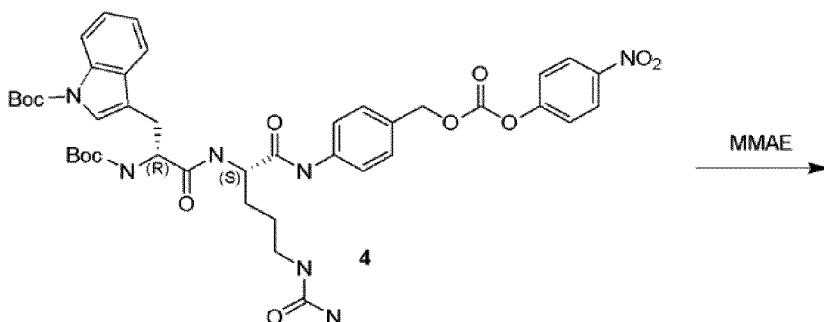
Общая методика получения соединения 4

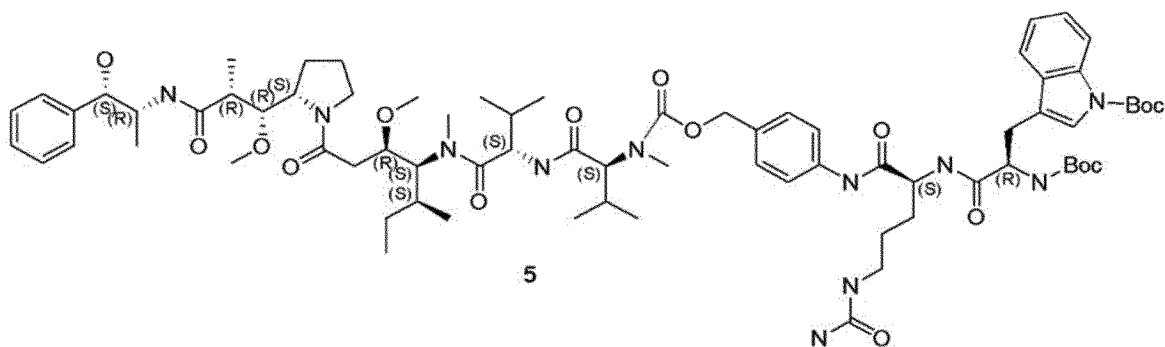


К раствору соединения 2 (2 г, 3,00 ммоль, 1 экв), DIEA (2,71 г, 21,00 ммоль, 3,66 мл, 7 экв) в DMF (20 мл) добавляли одной порцией бис(4-нитрофенил)карбонат (5,48 г, 18,00 ммоль, 6 экв) при 0°C. Смесь перемешивали при 0-15°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 3 (0,9 г, 1,08 ммоль, выход 36,07%) получали в виде желтого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 832,0 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	831,88

Общая методика получения соединения 5

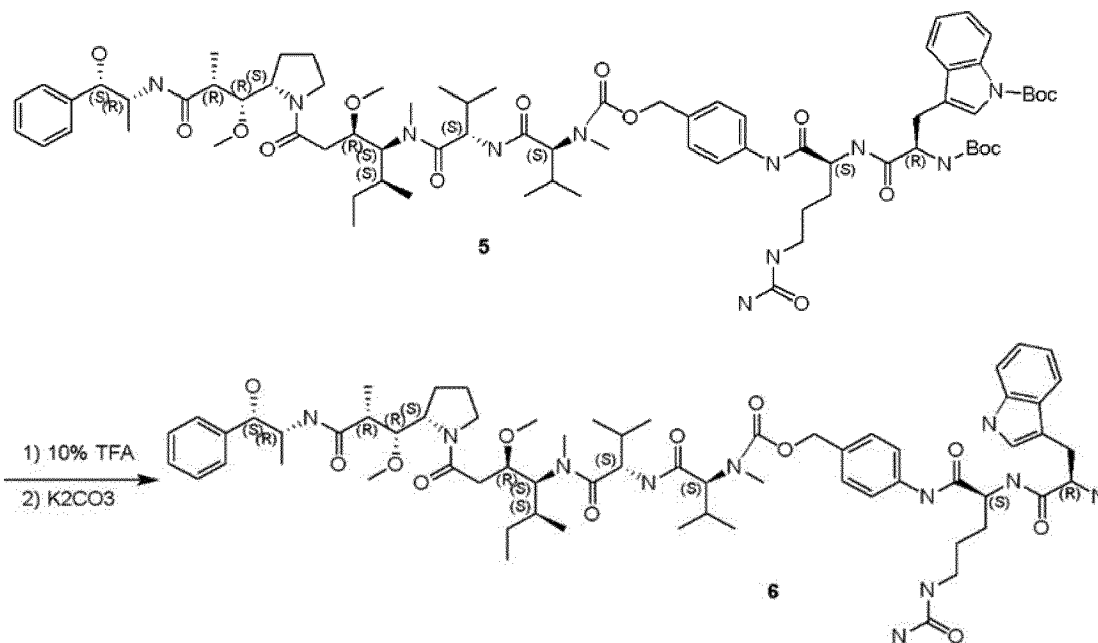




К раствору соединения 3 (350 мг, 420,74 мкмоль, 1,00 экв), HOBt (56,85 мг, 420,74 мкмоль, 1 экв) и DIEA (163,13 мг, 1,26 ммоль, 219,86 мкл, 3 экв) в DMF (10 мл) добавляли MMAE (302,08 мг, 420,74 мкмоль, 1 экв) при 0°C. Смесь перемешивали при 40°C в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 4 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 4 (0,22 г, 155,95 мкмоль, выход 37,06%) получали в виде желтого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 1410,5 [M+H] ⁺ , 705,7 [M+2H] ²⁺
Молекулярная масса	1410,76

Общая методика получения соединения 6

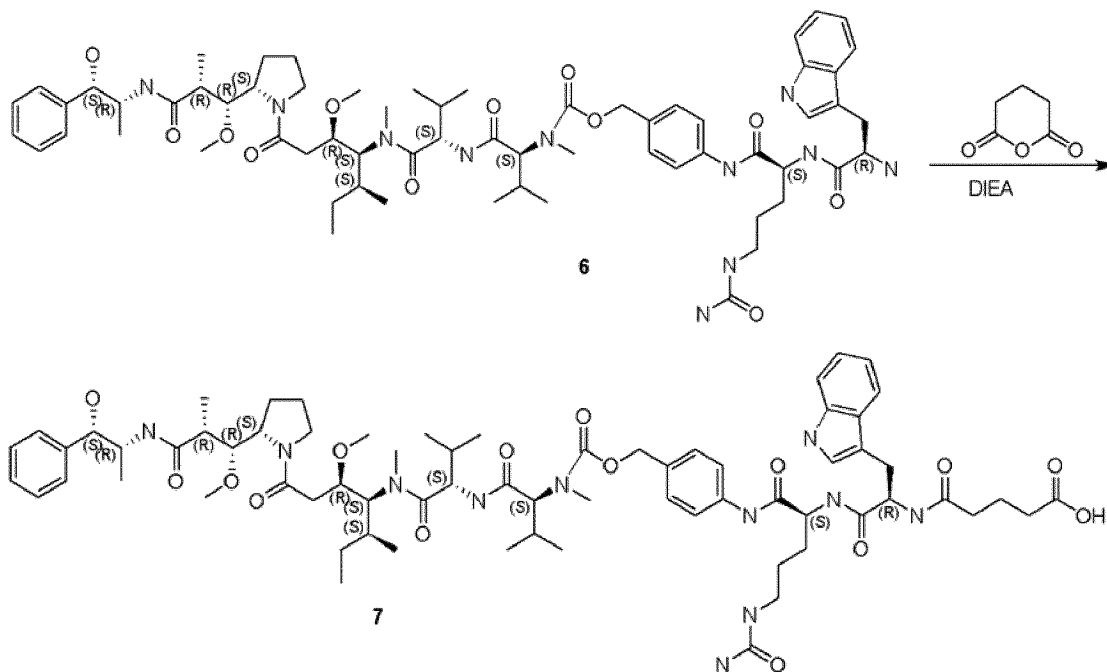


К раствору соединения 4 (0,21 г, 148,86 мкмоль, 1 экв) в DCM (9 мл) добавляли TFA (1,54 г, 13,51 ммоль, 1 мл, 90,73 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 4 часов и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который растворяли в THF, затем добавляли в твердом виде K₂CO₃ и перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 4 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Реакционную смесь фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали

методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 5 (0,13 г, 102,02 мкмоль, выход 68,54%, чистота 95%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 1210,4 [M+H] ⁺ , 605,8 [M+2H] ²⁺
Молекулярная масса	1210,53

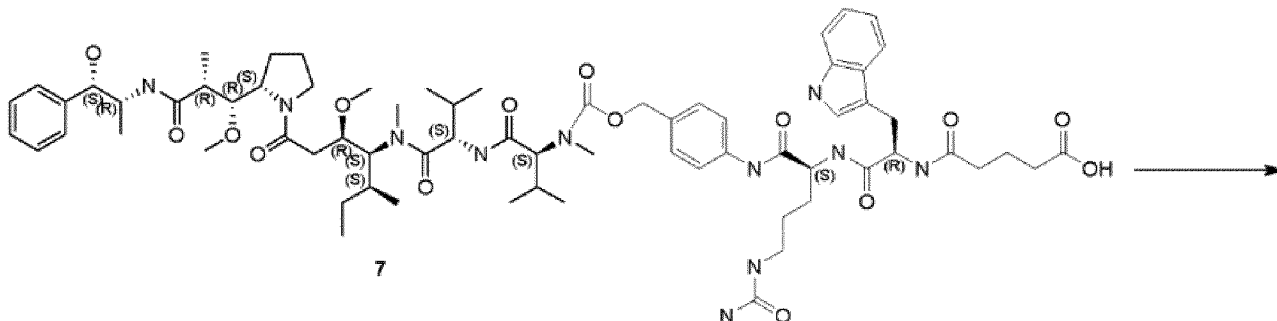
Общая методика получения соединения 7

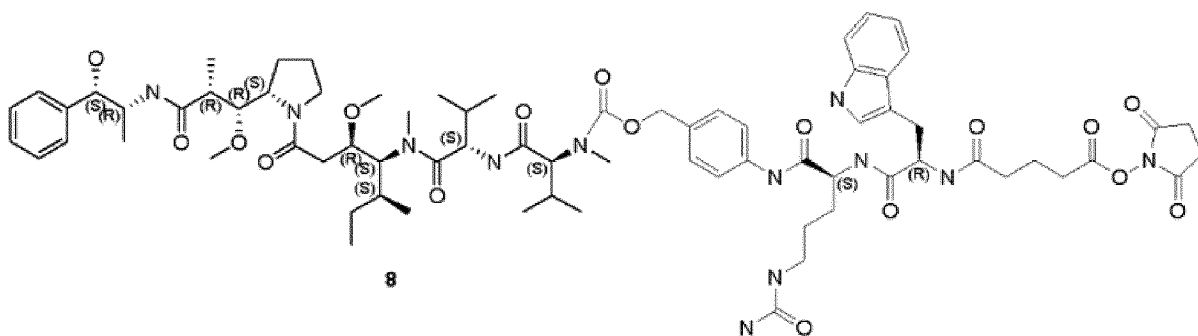


К раствору соединения 5 (0,12 г, 99,13 мкмоль, 1 экв) в DMA (5 мл) добавляли DIEA (38,44 мг, 297,40 мкмоль, 51,80 мкл, 3 экв) и тетрагидропиран-2,6-дион (22,62 мг, 198,26 мкмоль, 2 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 5 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 6 (0,09 г, 67,94 мкмоль, выход 68,54%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 662,7 [M+2H] ²⁺
Молекулярная масса	1324,63

Общая методика получения соединения 8





К раствору соединения 6 (0,09 г, 67,95 мкмоль, 1 экв), HOSu (23,46 мг, 203,84 мкмоль, 3 экв) в DMA (6 мл) и DCM (2 мл) добавляли EDCI (39,08 мг, 203,84 мкмоль, 3 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 6 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. DCM удаляли, и остаток непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 7 (0,06 г, 40,09 мкмоль, выход 59,01%, чистота 95%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 711,2 [M+2H] ²⁺
Молекулярная масса	1421,7

BCY6062

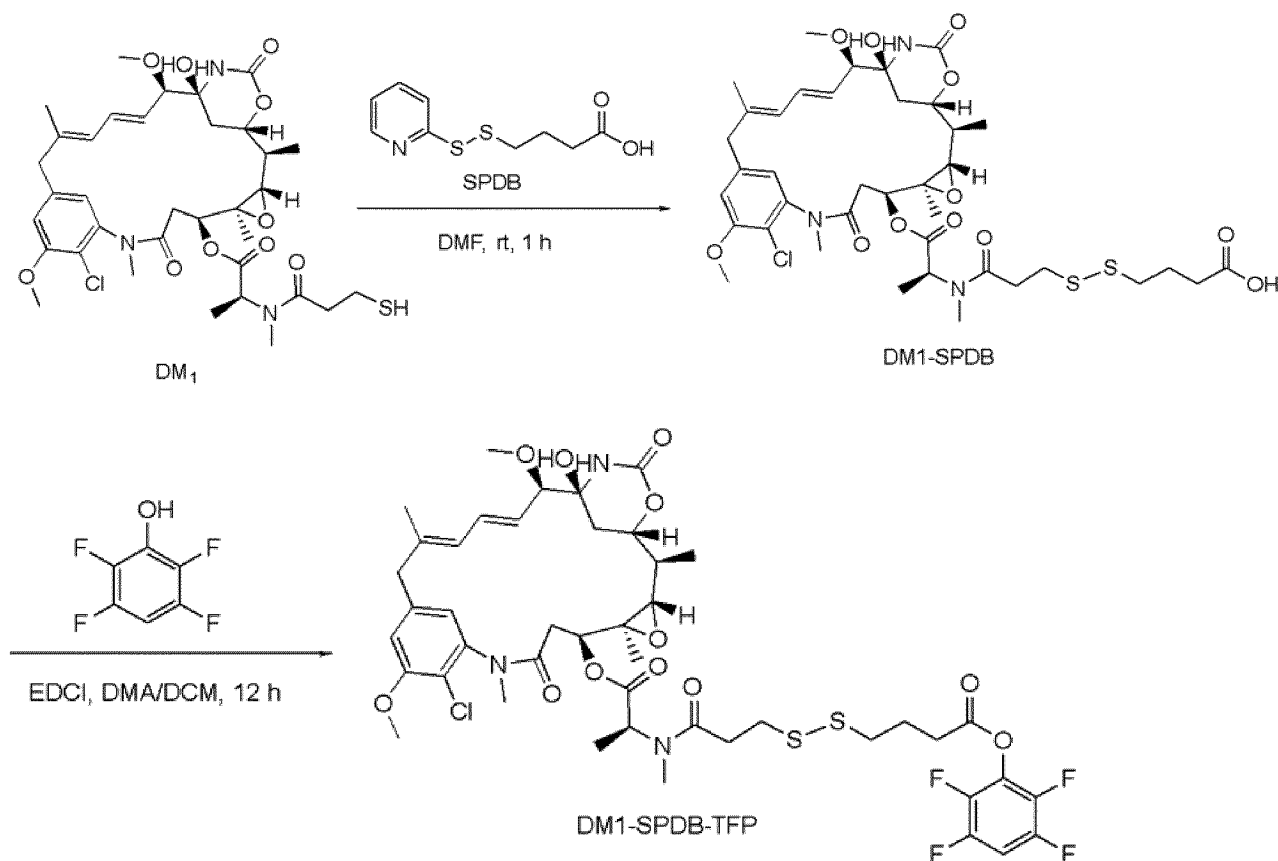
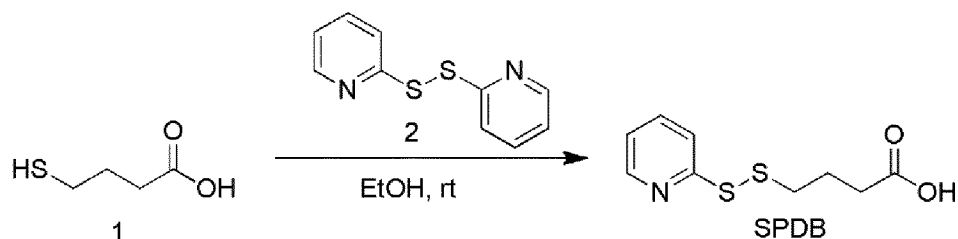
К раствору BCY6014 (76,99 мг, 25,32 мкмоль, 1,2 экв) в DMA (5 мл) добавляли DIEA (8,18 мг, 63,31 мкмоль, 11,03 мкл, 3 экв), соединение 7 (0,03 г, 21,10 мкмоль, 1 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Ход реакции контролировали методом LC-MS, и после завершения реакции, смесь очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). BCY6062 (0,0255 г, 5,70 мкмоль, выход 27,01%, чистота 97,15%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6062 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	13,15 мин
LCMS (ESI):	m/z 1449,2 [M+3H] ³⁺ , 1087,0 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	4346,13

DM1 серии

DM1-SS- серии

DM1-SPDP-TFP Линкер

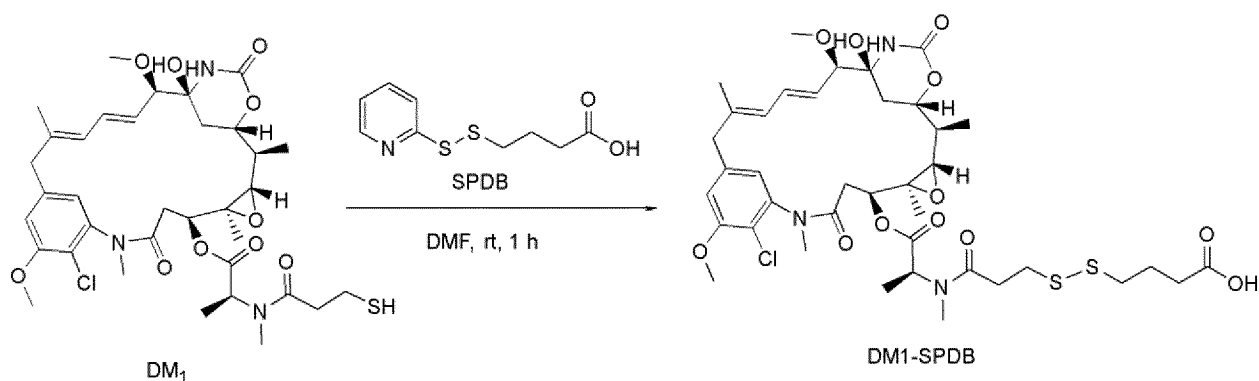
**SPDB**

К раствору 2-(2-пиридилдисульфанил)пиридина (12,37 г, 56,18 ммоль, 1,50 экв) в EtOH (100,00 мл) добавляли 4-сульфанилбутановую кислоту (4,50 г, 37,45 ммоль, 1,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 18 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (C18 360 г, нейтральное условие). Соединение SPDB (1,9 г, 8,29 ммоль, выход 22,12%) получали в виде желтого твердого вещества.

¹H ЯМР: ES6446-8-P1A 400 МГц CDCl₃

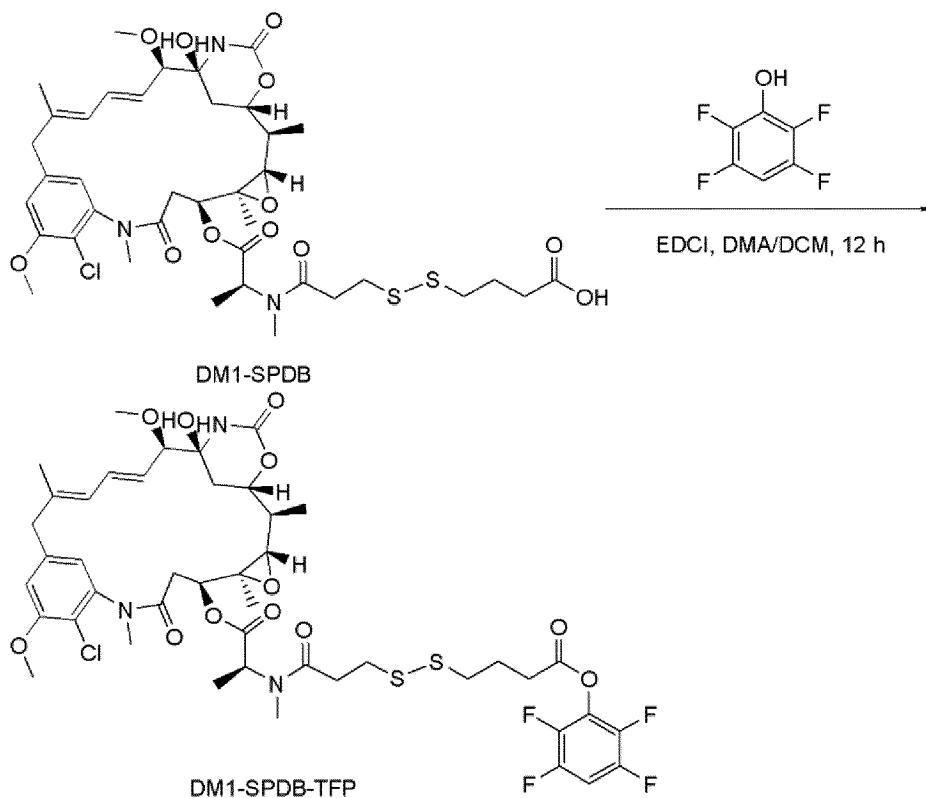
δ ppm 1,98 (кв, J=7,09 Гц, 2 H), 2,45 (т, J=7,15 Гц, 2 H), 2,79 (т, J=7,03 Гц, 2 H), 7,03 (дд, J=7,15, 4,89 Гц, 1 H), 7,19 (с, 1 H), 7,56-7,65 (м, 2 H), 8,41 (д, J=4,52 Гц, 1 H).

LCMS (ESI):	m/z 230,0 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	229,31

DM1-SPDB

Смесь DM1 (250,00 мг, 338,62 мкмоль, 1,00 экв) и 4-(2-пиридилдисульфанил)бутановой кислоты (100,95 мг, 440,21 мкмоль, 1,30 экв) добавляли в атмосфере азота в колбу объемом 50 мл с DMF (10,00 мл), продували с помощью N₂ в течение 30 минут. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1 был полностью израсходовано, и был зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Остаток очищали флэш-гельхроматографией (ISCO®; колонка 120 g SepaFlash® C18 Flash, элюент 0~60% MeCN/H₂O и 85 мл/мин). DM1-SPDB (120,00 мг, 140,11 мкмоль, выход 41,38%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 838,0 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	856,44

DM1-SPDB-TFP

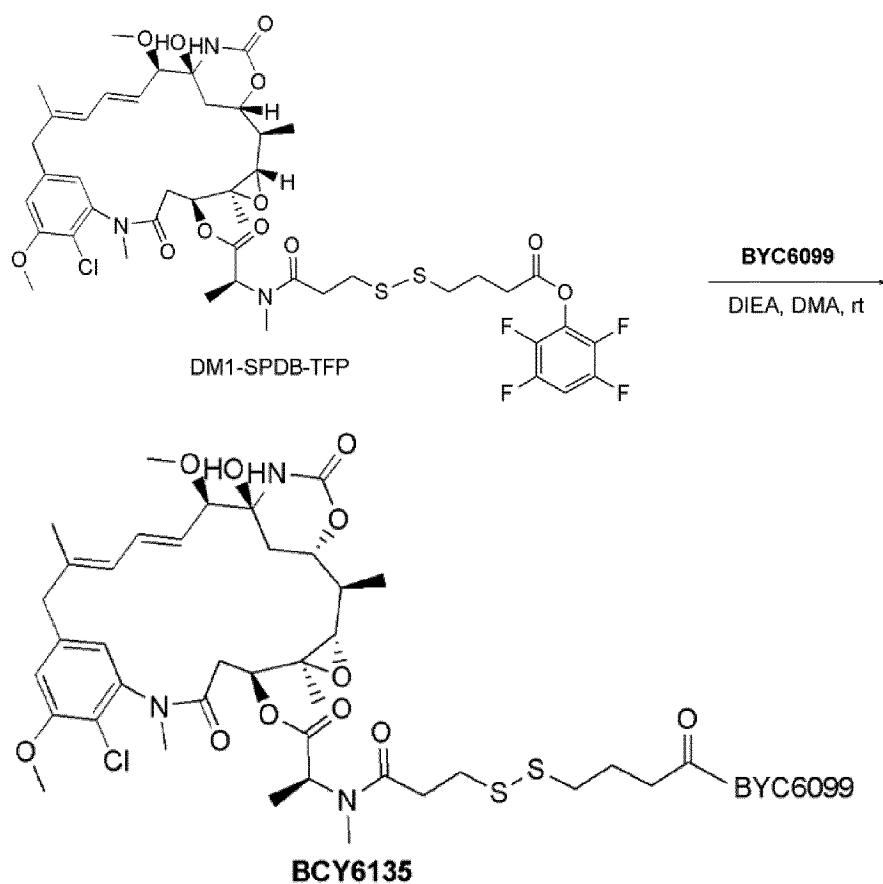
К раствору DM1-SPDB (120,00 мг, 140,11 мкмоль, 1,00 экв) и 2,3,5,6-тетрафторфенола (69,81 мг, 420,34 мкмоль, 3,00 экв) в DCM (1,00 мл) и DMA (3,00 мл) добавляли EDCI (80,58 мг, 420,34 мкмоль, 3,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 4 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1-SPDB было полностью израсходовано, и был зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. DCM удаляли, и остаток непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение DM1-SPDB-TFP (60,00 мг, 59,73 мкмоль, выход 42,63%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	m/z 985,9 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	1004,5

Общая методика связывания DM1-SPDB-TFP с таргетирующими бициклами

К раствору таргетирующего бицикла (1,1-1,3 экв) в DMA добавляли DIEA (3 экв) и DM1-SPDB-TFP (1 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. Ход реакции контролировали методом LC-MS, и после завершения реакции, смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

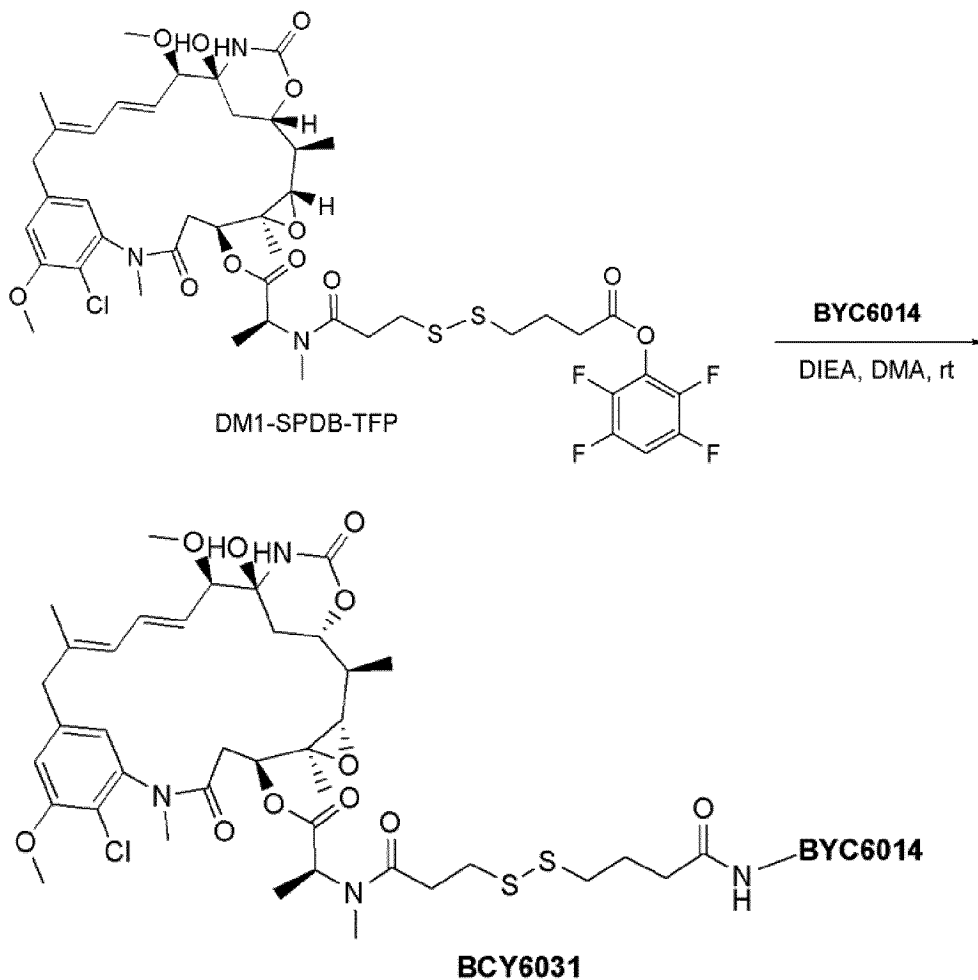
BCY6135



BCY6099 (114,1 мг, 35,84 мкмоль) использовали в качестве бициклического реагента. Получали 22,4 мг соединения BCY6135 (5,30 мкмоль, выход 17,74%, чистота 95,14%) в виде белого твердого вещества.

BCY6135 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN

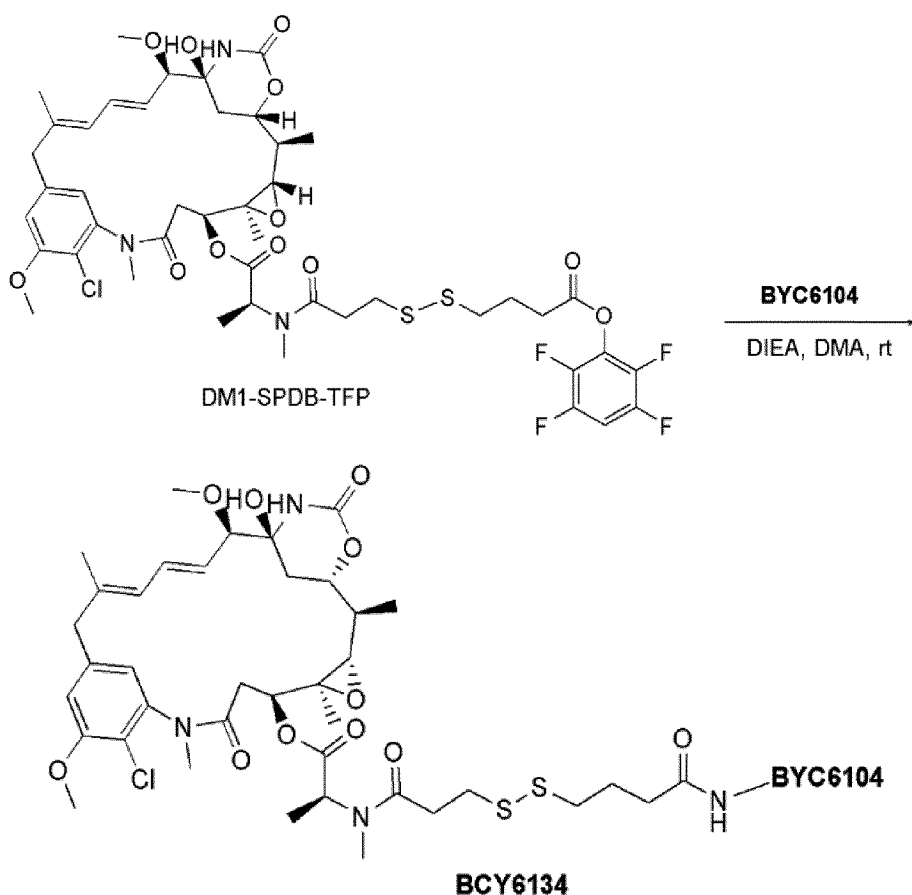
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% В в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% В
Время удерживания:	9,81 мин
LCMS (ESI):	m/z 1341,5 [M+3H] ³⁺ , 805,0 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса пептида	4021,08

BCY6031

BCY6014 (121,07 мг, 39,82 мкмоль) использовали в качестве бициклического реагента. Получали 59,90 мг соединения BCY6031 (14,67 мкмоль, выход 36,85%, чистота 95,02%) в виде белого твердого вещества.

BCY6031 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% В в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% В
Время удерживания:	6,284 мин
LCMS (ESI):	m/z 1286,4 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 965,6 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3877,96

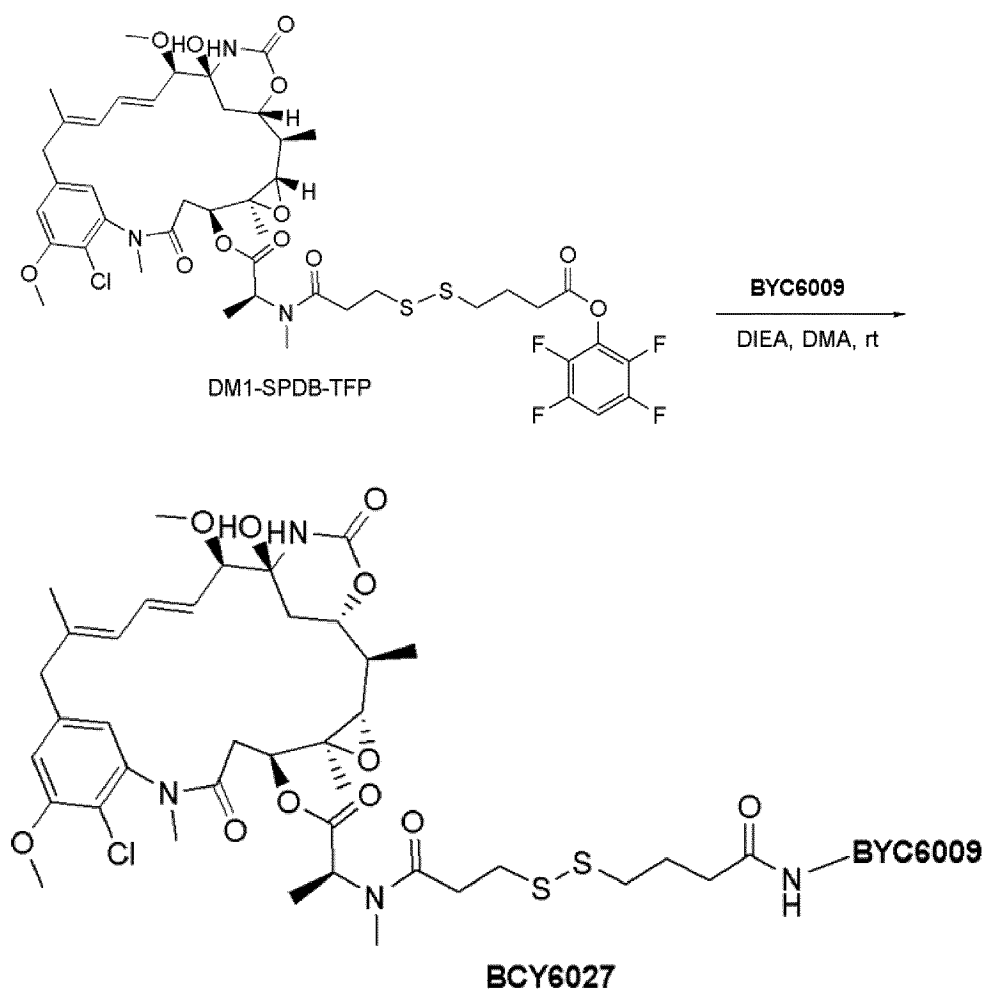
BCY6134



BCY6104 (95,11 мг, 29,87 мкмоль, 1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6134 (0,0232 г, 5,64 мкмоль, выход 18,89%, чистота 97,82%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6134 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	9,10 мин
LCMS (ESI):	m/z 1001,8 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	4026,1

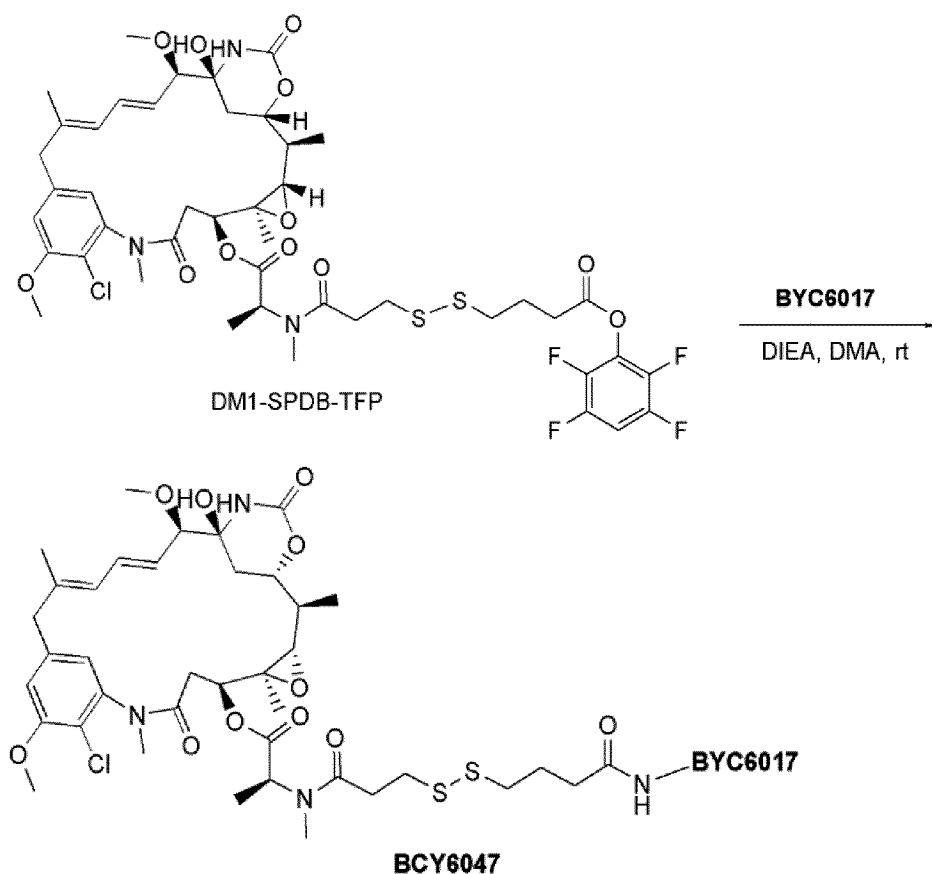
BCY6027



BCY6009 (60,24 мг, 19,91 мкмоль, 1,00 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6027 (20,40 мг, 5,11 мкмоль, выход 25,69%, чистота 96,88%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6027 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	5,97 мин
LCMS (ESI):	m/z 1932,1 [M+2H] ²⁺ , 1282,5 [M+3H-H ₂ O] ³⁺
Молекулярная масса пептида	3863,99

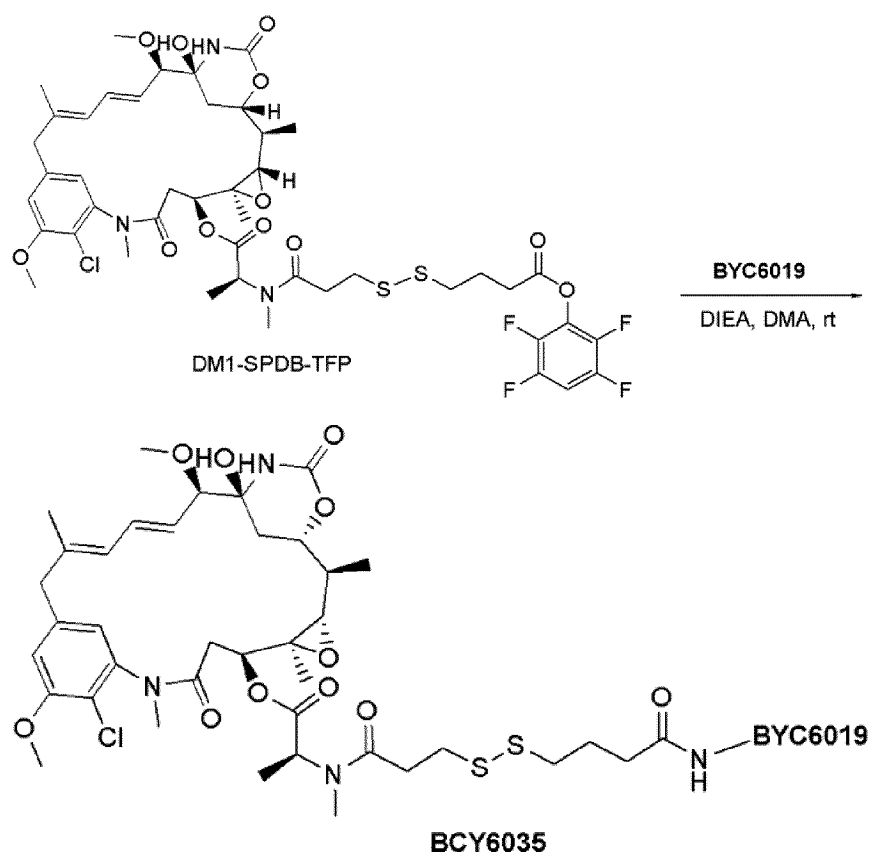
BCY6047



BCY6017 (61,81 мг, 27,38 мкмоль, 1,1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6047 (0,032 г, 10,34 мкмоль, выход 41,53%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6047 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	38-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	12,28 мин
LCMS (ESI):	m/z 1026,3 [M+3H-H ₂ O] ³⁺
Молекулярная масса пептида	3096,1

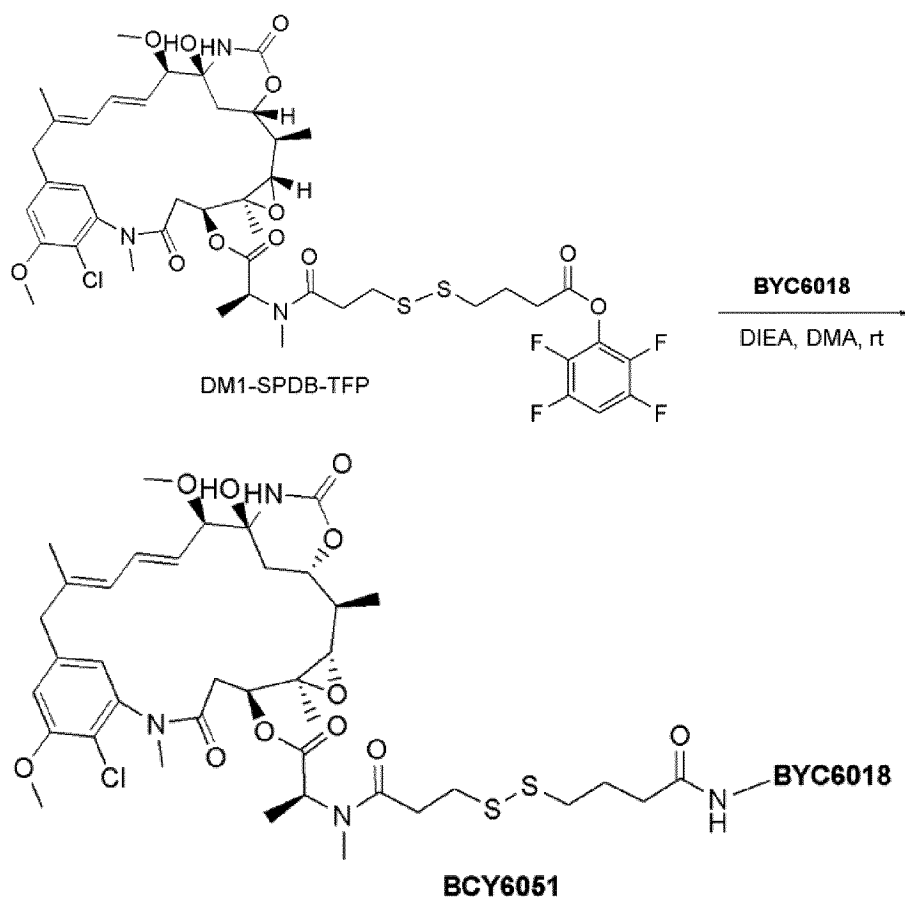
BCY6035



BCY6019 (115,22 мг, 32,86 мкмоль, 1,10 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6035 (37,80 мг, 10,37 мкмоль, выход 34,73%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6035 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	12,28 мин
LCMS (ESI):	m/z 1208,8 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 911,5 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3643,73

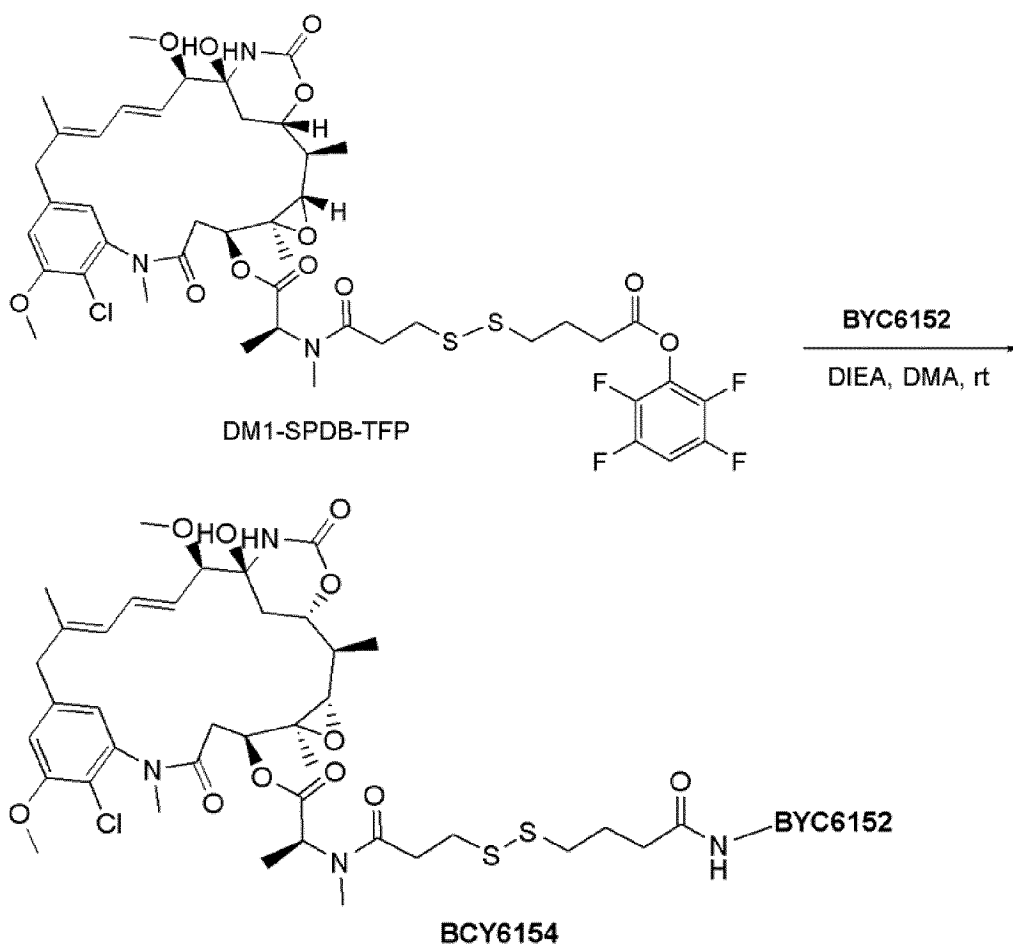
BCY6051



BCY6018 (73,48 мг, 27,38 мкмоль, 1,1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6051 (0,0582 г, 16,52 мкмоль, выход 66,39%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6051 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,37 мин
LCMS (ESI):	m/z 880,5 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3522,57

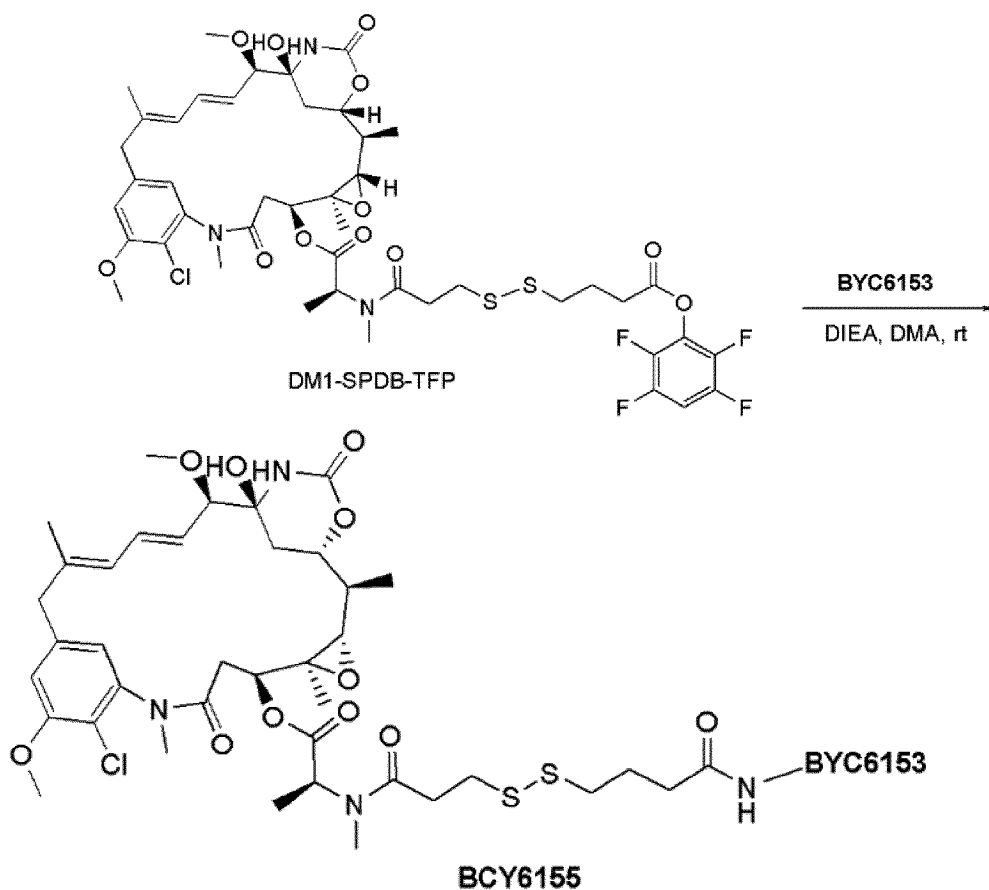
BCY6154



BCY6152 (93,17 мг, 29,87 мкмоль, 1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6154 (40,10 мг, 9,93 мкмоль, выход 33,27%, чистота 98,06%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6154 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,94 мин
LCMS (ESI):	m/z 1313,8 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 985,8 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3958,02

BCY6155

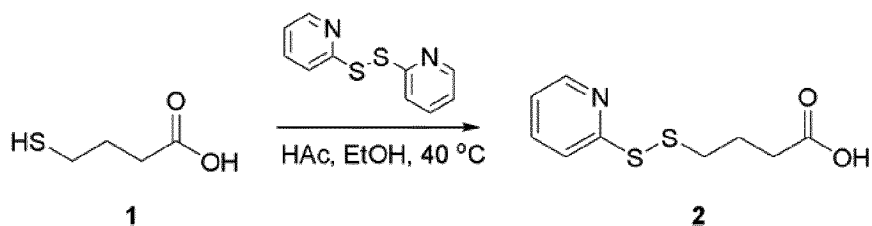


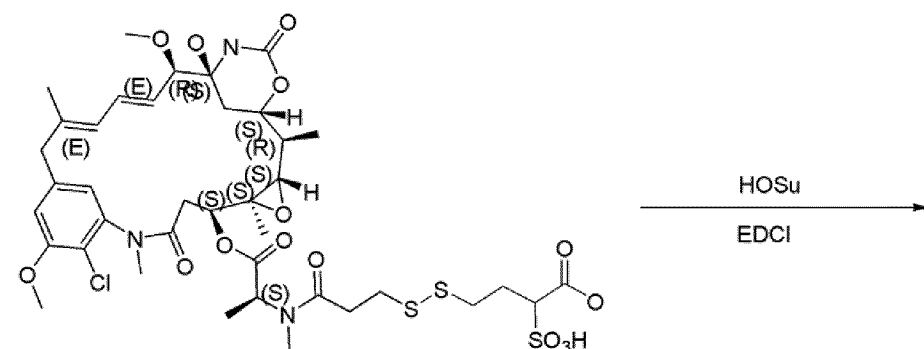
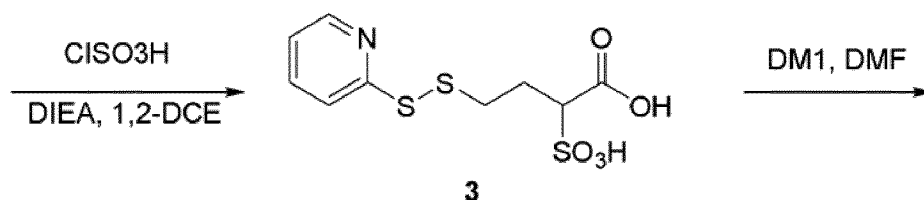
BCY6153 (82,55 мг, 29,87 мкмоль, 1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6155 (0,0312 г, 8,55 мкмоль, выход 28,62%, чистота 98,69%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6155 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	12,93 мин
LCMS (ESI):	m/z 897,1 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3602,63

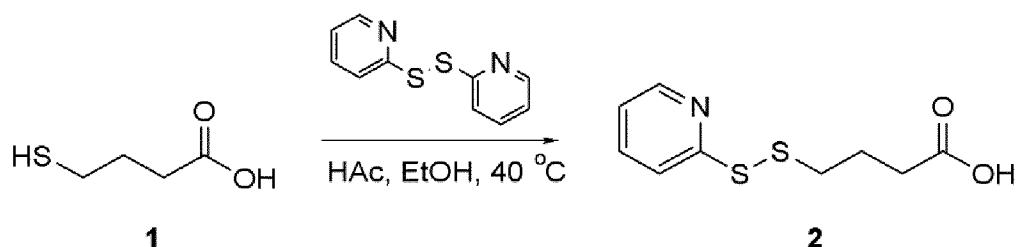
DM1-SS(SO₃H)- серии

DM1-SPDP(SO₃H)-NHS Линкер





Соединение 2



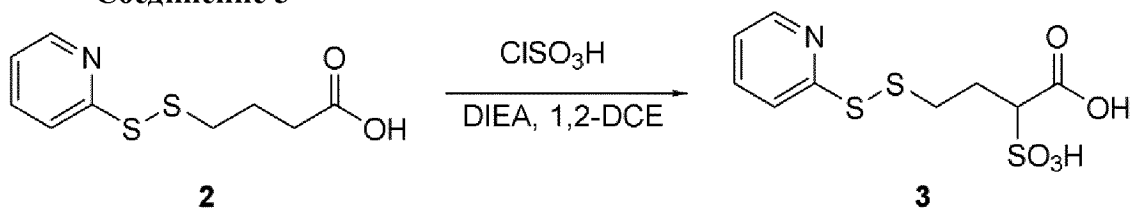
К раствору 4-сульфанилбутановой кислоты (2,0 г, 16,64 ммоль, 1 экв) и 2-(2-пиридилдисульфанил)- пиридина (11,0 г, 49,93 ммоль, 3 экв) в EtOH (50 мл) добавляли AcOH (1,05 г, 17,48 ммоль, 1 экв). Смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что зарегистрирован один главный пик с требуемой массой, а анализ методом TLC указывал, что 4-сульфанилбутановая кислота была полностью израсходована. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение 2 (2,0 г, 8,72 ммоль, выход 52,4%) получали в виде желтого твердого вещества.

¹H ЯМР: 400 МГц CDCl₃

δ ppm 2,03-2,11 (м, 2 H), 2,54 (т, $J=7,20$ Гц, 2 H), 2,88 (т, $J=7,20$ Гц, 2 H), 7,11-7,14 (м, 1 H), 7,67-7,74 (м, 2 H), 8,50 (д, $J=4,80$ Гц, 1 H).

LCMS (ESI):	230 $[M+H]^+$
Молекулярная масса	229,31

Соединение 3



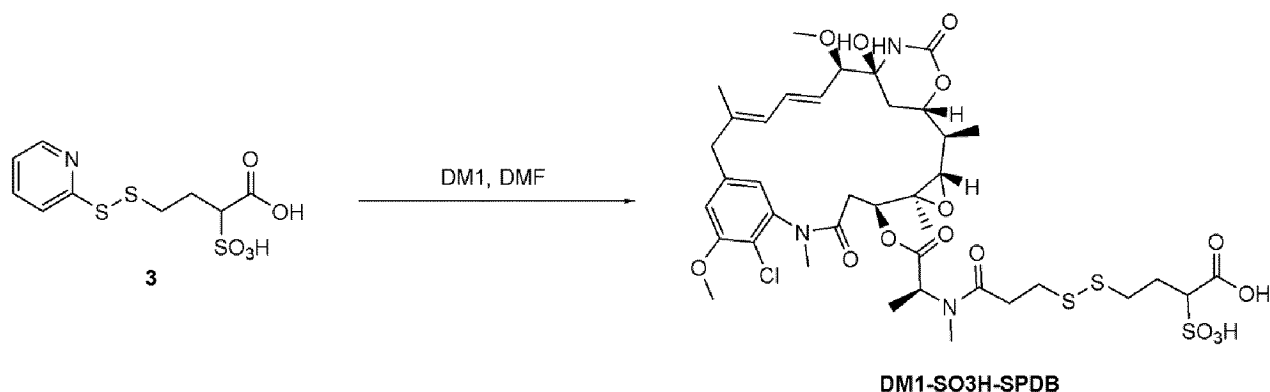
К раствору соединения 2 (0,5 г, 2,18 ммоль, 1 экв) в DCE (5 мл) добавляли тремя порциями хлорсульфоновую кислоту (1,5 г, 13,08 ммоль, 0,89 мл, 6 экв) и двумя порциями DIEA (1,13 г, 8,72 ммоль, 1,52 мл, 4 экв). Смесь перемешивали при 75°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Реакционную смесь гасили путем добавления 3 мл H_2O , и DCE удаляли. Остаток непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральные условия). Соединение 3 (0,68 г, 1,76 ммоль, выход 80,6%, чистота 80%) получали в виде светло-желтого масла.

^1H ЯМР: 400 МГц CDCl_3

δ ppm 2,49-2,54 (м, 2 H), 3,63-3,67 (м, 2 H), 3,90 (т, $J=6,60$ Гц, 2 H), 7,09-7,12 (м, 1 H), 7,66-7,76 (м, 2 H), 8,47 (дд, $J=4,80$ Гц, 0,80 Гц, 1 H), 8,56 (с, 1 H).

