

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092282** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.01.14

(51) Int. Cl. *C12N 5/095* (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.03.26

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МИНИМАЛЬНОГО ОСТАТОЧНОГО РАКА**

(31) 62/648,166

(72) Изобретатель:

(32) 2018.03.26

Агирре-Хисо Хулио А. (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2019/024097

Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2019/191115 2019.10.03

(71) Заявитель:

ИКАН СКУЛ ОФ МЕДСИН ЭТ
МАУНТ СИНАЙ (US)

(57) В настоящем изобретении раскрыты способы лечения минимального остаточного рака у пациента. Способы включают контактирование диссеминированных опухолевых клеток (DCC) у пациента с белком, производным костного морфогенетического белка 7 (BMP7), где контактирование вызывает или поддерживает состояние покоя у контактирующих DCC пациента для лечения минимального остаточного рака у пациента. Также раскрыты способы, которые включают контактирование DCC у пациента с ингибитором РНК-подобной протеинкиназы эндоплазматического ретикулума (PERK), выбранным из LY2, LY3 и LY4, где указанное контактирование уничтожает DCC у пациента для лечения минимального остаточного рака у пациента.

A1

202092282

202092282

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564919EA/026

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МИНИМАЛЬНОГО ОСТАТОЧНОГО РАКА

[0001] Настоящая заявка заявляет приоритет Предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/648166, поданной 26 марта 2018 г., которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[0002] Настоящее изобретение было сделано при государственной поддержке грантами R01 CA109182, U54 CA16131 и P30 CA196521 Национального института здравоохранения/Национального института рака, и гранта BC 132674 программ медицинских исследований Министерства обороны США. Государство обладает определенными правами на изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к способам лечения минимального остаточного рака у пациента.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Разворачивание белков в полости эндоплазматического ретикулума («ER») активирует три основных пути: PERK, IRE1 α и ATF6, также известные как реакция несвернутых белков («UPR»), которая позволяет клеткам корректировать и пережить этот стресс (Walter et al., «The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation», *Science* 334:1081-1086 (2011) и Ron et al., «Signal Integration In the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 519-529 (2007)). Недавние данные свидетельствуют о том, что при различных типах рака UPR является механизмом, который позволяет опухолевым клеткам реагировать на требования к ER и окислительным условиям, вызванным повышенной трансляционной нагрузкой, вызванной, среди других сигналов, онкогенами и гипоксией, (Blais et al., «Activating Transcription Factor 4 is Translationally Regulated by Hypoxic Stress», *Mol. Cell. Biol.* 24:7469-7482 (2004); Chevet et al., «Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis», *Cancer Discov.* 5:586-597 (2015); Tameire et al., «Cell Intrinsic and Extrinsic Activators of the Unfolded Protein Response in Cancer: Mechanisms and Targets for Therapy», *Semin. Cancer Biol.* 33:3-15 (2015); Hart et al., «ER Stress-Mediated Autophagy Promotes Myc-Dependent Transformation and Tumor Growth», *J. Clin. Invest.* 122:4621-4634 (2012); Martin-Perez et al., «Activated ERBB2/HER2 Licenses Sensitivity to Apoptosis Upon Endoplasmic Reticulum Stress Through a PERK-Dependent Pathway», *Cancer Res.* 74:1766-1777 (2014); Rajasekhar et al., «Postgenomic Global Analysis of Translational Control Induced by Oncogenic Signaling», *Oncogene* 23:3248-3264 (2004); Rajasekhar et al., «Oncogenic Ras and Akt Signaling Contribute to Glioblastoma Formation by Differential Recruitment of Existing mRNAs to Polysomes», *Mol. Cell* 12:889-901 (2003); Rojo et al., «4E-Binding Protein 1, A Cell Signaling Hallmark in Breast Cancer that Correlates With Pathologic Grade and Prognosis», *Clin. Cancer Res.* 13:81-89 (2007); and Sequeira et al., «Inhibition of eIF2 α Dephosphorylation Inhibits ErbB2-Induced Dereglulation of Mammary Acinar

Morphogenesis», *BMC Cell Biol.* 10:64 (2009)). Активированные онкогенами пути увеличивают нагрузку на белок-клиент ER за счет активации передачи сигналов mTOR и инициации трансляции (Hart et al., «ER Stress-Mediated Autophagy Promotes Myc-Dependent Transformation and Tumor Growth», *J. Clin. Invest.* 122:4621-4634 (2012); Ozcan et al., «Loss of the Tuberous Sclerosis Complex Tumor Suppressors Triggers the Unfolded Protein Response to Regulate Insulin Signaling and Apoptosis», *Mol. Cell* 29:541-551 (2008); and Tameire et al., «Cell Intrinsic and Extrinsic Activators of the Unfolded Protein Response in Cancer: Mechanisms and Targets for Therapy», *Semin. Cancer Biol.* 33: 3-15 (2015)). Кроме того, было показано, что пути PERK и IRE1 α -XBP-1 способствуют адаптации к гипоксии и стрессу микроокружения (Bi et al., «ER Stress-Regulated Translation Increases Tolerance to Extreme Hypoxia and Promotes Tumor Growth», *EMBO J.* 24:3470-3481 (2005); Blais et al., «Activating Transcription Factor 4 is Translationally Regulated by Hypoxic Stress», *Mol. Cell Biol.* 24:7469-7482 (2004); Chen et al., «XBP1 Promotes Triple-Negative Breast Cancer by Controlling the HIF1 α Pathway», *Nature* 508:103-107 (2014); Romero-Ramirez et al., «X box-Binding Protein 1 Regulates Angiogenesis in Human Pancreatic Adenocarcinomas», *Transl. Oncol.* 2:31-38 (2009); Rouschop et al., «The Unfolded Protein Response Protects Human Tumor Cells During Hypoxia Through Regulation of the Autophagy Genes MAP1LC3B and ATG5», *J. Clin. Invest.* 120:127-141 (2010); Schewe et al., «ATF6 α -Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells In Vivo», *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10519-10524(2008); и Ye et al., «The GCN2-ATF4 Pathway is Critical for Tumour Cell Survival and Proliferation in Response to Nutrient Deprivation», *EMBO J.* 29:2082-2096 (2010)), предполагая, что UPR может позволить адаптацию к изменению среды.

[0005] Активация PERK координирует реакцию антиоксидантов и реакцию аутофагии для защиты эпителиальных клеток молочной железы во время потери адгезии к базальной мембране (Avivar-Valderas et al., «PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment», *Mol. Cell Biol.* 31: 3616-3629 (2011)). Эта реакция выживания включает транскрипционную программу ATF4 и CHOP (Avivar-Valderas et al., «PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment», *Mol. Cell Biol.* 31:3616-3629 (2011)) в комбинации с быстрой активацией пути LKB1-AMPK-TSC2, который ингибирует mTOR (Avivar-Valderas et al., «Regulation of Autophagy during ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK», *Oncogene* 32(41):4932-40 (2013)). Поражения DCIS человека демонстрируют повышенное фосфорилирование PERK и аутофагию (Avivar-Valderas et al., «PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment», *Mol. Cell Biol.* 31:3616-3629 (2011) и Espina et al., «Malignant Precursor Cells Pre-Exist in Human Breast DCIS and Require Autophagy for Survival», *PLoS One* 5:e10240 (2010)), и обусловленное удаление PERK в эпителии молочной железы замедляло канцерогенез молочной железы, вызванный онкогеном HER2 (Bobrovnikova-Marjon et al., «PERK Promotes Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth by Limiting Oxidative DNA Damage», *Oncogene* 29:3881-

3895 (2004) и Bobrovnikova-Marjon et al., «PERK-Dependent Regulation of Lipogenesis During Mouse Mammary Gland Development and Adipocyte Differentiation», Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 105: 16314-16319 (2008)). Кроме того, HER2 увеличивает уровни протеотоксичности в опухолевых клетках, активируя передачу сигналов JNK и IRE и позволяя злокачественным клеткам HER2+ справляться с этим стрессом (Singh et al., «HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive», Sci. Signal. 8: ra52 (2015)). Соответственно, база данных cBIO (Cerami et al., «The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data», Cancer Discov. 2: 401-404 (2012)) показала, что ~ 14% опухолей молочной железы человека с амплифицированным HER2, демонстрируют повышенную регуляцию мРНК PERK, что дополнительно подтверждает мнение о том, что опухоли HER2+ могут зависеть от PERK и/или других путей UPR для выживания.

[0006] Также было показано, что спящие (покоящиеся) опухолевые клетки зависят от передачи сигналов PERK и ATF6 для выживания (Ranganathan et al., «Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival», Cancer Res. 68:3260-3268 (2008); Ranganathan et al., «Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells», Cancer Res. 66:1702-1711 (2006); and Schewe et al., «ATF6 α -Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells In Vivo», Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 105: 10519-10524 (2008)). Покоящиеся диссеминированные опухолевые клетки поджелудочной железы («DCC») в печени также демонстрировали PERK-зависимый UPR, который был связан с потерей экспрессии E-кадгерина и подавлением MHC-I, что способствовало уклонению от иммунитета во время покоя (Pommier et al., «Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Metastases», Science 360 (6394): eaao4908 (2018), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). В модели MMTV-HER2 покоящиеся DCC в костном мозге и легких также оказались отрицательными по E-кадгерину (Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», Nature 540: 588-592 (2016)), но связь с UPR не тестировал. Вместе эти данные позволяют предположить, что UPR может служить механизмом адаптивного выживания DCC в стрессовом и иммунном микроокружении.

[0007] Настоящее раскрытие относится к преодолению недостатков данной области техники.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Один аспект изобретения относится к способу лечения минимального остаточного рака у пациента. Этот способ включает контактирование диссеминированных опухолевых клеток (DCC) пациента с белком, производным костного морфогенетического белка 7 («BMP7»), где указанное контактирование вызывает или поддерживает состояние покоя в контактирующих DCC пациентах для лечения минимального остаточного рака у пациента. Способы этого аспекта могут быть использованы для предотвращения

прогрессирования минимального остаточного рака до агрессивного роста у пациента.