LCMS (ESI):	310,0 $[M+H]^+$
Молекулярная масса	309,37

DM1-SO₃H-SPDB

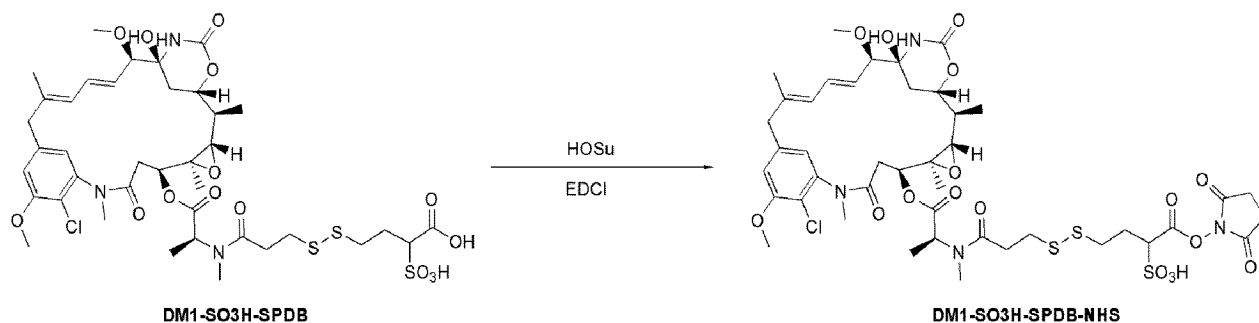


К раствору DM1 (1,0 г, 1,35 ммоль, 1 экв) и соединения 3 (502,9 мг, 1,63 ммоль, 1,2 экв) в DMF (10 мл) добавляли водный раствор NaHCO_3 для доведения величины pH до 8. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Остаток непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной

жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение DM1-SO₃H-SPDB (0,28 г, 299,0 мкмоль, выход 22,1%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	918,2 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	936,50

DM1-SO₃H-SPDB-NHS



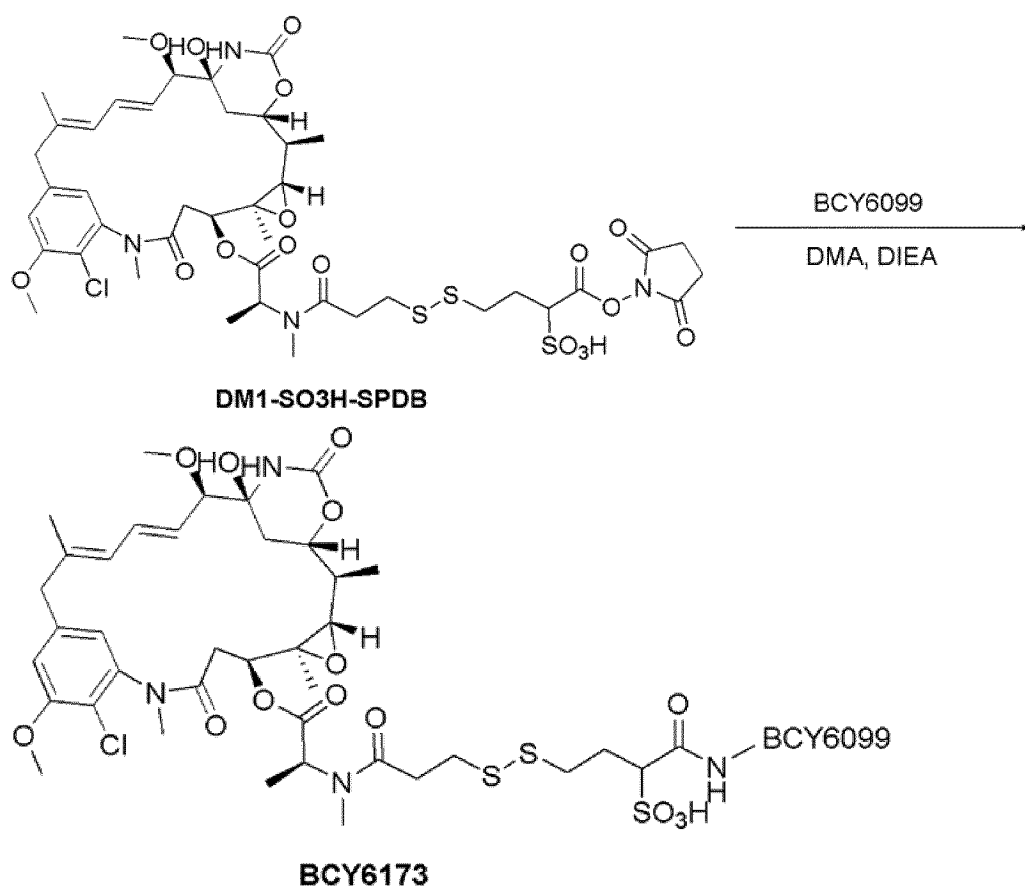
К раствору DM1-SO₃H-SPDB (103,2 мг, 896,95 мкмоль, 3 экв), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (103,2 мг, 896,95 мкмоль, 3 экв) в DMA (6 мл) и DCM (2 мл) добавляли EDCI (171,9 мг, 896,95 мкмоль, 3 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1-SO₃H-SPDB было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. DCM удаляли. Остаток непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение DM1-SO₃H-SPDB-NHS (0,22 г, 212,85 мкмоль, выход 71,2%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	1015,2 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	1033,57

Общая методика связывания DM1-SO₃H-SPDB-NHS с таргетирующими бициклами

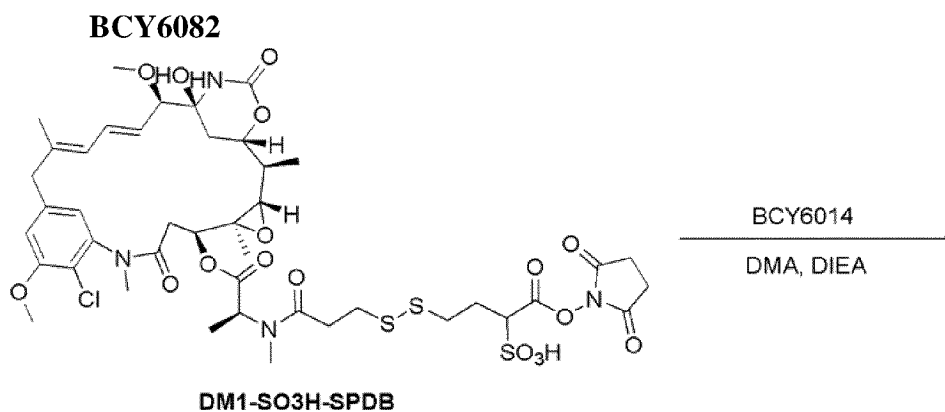
К раствору таргетирующего бицикла (1,1-1,3 экв) в DMA добавляли DIEA (3 экв) и DM1-SO₃H-SPDB-NHS (1 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Ход реакции контролировали методом LC-MS, и после завершения реакции, смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

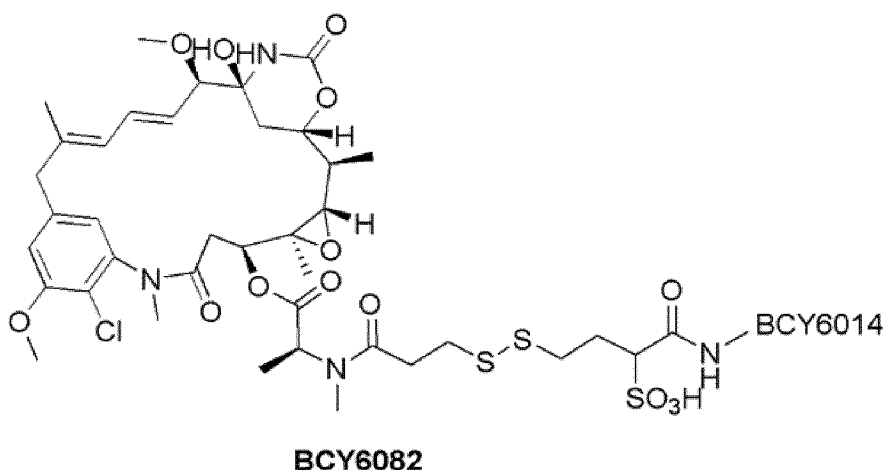
BCY6173



BSY6099 (200,15 мг, 62,89 мкмоль) использовали в качестве бициклического реагента. Получали 57,1 мг соединения BSY6173 (3,40 мкмоль, выход 22,79%, чистота 95,80%) в виде белого твердого вещества.

BSY6173 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	10,30 мин
LCMS (ESI):	m/z 1361,9 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 1021,8 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	4101,15

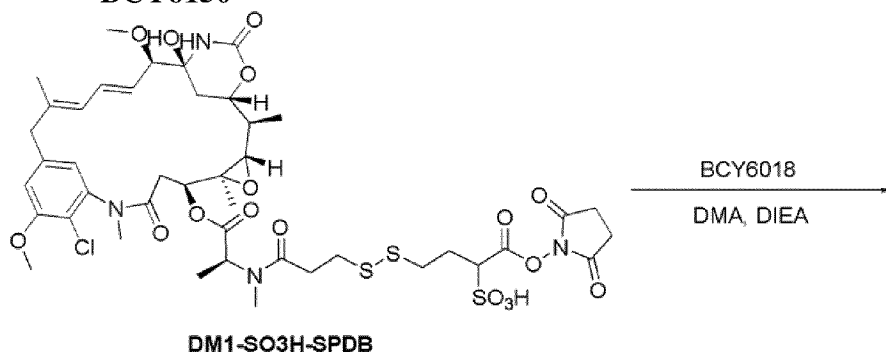




BCY6014 (711,9 мг, 234,14 мкмоль) использовали в качестве бициклического реагента. Получали 308 мг соединения BCY6082 (74,97 мкмоль, выход 35,2%, чистота 96,36%) в виде белого твердого вещества.

BCY6082 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,95 мин
LCMS (ESI):	m/z 1299,3 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 975,0 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3911,04

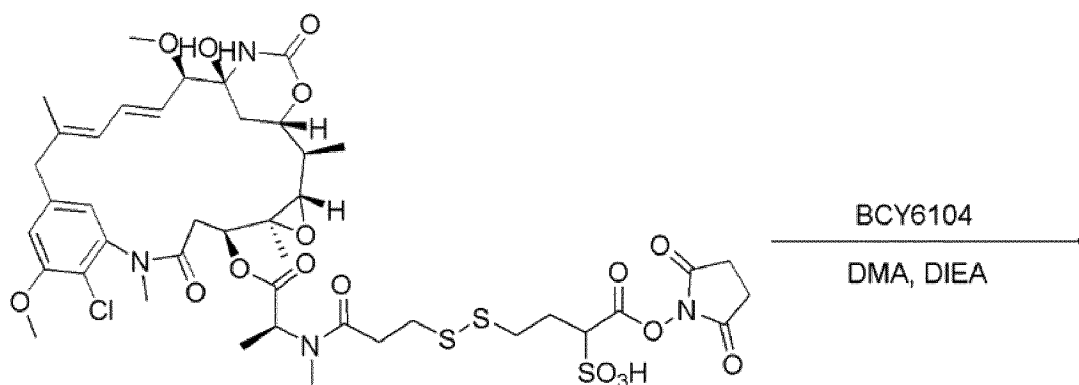
BCY6150



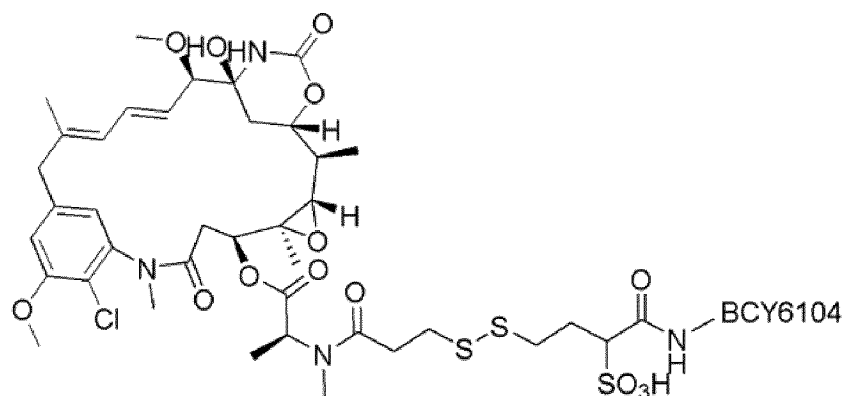
BCY6018 (77,91 мг, 29,03 мкмоль, 1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6150 (0,0249 г, 6,61 мкмоль, выход 22,78%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6150 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	12,31 мин
LCMS (ESI):	m/z 1195,4 [M+3H-H ₂ O] ³⁺
Молекулярная масса пептида	3602,63

BCY6151



DM1-SO3H-SPDB

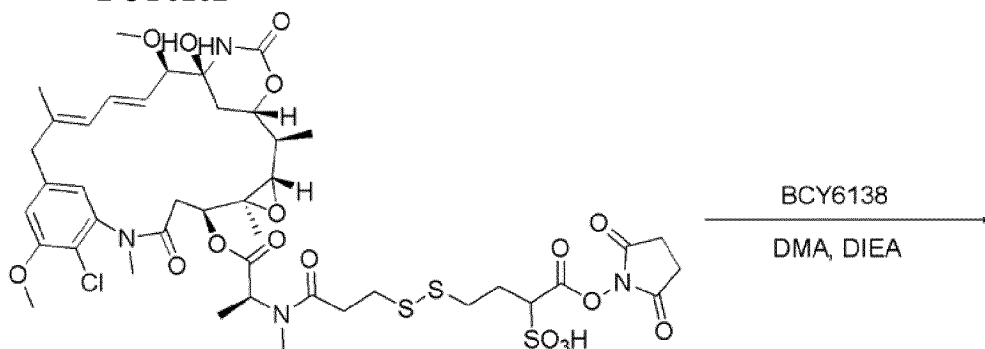
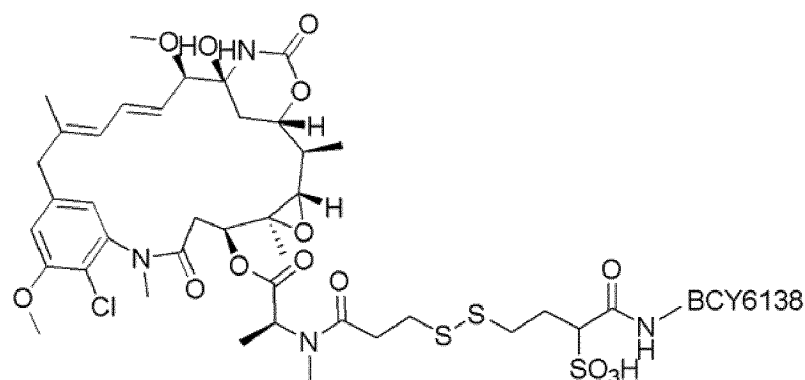


BCY6151

BCY6104 (120,17 мг, 37,73 мкмоль, 1,3 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6151 (0,0256 г, 6,16 мкмоль, выход 21,22%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6151 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	8,68 мин

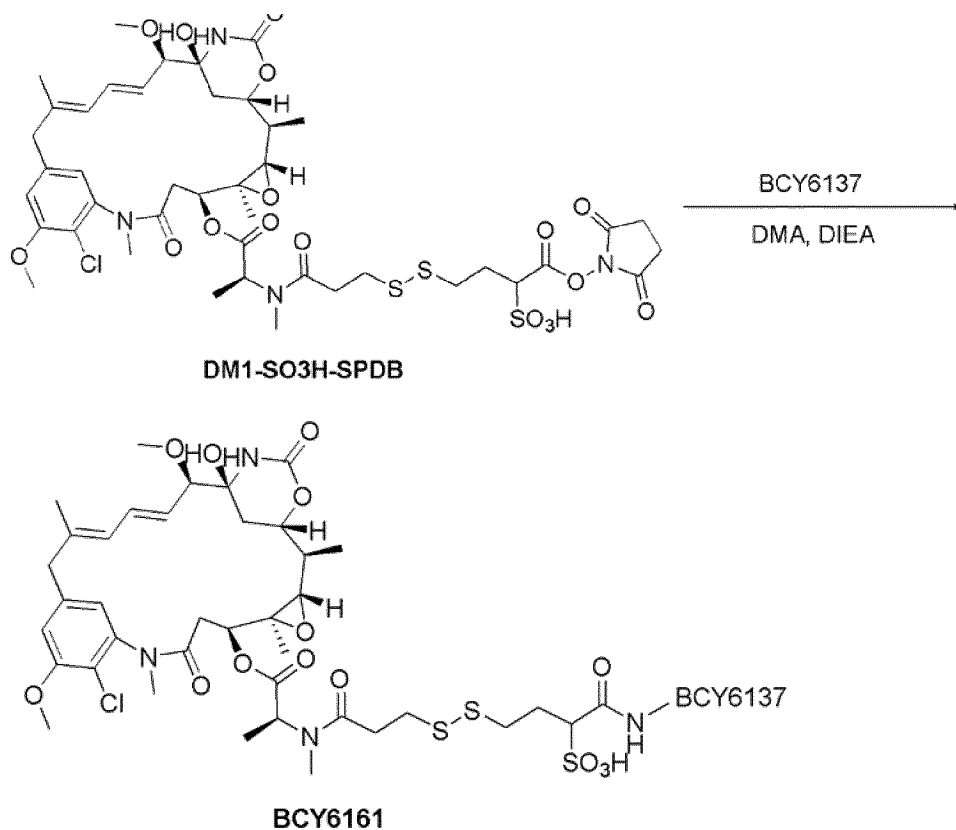
LCMS (ESI):	m/z 1362,3 [M+3H-H ₂ O] ³⁺
Молекулярная масса пептида	4105,16

BCY6162**DM1-SO3H-SPDB****BCY6162**

BCY6138 (82,80 мг, 26,61 мкмоль, 1,1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6162 (0,0362 г, 8,98 мкмоль, выход 37,13%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6162 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	21,09 мин
LCMS (ESI):	m/z 1323,5 [M+3H-H ₂ O-44] ³⁺
Молекулярная масса пептида	4026,74

BCY6161

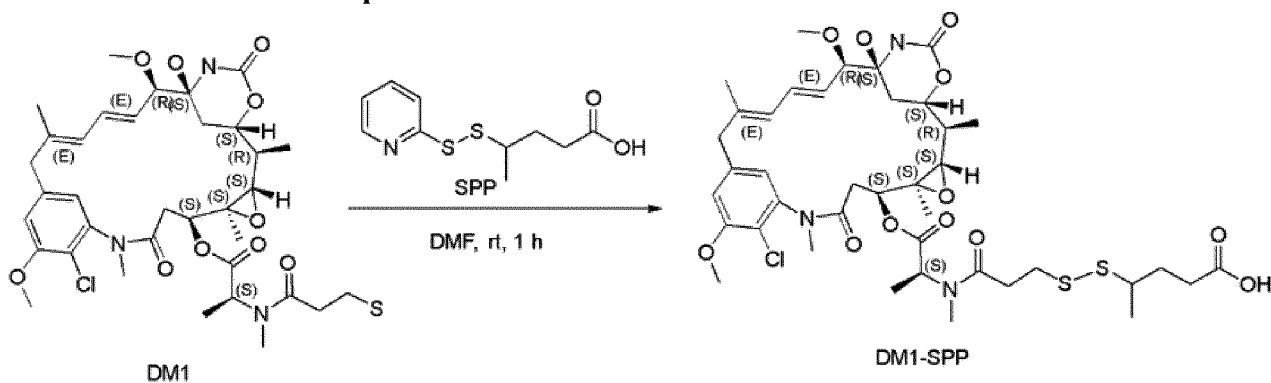


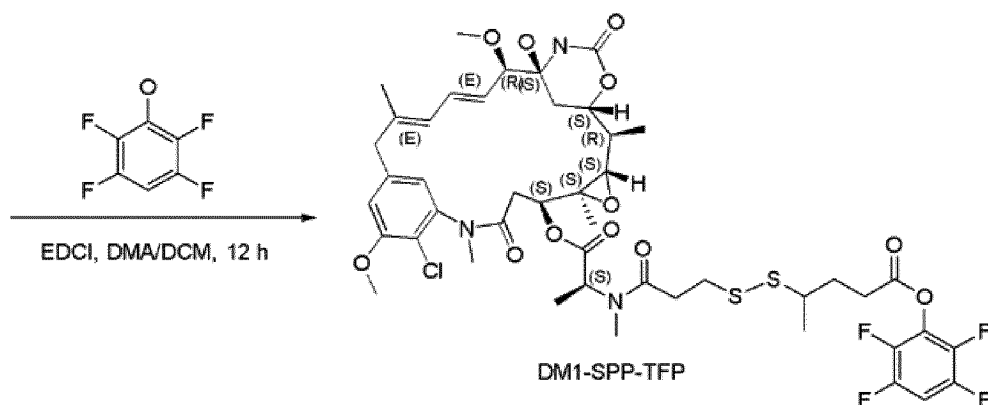
BCY6137 (79,67 мг, 24,48 мкмоль, 1,1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6161 (0,0232 г, 5,26 мкмоль, выход 21,76%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6161 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	10,22 мин
LCMS (ESI):	m/z 1392 [M+3H-H ₂ O] ³⁺
Молекулярная масса пептида	4192,33

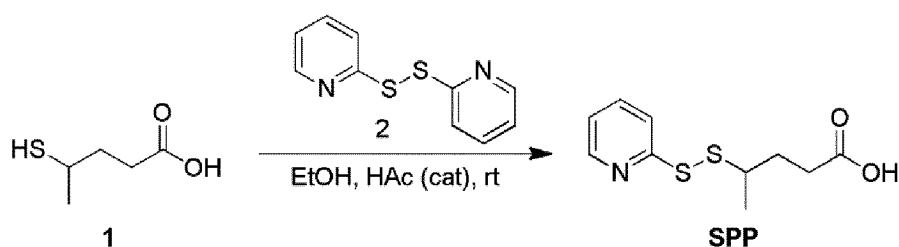
DM1-SS-Ме серии

DM1-SS-Ме Линкер





SPP



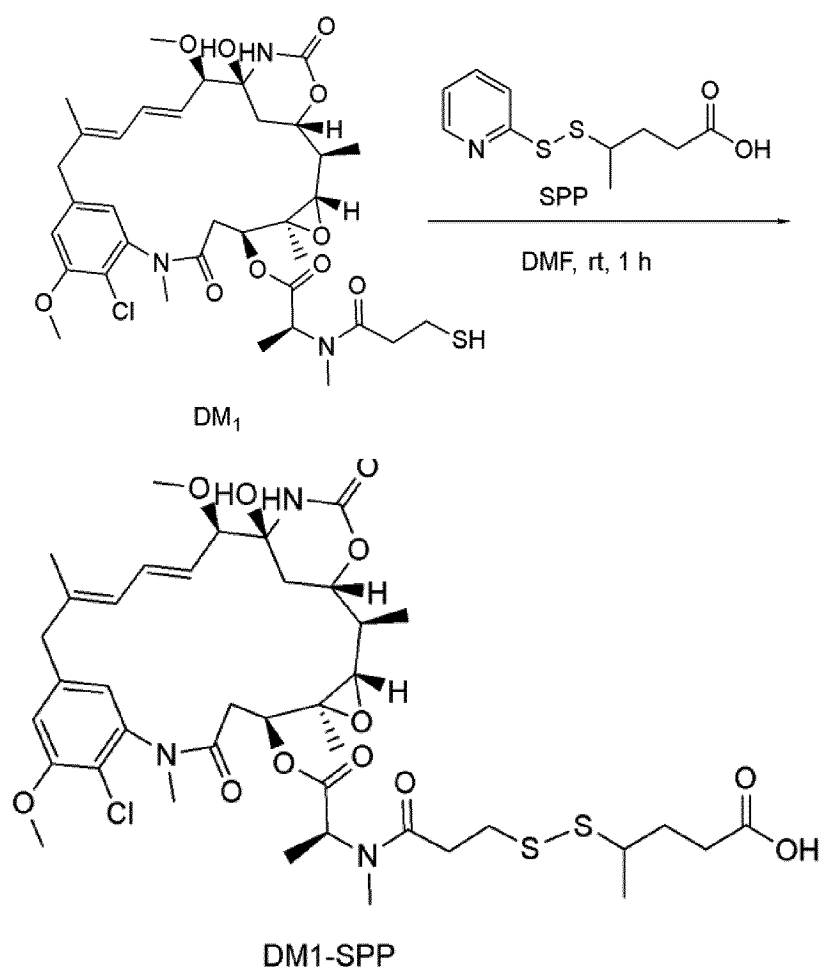
К раствору 2-(2-пиридилдисульфанил)пиридина (2,46 г, 11,18 ммоль, 1,50 экв) и AcOH (1,05 г, 17,49 ммоль, 1,00 мл, 2,35 экв) в EtOH (50,00 мл) добавляли 4-сульфанилпентановую кислоту (1,00 г, 7,45 ммоль, 1,00 экв). Смесь перемешивали при 40°C в течение 18 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение SPP (1,61 г, 6,62 ммоль, 88,81% выход) получали в виде желтого твердого вещества.

¹H ЯМР: 400 МГц DMSO-d₆

δ ppm 1,36 (д, J=6,78 Гц, 3 H), 1,88-2,07 (м, 2 H), 2,56 (тд, J=7,53, 1,76 Гц, 2 H), 3,00-3,09 (м, 1 H), 7,11 (ддд, J=7,34, 4,96, 1,00 Гц, 1 H), 7,66 (тд, J=7,78, 1,76 Гц, 1 H), 7,73-7,77 (м, 1 H), 8,48 (дт, J=4,02, 0,88 Гц, 1 H).

LCMS (ESI):	243,8 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	243,34

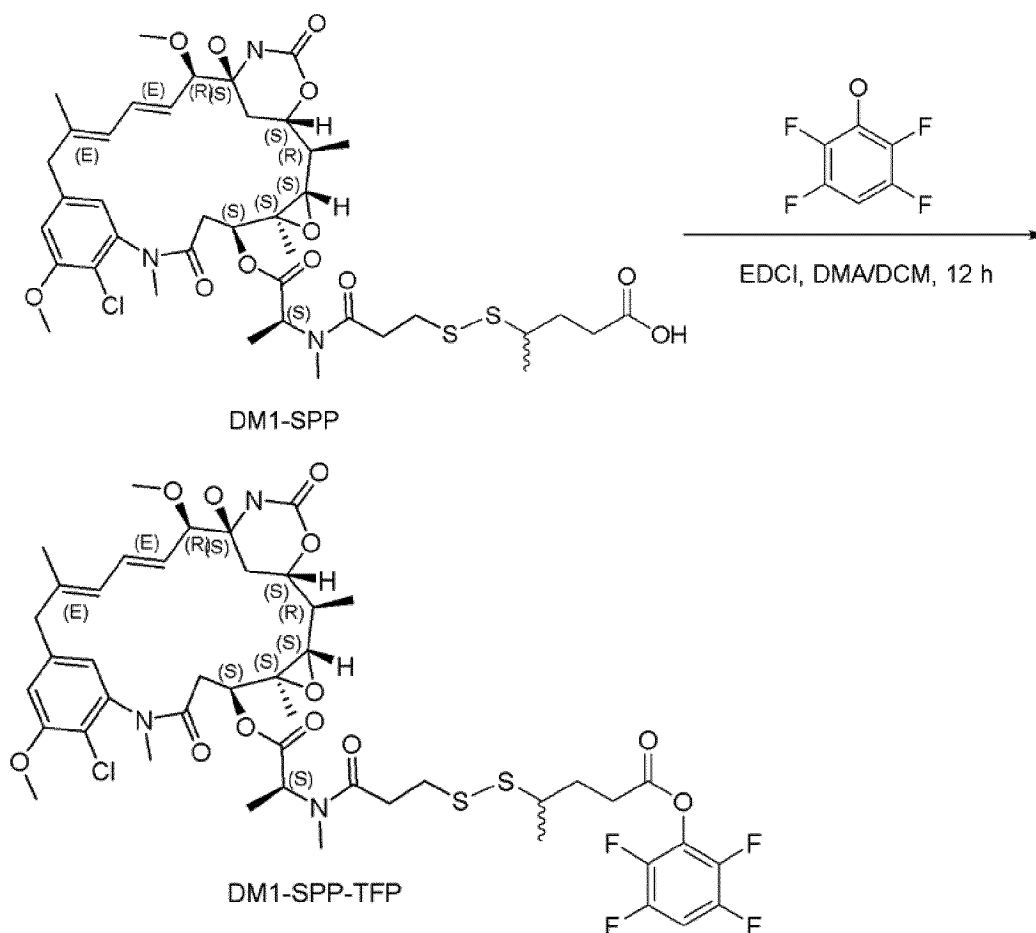
DM1-SPP



Величину рН раствора DM1 (200 мг, 270,90 мкмоль, 1,00 экв), 4-(2-пиридилдисульфанил)пентановой кислоты (98,89 мг, 406,35 мкмоль, 1,50 экв) в H₂O (5,00 мл) довели до 8 с помощью водного раствора NaHCO₃. Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой (главный MS составлял M+1-18). Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение DM1-SPP (120 мг, 137,86 мкмоль, выход 50,89%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	852,0 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	870,47

DM1-SPP-TFP



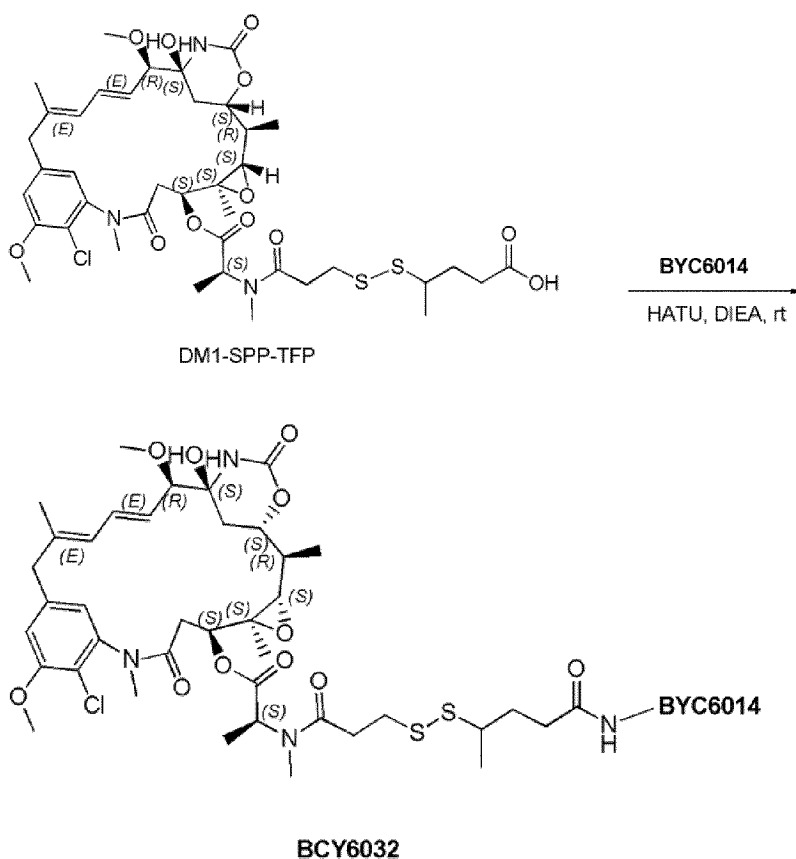
К раствору DM1-SPP (0,175 г, 201,04 мкмоль, 1,0 экв), 2,3,5,6-тетрафторфенола (100,16 мг, 603,13 мкмоль, 3,0 экв) в DCM (1,0 мл) и DMA (3,0 мл) добавляли EDCI (115,62 мг, 603,13 мкмоль, 3,0 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 12 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1-SPP было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. DCM удаляли, и остаток очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение DM1-SPP-TFP (0,123 г, 120,76 мкмоль, 60,07% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	999,9 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	1018,53

Общая методика связывания DM1-SPP-TFP с таргетирующими бициклами

К раствору таргетирующего бицикла (1,1-1,3 экв) в DMA добавляли DIEA (3 экв) и DM1-SPP-TFP (1 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Ход реакции контролировали методом LC-MS, и после завершения реакции, смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

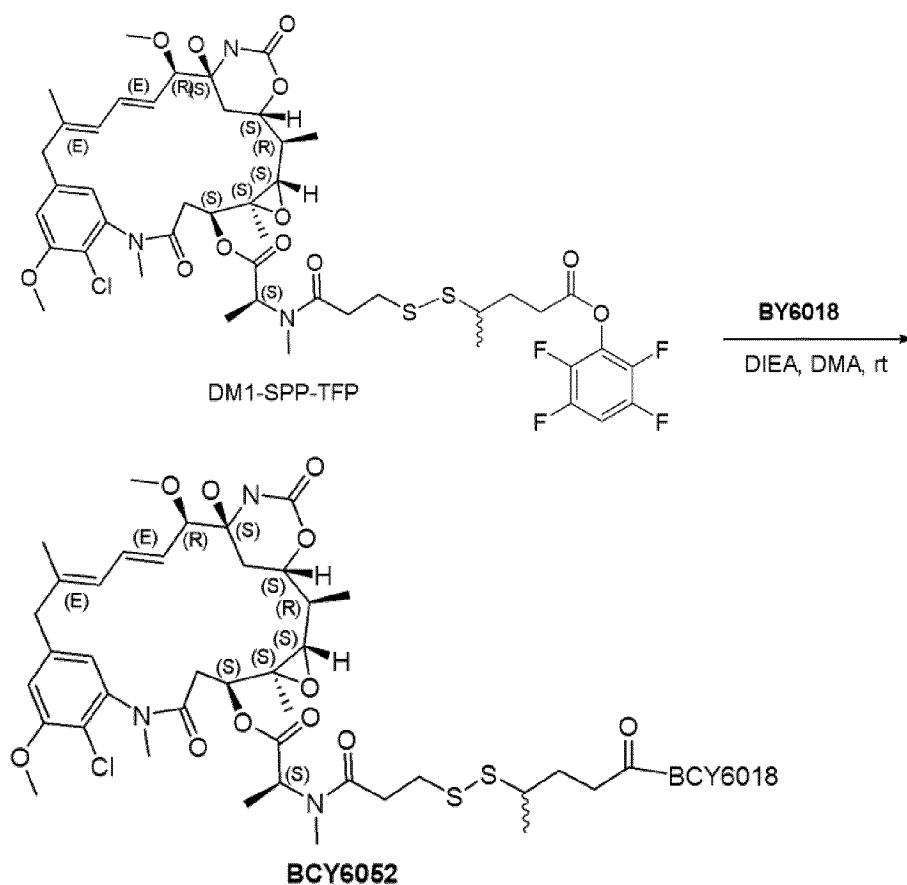
BCY6032



К раствору DM1-SPP (30,00 мг, 34,46 мкмоль, 1,00 экв) в DMF (5,00 мл) добавляли DIEA (13,36 мг, 103,38 мкмоль, 18,05 мкл, 3,00 экв) и HATU (13,10 мг, 34,46 мкмоль, 1,00 экв). Через 1 час добавляли BCY6014 (104,79 мг, 34,46 мкмоль, 1,00 экв), и смесь перемешивали при 15°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что 40% DM1-SPP оставалось непрореагировавшим. Анализ методом LC-MS обнаруживал несколько новых пиков, и было определено присутствие 20% требуемого соединения. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (TFA условие). Соединение BCY6032 (10,00 мг, 2,57 мкмоль, 7,45% выход) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6032 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	25-55% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	13,38 мин
LCMS (ESI):	m/z 1292,1 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 969,0 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3892,94

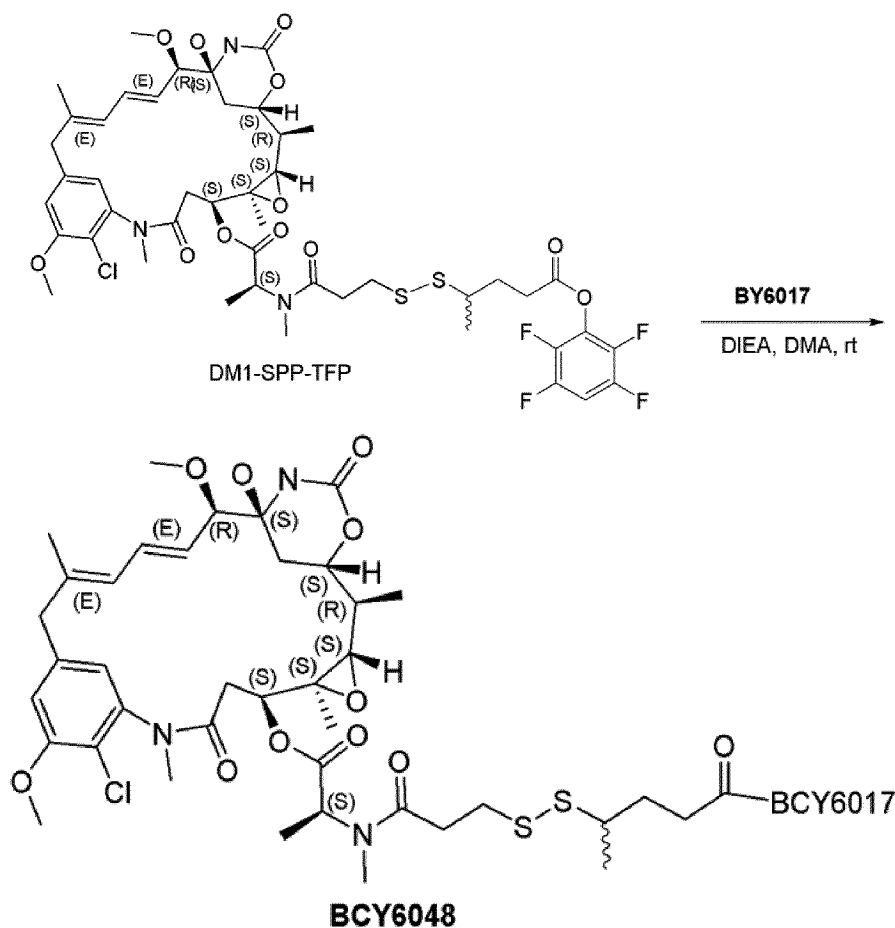
BCY6052



BCY6018 (86,96 мг, 32,40 мкмоль, 1,1 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6052 (32,30 мг, 9,13 мкмоль, выход 31,01%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6052 Данные анализа	
Подвижная фаза:	А: 0,1% муравьиной кислоты в H ₂ O В: ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Eclipse XDB-Фенил 3,5 мкм 100 x 3,0 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% В в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% В
Время удерживания:	6,96 мин
LCMS (ESI):	m/z 1173,4 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 884,6 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3536,58

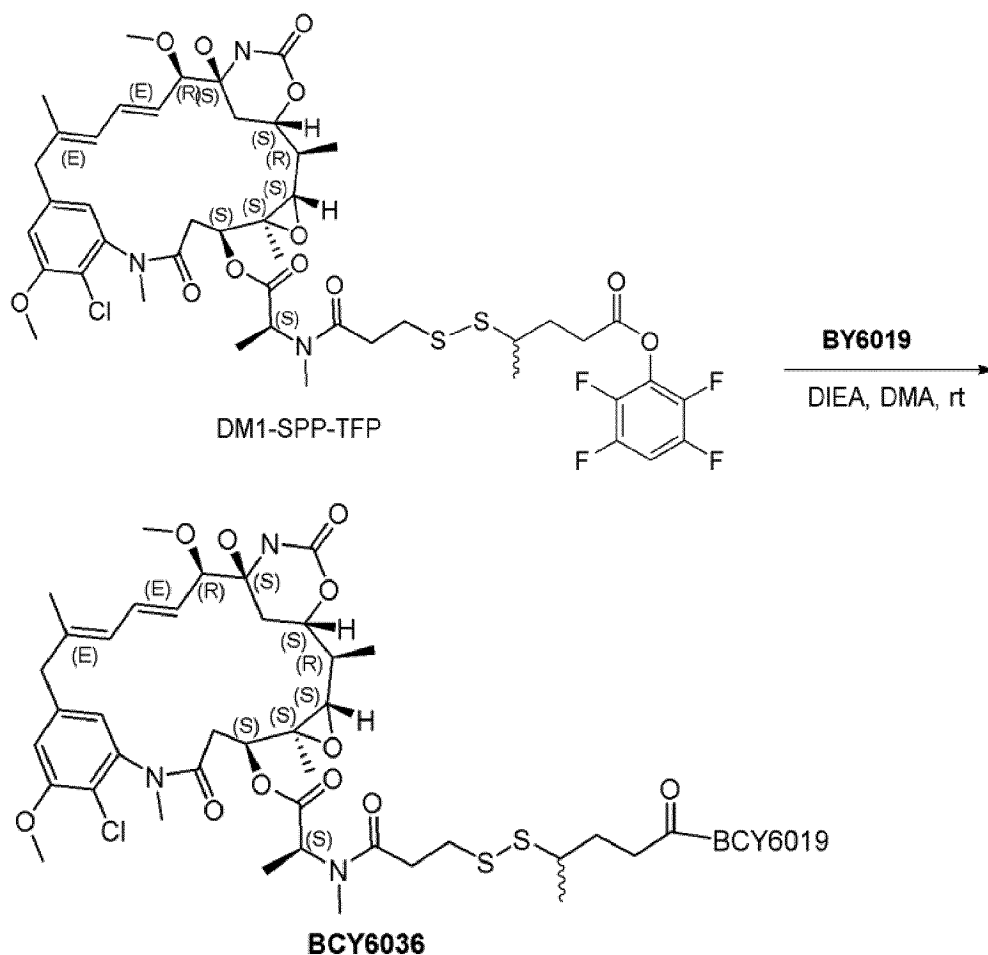
BCY6048



BSY6017 (66,50 мг, 29,45 мкмоль, 1,2 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BSY6048 (40,80 мг, 13,12 мкмоль, выход 53,45%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY6048 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% муравьиной кислоты в H ₂ O B: ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Eclipse XDB-Фенил 3,5 мкм 100 x 3,0 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	7,56 мин
LCMS (ESI):	m/z 1031,0 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 884,6 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3110,13

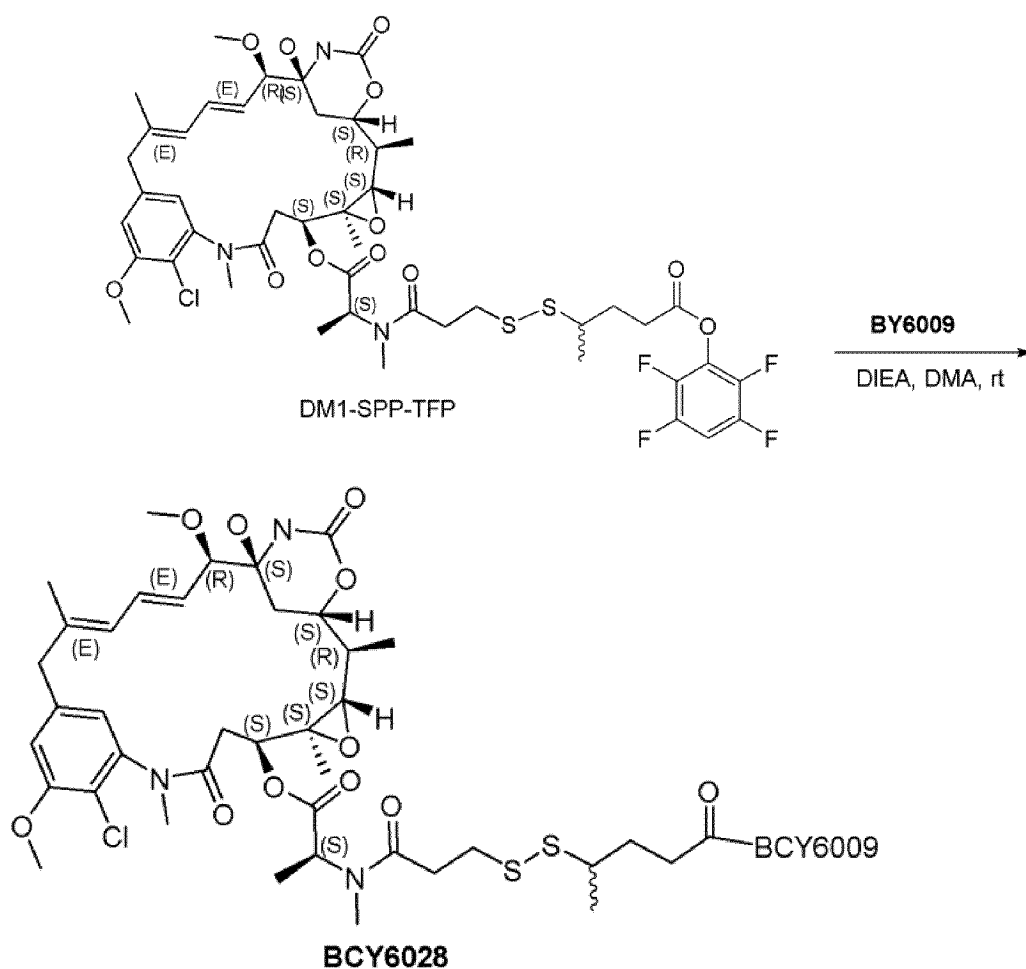
BSY6036



BSY6019 (113,60 мг, 32,40 мкмоль, 1,10 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BSY6036 (53,20 мг, 14,00 мкмоль, выход 47,54%, чистота 96,26%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY6036 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	8,19 мин
LCMS (ESI):	m/z 1213,6 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 914,7 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3657,76

BSY6028

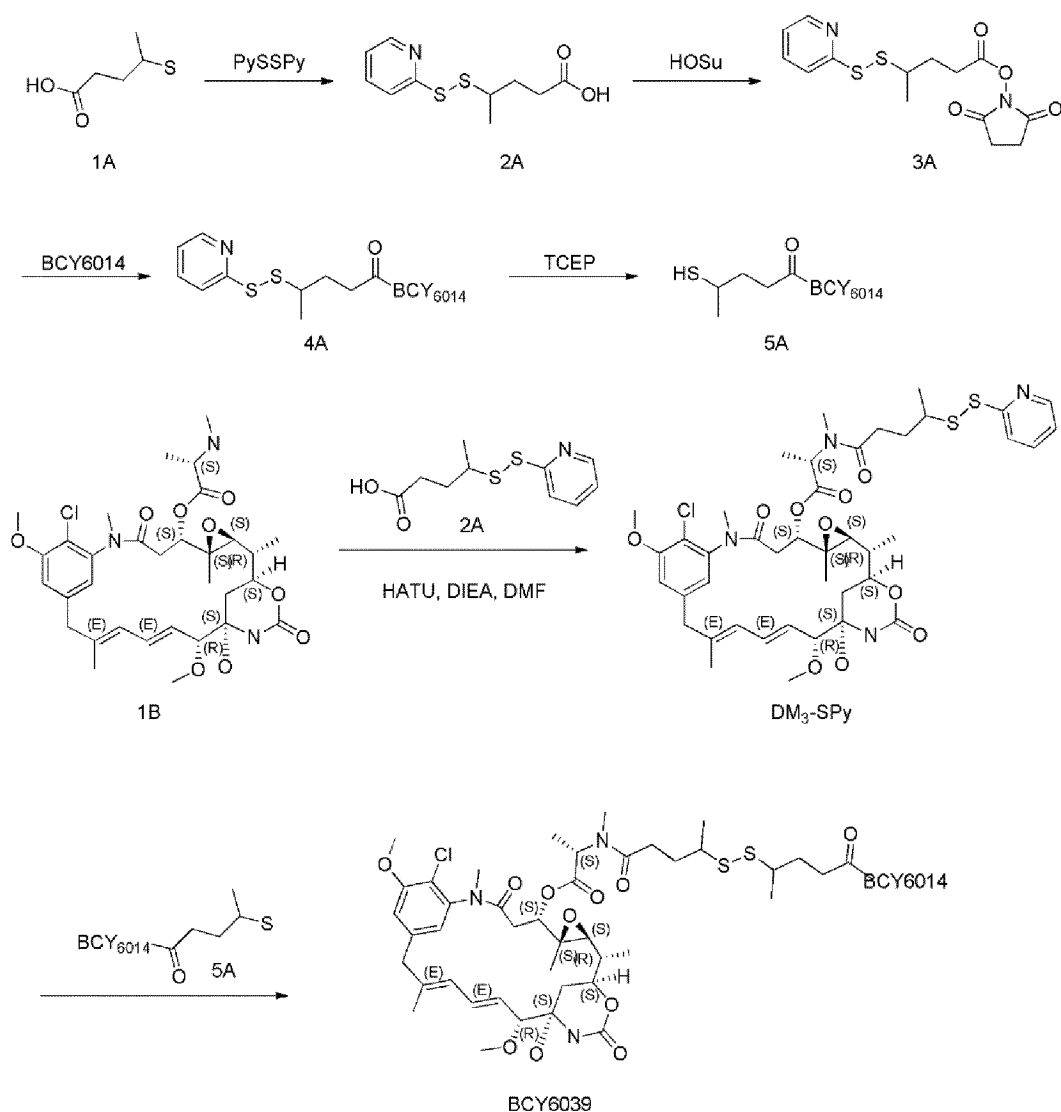


BCY6009 (99,00 мг, 29,45 мкмоль, 1,00 экв) использовали в качестве бициклического реагента. BCY6028 (24,30 мг, 6,05 мкмоль, выход 20,56%, чистота 96,61%) получали в виде белого твердого вещества.

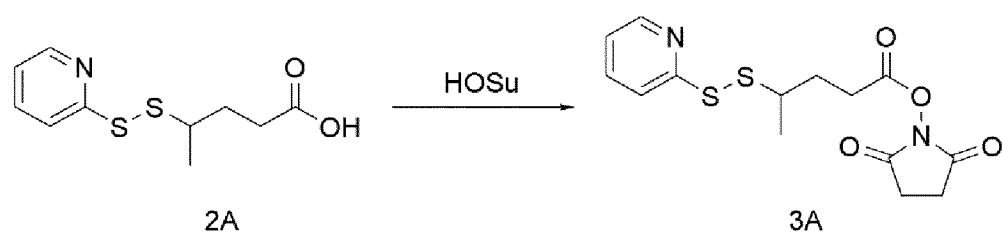
BCY6028 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	35-65% B в течение 20 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	6,43 мин
LCMS (ESI):	m/z 965,6 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3877,96

Дисульфидные линкеры (различные стерические затруднения)

BCY6039 (DM1-Me-SS-Me-Бицикл)



Соединение 2A

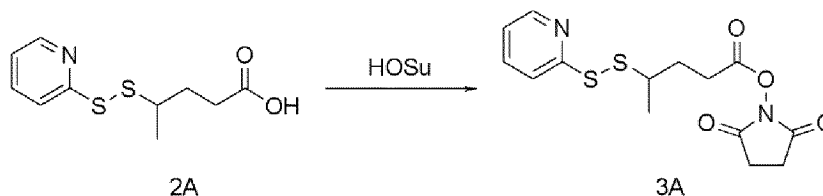


К раствору 2-(2-пиридилдисульфанил)пиридина (2,46 г, 11,18 ммоль, 1,50 экв) и AcOH (1,05 г, 17,49 ммоль, 1,00 мл, 2,35 экв) в EtOH (50,00 мл) добавляли 4-сульфанилпентановую кислоту (1A) (1,00 г, 7,45 ммоль, 1,00 экв). Смесь перемешивали при 40°C в течение 18 часов в атмосфере N₂. Анализ методом LC-MS показывал, что 1A было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной массы. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной

хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение 2A (1,61 г, 6,62 ммоль, 88,81% выход) получали в виде светло-желтого твердого вещества.

LCMS (ESI):	243,9 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	243,34

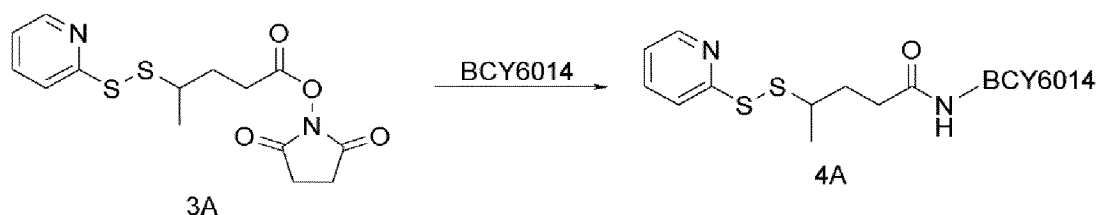
Соединение 3A



К раствору 2A (0,01 г, 41,09 мкмоль, 1,00 экв), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (14,19 мг, 123,28 мкмоль, 3,00 экв) в DMA (1 мл) добавляли EDCI (23,63 мг, 123,28 мкмоль, 3,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что 2A было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Остаток очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение 3A (0,011 г, 32,31 мкмоль, 78,63% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	340,8 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	340,41

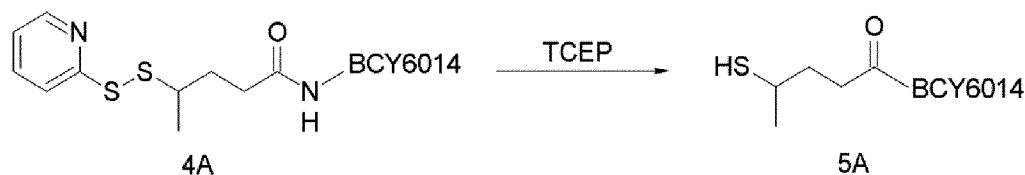
Соединение 4A



К раствору BCY6014 (98,25 мг, 32,31 мкмоль, 1,00 экв) в DMA (3 мл) добавляли DIEA (8,26 мг, 64,62 мкмоль, 11,26 мкл, 2,00 экв) и соединение 3A (0,011 г, 32,31 мкмоль, 1,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3A было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение 4A (0,04 г, 12,25 мкмоль, выход 37,90%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	1088,7 [M+3H] ³⁺ , 816,5 [M+4H] ⁴⁺
Молекулярная масса	3264,88

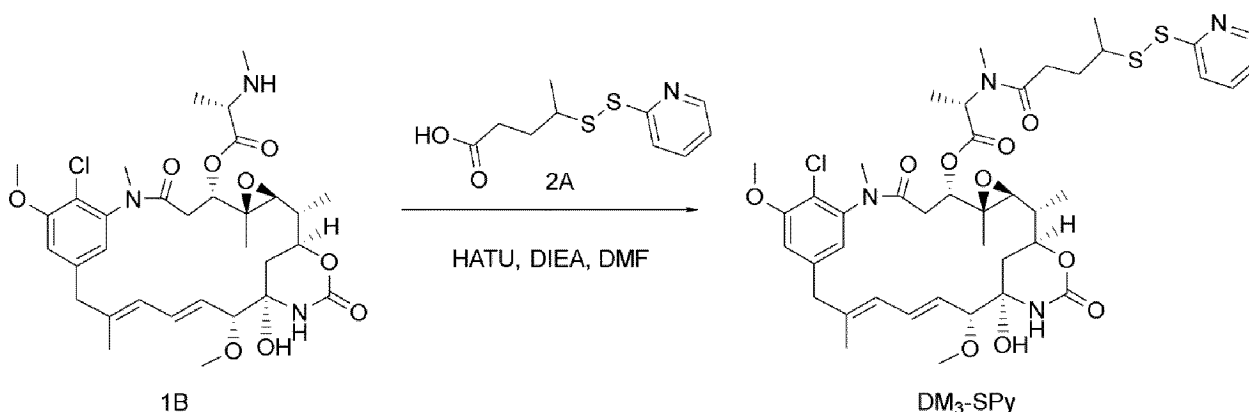
Соединение 5A



К раствору 4A (0,04 г, 12,25 мкмоль, 1,00 экв) в MeCN (4 мл) и H₂O (2 мл) добавляли ТСЕР (4,21 мг, 14,70 мкмоль, 4,05 мкл, 1,20 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 4A было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Остаток очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение 5A (0,035 г, 11,09 мкмоль, выход 90,53%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	1052,2 [M+3H] ³⁺
Молекулярная масса	3155,73

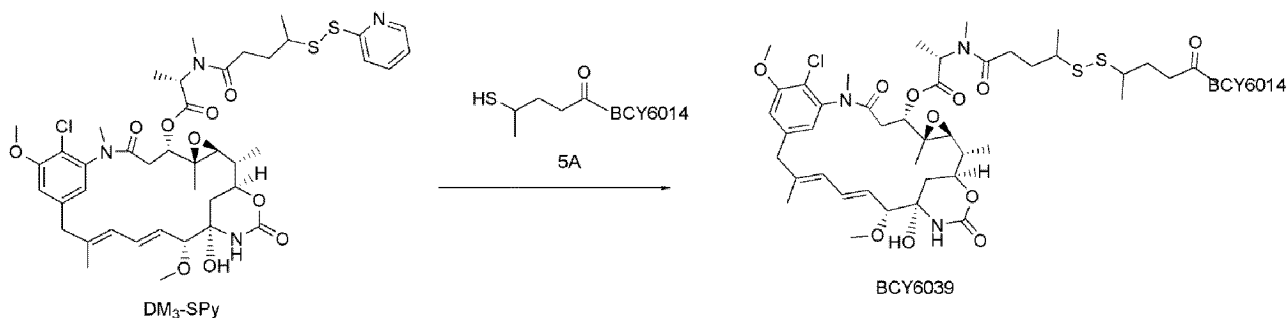
DM3-SPy



К раствору 4-(2-пиридилдисульфанил)пентановой кислоты (2A) (22,46 мг, 92,29 мкмоль, 1,20 экв), HATU (35,09 мг, 92,29 мкмоль, 1,20 экв), DIEA (29,82 мг, 230,71 мкмоль, 40,19 мкл, 3,00 экв) в DMF (5 мл) добавляли соединение 1B (0,05 г, 76,90 мкмоль, 1,00 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1B было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Остаток очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение DM3-SPy (0,025 г, 28,56 мкмоль, 37,13% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	875,1 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	875,49

BCY6039

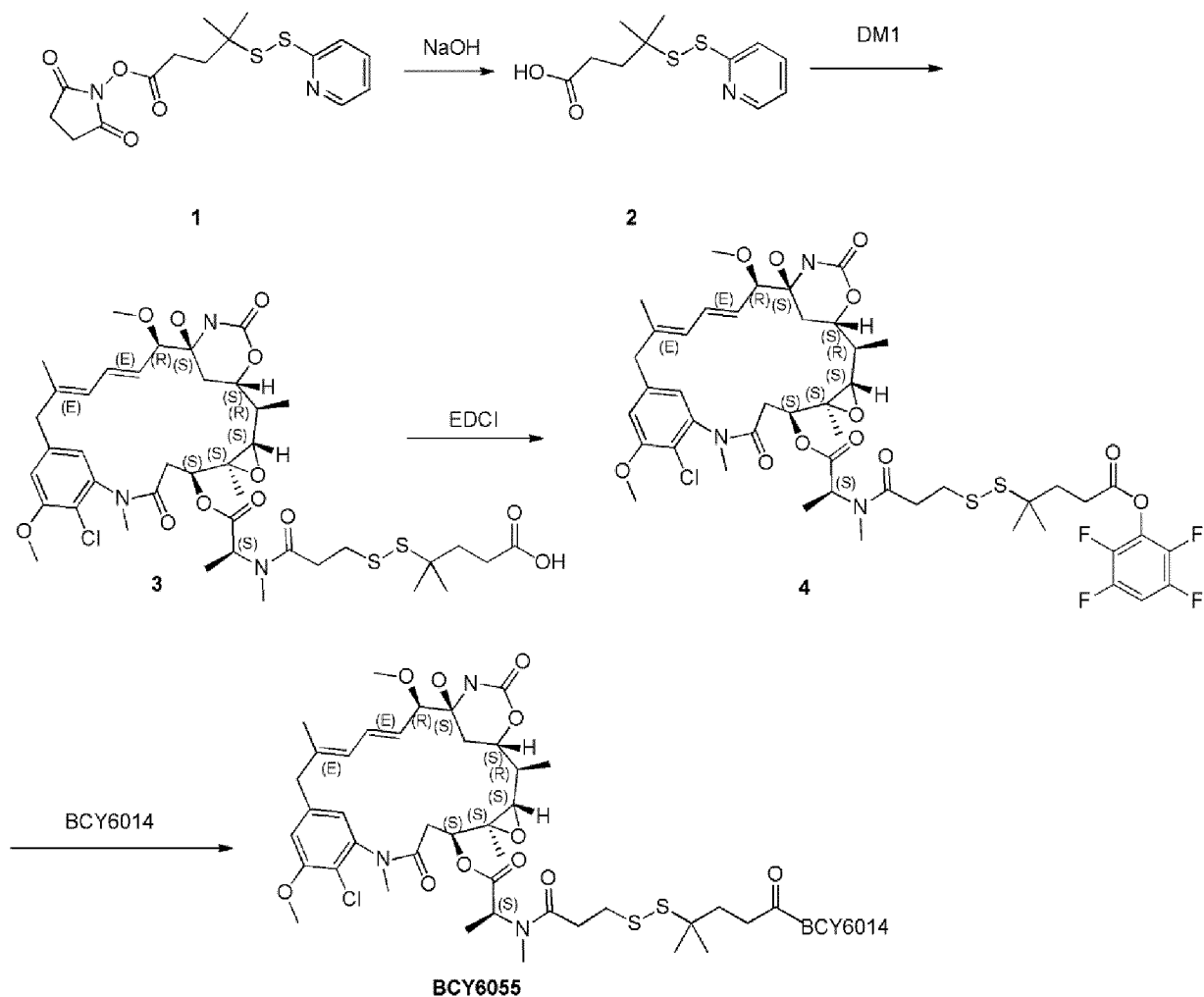


Величину pH раствора DM3-SPy (0,015 г, 17,13 мкмоль, 1,00 экв) и соединения 5A (54,08 мг, 17,13 мкмоль, 1,00 экв) в DMF (3 мл) доводили до 8 с помощью водного раствора

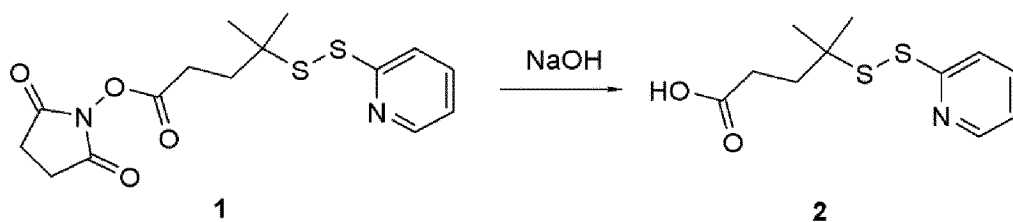
NaHCO₃. Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что DM3-SPy было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (TFA условие). Соединение BCY6039 (0,0263 г, 6,58 мкмоль, выход 38,39%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6039 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE (1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	13,01 мин
LCMS (ESI):	m/z 976,1 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3921,01

BCY6055 (DM1-SS-Me₂-Бицикл)



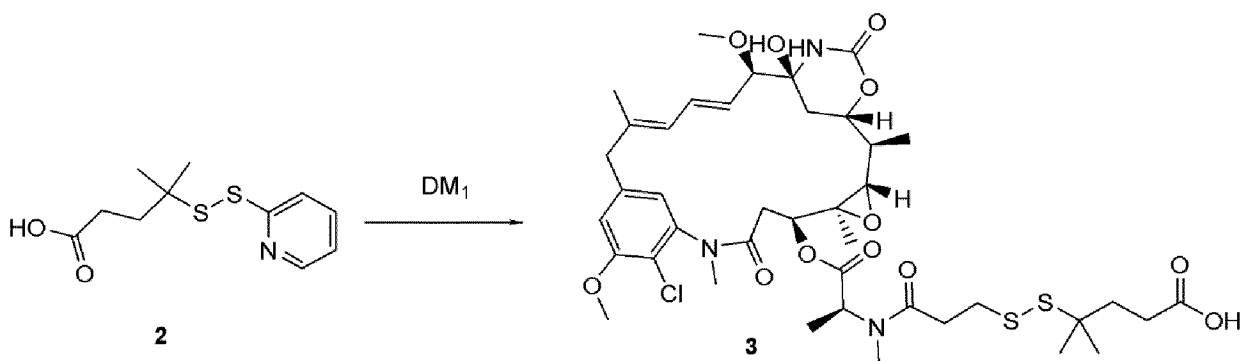
Соединение 2



Величину pH раствора соединения 1 (0,045 г, 126,96 мкмоль, 1 экв) в H₂O (1 мл) довели до 13 с помощью 1 N раствора NaOH. Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Остаток очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение 2 (0,03 г, 116,56 мкмоль, 91,81% выход) получали в виде желтого твердого вещества.

LCMS (ESI):	257,9 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	257,37

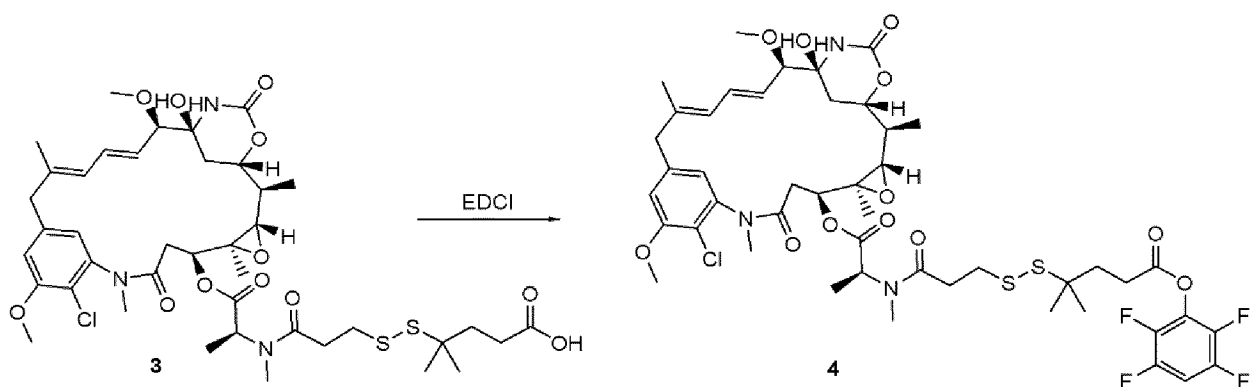
Соединение 3



Раствор соединения 2 (0,03, 116,56 мкмоль, 1,0 экв) и DM1 (111,87 мг, 151,53 мкмоль, 1,3 экв) в DMF (5 мл) перемешивали при 15°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (NH₄HCO₃ условие). Соединение 3 (0,05 г, 56,53 мкмоль, 48,50% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	866,0 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	884,49

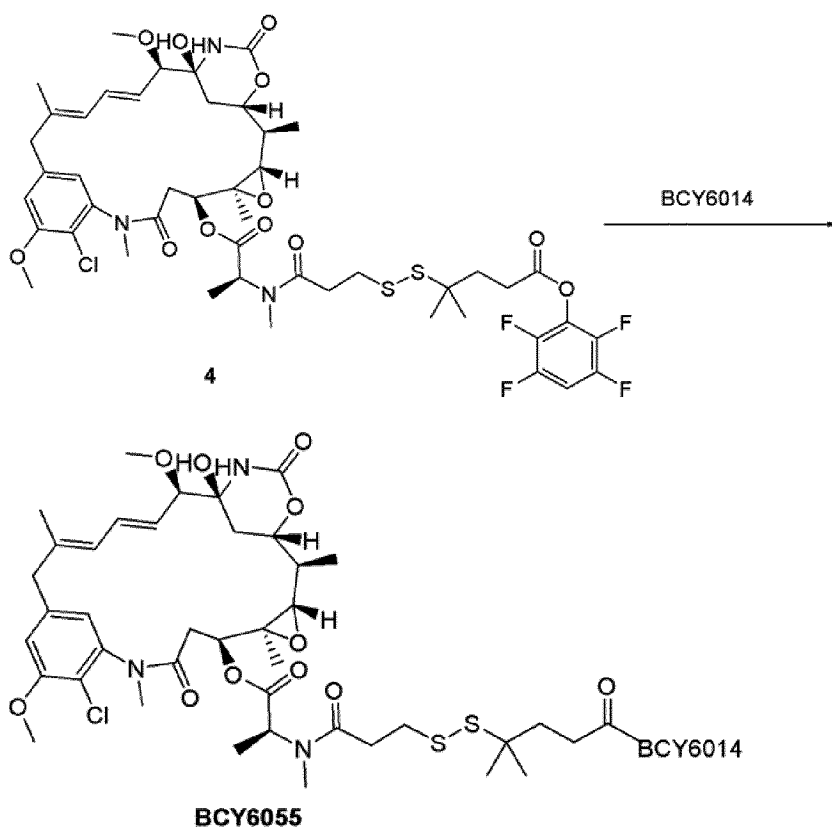
Соединение 4



К раствору соединения 3 (0,05 г, 56,53 мкмоль, 1,0 экв) и 2,3,5,6-тетрафторфенола (28,16 мг, 169,59 мкмоль, 3,0 экв) в DMA (3 мл) и DCM (1 мл) добавляли EDCI (32,51 мг, 169,59 мкмоль, 3 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. DCM удаляли, и смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение 4 (0,03 г, 29,05 мкмоль, выход 51,40%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	1014,0 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	1032,55

BCY6055

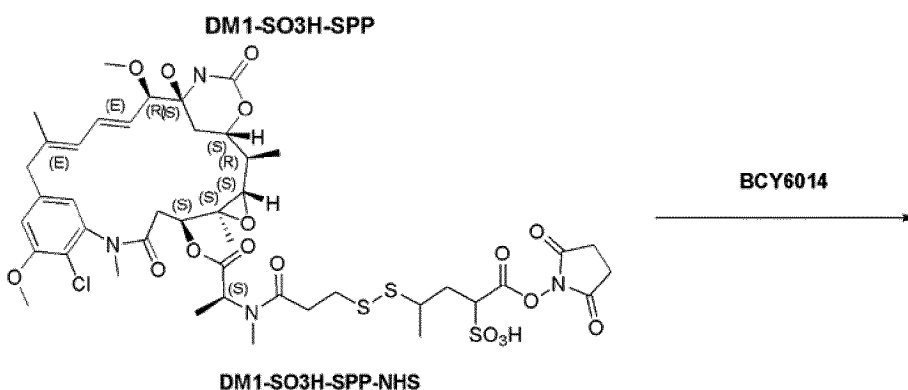
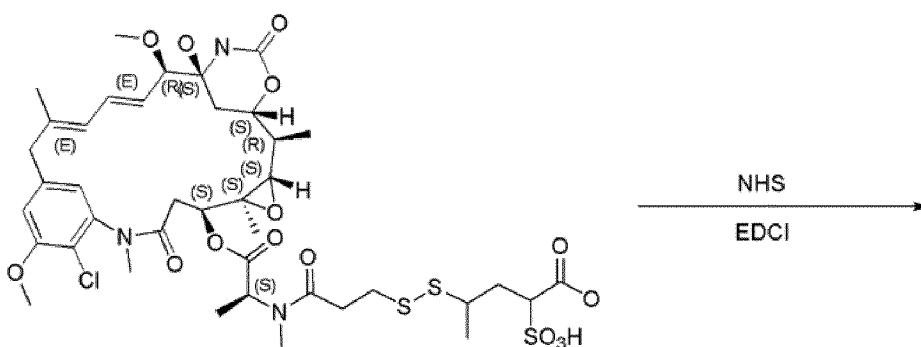
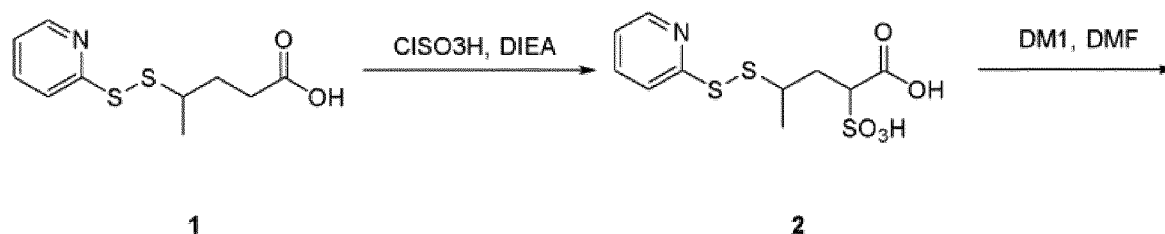


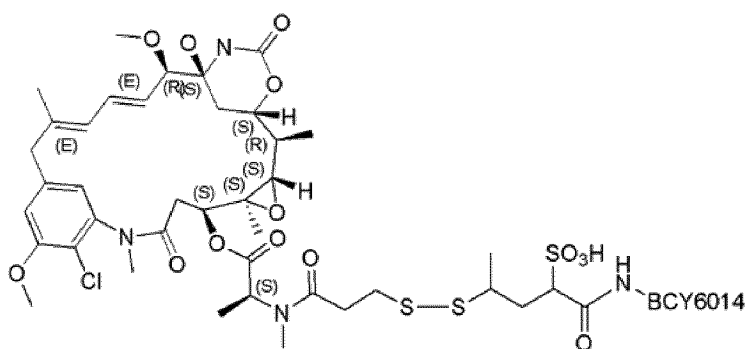
К раствору BCY6014 (106,01 мг, 34,87 мкмоль, 1,2 экв) в DMA (3 мл) добавляли DIEA (11,27 мг, 87,16 мкмоль, 15,18 мкл, 3,0 экв) и соединение 4 (0,03 г, 29,05 мкмоль, 1,0 экв).

Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 4 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (TFA условие). Соединение BCY6055 (0,0352 г, 9,01 мкмоль, выход 31,01%) получали в виде белого твердого вещества.

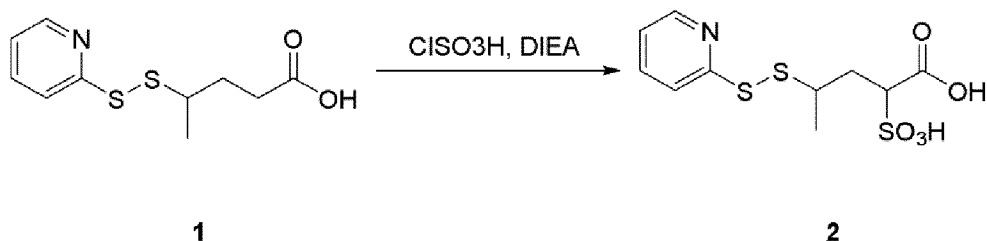
BCY6055 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE (1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	12,68 мин
LCMS (ESI):	m/z 1296,1 [M+3H-H ₂ O] ³⁺ , 972,4 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3906,98

BCY6077 (DM1-SS-Me-(SO₃H)-Бицикл)





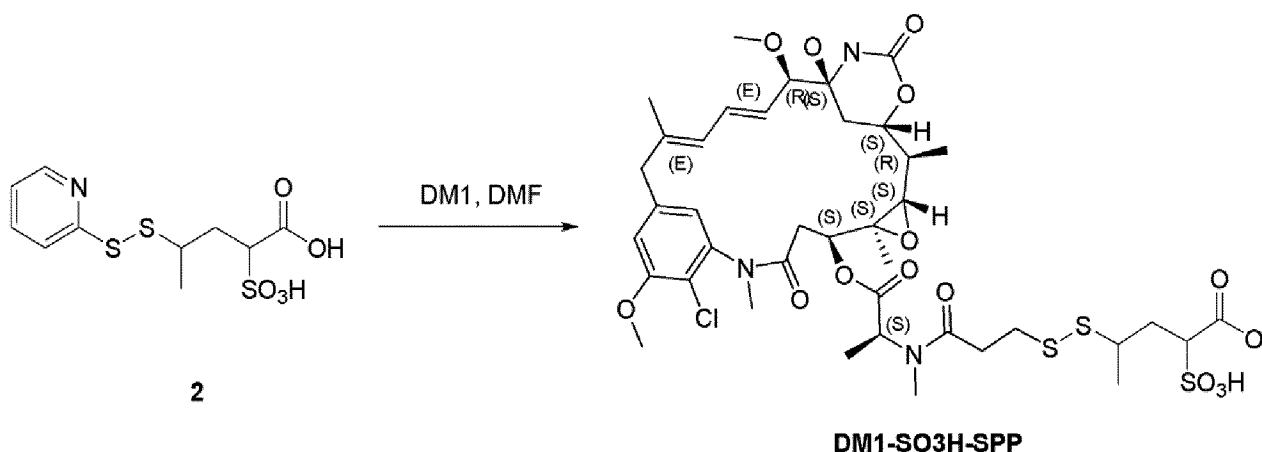
Общая методика получения соединения 2



К раствору соединения 1 (0,1 г, 410,94 мкмоль, 1 экв) в 1,2-дихлорэтане (3 мл) добавляли тремя порциями хлорсульфоновую кислоту (0,86 г, 7,38 ммоль, 491,43 мкл, 17,96 экв) и добавляли двумя порциями DIEA (318,67 мг, 2,47 ммоль, 429,47 мкл, 6 экв). Смесь перемешивали при 75°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS 324, один главный пик побочного продукта MS 221 относился к PySSPy. Растворитель удаляли, и остаток растворяли в H₂O/MeCN=15/1. Непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие: MeCN/H₂O). Соединение 2 (0,055 г, 170,06 мкмоль, выход 41,38%) получали в виде желтого масла.

LCMS (ESI):	323,6 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	323,4

Общая методика получения DM1-SO₃H-SPP

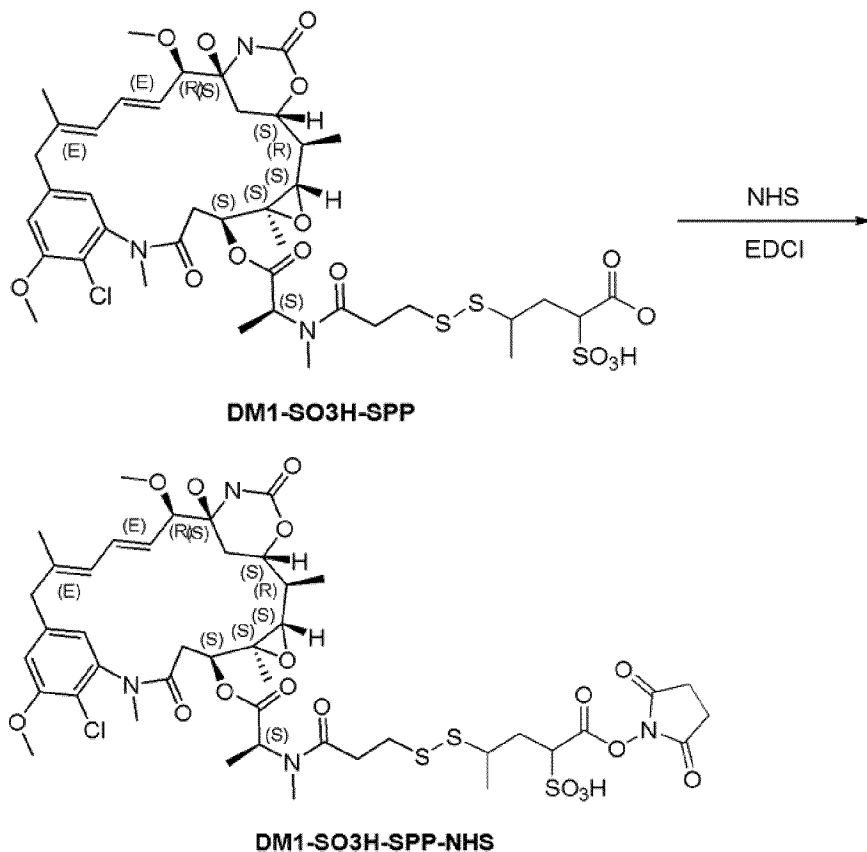


Величину pH раствора DM1 (113,00 мг, 153,06 мкмоль, 1,1 экв), соединения 2 (0,045 г, 139,14 мкмоль, 1 экв) в DMF (2 мл) довели до 8 с помощью водного раствора NaHCO₃. Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что

DM1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение DM1-SO₃H-SPP (0,075 г, 78,90 мкмоль, выход 56,71%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	931,9 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	950,52

Общая методика получения DM1-SO₃H-SPP-NHS



К раствору DM1-SO₃H-SPP (0,06 г, 63,12 мкмоль, 1 экв), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (7,99 мг, 69,43 мкмоль, 1,1 экв) в DMA (1,5 мл) и DCM (0,5 мл) добавляли EDCI (13,31 мг, 69,43 мкмоль, 1,1 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1-SO₃H-SPP было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие: MeCN/H₂O). Соединение DM1-SO₃H-SPP-NHS (0,045 г, 42,96 мкмоль, 68,05% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	984 [M-NHS+K] ⁺
Молекулярная масса	1047,6

Общая методика получения BCY6077

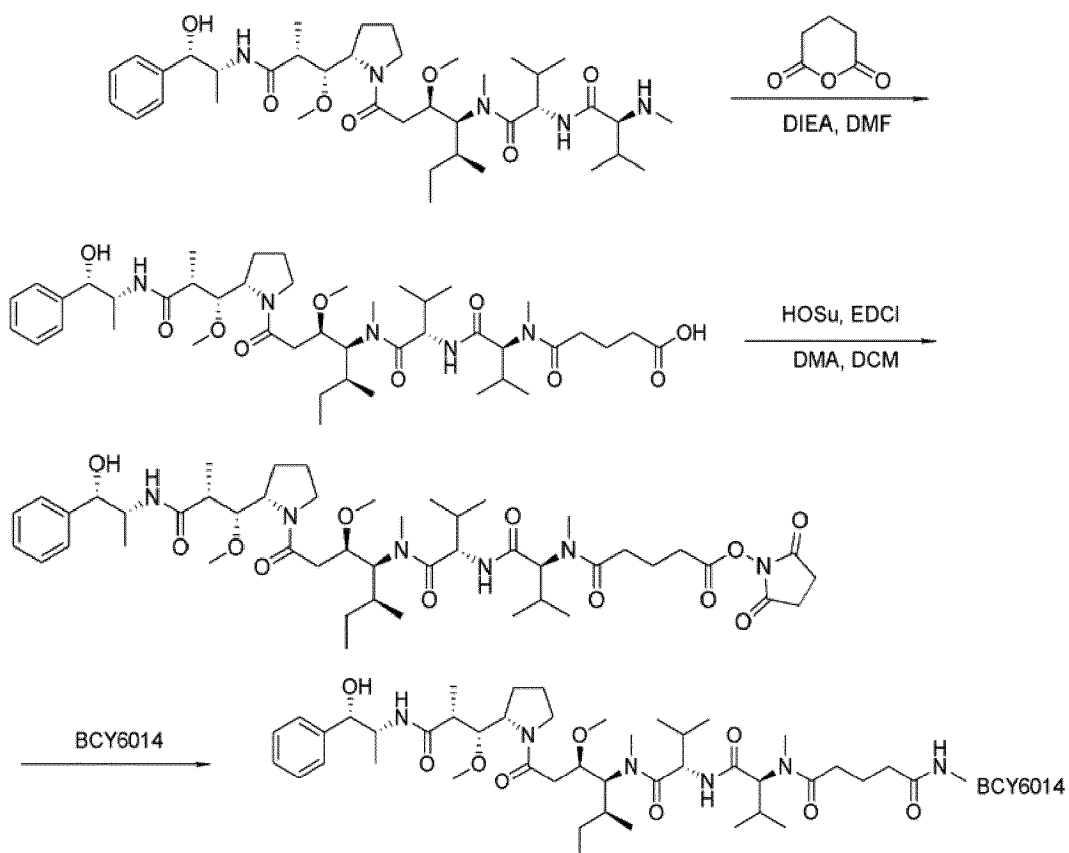
К раствору BCY6014 (101,58 мг, 33,41 мкмоль, 1 экв) в DMA (1 мл) добавляли DIEA (12,95 мг, 100,23 мкмоль, 17,46 мкл, 3 экв) и DM1-SO₃H-SPP-TFP (0,035 г, 33,41 мкмоль, 1 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1-SO₃H-SPP-TFP было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS. Непосредственно очищали методом препаративной HPLC

(TFA условие). Соединение BCY6077 (41,30 мг, 10,03 мкмоль, выход 30,01%, чистота 96,44%) получали в виде белого твердого вещества.

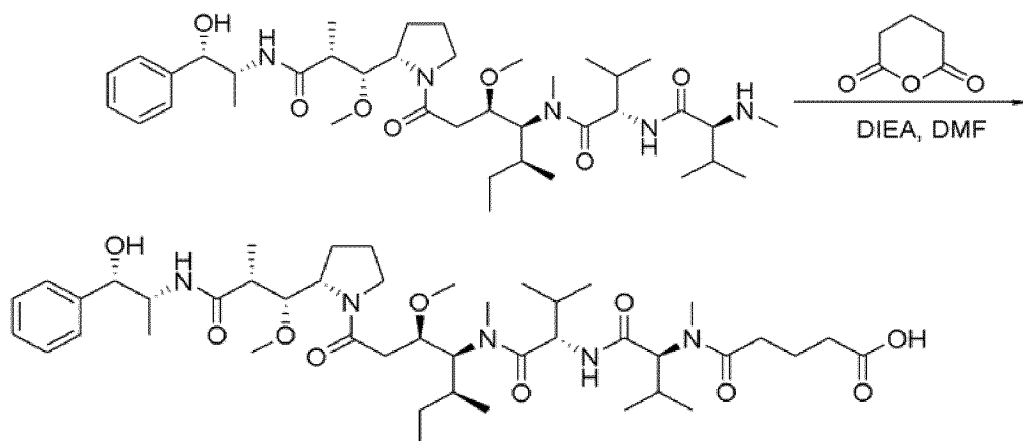
BCY6077 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE (1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	11,80 мин
LCMS (ESI):	m/z 978,2 [M+4H-18-44] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3972,06

Нерасщепляемые серии

BCY6063 (MMAE)



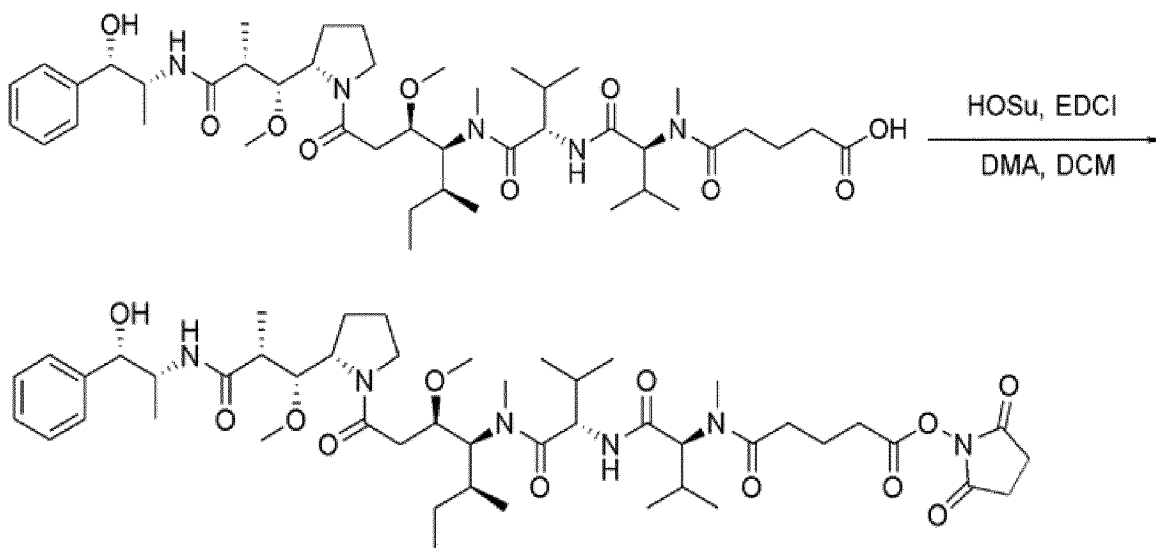
Глутарат-MMAE



К раствору MMAE (0,2 г, 278,56 мкмоль, 1,0 экв) в DMA (3 мл) добавляли DIEA (108,01 мг, 835,68 мкмоль, 145,56 мкл, 3,0 экв) и тетрагидропиран-2,6-дион (63,57 мг, 557,12 мкмоль, 2,0 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что MMAE было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение Глутарат-MMAE (0,12 г, 144,22 мкмоль, 51,77% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	832,3 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	832,09

Глутарат-MMAE-NHS

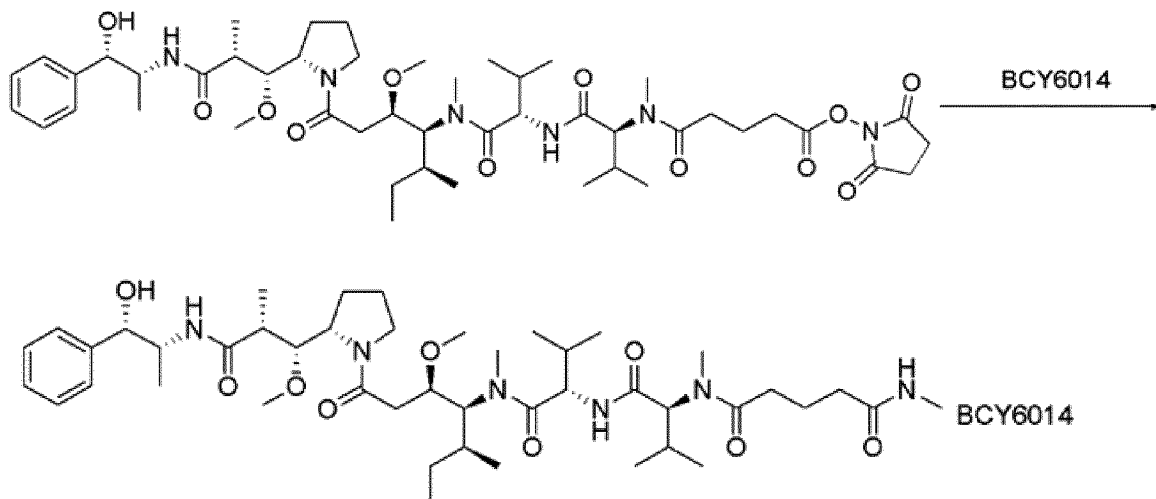


К раствору Глутарат-MMAE (0,12 г, 144,22 мкмоль, 1,0 экв), 1-гидрокси-2,5-диона (49,79 мг, 432,65 мкмоль, 3,0 экв) в DMA (3 мл) и DCM (1 мл) добавляли EDCI (82,94 мг, 432,65 мкмоль, 3,0 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что Глутарат-MMAE было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (TFA

условие). Соединение Глутарат-ММАЕ-NHS (0,055 г, 59,19 мкмоль, выход 41,04%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	929,2 [M+H] ⁺
Молекулярная масса	929,17

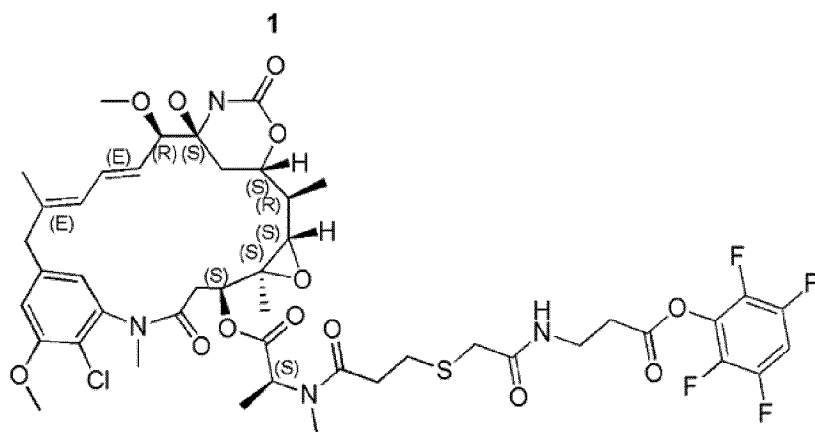
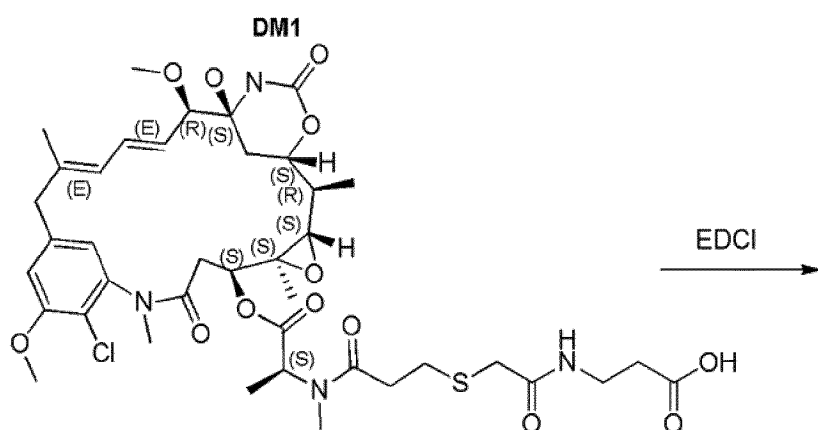
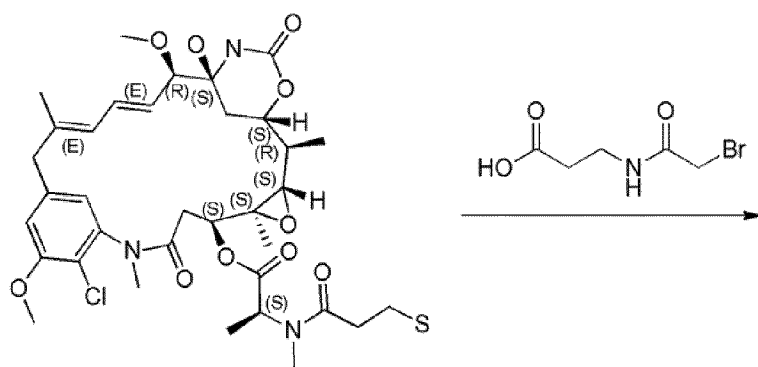
BCY6063



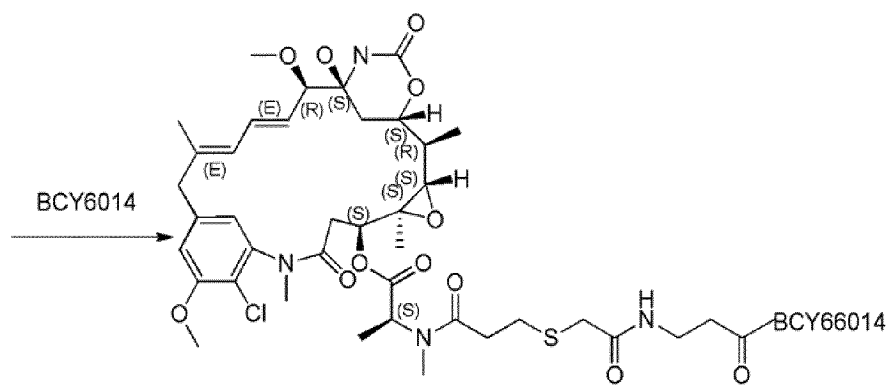
К раствору BCY6014 (98,17 мг, 32,29 мкмоль, 1,2 экв) в DMA (2 мл) добавляли DIEA (10,43 мг, 80,72 мкмоль, 14,06 мкл, 3 экв) и Глутарат-ММАЕ-NHS (0,025 г, 26,91 мкмоль, 1 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что Глутарат-ММАЕ-NHS было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (TFA условие). Соединение BCY6063 (32,10 мг, 8,33 мкмоль, выход 30,95%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6063 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	10,86 мин
LCMS (ESI):	m/z 963,8 [M+4H] ⁴⁺ , 771,1 [M+5H] ⁵⁺
Молекулярная масса пептида	3854,56

BCY6064 (DM1)

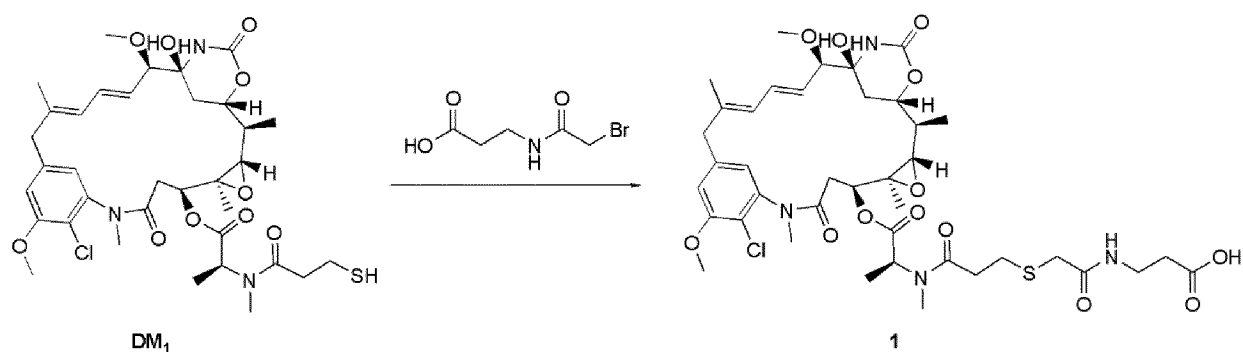


2



BCY6064

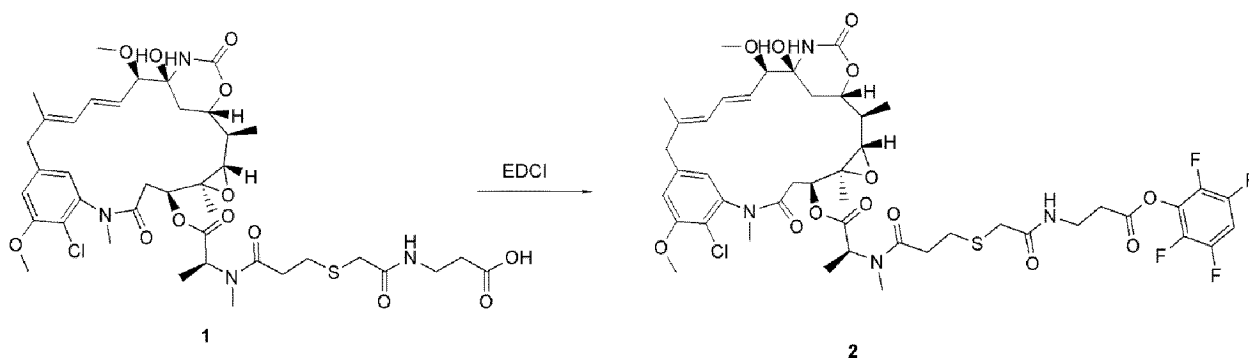
Соединение 1



К раствору DM1 (0,1 г, 135,45 мкмоль, 1 экв), 3-[(2-бромацетил)амино]пропановой кислоты (34,14 мг, 162,54 мкмоль, 1,2 экв) в DMF (5 мл) добавляли TEA (41,12 мг, 406,35 мкмоль, 56,56 мкл, 3 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что DM1 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральные условия). Соединение 1 (0,08 г, 92,23 мкмоль, 68,09% выход) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	849,1 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	867,41

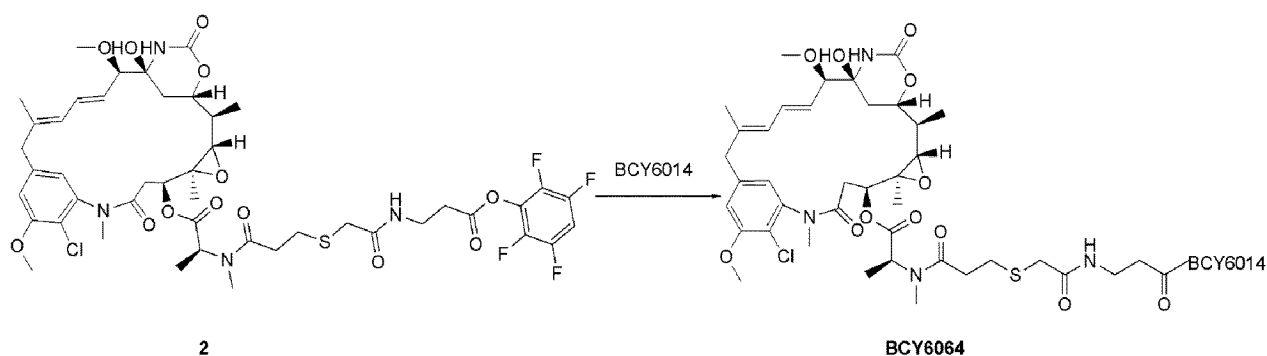
Соединение 2



К раствору соединения 1 (0,08 г, 92,23 мкмоль, 1 экв), 2,3,5,6-тетрафторфенола (45,95 мг, 276,69 мкмоль, 3 экв) в DMA (3 мл) и DCM (1 мл) добавляли EDCI (53,04 мг, 276,69 мкмоль, 3 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 4 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (нейтральное условие). Соединение 2 (0,06 г, 59,09 мкмоль, выход 64,06%) получали в виде белого твердого вещества.

LCMS (ESI):	997,0 [M+H-H ₂ O] ⁺
Молекулярная масса	1015,46

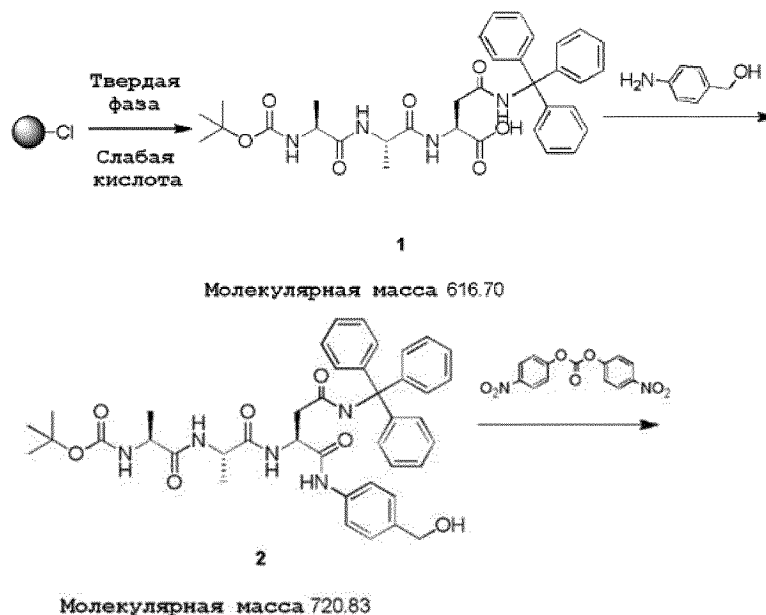
BCY6064

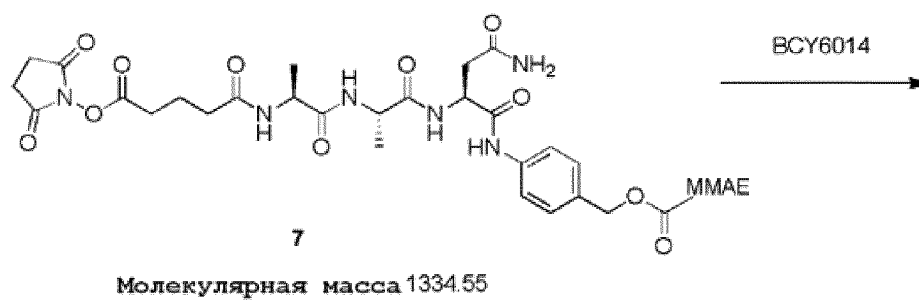
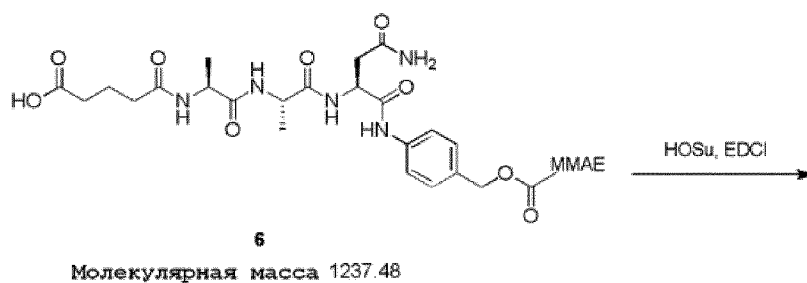
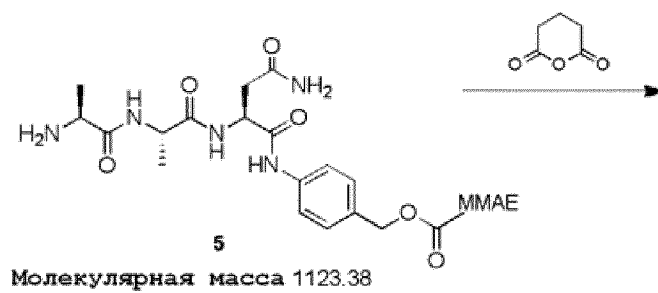
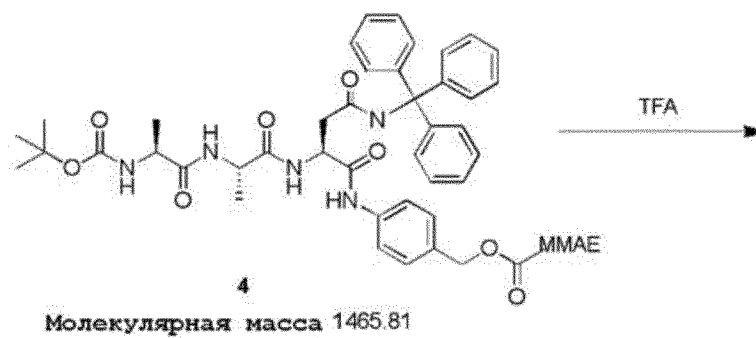
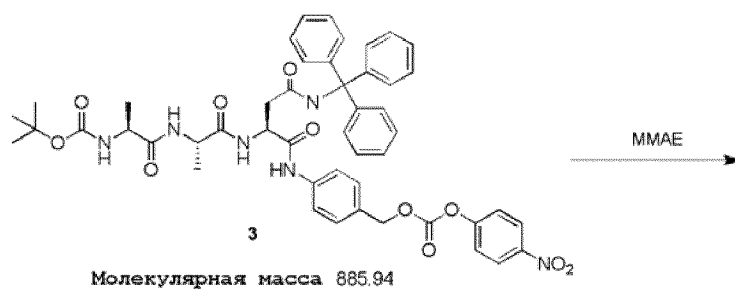


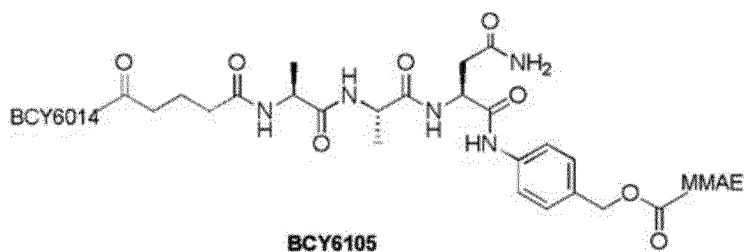
К раствору BCY6014 (107,79 мг, 35,45 мкмоль, 1,2 экв) в DMA (3 мл) добавляли DIEA (11,45 мг, 88,63 мкмоль, 15,44 мкл, 3,0 экв) и соединение 2 (0,030 г, 29,54 мкмоль, 1 экв). Смесь перемешивали при 15°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и зарегистрирован один главный пик с требуемой массой. Смесь непосредственно очищали методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) (TFA условие). Соединение BCY6064 (28,40 мг, 7,30 мкмоль, выход 24,71%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6064 Данные анализа	
Подвижная фаза:	A: 0,1% TFA в H ₂ O B: 0,1% TFA в ACN
Расход:	1,0 мл/мин
Колонка:	Gemini-NX C18 5 мкм 110A 150 x 4,6 мм
Прибор:	Agilent 1200 HPLC-BE(1-614)
Метод:	28-68% B в течение 30 минут, затем 3 минуты 95% B
Время удерживания:	10,26 мин
LCMS (ESI):	m/z 968,4 [M+4H-H ₂ O] ⁴⁺
Молекулярная масса пептида	3889,89

BCY6105







BCU6105

Молекулярная масса 4260.01

Общая методика получения соединения 2

К раствору соединения 1 (3,5 г, 5,68 ммоль, 1,0 экв) в DCM (20 мл) и MeOH (10 мл) добавляли в темноте (4-аминофенил)метанол (978,5 мг, 7,95 ммоль, 1,4 экв) и EEDQ (2,81 г, 11,35 ммоль, 2,0 экв), и смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+H^+]=722,0$). Полученную реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; колонка 220 g SepaFlash® Silica Flash, элюент 0~10% метанол/дихлорметан и 80 мл/мин). Соединение 2 (3,0 г, 4,16 ммоль, выход 73,2%) получали в виде желтого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 3

К раствору соединения 2 (2,5 г, 3,46 ммоль, 1,0 экв) в THF (30 мл) добавляли DIEA (2,69 г, 20,78 ммоль, 3,62 мл, 6,0 экв) и бис(4-нитрофенил)карбонат (6,32 г, 20,78 ммоль, 6,0 экв), и смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Анализ методом TLC показывал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и образовалось одно новое пятно. Реакционную смесь очищали под контролем TLC. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; колонка 220 g SepaFlash® Silica Flash, элюент 0~5% метанол/дихлорметан и 100 мл/мин). Соединение 3 (2,2 г, 2,48 ммоль, выход 71,6%) получали в виде желтого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 4

К раствору соединения 3 (0,3 г, 338,24 мкмоль, 1,0 экв) в DMF (5 мл) добавляли HOBt (50,3 мг, 372,06 мкмоль, 1,1 экв), DIEA (131,1 мг, 1,01 ммоль, 176,7 мкл, 3,0 экв) и MMAE (218,6 мг, 304,42 мкмоль, 0,9 экв). Смесь перемешивали при 40°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал наличие одного пика с требуемой MS ($[M+H^+]=1466,4$, $[M+2H^+]/2=733,2$). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие), и соединение 4 (0,2 г, 136,44 мкмоль, выход 40,3%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 5

Соединение 4 (0,175 г, 119,39 мкмоль, 1,0 экв) сначала растворяли в TFA (1,8 мл), и затем добавляли триизопропилсилан (13,5 г, 85,20 ммоль, 17,5 мл, 713,7 экв). Смесь

перемешивали при 0°C в течение 30 минут. Анализ методом LC-MS показывал наличие одного пика с требуемой MS ($[M+H^+]=1123,4$, $[M+2H^+]/2=562,2$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 5 (0,1 г, 89,02 мкмоль, выход 74,6%) получали в виде желтого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 6

К раствору соединения 5 (0,07 г, 62,31 мкмоль, 1,0 экв) в DMA (1,0 мл) добавляли DIEA (24,2 мг, 186,94 мкмоль, 3,0 экв) и тетрагидропиран-2,6-дион (14,2 мг, 124,62 мкмоль, 2,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 5 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+H^+]=1237,4$, $[M+2H^+]/2=619,3$). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие), и соединение 6 (0,04 г, 32,32 мкмоль, выход 51,8%) получали в виде светло-желтого твердого вещества.

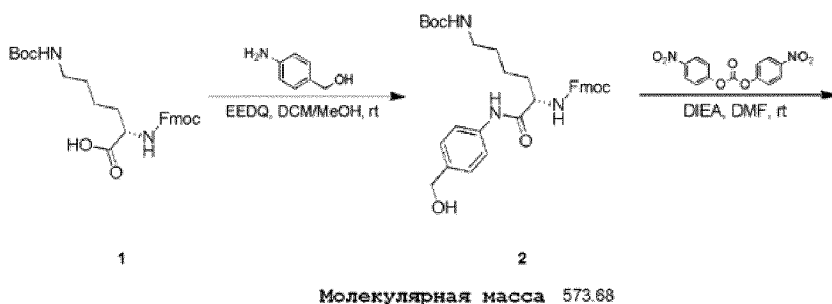
Общая методика получения соединения 7

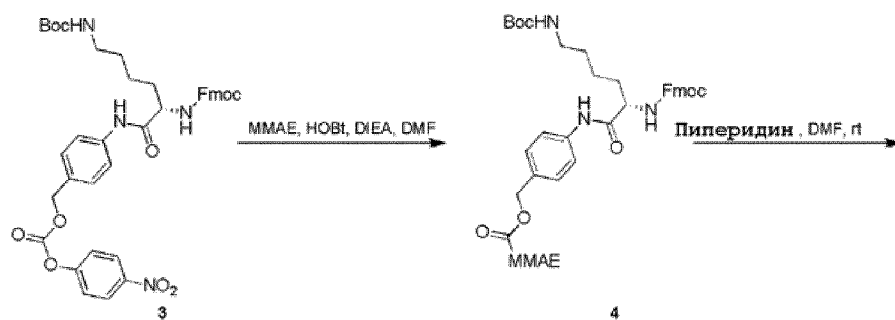
К раствору соединения 6 (0,04 г, 32,32 мкмоль, 1,0 экв), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (11,2 мг, 96,97 мкмоль, 3,0 экв) в DMA (3,0 мл) и DCM (1,0 мл) добавляли EDCI (18,6 мг, 96,97 мкмоль, 3,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 6 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+H^+]=1334,5$, $[M+2H^+]/2=667,7$). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (TFA условие), и соединение 7 (0,025 г, 18,73 мкмоль, выход 57,9%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения BCY6105

К раствору BCY6014 (82,0 мг, 26,98 мкмоль, 1,2 экв) в DMA (4 мл) добавляли DIEA (8,7 мг, 67,44 мкмоль, 11,7 мкл, 3,0 экв) и соединение 7 (0,03 г, 22,48 мкмоль, 1,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 7 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+4H^+]/4=1065,2$). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (TFA условие). Соединение BCY6105 (0,024 г, 5,41 мкмоль, выход 24,1%, чистота 96,06%) получали в виде белого твердого вещества.

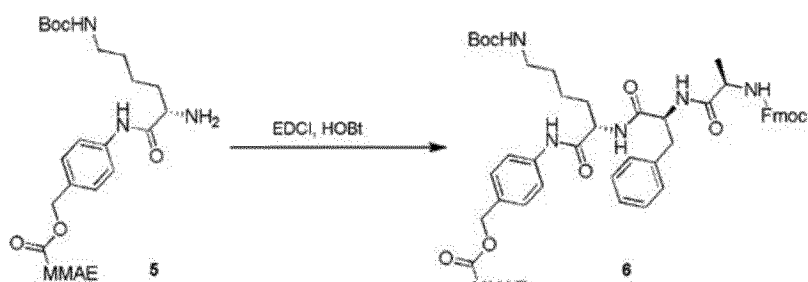
BCY6106





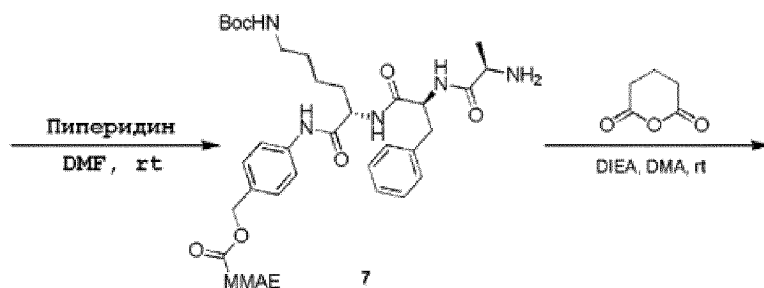
Молекулярная масса 738.78

Молекулярная масса 1317.65

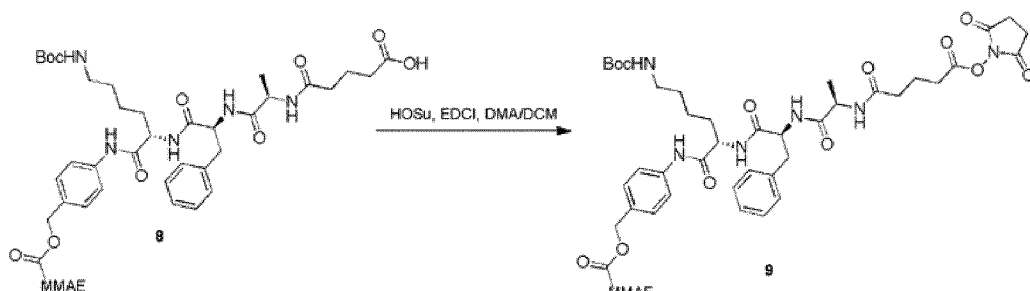


Молекулярная масса 1095.41

Молекулярная масса 1535.90

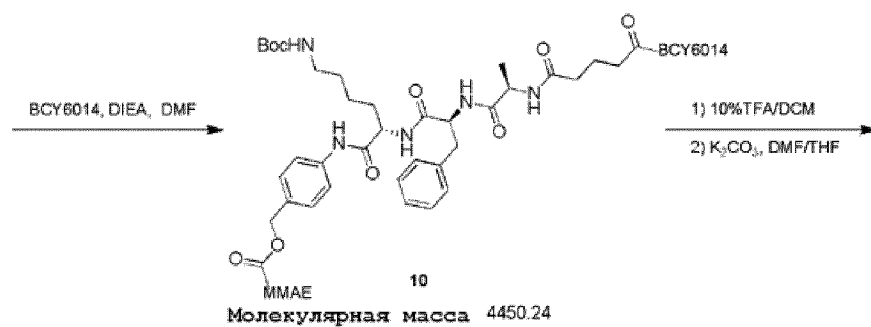


Молекулярная масса 1313.66

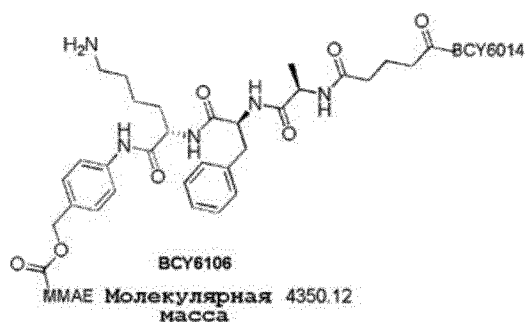


Молекулярная масса 1427.76

Молекулярная масса 1524.83



Молекулярная масса 4450.24



Общая методика получения соединения 2

К раствору соединения 1 (5,0 г, 10,67 ммоль, 1,0 экв) в DCM (30 мл) и MeOH (10 мл) добавляли EEDQ (5,28 г, 21,34 ммоль, 2,0 экв) и (4-аминофенил)метанол (2,63 г, 21,34 ммоль, 2,0 экв). Смесь перемешивали при 20°C в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS (требуемая величина $m/z=574$, в то время как распад и частичный распад группы Boc соответствовал величине $m/z=474$ и 518, соответственно). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 2 (3,7 г, 6,45 ммоль, выход 60,4%) получали в виде желтого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 3

К раствору соединения 2 (3,4 г, 5,93 ммоль, 1,0 экв) в DMF (20 мл) добавляли одной порцией DIEA (5,36 г, 41,49 ммоль, 7,23 мл, 7,0 экв) и бис(4-нитрофенил)карбонат (10,82 г, 35,56 ммоль, 6,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал наличие одного пика с требуемой MS (величина $m/z=639$ соответствовала массе с группой Boc, распадавшейся в процессе электрораспылительной ионизации (ESI). Реакционную смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 3 (3,0 г, 4,06 ммоль, выход 68,5%) получали в виде желтого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 4

К раствору соединения 3 (707,4 мг, 957,55 мкмоль, 1,0 экв) в DMF (15 мл) добавляли NOBt (155,3 мг, 1,15 ммоль, 1,2 экв), DIEA (371,3 мг, 2,87 ммоль, 500,4 мкл, 3,0 экв), и MMAE (0,55 г, 766,04 мкмоль, 0,8 экв). Смесь перемешивали при 30°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал наличие одного пика с требуемой MS (требуемая $m/z=1317$, а $m/z=609$ соответствовала массе с двумя протонами и распаду Boc группы в процессе электрораспылительной ионизации (ESI). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 4 (0,53 г, 402,23 мкмоль, выход 42,0%) получали в виде желтого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 5

К раствору соединения 4 (0,526 г, 399,20 мкмоль, 1,0 экв) в DMF (4 мл) добавляли пиперидин (862,2 мг, 10,13 ммоль, 1,0 мл, 25,4 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 30 минут. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 4 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS (требуемая $m/z=1095$, и величина $m/z=265$ соответствовала аддукту Fmoc-пиперидин). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 5 (0,230 г, 209,97 мкмоль, выход 52,6%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 6

К раствору Fmoc-(D-Ala)-Phe-OH (125,6 мг, 273,87 мкмоль, 1,2 экв) в DMF (10 мл) добавляли EDCI (52,5 мг, 273,87 мкмоль, 1,2 экв), HOBT (37,0 мг, 273,87 мкмоль, 1,2 экв) и соединение 5 (0,25 г, 228,23 мкмоль, 1 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 3 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 5 было полностью израсходовано, и был обнаружен один пик с требуемой величиной MS (величина $m/z=718$ соответствовала массе с двумя протонами и распаду группы Boc в процессе ESI). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 6 (0,18 г, 117,20 мкмоль, выход 51,3%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 7

К раствору соединения 6 (0,18 г, 117,20 мкмоль, 1,0 экв) в DMF (8 мл) добавляли пиперидин (1,72 г, 20,25 ммоль, 2,0 мл, 172,8 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 7 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS (величины $m/z=1314$ и 657 соответствовали требуемой массе, и $m/z=265$ соответствовала аддукту Fmoc-пиперидин). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 7 (0,13 г, 98,96 мкмоль, выход 84,4%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 8

К раствору соединения 7 (0,105 г, 79,93 мкмоль, 1,0 экв) в DMA (4 мл) добавляли DIEA (31,0 мг, 239,79 мкмоль, 41,8 мкл, 3,0 экв) и тетрагидропиран-2,6-дион (27,4 мг, 239,79 мкмоль, 3,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 7 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS (величина $m/z=664,5$ соответствовала массе с двумя протонами и распаду группы Boc в процессе ESI). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие), и соединение 8 (0,09 г, 63,04 мкмоль, выход 78,8%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 9

К раствору соединения 8 (0,09 г, 63,04 мкмоль, 1,0 экв), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (21,7 мг, 189,11 мкмоль, 3,0 экв) в DMA (3 мл) и DCM (1 мл), добавляли EDCI (36,2

мг, 189,11 мкмоль, 3,0 экв), растворенный в 1 мл DCM. Смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 8 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS (требуемая величина $m/z=1524$ (один протон) и 763 (два протона), в то время как величина $m/z=713$ соответствовала массе при распаде группы Boc в процессе ESI). Реакционную смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 9 (0,07 г, 45,91 мкмоль, выход 72,8%) получали в виде белого твердого вещества.