[0009] Другой аспект относится к способу лечения минимального остаточного рака у пациента, причем способ включает контактирование диссеминированных опухолевых клеток (DCC) у пациента с ингибитором РНК-подобной протеинкиназы эндоплазматического ретикулума («PERK»), выбранным из LY2, LY3, и LY4, где указанное контактирование уничтожает DCC у пациента для лечения минимального остаточного рака у пациента.

[0010] Еще один аспект относится к способу лечения рака на поздней стадии у пациента. Этот способ включает контактирование диссеминированных опухолевых клеток (DCC) у пациента с ингибитором РНК-подобной протеинкиназы эндоплазматического ретикулума (PERK), выбранным из LY2, LY3 и LY4, где указанное контактирование уничтожает DCC у пациента для лечения поздней стадии рака у пациента.

[0011] Описанное ниже является, помимо прочего, демонстрацией того, что LY4, селективный и мощный ингибитор PERK, может блокировать метастазы, обусловленные HER2, в результате своей способности специфически вызывать уничтожение спящих DCC. В соответствии с настоящим описанием ингибиторы PERK представляют собой новую стратегию нацеливания на одиночные спящие клетки во время стадий минимальной остаточной болезни либо по отдельности, либо в комбинации с антипролиферативной терапией для предотвращения летальных метастазов. Также ниже описана демонстрация того, что производные костных морфогенетических белков могут вызывать состояние покоя в диссеминированных опухолевых клетках.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0012] На ФИГ. 1A-1C показано, что покоящиеся диссеминированные HER2+клетки демонстрируют высокие уровни активации пути ER-стресса. На ФИГ. 1A показаны изображения срезов легких животных MMTV-HER2, окрашенных на HER2, Ki67 (пролиферация) и GADD34 (ER-стресс). График на ФИГ. 1A показывает количественную оценку клеток/метастазов, положительных по обоим маркерам, в процентах от общего числа клеток. На ФИГ. 1B показаны изображения метастазов рака молочной железы человека из разных мест (лимфатический узел, печень, легкие), окрашенные на цитокератины, Ki67 (пролиферация) и GADD34 (ER-стресс). График на ФИГ. 1B показывает количественный анализ клеток/метастазов, положительных для обоих маркеров, в процентах от общего числа клеток. На ФИГ. 1C показана иерархическая кластеризация профиля высокопроизводительной направленной экспрессии генов (столбцы) отдельных клеток (диссеминированных опухолевых клеток легких («DTC»)) (ряды).

[0013] На ФИГ. 2A-2G продемонстрировано, что ингибирование PERK активируется у пациента с опухолевыми HER2+клетками. ФИГ. 2A представляет собой блок-схему стадий, выполняемых для анализа экспрессии гена отдельных клеток с помощью C1 и Biomark HD Fluidigm. Всего было проанализировано 255 DCC и 90 первичных опухолевых («PT») клеток. ФИГ. 2B демонстрирует список генов,

проанализированных с помощью высокопроизводительной кПЦР. ФИГ. 2С представляет собой иммуноблот, показывающий ингибирование фосфорилирования PERK ингибиторами серии LY (LY2, LY3 и LY4) и GSK2656157 (2 мкМ) в клетках MCF10A-HER2, подвергнутых стрессу путем помещения их в суспензию на 24 часа. * обозначает неспецифические полосы. На ФИГ. 2D показана кривая жизнеспособности клеток LY4 доза-ответ (Cell Titer Blue, СТВ) в клетках MCF10A-HER2 в отсутствие (-) или в присутствии стресса (низкая доза тапсигаргина, Tg 2 нМ) через 48 часов. Пунктирная линия указывает IC50 (≈ 9 нМ). На ФИГ. 2E показана киназная селективность ингибиторов PERK LY4, LY2, LY3 и GSK2656157 по оценке ферментативного биохимического анализа. На ФИГ. 2F показано влияние LY4 на общее количество клеток костного мозга (в двух нижних конечностях) у самок MMTV-HER2, подвергнутых обработке в течение 2 недель. На ФИГ. 2G показано влияние LY4 на количество лейкоцитов у самок MMTV-HER2, подвергнутых обработке в течение 2 недель.

[0014] На ФИГ. 3A-3G показано, что ингибирование LY4 PERK снижает метастатическое поражение легких и костного мозга на уровне единичных диссеминированных опухолевых клеток. ФИГ. 3A представляет собой иммуноблот, показывающий ингибирование фосфорилирования PERK (T980) ингибитором PERK LY4 (2 мкМ) в клетках MCF10A-HER2, лишенных сыворотки в течение ночи и обработанных EGF (100 нг/мл) в течение 15 минут. На ФИГ. 3B, самкам MMTV-HER2+ (24-недельного возраста) ежедневно вводили носитель или LY4 (50 мг/кг) в течение 2 недель. Показаны иммуногистохимические исследования («ИНС») срезов поджелудочной и молочной железы с антителами к P-PERK и P-EIF2 α . Вставки показывают большее увеличение. Масштабные линейки, 100 мкм. На ФИГ. 3C показано изображение и количественная оценка (правый график) макрометастазов (> 100 клеток), обнаруженных с помощью окрашивания H&E и количественно оцененных в 5 срезах легких/животное (n=16). Масштабная линейка, 100 мкм. p по критерию Манна-Уитни. На ФИГ. 3D показано изображение и количественная оценка (правый график) микрометастазов (2-100 клеток), обнаруженных путем окрашивания ИНС с использованием антитела против HER2, и количественно определено на срез легкого/животное \pm стандартное отклонение. (n=6). Масштабная линейка 25 мкм. p по критерию Манна-Уитни. На ФИГ. 3E показано изображение и количественная оценка (правый график) одиночных диссеминированных опухолевых клеток (DTC), обнаруженных с помощью ИНС-окрашивания на HER2, классифицированных как P-Rb+ или P-Rb- и количественно определенных на срез легкого \pm стандартное отклонение. (n=6). Масштабная линейка 25 мкм. p по критерию Манна-Уитни. Стрелка и кружок на изображении указывают на одиночные DTC. На ФИГ. 3F показано изображение и количественная оценка (правый график) диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге, обнаруженных IF-окрашиванием на CK8/18 и HER2 в цитоспинах из зрелой истощенной по гемопозитическим клеткам ткани костного мозга (n=8). Масштабная линейка 25 мкм. p по критерию Манна-Уитни. Стрелки указывают на HER2+клетки. На ФИГ. 3G показаны репрезентативные изображения клеток ZR75.1

HER2+, сконструированных для экспрессии Dendra-маркированных H2B белков, засеянных на матригеле с низкой плотностью (отдельные клетки). В день 0 метку Dendra (зеленая флуоресценция) фотопреобразовали с помощью одного импульса УФ-света в красную флуоресценцию и использовали в качестве индикатора покоя. Лунки обрабатывали со 2 по 8 день носителем (ДМСО) или LY4 (2 мкМ). Графики показывают процент живых клеток на 8-й день измерения \pm стандартное отклонение. (n=4). p по критерию Стьюдента.

[0015] На ФИГ. 4А-4F показано влияние обработки LY4 на метастазы и циркулирующие опухолевые клетки («СТС»). На ФИГ. 4А показана нормализованная площадь единичных макрометастазов у животных, получавших носитель и LY4 (n=21 и 15). p по критерию Манна-Уитни. ФИГ. 4В представляет собой график, показывающий количественное определение циркулирующих опухолевых клеток/мл крови путем HER2 окрашивания цитоспинов. На ФИГ. 4С показаны изображение и график, демонстрирующие процент микрометастазов P-Rb+ на срез легкого/животное (n=4 и 6). ФИГ. 4D представляет собой изображение, показывающее 100% фотоконверсию в ZR75.1-H2B-Dendra от зеленой флуоресценции до красной флуоресценции в день 0 после посева в 3D Matrigel. На ФИГ. 4Е, фотопреобразованные клетки ZR75.1-H2B-Dendra засеяли с низкой (отдельные клетки) или высокой плотностью. График показывает процент сохранения красной метки в клетках, засеянных как отдельные клетки или с высокой плотностью \pm стандартное отклонение. (n=4). p по критерию Стьюдента. ФИГ. 4F такой же, как на ФИГ. 4D, но клетки, засеянные с высокой плотностью, обрабатывали со 2 по 8 день носителем (ДМСО) или LY4 (2 мкМ). График показывает измеренный процент живых колоний \pm стандартное отклонение на 8-е сутки (n=4). p по критерию Стьюдента.

[0016] На ФИГ. 5А-5С продемонстрировано, что ингибирование PERK активируется в клетках Her2+. На ФИГ. 5А показано, что PERK (EIF2AK3) активируется в подгруппе пациентов с раком молочной железы HER2+. Анализ данных TCGA рака молочной железы HER2+ (58 опухолей) с помощью cBioPortal. На ФИГ. 5В показаны репрезентативные изображения окрашивания кармином тотального препарата нормальной молочной железы FVB по сравнению с тотальным препаратом молочной железы MMTV-пеп, обработанным носителем и LY4. На ФИГ. 5С показана количественная оценка гистологических структур (от нормального пустого протока до DCIS-подобной интраэпителиальной неоплазии молочной железы), верхние изображения и более высокие увеличения в нижнем ряду), присутствующих в срезах молочной железы, окрашенных Н&Е.