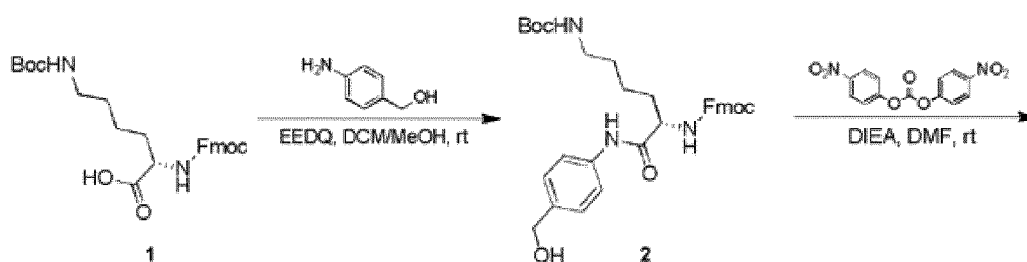
Общая методика получения соединения 10

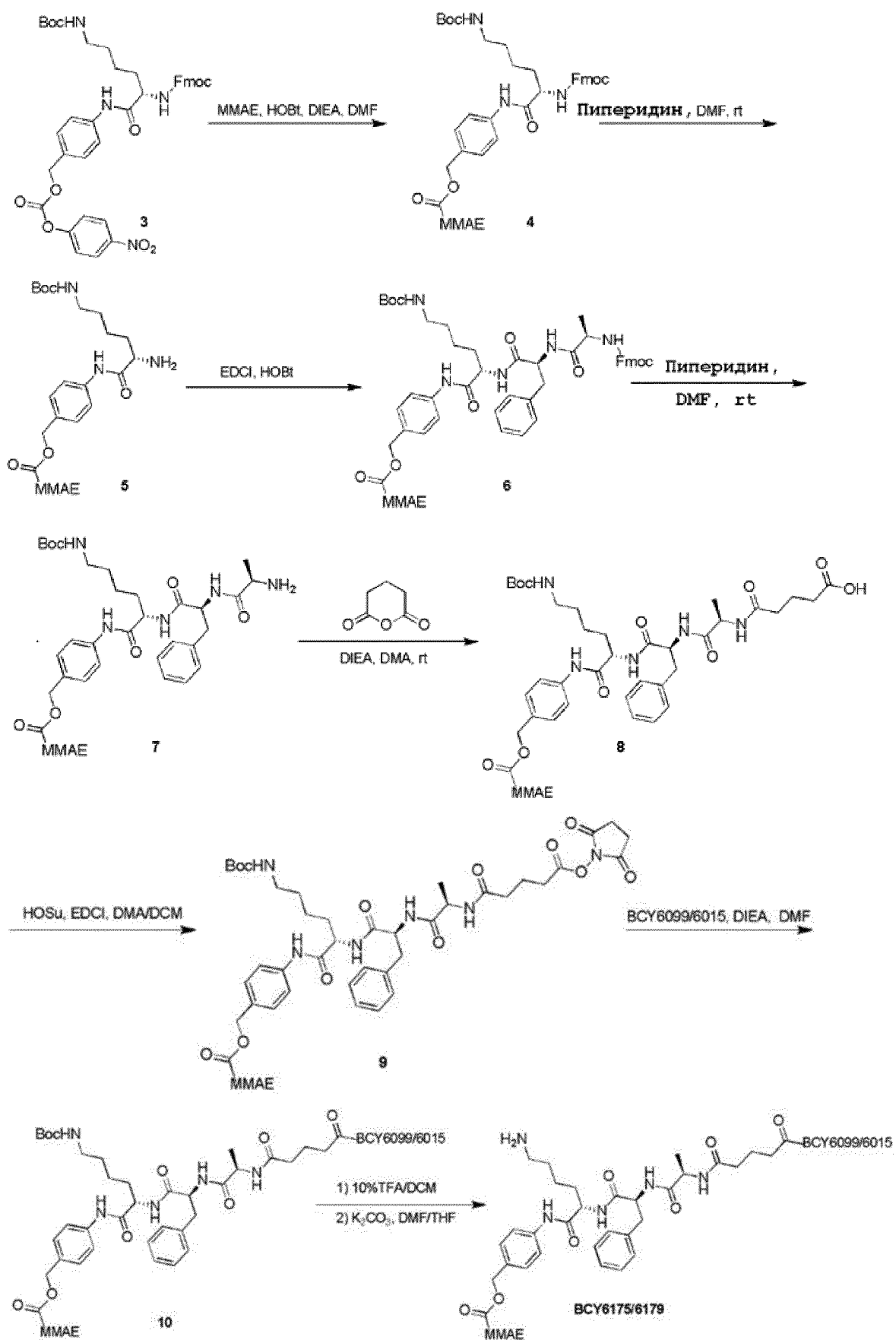
К раствору BSY6014 (167,5 мг, 55,09 мкмоль, 1,2 экв) в DMF (3 мл) добавляли DIEA (11,8 мг, 91,81 мкмоль, 16,0 мкл, 2,0 экв) и соединение 9 (0,07 г, 45,91 мкмоль, 1,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 9 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+4H^+]/4=1112,9$, $[M+5H^+]/5=890,5$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Неочищенный продукт 10 (0,220 г, неочищенный) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Общая методика получения BSY6106

К раствору соединения 10 (0,200 г, 44,95 мкмоль, 1,0 экв) в DCM (4 мл) добавляли 1 мл TFA. Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал наличие одного главного пика с требуемой MS ($[M+4H^+]/4=1088,0$, $[M+5H^+]/5=870,8$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением остатка, который затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (TFA условие). Соединение BSY6106 (0,0297 г, 20,06 мкмоль, выход 14,5%, чистота 95,46%) получали в виде белого твердого вещества.

BSY6175





Общая методика получения соединения 9

Синтез соединения 9 проводили таким же методом, который описан для BCY6106.

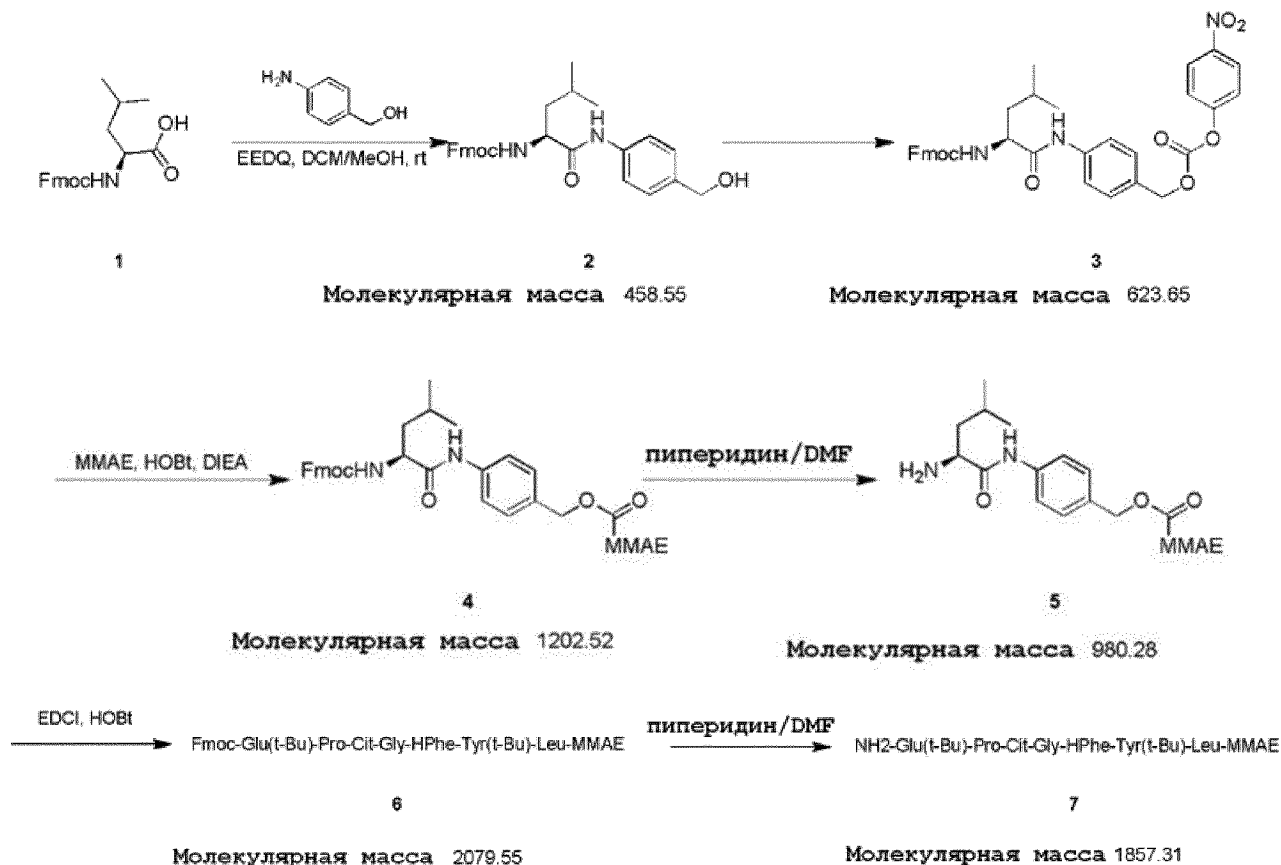
Общая методика получения соединения 10A

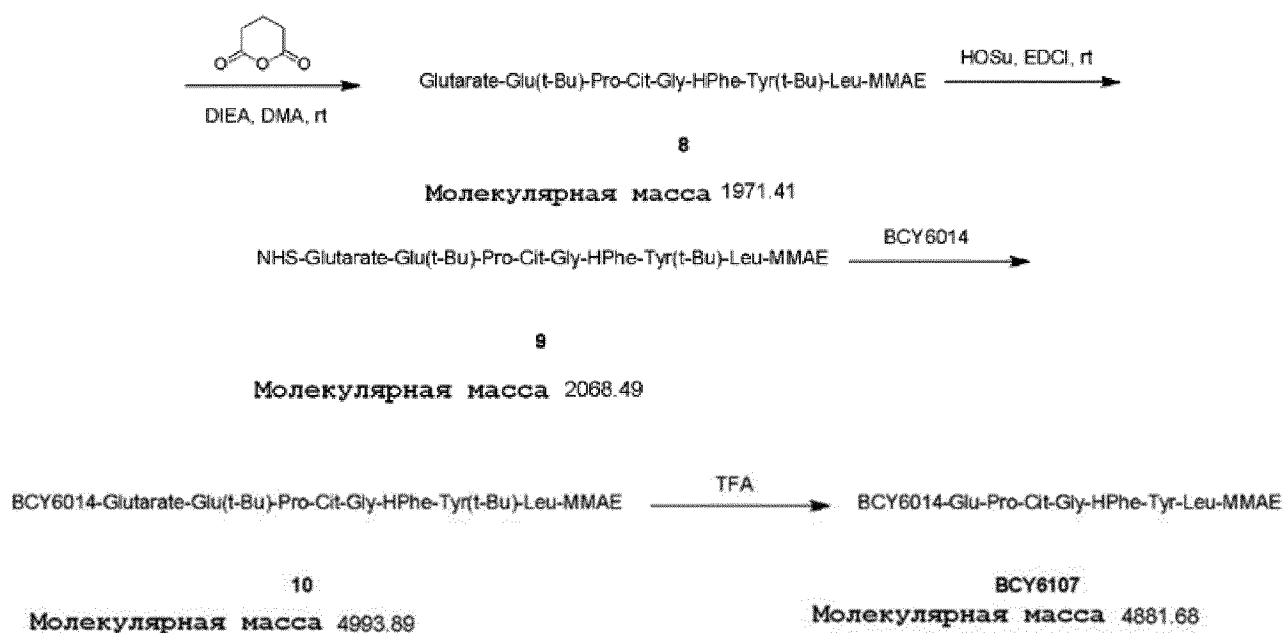
К раствору BCY6099 (195,15 мг, 61,32 мкмоль, 1,1 экв) в DMA (3 мл) добавляли DIEA (21,61 мг, 167,23 мкмоль, 29,13 мкл, 3 экв) и соединения 9 (0,085 г, 55,74 мкмоль, 1,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 9 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной m/z . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка (светло-желтого масла). Реакционную смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 10A (0,160 г, 34,84 мкмоль, выход 62,50%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения BCY6175

К раствору соединения 10A в DCM (4,5 мл) добавляли TFA (4,5 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 10A было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной m/z . Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка, который очищали методом препаративной HPLC (TFA условие). Соединение BCY6175 (61,40 мг, 13,56 мкмоль, выход 31,13%) получали в виде белого твердого вещества.

BCY6107





Общая методика получения соединения 2

К раствору соединения 1 (3,0 г, 8,49 ммоль, 1,0 экв) в DCM (30 мл) и MeOH (10 мл) добавляли EEDQ (2,52 г, 10,19 ммоль, 1,2 экв) и (4-аминофенил)метанол (1,25 г, 10,19 ммоль, 1,2 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 1 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+H]^+$ 459,5). Кроме того, анализ методом TLC указывал на полное расхождение соединения 1 и образование новых пятен. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; колонка 120 g SepaFlash® Silica Flash, элюент градиент 0~60% этилацетат/петролейный эфир и 80 мл/мин). Соединение 2 (3,5 г, 7,63 ммоль, выход 89,9%) получали в виде желтого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 3

К раствору соединения 2 (3,3 г, 7,20 ммоль, 1,0 экв) в THF (100 мл), добавляли DIEA (4,65 г, 35,98 ммоль, 6,27 мл, 5,0 экв) и бис(4-нитрофенил)карбонат (8,76 г, 28,79 ммоль, 4,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 2 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+H]^+$ 624,0). Кроме того, анализ методом TLC указывал на полное расхождение соединения 2 и образование новых пятен. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя с получением остатка. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (ISCO®; колонка 120 g SepaFlash® Silica Flash, элюент градиент 0~15% этилацетат/петролейный эфир и 80 мл/мин). Соединение 3 (3,0 г, 4,81 ммоль, выход 66,8%) получали в виде желтого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 4

К раствору соединения 3 (124,09 мг, 198,97 мкмоль, 1,0 экв) в DMF (5 мл) добавляли NOBt (32,3 мг, 238,77 мкмоль, 1,2 экв), DIEA (77,1 мг, 596,92 мкмоль, 103,9 мкл, 3,0 экв) и

ММАЕ (0,1 г, 139,28 мкмоль, 0,7 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 3 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+H]^+$ 1202,5, $[M+Na]^+$ 1224,5). Реакционную смесь затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). После лиофилизации, получали соединение 4 (0,08 г, 66,53 мкмоль, выход 33,4%) в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 5

К раствору соединения 4 (0,08 г, 66,53 мкмоль, 1,0 экв) в DMF (4 мл) добавляли пиперидин (862,2 мг, 10,13 ммоль, 1 мл, 152,2 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 4 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+H]^+$ 981,5, $[M+Na]^+$ 1003,5, в то время как величина $m/z=264,0$ соответствовала аддукту Fmoc-пиперидин). Реакционную смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 5 (0,055 г, 56,11 мкмоль, выход 84,3%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 6

К раствору Fmoc-Glu(t-Bu)-Pro-Cit-Gly-HPhe-Tyr(t-Bu)-OH (74,1 мг, 66,31 мкмоль, 1,3 экв) в DMF (4 мл) добавляли EDCI (12,7 мг, 66,31 мкмоль, 1,3 экв), HOBt (8,9 мг, 66,31 мкмоль, 1,3 экв) и соединение 5 (0,05 г, 51,01 мкмоль, 1,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 30 минут. Анализ методом LC-MS показал, что 20% соединения 5 не прореагировало, появилось несколько новых пиков, и 60% реакционной смеси составлял требуемый продукт ($[M+2H^+]/2=1040,4$). Реакционную смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 6 (0,07 г, 33,66 мкмоль, выход 66,0%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 7

К раствору соединения 6 (0,07 г, 33,66 мкмоль, 1,0 экв) в DMF (4 мл) добавляли пиперидин (2,9 мг, 33,66 мкмоль, 3,3 мкл, 1,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 15 минут. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 6 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+2H^+]/2=929,1$, в то время как величина $m/z=264,2$ соответствовала аддукту Fmoc-пиперидин). Реакционную смесь непосредственно очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 7 (0,045 г, 24,23 мкмоль, выход 72,0%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 8

К раствору соединения 7 (0,04 г, 21,54 мкмоль, 1,0 экв) в DMA (1 мл) добавляли DIEA (8,3 мг, 64,61 мкмоль, 11,2 мкл, 3,0 экв) и тетрагидропиран-2,6-дион (7,4 мг, 64,61 мкмоль, 3,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 7 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+2H^+]/2=986,4$). Реакционную смесь затем непосредственно

очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 8 (0,035 г, 17,75 мкмоль, выход 82,4%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 9

К раствору соединения 8 (0,035 г, 17,75 мкмоль, 1,0 экв), 1-гидроксипирролидин-2,5-диона (6,1 мг, 53,26 мкмоль, 3,0 экв) в DMA (3 мл) и DCM (1 мл) добавляли EDCI (10,2 мг, 53,26 мкмоль, 3,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 8 частично не прореагировало, и был обнаружен один пик с требуемой величиной массы ($[M+2H+]/2=1034,7$). Затем удаляли DCM, после чего смесь очищали методом препаративной HPLC (нейтральное условие). Соединение 9 (0,03 г, 14,50 мкмоль, выход 81,7%) получали в виде белого твердого вещества.

Общая методика получения соединения 10

К раствору BCY6014 (52,9 мг, 17,40 мкмоль, 1,59 мкл, 1,2 экв) в DMF (2 мл) добавляли DIEA (5,6 мг, 43,51 мкмоль, 7,6 мкл, 3,0 экв) и соединение 9 (0,03 г, 14,50 мкмоль, 1,0 экв). Смесь перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Анализ методом LC-MS показывал, что был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+4H+]/4=1249,2$, $[M+5H+]/5=999,3$). Затем удаляли растворитель, и полученный неочищенный продукт 10 (0,06 г, неочищенный) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Общая методика получения BCY6107

К раствору соединения 10 (0,055 г, 11,01 мкмоль, 1,0 экв) в DCM (1 мл) добавляли 1 мл TFA. Смесь перемешивали при 0°C в течение 15 минут. Анализ методом LC-MS показывал, что соединение 10 было полностью израсходовано, и был обнаружен один главный пик с требуемой величиной MS ($[M+4H+]/4=1221,0$, $[M+5H+]/5=977,0$). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении для удаления растворителя, получая в результате остаток, который затем непосредственно очищали методом препаративной HPLC (TFA условие). Соединение BCY6107 (20,4 мг, 4,03 мкмоль, выход 36,6%, чистота 96,36%) получали в виде белого твердого вещества.

ДАННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Исследование 1. Измерения флуоресцентной поляризации

(а) Анализ прямого связывания

Пептиды с флуоресцентной меткой (либо с флуоресцеином, фирмы SIGMA, либо с Alexa Fluor488™, фирмы Fisher Scientific) разводили до 2,5 нМ в PBS с 0,01% tween 20 или в 50 мМ HEPES с 100 мМ NaCl и 0,01% tween pH 7,4 (оба называют буфером для анализа). В этот же раствор пептида в буфере для анализа добавляли белок и проводили его титрование с получением 1 нМ пептида в суммарном об 25 мкл в 384-луночных планшетах с черными стенками и дном с малым объемом и с низкой степенью связывания, в итоге, 5 мкл буфера для анализа, 10 мкл белка (таблица 1), затем 10 мкл флуоресцентного пептида. Использовали последовательные разведения один к двум для получения 12 различных концентраций с наивысшими концентрациями в диапазоне от 500 нМ для известных лекарственных

препаратов для связывания, обладающих высокой аффинностью, до 10 мкМ для известных лекарственных препаратов для связывания, обладающих низкой аффинностью, и для проведения исследований по селективности. Измерения проводили на считывающем устройстве для микропланшетов BMG PHERAstar FS, оснащенном оптическим модулем "FP 485 520 520", в котором используется возбуждающее излучение при 485 нм и проводится детекция параллельной и перпендикулярной эмиссии при 520 нм. Прибор PHERAstar FS использовали при 25°C в режиме 200 вспышек на лунку и с задержкой позиционирования 0,1 секунды, при этом измерение каждой лунки проводили с интервалами от 5 до 10 минут в течение 60 минут. Используемое для анализа приращение определяли для каждого меченого вещества по истечению 60 минут, когда уже в лунке отсутствовал белок. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Systat Sigmaplot version 12.0. Величины mP аппроксимировали с помощью определенного пользователем уравнения второго порядка с получением величины Kd: $f = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / \text{Lig} * ((x + \text{Lig} + Kd) / 2 - \sqrt{(((x + \text{Lig} + Kd) / 2)^2 - (\text{Lig} * x))})$. "Lig" представляло собой определяемую величину концентрации используемого меченого вещества.

(b) Анализ конкурентного связывания

Пептиды без флуоресцентной метки подвергали испытаниям на конкурентное связывание с пептидом с флуоресцентной меткой и известной величиной Kd (таблица 2). Референсное соединение А имеет последовательность Fl-G-Sar₅-ACPWGPAWCPVNRPGCA (Fl-G-Sar₅-(SEQ ID NO: 94)). Референсное соединение В имеет последовательность Fl-G-Sar₅-ACPWGPFWCPVNRPGCA (Fl-G-Sar₅-(SEQ ID NO: 95)). Референсное соединение С имеет последовательность Fl-G-Sar₅-ADVTCPWGPFWCPVNRPGCA (Fl-G-Sar₅-(SEQ ID NO: 96)). Каждое из референсных соединений А, В и С содержит молекулярный каркас TBMB. Пептиды разбавляли до соответствующей концентрации в буфере для анализа, описанном для анализа прямого связывания, с максимальным содержанием 5% DMSO, затем последовательно разбавляли 1 к 2. Добавляли в планшет пять микролитров разбавленного пептида, затем 10 мкл человеческого или мышиного EphA2 (таблица 1) при фиксированной концентрации, которая зависела от используемого флуоресцентного пептида (таблица 2), затем добавляли 10 мкл флуоресцентного пептида. Измерения проводили таким же способом, как в случае проведения анализа прямого связывания, однако, приращение определяли перед первым измерением. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Systat Sigmaplot version 12.0. Величины mP аппроксимировали с помощью определенного пользователем уравнения третьего порядка с получением величины Ki:

$$f = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) / \text{Lig} * ((\text{Lig} * ((2 * ((K_{\text{lig}} + K_{\text{comp}} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (K_{\text{comp}} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + K_{\text{lig}} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + K_{\text{lig}} * K_{\text{comp}}))^0,5 * \cos(\arccos((-2 * (K_{\text{lig}} + K_{\text{comp}} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^3 + 9 * (K_{\text{lig}} + K_{\text{comp}} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c) * (K_{\text{comp}} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + K_{\text{lig}} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + K_{\text{lig}} * K_{\text{comp}}) - 27 * (-1 * K_{\text{lig}} * K_{\text{comp}} * \text{Prot} * c)) / (2 * (((K_{\text{lig}} + K_{\text{comp}} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (K_{\text{comp}} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + K_{\text{lig}} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + K_{\text{lig}} * K_{\text{comp}})))))))$$

$$\begin{aligned} & \text{Prot}^*c) + \text{Klig}^*(\text{Comp} - \text{Prot}^*c) + \text{Klig}^*\text{Kcomp}))^3)^{0,5}))/3)) - (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \\ & \text{Prot}^*c))/((3^*\text{Klig}) + ((2^*((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot}^*c)^2 - 3^*(\text{Kcomp}^*(\text{Lig} - \\ & \text{Prot}^*c) + \text{Klig}^*(\text{Comp} - \text{Prot}^*c) + \text{Klig}^*\text{Kcomp}))^{0,5} * \text{COS}(\text{ARCCOS}((-2^*(\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \\ & \text{Prot}^*c)^3 + 9^*(\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot}^*c) * (\text{Kcomp}^*(\text{Lig} - \text{Prot}^*c) + \text{Klig}^*(\text{Comp} - \\ & \text{Prot}^*c) + \text{Klig}^*\text{Kcomp}) - 27^*(-1^*\text{Klig}^*\text{Kcomp}^*\text{Prot}^*c))/2^*((((\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot}^*c)^2 - \\ & 3^*(\text{Kcomp}^*(\text{Lig} - \text{Prot}^*c) + \text{Klig}^*(\text{Comp} - \text{Prot}^*c) + \text{Klig}^*\text{Kcomp}))^3)^{0,5}))/3)) - \\ & (\text{Klig} + \text{Kcomp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot}^*c))))). \end{aligned}$$

"Lig", "Klig" и "Prot" представляли собой определяемые величины, относящиеся к концентрации флуоресцентного пептида, Kd флуоресцентного пептида и концентрации EphA2, соответственно.

Таблица 1. Рецепторы эфрина и источник

Рецептор (домен)	Вид	Формат/метка	Фирма-поставщик	Номер по каталогу
EphA1 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	7146-A1
EphA2 (Ecto)	Человек	С-концевой полиHis	R&D systems	3035-A2
EphA2 (Ecto)	Человек	С-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA2 (Ecto)	Мышь	Fc-слияние	R&D Systems	639-A2
EphA2 (Ecto)	Мышь	С-концевой полиHis	Sino Biological	50586-M08H
EphA2 (ligand binding)	Крыса	С-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA2 (ligand binding)	Собака	С-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA3 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	6444-A3
EphA3 (Ecto)	Человек	N-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA3 (Ecto)	Крыса	С-концевой полиHis	Sino Biological	80465-R08H
EphA4 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	6827-A4
EphA4 (Ecto)	Человек	С-концевой полиHis	Sino Biological	11314-H08H
EphA4 (Ecto)	Крыса	С-концевой полиHis	Sino Biological	80123-R08H

EphA6 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	5606-A6
EphA7 (Ecto)	Человек	Fc-слияние	R&D systems	6756-A7
EphB1 (Ecto)	Крыса	Fc-слияние	R&D systems	1596-B1
EphB4 (Ecto)	Человек	С-концевой полиHis	R&D systems	3038-B4

Таблица 2. Конечные концентрации флуоресцентного пептида и EphA2, используемые при проведении анализов на конкурентное связывание

Флуоресцентный пептид	Концентрация флуоресцентного пептида (нМ)	Концентрация человеческого EphA2 (нМ)	Концентрация мышинового EphA2 (нМ)
Референсное соединение А	10	75	
Референсное соединение В	1	30	
Референсное соединение С	0,8 (человек) 1 (мышь)	2,4	50

Проводили испытания конкретных пептидных лигандов по изобретению с помощью упомянутых выше методов анализа, результаты которых приведены в таблицах 3-7:

Таблица 3. Данные биологических испытаний пептидных лигандов по изобретению (ТАТА пептиды, анализ прямого связывания)

Номер бициклического соединения	Последовательность	EphA2 человека (K_D , нМ $\pm$ 95% CI)
1	ACMNDWWCAMGWKCA-Sar ₆ -K(Fl) ((SEQ ID NO: 3)-Sar ₆ -K(Fl))	304 $\pm$ 91,99
2	ACVPDRRCAYMNVCA-Sar ₆ -K(Fl) ((SEQ ID NO: 4)-Sar ₆ -K(Fl))	74,91 $\pm$ 6,6
3	ACVVDGRCAVMNVCA-Sar ₆ -K(Fl) ((SEQ ID NO: 5)-Sar ₆ -K(Fl))	129,8 $\pm$ 80,75
4	ACVVDSRCAYMNVCA-Sar ₆ -K(Fl) ((SEQ ID NO: 6)-Sar ₆ -K(Fl))	124,6 $\pm$ 51,74
5	ACVPDSRCAYMNVCA-Sar ₆ -K(Fl) ((SEQ ID NO: 7)-Sar ₆ -K(Fl))	93,95 $\pm$ 23,62
6	ACYVGKECAIRNVCA-Sar ₆ -K(Fl) ((SEQ	168,5 $\pm$ 20,58

	ID NO: 8)-Sar ₆ -K(Fl))	
7	ACYVGKECAYMNVCA-Sar ₆ -K(Fl) ((SEQ ID NO: 9)-Sar ₆ -K(Fl))	149,73 ± 39,2
8	Fl-G-Sar ₅ -ACYVGKECAYMNVCA (Fl-G-Sar ₅ -(SEQ ID NO: 9))	218,33 ± 10,51
9	Fl-(β-Ala)-Sar ₁₀ - ARDCPLVNPLCLHPGWTC (Fl-(β-Ala)- Sar ₁₀ -(SEQ ID NO: 10))	6,43 ± 1,15
10	Fl-(β-Ala)-Sar ₁₀ - A(HArg)DCPLVNPLCLHPGWTC (Fl-(β-Ala)- Sar ₁₀ -(SEQ ID NO: 11))	9,07 ± 2,49
11	Ac-CPLVNPLCLHPGWTC(LHG-Sar ₆ -(D-K[Fl]) (Ac-(SEQ ID NO: 12)-Sar ₆ -(D-K[Fl]))	3,08 ± 0,43
12	Ac-CPLVNPLCLHPGWTC(L(D-His)G-Sar ₆ -(D-K[Fl]) (Ac-SEQ ID NO: 13)-Sar ₆ -(D-K[Fl]))	10,56 ± 0,77
13	Ac-CPLVNPLCLHPGWSCRGGQ-Sar ₆ -(D-K[Fl]) (Ac-(SEQ ID NO: 14)- Sar ₆ -(D-K[Fl]))	5,29 ± 0,79
14	Ac-CPLVNPLCLHPGWSC(HArg)GQ-Sar ₆ -(D-K[Fl]) (Ac-(SEQ ID NO: 15)- Sar ₆ -(D-K[Fl]))	9,96 ± 0,55

Таблица 4. Данные биологических испытаний пептидных лигандов по изобретению (ТАТА пептиды, анализ конкурентного связывания)

Номер бициклического соединения	Последовательность	Ki, нМ ± 95% CI			
		EphA2 человека			EphA2 мыши
		Флуоресцентный пептид			
		Референсное соединение C	Референсное соединение B	Референсное соединение A	Референсное соединение C
15	ACMNDW WCAMGW KCA (SEQ	277,5 ± 38,22			

Номер	п р о т	Ki, нМ ± 95% CI			
	ID NO: 3)				
16	ACVPDRR CAYMNV CA (SEQ ID NO: 4)	69,97 ± 8,67			
17	(β-Ala)- Sar ₁₀ - ACVPDRR CAYMNV C ((β-Ala)- Sar ₁₀ -(SEQ ID NO: 16))	85,05 ± 1,08			
18	DLRCGGD PRCAYMN VCA (SEQ ID NO: 17)	70,8 ± 2,35			
19	SRPCVIDS RCAYMN VCA (SEQ ID NO: 18)	94,75 ± 24,01			
20	ESRCSPD ARCAYM NVCA (SEQ ID NO: 19)	57,05 ± 4,61			
21	HSGCRPD PRCAYMN VCA (SEQ ID NO: 20)	62,15 ± 4,61			

Номер	п р о т	Ki, нМ ± 95% CI			
22	GSGCKPD SRCAYMN VCA (SEQ ID NO: 21)	63,25 ± 13,82			
23	ETVCLPD SRCAYMN VCA (SEQ ID NO: 22)	130 ± 15,68			
24	GQVCIVD ARCAYM NVCA (SEQ ID NO: 23)	168,5 ± 16,66			
25	ACVPDRR CAFENVC VDH (SEQ ID NO: 24)	97,3 ± 3,33			
26	ACVPDRR CAFNMVC EDR (SEQ ID NO: 25)	39,05 ± 10,29			
27	ACVPDRR CAFQDVC DHE (SEQ ID NO: 26)	159 n=1			
28	ACVPDRR CAFRDVC LTG	1700 n=1			

Номер	п	с	т	о	Ki, нМ ± 95% CI			
		(SEQ ID NO: 27)						
29		ACYVGKE CAYMNV CA (SEQ ID NO: 9)	209,5 ± 110,74	106,65 ± 24,94	87,7 n=1			
30		ACQPSNH CAFMNYC A (SEQ ID NO: 28)	293 n=1	186,53 ± 86,86	137 n=1			
31		ACSPTPA CAVQNLC A (SEQ ID NO: 29)	223 n=1	177 ± 60,76				
32		ACTSCWA YPDSFCA (SEQ ID NO: 30)	232 ± 52,19		151 n=1			
33		ACTKPTG FCAYPDTI CA (SEQ ID NO: 31)	268,5 ± 16,66					
34		ACRGEW GYCAYPD TICA (SEQ ID NO: 32)	347,5 ± 57,82					
35		ACRNWG MYCAYP DTICA	282,5 ± 65,66					

Номер	п р о	Ki, нМ ± 95% CI			
	(SEQ ID NO: 33)				
36	ACPDWG KYCAYPD TICA (SEQ ID NO: 34)	160 ± 1,96			
37	ACRVYGP YCAYPDT ICA (SEQ ID NO: 35)	294,5 ± 20,58			
38	ACSSCWA YPDSVCA (SEQ ID NO: 36)	400,33 ± 205,19			
39	ACQSCW AYPDTYC A (SEQ ID NO: 37)	321,33 ± 119,53			
40	ACGFMGL EPCETFC A (SEQ ID NO: 38)	187,5 ± 20,58			
41	ACGFMGL VPCEVHC A (SEQ ID NO: 39)	155 ± 9,8			
42	ACGFMGL EPCEMVC	320,5 ± 14,7			

Номер	п р о т	Ki, нМ ± 95% CI			
	A (SEQ ID NO: 40)				
43	ACGFMGL EPCVTYC A (SEQ ID NO: 41)	233,5 ± 20,58			
44	ACGFMGL EPCELVC A (SEQ ID NO: 42)	126,8 ± 21,17			
45	ACGFMGL VPCNVFC A (SEQ ID NO: 43)	142 ± 41,16			
46	ACGFMGL EPCELFC A (SEQ ID NO: 44)	81,7 ± 7,06			
47	ACGFMGL EPCELFC MPK (SEQ ID NO: 45)	185 ± 74,48			
48	ACGFMGL EPCELYC A (SEQ ID NO: 46)	127,5 ± 14,7			

Номер	п р о	Ki, нМ ± 95% CI			
49	ACGFMGL EPCELYC AHT (SEQ ID NO: 47)	144 ± 17,64			
50	ACGFMGL EPCEMYC A (SEQ ID NO: 48)	140 ± 45,08			
51	ACGFMGL VPCELYC ADN (SEQ ID NO: 49)	84,4 ± 36,46			
52	ACPLVNP LCLTSGW KCA (SEQ ID NO: 50)	115,33 ± 11,33			
53	ACPMVNP LCLHPGW ICA (SEQ ID NO: 51)	15,4 ± 3,17			
54	ACPLVNP LCLHPGW ICA (SEQ ID NO: 52)	15,25 ± 2,84			
55	ACPLVNP LCLHPGW RCA	20,55 ± 0,88			

Номер	п	а	с	т	о	Ki, нМ ± 95% CI			
			(SEQ ID NO: 53)						
56		ACPLVNP LCNLPGW TCA (SEQ ID NO: 54)		184 ± 115,64					
57		ACPLVNP LCLVPGW SCA (SEQ ID NO: 55)		35,4 ± 10					
58		ACPLVNP LCLLDGW TCA (SEQ ID NO: 56)		38,35 ± 5,39					
59		ACPLVNP LCLMPG WGCA (SEQ ID NO: 57)		114,5 ± 10,78					
60		ACPLVNP LCMIGNW TCA (SEQ ID NO: 58)		96,2 ± 0,59					
61		ACPLVNP LCLMTG WSCA (SEQ ID NO: 59)		241,5 ± 44,1					
62		ACPLVNP		67,1 ± 19,21					

Номер	п	с	т	о	Ki, нМ ± 95% CI			
		LCMMGG						
		WKCA						
		(SEQ ID NO: 60)						
63		ACPLVNP			59,05 ± 28,32			
		LCLYGSW						
		KCA						
		(SEQ ID NO: 61)						
64		ACPLVNP			30 n=1			
		LCLHPGW						
		TCA						
		(SEQ ID NO: 62)						
65		ARDCPLV			6,05 ± 1,38			39,1 ± 0,39
		NPLCLHP						
		GWTC						
		(SEQ ID NO: 63)						
66		(β-Ala)-			4,94 ± 1,41			57,6 ± 24,86
(BCY60		Sar ₁₀ -						
99)		A(HArg)D						
		C(HyP)LV						
		NPLCLHP(						
		D-						
		Asp)W(HA						
		rg)C (SEQ						
		ID NO: 2)						
67		(β-Ala)-			8,51 ± 0,17			61,7 ± 15,48
(BCY60		Sar ₁₀ -						
14)		A(HArg)D						
		CPLVNPL						
		CLHPGWT						

Номер	п	а	а	а	а	Ki, нМ ± 95% CI			
68						19,3 ± 4,92			166,5 ± 30,38
69						17,5 ± 0,98			164,5 ± 2,94
70						10,06 ± 2,96			
71						11,11 ± 2,25			
72						11,92 ± 6,04			

Номер	пептид	K _i , нМ ± 95% CI			
	NPLCLHP GWTC (SEQ ID NO: 66)				
73	ACPLVNP LCLHPGW TCLHG (SEQ ID NO: 67)	1,98 ± 0,49			7,27 ± 1,09
74	Ac- CPLVNPL CLHPGWT CLHG (Ac- (SEQ ID NO: 12))	1,76 ± 0,54			
75	(β-Ala)- Sar ₁₀ - ACPLVNP LCLHPGW TCLHG ((β-Ala)- Sar ₁₀ -(SEQ ID NO: 67))	2,48 ± 0,27			18 ± 1,18
76	(β-Ala)- Sar ₁₀ - ACPLVNP LCLHPGW TCL(D- His)G ((β-Ala)- Sar ₁₀ -(SEQ ID NO: 68))	10,01 ± 1,55			75,15 ± 14,41
77	Ac-	5,41 ± 0,86			48,23 ± 15,72

Номер	п	а	с	т	о	Ki, нМ ± 95% CI			
(BCY60 19)		CPLVNPL CLHPGWT CLHG- Sar ₆ -(D-K) (Ac-(SEQ ID NO: 12)- Sar ₆ -(D-K))							
78		Ac- CPLVNPL CLHPGWT CL(D- His)G-Sar ₆ - (D-K) (Ac-(SEQ ID NO: 13)- Sar ₆ -(D-K))	15,6 ± 4,7					115,03 ± 41,16	
79		ACPLVNP LCLHPG(2 Nal)TCLH G (SEQ ID NO: 69)	162 ± 17,64						
80		RHDCPLV NPLCLLP GWTCA (SEQ ID NO: 70)	7,11 ± 0,72						
81		TPRCPLV NPLCLMP GWTCA (SEQ ID NO: 71)	9,8 ± 2,61						
82		ACPLVNP	46,2 n=1						

Номер	п	с	т	о	Ki, нМ ± 95% CI			
		LCLAPGW						
		TCA						
		(SEQ ID NO: 72)						
83		ACPLVNP			7,05 ± 1,11			
		LCLAPGW						
		TCSRS						
		(SEQ ID NO: 73)						
84		ACPLVNP			53,9 n=1			
		LCLEPGW						
		TCA						
		(SEQ ID NO: 74)						
85		ACPLVNP			10,95 ± 1,6			
		LCLEPGW						
		TCAKR						
		(SEQ ID NO: 75)						
86		ACPLVNP			56,15 ± 11,27			
		LCLHPGW						
		SCA						
		(SEQ ID NO: 76)						
87 (BCY60 26)		ACPLVNP			2,57 ± 0,63			18,6 ± 0,59
		LCLHPGW						
		SCRGQ						
		(SEQ ID NO: 77)						
88		Ac- CPLVNPL			1,64 ± 0,75			
		CLHPGWS						
		CRGQ						

Номер	п	с	т	о	Ki, нМ ± 95% CI			
		(Ac-(SEQ ID NO: 14))						
89		(β-Ala)- Sar ₁₀ - ACPLVNP LCLHPGW SCRGQ ((β-Ala)- Sar ₁₀ -(SEQ ID NO: 77))	2,86 ± 1,29				29,55 ± 4,61	
90		(β-Ala)- Sar ₁₀ - ACPLVNP LCLHPGW SC(HArg)G Q ((β-Ala)- Sar ₁₀ -(SEQ ID NO: 78))	5,41 ± 0,67				47,05 ± 11,47	
91 (BCY60 42)		Ac- CPLVNPL CLHPGWS CRGQ- Sar ₆ -(D-K) (Ac-(SEQ ID NO: 14)- Sar ₆ -(D-K))	5,98 ± 1,42				49,87 ± 14,44	
92		Ac- CPLVNPL CLHPGWS C(HArg)G Q-Sar ₆ -(D- K)	10,56 ± 6,56				75,27 ± 21,72	

Номер	Последовательность	K _i , нМ ± 95% CI			
	(Ac-(SEQ ID NO: 15)-Sar ₆ -(D-K))				
93	ACPLVNP LCLHPG(2 Nal)SCRG Q (SEQ ID NO: 79)	228 ± 103,88			
94	ACPLVNP LCLTPGW TCTNT (SEQ ID NO: 80)	13,25 ± 4,05			
95	ACPMVNP LCLHPGW KCA (SEQ ID NO: 81)	11,91 ± 3,73			
96	ACPMVNP LCLTPGW ICA (SEQ ID NO: 82)	16,07 ± 4,58			
97	ACPMVNP LCLHPGW TCA (SEQ ID NO: 83)	20 ± 1,02			

Таблица 5. Данные биологических испытаний ТАТА пептидных лигандов по изобретению (анализ конкурентного связывания)

Номер	Последовательность	K _i , нМ ± 95% CI
-------	--------------------	------------------------------

бициклического соединения		EphA2 человека	EphA2 мыши
		Флуоресцентный пептид	
		Референсное соединение С	Референсное соединение С
98	(β -Ala)-Sar ₁₀ -H(D-Asp)VT- C(Aib)(1Nal)G(Aib)F(1Nal)CP(tBuGly)N(HArg) P(D-Asp)C ((β -Ala)-Sar ₁₀ -(SEQ ID NO: 84))	251,5 $\pm$ 73,5	

Таблица 6. Данные биологических испытаний пептидных лигандов по изобретению (данные по конкурентному связыванию BDC с ТАТА каркасами)

Номер соединения BDC	Прекурсор бицикла	Общая формула	K _i , нМ	
			EphA2 человека	EphA2 мыши
			Флуоресцентный пептид	
			Референсное соединение С	Референсное соединение С
BCY6027	BCY6099	Формула (А)	10,23	
BCY6028	BCY6099	Формула (В)	13,04	
BCY6031	BCY6014	Формула (А)	12,62	34,70
BCY6032	BCY6014	Формула (В)	11,42	35,90

Таблица 7. Данные по селективности для пептидных лигандов по изобретению (селективность при анализе прямого связывания)

14	13	12	11	9	7	2	Номер бициклического соединения
					216	$516,5 \pm 236,18$	ErhA2 мыши
					$252,5 \pm 6,86$	$210 \pm 1,96$	ErhA2 крысы
							ErhA2 собаки
						>1000	ErhA3 человека и мыши
						>1000	ErhA3 крысы
>3000	>3000	>3000	>3000	>3000		>1000	ErhA4 человека
						$10890 n=1$	ErhA4 крысы и мыши
							ErhB1 крысы
							ErhB4 человека
							ErhA7 человека
							ErhA6 человека
							ErhA1 человека
							Фактор XIIa человека
							Карбоангидраза 9 человека
						>6000	CD38 человека

Исследование 2. Измерения флуоресцентной поляризации (альтернативный протокол)

(а) Конкурентное связывание

Пептиды без флуоресцентной метки подвергали испытаниям на конкурентное связывание с пептидом с флуоресцентной меткой и известной величиной K_d (таблица 9). Добавляли в планшет пять микролитров испытуемого соединения с возрастающими концентрациями (двухкратно), затем 10 мкл ErhA2 белка (таблица 8) при фиксированной концентрации, которая зависела от используемого флуоресцентного пептида (таблица 9),

затем добавляли 10 мкл флуоресцентного пептида. Буфер представлял собой буфер для анализа, такой как описанный выше, с DMSO <1%. Измерения проводили на считывающем устройстве для микропланшетов BMG PHERAstar FS, оснащенном оптическим модулем "FP 485 520 520", в котором используется возбуждающее излучение при 485 нм и проводится детекция параллельной и перпендикулярной эмиссии при 520 нм. Прибор PHERAstar FS использовали при 25°C в режиме 200 вспышек на лунку и с задержкой позиционирования 0,1 секунды, при этом измерение каждой лунки проводили с интервалами от 5 до 10 минут в течение 60 минут. В качестве варианта, измерения проводили с аналогичными вариантами времени на планшетном анализаторе Perkin Elmer Envision, оснащенном двухзеркальным FITC FP Dual Mirror, фильтром возбуждающего излучения FITC FP 480 и фильтрами эмиссионного излучения FITC FP P-pol 535 и FITC FP S-pol с 30 вспышками и со значением G-фактора 1,2. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Systat Sigmaplot версии 12.0 или 13.0, где величины mP в момент времени 60 минут аппроксимировали с помощью определенного пользователем уравнения третьего порядка с получением величины K_i :

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

Lig", "Klig" и "Prot" представляли собой определяемые величины, относящиеся к концентрации флуоресцентного пептида, K_d флуоресцентного пептида и концентрации EphA2, соответственно.

Таблица 8. Рецепторы Eph и источник

Рецептор (домен)	Вид	Формат/метка	Фирма-поставщик	Номер по каталогу
EphA2 (Ecto)	Человек	С-концевой полиHis	R&D systems	3035-A2
EphA2 (Ecto)	Человек	С-концевой полиHis	In-house	N/A
EphA2 (Ecto)	Мышь	С-концевой	Sino Biological	50586-M08H

		полиHis		
EphA2 (ligand binding)	Крыса	С-концевой полиHis	In-house	N/A

Таблица 9. Конечные концентрации флуоресцентного пептида и EphA2, используемые при проведении анализов на конкурентное связывание

Флуоресцентный пептид	Концентрация флуоресцентного пептида (нМ)	Концентрация человеческого EphA2 (нМ)	Концентрация мышинового EphA2 (нМ)	Концентрация крысиного EphA2 (нМ)
Референсное соединение С	0,8	2,4 или 25	50 или 15 нМ	25

Конкретные пептидные лиганды и бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению подвергали испытанию в упомянутом выше анализе на конкурентное связывание, и результаты представлены в таблицах 10-11.

Таблица 10. Конкурентное связывание с выбранными бициклическими пептидами

Номер бицикла	Человек Ki (нМ)	Мышь Ki (нМ)	Крыса Ki (нМ)
BCY6009 (Соединение 108)	12,7	26,7	18,0
BCY6014 (Соединение 67)	14,5	39,6	24,4
BCY6017 (Соединение 109)	8,3		
BCY6018 (Соединение 110)	13,1		
BCY6019 (Соединение 77)	6,4	16,0	
BCY6026 (Соединение 87)	4,4		
BCY6042 (Соединение 91)	6,7		
BCY6059 (Соединение 106)	43,2		
BCY6099	2,7	4,5	1,9

(Соединение 66)			
BCY6101 (соединение 101)	9,7	6,9	
BCY6102 (соединение 102)	14,6	25,1	
BCY6103 (соединение 100)	14,8	20,8	
BCY6104 (соединение 99)	5,1	19,8	
BCY6137 (Соединение 105)	2,2		
BCY6138 (Соединение 104)	566,0		
BCY6139 (соединение 103)	5,7		
BCY6141 (Соединение 112)	90,4		
BCY6152 (Соединение 111)	23,3		
BCY6153 (Соединение 113)	18,2		
BCY6160 (Соединение 107)	14,0		
BCY6039	9,4		
BCY6105	8,86		
BCY6106	12,9		
BCY6175	1		
BCY6107	19,18		

Результаты анализа конкурентного связывания в таблице 10 показывают, что нацеленные на EphA2 человека бициклические пептиды (BCY6014 и BCY6099) связываются с высокой аффинностью с EphA2 мыши и крысы. Аналогично, BCY6019 связывается с EphA2 как человека, так и мыши. Эти результаты показывают, что конкретные пептиды по изобретению могут использоваться в *in vivo* экспериментальных моделях на мышах и крысах для проведения исследований по оценке эффективности и токсических эффектов.

Таблица 11. Конкурентное связывание с выбранными бициклическими конъюгатами лекарственных средств (BDC)

Идентификационный номер бицикла	Человек K _i (нМ)	Мышь K _i (нМ)	Крыса K _i (нМ)
BCY6061	12,0	32,3	14,2
BCY6174	1,7	3,9	3,0
BCY6029	2,3		
BCY6033	9,9	34,2	13,4
BCY6037	7,3		
BCY6049	8,8	28,1	
BCY6053	48,2	29,7	
BCY6122	13,7	10,4	
BCY6136	1,9	5,5	3,2
BCY6030	5,6		
BCY6034	5,9	35,9	
BCY6038	2,8		
BCY6050	168,1	62,2	
BCY6054	53,6	73,6	
BCY6027	10,2		
BCY6031	12,5	35,1	20,0
BCY6035	15,2		
BCY6047	53,2	34,2	
BCY6051	54,0	43,6	
BCY6134	7,4	12,6	
BCY6135	2,4	5,0	2,9
BCY6154	8,0		
BCY6155	12,5		
BCY6063	7,8	66,8	
BCY6028	13,0		
BCY6032	11,4	35,9	
BCY6036	18,6		
BCY6048	120,7	87,2	
BCY6052	30,5	27,1	
BCY6064	12,5	40,7	

BCY6162	44,9		
BCY6082	10,5	34,1	13,9
BCY6150	17,9		
BCY6151	9,0		
BCY6161	2,1		
BCY6173	1,7	4,3	2,5
BCY6077	6,5	25,3	
BCY6055	15,8		
BCY6062	12,9	20,3	

Данные, приведенные в таблице 11, показывают, что конкретные бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению проявляют отличную перекрестную реактивность между EphA2 человека, мыши и грызунов. Поэтому, пептиды по изобретению может быть использован в *in vivo* экспериментальных моделях на мышах и крысах для проведения исследований по оценке эффективности и токсических эффектов.

(b) Измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

Не подвергавшиеся Fc-слиянию белки биотинилировали с помощью EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin в течение 1 часа в 4 mM ацетата натрия, 100 mM NaCl, pH 5,4 при трехкратном мольном избытке биотина относительно белка. Степень нанесения метки определяли с использованием набора Fluorescence Biotin Quantification Kit (Thermo) после диализа реакционной смеси в PBS. Для анализа связывания пептидов, использовали прибор Biacore T200 с чипом ХанТес CMD500D. Стрептавидин иммобилизовали на чипе, используя стандартную химическую реакцию сочетания амина при 25°C с HBS-N (10 mM HEPES, 0,15 M NaCl, pH 7,4) в качестве подвижного буфера. Вкратце, активировали поверхность карбоксиметилдекстрана путем введения в течение 7 минут смеси 1:1 0,4 M 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимида гидрохлорид (EDC)/0,1 M N-гидроксисукцинимид (NHS) при расходе 10 мкл/мин. Для захвата стрептавида, белок разбавляли до 0,2 мг/мл в 10 mM ацетата натрия (pH 4,5) и захватывали путем введения 120 мкл на активированную поверхность чипа. Остаточные активированные группы блокировали путем введения в течение 7 минут смеси 1 M этаноламин (pH 8,5):HBS-N (1:1). Буфер заменяли на PBS/0,05% Tween 20, и биотинилированный EphA2 захватывали до уровня 500-1500 резонансных единиц, используя разбавление белка до 0,2 мкМ в буфере. Приготавливали серию разбавлений пептидов в этом буфере с конечной концентрацией DMSO 0,5%, при этом наивысшая концентрация пептида составляла 50 или 100 нМ и 6 дополнительных двухкратных разбавлений. Анализ методом SPR проводили при 25°C при расходе 90 мкл/мин при 60 секундах ассоциации и 900-1200 секундах диссоциации. Проводили корректировку данных для исключения объемных эффектов DMSO. Все данные дважды сопоставляли с холостыми введениями и референсной поверхностью, используя стандартные процедуры обработки, и обработку данных и аппроксимацию кинетических данных

проводили с использованием программного обеспечения Scrubber software, version 2.0c (фирмы BioLogic Software). Данные аппроксимировали с использованием модели простого связывания 1:1, учитывающей в требуемых случаях эффекты переноса массы.

Для исследования связывания бициклических конъюгатов лекарственных средств использовали прибор Biacore 3000. Для биотинилированных белков уровни иммобилизации составляли 1500 резонансных единиц, а наивысшая концентрация составляла 100 нМ. Во всех других отношениях, метод был таким же, как описанный выше метод, с использованием либо чипа CMD500D, либо чипа CM5 (GE Healthcare). Для Fc-меченых белков, чип CM5 активировали, как описано выше, и затем козье антитело против человеческого IgG (Thermo-Fisher H10500) разбавляли до 20 мкг/мл в 10 мМ ацетата натрия pH 5,0 и захватывали до приблизительно 3000 резонансных единиц. Поверхность затем блокировали, как описано выше. Проводили последовательный захват Fc-меченых белков с получением приблизительно 200-400 резонансных единиц белка-мишени. Используемые белки описаны ниже. Все белки ресуспендировали в рекомендованных фирмой-производителем буферах и концентрациях и захватывали с использованием 5-10 мкг/мл белка в PBS/0,05% Tween 20.

Таблица 12

Рецептор	Вид	Формат/метка	Фирма-поставщик	Номер по каталогу
EphA1	Человек	Fc-слияние	Sino Biologics	15789-H02H
EphA2	Человек	0,95 моль биотин/мономер	In house	N/A
EphA2	Мышь	Fc-слияние	R&D Systems	639-A2
EphA2	Крыса	1,4 моль биотин/мономер	In house	N/A
EphA3	Человек	Fc-слияние	R&D Systems	6444-A3
EphA3	Мышь	Fc-слияние	Sino Biologics	51122-M02H
EphA3	Крыса	Fc-слияние	Sino Biologics	80465-R02H
EphA4	Человек	Fc-слияние	Sino Biologics	11314-H03H
EphA4	Мышь	Fc-слияние	Sino Biologics	50575-M02H
EphA4	Крыса	Fc-слияние	Sino	80123-R02H

			Biologics	
EphA5	Человек	3,1 моль биотин/мономер	R&D Systems	3036-A5
EphA6	Человек	Fc-слияние	R&D Systems	5606-A6
EphA7	Человек	Fc-слияние	R&D Systems	6756-A7
EphB1	Крыса	Fc-слияние	R&D Systems	1596-B1
EphB4	Человек	Fc-слияние	Sino Biologics	10235-H02H

Конкретные пептидные лиганды и бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению подвергали испытанию в упомянутом выше анализе на конкурентное связывание, и результаты представлены в таблицах 13-15.

Таблица 13. Анализ связывания методом SPR выбранных бициклических пептидов и бициклических конъюгатов лекарственных средств по изобретению

Номер бицикл /BDC	Человек				Мышь				Крыса			
	K_D (нМ)	K_{off} (c^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	K_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	K_D (нМ)	K_{off} (c^{-1})	$t_{1/2}$ (мин)	K_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	K_D (нМ)	K_{off} (c^{-1})	$t_{1/2}$ (мин)	K_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)
BCY6026	1,02	1,02E-03	11,3	9,92E+05								
BCY6031	1,99	4,95E-03	2,3	2,49E+06								
BCY6032	2,10	5,27E-03	2,2	2,52E+06								
BCY6033	3,41	3,43E-03	3,5	9,99E+05	21,8	6,37E-03	1,8	2,92E+05	166	4,42E-03	2,6	2,67E+04

BCY6173	BCY6136	BCY6082	BCY6034
0,73	1,17	2,42	1,64
1,24E-03	1,15E-03	2,42E-03	3,65E-03
9,3	10,0	4,8	3,2
1,69E+06	9,86E+05	9,87E+05	2,23E+06
2,95	2,53	18,3	
1,14E-03	1,11E-03	5,97E-03	
10,1	10,4	1,9	
3,86E+05	4,37E+05	3,27E+05	
1,10	2,96	28,8	
9,60E-04	9,11E-04	3,64E-03	
12,0	12,6	3,2	
8,81E+05	3,07E+05	1,26E+05	

В таблице 13 представлена подробная информация по аффинностям связывания и кинетическим параметрам (K_{off} и K_{on}) для связывания выбранных бициклических конъюгатов лекарственных средств с EphA2 человека, полученные методом SPR.

Таблица 14. Анализ связывания методом SPR выбранных бициклических конъюгатов лекарственных средств по изобретению с гомологами Eph человека

Номер BDC	EphA1	EphA3	EphA4	EphA5	EphA6	EphA7	EphB4
BCY6033	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 25 мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ
BCY6082	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 25 мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ
BCY6136	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 25 мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ

BCY6173	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 5 мкМ	отсутствие связывания @ 25 мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ	отсутствие связывания @ 20мкМ
---------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------

В таблице 14 представлены результаты связывания для четырех бициклических конъюгатов лекарственных средств (BCY6033, BCY6082, BCY6136 and BCY6173) при проведении анализа методом SPR с близкородственными гомологами эфрина человека. Результаты показывают, что соединения по изобретению не проявляют значимого связывания с близкородственными гомологами EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7 и EphB4 человека.

Таблица 15. Анализ связывания методом SPR выбранных бициклических конъюгатов лекарственных средств по изобретению с ортологами Eph мыши и крысы

Номер BDC	EphA3 мыши	EphA4 мыши	EphA3 крысы	EphB1 крысы
BCY6033	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ
BCY6082	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ
BCY6136	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ
BCY6173	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ	отсутствие связывания @ 20 мкМ

Результаты в таблице 15 показывают, что конкретные бициклические конъюгаты лекарственных средств по изобретению (BCY6033, BCY6082, BCY6136 и BCY6173) являются также селективными в отношении EphA2 мыши и крысы и не проявляют значимого связывания с близкородственными гомологами EphA3 и EphA4 мыши, и EphA3 и EphB1 крысы.

Исследования 3 и 7-23

В каждом из исследований 3 и 7-23, применяли следующую методологию для каждого исследования:

а) Материалы

(i) Животные и условия их содержания

Животные

Вид: домовая мышь

Штамм: Balb/c nude или CB17-SCID

Возраст: 6-8 недель

Масса тела: 18-22 г

Число животных: 9-90 мышей

Фирма-поставщик животных: Shanghai Lingchang Biotechnology Experimental Animal Co. Limited.

Условия содержания

Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре и влажности по 3-5 животных в каждой клетке.

Температура: 20~26°C.

Влажность 40-70%.

Клетки изготовлены из поликарбоната. Размер 300 мм x 180 мм x 150 мм. Материал для подстилки - стержень кукурузного початка, который заменяют дважды в неделю.

Рацион. Животные имели свободный доступ к стерилизованному облучением сухому гранулированному корму на протяжении всего периода исследования.

Вода. Животные имели свободный доступ к стерилизованной питьевой воде.

Идентификация клетки. Идентифицирующие этикетки для каждой клетки содержали следующую информацию: число животных, пол, штамм, дата получения, лечение, номер исследования, номер группы и дата начала лечения.

Идентификация животного. Животных маркировали путем маркировки уха.

(ii) Испытание и материалы для положительного контроля

Номер	Описание физического состояния	Молекулярная масса	Чистота	Условие хранения
BCY6031	Лиофилизированный порошок	3878,92	97,99%	Хранили при -80°C
BCY6033	Лиофилизированный порошок	4260,01	99,12%	Хранили при -80°C
BCY6082	Лиофилизированный порошок	3911,04	96,8%	Хранили при -80°C
BCY6135	Лиофилизированный порошок	4021	95,14%	Хранили при -80°C
BCY6136	Лиофилизированный порошок	4402,23	97,5-98,6%	Хранили при -80°C
BCY6173	Лиофилизированный порошок	4101,15	95,80%	Хранили при -80°C
BCY6174	Лиофилизированный порошок	4537	99,50%	Хранили при -80°C
BCY6175	Лиофилизированный порошок	4492,29	96,20%	Хранили при -80°C
BCY8245	Лиофилизированный порошок	4173,85	99,30%	Хранили при -80°C
BCY8781	Лиофилизированный порошок	4173,83	99,00%	Хранили при -80°C

ADC (MEDI-547) ¹	Раствор (концентрация 10,47 мг/мл)	-	> 99,00%	Хранили при -80°C
--------------------------------	---------------------------------------	---	----------	----------------------

¹Подробные сведения о MEDI-547 (полностью человеческое моноклональное антитело 1C1 (распознающее как человеческий, так и мышинный EphA2), конъюгированное с MMAF через MC линкер) приведены в публикации Jackson et al (2008) Cancer Res 68, 9367-74.

((b) Экспериментальные методы и методики

(i) Наблюдения

Все методики, относящиеся к содержанию, уходу и лечению животных при исследовании проводили в соответствии с руководящими принципами, одобренными Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных (IACUC) международной фармацевтической, биофармацевтической и медицинской компанией WuXi AppTec, следуя руководству Международной ассоциации оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC). Во время проведения мониторинга, осуществляемого по обычной программе, животных подвергали ежедневному осмотру на наличие любых воздействий роста опухоли и лечения на нормальное поведение, такое как подвижность, потребление корма и воды (путем только визуального осмотра), прибавление/потеря массы тела, тусклость глаз/шерсти и любое другое аномальное воздействие, указанное в протоколе. Случай смерти и наблюдаемые клинические проявления регистрировали с учетом числа животных в каждой подгруппе.