[0017] На ФИГ. 6А-6С показано, что ингибитор PERK LY4 вызывает «нормализацию» молочной железы в модели рака молочной железы MMTV-HER2+. На ФИГ. 6А показаны репрезентативные изображения окрашивания кармином тотальных препаратов молочных желез и срезов молочных желез, окрашенных Н&Е, от животных, обработанных носителем и LY4. Масштабная линейка, 100 мкм. На ФИГ. 6В показана количественная оценка гистологических структур (пустой проток e.d., окклюзия протока

o.d., окклюзия гиперплазии o.h., и DCIS-подобная интраэпителиальная неоплазия молочной железы M.I.N.), присутствующих в Н & Е-окрашенных срезах молочной железы (n=50/животное, животные n=13) у животных, получавших носитель и LY4 ± sem. Статистическая значимость (p) рассчитана по критерию Манна-Уитни. На ФИГ. 6С показана ИНС эпителиального люминального маркера цитокератина 8/18 (CK8/18) и миоэпителиального маркера гладкомышечного актина («SMA») в срезах молочной железы. График показывает оценку структур CK8/18+и SMA+на животное, n=12. p по критерию Манна-Уитни. Масштабная линейка 75 мкм.

[0018] На ФИГ. 7А-7F показано влияние обработки LY4 на уровни Р-PERK, уровни Р-гистона H3 и размер опухоли. ФИГ. 7А представляет собой вестерн-блоттинг уровня Р-PERK в опухолевых лизатах MMTV-neu от животных, обработанных носителем и LY4. На ФИГ. 7В показаны объемы опухолей у самок, обработанных носителем (верхний) и LY4 (нижний) (мм³). Каждая линия представляет опухоль. На ФИГ. 7С показано процентное уменьшение размера опухоли у самок, получавших LY4, которые показали уменьшение опухоли. Каждая линия представляет опухоль и животное. На ФИГ. 7D показана ИНС для Р-гистона H3 в срезах опухоли молочной железы, репрезентативные изображения и количественную оценку (правый график). p по критерию Манна-Уитни. На ФИГ. 7Е, клетки ZR75.1, сверхэкспрессирующие HER2, высевали на матригель и после формирования ацинуса (день 10) лунки обрабатывали носителем (контроль) или LY4 (2 мкМ) в течение 10 дней. График показывает процент клеток, положительных по расщепленной каспазе-3, на ацинусы (n=20) ± стандартное отклонение. p по критерию Стьюдента. На ФИГ. 7F, клетки MCF10A-HER2 высевали на матригеле и после закрепления ацинуса (день 4) лунки обрабатывали носителем (контроль) или LY4 (2 мкМ) в течение 10 дней. График показывает процент Р-гистон H3-положительных клеток на ацинусы (n=20) ± стандартное отклонение. p по критерию Стьюдента.

[0019] На ФИГ. 8А-8D показано, что ингибирование PERK снижает рост опухоли у самок MMTV-HER2+. На ФИГ. 8А, самкам MMTV-neu (от 24 до 32 недель) с явными опухолями ежедневно вводили носитель или LY4 (50 мг/кг) в течение 2 недель. График показывает процентное изменение размера опухоли у животных, получавших носитель и LY4, ± стандартное отклонение. (n=16). p по критерию Манна-Уитни. ФИГ. 8В представляет собой график, показывающий конечный объем опухоли (мм³). Усы представляют минимальное и максимальное значения данных (n=16). p по критерию Манна-Уитни. ФИГ. 8С показывает репрезентативную ИНС окрашивания TUNEL для измерения уровней апоптоза в срезах опухоли. Масштабные линейки 10 и 50 мкм. График, процентное содержание TUNEL-положительных клеток в срезах опухоли, обработанных носителем и LY4 (n=5). p по критерию Манна-Уитни. На ФИГ. 8D, HER2+клетки MCF10A-HER2 или SKBR3 высевали на матригель и после формирования ацинуса (день 4) лунки обрабатывали носителем (контроль) или LY4 (2 мкМ) в течение 10 дней. График показывает процент клеток, положительных по расщепленной каспазе-3, на ацинусы (n=20) ± стандартное отклонение. p по критерию Стьюдента. Репрезентативные

конфокальные изображения ацинусов MCF10A-HER2, окрашенных на расщепленную каспазу-3.

[0020] На ФИГ. 9А-9F показано, что обработка LY4 снижает уровни фосфо-HER2 и нижележащих сигнальных путей. На ФИГ. 9А показаны репрезентативные изображения ИНС для P-HER2, P-PERK и P-EIF2 α в срезе опухоли молочной железы MMTV-HER2. Обратите внимание, что обод, положительный для P-HER2, перекрывается с окрашиванием P-PERK и P-EIF2 α . Масштабная линейка, 100 мкм. На ФИГ. 9В показана иерархическая кластеризация профиля высокопроизводительной целевой экспрессии гена (столбцы) одиночных клеток (первичная опухоль молочной железы) (ряды) от самок MMTV-HER2. На ФИГ. 9С показано репрезентативное окрашивание ИНС P-HER2 и HER2 в опухолях молочной железы, обработанных носителем и LY4. График показывает оценку P-HER2 в опухолях, обработанных носителем и LY. Количественная оценка уровней P-HER2 в срезах опухоли по интенсивности ИНС и балльной оценке площади (n=11) (см. ФИГ. 10А). Масштабная линейка, 50 мкм. р по критерию Манна-Уитни. На ФИГ. 9D, клетки MCF10A-HER2 истощали в течение ночи и обрабатывали +/- LY4 (2 мкМ), после чего добавляли +/- EGF (100 нг/мл) в течение 15 минут перед сбором. Уровни P-HER2, P-EGFR, P-AKT, P-S6 и P-ERK, а также общий HER2 и EGFR оценивали с помощью вестерн-блоттинга. GAPDH и β -TUB использовали в качестве контроля загрузки. Показан репрезентативный блот трех экспериментов. Денситометрический анализ P-HER2 (n=3) \pm стандартное отклонение. р по критерию Стьюдента. На ФИГ. 9Е, клетки MCF10A-HER2 обрабатывали, как на ФИГ. 9D, и проводили анализ биотинилирования поверхностных рецепторов. Оценивали поверхностные уровни общего HER2 и P-HER2. Показана денситометрия для P-HER2. На ФИГ. 9F, клетки MCF10A-HER2 обрабатывали, как на ФИГ. 9D, и проводили анализ обратимого биотинилирования поверхностных рецепторов. Оценивали эндоцитозированные уровни общего HER2 и P-HER2. Показан один из двух экспериментов.

[0021] На ФИГ. 10А-10С показана количественная оценка уровней P-HER2 в клетках MCF10A-HER2. На ФИГ. 10А показана система оценки, используемая для количественной оценки уровней P-HER2 в срезах опухоли молочной железы. Положительную площадь ИНС P-HER2 умножали на ее показатель интенсивности в соответствии с установленной оценкой, показанной на этих репрезентативных изображениях. Масштабная линейка, 100 мкм. На ФИГ. 10В, клетки MCF10A-HER2 истощали в течение ночи и обрабатывали +/- LY4 (2 мкМ), после чего добавляли +/- EGF (100 нг/мл) в течение 20 минут перед сбором. Уровни P-HER2/Y1112 и P-HER2/Y877 оценивали с помощью вестерн-блоттинга. GAPDH и HSP90 использовали в качестве контролей загрузки. На ФИГ. 10С показан ввод экстрактов, используемых в анализе поверхностного биотинилирования.

[0022] На ФИГ. 11А-11Е показано, что последовательное ингибирование CDK4/6 с последующим ингибированием PERK усиливает антиметастатический эффект LY4. ФИГ. 11А представляет собой схематическую иллюстрацию эксперимента *in vivo*,

разработанного для оценки последовательной обработки Абемациклибом и LY4 в мышинной модели MMTV-neu/HER2+. Самок мышей MMTV-neu/HER2+ (в возрасте 24 недель) обрабатывали ежедневно ингибитором CDK4/6 Абемациклиб (50 мкг) в течение 4 недель, а затем +/- LY4 (50 мг/кг). ФИГ. 11В представляет собой серию флуоресцентных ИНС срезов опухоли для HER2, Ki67 (пролиферация) и GADD34 (ER-стресс). Масштабные линейки, 100 мкм. Стрелки указывают на высокую флуоресценцию. ФИГ. 11С представляет собой график, показывающий количество макрометастазов (> 100 клеток), обнаруженное окрашиванием Н&Е и определенное количественно в 5 срезах легких/животное (n=8). p по критерию Манна-Уитни. ФИГ. 11D представляет собой график, показывающий количество микрометастазов (2-100 клеток), обнаруженное путем окрашивания ИНС с использованием антитела против HER2 и количественно определенное на срез легкого/животное ± стандартное отклонение. (n=8). p по критерию Манна-Уитни. ФИГ. 11E представляет собой график, показывающий количество единичных диссеминированных опухолевых клеток, обнаруженных с помощью ИНС-окрашивания на HER2, классифицированных как Ki67+ или Ki67- и количественно определенных на срез легкого ± стандартное отклонение. (n=8). p по критерию Манна-Уитни.