(ii) Измерения опухоли и конечные клинические результаты

Главным конечным клиническим результатом являлось обнаружение возможности отсрочки роста опухоли или возможности излечения мышей. Объем опухоли измеряли три раза в неделю в двух направлениях, используя штангенциркуль, и объем выражали в мм³, используя формулу: $V = 0,5 \times a \times b^2$, где а и b представляют собой наибольший и наименьший диаметры опухоли, соответственно. Затем размер опухоли использовали для расчетов величины Т/С. Величина Т/С (в процентах) представляет собой показатель противоопухолевой активности; Т и С представляют собой средние объемы в подвергаемых лечению и контрольных группах, соответственно, на данный день.

Для каждой группы рассчитывали TGI, используя формулу: $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$; T_i представляет собой средний объем опухоли в подвергаемой лечению группе на данный день, T_0 представляет собой средний объем опухоли в подвергаемой лечению группе на день начала лечения, V_i представляет собой средний объем опухоли в контрольной группе с плацебо на тот же самый день, что и для T_i , и V_0 представляет собой средний объем опухоли в группе с плацебо на день начала лечения.

(iii) Сбор образцов

В конце исследования, опухоли во всех группах собирали для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE).

(iv) Статистический анализ

Сводная статистика, включающая стандартное значение и стандартную ошибку среднего значения (SEM), приведена для объема опухоли в каждой группе в каждый момент времени.

Статистический анализ различия в объеме опухоли между группами проводили на данных, полученных в момент времени достижения наилучшего терапевтического результата после введения последней дозы.

Для сравнения объема опухоли между группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), и затем получали оценку статистической значимости с критерием Фишера (F-критерий) (отношение дисперсии результатов лечения к дисперсии ошибки), сравнения между группами проводили с использованием теста Геймса-Ховелла (Games-Howell). Все данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5.0. Статистически значимой считали величину $P < 0,05$.

Исследование 3. In vivo эффективность в модели LU-01-0046 PDX

Сначала получают линии раковых клеток (CCL) из опухолей пациентов, которые приобретают способность к пролиферации в *in vitro* культурах клеток. В результате *in vitro* манипуляции, линии раковых клеток (CCL), которые традиционно используют при исследованиях рака, подвергаются генетическим трансформациям, которые не восстанавливаются, когда клетки выращивают *in vivo*. В результате культивирования клеток, отбирают клетки, которые лучше приспособлены для выживания в культуре, удаляют резидентные опухолевые клетки и белки, которые взаимодействуют с раковыми клетками, и культура становится фенотипически гомогенной. В настоящее время, исследователи объясняют причину того, что только 5% противораковых препаратов одобряется Управлением по контролю за качеством пищевых и фармацевтических препаратов США после преклинических испытаний, так как при проведении исследований отсутствует гетерогенность опухоли и отсутствует стромальное микроокружение, свойственное человеку. В частности, CCL-ксенотрансплантаты часто не позволяют предсказать ответ на воздействие лекарственного средства в первичных опухолях, так как CCL не позволяют изучить механизм возникновения резистентности к лекарственному средству или влияния микроокружения на ответ при действии лекарственного средства, которые обнаруживаются в первичных опухолях человека. Для того чтобы преодолеть эти проблемы, авторы изобретения использовали модели PDX для повышения предсказательной способности преклинических моделей.

Модель PDX создают путем имплантации раковой ткани из первичной опухоли пациента непосредственно иммунодефицитной мыши. В модели PDX может сохраняться гистология опухоли пациента, в том числе присутствие неопухолевых клеток (например, стромальных клеток), и поэтому, эта модель лучше имитирует микроокружение опухоли. В силу этого, модели PDX обычно лучше отражают гетерогенность и гистологию первичных опухолей, чем CCL-ксенотрансплантаты.

BCY6031 подвергали скринингу в PDX ксенотрансплантате первичной аденокарциномы (LU-01-0046), полученном от пациента с немелкоклеточной карциномой

легкого (NSCLC). Было показано, что LU-01-0046 экспрессирует высокие уровни EphA2, используя секвенирование РНК. BCY6031 проявлял высокую активность в модели LU-01-0046 и, поэтому, он является новым перспективным терапевтическим препаратом для лечения немелкоклеточного рака легкого.

(а) Подвергаемые лечению группы

Цель проведения эксперимента заключалась в сравнении роста опухоли у животных, подвергаемых лечению с помощью плацебо, с ростом опухоли у животных, подвергаемых лечению с помощью BCY6031 при дозе 5 мг/кг один раз в неделю в течение четырех недель.

Таблица 16

Группа	n	Лечение	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	6	Плацебо	-	10	внутривенно	Один раз в две недели x 1 неделя
2	3	BCY6031	5	10	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели

Примечание: n: число животных; объем дозирования: скорректированный объем дозирования с учетом массы тела.

(b) Метод эксперимента

(i) Информация о PDX

Таблица 17

Название модели	Тип рака	Скорость роста опухоли	Массив данных	RSQ	Экспрессия EPH2
LU-01-0046	NSCLC	Размер опухоли может достигать 1000 мм ³ через 40 дней после инокуляции опухоли	6,790	31,312	Высокая

(ii) Инокуляция опухоли

Каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность приблизительно 30 мм³ фрагмента опухоли LU-01-0046. Лечение лекарственным средством начинали, когда средний объем опухоли достигал 943 мм³. Испытуемый препарат, способ введения, частота дозирования и число животных в каждой группе описаны выше.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата

Таблица 18

Испытуемый препарат	Доза(мг/кг)	Рецептура
---------------------	-------------	-----------

Плацебо	--	50 мМ ацетат, 10% сахараза рН 5 (без DMSO)
BCY6031	5	Растворить 4,59 мг BCY6031 в 4,498 мл буфера для приготовления с получением исходного раствора 1 мг/мл BCY6031. Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6031 с помощью 450 мкл буфера для приготовления.

(с) Результаты

(i) Летальность, процент смертности и прибавка и потеря массы тела

Массу тела животных регулярно контролировали в качестве косвенной меры токсичности. Изменение массы тела у самок бестимусных мышей линии BALB/c, несущих опухоль LU-01-0046, которым вводили BCY6031, представлено на фигуре 1.

(ii) Кривая роста опухоли

Кривая роста опухоли представлена на фигуре 2.

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для BCY6031 в PDX модели LU-01-0046 рассчитывали на основе измерений объема опухолей на день 7 после начала лечения.

Таблица 19. Анализ ингибирования роста опухоли (T/C и TGI) на день 7

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	2191±473	--	--	--
2	BCY6031, 5 мг/кг, один раз в неделю	463±158	21,1	138,6	p<0,05

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Обсуждение

В исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6031 в PDX модели LU-01-0046. Измеренные массы тела представлены на фигуре 1. Объемы опухолей в подвергнутой лечению группе в различные моменты времени представлены в таблице 19 и на фигуре 2.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 2191 мм³ на день 7. Препарат BCY6031 при дозе 5 мг/кг проявлял высокую противоопухолевую активность с измеренной величиной объема опухоли 463 мм³ (TGI=138,6%, p<0,05) ко дню 7. Кроме того, лечение препаратом BCY6031 приводило к полному уничтожению опухолей от дня 32, и не происходило возобновления роста опухоли после временного прекращения дозирования на день 28. Лечение препаратом BCY6031 не вызывало значительной потери

массы тела (фигура 1), и не было обнаружено признаков неблагоприятного воздействия у подвергавшихся лечению мышей на протяжении всего исследования.

Исследование 4. In vivo эффективность BCY6136 в ксенотрансплантатных моделях CDX

В исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в трех полученных моделях раковых клеточных линий (CDX): линии фибросаркомы HT1080, линии трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 и линии немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) NCI-H1975.

(a) Методика проведения эксперимента

Мышам линии Balb/c подкожно инокулировали опухолевые клетки в правую боковую поверхность, и лечение с помощью лекарственного средства начинали, когда средний объем опухоли достигал от 150 до 200 мм³. Измерения опухоли и статистический анализ проводили так, как описано выше. Несущим опухоль животным вводили один раз в неделю BCY6136 или плацебо.

(b) Обсуждение

На фигурах 4-6 показано, что BCY6136 является эффективным в ксенотрансплантатных моделях рака молочной железы, легкого и фибросаркомы после дозирования один раз в неделю

Модель фибросаркомы HT1080

В модели HT1080 полный регресс роста опухоли достигался к дню 14 после дозирования BCY6136 один раз в неделю в дни 0 и 7 при дозе 3 и 5 мг/кг (фигура 4). Дозирование BCY6136 один раз в неделю при дозе 2 мг/кг в дни 0 и 7 вызывало остановку роста опухоли (частичный регресс) (фигура 4). Лечение с применением BCY6136 приводило к незначительной потере массы тел (фигура 4, график в правом верхнем углу), и на протяжении всего исследования не обнаруживались неблагоприятные клинические проявления у подвергнутых лечению лекарственным средством мышей.

Модель NCI-H1975 NSCLC

Полный регресс роста опухоли в модели NCI-H1975 наблюдался приблизительно на день 28 после дозирования BCY6136 один раз в неделю при дозе 2 и 3 мг/кг (фигура 5). После прекращения дозирования на день 35, не обнаруживалось возобновление роста опухоли у животных, которым вводили дозу 3 мг/кг, в период от дня 35 до дня 72, когда были закончены измерения размера передней лапы животных, которым вводили дозу 3 мг/кг (фигура 5). Дозирование BCY6136 при величине дозы 2 мг/кг вызывало полный регресс в этой модели приблизительно со дня 28. После прекращения дозирования на день 35, не обнаруживалось возобновление роста опухоли приблизительно вплоть до дня 51 при величине дозы 2 мг/кг. При этом уровне дозы наблюдалось умеренное возобновление роста опухоли приблизительно от дня 51 и вплоть до окончания исследования в день 77. Лечение с помощью BCY6136 при дозе 1 мг/кг вызывало остановку роста опухоли (частичный регресс) (фигура 5). Лечение с применением BCY6136 вызывало незначительную потерю массы тела

(фигура 5, график в правом верхнем углу), и на протяжении всего исследования не обнаруживались неблагоприятные клинические проявления у подвергнутых лечению лекарственным средством мышей.

Модель рака молочной железы MDA-MB-231

Остановку роста опухоли (частичный регресс) наблюдали в модели MDA-MB231 после дозирования один раз в неделю при дозе 2 и 3 мг/кг от дня 0 до дня 45 (фигура 6). Наблюдалась некоторая потеря массы тела (относимая за счет массы опухоли) у животных, которым вводили дозу 2 мг/кг (фигура 6, график в правом верхнем углу).

Эти результаты показывают, что BCY6136 вызывает глубокое ингибирование роста опухоли у мышей, которым имплантировали ксенотрансплантаты CDX фибросаркомы, рака молочной железы и рака легкого, после дозирования один раз в неделю.

Исследование 5. Исследования безопасности на крысах

Шесть (6) самцов крыс распределяли случайным образом на 3 группы по 2 крысы в группе для определения токсичности BCY6136, затем вводили внутривенно болюсную инъекцию при дозе 5, 7,5 и 10 мг/кг в дни 1 и 8. Исследование заканчивали на день 15.

Не было обнаружено значительных воздействий на показатели коагуляции (протромбиновое время (сек), активированное парциальное тромбопластиновое время (сек) или уровни фибриногена (г/л)) в дни 2, 12 и 15 (данные не показаны). Не сообщалось по поводу прижизненных случаев кровотечения, и не было обнаружено доказательств внутреннего кровотечения после патологоанатомического вскрытия.

Исследование 6. Исследования безопасности на яванских макаках

Проводили токсикологические исследования продолжительностью двадцать восемь дней при применении BCY6136 на яванских макаках. BCY6136 дозировали в дозе 1,0 и 2,0 мг/кг в дни 1, 8, 15 и 22. Животных подвергали эвтаназии и проводили вскрытие в день 29 (через 7 дней после введения последней дозы).

Не было обнаружено значительных воздействий на показатели коагуляции по сравнению с исходным уровнем в дни 18, 22 и 25 (данные не показаны) и день 29 (таблица 20). Не сообщалось по поводу прижизненных случаев кровотечения, и не было обнаружено доказательств внутреннего кровотечения после патологоанатомического вскрытия.

Таблица 20. Показатели коагуляции на день 29 после дозирования BCY6136 яванским макакам при дозе 1,0 и 2,0 мг/кг

	1,0 мг/кг x 4		2,0 мг/кг x 4	
	Исходный уровень	День 29	Исходный уровень	День 29
Протромбиновое время (сек)	13,4	11,7	9,4	9,7
Протромбиновое время (сек)	11	9,2	11,2	11,0
Активированное парциальное	18,9	19,4	19,4	20,9

тромбопластиновое время (сек)				
Активированное парциальное тромбопластиновое время (сек)	16,1	15,7	18,7	18,2
Уровни фибриногена (г/л)	2,08	2,42	1,86	6,1
Уровни фибриногена (г/л)	2,28	2,35	1,82	3,1

Исследование 7. Исследование in vivo эффективности BCY6033 и BCY6136 и ADC при лечении ксенотрансплантата PC-3 у бестимусных мышей линии Balb/c

(a) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности BCY6033 и BCY6136 при лечении ксенотрансплантата PC-3.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	-	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
5	ADC	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
6	BCY6033	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(c) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Клетки опухоли PC-3 следует содержать в среде F12K, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки следует пересевать стандартным методом два раза в неделю. Для инокуляции опухоли, следует собирать клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, и подсчитывать их.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши следует инокулировать подкожно в правую боковую поверхность опухолевые клетки РС-3 (10×10^6). Животных следует рандомизировать, и лечение следует начинать, когда средний объем опухоли достигнет приблизительно 150 мм^3 . Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в следующей таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат/уксусная кислота pH 5 10% сахарозы
BCY6136	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл буфера для плацебо
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл буфера для плацебо
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл буфера для плацебо
ADC	0,3	Разбавить 26 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 874 мкл буфера для ADC
BCY6033	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 630 мкл буфера для плацебо

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлена на фигурах 7-9.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат РС-3, приведен в таблице 21.

Таблица 21. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	0	2	4	7	9	11	14	16	18	21
1	Плацебо, один раз в неделю	149±9	235±9	377±9	718±30	1126±41	1431±79	1792±69	2070±152		
2	BCY6136, 1мг/кг, один раз в неделю	150±11	185±25	228±31	201±17	183±23	153±38	137±33	107±32	64±28	45±23

6	5	4	3	2	1	Группа		6	5	4	3
3, 3 мг/кг, один раз в	ADC 3 мг/кг, один раз в неделю	6 3 мг/кг, один раз в	6, 2 мг/кг, один раз в	6, 1 мг/кг, один раз в	Плацебо, один раз в неделю	Лечение		3, 3 мг/кг, один раз в	ADC 3 мг/кг, один раз в неделю	6 3 мг/кг, один раз в	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю
59±31	53±16	21±10	21±11	35±18		23		151±33	151±27	149±2	149±18
44±27	50±22	23±12	22±12	28±14		25		214±53	203±10	155±8	179±28
39±24	46±23	27±14	22±12	37±19		28		204±51	210±12	144±16	158±22
40±29	70±35	22±11	24±12	34±17		30		192±53	189±11	132±20	137±16
47±32	78±39	24±12	33±16	42±21		32		163±43	185±16	107±28	122±15
41±27	53±27	20±11	22±11	42±23		35		151±40	190±37	94±23	114±20
41±30	60±30	27±14	26±14	43±21		37		141±39	158±36	83±22	101±16
34±24	53±27	12±6	22±12	28±14		39		116±36	124±35	70±27	79±20
33±27	40±22	12±6	16±9	18±9		42		83±28	103±27	38±16	57±19
								63±32	74±14	35±17	42±17

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в ксенотрансплантатной модели РС-3 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 16 после начала лечения.

Таблица 22. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	2070±152	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	107±32	5,2	102,2	p<0,001
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	79±20	3,8	103,6	p<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	70±27	3,4	104,1	p<0,001
5	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	124±35	6,0	101,4	p<0,001
6	BCY6033, 3 мг/кг, один раз в неделю	116±36	5,6	101,8	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность испытуемых препаратов в ксенотрансплантатной модели РС-3. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены на фигурах 7-9 и в таблицах 21 и 22.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили плацебо, достигал 2070 мм³ на день 16. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг, один раз в неделю (TV=107 мм³, TGI=102,2%, p<0,001), BCY6136 при дозе 2 мг/кг, один раз в неделю (TV=79 мм³, TGI=103,6%, p<0,001) и BCY6136 при 3 мг/кг, один раз в неделю (TV=70 мм³, TGI=104,1%, p<0,001) демонстрировали мощное противоопухолевое действие.

BCY6033 при дозе 3 мг/кг, один раз в неделю (TV=116 мм³, TGI=101,8%, p<0,001) и ADC при дозе 3 мг/кг, один раз в неделю (TV=124 мм³, TGI=101,4%, p<0,001) демонстрировали сопоставимое противоопухолевое действие.

В этом исследовании, регулярно контролировали массу тела животных. У всех мышей масса тела сохранялась на нормальном уровне.

Исследование 8. Изучение in vivo эффективности BCY6136 при лечении бестимусных мышей линии Balb/c в ксенотрансплантатной модели PC-3

(a) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой активности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата PC-3 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	N ^a	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	--	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
2	BCY6136	0,167	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
3 ^b	BCY6136	0,5	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
4	BCY6136	1,5	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
5 ^b	BCY6136	0,5	4	внутривенно	Один раз в две недели x 2 недели
6 ^b	BCY6136	1,5	4	внутривенно	Один раз в две недели x 2 недели
7	EphA2-ADC	0,33	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
8	EphA2-ADC	1	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели

9	EphA2-ADC	3	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели
10 ^c	Доцетаксел	15	4	внутривенно	Один раз в неделю x 4 недели

^a N, число животных в каждой группе

^b После 4 недельного лечения, представленного в таблице дизайна эксперимента, мышей в группах 3, 5 и 6 подвергали лечению с помощью BCY6136 в дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю от дня 52 по схеме текущего контроля.

^c Вследствие очень большой потери массы тела у мышей после первого дозирования, которых подвергали лечению доцетакселом, лечение приостанавливали в течение 2 недель, затем на день 28 проводили лечение при более низкой дозе (доцетаксел, 10 мг/кг). После чего, мышей подвергали лечению с помощью BCY6136 при дозировании 1,5 мг/кг один раз в неделю со дня 42 до дня 70.

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Опухолевые клетки содержали в среде F12K, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки пересеивали стандартным методом два раза в неделю. Для инокуляции опухоли, собирали клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность опухолевые клетки PC-3 (10 x 10⁶) в 0,2 мл PBS. Когда средний объем опухоли достигал 454 мм³, 52 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в следующей таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Чистота	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	-	25 mM гистидина pH 7 10% сахарозы
BCY6136	98,6%	-	50 mM ацетата 10% сахарозы pH 5
		1	Растворить 2,70 мг BCY6136 в 2,662 мл ацетатного буфера
		0,3	Разбавить 300 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 700 мкл ацетатного буфера ¹
		0,15	Разбавить 600 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 600 мкл ацетатного буфера
		0,05	Разбавить 200 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 1000 мкл ацетатного буфера

		0,0167	Разбавить 66,7 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл ВСУ6136 с помощью 1133,3 мкл ацетатного буфера
EphA2-ADC	-	-	25 мМ гистидин pH 5,5
		0,033	Разбавить 9,3 мкл исходного раствора 4,24 мг/мл EphA2-ADC с помощью 1191 мкл гистидинового буфера
		0,1	Разбавить 28 мкл исходного раствора 4,24 мг/мл EphA2-ADC с помощью 1172 мкл гистидинового буфера
		0,3	Разбавить 84,9 мкл исходного раствора 4,24 мг/мл EphA2-ADC с помощью 1115 мкл гистидинового буфера
Доцетаксел	-	10	Смешать 0,5 мл 20 мг доцетаксела с 1,5 мл буфера
		1,5	Разбавить 180 мкл исходного раствора 10 мг/мл доцетаксела с помощью 1020 мкл солевого буфера
¹ 50 мМ ацетат 10% сахарозы pH 5,3. 25 мМ гистидин pH 5,5			

(с) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Кривая роста опухоли представлена на фигуре 10.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самцов бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат PC-3, приведен в таблице 23.

Таблица 23. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени (от дня 0 до дня 20)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения									
		0	2	4	6	8	10	13	15	17	20
1	Плацебо, один раз в неделю	456±25	648±50	880±23	1022±29	1178±118	1327±133	1631±93	1868±90	2052±139	2364±102
2	ВСУ6136 0,167 мг/кг, один раз в неделю	450±33	631±55	695±78	739±39	850±68	904±73	975±47	1089±74	1124±92	1188±111
3	ВСУ6136 0,5 мг/кг, один раз в неделю	451±47	622±96	519 ±70	460±55	398±50	329±38	260±33	249±33	231±38	234±42

10	9	8	7	6		5	4
Доцетаксел 15 мг/кг, один раз в две недели	ЕрhA2-ADC 3 мг/кг, один раз в две недели	ЕрhA2-ADC 1 мг/кг, один раз в две недели	ЕрhA2-ADC 0,33 мг/кг, один раз в две недели	1,5 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 1,5 мг/кг, один раз в две недели	BCY6136 0,5 мг/кг, один раз в две недели	BCY6136 1,5 мг/кг, один раз в неделю
453±62	452±60	450±49	457±43	452±42	454±37	458±49	
584±72	593±98	617±48	636±57	590±75	643±25	587±63	
632±56	643±141	673±50	712±70	457±49	531±37	494±54	
636±48	593±106	721±61	792±78	375±44	458±33	363±32	
568±50	433±103	782±78	870±87	328±47	411±32	283±32	
408±31	290±81	755±67	900±58	242±63	382±49	237±24	
374±26	268±64	840±93	1049±66	206±61	430±88	192±13	
388±36	232±60	913±91	1242±123	197±62	522±124	164±16	
361±25	225±66	978±100	1443±129	182±55	560±129	155±20	
419±31	184±62	981±100	1637±181	128±36	530±147	131±19	

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в ксенотрансплантатной модели РС-3 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 20 после начала лечения.

Таблица 24. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	2364±102	--	--	--
2	BCY6136, 0,167 мг/кг, один раз в неделю	1188±111	50,2	61,4	p<0,001
3	BCY6136, 0,5 мг/кг, один раз в неделю	234±42	9,9	111,4	p<0,001
4	BCY6136, 1,5 мг/кг, один раз в неделю	131±19	5,5	117,2	p<0,001
5	BCY6136, 0,5 мг/кг, один раз в две недели	530±147	22,4	96,0	p<0,001
6	BCY6136, 1,5 мг/кг, один раз в две недели	128±36	5,4	117,0	p<0,001
7	EphA2-ADC, 0,33 мг/кг, один раз в неделю	1637±181	69,2	38,1	p<0,001
8	EphA2-ADC, 1 мг/кг, один раз в неделю	981±100	41,5	72,2	p<0,001
9	EphA2-ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	184±62	7,8	114,0	p<0,001
10	Доцетаксел, 15 мг/кг, один раз в неделю	419±31	17,7	101,8	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(d) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность испытываемых препаратов в ксенотрансплантатной модели РС-3. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены 10 и в таблицах 23 и 24.

Средний размер опухоли у мышей, которым вводили плацебо, достигал 2364 мм³ на день 20. Препарат BCY6136 при дозе 0,167 мг/кг один раз в неделю (TV=1188 мм³, TGI=61,4%, p<0,001), при и дозе 0,5 мг/кг один раз в две недели (TV=530 мм³, TGI=96,0%, p<0,001), при дозе 0,5 мг/кг один раз в неделю (TV=234 мм³, TGI=111,4%, p<0,001) и при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю (TV=131 мм³, TGI=117,2%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность, зависимую от дозы или от частоты введения дозы, на день 20. Препарат BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в две недели (TV=128 мм³, TGI=117,0%, p<0,001) проявлял сопоставимую противоопухолевую активность с препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю. Из них, мыши, подвергаемые лечению препаратом BCY6136 при дозе 0,5 мг/кг один раз в неделю или препаратом BCY6136 при дозе 0,5 мг/кг один раз в две недели, обнаруживали очевидный рецидив опухоли после прекращения лечения, дальнейшее лечение препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю со дня 52 давало хороший результат по регрессу опухоли. Мыши, подвергавшиеся лечению препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в две недели, также обнаруживали рецидив опухоли после прекращения лечения, но дальнейшее дозирование не приводило к полному регрессу опухоли. Мыши, подвергавшиеся лечению препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю, не обнаруживали рецидива опухоли вплоть дня 48.

Препарат EphA2-ADC при дозе 0,33 мг/кг один раз в неделю (TV=1637 мм³, TGI=38,1%, p<0,001), при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=981 мм³, TGI=72,2%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг, один раз в неделю (TV=184 мм³, TGI=114,0%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность, зависящую от величины дозы, на день 20. Мыши, подвергнутые лечению препаратом EphA2-ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю, не обнаруживали рецидива опухоли вплоть дня 59.

Доцетаксел при дозе 15 мг/кг один раз в неделю (TV=419 мм³, TGI=101,8%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность, но вызывал очень большие потери массы тела у животных. После прекращения лечения, мыши обнаруживали очевидный рецидив опухоли. Лечение препаратом BCY6136 при дозе 1,5 мг/кг один раз в неделю со дня 42 давало хороший результат по регрессу опухоли у этих мышей.

Исследование 9 Испытание in vivo эффективности BCY6033, BCY6136 и BCY6082 при лечении ксенотрансплантата NCI-H1975 у бестимусных мышей линии Balb/c

(a) Цель исследования

Целью исследования являлась оценка in vivo противоопухолевой активности BCY6033, BCY6136 и BCY6082 при лечении ксенотрансплантата NCI-H1975 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозируемый объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
--------	---------	---	--------------	--------------------------	--------------------	-------

1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6033	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6033	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6033	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
5	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
6	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
7	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
8	BCY6082	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
9	BCY6082	3	5	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Для инокуляции опухоли, собирали клетки, находящиеся в фазе экспоненциального роста, и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность опухолевые клетки NCI-H1975 (10×10^6) в 0,2 мл PBS. Когда средний объем опухоли достигал 149 мм^3 , 36 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в следующей таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Лечение	Доза (мг/мл)	Рецептура
Плацебо		50 mM ацетат, 10% сахароза pH 5

BCY6033	1	Растворить 6,71 мг BCY6033 в 6,710 мл буфера для приготовления
	0,3	Разбавить 270 мкл 1 мг/мл BCY6033 с помощью 630 мкл буфера для приготовления
	0,2	Разбавить 180 мкл 1 мг/мл BCY6033 с помощью 720 мкл буфера для приготовления
	0,1	Разбавить 90 мкл 1 мг/мл BCY6033 с помощью 810 мкл буфера для приготовления
BCY6136	1	Растворить 3,79 мг BCY6136 в 3,695 мл буфера для приготовления
	0,3	Разбавить 270 мкл 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл буфера для приготовления
	0,2	Разбавить 180 мкл 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл буфера для приготовления
	0,1	Разбавить 90 мкл 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл буфера для приготовления
BCY6082	1	Взвесить и растворить 4,30 мг BCY6082 в 4,162 мл буфера для приготовления
	0,5	Разбавить 450 мкл 1 мг/мл BCY6082 с помощью 450 мкл буфера для приготовления
	0,2	Разбавить 180 мкл 1 мг/мл BCY6082 с помощью 720 мкл буфера для приготовления

(iv) Сбор образцов

На PG-D23, фиксировали формалином и заливали парафином (FFPE) опухоли группы 1.

На PG-D44, фиксировали формалином и заливали парафином (FFPE) опухоли группы 2 и 5.

В конце исследования, фиксировали формалином и заливали парафином (FFPE) опухоли группы 6.

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и рост опухоли представлены на фигурах 11-13.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самцов бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат NCI-H1975, приведен в таблицах 25-29.

Таблица 25. Объем остаточной опухоли (PG-D0~PG-D17)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения							
		0	2	4	7	9	11	14	17
1	Плацебо, один раз в неделю	148±4	195±1 1	297±3 3	466±6 4	732±10 7	1028±1 92	1278±2 52	1543±2 98
2	BCY6033, 1 мг/кг, один раз в неделю	149±1 0	160±4	207±1 3	259±4 9	330±69	365±83	341±59	336±54
3	BCY6033, 2 мг/кг, один раз в неделю	149±1 0	183±1 1	276±2 4	365±4 2	405±20	364±19	319±32	304±33
4	BCY6033, 3 мг/кг, один раз в неделю	149±6	161±4	207±2 6	260±2 1	270±42	243±52	187±53	131±43
5	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	150±6	178±2 0	232±4 9	336±4 3	400±24	407±42	299±11 3	261±12 7
6	BCY6136, 2 мг/кг,	150±1 4	181±2 6	237±2 7	277±3 6	297±37	306±55	256±53	218±49

	один раз в неделю								
7	BCY61 36, 3 мг/кг, один раз в неделю	148±9	168±1 0	231±6	365±1 6	390±13	423±42	319±26	228±16
8	BCY60 82, 2 мг/кг, один раз в неделю	148±5	157±4	223±1 9	370±8 4	447±10 2	658±18 8	906±33 2	1123±4 10
9	BCY60 82, 5 мг/кг, один раз в неделю	148±6	176±1 2	235±1 9	378±5 9	436±68	510±82	484±78	491±10 3

Таблица 26. Объем остаточной опухоли (PG-D18~PG-D35)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения							
		18	21	23	25	28	30	33	35
1	Плацебо, один раз в неделю	1864±3 95	2371± 470	--	--	--	--	--	--
2	BCY6033, 1 мг/кг,	278±71	306±8 1	343±8 6	366±8 9	466±1 15	481±1 12	619±1 70	780±2 36

	один раз в недел ю								
3	ВСУ6 033, 2 мг/кг, один раз в недел ю	172±25	95±12	61±6	39±4	13±1	12±1	6±3	6±3
4	ВСУ6 033, 3 мг/кг, один раз в недел ю	75±15	29±4	20±6	13±2	6±0	4±0	1±0	2±1
5	ВСУ6 136, 1 мг/кг, один раз в недел ю	215±11 3	205±1 17	197±1 13	200±1 05	202±1 12	202±1 17	230±1 42	241±1 27
6	ВСУ6 136, 2 мг/кг, один раз в	149±31	99±30	69±22	42±13	30±10	16±8	20±9	4±2

	недел ю								
7	BCY6 136, 3 мг/кг, один раз в недел ю	149±17	94±30	50±15	41±21	21±8	6±6	10±6	3±1
8	BCY6 082, 2 мг/кг, один раз в недел ю	1199±4 08	1528± 604	1978± 792	2499± 931	--	--	--	--
9	BCY6 082, 5 мг/кг, один раз в недел ю	471±14 3	390±1 33	368±1 22	295±1 02	227±8 6	--	--	--

Таблица 27. Объем остаточной опухоли (PG-D37~PG-D53)

Групп а	Лечение	Дни после начала лечения							
		37	39	42	44	46	49	51	53
2	BCY603 3, 1 мг/кг, один раз в неделю	877±188	945±145	1258±17 3	--	--	--	--	--

3	BCY603 3, 2 мг/кг, один раз в неделю	3±1	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0
4	BCY603 3, 3 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0±0	0±0	0±0	1±0	0±0	1±0	1±0
5	BCY613 6, 1 мг/кг, один раз в неделю	277±149	294±159	351±188	--	--	--	--	--
6	BCY613 6, 2 мг/кг, один раз в неделю	7±4	2±1	1±0	3±1	2±1	3±2	6±3	14± 10
7	BCY613 6, 3 мг/кг, один раз в неделю	3±3	2±1	1±0	0±0	0±0	0±0	1±0	1±0

Таблица 28. Объем остаточной опухоли (PG-D56~PG-D74)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения								
		56	58	60	63	65	67	70	72	74
3	BCY6033 , 2 мг/кг, один раз в неделю	1±0	1±0	1±0	1±0	1±0	2±1	4±3	7±6	--

4	BCY6033 , 3 мг/кг, один раз в неделю	1±0	1±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	--
6	BCY6136 , 2 мг/кг, один раз в неделю	16±1 1	27± 18	34±2 3	45±3 1	63±4 0	71±4 7	95±7 0	111± 73	122± 75
7	BCY6136 , 3 мг/кг, один раз в неделю	1±0	1±0	1±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	--

Таблица 29. Объем остаточной опухоли (PG-D77~PG-D98)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		77	81	84	88	91	95	98
6	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	208±1 12	337±1 23	501±172	626±1 82	856±2 45	1035±16 9	1266±39

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для BCY6033, BCY6136 и BCY6082 в ксенотрансплантатной модели NCI-H1975 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 21 после начала лечения.

Таблица 30. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	2371±470	--	--	--
2	BCY6033, 1 мг/кг, один раз в неделю	306±81	12,9	92,9	p<0,001

3	BCY6033, 2 мг/кг, один раз в неделю	95±12	4,0	102,5	p<0,001
4	BCY6033, 3 мг/кг, один раз в неделю	29±4	1,2	105,4	p<0,001
5	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	205±117	8,6	97,5	p<0,001
6	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	99±30	4,2	102,3	p<0,001
7	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	94±30	4,0	102,4	p<0,001
8	BCY6082, 2 мг/кг, один раз в неделю	1528±604	64,4	37,9	p>0,05
9	BCY6082, 5 мг/кг, один раз в неделю	390±133	16,4	89,1	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (Т/С).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6033, BCY6136 и BCY6082 в ксенотрансплантатной модели NCI-H1975. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены на фигурах 11-13 и в таблицах 25-30.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 2371 мм³ на день 21. Препарат BCY6033 при дозе 1 мг/кг (TV=306 мм³, TGI=92,9%, p<0,001), при дозе 2 мг/кг (TV=95 мм³, TGI=102,5%, p<0,001) и дозе 3 мг/кг (TV=29 мм³, TGI=105,4%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность. Препарат BCY6033 при дозе 2 мг/кг и при дозе 3 мг/кг уничтожал опухоли или вызывал регресс опухоли до малого размера,

лечение приостанавливали со дня 35, и опухоли не обнаруживали очевидного возобновления роста в течение следующих 5-6 недель постоянного наблюдения.

Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг ($TV=205 \text{ мм}^3$, $TGI=97,5\%$, $p<0,001$), при дозе 2 мг/кг ($TV=99 \text{ мм}^3$, $TGI=102,3\%$, $p<0,001$) и при дозе 3 мг/кг ($TV=94 \text{ мм}^3$, $TGI=102,4\%$, $p<0,001$) проявлял высокую противоопухолевую активность. BCY6136 при дозе 2 мг/кг и дозе 3 мг/кг уничтожал опухоли или вызывал регресс опухоли до малого размера. Лечение приостанавливали со дня 35, и опухоли в группе с дозой 3 мг/кг не обнаруживали очевидного возобновления роста в течение следующих 5-6 недель постоянного наблюдения, однако опухоли в группе с дозой 2 мг/кг обнаруживали очевидное возобновление роста, и возобновление дозирования не приводило к значительному ингибированию опухоли.

Препарат BCY6082 при дозе 2 мг/кг ($TV=1528 \text{ мм}^3$, $TGI=37,9\%$, $p>0,05$) не проявлял очевидной противоопухолевой активности, препарат BCY6082 при дозе 5 мг/кг ($TV=390 \text{ мм}^3$, $TGI=89,1\%$, $p<0,001$) проявлял значительную противоопухолевую активность.

В этом исследовании, у одной мыши, подвергнутой лечению препаратом BCY6033 при дозе 3 мг/кг, в процессе проведения контроля была обнаружена потеря массы тела более 15%, у других мышей масса тела практически не изменялась.

Исследование 10. Исследование in vivo эффективности BCY6136 в модели LU-01-0251 PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c

(a) Цель исследования

Целью изучения является оценка in vivo противоопухолевой активности BCY6136 в модели LU-01-0251 PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозируемый объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	5	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
5	ADC	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0251 (~30 мм³). Для исследования эффективности, лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 174 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в следующей таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	50 мМ ацетат, 10% сахара рН 5
BCY6136	0,3	Растворить 6,11 мг BCY6136 в 20 мл ацетатного буфера ¹
	0,2	Разбавить 940 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 470 мкл ацетатного буфера
	0,1	Разбавить 470 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 940 мкл ацетатного буфера
ADC	0,3	Разбавить 43 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 1457 мкл буфера для ADC ²
¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахарозы рН 5		
² Буфер для ADC: 20 мМ гистидин рН 5,5		

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлена на фигуре 14.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли на день 28 после начала лечения у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0251, приведен в таблице 31.

Таблица 31. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
День	Плацебо	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю
0	174±17	175±15	174±17	175±14	174±16
3	264±33	230±29	205±21	187±19	227±12

7	403±68	281±55	154±21	118±13	239±42
10	562±83	370±104	111±19	72±12	241±46
14	777±163	362±104	62±17	30±5	191±47
17	1021±246	437±136	46±13	17±3	139±39
21	1472±342	526±167	30±18	4±3	101±31
24	1790±417	491±132	32±24	1±1	70±23
28	2208±512	499±128	32±30	0±0	39±14

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования роста опухоли для BCY6136 и ADC в модели LU-01-0251 PDX рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 28 после начала лечения.

Таблица 32. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	2208±512	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	499±128	22,6	84,0	P<0,001
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	32±30	1,4	107,0	P<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0,0	108,6	P<0,001
5	ADC, 3 мг/кг, один раз в	39±14	1,8	106,6	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM). ^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 и ADC в модели LU-01-0251 PDX. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены на фигуре 14 и в таблицах 31 и 32.

В этом исследовании, средний размер опухоли у мышей, которым вводили плацебо, достигал 2208 мм³ на день 28 после начала лечения. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=499 мм³, TGI=84,0%, p<0,001), при дозе 2 мг/кг, один раз в неделю (TV=32 мм³, TGI=107,0%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=0 мм³, TGI=108,6%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность. Препарат ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=39 мм³, TGI=106,6%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность.

Исследование 11. Исследование in vivo эффективности BCY6136 в модели LU-01-0251 PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c

(a) Цель исследования

Целью изучения является оценка *in vivo* противоопухолевой активности BCY6136 в модели LU-01-0251 PDX на бестимусных мышах линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозируемый объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю x 21 неделя
2	BCY6136	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю x 28 недель
3 ^a	BCY6136	5	2	10	внутривенно	один раз в неделю x 70 недель
4 ^b	BCY6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю x 56 недель
5 ^c	ADC	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю x 70 недель

^a Схему дозирования сохраняли от дня 0 до дня 70 для всех мышей в этой группе, затем мышь 3-2 и мышь 3-4 подвергали дополнительному дозированию BCY6136 в дозе 3 мг/кг один раз в неделю со дня 77, в то время как лечение других мышей из группы 3 временно прекращали.

^b Схему дозирования сохраняли от дня 0 до дня 56 для всех мышей в этой группе.

^c Схему дозирования сохраняли от дня 0 до дня 70 для всех мышей в этой группе.

(c) Методы и методики эксперимента

(i) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мышке инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0251 (~30 мм³). Для исследования эффективности, лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 960 мм³. Введение испытуемого

препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	25 мМ гистидин 10% сахара рН 7
BCY6136	0,3	0,3 мг/мл BCY6136 получали как описано выше в исследовании 10
	0,2	Разбавить 940 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 470 мкл гистидинового буфера ¹
	0,1	Разбавить 470 мкл исходного раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 940 мкл гистидинового буфера
ADC	0,3	Разбавить 43 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 1457 мкл буфера для ADC ²
¹ Гистидиновый буфер: 25 мМ гистидин 10% сахара рН 7		
² Буфер для ADC: 20 мМ гистидин рН 5,5		

(iii) Сбор образцов

Опухоль мыши #3-2 собирали для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE) на день 94. Опухоли мышей #5-2 и 5-3 собирали и помещали в один блок для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE) на день 140.

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлена на фигуре 15.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в период времени от дня 0 до дня 28 после начала лечения у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0251, приведен в таблице 33.

Таблица 33. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
День	Плацебо	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю
0	962±102	963±97	962±137	960±103	959±124

3	1176±108	1003±121	973±105	989±128	1043±158
7	1351±142	1056±151	873±125	890±98	1100±156
10	1591±179	1122±139	722±157	674±96	1172±188
14	1951±225	1417±191	503±151	342±64	1228±174
17	2301±344	1672±262	398±160	216±43	1143±186
21		1794±328	307±169	94±26	996±187
24		1867±408	261±168	62±14	867±178
28		2120±483	217±167	45±16	713±178

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования роста опухоли для BCY6136 и ADC в модели LU-01-0251 PDX рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 17 после начала лечения.

Таблица 34. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	2301±344	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1672±262	72,7	47,0	p>0,05
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	398±160	17,3	142,1	P<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	216±43	9,4	155,6	P<0,001
5	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	1143±186	49,7	86,3	P<0,01

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM);

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 и ADC в модели LU-01-0251 PDX. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергаемых лечению, в различные моменты времени представлены на фигуре 15 и в таблицах 33 и 34.

В этом исследовании, лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 960 мм³. На день 17 после начала лечения, средний объем опухоли мышей, подвергаемых лечению с помощью плацебо, достигал 2301 мм³. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=1672 мм³, TGI=47,0%, p>0,05) не проявлял очевидной противоопухолевой активности; препарат BCY6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=398 мм³, TGI=142,1%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=216 мм³, TGI=155,6%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность на день 17.

После лечения в течение 70 дней препаратом BCY6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю, у 3 из 5 этих мышей обнаруживали полный регресс опухоли, у оставшихся 2 мышей обнаруживали очевидный рецидив опухоли от дня 42 до дня 77. При последующем проведении лечения двух рецидивов опухолей препаратом BCY6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю со дня 7, у одной из опухолей достигался очевидный регресс опухоли, в то время как другая опухоль проявляла резистентность к лечению.

После лечения в течение 56 дней препаратом BCY6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю, у всех мышей в этой группе обнаруживали полный регресс опухоли.

Препарат ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю ($TV=1143 \text{ мм}^3$, $TGI=86,3\%$, $p<0,01$) проявлял очевидную противоопухолевую активность на день 17, после проведения лечения в течение еще 53 дней, у этих мышей обнаруживали дополнительный, но не полный регресс опухоли.

В этом исследовании, у некоторых мышей обнаруживалась резкая потеря массы тела, которая может быть связана с длительным периодом кормления иммунодефицитных мышей.

Исследование 12. Исследование in vivo эффективности BCY6033, BCY6136, BCY6082 и BCY6031 в модели LU-01-0046 NSCLC PDX у бестимусных мышей линии Balb/c

(a) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности BCY6033, BCY6136, BCY6082 и BCY6031 в обширных опухолях LU-01-0046 PDX у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозируемый объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
BCY						
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6082	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6082	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6033	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю

5	BCY6033	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
6	BCY6136	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
7	BCY6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
8	ADC	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
9	BCY6031	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0046 (~30 мм³). Лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 955 мм³ для исследования препаратов BT17BDC и 1039 мм³ для исследования препаратов BCY. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецепт приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат 10% сахароза pH 5
BCY6033	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 1350 мкл ацетатного буфера ¹
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
BCY6136	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1350 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
BCY6082	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6082 с помощью 1350 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл

		BCY6082 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
BCY6031	0,3	Растворить 5,72 мг BCY6031 в 5,6 мл ацетатного буфера с получением исходного раствора 1 мг/мл. Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6031 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
ADC	0,3	Разбавить 43 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 1457 мкл буфера ²

¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахара pH 5

² Растворить 0,419 г гидрохлорида гистидина в 100 мл воды, использовать 1М HCl для доведения величины pH 5,5

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлена на фигуре 16.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046, представлен в таблице 35.

Таблица 35. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени (кросс-секционное исследование бициклических препаратов (BCY))

[illegible]

7		6		5		4		3	
3 мг/кг, один раз в неделю	ВСУ6136,	1 мг/кг, один раз в неделю	ВСУ6136,	3 мг/кг, один раз в неделю	ВСУ6033,	1 мг/кг, один раз в неделю	ВСУ6033,	3 мг/кг, один раз в неделю	ВСУ6082,
1036±100		1037±130		1046±128		1030±124		1033±111	
784±146		1163±146		555±85		1173±227		1040±124	
548±107		1927±283		441±144		1791±324		1294±182	
362±110		2483±530		182±76		2408±484		1298±101	
325±122		--		163±94		--		1849±189	
275±152		--		114±54		--		2052±168	
233±187		--		88±76		--		1999±425	

8	3 мг/кг, один раз в неделю	ADC,	1033±114	1155±230	2200±505	--	--	--	--
	3 мг/кг, один раз в неделю	BCY6031,							
9	3 мг/кг, один раз в неделю	BCY6031,	1042±117	820±149	1319±233	901±188	672±198	522±315	515±323
	3 мг/кг, один раз в неделю	BCY6031,							

Примечание: объем остаточной опухоли не обнаруживали после дня 22 для групп 3, 5, 7 и 9.

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 PDX рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 22 и день 28, соответственно, для двух кросс-секционных исследований после начала лечения.

Таблица 36. Анализ ингибирования роста опухоли (кросс-секционные исследования BCYs на день 22)

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	6186±596*	--	--	--
2	BCY6082, 1 мг/кг, один раз в неделю	5805±428*	93,8	7,5	p>0,05
3	BCY6082, 3 мг/кг, один раз в неделю	1999±425	32,3	81,2	p<0,01
4	BCY6033, 1 мг/кг, один раз в неделю	4384±881*	70,9	34,8	p>0,05

5	BCY6033, 3 мг/кг, один раз в неделю	88±76	1,4	118,6	P<0,001
6	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	4564±981*	73,8	31,4	p>0,05
7	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	233±187	3,8	115,6	p<0,001
8	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	5446±1250*	88,0	14,2	p>0,05
9	BCY6031, 3 мг/кг, один раз в неделю	515±323	8,3	110,2	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM);

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (Т/С).

* В некоторых группах исследования прекращали до дня 22, и объем опухоли вычисляли путем использования уравнения экспоненциального роста, представленного ниже:

Группа плацебо: $Y=995,4 \times \exp(0,1134 \times X)$.

Группа BCY6082, 1мг/кг: $Y=939,1 \times \exp(0,1128 \times X)$.

Группа BCY6033, 1мг/кг: $Y=846,6 \times \exp(0,0945 \times X)$.

Группа BCY6136, 1мг/кг: $Y=855,0 \times \exp(0,0974 \times X)$.

Группа ADC, 3мг/кг: $Y=757,4 \times \exp(0,1312 \times X)$.

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании проводили оценку терапевтической эффективности испытуемых препаратов в отношении обширных опухолей LU-01-0046. Измеренные объемы опухолей для всех подвергаемых лечению групп в различные моменты времени представлены на фигуре 16 и в таблицах 35 и 36.

В этом исследовании BCYs, средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, составлял 6186 мм³ на день 22. Препараты BCY6082, BCY6033, BCY6136 при дозе 1 мг/кг и препарат ADC при дозе 3 мг/кг не проявляли очевидной противоопухолевой активности, когда размер опухоли перед началом лечения составлял 1000 мм³.

Препарат BCY6082 (TV=1999 мм³, TGI=81,2%, p<0,01), препарат BCY6033 (TV=88 мм³, TGI=118,6%, p<0,001), препарат BCY6136 (TV=233 мм³, TGI=115,6%, p<0,001) и препарат BCY6031 (TV=115 мм³, TGI=110,2%, p<0,001) при дозе 3 мг/кг проявляли значительную противоопухолевую активность. Среди них, применение BCY6033 и BCY6136 приводило к полному уничтожению 2/5 и 4/5 опухолей.

Исследование 13. In vivo эффективность BCY6136 в модели бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046 NSCLC PDX

(a) Цель исследования

Целью исследования являлась оценка in vivo терапевтической эффективности BCY6136 в модели бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046 NSCLC PDX.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	5	--	внутривенно	один раз в неделю x 2 недели
2	BCY6136	5	1	внутривенно	один раз в неделю x 3 недели
3	BCY6136	5	2	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели
4	BCY6136	5	3	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели
5	ADC	5	3	внутривенно	один раз в неделю x 3 недели

6	ADC	5	5	внутривенно	один раз в неделю x 3 недели
---	-----	---	---	-------------	------------------------------------

Примечание: исследование в группах прекращали, когда средний объем опухоли превышал 2000 мм³, и опухоли собирали для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE): группа 1 на PG-D14, группа 5 на PG-D18, группа 2 и 6 на PG-D21, и группа 3 и 4 на PG-D31.

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли конкретного типа (~30 мм³). Лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал приблизительно 198 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Группа	Соединения	Доза (мг/кг)	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
1	Плацебо	-	-	50 мМ ацетат, 10% сахароза рН 5 (без DMSO)
2	BCY6136	1	0,1	Растворить 10,93 мг BCY6136 в 10,766 мл среды, используя ультразвуковую обработку, для получения исходного раствора 1 мг/мл BCY6136. Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1350 мкл среды
3	BCY6136	2	0,2	Разбавить 300 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1200 мкл среды
4	BCY6136	3	0,3	исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1050 мкл среды
Буфер 2: растворить 0,419 г гидрохлорида гистидина в 100 мл воды, использовать 1 М HCl для доведения величины рН до 5,5				
5	ADC	3	0,3	Разбавить 43 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 1457 мкл буфера 2
6	ADC	5	0,5	Разбавить 71,6 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 1428,4 мкл буфера 2

Примечание: дозируемый препарат обычно является свежеприготовленным.

(iii) Сбор образцов

Исследования в группах прекращали, когда средний объем опухоли достигал более 2000 мм³, и, после последнего измерения, опухоли собирали для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE): группа 1 на PG-D14, группа 5 на PG-D18, группа 2 и 6 на PG-D21, и группа 3 и 4 на PG-D31.

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлена на фигуре 17.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени в модели на самках бестимусных мышей линии Balb/c, несущих LU-01-0046 NSCLC PDX, представлен в таблице 37.

Таблица 37. Объем остаточной опухоли (мм³) в зависимости от времени

Группа	1	2	3	4	5	6
Лечение	Плацебо один раз в неделю	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	ADC 3 мг/кг, один раз в неделю	ADC 5 мг/кг, один раз в неделю
0	201 ± 37	198 ± 39	201 ± 40	200 ± 46	195 ± 28	195 ± 40
3	441 ± 82	310 ± 59	283 ± 77	155 ± 40	418 ± 99	389 ± 68
7	927 ± 171	547 ± 88	423 ± 132	74 ± 19	643 ± 159	596 ± 116
10	1546 ± 377	747 ± 121	321 ± 108	31 ± 8	938 ± 230	882 ± 134
14	2307 ± 594	1058 ± 140	264 ± 95	26 ± 11	1475 ± 466	1215 ± 193
17	-	1390 ± 205	127 ± 41	26 ± 13	2281 ± 556	1576 ± 228
21	-	2138 ± 301	118 ± 34	64 ± 42	-	2049 ± 242
24	-	-	101 ± 40	99 ± 63	-	-
28	-	-	255 ± 140	276 ± 176	-	-
31	--	-	582 ± 346	477 ± 283	-	-

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в модели на бестимусных мышях линии Balb/c, несущих LU-01-0046 PDX, рассчитывали на основе объема опухоли, измеренного на PG-D14.

Таблица 38. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C (%) ^b	TGI (%) ^c	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо один раз в	2307 ± 594	--	--	--

	неделю				
2	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю	1058 ± 140	45,9	59,1	p<0,05
3	BCY6136 2 мг/кг, один раз в неделю	264 ± 95	11,4	97,0	p<0,001
4	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	26 ± 11	1,1	108,3	p<0,001
5	ADC 3 мг/кг, один раз в неделю	1475 ± 466	63,9	39,2	p>0,05
6	ADC 5 мг/кг, один раз в неделю	1215 ± 193	52,7	51,6	p>0,05

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывали путем деления среднего объема опухоли в группе для подвергавшейся лечению группы на средний объем опухоли в группе для контрольной группы (T/C).

^c TGI рассчитывали для каждой группы, используя формулу: $TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В настоящем исследовании оценивали терапевтическую эффективность испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 PDX. Измеренные объемы опухолей во всех подвергавшихся лечению группах в различные моменты времени представлены на фигуре 17 и в таблицах 37 и 38.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 2307 мм³ на PG-D14. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг (TV=1058 мм³, TGI=59,1%, p<0,05), при дозе 2 мг/кг (TV=264 мм³, TGI=97,0%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг (TV=26 мм³, TGI=108,3%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность. ADC при дозе 3 мг/кг и 5 мг/кг не проявлял явной противоопухолевой активности (p>0,05).

В этом исследовании, масса тела животных во всех группах сохранялась практически постоянной.

Исследование 14. Исследование in vivo эффективности BCY6033, BCY6136, BCY6082, BCY6173, BCY6175 и BCY6031 в модели LU-01-0046 NSCLC PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c

(a) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 NSCLC PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
Часть 1						
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6033	5	1/2	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6033	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	5	1/2	10	внутривенно	один раз в неделю
5	BCY6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
6	BCY6082	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
7	BCY6082	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
Часть 2						
8	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю

9	BCY6173	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
10	BCY6173	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
11	BCY6175	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю
12	BCY6031	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0046 (~30 мм³). Лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 200 мм³, в случае части 1 исследования, и 192 мм³, в случае части 2 исследования. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Test article	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат 10% сахара рН 5
BCY6033	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 1350 мкл ацетатного буфера ¹
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
BCY6136	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1350 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
BCY6082	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6082 с помощью 1350 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6082 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
BCY6173	0,1	Растворить 3,65 мг BCY6173 в 3,5 мл ацетатного буфера

		с получением 1 мг/мл исходного раствора. Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл ВСУ6173 с помощью 1350 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл ВСУ6173 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
ВСУ6175	0,3	Растворить 3,02 мг ВСУ6175 в 2,9 мл ацетатного буфера с получением 1 мг/мл исходного раствора. Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл ВСУ6175 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
ВСУ6031	0,3	Растворить 5,72 мг ВСУ6031 в 5,6 мл ацетатного буфера с получением 1 мг/мл исходного раствора. Разбавить 450 мкл 1 мг/мл ВСУ6031 с помощью 1050 мкл ацетатного буфера
1. Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахара рН 5		

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлена на фигурах 18-22.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли на день 21 после начала лечения у самок бестимусных мыши линии Balb/c, несущих LU-01-0046, представлен в таблицах 39 и 40.

Таблица 39. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени (часть 1)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	3	6	10	14	17	21
1	Плацебо, один раз в неделю	202±2 6	328±4 8	536±6 8	953±10 7	1386±97	1833±13 2	2551±24 2
2	ВСУ6033, 1 мг/кг, один раз в неделю	201±2 3	285±4 7	449±8 7	623±11 2	891±196	967±228	1285±23 4
3	ВСУ6033, 3 мг/кг, один раз в неделю	201±2 6	187±4 3	91±34	37±14	3±3	0±0	0±0

4	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	200±3 3	293±5 6	426±9 1	682±15 1	964±194	976±258	1285±23 4
5	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	201±3 3	194±3 1	135±2 7	52±18	13±9	4±4	0±0
6	BCY6082, 1 мг/кг, один раз в неделю	201±2 9	295±4 3	466±6 5	877±80	1201±10 6	1502±10 8	1826±22 4
7	BCY6082, 3 мг/кг, один раз в неделю	201±3 4	235±3 6	310±4 4	398±65	634±136	729±184	1042±29 0

Таблица 40. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени (часть 2)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	3	7	10	14	17	21
8	Плацебо, один раз в неделю	192±3 0	311±8 3	562±14 6	830±23 0	1320±44 4	1652±52 8	2342±65 1
9	BCY6173, 1 мг/кг, один раз в неделю	191±3 3	318±5 8	553±88	817±16 5	1314±27 6	1546±27 6	2151±26 2
10	BCY6173, 3 мг/кг, один раз	192±3 7	259±5 1	400±53	455±28	636±92	646±138	890±260

	в неделю							
11	BCY617 5, 3 мг/кг, один раз в неделю	192±4 2	186±5 7	92±38	19±11	0±0	0±0	0±0
12	BCY603 1, 3 мг/кг, один раз в неделю	191±3 8	207±4 6	387±70	355±11 0	544±159	643±185	874±281

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования роста опухоли для испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 PDX рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 21 после начала лечения.

Таблица 41. Анализ ингибирования роста опухоли (часть 1)

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	2551±242	--	--	--
2	BCY6033, 1 мг/кг, один раз в неделю	1285±234	50,4	53,9	p<0,001
3	BCY6033, 3 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0,0	108,6	p<0,001
4	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1285±234	50,4	53,9	p<0,001
5	BCY6136,	0±0	0,0	108,5	p<0,001

	3 мг/кг, один раз в неделю				
6	BCY6082, 1 мг/кг, один раз в неделю	1826±224	71,6	30,8	p<0,05
7	BCY6082, 3 мг/кг, один раз в неделю	1042±290	40,8	64,2	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM); ^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

Таблица 42. Анализ ингибирования роста опухоли (часть 2)

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
8	Плацебо, один раз в неделю	2342±651	--	--	--
9	BCY6173, 1 мг/кг, один раз в неделю	2151±262	91,8	8,9	p>0,05
10	BCY6173, 3 мг/кг, один раз в неделю	890±260	38,0	67,5	p<0,05
11	BCY6175, 3 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0,0	108,9	p<0,001
12	BCY6031, 3 мг/кг, один раз в неделю	874±281	37,3	68,2	p<0,05

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM); ^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность испытуемых препаратов в модели LU-01-0046 PDX. Измеренные объемы опухолей для всех подвергаемых

лечению групп в различные моменты времени представлены на фигурах 18-22 и в таблицах 39-42.

В части 1 исследования, средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 2551 мм^3 на день 21 после начала лечения.

Препарат BCY6033 при дозе $1/2 \text{ мг/кг}$ один раз в неделю ($TV=1285 \text{ мм}^3$, $TGI=53,9\%$, $p<0,001$) и препарат BCY6136 при дозе $1/2 \text{ мг/кг}$ один раз в неделю ($TV=1285 \text{ мм}^3$, $TGI=53,9\%$, $p<0,001$) проявлял значительную противоопухолевую активность, но она не приводила к регрессу опухоли. Препарат BCY6033 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю ($TV=0 \text{ мм}^3$, $TGI=108,6\%$, $p<0,001$) и препарат BCY6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю ($TV=0 \text{ мм}^3$, $TGI=108,5\%$, $p<0,001$) полностью уничтожали опухоли, 1 из 5 опухолей, соответственно, в группах BCY6033 и BCY6136 3 мг/кг обнаруживала возобновление роста после временного прекращения дозирования, и после возобновления дозирования опухоли были резистентны к лечению препаратами BCY6033 или BCY6136. Остальные опухоли в группах дозирования BCY6033 и BCY6136 (4/5 в каждой группе) не обнаруживали возобновления роста после 80 дней временного прекращения дозирования.

Препарат BCY6082 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю ($TV=1826 \text{ мм}^3$, $TGI=30,8\%$, $p<0,05$) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю ($TV=1042 \text{ мм}^3$, $TGI=64,2\%$, $p<0,001$) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность, но не вызывал регресса опухоли.

В части 2 исследования, средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 2342 мм^3 на день 21 после начала лечения. BCY6173 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю ($TV=2151 \text{ мм}^3$, $TGI=8,9\%$, $p>0,05$) не проявлял противоопухолевой активности. BCY6173 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю ($TV=890 \text{ мм}^3$, $TGI=67,5\%$, $p<0,05$) проявлял очевидную противоопухолевую активность.

Препарат BCY6175 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю ($TV=0 \text{ мм}^3$, $TGI=108,9\%$, $p<0,001$) полностью уничтожал 4/5 опухолей на день 14. Препарат BCY6031 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю ($TV=874 \text{ мм}^3$, $TGI=68,2\%$, $p<0,05$) проявлял очевидную противоопухолевую активность, но не вызывал регресса опухоли.

Исследование 15. Исследование in vivo эффективности BCY6136 в модели LU-01-0412 NSCLC PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c

(a) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo терапевтической эффективности BCY6136 в модели LU-01-0412 NSCLC PDX на бестимусных мышцах линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозирующи й объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема

1	Плацебо	6	--	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели
2	BCY613 6	6	1	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели
3	BCY613 6	6	3	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели
4	BCY824 5	6	3	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели
5	BCY878 1	6	3	10	внутривенно	Один раз в неделю, 4 недели

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0412 (~30 мм³). Животных рандомизировали, когда средний объем опухоли достигал 159 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	25 мМ гистидин 10% сахара pH 7
BCY6136	1	Растворить 6,06 мг BCY6136 в 5,969 мл 50 мМ ацетат/уксусная кислота pH 5 10% сахара
	0,1	Разбавить 180 мкл раствора 1 мг/мл BT5528 с помощью 1620 мкл 50 мМ ацетат/уксусная кислота pH 5 10% сахара
	0,3	Разбавить 540 мкл раствора 1 мг/мл BT5528 с помощью 1260 мкл 50 мМ ацетат/уксусная кислота pH 5 10% сахара
BCY8245	1	Растворить 4,15 мг порошка BCY8245 в 4,121 мл в буфере для плацебо
	0,3	Разбавить 540 мкл раствора 1 мг/мл BCY8245 с

		помощью 1260 мкл буфера для плацебо
BCY8781	1	Растворить 4,08 мг порошка BCY8781 в 80,8 мкл DMSO, затем разбавить до 1 мг/мл с помощью 3958 мкл буфера для плацебо
	0,3	Разбавить 540 мкл раствора 1 мг/мл BCY8781 с помощью 1260 мкл буфера для плацебо

(iii) Сбор образцов

Собирали плазму мышей, которым вводили плацебо и которым вводили BCY6136, BCY8245 и BCY8781, через 30 минут и через 24 часа после дозирования. Собирали опухоли у мышей, которым вводили плацебо и которым вводили BCY6136, BCY8245 и BCY8781, через 24 часа после дозирования.