[0023] На ФИГ. 12А-12G показаны предлагаемые моно- или комбинированные терапии, которые включают использование LY4, и эксперименты, показывающие, что обработка клеток меланомы ингибитором CDK4/6 Абемациклиб в комбинации с LY4 по-разному влияет на жизнеспособность клеток *in vitro* в 2D- и 3D-культуре. ФИГ. 12А представляет собой схематическое изображение обоснования комбинации абемациклиба и LY4. ФИГ. 12В представляет собой гистограмму, показывающую результаты обработки *in vitro* мутантных Braf клеток меланомы (WM35) 0 нМ, 10 нМ или 50 нМ Абемациклиб в течение 1 недели с последующей 48-часовой обработкой 2 мкМ LY4. ФИГ. 12С включает изображения клеток, окрашенных DAPI после предварительной обработки Абемациклибом в течение 1 недели с последующей обработкой 2 мкМ LY4. На матригель было засеяно 5000 клеток. На ФИГ. 12D-12Е, клетки меланомы WM35 предварительно обрабатывали Абемациклибом в течение 5 недель с последующей обработкой LY4 в полной среде и Абемациклибом. Клетки окрашивали трипановым синим для идентификации жизнеспособных клеток. ФИГ. 12D представляет собой график, показывающий клетки, чувствительные к Абемациклибу. ФИГ. 12Е представляет собой график, показывающий клетки, устойчивые к Абемациклибу. На ФИГ. 12F показаны изображения клеток, окрашенных DAPI после предварительной обработки Абемациклибом в течение 5 недель и совместной обработки 2 мкМ LY4 и Абемациклибом. На матригель засеяно 1000 клеток. ФИГ. 12G предполагает, что когда задержка роста индуцируется с помощью Абемациклиба, клетки активируют мишень PERK (GADD34), что может объяснить, почему клетки чувствительны к LY4. Клетки меланомы WM35, наивные или устойчивые (R) к Абемациклибу, обрабатывали в культуре носителем (-) или 150 и 300 нМ Абемациклиба в течение 24 часов. Затем клетки

лизировали и исследовали с помощью вестерн-блоттинга на экспрессию GADD34. Экспрессию тубулина использовали в качестве контроля загрузки. Обратите внимание, что в наивных по отношению к Абемациклибу клетках GADD34 активируется, что предполагает активацию PERK. Устойчивые клетки, по-видимому, показывают более высокие уровни GADD34, которые не изменяются и не снижаются после дополнительной обработки Абемациклибом.

[0024] На ФИГ. 13А-13С продемонстрировано влияние BMP7-F9 на соотношение активности ERK/p38 и различных мРНК, связанных с генами сигнатуры покоя. На ФИГ. 13А показано, что обработка BMP7-F9 в концентрации 2 нг/мл, 5 нг/мл и 10 нг/мл (вторая, третья и четвертая серые полосы, соответственно: контроль - первая черная полоса) снижает соотношение активности ERK/p38 по сравнению с контролем, как определено вестерн-блоттингом в клетках HEp3 HNSCC. Влияние на соотношение активности ERK/p38 наблюдается через 2-6 и 24 часа (вторая-четвертая группа столбцов). В первые 30 минут активность ERK стимулируется BMP7 (первый набор столбцов). На ФИГ. 13В показано, что обработка BMP7-F9 индуцирует мРНК DEC2, p53 и p27 (10 нг/мл BMP7-F9, 24 часа), которые кодируют гены сигнатуры покоя. На ФИГ. 13С показано, что обработка тех же клеток BMP7-F9 индуцирует накопление в ядре NR2F1, фактора транскрипции, мощного индуктора покоя, как определено с помощью иммунофлуоресценции (10 нг/мл, 24 часа). Стрелки указывают на флуоресценцию NR2F1. Различия на ФИГ. 13А и ФИГ. 13В, $p < 0,05$, рассчитанное с использованием t-критерия Стьюдента. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что BMP7-F9 является сильным индуктором генов покоя, которые, как обнаруживается, активируются в спонтанно спящих ДСС или индуцируются посредством репрограммирования или передачи сигналов TGF β 2 в костном мозге.

[0025] На ФИГ. 14А-14Е показано, как *in vitro* и *in vivo* BMP7-F9 индуцирует остановку роста клеток Т-HEp3. На ФИГ. 14А показано, что обработка BMP7-F9 клеток Т-HEp3 ингибирует их пролиферацию *in vitro* в течение 48 часов, как определено анализом титра клеток трипановым синим (RFU, относительные единицы флуоресценции). ФИГ. 14В представляет собой схематическую иллюстрацию экспериментальной процедуры *in vivo*, использованной на ФИГ. 14С-14Д. Клетки Т-HEp3 предварительно обрабатывали в течение 24 часов BMP7-F9 *in vitro*, а затем инокулировали на хориоаллантоисных мембранах куриных эмбрионов («САМ») (ФИГ. 14С), где их ежедневно обрабатывали *in vivo* носителем или BMP7-F9 (50 нг/мл) перед сбором опухолей и количественным определением количества клеток HEp3 HNSCC (ФИГ. 14Д) и уровней Р-НЗ (ФИГ. 14Е). Стрелки на ФИГ. 14Е указывают на перекрывающуюся флуоресценцию Р-НЗ и DAPI. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что маркеры покоя, идентифицированные на ФИГ. 13В, коррелируют с подавлением роста *in vitro* и *in vivo* в краткосрочном эксперименте в системе САМ.

[0026] На ФИГ. 15А-15С показана оценка обработки BMP7-F9 на мышинной модели заболевания. ФИГ. 15А представляет собой схематическую иллюстрацию экспериментальной процедуры *in vivo*, использованной для оценки эффекта BMP7-F9 на

инициирование метастазирования. Опухоли HEp3-GFP HNSCC выращивали до тех пор, пока они не стали примерно 300 мм³, а затем обрабатывали в условиях нео-адьюванта 50 мкг/кг BMP7-F9 до тех пор, пока опухоли не стали примерно 600 мм³. Затем опухоли удаляли хирургическим путем. Через 1-2 дня после операции продолжали адьювантную обработку BMP7-F9 еще 3, 4 или 6 недель. Затем животных умерщвляли, и нагрузку DCC в легких оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. На ФИГ. 15B показано, что BMP7 ограничивает развитие местных и отдаленных рецидивов после хирургического вмешательства. Мышей NSG обрабатывали в соответствии с протоколом, показанным на ФИГ. 15A на 3 и 6 недель. В эти временные точки оценивали процент местного рецидива и встречаемость DCC. На ФИГ. 15C, мышей обрабатывали, как на ФИГ. 15A, за исключением того, что адьювантная обработка длилась 4 недели. После обработки подсчитывали количество GFP-положительных клеток в диссоциированных легких. Это показатель нагрузки DCC в легких, которая значительно снижается при обработке BMP7-F9. Обратите внимание, что медиана нагрузки DCC снижается на один log и что BMP-7, очевидно, излечивает от DCC 3 из 7 животных.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0027] В настоящем описании раскрыты способы лечения минимального остаточного рака у пациента. Один аспект изобретения относится к способу лечения минимального остаточного рака у пациента. Этот метод включает контактирование диссеминированных опухолевых клеток (DCC) у пациента с производным костного морфогенетического белка 7 (BMP7). Контактное диссеминированных опухолевых клеток (DCC) пациента с белком, производным костного морфогенетического белка 7 (BMP7), индуцирует или поддерживает состояние покоя в контактирующих DCC пациента для лечения минимального остаточного рака у пациента.

[0028] В контексте настоящего описания фраза «минимальный остаточный рак» включает ситуацию или состояние, при котором по стандартным рентгенографическим и гистологическим критериям отсутствуют свидетельства рака у пациента, но когда пациент фактически имеет остаточные опухолевые клетки (т. е. DCC) в крови (как CTC), костном мозге или лимфатических узлах (как DTC). Минимальный остаточный рак может возникнуть после лечения рака с помощью химиотерапии, хирургического вмешательства и/или лучевой терапии. Стандартные рентгенографические и гистологические методы обнаружения могут включать, например, тесты визуализации (рентгеновское излучение, ультразвук, МРТ); кровь или иммунохимические тесты на известные опухолевые маркеры или циркулирующие опухолевые маркеры, такие как PSA; тестирование биоптатов или цитологических образцов на известные опухолевые маркеры для оценки, например, количества присутствующих опухолевых клеток или относительной редкости таких клеток.

[0029] В данной области хорошо известно, что опухолевые клетки могут рано распространяться из первичных опухолей в виде CTC и DTC. Действительно, DTC были идентифицированы у пациентов без признаков заболевания после операции на опухоли. В

редких случаях, когда история онкологического заболевания не исключает донорства трансплантата, у реципиентов развиваются метастазы донорского происхождения, даже если донор не болел в течение 30 лет (MacKie et al., «Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery», *N. Engl. J. Med.* 348: 567-568 (2003), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[0030] Филогенетика опухолей и полногеномное секвенирование метастазов у отдельных пациентов позволили предположить первичную передачу от опухоли к метастазу и от метастаза к метастазу, что свидетельствует о том, что модель непрерывного/линейного роста не учитывает поздние (10+ лет) рецидивы у отдельных пациентов (Gundem et al., «The Evolutionary History of Lethal Metastatic Prostate Cancer», *Nature* 520:353-357 (2015) и Naxerova et al., «Using Tumour Phylogenetics to Identify the Roots of Metastasis in Humans», *Nature Reviews Clinical Oncology* 12:258-272 (2015), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки).

[0031] Анализ одиночных клеток CTC также показал генетическую связь между CTC и первичными опухолями (Ni et al., «Reproducible Copy Number Variation Patterns Among Single Circulating Tumor Cells of Lung Cancer Patients», *PNAS* 110(52):21083-88; Heitzer et al., «Complex Tumor Genomes Inferred from Single Circulating Tumor Cells by Array-CGH and Next-Generation Sequencing», *Cancer. Res.* 73:2965-75 (2013); и Lohr et al., «Whole-Exome Sequencing of Circulating Tumor Cells Provides a Window into Metastatic Prostate Cancer», *Nature Biotech.* 32: 479-484 (2014), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки).

[0032] Кроме того, у людей CTC/DTC не коррелируют со стадией или размером первичного рака (Krishnamurthy et al., «Detection of Minimal Residual Disease in Blood and Bone Marrow in Early Stage Breast Cancer», *Cancer* 116(14):3330-3337 (2010), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Вместо этого считается, что CTC и DTC сохраняют способность образовывать метастазы/рецидивы заболевания. В частности, было показано, что обнаружение CTC и DTC позволяет прогнозировать метастазы и рецидивы рака молочной железы и предстательной железы (Braun et al., «A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer», *NEJM* 353:793-802 (2005); Hayes et al., «Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point During Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival», *Clin. Cancer Res.* 12(14):4218-4224 (2006); и de Bono et al., «Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer», *Clin. Cancer Res.* 14: 6302-6309 (2008), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки).