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Кривая роста опухоли представлена на фигуре 23.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии BALB/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0412, представлен в таблице 43.

Таблица 43. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
Дни	Плацебо один раз в неделю x 4 недели	BCY6136 1 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	BCY8245 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	BCY8781 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели
0	159±11	159±13	159±11	159±12	159±11
4	255±12	214±16	197±16	168±18	176±21
7	309±20	237±16	195±16	132±10	167±13
11	395±31	246±19	156±18	78±4	107±15
14	464±31	300±18	177±29	45±5	72±12
18	521±26	369±32	210±32	21±2	44±8
21	611±33	470±46	225±32	11±1	31±6
25	737±68	632±47	252±37	6±1	20±6
28	788±80	664±52	299±37	2±1	14±5
32	1104±142	758±70	416±52	1±1	12±5

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для BCY6136, BCY8245 и BCY8781 в ксенотрансплантатной модели LU-01-0412 рассчитывали на основе измерений объема опухолей на день 32 после начала лечения.

Таблица 44. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю x 4 недели	1104±142	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	758±70	68,6	36,7	P<0,05
3	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	416±52	37,6	72,9	P<0,001
4	BCY8245, 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	1±1	0,1	116,8	P<0,001
5	BCY8781, 3 мг/кг, один раз в неделю x 4 недели	12±5	1,0	115,6	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM);

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136, BCY8245 и BCY8781 в ксенотрансплантатной модели LU-01-0412. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фигуре 23 и в таблицах 43 и 44.

Средний объем опухоли мышей, подвергаемых лечению с помощью плацебо, достигал 1104 мм³ на день 32 после начала лечения. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю x 4 недели (TV=758 мм³, TGI=36,7%, p<0,05) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю x 4 недели (TV=416 мм³, TGI=72,9%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность, но его применение не приводило к регрессу опухоли. Препарат BCY8245 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю x 4 недели (TV=1 мм³, TGI=116,8%, p<0,001) и препарат BCY8781 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю x 4 недели (TV=12 мм³, TGI=115,6%, p<0,001) вызывали очевидный регресс опухоли. В том числе, 5 из 6 опухолей,

подвергнутых лечению препаратом BCY8245 в дозе 3 мг/кг, и 2 из 6 опухолей, подвергнутых лечению препаратом BCY8781 в дозе 3 мг/кг, были полностью уничтожены на день 32.

В этом исследовании, у животных во всех группах масса тела сохранялась практически постоянной.

Исследование 16. Исследование in vivo эффективности BCY6136 при лечении бестимусных мыши линии Balb/c в модели LU-01-0486 PDX

(a) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности BCY6136 в модели LU-01-0486 PDX на бестимусных мышах линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Дозирующий объем (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	5	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	5	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	5	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	5	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(c) Методы и методики эксперимента

(i) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность фрагмент опухоли LU-01-0486 (~30 мм³). Для исследования эффективности, лечение начинали, когда средний объем опухоли достигал 180 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(ii) Рецептатура приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	50 mM ацетат 10% сахара pH 5
BCY6136	0,3	Раствор 0,3 мг/мл BCY6136 готовили так, как описано в исследовании 10

	0,2	Разбавить 940 мкл раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 470 мкл ацетатного буфера ¹
	0,1	Разбавить 470 мкл раствора 0,3 мг/мл BCY6136 с помощью 940 мкл ацетатного буфера
¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахара pH 5		

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлена на фигуре 24.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли на день 14 после начала лечения у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат LU-01-0486, приведен в таблице 45.

Таблица 45. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	Дни после начала лечения				
		0	3	7	10	14
1	Плацебо, один раз в неделю	179±20	232±30	358±45	450±47	651±112
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	180±23	221±20	326±34	420±34	638±71
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	179±27	222±26	365±44	459±82	645±105
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	180±25	209±37	304±51	348±77	449±115

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 в модели LU-01-0486 PDX рассчитывали на основе измерения объема опухоли в день 14 после начала лечения.

Таблица 46. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	651±112	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	638±71	98,0	3,0	p>0,05
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	645±105	99,1	1,2	p>0,05
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	449±115	68,9	43,1	p>0,05

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM); ^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в модели LU-01-0486 PDX. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фигуре 24 и в таблицах 45 и 46.

В этом исследовании, средний объем опухоли мышей, подвергаемых лечению с помощью плацебо, достигал 651 мм³ на день 14 после начала лечения. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=638 мм³, TGI=3,0%, p>0,05) и при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=645 мм³, TGI=1,2%, p>0,05) не проявлял противоопухолевой активности. Препарат BCY6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=449 мм³, TGI=43,1%, p>0,05) проявлял в небольшой степени противоопухолевую активность без статистической значимости.

Исследование 17. Испытание in vivo эффективности BCY6033, BCY6136 и BCY6082 при лечении ксенотрансплантата MDA-MB-231-luc у бестимусных мышей линии Balb/c

(а) Цель исследования

Целью исследования являлась оценка in vivo противоопухолевой активности BCY6033, BCY6136 и BCY6082 при лечении бестимусных мышей линии Balb/c в ксенотрансплантатной модели MDA-MB-231-luc.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
--------	---------	---	--------------	---------------------------	--------------------	-------

1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6033	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6033	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6033	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
5	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
6	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
7	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
8	BCY6082	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
9	BCY6082	3	5	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли MDA-MB-231-luc (10×10^6) в 0,1 мл PBS с 0,1 мл матригеля. Когда средний объем опухоли достигал 159 мм^3 , 36 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата

Лечение	Доза	Рецептура
---------	------	-----------

	(мг/мл)	
Плацебо		50 мМ ацетат, 10% сахараза рН 5
BCY6033	1	Растворить 6,71 мг BCY6033 в 6,710 мл буфера для приготовления
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 630 мкл буфера для приготовления
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 720 мкл буфера для приготовления
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 810 мкл буфера для приготовления
BCY6136	1	Растворить 3,79 мг BCY6136 в 3,695 мл буфера для приготовления
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл буфера для приготовления
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл буфера для приготовления
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл буфера для приготовления
BCY6082	1	Взвесить и растворить 4,30 мг BCY6082 в 4,162 мл буфера для приготовления
	0,5	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6082 с помощью 450 мкл буфера для приготовления
	0,2*	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6082 с помощью 720 мкл буфера для приготовления

(iv) Сбор образцов

На PG-D24, для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE), собирали и фиксировали опухоли группы 1, 8 и 9.

На PG-D33, для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE), собирали и фиксировали опухоли группы 2 и 5.

В конце исследования, для фиксирования формалином и заливки парафином (FFPE), собирали и фиксировали опухоли группы 3, 4, 6 и 7.

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и рост опухоли представлены на фигурах 25-27.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат MDA-MB-231-luc, представлен в таблицах 47-49.

Таблица 47. Объем остаточной опухоли (PG-D0~PG-D17)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения							
		0	2	4	7	9	11	14	17
1	Плацебо, один раз в неделю	159±14	269±8	306±19	425±52	688±54	908±54	1064±98	1315±95
2	BCY603 3, 1 мг/кг, один раз в неделю	159±6	219±19	221±55	296±76	329±64	421±77	479±84	609±122
3	BCY603 3, 2 мг/кг, один раз в неделю	159±10	240±73	215±57	201±47	109±36	84±34	64±32	59±35
4	BCY603 3, 3 мг/кг, один раз в неделю	158±7	189±27	147±32	109±26	79±11	66±7	41±5	31±6
5	BCY613 6, 1 мг/кг, один раз в неделю	159±10	226±36	221±54	310±72	416±89	526±77	636±92	809±135
6	BCY613 6, 2 мг/кг, один раз в неделю	159±16	218±17	182±22	182±26	101±20	77±24	36±4	41±10
7	BCY613	158±	241±1	259±	325±	258±1	246±	162±19	178±10

	6, 3 мг/кг, один раз в неделю	5	2	6	14	2	15		
8	BCY608 2, 2 мг/кг, один раз в неделю	159± 13	210±1 0	242± 16	305± 19	445±5 8	611± 76	734±13 9	926±105
9	BCY608 2, 5 мг/кг, один раз в неделю	159± 7	227±3 1	247± 47	250± 65	276±7 9	241± 61	220±56	184±85

Таблица 48. Объем остаточной опухоли (PG-D19~PG-D33)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		19	21	24	26	28	31	33
1	Плацебо, один раз в неделю	1453±1 28	1661±17 3	--	--	--	--	--
2	BCY6033 , 1 мг/кг, один раз в неделю	724±16 2	880±156	1069±1 89	1182±1 64	1342±1 66	1647±1 13	--
3	BCY6033 , 2 мг/кг, один раз в неделю	61±35	67±44	100±76	133±96	163±10 6	221±14 3	257±152
4	BCY6033 , 3 мг/кг, один раз	29±7	22±12	22±8	21±9	21±10	43±20	57±29

	в неделю							
5	BCY6136 , 1 мг/кг, один раз в неделю	879±19 0	994±213	1253±3 13	1431±3 53	1507±2 53	2181±6 09	--
6	BCY6136 , 2 мг/кг, один раз в неделю	35±9	33±9	31±17	41±32	59±45	82±59	87±71
7	BCY6136 , 3 мг/кг, один раз в неделю	171±21	132±19	108±19	85±15	81±8	87±14	92±18
8	BCY6082 , 2 мг/кг, один раз в неделю	1034±1 78	1287±94	--	--	--	--	--
9	BCY6082 , 5 мг/кг, один раз в неделю	214±12 0	218±146	--	--	--	--	--

Таблица 49. Объем остаточной опухоли (PG-D35~PG-D47)

Группа	Лечение	Дни после начала лечения					
		35	38	40	42	45	47
3	BCY603 3, 2 мг/кг, один раз	352±210	456±271	525±302	683±400	738±429	853±476

	в неделю						
4	BCY603 3, 3 мг/кг, один раз в неделю	79±47	118±71	139±82	220±125	312±176	423±222
6	BCY613 6, 2 мг/кг, один раз в неделю	124±106	156±120	179±142	239±197	285±239	350±298
7	BCY613 6, 3 мг/кг, один раз в неделю	129±38	173±65	181±65	269±113	293±114	371±128

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для BCY6033, BCY6136 и BCY6082 в ксенотрансплантатной модели MDA-MB-231-luc рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 21 после начала лечения.

Таблица 50. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	1661±173	--	--	--
2	BCY6033, 1 мг/кг, один раз в неделю	880±156	53,0	52,0	p<0,001
3	BCY6033, 2 мг/кг, один раз в неделю	67±44	4,1	106,1	p<0,001
4	BCY6033, 3 мг/кг, один раз в неделю	22±12	1,3	109,1	p<0,001

5	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	994±213	59,8	44,4	p<0,01
6	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	33±9	2,0	108,4	p<0,001
7	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	132±19	8,0	101,7	p<0,001
8	BCY6082, 2 мг/кг, один раз в неделю	1287±94	77,5	24,9	p>0,05
9	BCY6082, 5 мг/кг, один раз в неделю	218±146	13,1	96,1	p<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (Т/С).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6033, BCY6136 и BCY6082 в ксенотрансплантатной модели MDA-MB-231-luc. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергнутых лечению, в различные моменты времени представлены на фигурах 25-27 и в таблицах 47-50.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1661 мм³ на день 21. Препарат BCY6033 при дозе 1 мг/кг (TV=880 мм³, TGI=52,0%, p<0,001), при дозе 2 мг/кг (TV=67 мм³, TGI=106,1%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг (TV=22 мм³, TGI=109,1%, p<0,001) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность. Препарат BCY6033 при дозе 2 мг/кг и дозе 3 мг/кг эффективно вызывал регресс опухолей, но опухоли обнаруживали очевидное возобновление роста со дня 21.

Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг (TV=994 мм³, TGI=44,4%, p<0,01) проявлял умеренную противоопухолевую активность, препарат BCY6136 при дозе 2 мг/кг (TV=33 мм³, TGI=108,4%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг (TV=132 мм³, TGI=101,1%, p<0,001) проявлял высокую противоопухолевую активность, но опухоли обнаруживали очевидное возобновление роста со дня 28.

Препарат BCY6082 при дозе 2 мг/кг (TV=1287 мм³, TGI=24,9%, $p>0,05$) не проявлял очевидной противоопухолевой активности, препарат BCY6082 при дозе 5 мг/кг (TV=218 мм³, TGI=96,1%, $p<0,001$) проявлял значительную противоопухолевую активность.

В этом исследовании, одна мышь, подвергавшаяся лечению препаратом BCY6136 при дозе 2 мг/кг, потеряла более 15% массы тела в процессе курса лечения, у других мышей сохранялась практически постоянная масса тела.

Исследование 18. Испытание in vivo эффективности BCY6136 при лечении мышей линии BALB/c в сингенной модели EMT-6

(a) Цель исследования

Целью исследования являлась оценка in vivo противоопухолевой активности препарата BCY6136 при лечении мышей линии BALB/c в сингенной модели EMT-6.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	N	Способ дозирования	Схема	Сбор образцов
1	Плацебо	--	5	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели	будет проводиться сбор опухолей от резервных мышей для сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS)
2	BCY6136	3	5	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели	
3	BCY6136	1/5 ^b	5	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели	
4	BCY6136	0,3/3 ^b	5	внутривенно	один раз в неделю x 4 недели	

^a Инъецируемый объем каждой мыши составляет 10 мл/кг.

^b Дозу в группе 3 и группе 4 изменяли на 5 мг/кг и 3 мг/кг со дня 14.

(c) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Опухолевые клетки EMT-6 содержали in vitro в виде монослойной культуры в среде ЕМЕМ, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали два раза в неделю путем обработки с помощью трипсин-EDTA. Для инокуляции, клетки собирали на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли ЕМТ-6 (5×10^6) в 0,1 мл PBS. Когда средний объем опухоли достигал 75 мм^3 , 44 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата

Приготовление препарата BCY6136		
Лечение	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо/буфер	--	50 мМ ацетат, 10% сахароза pH 5
BCY6136	1	Растворить 6,2 мг BCY6136 с помощью 6113 мкл буфера
BCY6136	0,3	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1050 мкл буфера
BCY6136	0,1	Разбавить 150 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1350 мкл буфера
BCY6136	0,03	Разбавить 45 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 1455 мкл буфера
Приготовление препарата BCY6136		
Лечение	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо/буфер	--	50 мМ ацетат, 10% сахароза pH 5
BCY6136	1	Исходный раствор
BCY6136	0,3	Разбавить 420 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 980 мкл буфера
BCY6136	0,3	Разбавить 420 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 980 мкл буфера
BCY6136	0,5	Разбавить 700 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 700 мкл буфера

(iv) Сбор образцов

Собирали 3 опухоли от резервных мышей для сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) на день 11. Данные были представлены командой биологов.

(d) Результаты(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлена на фигуре 28.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок мышей линии BALB/c, несущих сингенную ЕМТ-6, представлен в таблице 51.

Таблица 51. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	Дни после начала лечения									
		0	3	5	7	10	12	14	17	19	21
1	Плацебо, один раз в неделю	82±4	141±11	260±24	443±90	557±99	703±119	812±139	948±191	1129±248	1499±340
2	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	82±4	58±1	59±2	125±18	240±23	322±23	374±22	431±37	486±50	561±61
3	BCY6136, 1/5 ^a мг/кг, один раз в неделю	82±4	108±18	204±27	350±57	426±49	588±72	691±65	850±98	1018±115	1272±140
4	BCY6136, 0,3/3 ^a мг/кг, один раз в неделю	82±4	130±16	255±35	358±34	450±67	607±94	751±112	872±119	1082±133	1394±161

Дозирование группы 3 и группы 4 заменяли на 5 мг/кг и 3 мг/кг со дня 14.

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 в сингенной модели ЕМТ-6 рассчитывали на основе измерений объема опухолей на день 21 после начала лечения.

Таблица 52. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	1499±340	--	--	--
2	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	561±61	37,4	66,2	p<0,05
3	BCY6136, 1/5 ^c мг/кг, один раз в неделю	1272±140	84,8	16,1	ns

4	BCY6136, 0,3/3 ^c мг/кг, один раз в неделю	1394±161	93,0	7,4	ns
---	--	----------	------	-----	----

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (Т/С).

^c Дозирование группы 3 и группы 4 заменяли на 5 мг/кг и 3 мг/кг со дня 14.

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в сингенной модели ЕМТ-6. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергнутых лечению, в различные моменты времени представлены на фигуре 28 и в таблицах 51 и 52.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1499 мм³ на день 21. Препарат BCY6136 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=561 мм³, TGI=66,2%, p<0,05) проявлял очевидную противоопухолевую активность. Препарат BCY6136 при дозе 1/5 мг/кг один раз в неделю (TV=1272 мм³, TGI=16,1%, p>0,05) и препарат BCY6136 при дозе 0,3/3 мг/кг один раз в неделю (TV=1394 мм³, TGI=7,4%, p>0,05) не проявлял противоопухолевой активности.

Дозирование группы 3 и группы 4 заменяли на 5 мг/кг и 3 мг/кг со дня 14. Обнаруживали изъязвление опухоли у мыши 3-5 на день 14, и мышей подвергали обработке кремом с антибиотиком. В этом исследовании, у всех мышей масса тела сохранялась практически неизменной.

Исследование 19. Исследование in vivo эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата NCI-N87 у бестимусных мышей линии Balb/c

(а) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата NCI-N87 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю

4	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
---	---------	---	---	----	-------------	-------------------

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Клетки опухоли NCI-N87 содержали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали два раза в неделю. Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли NCI-N87 (10×10⁶) с матригелем (1:1) в 0,2 мл PBS. Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 176 мм³, животных рандомизировали и начинали проведение лечения. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат 10% сахара pH 5
BCY6136	1	Растворить 4,295 мг BCY6136 в 4,214 мл ацетатного буфера ¹
	0,1	Разбавить 90 мкл 1 мг/мл исходного раствора BCY6136 с помощью 810 мкл ацетатного буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл 1 мг/мл исходного раствора BCY6136 с помощью 720 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл 1 мг/мл исходного раствора BCY6136 с помощью 630 мкл ацетатного буфера
¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахара pH 5		

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Кривая роста опухоли представлена на фигуре 29.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат NCI-N87, представлен в таблице 53.

Таблица 53. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

>	□	□	□	□	Дни после начала лечения
---	---	---	---	---	--------------------------

4	3	2	1	
ВСУ6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	ВСУ6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	ВСУ6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	Плацебо, один раз в неделю	
177±8	176±18	176±7	174±7	0
197±9	197±25	200±8	213±5	2
169±7	168±25	210±14	266±6	4
158±3	170±26	224±27	421±10	7
148±8	165±34	238±21	537±17	9
95±16	96±27	184±18	598±30	11
141±12	133±35	244±23	734±46	14
145±24	150±52	276±35	821±55	16
164±28	160±49	308±44	918±91	18
202±28	190±63	343±37	1024±83	21
205±30	203±65	390±43	1151±68	23
201±16	218±66	406±48	1305±57	25
196±21	201±53	422±42	1407±64	28
201±22	210±60	425±47	1465±90	30

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли препаратом ВСУ6136 в случае ксенотрансплантата NCI-N87 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 30 после начала лечения.

Таблица 54. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	1465±90	--	--	--
2	ВСУ6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	425±47	29,0	80,7	P<0,001

3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	210±60	14,3	97,4	P<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	201±22	13,7	98,1	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли для группы, подвергнутой лечению, на средний объем опухоли в контрольной группе (Т/С).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в модели NCI-N87. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фигуре 29 и в таблицах 53 и 54.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1465 мм³ на день 30. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=425 мм³, TGI=80,7%, p<0,001) и при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=210 мм³, TGI=97,4%, p<0,001) проявлял значительную дозозависимую противоопухолевую активность, BCY6136 в дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=201 мм³, TGI=98,1%, p<0,001) проявлял сравнимую противоопухолевую активность с активностью BCY6136 при дозе 2 мг/кг.

В этом исследовании, у мышей во всех группах не обнаруживали очевидной потери масса тела в процессе проведения курса лечения.

Исследование 20. Исследование in vivo эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантат SK-OV-3 у бестимусных мышей линии Balb/c

(а) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантат SK-OV-3 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	ADC	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

3	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
5	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Клетки опухоли SK-OV-3 содержали в среде МакКоя 5а, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали два раза в неделю. Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли SK-OV-3 (10×10⁶) с матригелем (1:1) в 0,2 мл PBS. Животных рандомизировали, и начинали проведение лечения, когда средний объем опухоли достигал приблизительно 186 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецептúra приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Чистота	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	-	50 мМ ацетат 10% сахароза pH5
BCY6136	98,5%	1	Растворить 3,65 мг BCY6136 в 3,60 мл 50 мМ ацетатного буфера ¹
		0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл ацетатного буфера ¹
		0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл ацетатного буфера ¹
		0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл ацетатного буфера ¹
ADC	ADC	0,3	Разбавить 69 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 2331 мкл буфера для ADC ²

¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахароза pH 5

² Буфер для ADC: 25 мМ гистидин 10% сахара pH 5,5

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Кривая роста опухоли представлена на фигуре 30.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат SK-OV-3, представлен в таблице 55.

Таблица 55. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	Дни после начала лечения												
		0	2	5	7	9	12	14	16	19	21	23	26	28
1	Плацебо, один раз в неделю	187±16	243±24	313±28	399±37	470±23	606±61	742±103	891±133	1076±185	1173±214	1340±236	1490±273	1560±305
2	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	187±16	181±15	212±16	263±35	268±14	335±23	353±18	392±63	449±4	481±27	573±33	647±26	684±111
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	186±23	222±19	293±34	331±21	356±23	440±8	503±28	587±33	702±43	752±26	893±34	1002±68	1035±67
4	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	186±23	170±18	164±28	188±33	180±34	202±29	200±29	230±46	229±48	231±58	236±49	240±48	277±58
5	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	184±24	168±18	150±12	164±12	158±8	180±8	187±4	212±17	208±29	204±12	205±17	227±31	254±48

iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 в случае ксенотрансплантата SK-OV-3 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 28 после начала лечения.

Таблица 56. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	1560±305	--	--	--
2	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	684±111	43,9	63,8	P<0,01
3	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1035±67	66,4	38,1	p>0,05
4	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	277±58	17,8	93,3	P<0,001
5	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	254±48	16,3	95,0	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в модели SK-OV-3. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фигуре 30 и в таблицах 55 и 56.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1560 мм³ на день 28. ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=684 мм³, TGI=63,8%, p<0,01) проявлял умеренную противоопухолевую активность. BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю

(TV=1035 мм³, TGI=38,1%, p>0,05) не проявлял очевидной противоопухолевой активности. BCY6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=277 мм³, TGI=93,3%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=254 мм³, TGI=95,0%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность.

В этом исследовании не было обнаружено очевидной потери массы тела у животных во всех группах в процессе проведения курса лечения.

Исследование 21. Исследование in vivo эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата OE21 у бестимусных мышей линии Balb/c

(a) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности BCY6136 при лечении ксенотрансплантата OE21 у бестимусных мышей линии Balb/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(c) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Клетки опухоли OE21 содержали в среде RPMI-1640, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали два раза в неделю. Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мышце инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли OE21 (5×10⁶) с матригелем (1:1) в 0,2 мл PBS. Животных рандомизировали, и начинали проведение лечения когда средний объем опухоли достигал

приблизительно 157 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Испытуемый препарат	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	-	50 мМ ацетат 10% сахара рН 5
BCY6136	1	Растворить 4,295 мг BCY6136 в 4,214 мл ацетатного буфера ¹
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 810 мкл ацетатного буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 720 мкл ацетатного буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 630 мкл ацетатного буфера
¹ Ацетатный буфер: 50 мМ ацетат 10% сахара рН 5		

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Кривая роста опухоли представлена на фигуре 31.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат OE21, представлен в таблице 57.

Таблица 57. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	Дни после начала лечения										
		0	2	4	7	9	11	14	16	18	21	23
1	Плацебо, один раз в неделю	155±9	211±16	291±16	379±14	456±32	539±13	828±42	955±40	1035±58	1250±46	1586±57
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	159±14	202±28	251±29	282±6	331±19	392±35	609±56	694±44	777±68	1083±85	1155±98
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	157±19	197±13	219±6	235±27	268±35	243±37	346±78	371±98	396±109	515±94	537±122

4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	155±19	200±16	197±7	209±11	229±26	211±14	289±38	318±53	330±40	474±42	489±51
---	--	--------	--------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 в случае ксенотрансплантата OE21 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 23 после начала лечения.

Таблица 58. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина
1	Плацебо, один раз в неделю	1586±57	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1155±98	72,8	30,4	P<0,05
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	537±122	33,9	73,4	P<0,001
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	489±51	30,8	76,7	P<0,001

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли для группы, подвергнутой лечению, на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 в модели OE21. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергавшихся лечению, в различные моменты времени представлены на фигуре 31 и в таблицах 57 и 58.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1586 мм³ на день 23. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=1155 мм³, TGI=30,4% p<0,05) проявлял противоопухолевая активность в слабой степени. BCY6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=537 мм³, TGI=73,4%, p<0,001) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=489 мм³, TGI=76,7%, p<0,001) проявлял значительную противоопухолевую активность.

В этом исследовании не было обнаружено очевидной потери массы тела у животных во всех группах в процессе проведения курса лечения.

Исследование 22. Испытание in vivo эффективности BCY6136 и BCY6082 при лечении ксенотрансплантат MOLP-8 у мышей линии CB17-SCID

(a) Цель исследования

Целью исследования является оценка in vivo противоопухолевой эффективности BCY6136 и BCY6082 при лечении ксенотрансплантат MOLP-8 у мышей линии CB17-SCID.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования	Способ дозирования	Схема
--------	---------	---	--------------	-------------------	--------------------	-------

				(мкл/г)		
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6136	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
5	BCY6082	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
6	BCY6082	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
7	BCY6082	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Клетки опухоли MOLP-8 содержали in vitro в виде монослойной культуры в среде RPMI-1640, дополненной 20% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки в установленном порядке пассировали путем обработки трипсин-EDTA. Для инокуляции собирали клетки на стадии экспоненциального роста и подсчитывали их.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши инокулировали подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли MOLP-8 (10×10⁶) в 0,2 мл PBS с 50% матригеля. Когда средний объем опухоли достигал 141 мм³, 36 животных рандомизировали. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе представлены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепт приготовления испытуемого препарата

Лечение	Концентрация (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	50 мМ ацетат, 10% сахара pH 5

BCY6136	0,1	Разбавить 90 мкл исходных растворов 1 мг/мл BCY6136* с помощью 810 мкл буфера***
	0,2	Разбавить 180 мкл исходных раствором 1 мг/мл BCY6136* с помощью 720 мкл буфера***
	0,3	Разбавить 270 мкл исходных растворов 1 мг/мл BCY6136* с помощью 630 мкл буфера***
BCY6082	0,1	Разбавить 90 мкл исходных растворов 1 мг/мл BCY6082** с помощью 810 мкл буфера***
	0,2	Разбавить 180 мкл исходных растворов 1 мг/мл BCY6082** с помощью 720 мкл буфера***
	0,3	Разбавить 270 мкл 1 мг/мл исходных растворов BCY6082** с помощью 630 мкл буфера***

* Исходные растворы BCY6136: 10,93 мг BCY6136 растворяли в 10,93 мл 50 мМ ацетат, 10% сахара, pH 5, и разливали в отдельные пробирки, и хранили при -80°C.

** Исходные растворы BCY6082: 2,43 мг BCY6136 растворяли в 2,43 мл 50 мМ ацетат, 10% сахара, pH 5, и разливали в отдельные пробирки, и хранили при -80°C.

*** Буфер: 50 мМ ацетат, 10% сахара pH 5

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлены на фигурах 32 и 33.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок мышей линии CB17-SCID, несущих ксенотрансплантат MOLP-8, представлен в таблице 59.

Таблица 59. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Плацебо, один раз в неделю	139±2	375±3 6	604±2 8	984±88	1451±1 33	1981±1 96	2528±2 95
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	143±1 3	299±6	444±4 9	576±31	806±85	1132±1 70	1446±2 34
3	BCY6136, 2 мг/кг,	140±1 5	271±4 3	250±2	509±23	662±78	873±49	1218±1 44

	один раз в неделю							
4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	142±1 9	239±6 7	197±2 0	342±78	425±90	693±13 3	938±15 5
5	BCY6082, 1 мг/кг, один раз в неделю	142±4	303±4 9	456±8 3	809±16 9	1365±2 77	1708±1 90	2296±5 11
6	BCY6082, 2 мг/кг, один раз в неделю	139±5	273±4 6	428±1 8	682±50	945±73	1240±8 5	1554±8 4
7	BCY6082, 3 мг/кг, один раз в неделю	142±4	219±7	369±7 7	471±81	656±11 5	997±21 2	1321±3 36

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для BCY6136 and BCY6082 в ксенотрансплантатной модели MOLP-8 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 14 после начала лечения.

Table 60. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	2528±295	--	--	--
2	BCY6136, 1 мг/кг, один раз в неделю	1446±234	57,2	45,5	p>0,05
3	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	1218±144	48,2	54,9	p<0,05

4	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	938±155	37,1	66,7	p<0,01
5	BCY6082, 1 мг/кг, один раз в неделю	2296±511	90,8	9,8	p>0,05
6	BCY6082, 2 мг/кг, один раз в неделю	1554±84	61,5	40,8	p>0,05
7	BCY6082, 3 мг/кг, один раз в неделю	1321±336	52,3	50,6	p<0,05

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (T/C).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность BCY6136 и BCY6082 в ксенотрансплантатной модели MOLP-8. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергнутых лечению, в различные моменты времени представлены на фигуре. Измеренные объемы опухолей во всех группах, подвергнутых лечению, в различные моменты времени представлены на фигурах 32 и 33 и в таблицах 59 и 60.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 2528 мм³ на день 14. Препарат BCY6136 при дозе 1 мг/кг (TV=1146 мм³, TGI=45,5%, p>0,05), при дозе 2 мг/кг (TV=1218 мм³, TGI=54,9%, p<0,05) и при дозе 3 мг/кг (TV=938 мм³, TGI=66,7%, p<0,01) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность, но при всех величинах доз не достигался регресс опухолей в ксенотрансплантатах MOLP-8.

Препарат BCY6082 при дозе 1 мг/кг (TV=2296 мм³, TGI=9,8%, p>0,05) и при дозе 2 мг/кг (TV=1554 мм³, TGI=40,8%, p>0,05) не проявлял очевидной противоопухолевой активности. Препарат BCY6082 при дозе 3 мг/кг значительно ингибировал рост опухоли (TV=1321 мм³, TGI=50,6%, p<0,05), но регресс опухоли не достигался в ксенотрансплантатах MOLP-8.

В этом исследовании, у всех мышей сохранялась масса тела практически на постоянном уровне.

Исследование 23. Испытание in vivo эффективности препаратов BCY при лечении ксенотрансплантата HT1080 у бестимусных мышей линии BALB/c

(a) Цель исследования

Целью исследования являлась оценка in vivo противоопухолевой активности препаратов BCY при лечении ксенотрансплантатной модели HT1080 на бестимусных мышках линии BALB/c.

(b) Дизайн эксперимента

Группа	Лечение	n	Доза (мг/кг)	Объем дозирования (мкл/г)	Способ дозирования	Схема
1	Плацебо	3	--	10	внутривенно	один раз в неделю
2	BCY6082	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
3	BCY6031	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
4	BCY6173	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
5	BCY6173	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
6	BCY6173	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
7	BCY6135	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
8	BCY6135	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
9	BCY6135	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
10	BCY6033	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
11	BCY6033	3	5	10	внутривенно	один раз в неделю
12	BCY6136	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю

13	BCY6136	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
14	BCY6136	3	5	10	внутривенно	один раз в неделю
15	BCY6174	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
16	BCY6174	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
17	BCY6174	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
18	BCY6175	3	1	10	внутривенно	один раз в неделю
19	BCY6175	3	2	10	внутривенно	один раз в неделю
20	BCY6175	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю
21	ADC	3	3	10	внутривенно	один раз в неделю

Примечание: n: число животных; объем дозирования: скорректированный объем дозирования 10 мкл/г с учетом массы тела.

(с) Методы и методики эксперимента

(i) Культивирование клеток

Клетки опухоли НТ1080 следует содержать в среде, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в воздухе. Опухолевые клетки следует в установленном порядке пассированы два раза в неделю. Для инокуляции опухоли, клетки следует собирать в экспоненциальной фазе роста и посчитать их число.

(ii) Инокуляция опухоли

Для развития опухоли, каждой мыши следует инокулировать подкожно в правую боковую поверхность клетки опухоли НТ1080 (5×10^6). Животных следует рандомизировать,

и лечение следует начать, когда средний объем опухоли достигнет приблизительно 150-200 мм³. Введение испытуемого препарата и число животных в каждой группе приведены в таблице дизайна эксперимента.

(iii) Рецепттура приготовления испытуемого препарата

Лечение	Доза (мг/мл)	Рецептура
Плацебо	--	50 мМ ацетат/уксусная кислота pH 5 10% сахароза
BCY6082	0,2	Разбавить 160 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6082 с помощью 640 мкл буфера
BCY6031	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6031 с помощью 720 мкл буфера
BCY6173	1	Растворить 2,13 мг BCY6173 в 2,04 мл буфера
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6173 с помощью 810 мкл буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6173 с помощью 720 мкл буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6173 с помощью 630 мкл буфера
BCY6135	1	Растворить 2 мг BCY6135 в 1,9 мл буфера
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6135 с помощью 810 мкл буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6135 с помощью 720 мкл буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6135 с помощью 630 мкл буфера
BCY6033	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 630 мкл буфера
	0,5	Разбавить 450 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6033 с помощью 450 мкл буфера
BCY6136	0,2	Разбавить 200 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 800 мкл буфера
	0,3	Разбавить 300 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6136 с помощью 700 мкл буфера
	0,5	Разбавить 500 мкл исходного раствора 1 мг/мл

		BCY6136 с помощью 500 мкл буфера
BCY6174	1	Растворить 2,69 мг BCY6174 в 2,677 мл буфера
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6174 с помощью 810 мкл буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6174 с помощью 720 мкл буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6174 с помощью 630 мкл буфера
BCY6175	1	Растворить 2 мг BCY6175 в 1,924 мл буфера
	0,1	Разбавить 90 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6175 с помощью 810 мкл буфера
	0,2	Разбавить 180 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6175 с помощью 720 мкл буфера
	0,3	Разбавить 270 мкл исходного раствора 1 мг/мл BCY6175 с помощью 630 мкл буфера
ADC	0,3	Разбавить 25,78 мкл исходного раствора 10,47 мг/мл ADC с помощью 874,22 мкл 25 мМ гистидин pH 7 10% сахара

(d) Результаты

(i) Кривая роста опухоли

Масса тела и кривая роста опухоли представлена на фигурах 34-42.

(ii) Объем остаточной опухоли

Средний объем опухоли в зависимости от времени у самок бестимусных мышей линии Balb/c, несущих ксенотрансплантат HT1080, приведен в таблице 61.

Таблица 61. Объем остаточной опухоли в зависимости от времени

Группа	Лечение	Дни после начала лечения						
		0	2	4	7	9	11	14
1	Плацебо, один раз в неделю	179±22	312±8 4	529±13 5	886±20 7	1185±1 72	1467±2 24	1737±2 58
2	BCY6082, 2 мг/кг, один раз в неделю	177±16	183±3 1	99±27	61±17	33±10	12±5	5±3
3	BCY6031, 2 мг/кг, один раз в неделю	177±24	215±3 5	133±37	63±31	53±37	45±36	71±67

	раз в неделю							
4	BCY6173 1 мг/кг, один раз в неделю	178±26	276±8	328±73	594±62	745±22	960±53	1074±1 50
5	BCY6173, 2 мг/кг, один раз в неделю	178±28	277±6 1	262±12 5	309±23 8	425±33 4	436±32 3	480±34 7
6	BCY6173, 3 мг/кг, один раз в неделю	179±43	182±7 1	133±88	87±68	77±65	60±54	47±42
7	BCY6135 1 мг/кг, один раз в неделю	178±22	267±6 6	262±58	436±67	599±89	703±36	871±28
8	BCY6135 2 мг/кг, один раз в неделю	178±23	176±4 8	117±43	70±23	67±23	52±21	62±7
9	BCY6135 3 мг/кг, один раз в неделю	177±39	178±7 9	92±67	62±46	62±51	57±51	44±40
10	BCY6033 3 мг/кг, один раз в неделю	178±26	186±3 4	79±30	29±15	12±8	6±4	9±7
11	BCY6033 5 мг/кг, один раз в неделю	178±36	117±2 0	41±10	12±4	6±2	4±0	0±0
12	BCY6136 2мг/кг, один раз в неделю	178±19	249±2 2	115±8	126±53	158±71	140±89	245±11 6
13	BCY6136 3 мг/кг, один раз в неделю	178±36	168±2 1	72±18	22±7	21±15	8±6	3±2
14	BCY6136 5 мг/кг, один	178±26	165±3 3	52±10	18±7	9±4	5±2	2±1

	раз в неделю							
15	BCY6174 1 мг/кг, один раз в неделю	180±35	231±1 9	226±29	432±37	602±63	742±62	1066±1 30
16	BCY6174 2мг/кг, один раз в неделю	178±31	203±5 0	123±29	216±47	291±40	326±68	532±91
17	BCY6174 3 мг/кг, один раз в неделю	178±33	195±1 3	110±39	58±23	34±17	21±11	11±7
18	BCY6175 1 мг/кг, один раз в неделю	178±27	248±6 2	244±74	347±18	435±18	558±38	769±26
19	BCY6175 2 мг/кг, один раз в неделю	178±22	223±4 2	158±59	116±35	156±52	166±51	295±88
20	BCY6175 3 мг/кг, один раз в неделю	179±39	189±4 8	116±50	43±18	33±18	25±13	11±9
21	ADC 3 мг/кг, один раз в неделю	180±26	158±3 0	58±8	18±2	7±1	2±2	0±0

(iii) Анализ ингибирования роста опухоли

Степень ингибирования опухоли для препаратов BCY в ксенотрансплантатной модели HT1080 рассчитывали на основе измерений объема опухоли на день 14 после начала лечения.

Таблица 62. Анализ ингибирования роста опухоли

Группа	Лечение	Объем опухоли (мм ³) ^a	T/C ^b (%)	TGI (%)	P-величина при сравнении с плацебо
1	Плацебо, один раз в неделю	1737±258	--	--	--

2	BCY6082, 2 мг/кг, один раз в неделю	5±3	0,3	111,1	p<0,01
3	BCY6031, 2 мг/кг, один раз в неделю	71±67	4,1	106,8	p<0,01
4	BCY6173, 1 мг/кг, один раз в неделю	1074±150	61,8	42,5	p>0,05
5	BCY6173, 2 мг/кг, один раз в неделю	480±347	27,6	80,6	p<0,05
6	BCY6173, 3 мг/кг, один раз в неделю	47±42	2,7	108,4	p<0,01
7	BCY6135, 1 мг/кг, один раз в неделю	871±28	50,1	55,5	p<0,01
8	BCY6135, 2 мг/кг, один раз в неделю	62±7	3,5	107,5	p<0,001
9	BCY6135, 3 мг/кг, один раз в неделю	44±40	2,5	108,6	p<0,001
10	BCY6033, 3 мг/кг, один раз в неделю	9±7	0,5	110,8	p<0,001
11	BCY6033, 5 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0,0	111,4	p<0,001
12	BCY6136, 2 мг/кг, один раз в неделю	245±116	14,1	95,7	p<0,001

13	BCY6136, 3 мг/кг, один раз в неделю	3±2	0,2	111,2	p<0,001
14	BCY6136, 5 мг/кг, один раз в неделю	2±1	0,1	111,3	p<0,001
15	BCY6174, 1 мг/кг, один раз в неделю	1066±130	61,4	43,1	p<0,05
16	BCY6174, 2 мг/кг, один раз в неделю	532±91	30,6	77,3	p<0,01
17	BCY6174, 3 мг/кг, один раз в неделю	11±7	0,6	110,7	p<0,001
18	BCY6175, 1 мг/кг, один раз в неделю	769±26	44,3	62,1	p<0,01
19	BCY6175, 2 мг/кг, один раз в неделю	295±88	17,0	92,5	p<0,001
20	BCY6175, 3 мг/кг, один раз в неделю	11±9	0,6	110,8	p<0,001
21	ADC, 3 мг/кг, один раз в неделю	0±0	0,0	111,5	-

^a Средняя величина ± стандартная ошибка среднего значения (SEM).

^b Ингибирование роста опухоли рассчитывают путем деления среднего объема опухоли в подвергнутой лечению группе на средний объем опухоли в контрольной группе (Т/С).

(е) Полученные результаты и их обсуждение

В этом исследовании оценивали терапевтическую эффективность препаратов BCY в ксенотрансплантатной модели НТ1080. Измеренные объемы опухолей во всех группах,

подвергнутых лечению, в различные моменты времени представлены на фигурах 34-42 и в таблицах 61 и 62.

Средний объем опухоли мышей, которым вводили плацебо, достигал 1737 мм³ на день 14.

Препарат BCY6082 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=5 мм³, TGI=111,1%, $p<0,01$) и препарат BCY6031 при 2 мг/кг один раз в неделю (TV=7 мм³, TGI=106,8%, $p<0,01$) проявляли высокую противоопухолевую активность.

Препарат BCY6173 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=1074 мм³, TGI=42,5%, $p>0,05$), при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=480 мм³, TGI=80,6%, $p<0,05$) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=7 мм³, TGI=108,4%, $p<0,01$) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность.

Препарат BCY6135 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=871 мм³, TGI=55,5%, $p<0,01$), при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=62 мм³, TGI=107,5%, $p<0,001$) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=44 мм³, TGI=108,6%, $p<0,001$) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность.

Препарат BCY6033 при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=9 мм³, TGI=110,8%, $p<0,001$) и при дозе 5 мг/кг один раз в неделю (TV=0 мм³, TGI=111,4%, $p<0,001$) проявлял высокую противоопухолевую активность и полностью уничтожал опухоли ко дню 14 при дозе 5 мг/кг.

Препарат BCY6136 при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=345 мм³, TGI=95,7%, $p<0,001$), при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=3 мм³, TGI=111,2%, $p<0,001$) и при дозе 5 мг/кг один раз в неделю (TV=2 мм³, TGI=111,3%, $p<0,001$) проявлял высокую противоопухолевую активность.

Препарат BCY6174 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=1066 мм³, TGI=43,1%, $p<0,05$), при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=532 мм³, TGI=77,3%, $p<0,01$) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=11 мм³, TGI=110,7%, $p<0,001$) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность.

Препарат BCY6175 при дозе 1 мг/кг один раз в неделю (TV=769 мм³, TGI=62,1%, $p<0,01$), при дозе 2 мг/кг один раз в неделю (TV=295 мм³, TGI=92,5%, $p<0,001$) и при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=11 мм³, TGI=110,8%, $p<0,001$) проявлял дозозависимую противоопухолевую активность.

Препарат ADC при дозе 3 мг/кг один раз в неделю (TV=0 мм³, TGI=111,5%) полностью уничтожал опухоли ко дню 14.

Исследование 24. Выяснение наличия взаимосвязи между вариацией числа копий (CNV) и экспрессия гена для EphA2 в случае типов множественных опухолей

Методы

1. Выберите все исследования на портале cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) и ищите исследования для EphA2.

(a) Удалите предварительные исследования.

(b) Снимите выделение "исследования с перекрывающимися образцами" для предотвращения ошибки выборки (на основе предупреждения в портале cBioPortal), всегда выбирайте исследование PanCancer, если можно использовать этот выбор.

(c) Исследования, выбранные для анализа (таблица 63).

Таблица 63. Исследования, подвергнутые анализу на портале cBioPortal, и подразделы в исследовании

Название исследования	Подразделы
Инвазивная карцинома молочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Плоскоклеточная карцинома легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Папиллярная почечно-клеточная карцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Светлоклеточная карцинома почки (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома толстой кишки (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Уротелиальная карцинома мочевого пузыря (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Увеальная меланома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома легкого (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Серозная цистаденокарцинома яичников (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Рак молочной железы (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)	Экспрессии мРНК (микроматричный анализ)
Мезотелиома (TCGA, PanCancer)	Партия нормализованной/объединенной

Atlas)	экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Колоректальная аденокарцинома (TCGA, Nature 2012)	РНК последовательность RPKM
Плоскоклеточная карцинома шейки матки (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Саркома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Энциклопедия линий раковых клеток (Novartis/Broad, Nature 2012)	Экспрессии мРНК (микроматричный анализ)
Аденокарцинома прямой кишки (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Гепатоцеллюлярная карцинома печени (TCGA, PanCancer Atlas)	EPHA2: экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Аденокарцинома желудка (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Эндометриальная карцинома тела матки (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Меланома кожи (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома предстательной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Хромофобная почечно-клеточная карцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Опухоль Вильмса в детском возрасте (TARGET, 2018)	Epha2: экспрессия мРНК (РНК- последовательность RPKM)
Феохромоцитома и параганглиома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369

Карцинома щитовидной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома пищевода (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Холангиокарцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Глиома головного мозга низкой степени злокачественности (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Тимома (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Острый лимфолейкоз в детском возрасте - фаза II (TARGET, 2018)	Epha2: экспрессия мРНК (РНК- последовательность RPKM)
Диффузная В-крупноклеточная лимфома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Мультиформная глиобластома (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Метастатический рак предстательной железы, SU2C/PCF Dream Team (Robinson et al., Cell 2015)	Экспрессия мРНК/захват (РНК- последовательность RPKM)
Острый миелолейкоз (TCGA, PanCancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Опухоли половых клеток яичка (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Адренокортикальная карцинома (TCGA, PanCancer Atlas)	RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq_RNASeqV2)
Карциносаркома матки (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369
Аденокарцинома поджелудочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2

	syn4976369
Аденокарцинома предстательной железы (MSKCC, Cancer Cell 2010)	Экспрессия мРНК
Аденокарцинома предстательной железы (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)	Экспрессия мРНК

2. Экспортируйте данные по вариациям числа копий (CNV) и экспрессии РНК из портала cBioPortal.

3. Проведите тест на то, что вариации числа копий (CNV) статистически значимо связаны с изменениями экспрессии мРНК для EphA2 (log2 не используют).

(a) Запустите непараметрический критерий Крускала-Уоллиса в программе GraphPad Prism (7.04) и R/R studio (пороговое значение для значимости: $p < 0,01$).

(i) GraphPad Prism: установите столбец в таблице, запустите непараметрический критерий без подгонки или сопряжения и не выдвигайте предположение о распределении Гаусса.

(ii) Пакеты, используемые в R:

1.XLConnect

2.dplyr

3.Критерий для суммы рангов Крускала-Уоллиса: `Kruskal.test`.

4. Проведите коррекцию для множественных сравнений (включите все возможные сравнения, даже если $n=1$ внутри группы) в R/Rstudio, используя критерий Данна (пороговое значение для значимости: $p < 0.025$).

(a) `dunn.test` с методом множественного сравнения = "бонферрони".

Результаты

Результаты представлены в таблице 64 ниже. Во всех 41 общедоступных наборах данных, собранных на портале cBioPortal, в которых сообщается как о вариации числа копий (CNV), так и экспрессии гена мРНК для EphA2, существуют многочисленные типы рака, при которых сообщали о случаях мелких делециях EphA2 (< 2 копий). Хотя это встречалось и более редко, но, при этих же самых типах рака, субпопуляция опухолей скрывала глубокие делеции EphA2 (потеря > 1 копии или биаллельная потеря), приращения EphA2 (2-3 копии) или амплификации EphA2 (> 3 копий). Случаи, при которых $> 33\%$ опухолей имели либо мелкие делеции, либо глубокие делеции, в EphA2 включали: хромофобную почечно-клеточную карциному, холангиокарциному, феохромоцитому и параганглиому, плоскоклеточный рак легкого, молочной железы, прямой кишки, глиому головного мозга низкой степени злокачественности, рак печени, адренокортикальную карциному, мезотелиому, аденокарциному пищевода и рак толстой кишки. В отличие от этого, не было исследований, при которых $> 33\%$ образцов имели либо приращения, либо амплификацию в

EphA2. Взятые в совокупности, эти результаты показывают, что делеции в EphA2 ДНК обнаруживаются для целого ряда типов рака.

Приблизительно одна треть из всех образцов, проанализированных в 41 исследовании, скрывала вариации числа копий (CNV) EphA2. Исходя из этого высокого процента вариаций числа копий (CNV) во всех исследованиях и высокого процента мелких делеций в опухолях специфического типа, проводили статистическое испытание для выявления возможных взаимосвязей между изменениями числа копий и экспрессией РНК. Опухоли по признаку были отнесены к 1 из 5 классов:

- а) глубокая делеция;
- б) мелкая делеция;
- с) диплоид;
- д) приращение; или
- е) амплификация.

Затем проводили тест Краскела-Уоллиса с целью выявления наличия отличий между классами ($P < 0,01$) при распределении величин экспрессии мРНК по классам. Для этих наборов данных TCGA с $P < 0,01$ и для определения, какие классы отличались друг от друга, было проведено апостериорное тестирование путем расчета Z-статистики с скорректированными вычисленными Р-величинами (Бонферони). Для простоты интерпретации, рассматривали попарные сравнения против диплоида по показателю (хотя рассчитывали все попарные Р-величины). 19/41 из этих исследований имели в тесте Краскела-Уоллиса р-величину $< 0,01$, что указывало на то, что число копий статистически значимо связано с экспрессией РНК. Из этих 19 исследований, 17 из них имели поправку Бонферрони $P < 0,025$ для диплоида относительно мелкой делеции, что указывало на взаимосвязь снижения экспрессии EphA2 mRNA со уменьшением числа копий EphA2. Только 2 из этих 19 исследований имели поправку Бонферрони $P < 0,025$ для диплоида относительно приращения, и эти оба исследования были исследованиями рака молочной железы. Кроме того, одно из этих исследований рака молочной железы (инвазивная карцинома молочной железы (TCGA, PanCancer Atlas)) имела поправку Бонферрони $P < 0,025$ как для диплоида относительно мелкой делеции, так и для диплоида относительно приращения, что позволяло предположить, что альтерации числа копий могут иметь сильное влияние на экспрессию EphA2 РНК при раке молочной железы.

Центральная догма генетики предполагает, что уменьшение числа копий в EphA2 приводит к снижению экспрессии РНК и белка. Поэтому, наблюдаемые взаимосвязи между потерей числа копий EphA2 и снижением экспрессии мРНК при различных типах опухолей позволяют предположить, что может быть также снижена и экспрессия белка EphA2. Аналогично, приращение числа копий EphA2 при раке молочной железы, которые были взаимосвязаны с повышением экспрессии мРНК, может также предполагать повышение экспрессии белка EphA2. Более того, более высокая экспрессия белка EphA2 (измеряемая методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS)) связана с повышением

эффективности в отношении EphA2 конкретных бициклических конъюгатов лекарственных средств по изобретению (измеряемой по объему опухоли) в преclinical in vivo моделях. Исходя из совокупности приведенных выше фактов, можно предположить, что если альтерации числа копий, которые взаимосвязаны с изменениями экспрессии мРНК, действительно позволяют предсказывать уровни экспрессии белка, то тогда пациенты с опухолями, содержащими делеции числа копий EphA2, могут, с определенной долей вероятности, в меньшей степени отвечать на лечение бициклическими конъюгатами лекарственных средств по изобретению, специфичных к EphA2. Аналогично, если пациенты с опухолью имеют приращение числа копий EphA2 (например, при раке молочной железы), то, возможно, что эти пациенты, с определенной долей вероятности, будут в большей степени отвечать на лечение бициклическими конъюгатами лекарственных средств по изобретению в отношении EphA2. Поэтому, если пациенты были разделены на группы по статусу числа копий EphA2, то эта информация могла бы быть использована как для исключения, так и для отбора пациентов с целью повышения эффективности лечения бициклическими конъюгатами лекарственных средств по изобретению, специфичных к EphA2.

Таблица 64. Результаты изучения взаимосвязи между вариациями числа копий (CNV) и экспрессией гена для EphA2

Название исследования	Подразделы	Число образцов/группа (n=X)					Критерий Краскела-Уоллиса		Парное сравнение, Z-статистика(поправка р-величины), Бонферрони			
		Глубокая делеция	Мелкая делеция	Диплоид	Приращение	Амплификация	Статистика Краскела-Уоллиса	р-величина	Глубокая делеция - диплоид	Диплоид - мелкая делеция	Диплоид-приращение	Амплификация - диплоид
Инвезиционная карцинома молочной железы (TCGA, Pan Cancer Atlas)	Партиципация нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina	5	415	511	61	2	80,816	< 2,2E-16	0,176118 (1,0000)	6,460580 (0,0000)*	- 4,603180 (0,0000)*	0,713978 (1,0000)

s)	HiSeq q_R NAS eqV 2 syn4 9763 69											
Пло скок лето чная карц ино ма легко го (TC GA, Pan Can cer Atlas)	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРНК из Illumi na HiSeq q_R NAS eqV 2 syn4 9763 69	3	20 7	20 1	55	0	52,94 2	1,89 E-11	- 1,584 610 (0,339 2)	6,7865 01 (0,0000)*	- 0,019 607 (1,000 0)	N/A
Пап илля рная поче чно- клет очна я карц ино ма (TC GA, Pan Can cer Atlas)	Экс прес сия мРНК, RSEM М (пар тия, нор мал изов анна я из Illumi na HiSeq q_R	1	48	22 4	0	1	42,16 1	3,71 E-09	- 1,586 207 (0,338 1)	6,0973 75 (0,0000)*	N/A	1,5491 07 (0,3641)

	NAS eqV 2)											
Свет локл еточ ная карц ино ма почк и (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Экс прес сия мРН К, RSE М (пар тия, нор мал изов анна я из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2)	0	69	27 8	5	0	38,34 2	4,72 E-09	N/A	6,1332 19 (0,0000)*	- 0,487 059 (0,939 3)	N/A
Аде нока рци ном а толс той киш ки (TC GA, Pan Can cer Atla s)	RSE М (пар тия, нор мал изов анна я из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2)	3	13 2	24 5	8	0	35,39 7	1,00 E-07	- 2,158 194 (0,092 7)	5,6706 00 (0,0000)*	0,781 046 (1,000 0)	N/A
Пло скок лето чная карц ино ма голо вы и шеи	Экс прес сия мРН К, RSE М (пар тия, нор	3	86	34 5	54	0	32,72	3,69 E-07	- 2,444 914 (0,043 5)	4,6807 89 (0,0000)*	- 1,530 670 (0,377 6)	N/A

(TC GA, Pan Can cer Atla s)	мал изов анна я из Illumina HiSeq q_R NAS eqV 2)											
Уро тели альн ая карц ино ма моч евог о пуз ыря (TC GA, Pan Can cer Atla s)	RSE M (пар тия, нор мал изов анна я из Illumina HiSeq q_R NAS eqV 2)	0	73	24 5	80	4	28,90 6	2,34 E-06	N/A	5,2032 51 (0,0000)*	0,211 744 (1,000 0)	0,5817 04 (1,0000)
Уве альн ая мела ном а (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРН К из Illumina HiSeq q_R NAS eqV	0	24	56	0	0	21,05 1	4,47 E-06	N/A	4,5880 95 (0,0000)*	N/A	N/A

	2 syn4 9763 69											
Аде нока рци ном а легк ого (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Экс прес сия мРН К, RSE М (пар тия, нор мал изов анна я из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2)	1	11 5	26 3	12 1	3	28,87 4	8,29 E-06	- 0,690 460 (1,000 0)	4,2801 00 (0,0001)*	- 0,626 707 (1,000 0)	2,2764 58 (0,1141)
Сер озна я цист аде нокар цин ома яичн иков (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРН К из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2 syn4 9763 69	0	59	78	60	4	25,34 9	1,31 E-05	N/A	4,3900 97 (0,0000)*	- 0,239 249 (1,000 0)	0,2405 43 (1,0000)

Рак мол очн ой жел езы (ME TAB RIC, Natu re 2012 & Nat Com mun 2016)	Экс прес сии мРН К (мик ром атри чны й анал из)	1	49 1	13 49	25	0	23,87 5	2,65 E-05	0,568 937 (1,000 0)	2,2745 64 (0,0688)	- 4,115 288 (0,000 1)*	N/A
Мез отел иом а (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРН К из Ilu mina HiSe q_R NAS eqV 2 syn4 9763 69	0	29	50	3	0	18,86 6	8,00 E-05	N/A	4,3194 25 (0,0000)*	0,170 478 (1,000 0)	N/A
Кол орек таль ная аден окар цин ома	РНК посл едо вате льно сть RPK М	0	53	13 8	2	0	18,84 7	8,08 E-05	N/A	4,2980 92 (0,0000)*	- 0,338 975 (1,000 0)	N/A

(TC GA, Nature 2012)												
Пло скок лето чная карц ино ма шей ки матк и (TC GA, Pan Cancer Atlas)	RSE M (пар тия, нор мал изов анна я из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2)	1	31	16 7	76	0	19,43 5	2,22 E-04	- 1,618 248 (0,316 8)	3,4296 09 (0,0018)*	- 1,446 339 (0,444 2)	N/A
Сар ком а (TC GA, Pan Cancer Atlas)	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРН К из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2 syn4 9763 69	0	43	11 3	70	4	19,38 9	2,27 E-04	N/A	3,6669 49 (0,0007)*	- 0,852 454 (1,000 0)	0,9530 27 (1,0000)

Энциклопедия линейных раковых клеток (Novartis/Broad, Nature 2012)	Экспрессия мРНК (микроматричный анализ)	17	279	418	150	13	20,977	0,00032	- 2,084879 (0,1854)	- 3,615935 (0,0015)*	- 2,007004 (0,2237)	- 0,108880 (1,0000)
Адекватности напряженности кишечника (TCGA, Pan Cancer Atlas)	Партиципация нормализованной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq RNA-Seq V2 syn4976369	1	54	78	3	0	18,215	0,0003971	- 1,926519 (0,1621)	3,877166 (0,0003)*	1,167400 (0,7291)	N/A
Гепатоцеллюлярная карцинома	EPHA2: экспрессия мРНК, RSE	1	130	194	21	2	15,514	0,003745	0,302341 (1,0000)	3,697248 (0,0011)*	- 0,336659 (1,0000)	0,454454 (1,0000)

пече ни (TC GA, Pan Can cer Atla s)	М (пар тия, нор мал изов анна я из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2)											
Аде нока рци ном а жел удка (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРН К из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2 syn4 9763 69	2	90	26 4	44	7	13,96 6	0,00 7404	- 2,072 978 (0,190 9)	1,6060 72 (0,5413)	- 1,750 466 (0,400 2)	1,6028 06 (0,5449)
Энд омет риал ьная карц ино ма тела матк и (TC	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп	3	61	39 5	43	5	12,91 6	0,01 17	- 1,905 863 (0,283 3)	1,0393 07 (1,0000)	- 1,597 383 (0,550 9)	2,2687 98 (0,1164)

GA, Pan Cancer Atlas)	рессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369											
Меланома кожи (TCGA, Pan Cancer Atlas)	Партия нормально обьединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369	2	70	216	72	3	12,242	0,01564	1,094526 (1,0000)	2,674493 (0,0374)	0,095966 (1,0000)	1,692628 (0,4526)
Аденокарцинома предстательной железы (TCGA, Pan Cancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормально обьединенная)	0	44	438	4	1	10,112	0,01764	N/A	2,905502 (0,0110)*	1,374609 (0,5078)	-0,082790 (1,0000)

GA, Pan Cancer Atlas)	анна я из Illumina HiSeq q_R NAS eqV 2)											
Хромофобная почечно-клеточная карцинома (TCGA, Pan Cancer Atlas)	Экспрессия мРНК, RSEM (партия, нормализованная из Illumina HiSeq q_RNAS eqV2)	0	52	12	1	0	7,878 1	0,01 947	N/A	2,4983 40 (0,0187))*	1,863 169 (0,093 7)	N/A
Опухоль Вилльмса в детском возрасте (TARGET, 2018)	EphA2: экспрессия мРНК (PK-последовательность RPKM)	0	22	74	5	0	7,491 2	0,02 362	N/A	2,6907 66 (0,0107))*	- 0,173 274 (1,000 0)	N/A
Феохромоцитомы	Партия нормализов	4	96	60	1	0	8,807 4	0,03 196	- 1,411 567 (0,474 2)	2,2013 44 (0,0831)	1,946 134 (0,154 9)	N/A

параганглиома (TCGA, Pan Cancer Atlas)	анно й/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369											
Карцинома щитовидной железы (TCGA, Pan Cancer Atlas)	Партия нормализованной/объединенной экспрессии мРНК из Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369	0	4	474	2	0	5,1773	0,08	N/A	2,221884 (0,0394)	0,503577 (0,9218)	N/A
Аденокарцинома пищевода	RSEM (партия, нормализованная)	1	64	83	32	1	7,6886	0,1037	-1,462679 (0,7178)	0,910990 (1,0000)	-1,682311 (0,4625)	-0,362298 (1,0000)

евод а (TC GA, Pan Can cer Atla s)	изов анна я из Ilu mina HiSe q_R NAS eqV 2)											
Хол анги окар цин ома (TC GA, Pan Can cer Atla s)	RSE M (пар тия, нор мал изов анна я из Ilu mina HiSe q_R NAS eqV 2)	2	27	7	0	0	4,169 1	0,12 44	- 2,037 840 (0,062 3)	0,9721 00 (0,4965)	N/A	N/A
Гли ома голо вног о мозг а низк ой степ ени злок ачес твен ност и (TC GA, Pan Can cer Atla s)	RSE M (пар тия, нор мал изов анна я из Ilu mina HiSe q_R NAS eqV 2)	0	19 1	30 3	13	0	4,047 3	0,13 22	N/A	0,7223 83 (0,7051)	- 1,771 514 (0,114 7)	N/A

Тим ома (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРН К из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2 syn4 9763 69	0	8	11 0	1	0	4,032 2	1,33 E-01	N/A	1,9823 34 (0,0712)	0,369 115 (1,000 0)	N/A
Ост рый лим фол ейко з в детс ком возр асте - фаза II (TA RGE T, 2018)	Eph a2: эксп ресс ия мРН К (РН К- посл едо- вате льно сть RPK M)	1	6	70	4	0	5,530 9	0,13 68	1,437 404 (0,451 8)	- 0,8051 00 (1,0000)	1,607 586 (0,323 8)	N/A
Диф фуз ная В- круп нокл еточ ная	Экс прес сия мРН К, RSE M (пар	0	4	33	0	0	1,744	0,18 66	N/A	1,3206 13 (0,0933)	N/A	N/A

лим фом а (TC GA, Pan Can cer Atla s)	тия, нор мал изов анна я из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2)											
Мул ьти фор мна я глио блас тома (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Экс прес сия мРН К, RSE М (пар тия, нор мал изов анна я из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2)	0	13	10 4	28	0	2,937 6	0,23 02	N/A	1,4287 78 (0,2296)	- 0,716 110 (0,710 9)	N/A
Мет аста тиче ский рак пред стат ельн ой жел езы, SU2 C/P CF Drea m Tea	Экс прес сия мРН К/за хват (РН К- посл едов ател ьнос ть RPK М)	2	21	87	7	0	4,069	0,25 4	- 1,812 613 (0,209 7)	0,9925 71 (0,9628)	0,314 089 (1,000 0)	N/A

m (Rob inso n et al., Cell 2015)												
Ост рый мие лоле йкоз (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Экс прес сия мРН К, RSE М (пар тия, нор мал изов анна я из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2)	0	1	16 0	4	0	2,401 6	0,30 1	N/A	- 1,5391 42 (0,1857)	- 0,199 532 (1,000 0)	N/A
Опу хол и пол овы х клет ок яичк а (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРН К из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2	1	29	92	22	0	3,314 4	0,34 56	0,574 846 (1,000 0)	- 0,4431 10 (1,0000)	- 1,751 161 (0,239 8)	N/A

	syn4 9763 69											
Адр енок орти каль ная карц ино ма (TC GA, Pan Can cer Atla s)	RSE M (пар тия, нор мал изов анна я из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2)	0	28	47	1	0	2,000 3	0,36 78	N/A	1,3463 97 (0,2673)	0,550 103 (0,873 4)	N/A
Кар цин осар ком а матк и (TC GA, Pan Can cer Atla s)	Пар тия нор мал изов анно й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРН К из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2 syn4 9763 69	0	16	22	16	2	2,44	0,48 62	N/A	0,4760 71 (1,0000)	- 0,550 292 (1,000 0)	1,2151 02 (0,6730)
Аде нока рци ном а под	Пар тия нор мал изов анно	2	50	10 6	9	1	3,383 3	4,96 E-01	- 1,195 082 (1,000 0)	0,1594 42 (1,0000)	- 0,602 558 (1,000 0)	1,2176 97 (1,0000)

жел удоч ной жел езы (TC GA, Pan Can cer Atla s)	й/об ъеди ненн ой эксп ресс ии мРН К из Illu mina HiSe q_R NAS eqV 2 syn4 9763 69											
Аде нока рци ном а пред стат ельн ой жел езы (MS KC C, Can cer Cell 2010)	Экс прес сия мРН К	0	5	77	3	0	1,313 9	0,51 84	N/A	- 0,4065 79 (1,0000)	- 1,089 948 (0,413 6)	N/A

Аде нока рци ном а пред стат ельн ой жел езы (Fre d Hutc hins on CRC , Nat Med 2016)	Экс прес сия мРН К	0	39	84	10	0	0,028 351	0,98 59	N/A	0,1604 04 (1,0000)	0,079 785 (1,000 0)	N/A
---	--------------------------------	---	----	----	----	---	--------------	------------	-----	------------------------------	------------------------------	-----

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидный лиганд, обладающий специфичностью к EphA2, включающий полипептид, содержащий, по меньшей мере, три остатка цистеина, разделенных, по меньшей мере, двумя петлевыми последовательностями, и неароматический молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с остатками цистеина полипептида таким образом, что, на молекулярном каркасе формируются, по меньшей мере, две полипептидные петли.