[0033] Считается, что метастазы возникают из пролиферативных, но также и спящих DCC, которые подверглись реактивации. Учитывая, что у пациентов могут развиваться метастазы через годы после удаления опухоли, считается, что спящие DCC могут быть основной причиной позднего рецидива рака. В контексте настоящего описания термин «состояние покоя» относится к временной остановке митоза и роста,

определяемой как клеточный покой, когда внутренние и/или внешние механизмы заставляют отдельные или небольшие группы DCC переходить в состояние покоя (обратимая остановка роста). Вторая категория спящих поражений определяется ангиогенным покоем, при котором масса опухоли поддерживается постоянной за счет баланса между делящимися клетками и клетками, которые умирают из-за плохой васкуляризации. Третья категория - это иммуно-опосредованный покой, когда иммунная система поддерживает постоянную массу пролиферирующей опухоли за счет постоянной цитотоксической активности, которая постоянно сокращает популяцию растущих опухолевых клеток (см., например, Sosa et al., «Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field», *Nat. Rev. Cancer* 14 (9): 611-622 (2014), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Спящие клетки могут возникать из сформировавшихся первичных опухолей, вторичных опухолей и/или преинвазивных поражений.

[0034] В одном варианте осуществления раскрытых в настоящем описании способов контактировавшие DCC представляют собой спящие опухолевые клетки, что означает, что опухолевые клетки испытывают временную остановку митоза/роста или поведение, подобное старению.

[0035] DCC могут быть обнаружены в аспиратах костного мозга путем проведения отрицательной селекции, устраняющей гемопоэтические клетки, а затем положительного окрашивания на EpCAM или CK8/18. В комбинации клетки можно окрашивать на маркеры покоя, чтобы определить, находятся ли они в пролиферативном или спящем состоянии. Последнее можно сделать после фиксации. Для выполнения анализа всего генома или всего транскриптома, EpCAM-положительные DCC из костного мозга выделяются вживую и обрабатываются для анализа всего генома или транскриптома (Gužvić et al., «Combined Genome and Transcriptome Analysis of Single Disseminated Cancer Cells from Bone Marrow of Prostate Cancer Patients Reveals Unexpected Transcriptomes», *Cancer Res.* 74 (24): 7383-94 (2014), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[0036] Описанные в настоящем документе методы могут дополнительно включать обнаружение присутствия DCC у пациента до указанного контакта. Как показано в Таблице 1 ниже, спящие DCC можно идентифицировать, поскольку они фенотипически отличаются от других типов клеток (Sosa et al., «Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field», *Nat. Rev. Cancer* 14 (9): 611-622 (2014), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Таблица 1 Маркеры DCC

Рак	Покоящиеся DCC Фенотип	Активные DCC Фенотип

Молочной железы	TGFβR3 ↑ BMPR2 ↑ P-ERK ↓ P-p38 ↑ GRP78 ↑ POSTN ↓ TSP receptors ↑ NR2F1 ↑	P-FAK ↑ EDG2 ↑ P-Src ↑ P-ERK ↑ P-p38 ↓ NR2F1 ↓
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (HNSCC)	TGFβR3 ↑ BMPR2 ↑ P-ERK ↓ P-p38 ↑ GRP78 ↑ NR2F1 ↑	P-FAK ↑ P-Src ↑ P-ERK ↑ P-p38 ↓ NR2F1 ↓
Предстательной железы	TGFβR3 ↑ BMPR2 ↑ P-ERK ↓ P-p38 ↑ GRP78 ↑ NR2F1 ↑	P-FAK ↑ P-Src ↑ P-ERK ↑ P-p38 ↓ NR2F1 ↓
Глиобластома, остеосаркома и липосаркома	POSTN ↓ TSP рецепторы ↑	Не определено
Яичников	ARHI ↑ ATG genes ↑	Не определено
Поджелудочной железы	IFNR ↑ TNFR ↑	Не определено

[0037] DTC были выявлены в костном мозге у 13-72% пациентов с раком предстательной железы до операции и у 20-57% пациентов без признаков заболевания более чем через 5 лет после операции (Morgan et al., «Disseminated Tumor Cells in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy and without Evidence of Disease Predicts Biochemical Recurrence», *Clin. Cancer Res.* 15:677-683 (2009) и Weckermann et al., «Perioperative Activation of Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow of Patients with Prostate Cancer», *J. Clin. Oncol.* 27 (10): 1549-56 (2009), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки). Обнаружение DTC является прогностическим признаком рецидива у пациентов с клиническим покоем.

[0038] Используемый в настоящем описании термин «клинический покой» относится к продолжительному клиническому периоду отсутствия заболевания (например, более 5 лет) между удалением первичной опухоли и рецидивом заболевания. Клинический покой часто встречается при раке предстательной железы, раке груди, раке пищевода, раке почек, раке щитовидной железы, В-клеточной лимфоме и меланоме (Lam et al., «The Role of the Microenvironment - Dormant Prostate Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow», *Drug Discov. Today Technol.* 11:41-47 (2014); Gelao et al., «Tumour Dormancy and Clinical Implications in Breast Cancer», *Ecancermedicalscience* 7:320 (2013); Ellis et al., «Detection and Isolation of Prostate Cancer Cells from Peripheral Blood and Bone Marrow», *Urology* 61:277-281 (2003); Morgan et al., «Disseminated Tumor Cells in Prostate

Cancer Patients after Radical Prostatectomy and without Evidence of Disease Predicts Biochemical Recurrence», Clin. Cancer Res. 15:677-683 (2009); и Pfitzenmaier et al., «Telomerase Activity in Disseminated Prostate Cancer Cells», BJU Int. 97: 1309-1313 (2006), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки), и находится в отдаленных органах, включая кости, лимфатические узлы, печень и легкие, где они могут оставаться в спящем состоянии в течение длительного периода времени (например, более 10 лет), пока у некоторых пациентов не появятся клинические метастазы.

[0039] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, у пациента были диагностированы СТС.

[0040] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, пациенту был поставлен диагноз ДТС и/или неметастатический рак.

[0041] Используемый в настоящем описании термин «пациент» представляет собой, например, пациента, такого как онкопациент, и включает любое животное, но предпочтительно млекопитающее. В одном варианте осуществления пациентом является человек. Подходящие пациенты-люди включают, без ограничения, детей, взрослых и пожилых людей, у которых диагностировали диссеминированные опухолевые клетки и/или неметастатический рак.

[0042] В других вариантах осуществления пациентом может быть представитель крупного рогатого скота, овца, свинья, кошка, лошадь, мышь, собака, кролик и т. д.

[0043] При выполнении описанных в настоящем документе способов DCC у пациента контактируют, чтобы вызвать или поддержать состояние покоя DCC. Это означает формирование устойчивого непролиферативного состояния в DCC или продолжение непролиферативного состояния в DCC.

[0044] В одном варианте осуществления минимальный остаточный рак подвергают лечению у пациента, у которого диагностирован рак. Например, и без ограничения, у пациента был диагностирован один или несколько из следующих состояний: рак молочной железы, множественная миелома, рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак мозга, рак шейки матки, мантийноклеточная лимфома, лейкоз, гепатоцеллюлярная карцинома, рак предстательной железы, увеальная и кожная меланома, рак кожи, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, глиобластома, нейробластома и колоректальный рак.

[0045] Другие виды рака также можно лечить описанными в настоящем документе способами.

[0046] В одном варианте осуществления у пациента подвергают лечению минимальный остаточный рак, связанный или ассоциированный с раком молочной железы. Рак молочной железы может быть выбран из одного или более из инвазивного рака молочной железы, протоковой карциномы *in situ* (DCIS), лобулярной карциномы *in situ* (LCIS) и воспалительного рака молочной железы.

[0047] Для молекулярной классификации рака молочной железы можно использовать различные молекулярные факторы, включая рецепторы гормонов и статус

рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2). HER2 и группы, подобные базальным, являются основными молекулярными подтипами, идентифицированными среди отрицательных по гормональным рецепторам видов рака молочной железы (Schnitt, «Classification and Prognosis of Invasive Breast Cancer: From Morphology to Molecular Taxonomy», *Modern Pathology* 23: S60-S64 (2010), который полностью включен сюда в качестве ссылки). В одном варианте осуществления рак молочной железы представляет собой рак молочной железы HER2+.

[0048] В некоторых вариантах осуществления описанных в настоящем документе способов пациент подвергся хирургической резекции для удаления опухоли. Например, пациент может подвергаться одному или более из мастэктомии, простатэктомии, удаления поражения кожи, резекции тонкой кишки, гастрэктомии, торакотомии, адреналэктомии, аппендэктомии, колэктомии, овариэктомии, тиреоидэктомии, гистерэктомии, глоссэктомии, полипэктомии толстой кишки и колоректальной резекции.

[0049] В способах, описанных в настоящем документе, диссеминированные опухолевые клетки (DCC) у пациента контактируют с белком, производным костного морфогенетического белка 7 (BMP7). BMP7 является членом суперсемейства TGF β , который секретируется стромальными остеобластами костного мозга и может влиять на микроокружение DCC/DTC. BMP7 играет ключевую роль в трансформации мезенхимальных клеток в кости и хрящи и, как было показано, обратимо вызывает старение в стволовых клетках рака предстательной железы (Kobayashi et al., «Bone Morphogenetic Protein 7 in Dormancy and Metastasis of Prostate Cancer Stem-Like Cells in Bone», *J. Exp. Med.* 208 (13): 2641-55 (2011), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Pro-BMP7 является промежуточным звеном между пре-BMP7 и зрелым BMP7, генерируемым протеолитическим процессингом пре-белка, который генерирует субъединицы зрелого гомодимера.