2. Пептидный лиганд по п. 1, где указанные петлевые последовательности включают 2, 3, 5, 6 или 7 аминокислот.

3. Пептидный лиганд по п. 1 или п. 2, где указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, одна из которых состоит из 2 аминокислот, а другая состоит из 7 аминокислот (таких как аминокислоты, представленные в таблице 4).

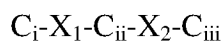
4. Пептидный лиганд по п.1 или п. 2, где указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 5 аминокислот (таких как аминокислоты, представленные в таблицах 3 и 4).

5. Пептидный лиганд по п.1 или п. 2, где указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 6 аминокислот (таких как аминокислоты, представленные в таблицах 3-5 и 10).

6. Пептидный лиганд по п.1 или п. 2, где указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, одна из которых состоит из 7 аминокислот, а другая состоит из 3 аминокислот (таких как аминокислоты, представленные в таблице 4).

7. Пептидный лиганд по п.1 или п. 2, где указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, одна из которых состоит из 6 аминокислот, а другая состоит из 7 аминокислот (таких как аминокислоты, представленные в таблице 5).

8. Пептидный лиганд по любому из пп. 1-7, где пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из:



где X_1 и X_2 представляют аминокислотные остатки между остатками цистеина, приведенные в таблицах 3-5 и 10, и C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Пептидный лиганд по любому из пп. 1-8, где пептидный лиганд включает аминокислотную последовательность, выбранную из одного или более пептидных лигандов, приведенных в одной или более таблицах 3-5 и 10.

10. Пептидный лиганд по любому из пп. 1-8, где указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми

последовательностями, обе из которых состоят из 6 аминокислот, и пептидный лиганд имеет следующую аминокислотную последовательность:

$C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1); и

$C_i\text{PLVNPLC}_{ii}\text{LHPGWTC}_{iii}$ (SEQ ID NO: 97);

такую как:

$C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1);

где HyP представляет собой гидроксипролин, HArg представляет собой гомоаргинин, и C_i , C_{ii} и C_{iii} представляют первый, второй и третий остатки цистеина, соответственно, или его фармацевтически приемлемая соль.

11. Пептидный лиганд по п. 10, где указанные петлевые последовательности включают три остатка цистеина, разделенных двумя петлевыми последовательностями, обе из которых состоят из 6 аминокислот, и пептидный лиганд имеет следующую аминокислотную последовательность:

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 2) (BCY6099; соединение 66); и

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i\text{PLVNPLC}_{ii}\text{LHPGWTC}_{iii}((\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-(SEQ ID NO: 11)})$ (BCY6014; соединение 67);

такую как:

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 2) (BCY6099; соединение 66);

где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин и HyP представляет собой гидроксипролин.

12. Пептидный лиганд по любому из пп. 1-11, где молекулярный каркас выбирают из 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА), и пептидный лиганд выбирают из любого одного из пептидных лигандов, приведенных в таблицах 3, 4, 5 и 10.

13. Пептидный лиганд по любому из пп. 1-11, где молекулярный каркас выбирают из 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-она (ТАТА), и пептидный лиганд представляет собой

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 2) (BCY6099; соединение 66); и

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i\text{PLVNPLC}_{ii}\text{LHPGWTC}_{iii}((\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-(SEQ ID NO: 11)})$ (BCY6014; соединение 67);

такую как:

$(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A}(\text{HArg})\text{D-}C_i(\text{HyP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP}(\text{D-Asp})\text{W}(\text{HArg})\text{C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 2) (BCY6099; соединение 66);

где Sar представляет собой саркозин, HArg представляет собой гомоаргинин и HyP представляет собой гидроксипролин.

14. Пептидный лиганд по любому из пп. 1-13, который выбирают из любого одного из соединений 1-113, или его фармацевтически приемлемая соль.

15. Пептидный лиганд по любому из пп. 1-13, который представляет собой соединение 66 (BCY6099) или соединение 67 (BCY6014), или его фармацевтически приемлемую соль, такое как соединение 66 (BCY6099) или его фармацевтически приемлемую соль.

16. Пептидный лиганд по любому из пп. 1-15, где фармацевтически приемлемую соль выбирают из соли свободной кислоты или соли натрия, калия, кальция, аммония.

17. Пептидный лиганд по любому из пп. 1-16, где EphA2 представляет собой EphA2 человека.

18. Конъюгат лекарственного средства, включающий пептидный лиганд по любому из пп. 1-17, конъюгированный с одной или более эффекторными и/или функциональными группами.

19. Конъюгат лекарственного средства по п. 18, где указанное цитотоксическое средство выбирают из DM1 или MMAE.

20. Конъюгат лекарственного средства по п. 18 или п. 19, который дополнительно включает линкер между указанным пептидным лигандом и указанными цитотоксическими средствами.

21. Конъюгат лекарственного средства по п. 20, где указанное цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер выбирают из -Val-Cit-, -Trp-Cit-, -Val-Lys-, -D-Trp-Cit-, -Ala-Ala-Asn-, D-Ala-Phe-Lys- или -Glu-Pro-Cit-Gly-hPhe-Tyr-Leu- (SEQ ID NO: 98).

22. Конъюгат лекарственного средства по п. 21, где указанное цитотоксическое средство представляет собой MMAE, и линкер представляет собой -Val-Cit-.

23. Конъюгат лекарственного средства по п. 20, где указанное цитотоксическое средство представляет собой DM1, и линкер выбирают из -S-S-, -SS(SO₃H)-, -SS(Me)-, -(Me)-SS-(Me)-, -SS(Me₂)- или -SS(Me)-SO₃H-.

24. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп. 18-23, который выбирают из любого одного из BCY6027, BCY6028, BCY6031 и BCY6032; BDCs, приведенных в таблицах 11 или 13; или BCY6033, BCY6082, BCY6136 и BCY6173.

25. Конъюгат лекарственного средства по п. 24, который выбирают из любого одного из BCY6031, BCY6033, BCY6082, BCY6135, BCY6136, BCY6173, BCY6174 и BCY6175.

26. Конъюгат лекарственного средства по п. 24 или п. 25, который представляет собой BCY6136.

27. Фармацевтическая композиция, которая включает пептидный лиганд по любому из пп. 1-17 или конъюгат лекарственного средства по любому одному из пп. 18-26 в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

28. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп. 18-26 для применения для предотвращения, торможения развития или лечения заболевания или нарушения, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани.

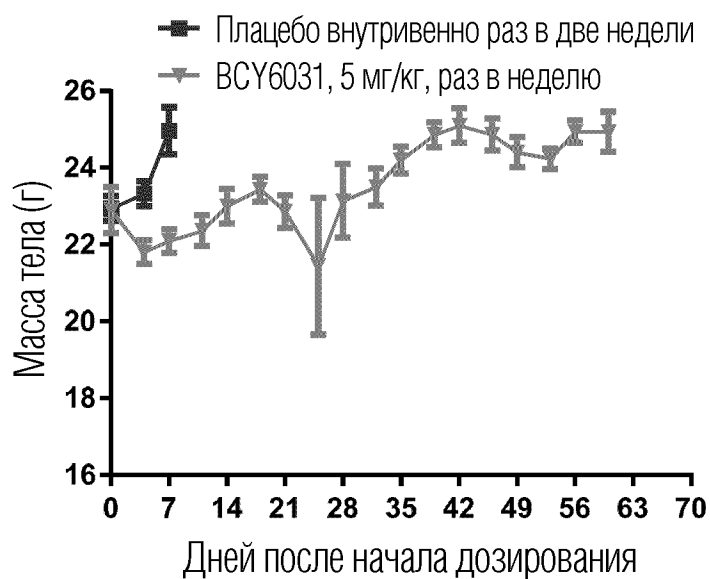
29. Конъюгат лекарственного средства по любому из пп. 18-26 для применения с целью предотвращения, торможения развития или лечения рака.

30. Конъюгат лекарственного средства для применения по п. 29, где рак выбирают из рака предстательной железы, рака легкого (такого как немелкоклеточные карциномы легкого (NSCLC)), рака молочной железы (такого как трижды негативный рак молочной железы), рака желудка, рака яичников, рака пищевода, множественной миеломы и фибросаркомы.

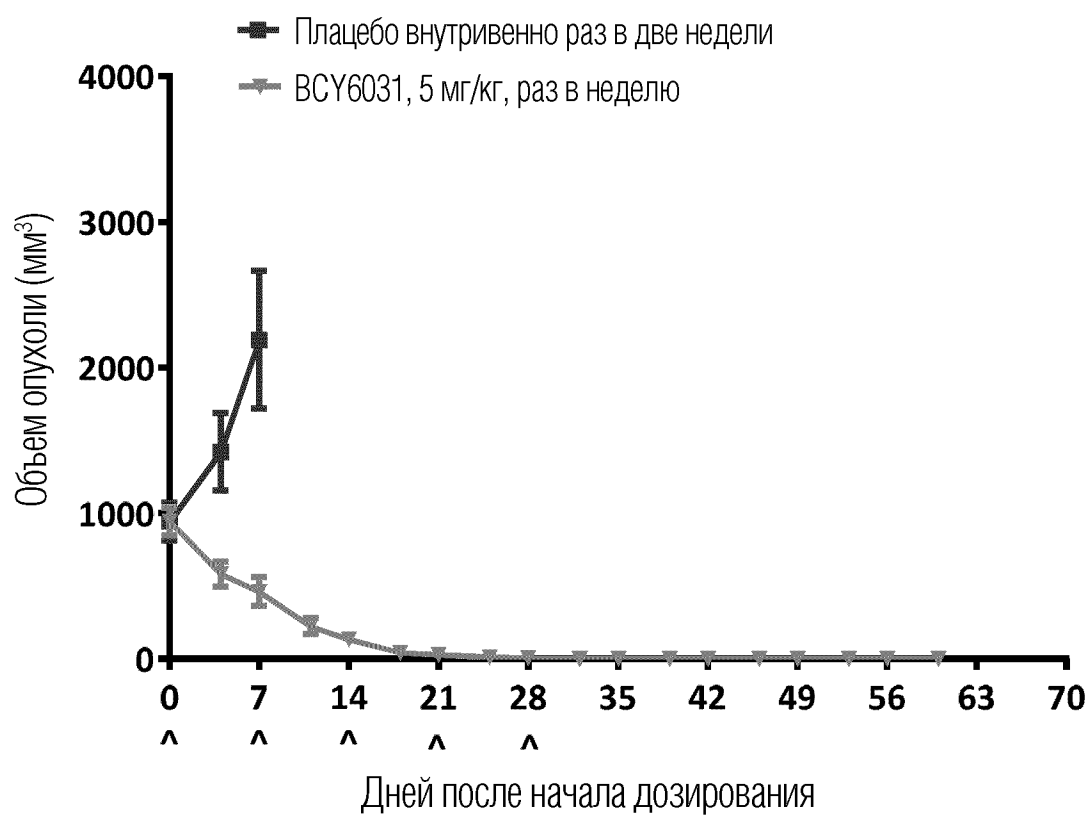
31. Способ предотвращения, торможения развития или лечения рака, который включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгат лекарственного средства по любому из пп. 18-26, где у указанного пациента выявлено наличие повышенной вариации числа копий (CNV) EphA2.

По доверенности

1/21

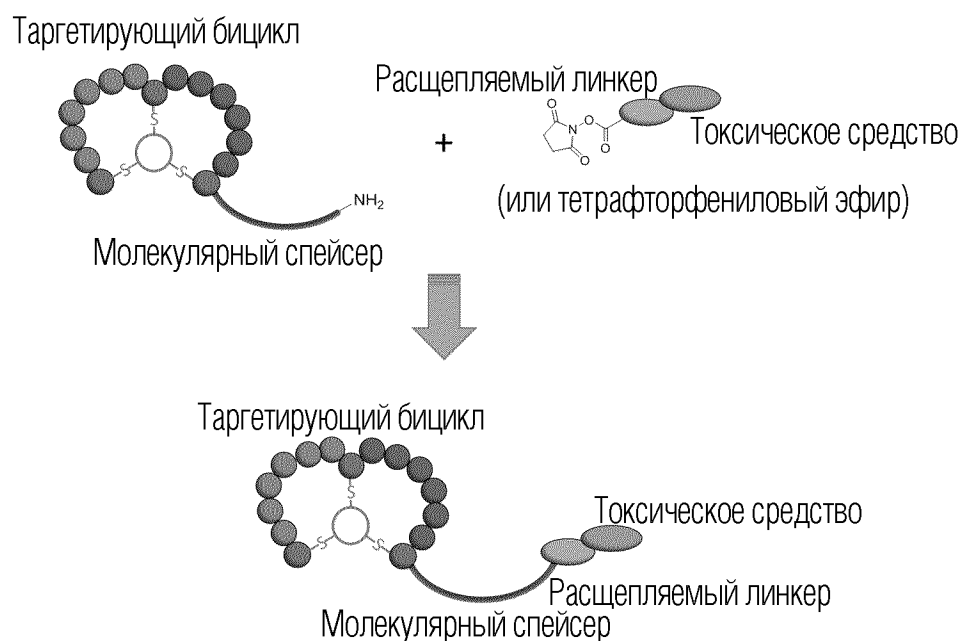


ФИГ. 1

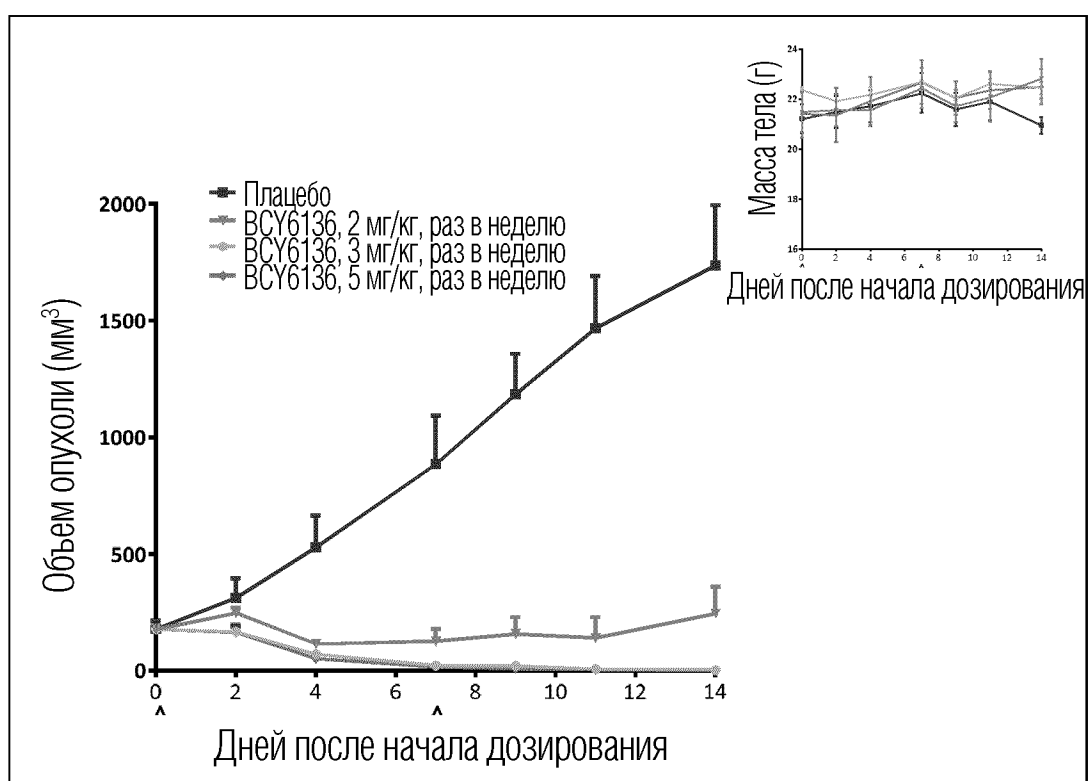


ФИГ. 2

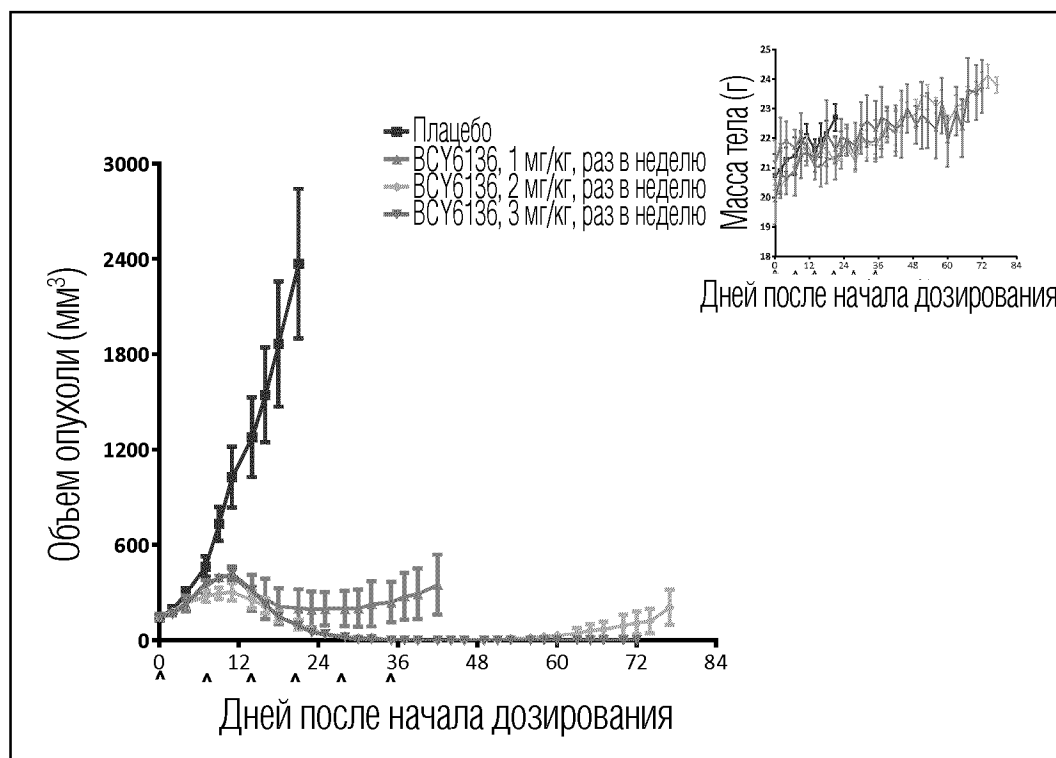
Бициклические конъюгаты лекарственных средств®