[0050] Белок BMP7 человека представляет собой секретируемую сигнальную молекулу суперсемейства TGF-бета и первоначально был идентифицирован по его способности индуцировать образование костей, но позже был признан многофункциональным цитокином, который опосредует рост и дифференцировку многих различных типов клеток. Белок BMP7 человека экспрессируется в клетках как белок-предшественник из 292 аминокислот, а зрелый, биологически активный BMP7 генерируется протеолитическим удалением сигнального пептида и пропептида. Аминокислотная последовательность человеческого белка BMP7 дикого типа, содержащая сигнальный пептид (первые 29 аминокислот), про-домен и зрелый пептид (жирным шрифтом), обозначена как SEQ ID NO: 1, как показано ниже:

```
MHVRSLRAAA  PHSFVALWAP  LFLRSALAD  FSLDNEVHSS  FHRRLRSQE
RREMQREILS  ILGLPHRPRP  HLQGKHNSAP  MFMLDLYNAM  AVEEGGGPGG
QGFSYPYKAV  FSTQGPPLAS  LQDSHFLTDA  DMVMSFVNLV  EHDKEFFHPR
YHHREFRFDL  SKIPEGEAVT  AAEFRIYKDY  IRERFDNETF  RISVYQVLQE
HLGRESDFL  LDSRTLWASE  EGWLVDITA  TSNHWVNP  HNLGLQLSVE
```

TLDGQSINPK LAGLGRHGP QNKQPFMVAF FKATEVHFERS IRSTGSKQRS
 QNRSKTPKNQ EALRMANVAE NSSDQRQAC KKHELYVSFR DLGWQDWIIA
 PEGYAAYYCE GECAFPLNSY MNATNHAIVQ TLVHFINPET VPKPCCAPTQ
 LNAISVLYFD DSSNVILKKY RNMVVRACGC H

Специалисту в данной области будет понятно, что сигнальный пептид может быть удален протеолитическим расщеплением, в результате чего образуется интактный продомен/зрелый пептид, который обозначен как про-BMP7.

[0051] Зрелый BMP7 человека дикого типа представляет собой димер двух гликозилированных, гомодимерных белков с дисульфидной связью из 139 аминокислот с массой примерно 35 кДа. Каждый гомодимерный белок имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2:

STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL
 GWQDWIIAPE GYAAYYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAIVQTL VHFINPETVP
 KPCCAPTQLN AISVLYFDR SNVILVKKYACY

[0052] Варианты человеческого белка BMP7 включают варианты зрелого человеческого BMP7 из SEQ ID NO: 2 со специфическими аминокислотными заменами, указанными в консенсусной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3:

STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSXQRQXCKK HELYVSFRDL
 GWQDWIIAPX GYAAXYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAXXQXL XHXXNPETVP
 KPCCAPTQLX SNCHVILKXDX SNCHNILVDDX

Конкретные варианты зрелого белка BMP7 человека по настоящему изобретению обладают повышенной специфической активностью, улучшенными характеристиками растворимости, улучшенной биодоступностью, сниженным связыванием с эндогенными циркулирующими ингибиторами и/или сниженной активностью EBF по сравнению со зрелым белком BMP7 человека дикого типа.

[0053] Подходящие варианты человеческого белка BMP7 выбраны из группы, состоящей из F93V/N110G; Y65G/I86L/T89A/N110G; Y65G/I86L/N110G/Y128F; Y65G/I86L/N110G/Y128W; Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W (BMP7-F9); Y65G/T89A/N110G/Y128F; Y65G/I86L/N110G; и Y65G/V114M (см. Таблицу 2 ниже).

Таблица 2. Иллюстративные варианты человеческого BMP7

BMP7 вариант	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
F93V/N110G	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAYYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAIVQTL VHVINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDSS SNVILKKYRN MVVRACGCH	4
Y65G/I86L/ T89A/N110G	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHALVQAL VHFINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDSS SNVILKKYRN MVVRACGCH	5
Y65G/I86L/	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS	6

BMP7 вариант	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
N110G/Y128F	SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHALVQTL VHFINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDDS SNVILKKFRN MVVRACGCH	
Y65G/I86L/ N110G/Y128W	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHALVQTL VHFINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDDS SNVILKKWRN MVVRACGCH	7
Y65G/I86L/ F93V/N110G/ Y128W (BMP7-F9)	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHALVQTL VHVINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDDS SNVILKKWRN MVVRACGCH	8
Y65G/T89A/ N110G/Y128F	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAIVQAL VHFINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDDS SNVILKKFRN MVVRACGCH	9
Y65G/I86L/ N110G	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHALVQTL VHFINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH	10
Y65G/V114M	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAIVQTL VHFINPETVP KPCCAPTQLN AISMLYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH	11

[0054] В одном варианте осуществления варианты BMP7 выбраны из группы, состоящей из Y65G/I86L/N110G/Y128W и Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W.

[0055] В одном варианте осуществления производное BMP7 представляет собой сконструированный вариант BMP7 про-BMP7. Сконструированный вариант про-BMP7 может содержать аминокислотные замены в положениях аминокислот, соответствующих домену зрелого белка BMP7. Сконструированный вариант про-BMP7 может процессироваться до зрелого белка, производного BMP7. Подходящие варианты про-BMP7, которые содержат про-домен, слитый с N-концом варианта зрелого белка BMP7 человека, выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, как показано в Таблице 3.

Таблица 3 Иллюстративные варианты человеческого про-BMP7

Про-BMP7 вариант	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO:12	DFSLDNEVHS SFIHRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGKHNSA PMFMLDYNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIPEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDLF

Про-ВМР7 вариант	Аминокислотная последовательность
	LLDSRTLWAS EEGWLVFDIT ATSNHWVVNP RHNLGLQLSV ETLDGQSINP KLAGLIGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHELYVSF RDLGWQDWII APEGYAAYYC EGECAPPLNS YMNATNHAIV QTLVHVINPE TVPKCCAPT QLG AISVLYF DDSSNVILKK YRNMVVRACG CH
SEQ ID NO:13	DFSLDNEVHS SFIHRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGKHNSA PMFMLDLYNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIPEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDFL LLDSRTLWAS EEGWLVFDIT ATSNHWVVNP RHNLGLQLSV ETLDGQSINP KLAGLIGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHELYVSF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAPPLNS YMNATNHALV QALVHFINPE TVPKCCAPT QLG AISVLYF DDSSNVILKK YRNMVVRACG CH
SEQ ID NO:14	DFSLDNEVHS SFIHRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGKHNSA PMFMLDLYNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIPEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDFL LLDSRTLWAS EEGWLVFDIT ATSNHWVVNP RHNLGLQLSV ETLDGQSINP KLAGLIGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHELYVSF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAPPLNS YMNATNHALV QTLVHFINPE TVPKCCAPT QLG AISVLYF DDSSNVILKK FRNMVVRACG CH
SEQ ID NO:15	DFSLDNEVHS SFIHRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGKHNSA PMFMLDLYNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIPEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDFL LLDSRTLWAS EEGWLVFDIT ATSNHWVVNP RHNLGLQLSV ETLDGQSINP KLAGLIGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHELYVSF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAPPLNS YMNATNHALV QTLVHFINPE TVPKCCAPT QLG AISVLYF DDSSNVILKK WRNMVVRACG CH
SEQ ID NO:16	DFSLDNEVHS SFIHRRLRSQ ERREMQREIL SILGLPHRPR PHLQGKHNSA PMFMLDLYNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIPEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDFL LLDSRTLWAS EEGWLVFDIT ATSNHWVVNP RHNLGLQLSV ETLDGQSINP KLAGLIGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHELYVSF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAPPLNS YMNATNHALV QTLVHVINPE TVPKCCAPT QLG AISVLYF DDSSNVILKK WRNMVVRACG CH

[0056] Подходящие белки, производные ВМР7 для использования с описанными в настоящем документе способами включают варианты человеческого пре-ВМР7 (то есть SEQ ID NO: 1).

[0057] В одном варианте осуществления белок, производный BMP7, представляет собой зрелый белок BMP7, обладающий повышенной биоактивностью (например, биоактивностью выше более чем в 50 или более раз) и биофизическими свойствами (например, повышенной растворимостью и стабильностью) по сравнению со зрелым белком BMP7 дикого типа.

[0058] В другом варианте осуществления производным BMP7 является BMP7-F9 (SEQ ID NO: 8).

[0059] Ссылка в настоящем описании на белок BMP7 дикого типа или его вариант, включая ссылку на SEQ ID NO., относится к гомодимеру, в котором каждая мономерная субъединица имеет идентифицированную последовательность. Например, ссылка на BMP7-F9 (SEQ ID NO: 8) относится к гомодимеру, где каждая мономерная субъединица имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и субъединицы связаны через дисульфидную связь(связи).

[0060] Для функциональных анализов, описанных в настоящем документе, обработка с помощью конкретного белка про-BMP7 или его варианта или их введение относится к обработке или введению гомодимеров конкретного зрелого BMP7, т. е. либо дикого типа, либо его варианта, которые обычно находятся в нековалентном комплексе с продоменом человека дикого типа.

[0061] В соответствии с описанными в настоящем документе способами контактирование может осуществляться путем введения пациенту белка, производного BMP7.

[0062] Эффект BMP7 на пациента может зависеть от рецептора BMP 2 (BMPR2), экспрессия которого, как было показано, обратно коррелирует с рецидивом и метастазированием в кости у пациентов с раком предстательной железы (Kobayashi et al., «Bone Morphogenetic Protein 7 in Dormancy and Metastasis of Prostate Cancer Stem-Like Cells in Bone», J. Exp. Med. 208 (13): 2641-55 (2011), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Таким образом, в одном варианте осуществления DCC, контактировавшие у пациента, являются положительными по рецептору костного морфогенетического белка (BMPR+).

[0063] Описанные в настоящем документе способы могут дополнительно включать введение пациенту химиотерапевтического агента, иммунотерапевтического агента, эпигенетического агента или ионизирующего излучения.

[0064] Используемый в настоящем описании термин «химиотерапевтический агент» относится к синтетическому, биологическому или полусинтетическому соединению, которое не является ферментом и которое убивает опухолевые клетки или подавляет рост опухолевых клеток, в то же время оказывая меньшее влияние на незлокачественные клетки. Может использоваться любой подходящий химиотерапевтический агент.

[0065] Подходящие химиотерапевтические агенты включают, без ограничения, антрациклин, таксан, ингибитор киназы, антитело, фторпиримидин и лекарственное

средство на основе платины. Примеры антрациклинов включают, но не ограничиваются ими, доксорубицин, даунорубицин, эпирубицин, митоксантрон и идарубицин. Примеры таксанов включают, но не ограничиваются ими, доцетаксел и паклитаксел. Примеры ингибиторов киназ включают, но не ограничиваются ими, лапатиниб, мезилат иматиниба и генефитиниб. Примеры антител включают, но не ограничиваются ими, алемтузумаб, гемтузумаб озогамин, ритуксимаб, трастузумаб и ибритумомаб тиуксетан. Примеры фторпиримидинов включают, но не ограничиваются ими, 5-фторурацил, капецитабин, тегафур, тегафур-урацил, флоксуридин, 5-фтордезоксифлуридин и S-1. Примеры лекарственных средств на основе платины включают, но не ограничиваются ими, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин и надаплатин.

[0066] Дополнительные подходящие химиотерапевтические агенты включают, без ограничения, алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, тиотепа, гексаметилмеламин, бусульфан, кармустин, ломустин, семустин, стрептозоцин, декарзустин, алкармозоцин и стрептозоцин) (например, винбластин, винкристин и винорелбин), подофиллотоксин (например, этопосид и тенипосид), антибиотики (например, блеомицин, дактиномицин, митомицин и валрубикрин) и аналоги камптотецина (например, иринотекан или топотекан).

[0067] В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент против HER2, выбранный из трастузумаба (Герцептин®) и лапатиниба (Тикерб®). Трастузумаб - это моноклональное антитело, которое нацелено на рецептор HER2/neu опухолевых клеток. Лапатиниб - это ингибитор тирозинкиназы, который нацелен на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и HER2.

[0068] Используемый в настоящем описании термин «иммунотерапевтический агент» относится к агенту, который способен индуцировать или усиливать иммунный ответ у пациента. В контексте рака иммунотерапевтические агенты стимулируют иммунную систему для более эффективного воздействия на опухолевые клетки. Подходящие иммунотерапевтические агенты могут быть выбраны из ингибитора иммунных контрольных точек, интерферона и противоопухолевой вакцины.

[0069] Ингибиторы иммунных контрольных точек - это соединения, которые подавляют взаимодействие иммунных контрольных точек. Примеры агентов, модулирующих иммунные контрольные точки, включают ингибиторы PD-1 (например, пембролизумаб и ниволумаб), ингибиторы PD-L1 (например, атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб) и ингибиторы CTLA-4 (например, ипилимумаб).

[0070] Интерфероны («IFN») представляют собой семейство цитокинов, которые защищают от болезней путем прямого воздействия на клетки-мишени и путем активации иммунных ответов. IFN могут продуцироваться как опухолевыми, так и иммунными клетками и действовать на них. IFN типа I включают белки IFN α , IFN β , IFN ϵ , IFN κ и IFN ω . IFN типа I, как известно, опосредуют противоопухолевые эффекты в отношении некоторых злокачественных новообразований (Moschos et al., Interferons in the Treatment of

Solid Tumors, «Cancer Treat. Res. 126: 207-241 (2005), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[0071] Используемый в настоящем описании термин «противоопухолевая вакцина» относится к композиции, которая стимулирует иммунный ответ у пациента против опухоли или опухолевой клетки. Противоопухолевые вакцины обычно состоят из источника опухолеассоциированного материала или клеток (антигена), которые могут быть аутологичными (от себя) или аллогенными (от других) для пациента, наряду с другими компонентами (например, адъювантами) для дальнейшего стимулирования и усиления иммунного ответа против антигена. Противоопухолевые вакцины могут стимулировать иммунную систему пациента к выработке антител к одному или нескольким специфическим антигенам и/или к выработке клеток Т-киллеров для атаки опухолевых клеток, которые имеют эти антигены.

[0072] Используемый в настоящем описании термин «эпигенетический агент» относится к агенту, который изменяет эпигенетическое состояние (например, состояние метилирования) ДНК клетки во время или после контакта или введения такого агента.

[0073] Подходящие эпигенетические агенты могут быть выбраны, например, из ингибитора гистондеацетилазы («HDAC»), 5-азациитидина, ретиноевой кислоты, триоксида мышьяка, ингибитора субъединицы «энхансер Zeste 2» (EZH2) репрессивного комплекса 2 Polycomb, ингибитора бромодомена («BRD») и их производных.

[0074] Примеры ингибиторов HDAC включают, но не ограничиваются ими, трихостатин А, трапоксин В, бензамиды, фенилбутират, вальпроевую кислоту, вориностат, белиностат, LAQ824, панобиностат, энтиностат, CI994 и моцетиностат.

[0075] Примеры ингибиторов EZH2 включают, но не ограничиваются ими, 3-дезазанепланоцин А (DZNep), EPZ005687, GSK126, EI1, UNC1999 и EPZ-6438 (Kim et al., «Targeting EZH2 in Cancer», Nat. Med. 22 (2): 128-134 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[0076] Примеры ингибиторов бромодомена включают, без ограничения, JQ1, I-BET151/762, PF-1 и RVX-208 (Wadhwa et al., «Bromodomain Inhibitor Review: Bromodomain and Extra-terminal Family Protein Inhibitors as a Potential New Therapy in Central Nervous System Tumors», Cureus 8(5):e620 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[0077] Дополнительные иллюстративные эпигенетические агенты включают ингибиторы ДНК-метилтрансферазы (DNMT), включая, помимо прочего, азацитидин и децитабин.

[0078] Микроокружение DCC/DTC играет решающую роль в усилении покоя. Член 1 Группы F Подсемейства 2 ядерных рецепторов (NR2F1) является рецептором ядерного гормона и регулятором транскрипции, который является ключевым узлом в сети факторов транскрипции, которая составляет сигнатуру покоя опухолевых клеток. При применении к профилям экспрессии генов у пациентов с раком молочной железы, положительным по рецепторам эстрогена (ER+), эта сигнатура, как было показано, предсказывает более

длительные периоды без метастазов (Kim et al., «Dormancy Signatures and Metastasis in Estrogen Receptor Positive and Negative Breast Cancer», *PloS One* 7:e35569 (2012), который полностью включен сюда в качестве ссылки). Этот признак покоя также был обнаружен в неактивных DTC у пациентов с раком предстательной железы, у которых не было симптомов в течение 7-18 лет (Sosa et al., «NR2F1 Controls Dormancy Tumor Cells via SOX9- and RARbeta-Driven Quiescence Programs», *Nat. Commun.* 6:6170 (2015) и Chery et al., «Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways», *Oncotarget* 5:9939-51 (2014), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки), подчеркивая его актуальность для болезней человека.

[0079] Было показано, что NR2F1 активирует и индуцирует покой локальных и отдаленных остаточных опухолевых клеток после операции на опухоли в модели ксенотрансплантата (PDX), полученной из клеток плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC) (Sosa, «Dormancy Programs as Emerging Antimetastasis Therapeutic Alternatives», *Mol. Cell. Oncol.* 3 (1): e1029062 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Пластичность экспрессии NR2F1 предполагает, что изменения в эпигеноме остаточных опухолевых клеток могут контролироваться внешними и внутренними сигналами и определять судьбу DCC. Было показано, что NR2F1 ограничивает перепрограммирование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS), вероятно, путем модуляции перепрограммирования хроматина (Onder et al., «Chromatin Modifying Enzymes as Modulators of Reprogramming», *Nature* 483 (7391): 598-602 (2012), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). NR2F1 также играет ключевую роль в поддержании глобально репрессивного хроматина в спящих опухолевых клетках, одновременно обеспечивая активное состояние хроматина в промоторах конкретных генов покоя, включая его собственный промотор (Sosa et al., «NR2F1 Controls Tumour Cell Dormancy via SOX9- and RARbeta-Driven Quiescence Programmes», *Nat. Commun.* 6: 6170 (2015), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), где подчеркивается существование согласованной эпигенетической программы, модулируемой NR2F1 и сигналами микроокружения, ведущими к покою опухолевых клеток. В одном варианте осуществления DTC являются NR2F1+.

[0080] Было показано, что DCC экспрессируют на высоком уровне пути активации PERK (Bragado et al., «Microenvironment Dictating Tumor Cell Dormancy», *Recent Results Cancer Res.* 195:25-39 (2012); Sosa et al., «Regulation of Tumor Cell Dormancy by Tissue Microenvironments and Autophagy», *Adv. Exp. Med. Biol.* 734:73-89 (2013); Goswami et al., «The Phosphoinositide 3-Kinase/Akt1/Par-4 Axis: A Cancer-Selective Therapeutic Target», *Cancer Res.* 66(6):2889-92 (2006); и Schewe et al., «ATF6alpha-Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells in vivo», *PNAS* 105(30):10519-24 (2008), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки), которые являются посредниками ISR. Передача сигналов ISR посредством фосфорилирования PERK и EIF2 α

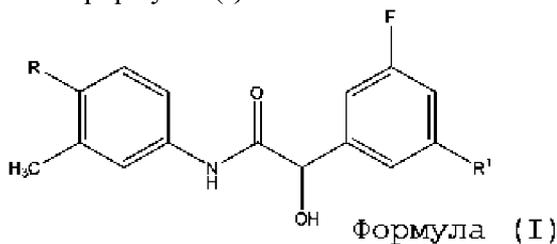
приводит к снижению общей трансляции, а также к увеличению специфической трансляции генов, окислительному стрессу и продукции ROS, деградации белка, деградации РНК, аутофагии и биосинтезу липидов, что может способствовать выживанию опухолевых клеток.