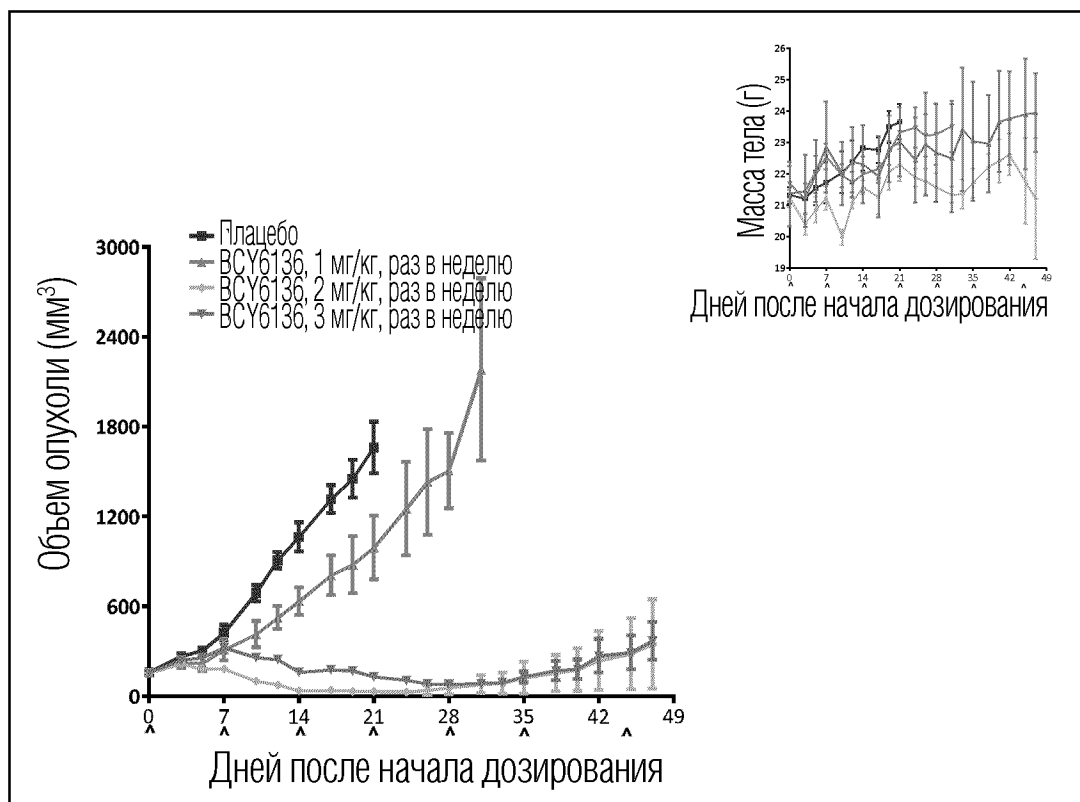
ФИГ. 3



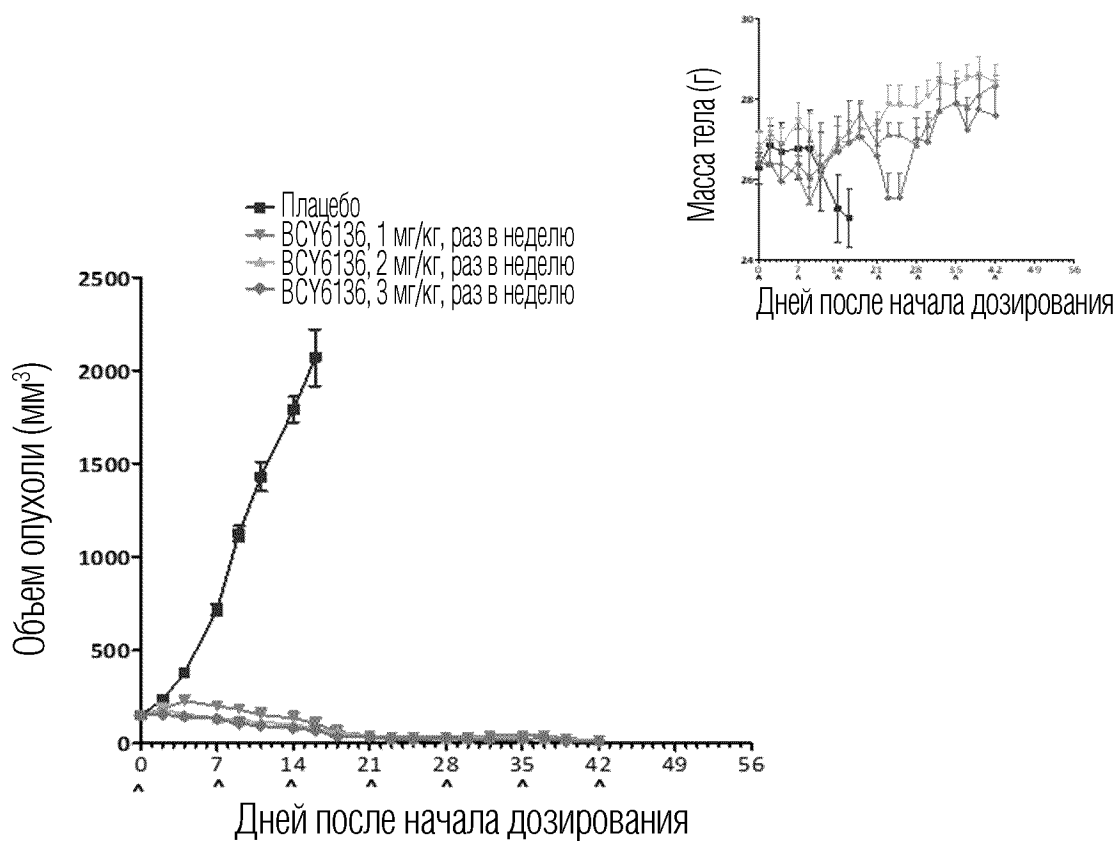
ФИГ. 4



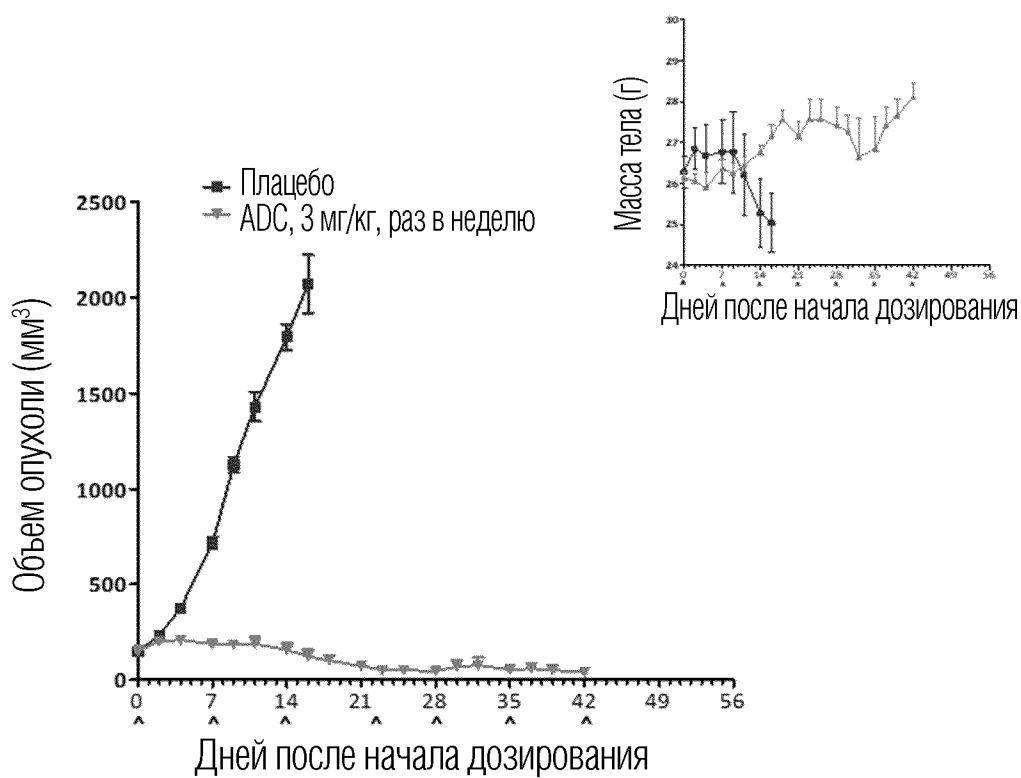
ФИГ. 5



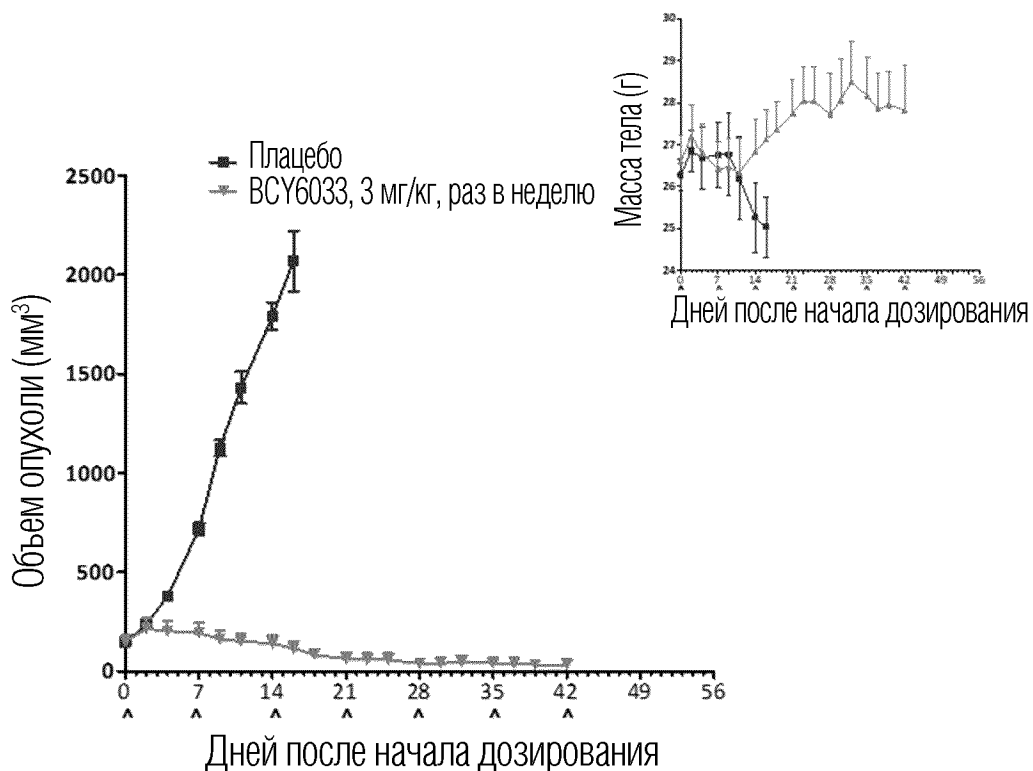
ФИГ. 6



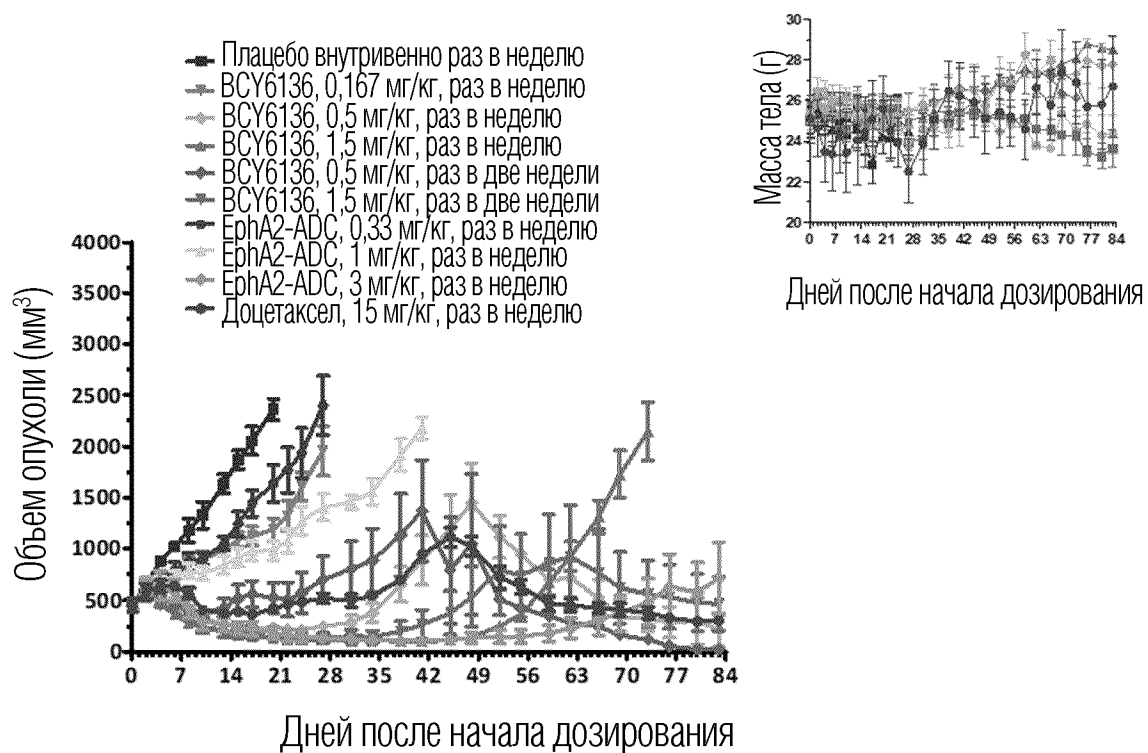
ФИГ. 7



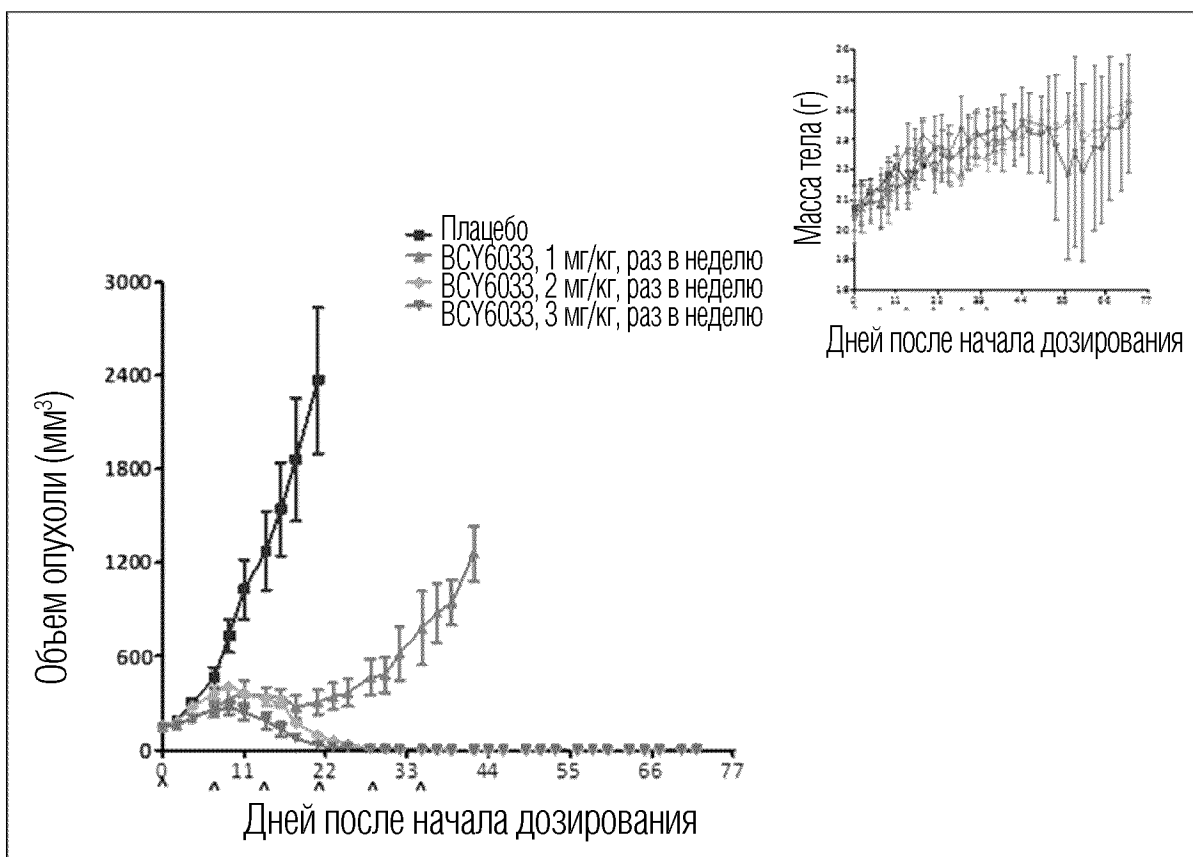
ФИГ. 8



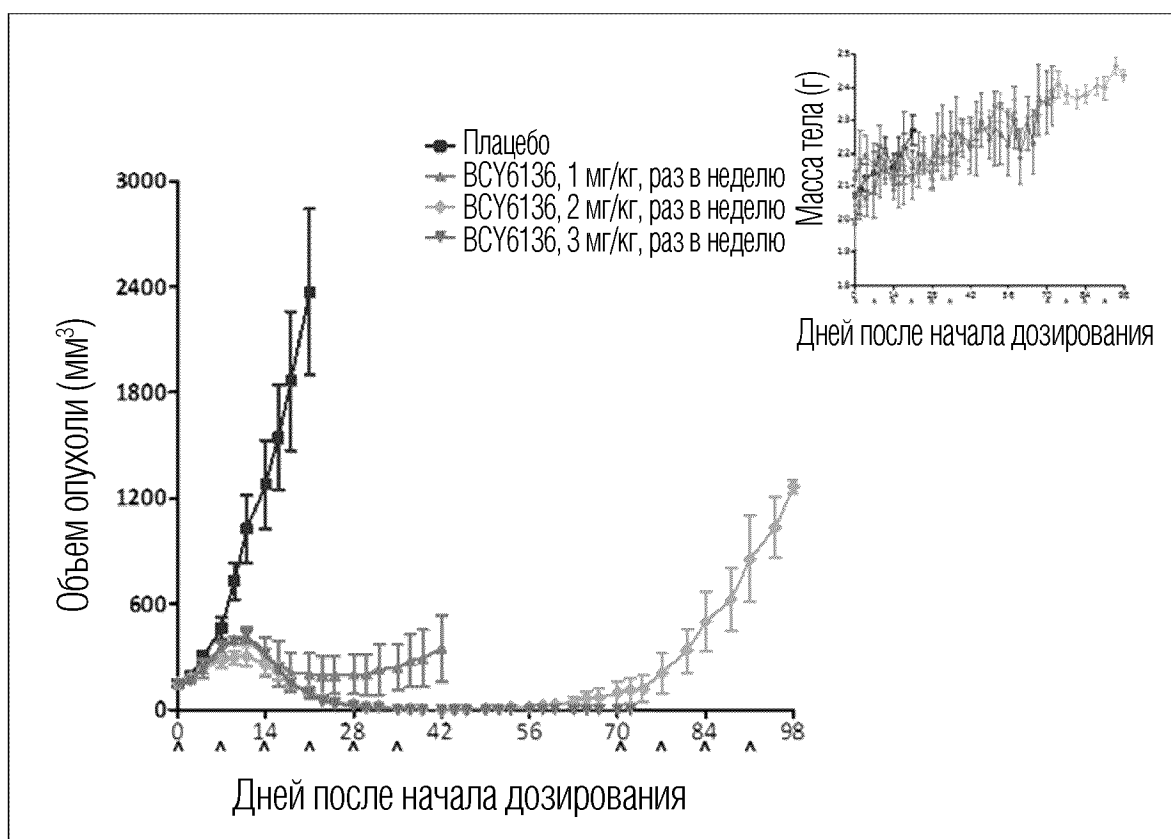
ФИГ. 9



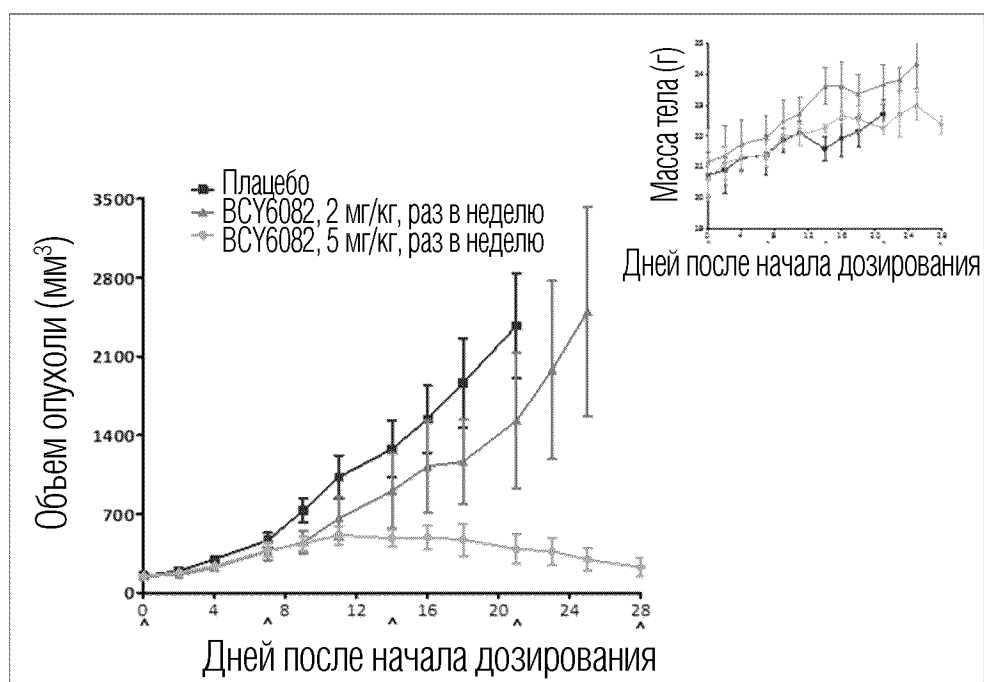
ФИГ. 10



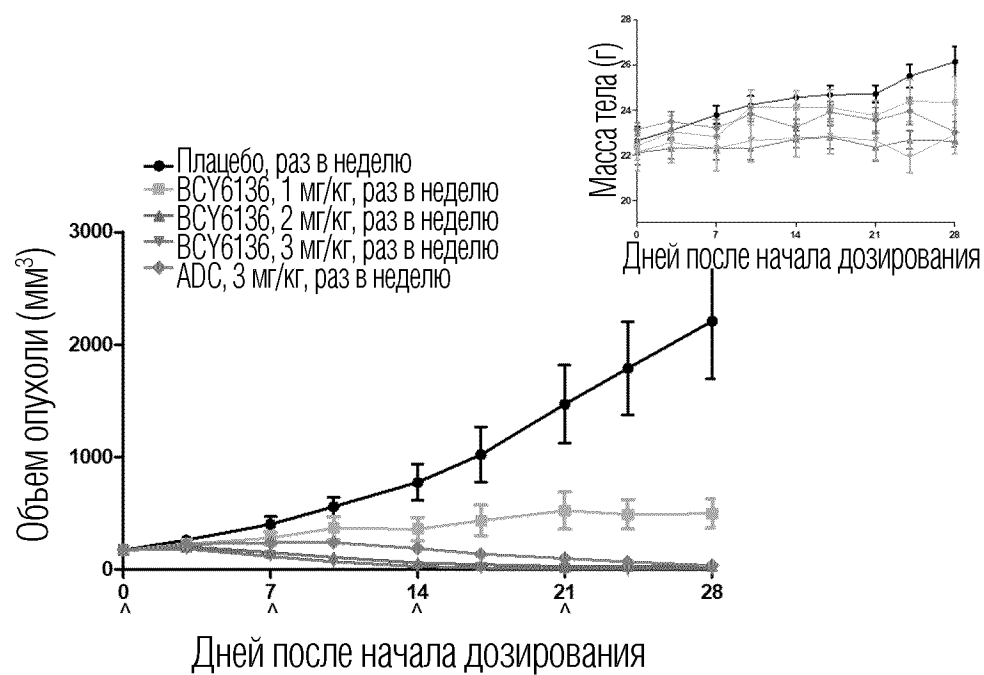
ФИГ. 11



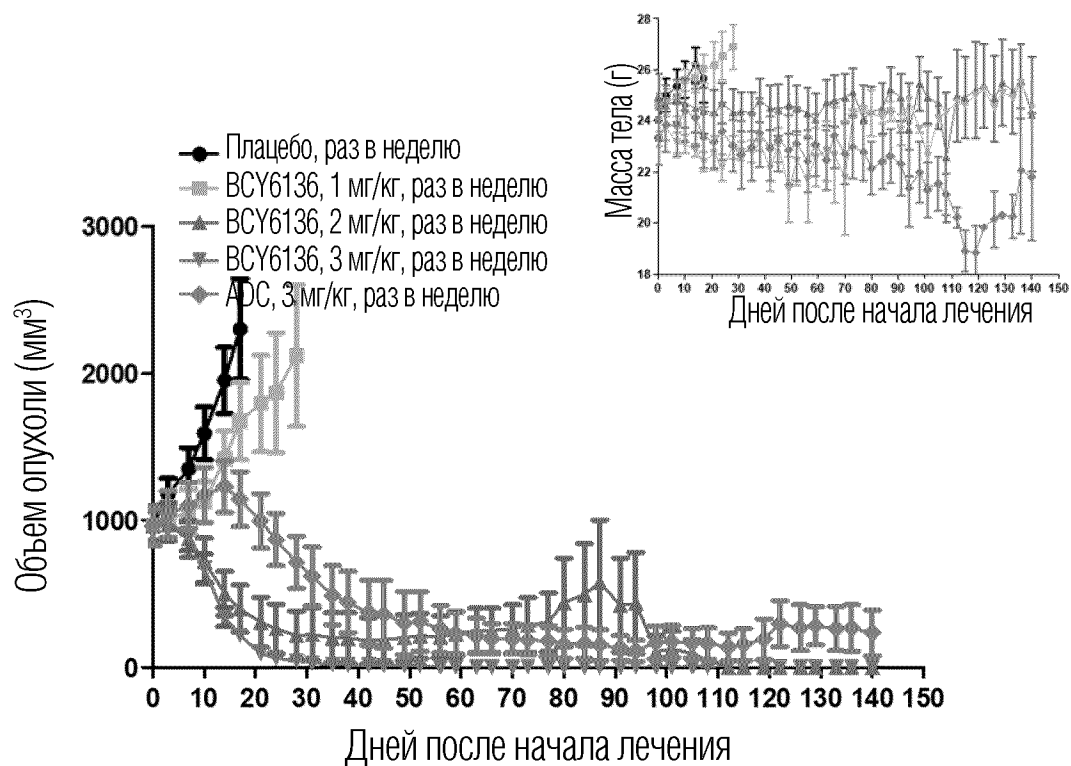
ФИГ. 12



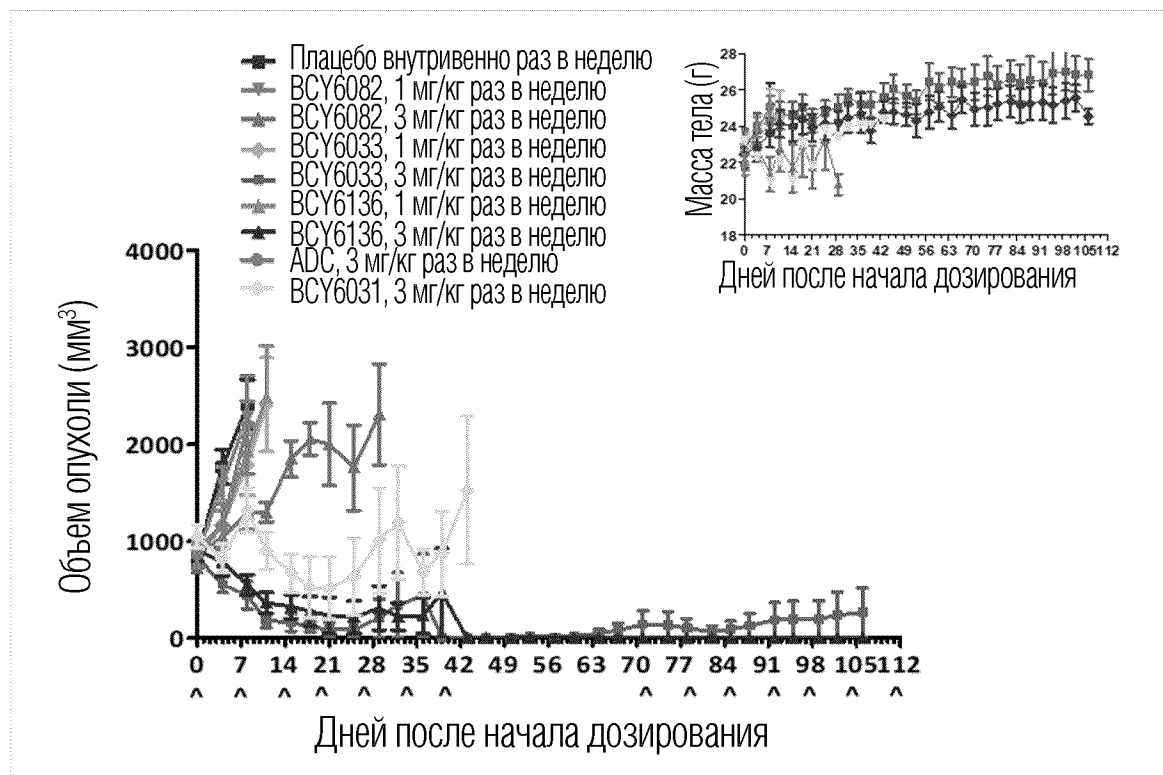
ФИГ. 13



ФИГ. 14

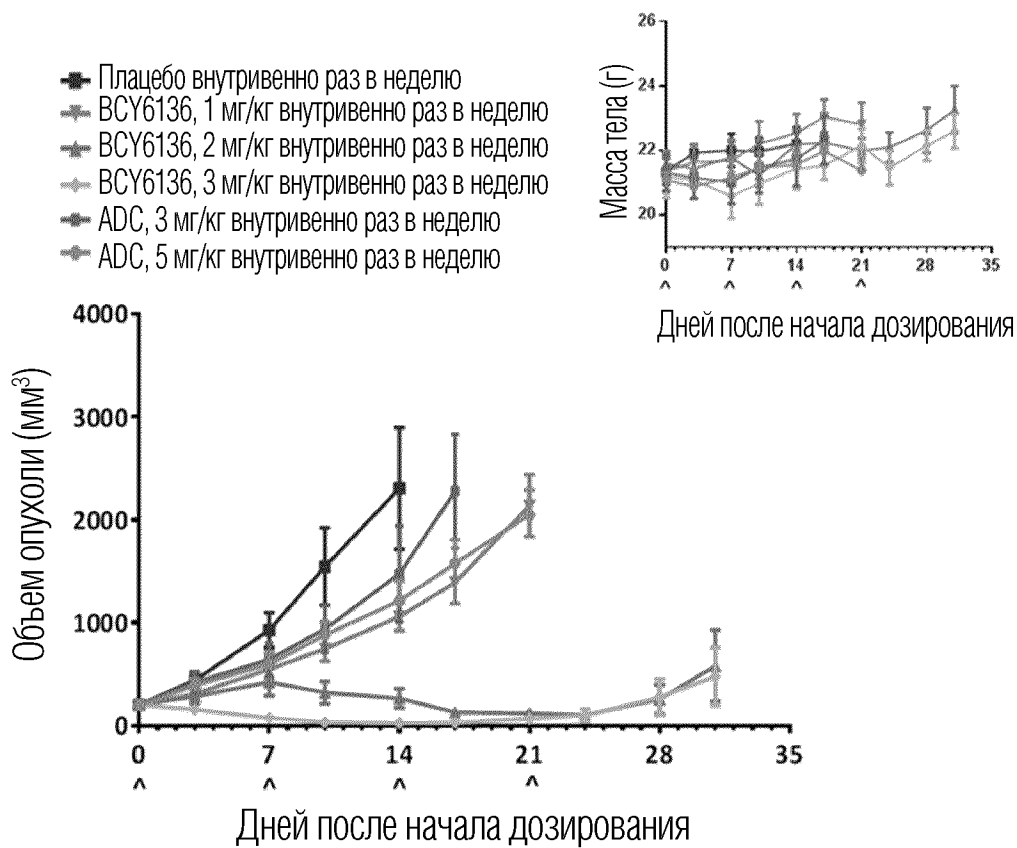


ФИГ. 15

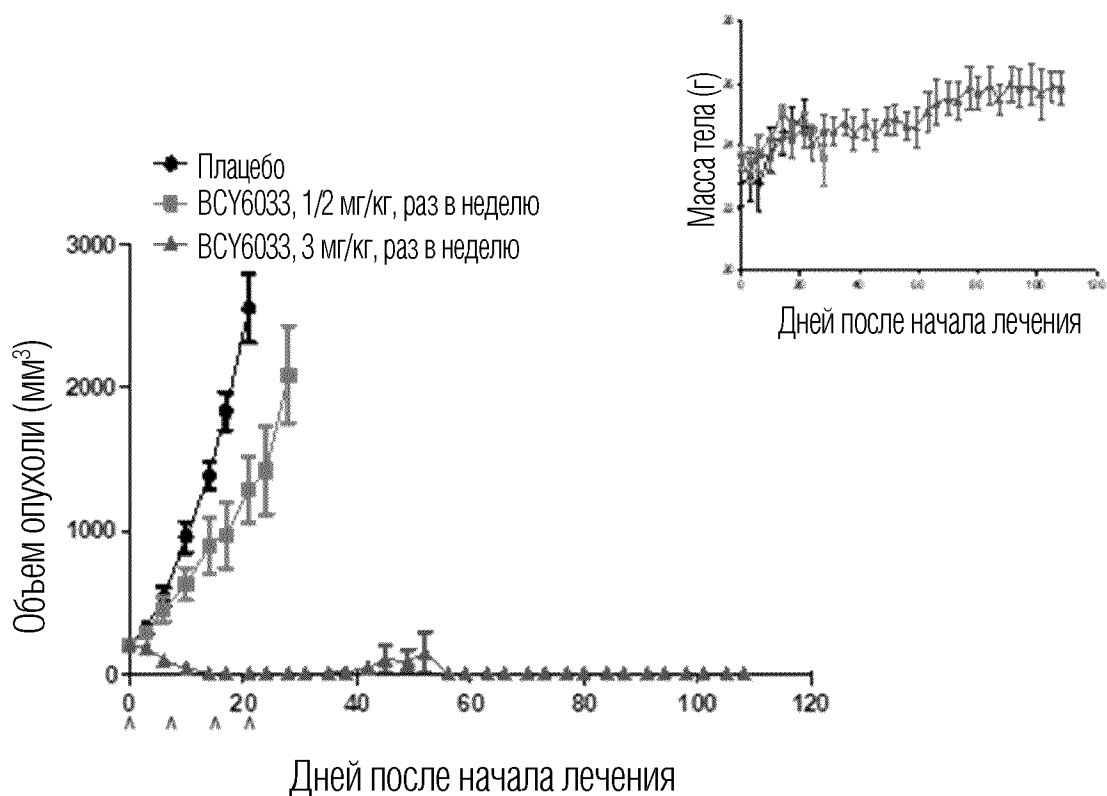


ФИГ. 16

9/21

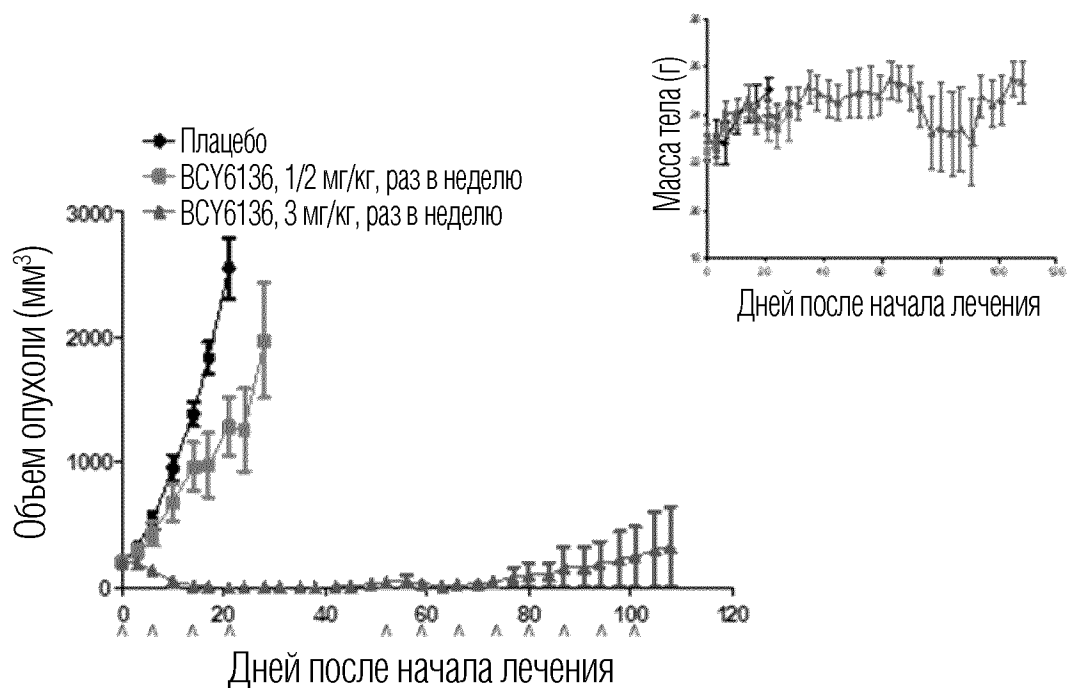


ФИГ. 17

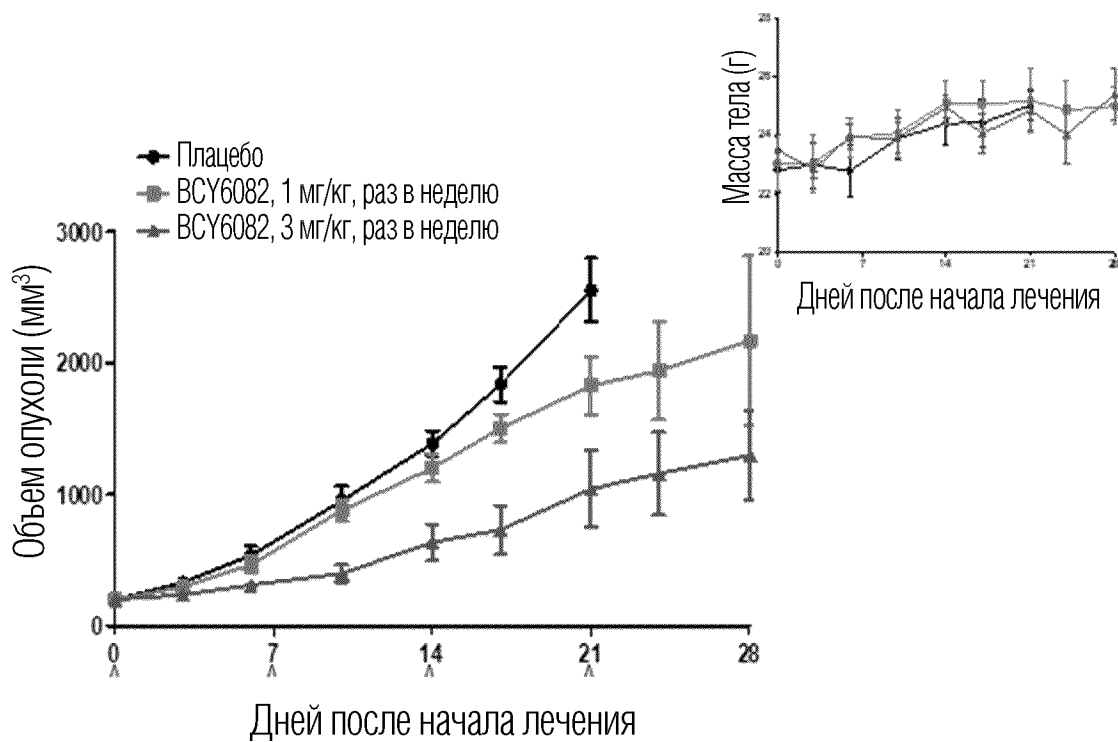


ФИГ. 18

10/21

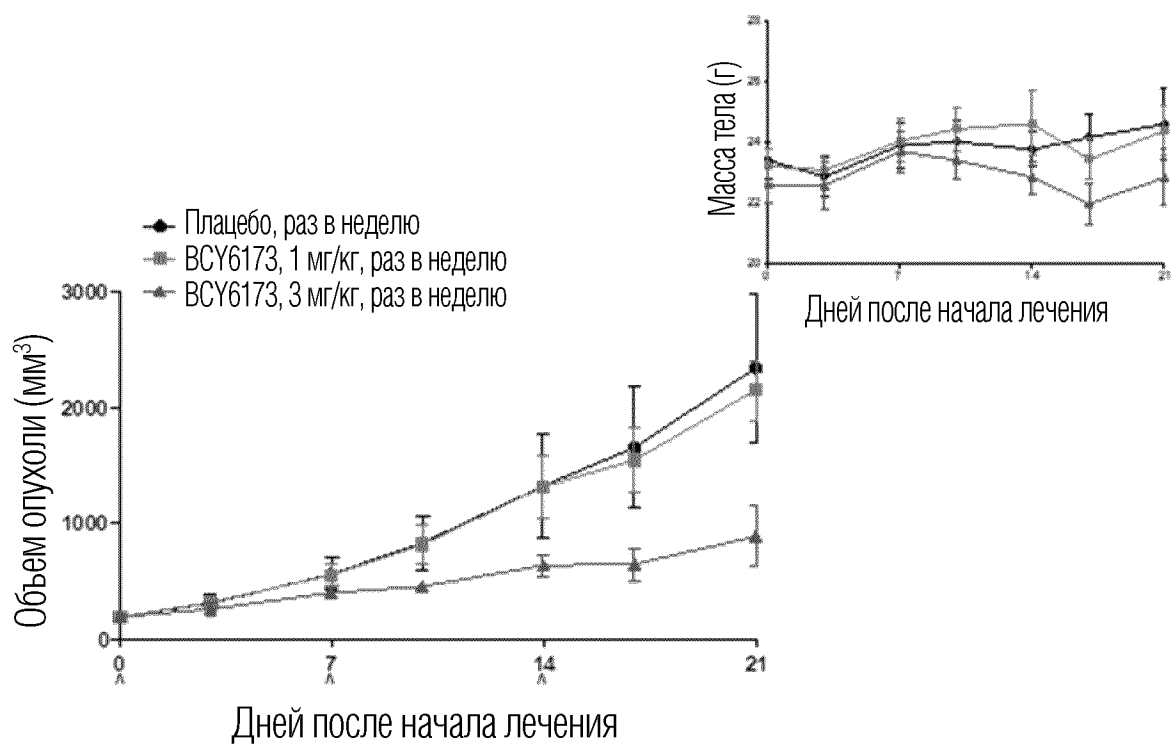


ФИГ. 19

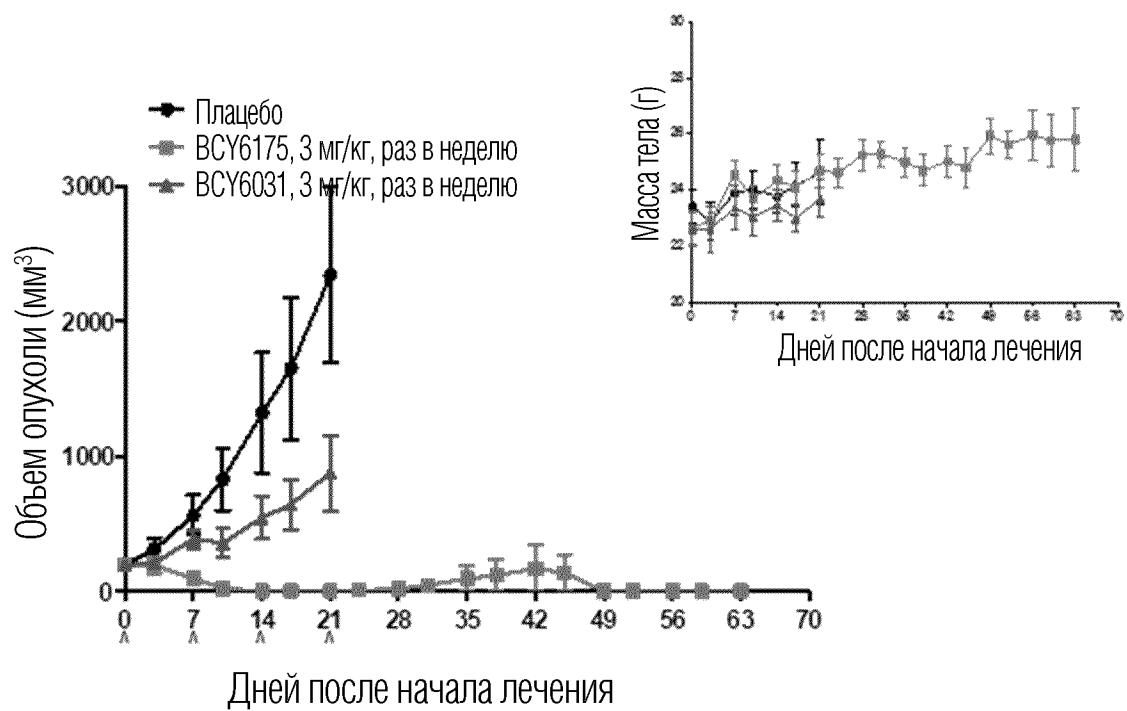


ФИГ. 20

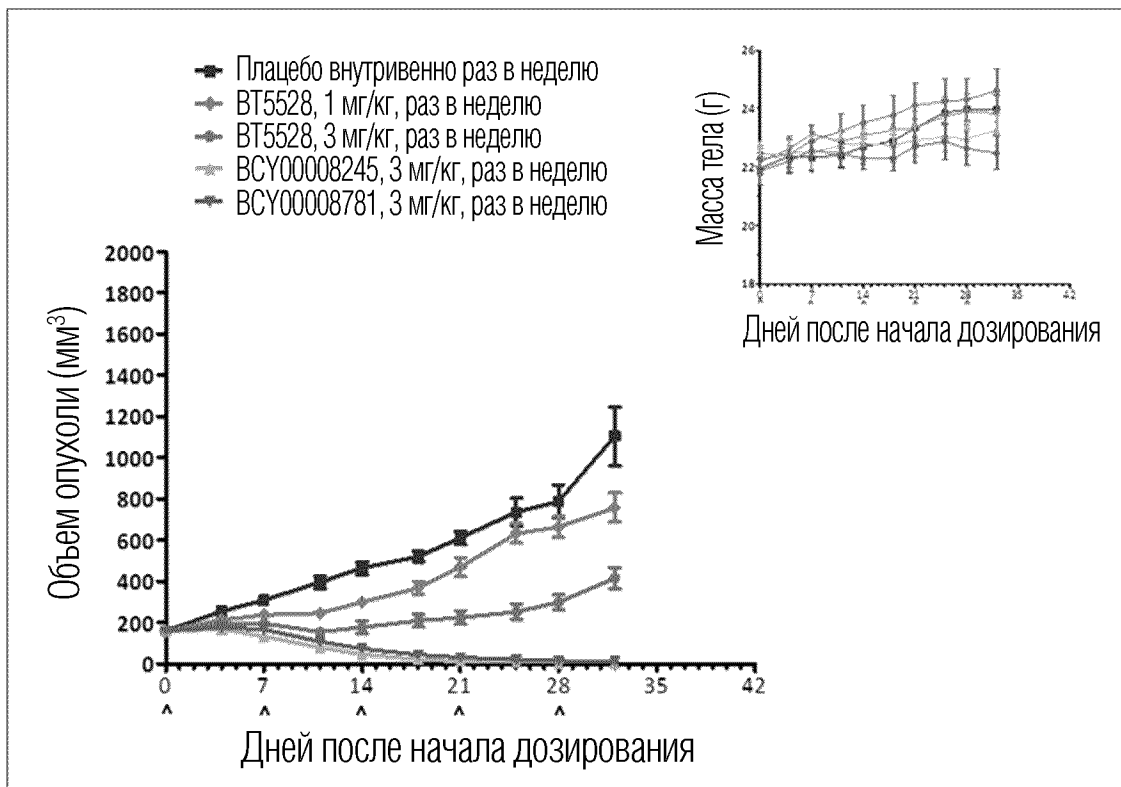
11/21



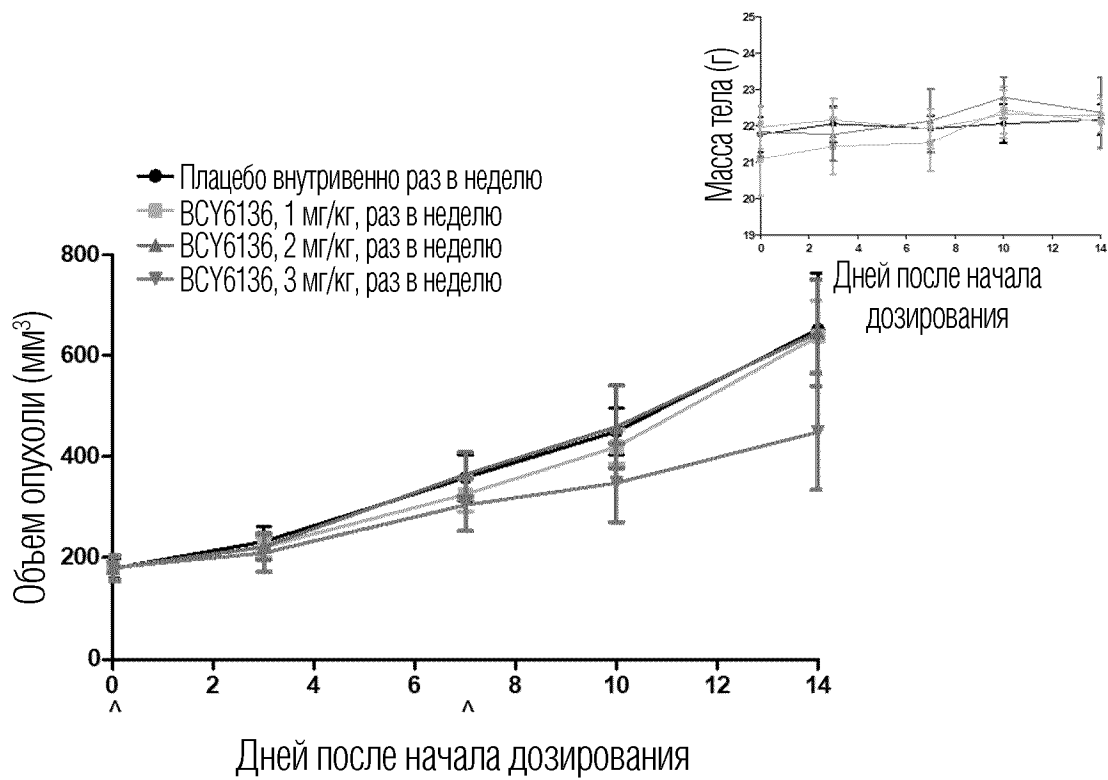
ФИГ. 21



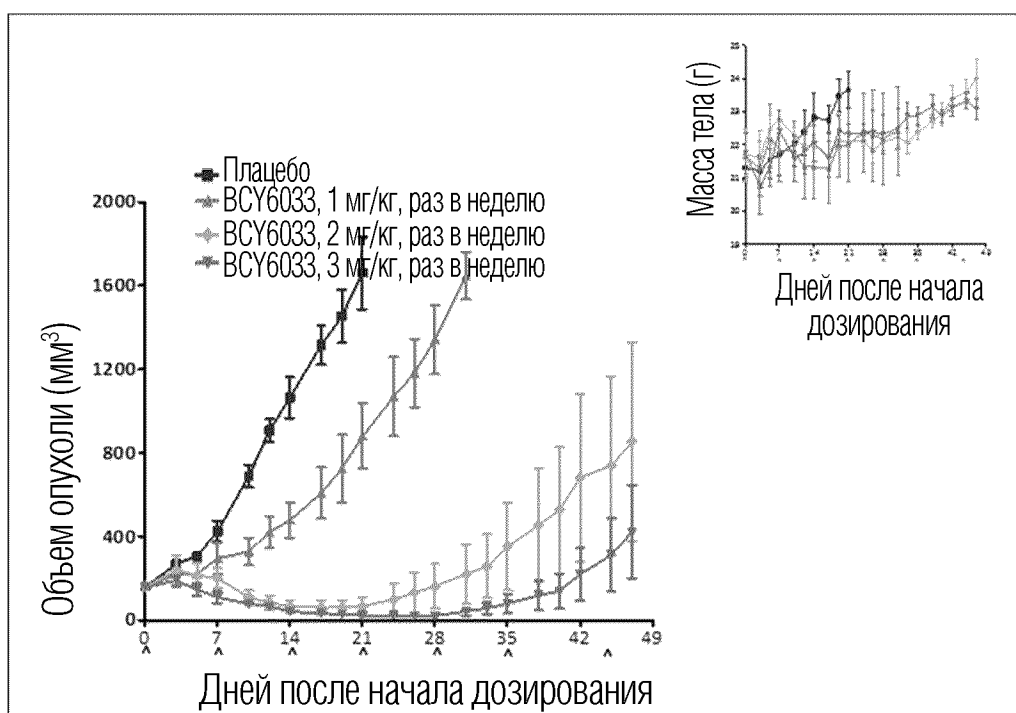
ФИГ. 22



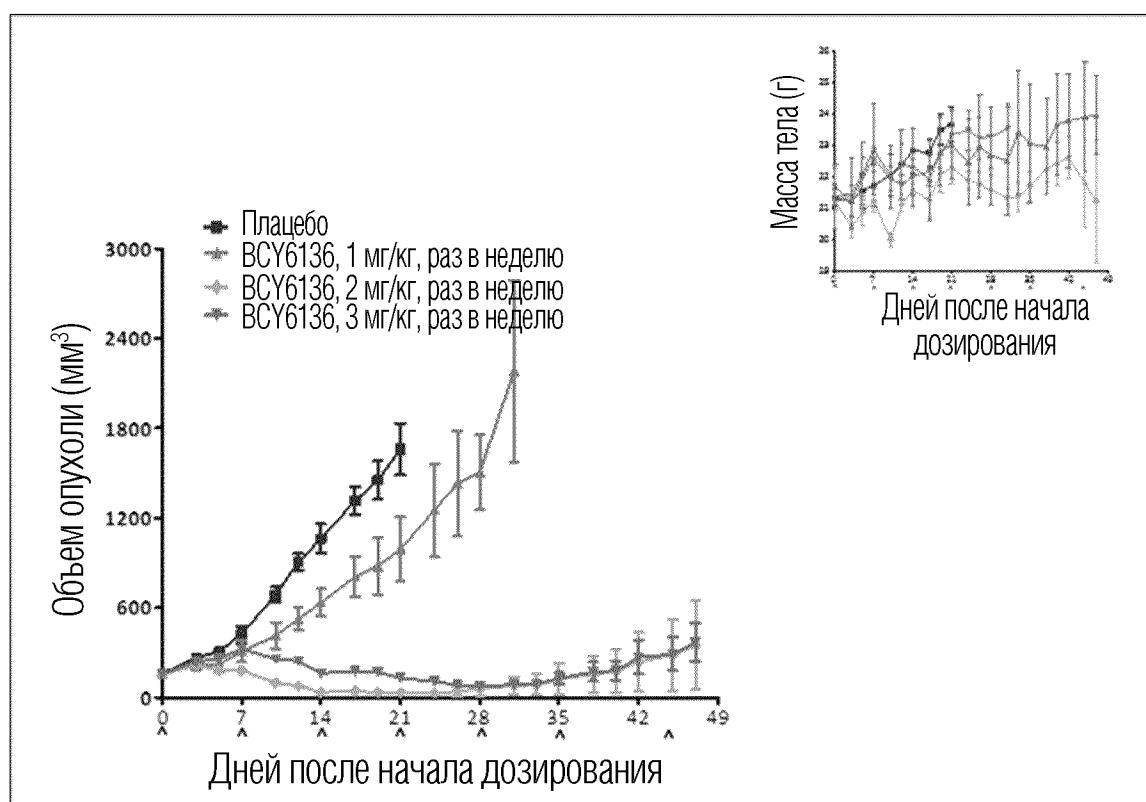
ФИГ. 23



ФИГ. 24

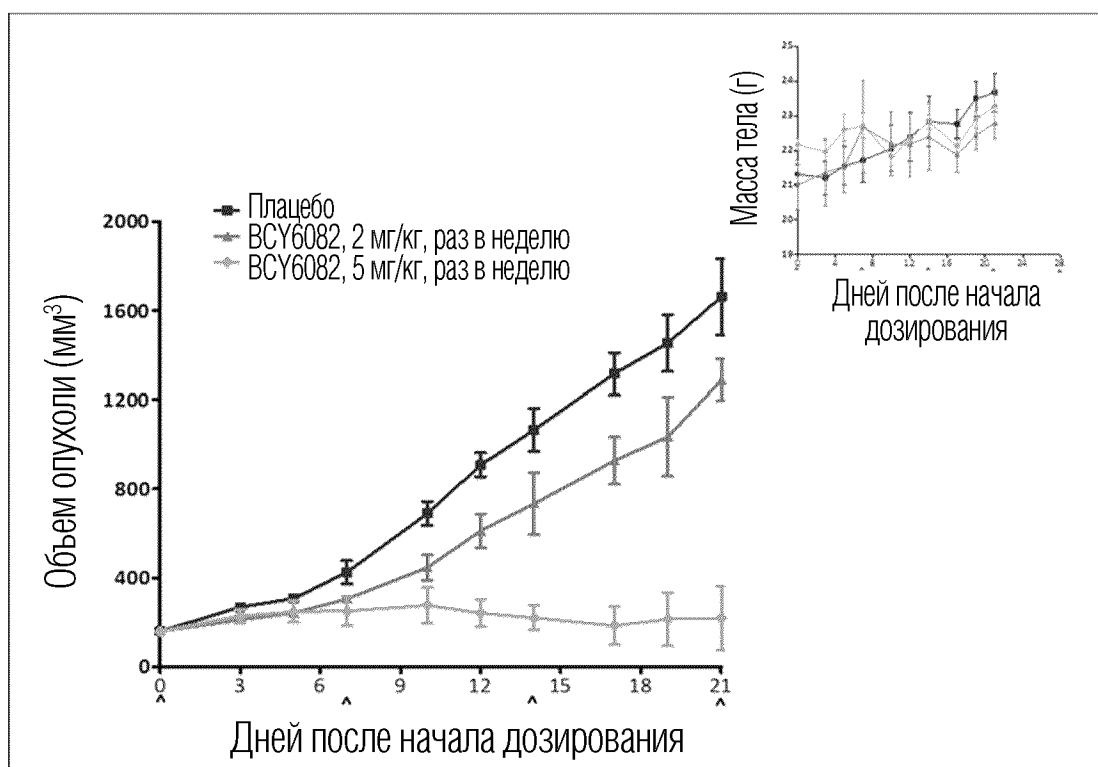


ФИГ. 25

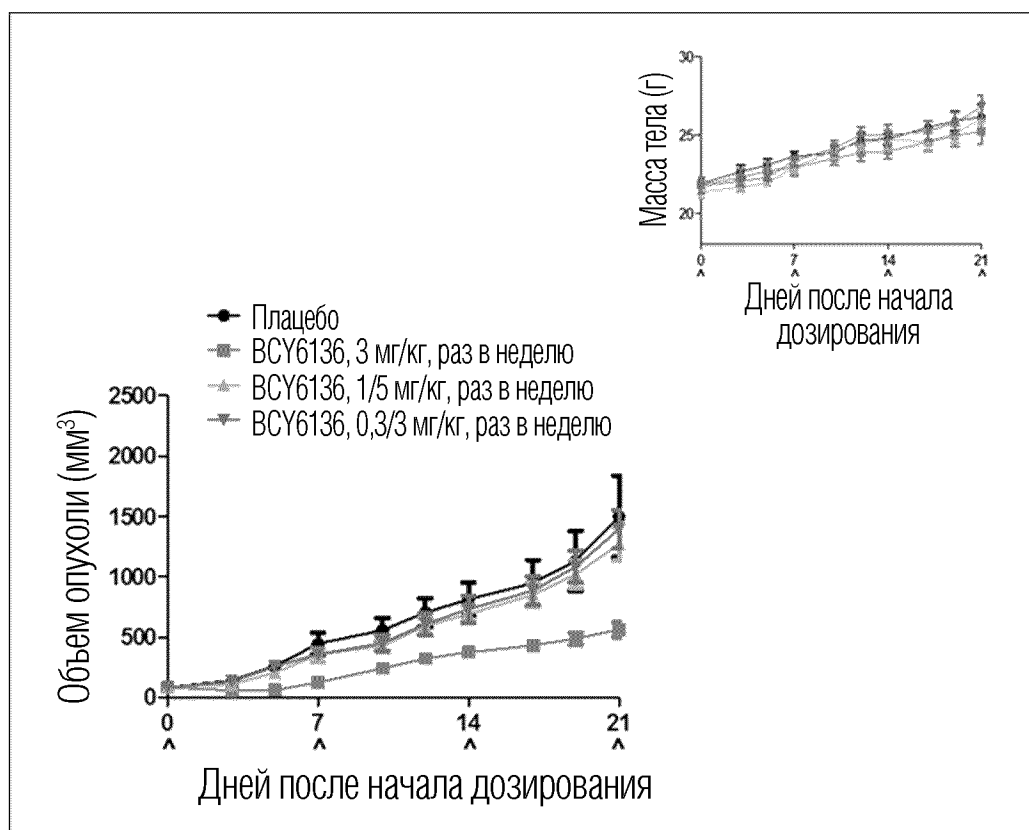


ФИГ. 26

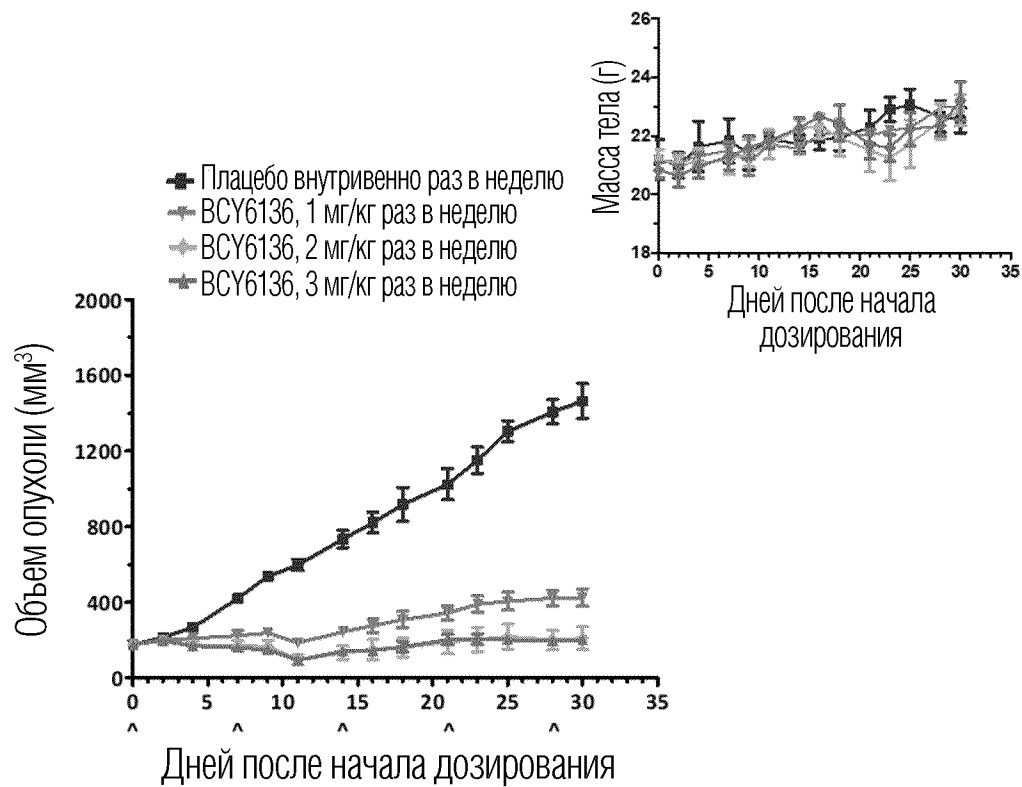
14/21



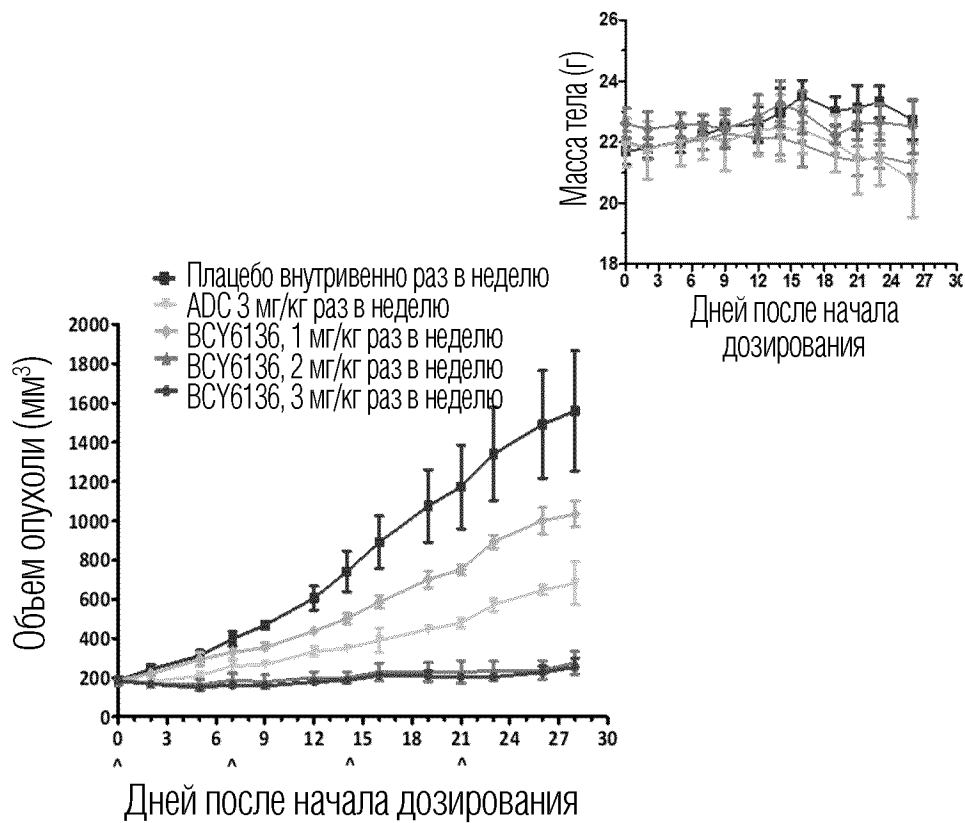
ФИГ. 27



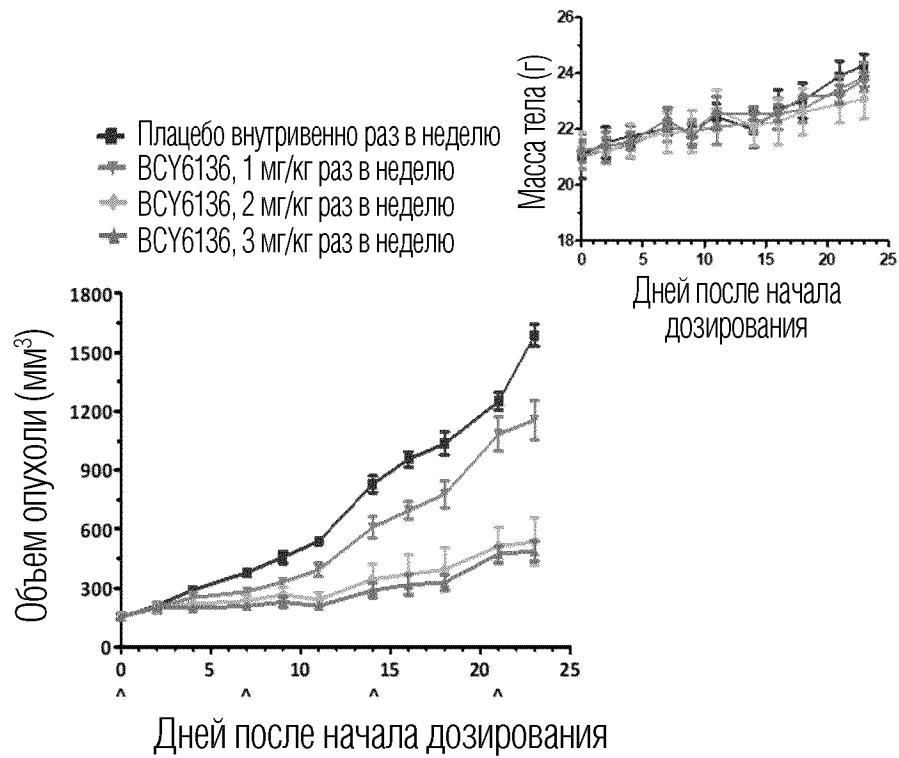
ФИГ. 28



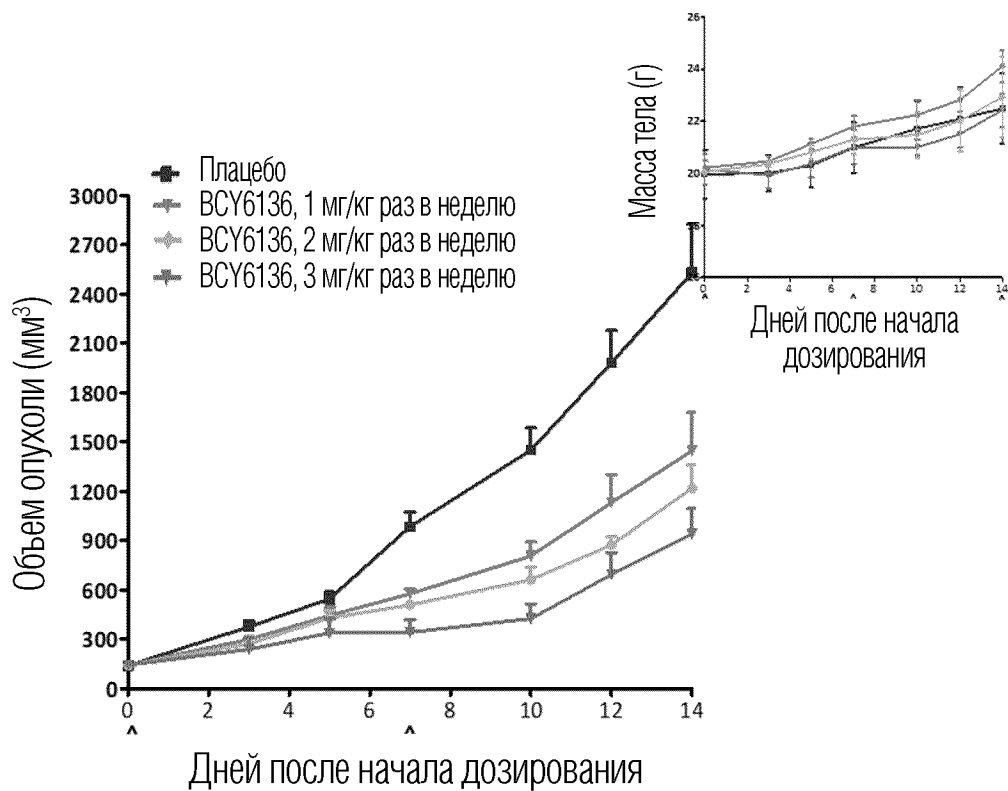
ФИГ. 29



ФИГ. 30

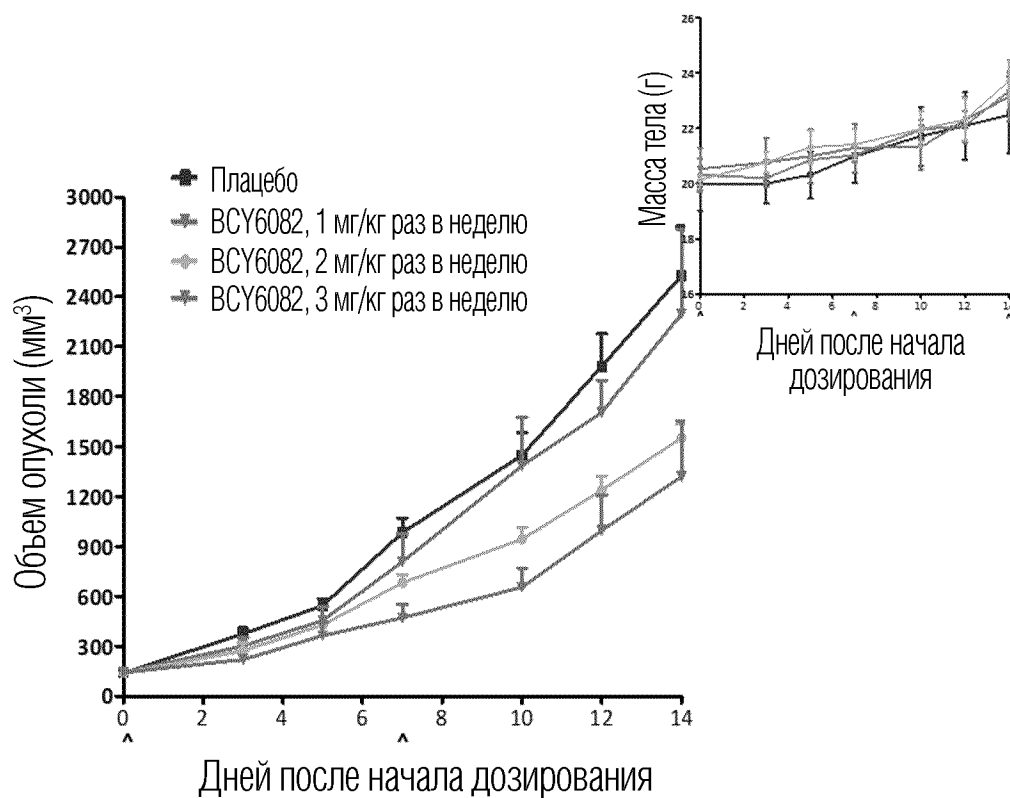


ФИГ. 31

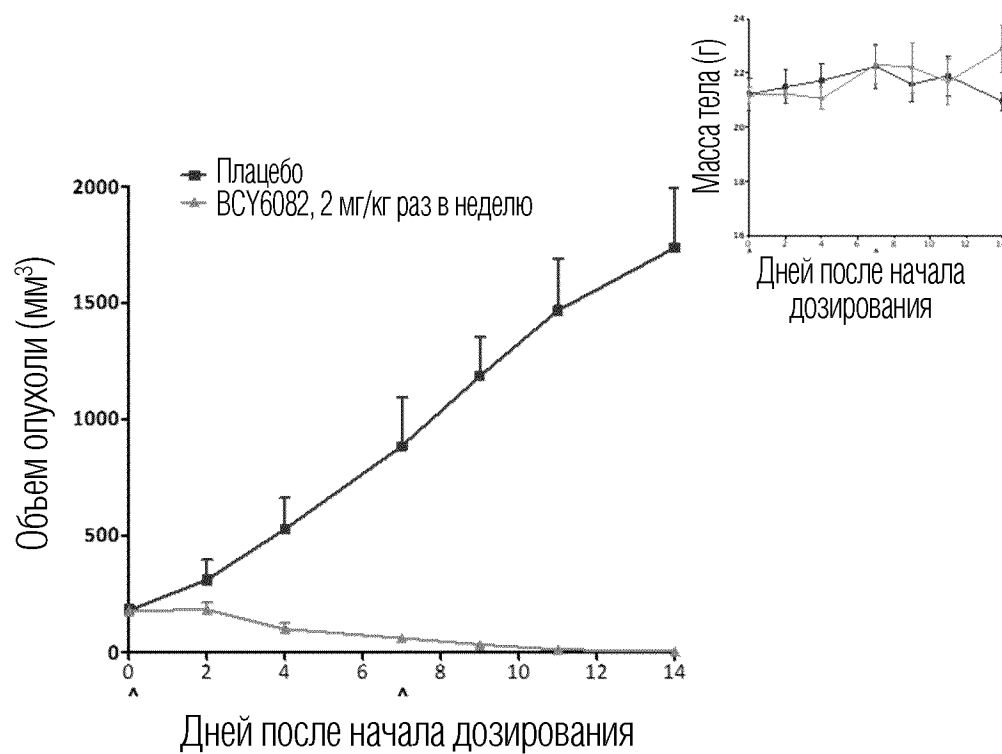


ФИГ. 32

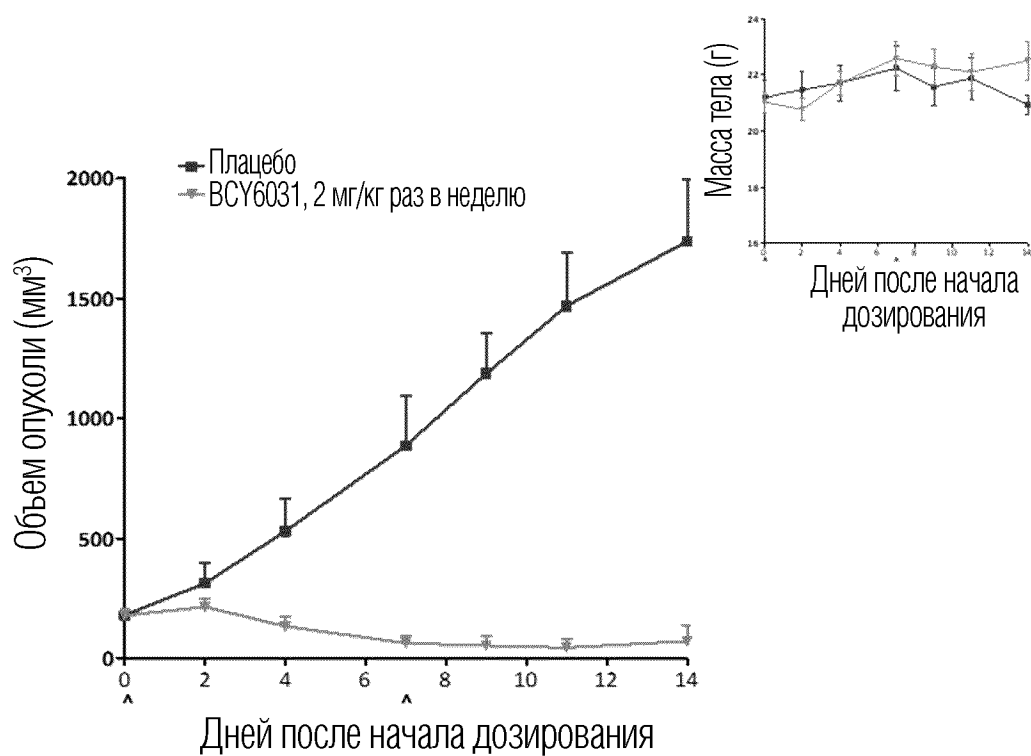
17/21



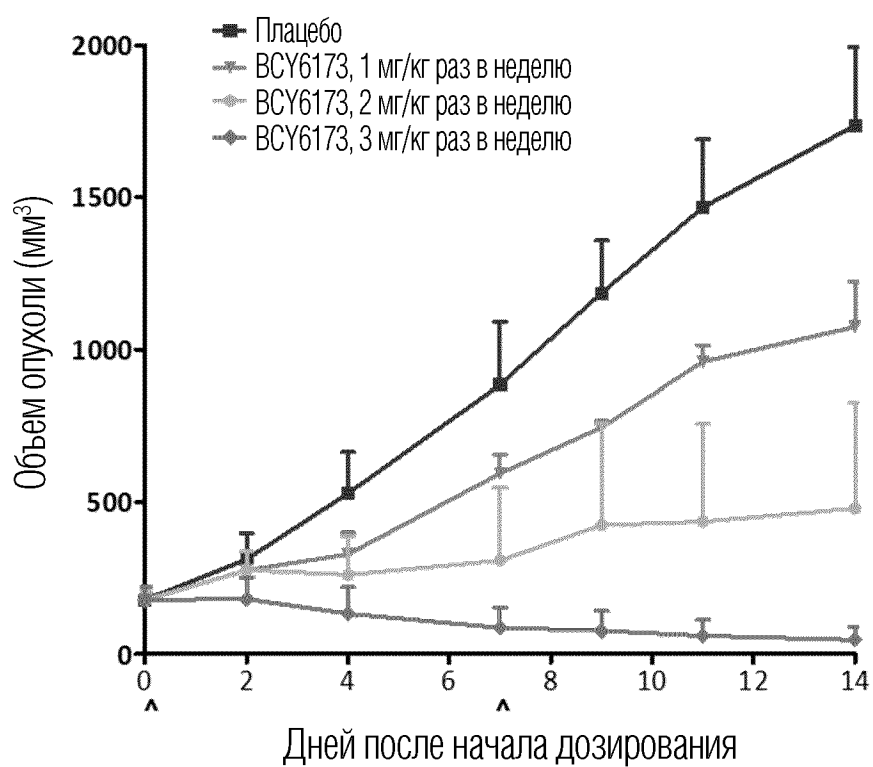
ФИГ. 33



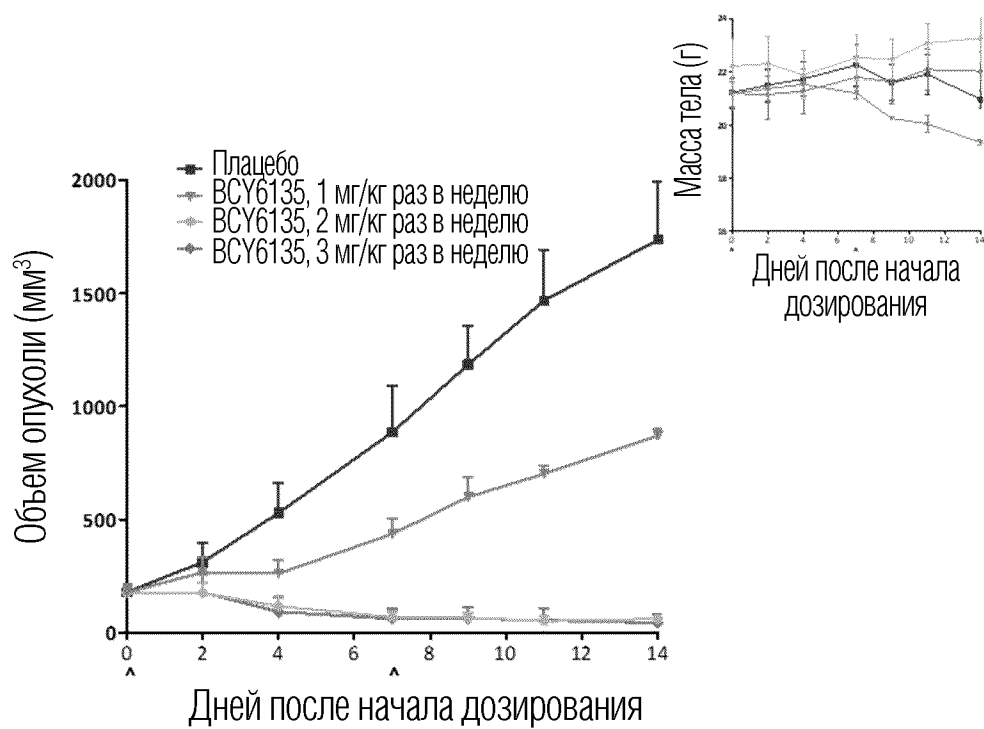
ФИГ. 34



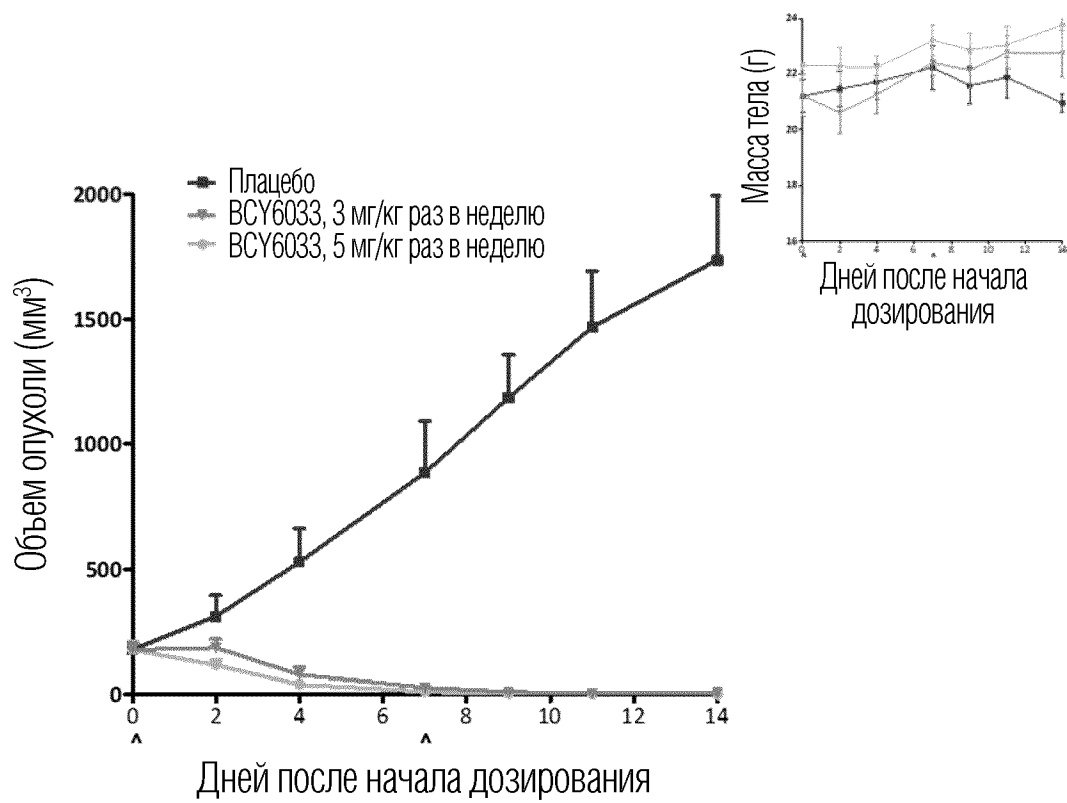
ФИГ. 35



ФИГ. 36

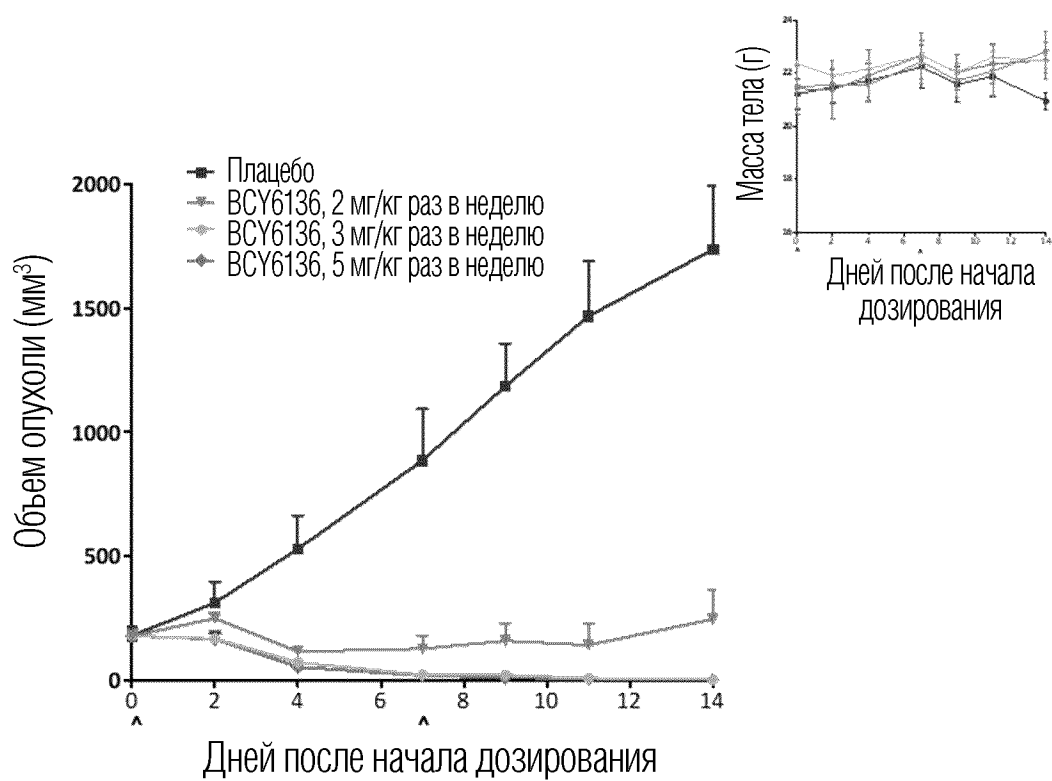


ФИГ. 37

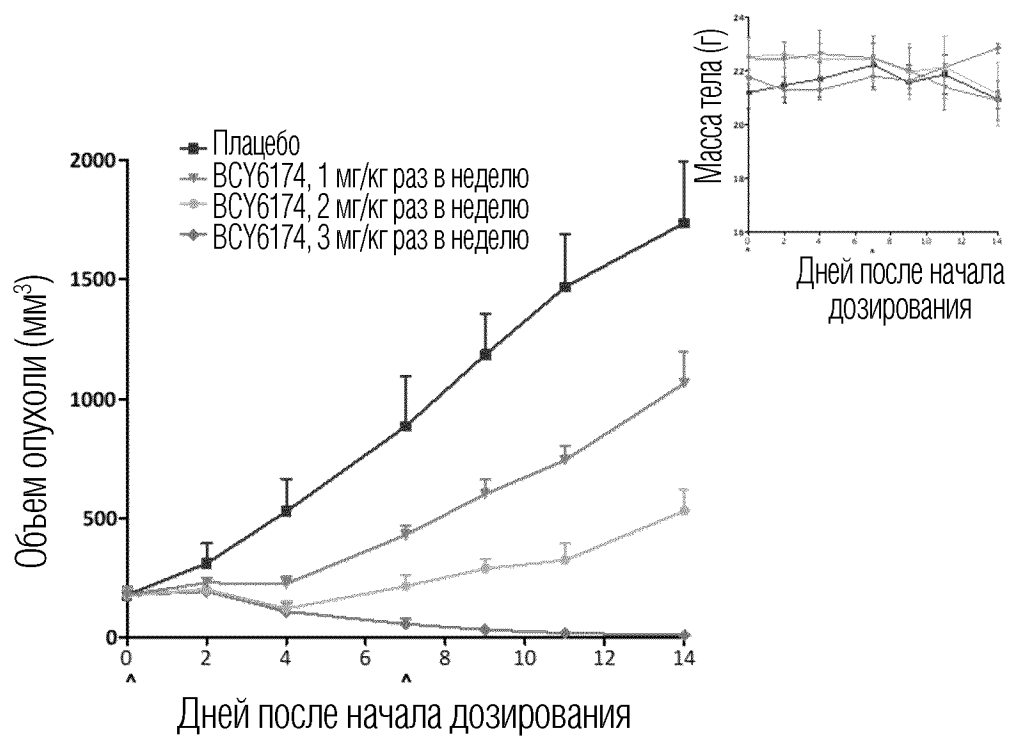


ФИГ. 38

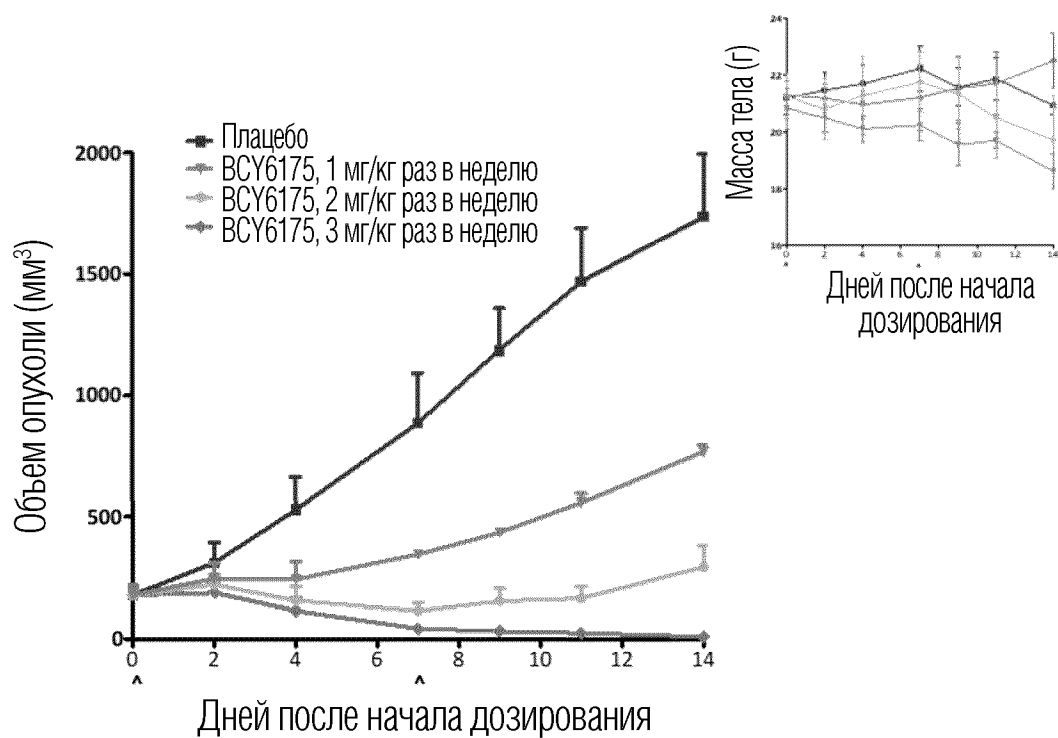
20/21



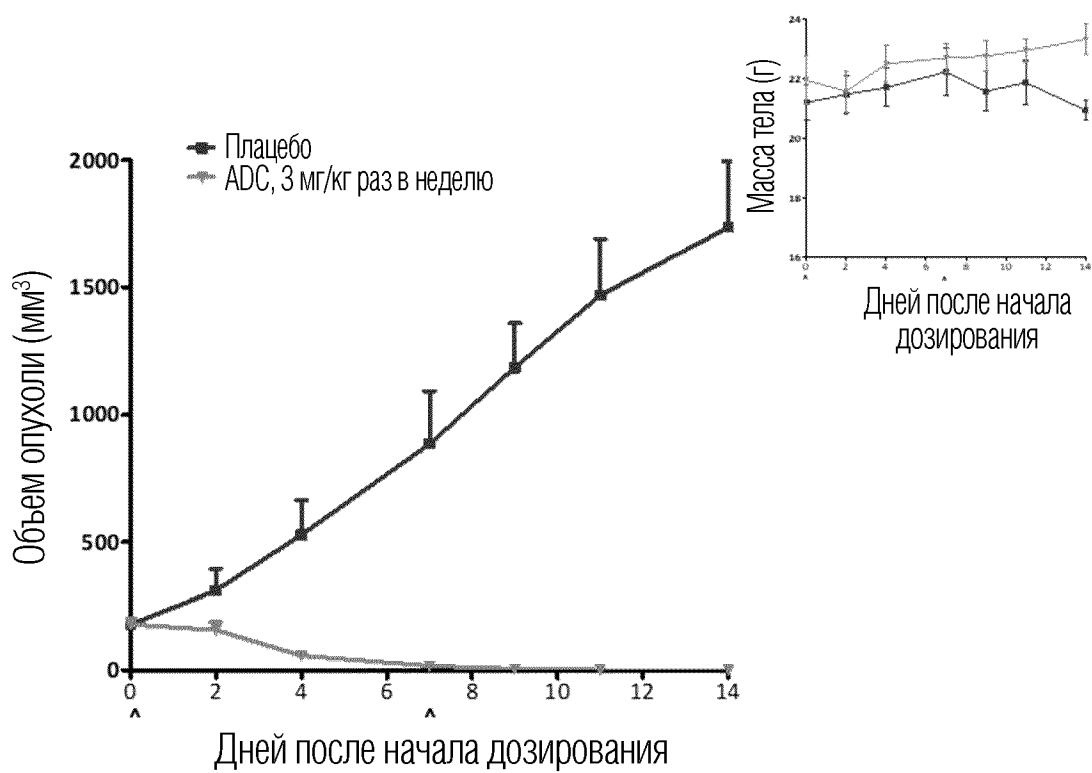
ФИГ. 39



ФИГ. 40



ФИГ. 41



ФИГ. 42