[0081] Другой аспект относится к способу лечения минимального остаточного рака у пациента, который включает контактирование диссеминированных опухолевых клеток (DCC) у пациента с ингибитором РНК-подобной протеинкиназы эндоплазматического ретикулума (PERK), выбранным из LY2, LY3 и LY4, где указанное контактирование уничтожает DCC у пациента для лечения минимального остаточного рака у пациента.

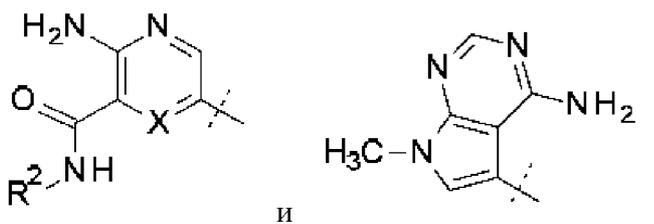
[0082] В одном варианте осуществления DCC являются фосфо-PERK активными. Соответственно, способ может дополнительно включать контактирование DCC у пациента с ингибитором PERK, ингибитором MEK, ингибитором CDK4/6 или любой их комбинацией.

[0083] Согласно одному варианту осуществления способов, описанных в настоящем документе, контактирование может осуществляться путем введения пациенту ингибитора PERK.

[0084] В одном варианте осуществления ингибитор PERK представляет собой соединение формулы (I).



где R выбран из группы, состоящей из



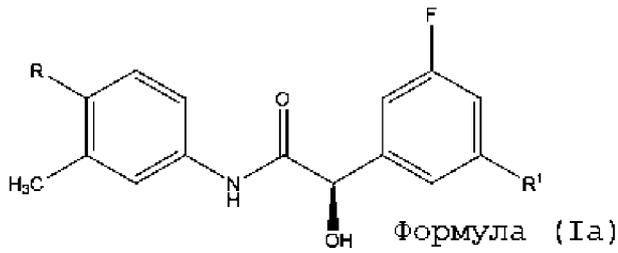
X представляет собой CH или N;

R1 представляет собой водород или галоген (например, фтор); и

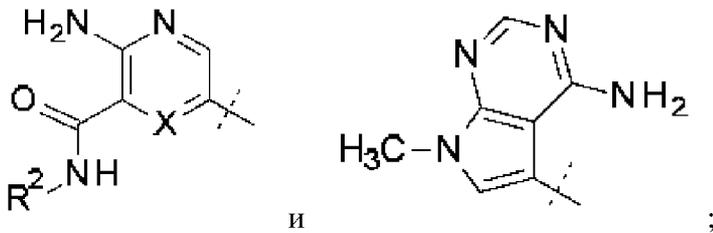
R2 представляет собой C1-C3алкил;

или его фармацевтически приемлемую соль.

[0085] В следующем варианте осуществления ингибитор PERK представляет собой соединение формулы (Ia)



где R выбран из группы, состоящей из



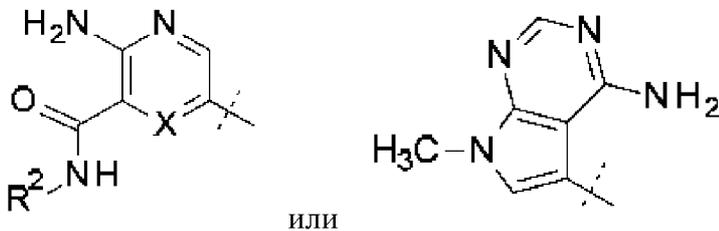
X представляет собой CH или N;

R1 представляет собой водород или галоген (например, фтор); и

R2 представляет собой C1-C3алкил;

или его фармацевтически приемлемую соль.

[0086] Когда ингибитор представляет собой соединение формулы (I) или формулы (Ia), R может быть



[0087] Используемый в настоящем описании термин «алкил» означает алифатическую углеводородную группу, которая может быть прямой или разветвленной, имеющей от примерно 1 до примерно 6 атомов углерода или от 1 до примерно 3 атомов углерода в цепи (или количество атомов углерода, обозначенное «C_n-C_n», где n - числовой диапазон атомов углерода). Разветвленный означает, что одна или более низших алкильных групп, таких как метил, этил или пропил, присоединены к линейной алкильной цепи. Примеры алкильных групп включают метил, этил, n-пропил и изопропил.

[0088] Термин «галоген» означает фтор, хлор, бром или йод. В одном варианте осуществления галоген представляет собой фтор.

[0089] Термин «соединение(я)» и эквивалентные выражения означают соединения, описанные в настоящем документе, причем выражение включает пролекарственные средства, фармацевтически приемлемые соли, оксиды и сольваты, например гидраты, если это позволяет контекст.

[0090] Описанные в настоящем документе соединения могут содержать один или более асимметричных центров и, таким образом, могут давать энантиомеры,

диастереомеры и другие стереоизомерные формы. Каждый хиральный центр может быть определен с точки зрения абсолютной стереохимии как (R)- или (S)-. Настоящее изобретение включает все такие возможные изомеры, а также их смеси, включая рацемические и оптически чистые формы. Оптически активные (R)- и (S)-, (-)- и (+)-, или (D)- и (L)- изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов или разделены с использованием обычных методик. Все таутомерные формы также предназначены для включения.

[0091] Описание «соединения» предназначено для включения солей, сольватов, оксидов и комплексов включения этого соединения, а также любой стереоизомерной формы или смеси любых таких форм этого соединения в любом соотношении. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления соединение, описанное в настоящем документе, в том числе в контексте фармацевтических композиций, способов лечения и соединений как таковых, предоставляется в форме соли.

[0092] Термин «сольват» относится к соединению в твердом состоянии, где молекулы подходящего растворителя включены в кристаллическую решетку. Подходящий растворитель для терапевтического введения является физиологически переносимым при введенной дозе. Примерами подходящих растворителей для терапевтического введения являются этанол и вода. Когда растворителем является вода, сольват называют гидратом. Обычно сольваты образуются путем растворения соединения в подходящем растворителе и выделения сольвата путем охлаждения или использования антирастворителя. Сольват обычно сушат или подвергают азеотропной перегонке в условиях окружающей среды.

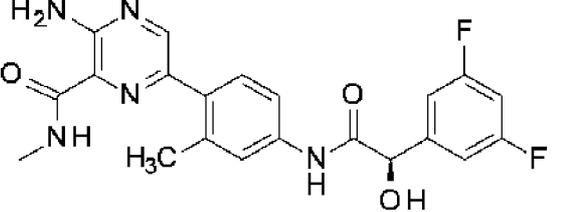
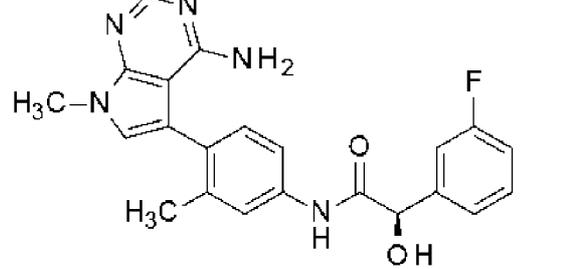
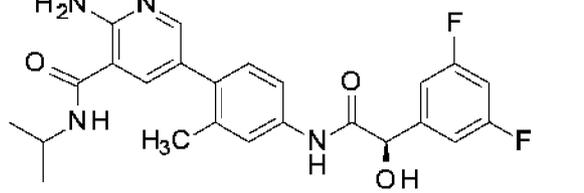
[0093] Комплексы включения описаны в Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19 Ed. 1: 176-177 (1995), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Наиболее часто используемые комплексы включения представляют собой комплексы с циклодекстринами, и все комплексы циклодекстрина, природные и синтетические, конкретно охватываются настоящим изобретением.

[0094] Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к солям, полученным из фармацевтически приемлемых нетоксичных кислот или оснований, включая неорганические кислоты и основания и органические кислоты и основания.

[0095] Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что с медицинской точки зрения он подходит для использования в контакте с клетками людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т. п. и соизмерим с разумным соотношением польза/риск.

[0096] Подходящие ингибиторы PERK могут быть выбраны из LY2, LY3, LY4 и их комбинаций (см. Таблицу 4 ниже). Ингибитор PERK может быть фармацевтически приемлемой солью LY2, LY3 и/или LY4.

Таблица 4 Примеры ингибиторов PERK

Соединение	Химическое название	Структура
LY2	3-амино-6-[4-[[[(2R)-2-(3,5-дифторфенил)-2-гидроксиацетил]амино]-2-метил-фенил]-N-метил-пиразин-2-карбоксамид	
LY3	(2R)-N-[4-(4-амино-7-метилпирроло[2,3-d]пиримидин-5-ил)-3-метил-фенил]-2-(3-фторфенил)-2-гидроксиацетамид	
LY4	2-амино-5-[4-[[[(2R)-2-(3,5-дифторфенил)-2-гидроксиацетил]амино]-2-метил-фенил]-N-изопропил-пиридин-3-карбоксамид	

[0097] В некоторых вариантах осуществления контактирование осуществляется с ингибитором PERK, который не ингибирует EIF2AK1, EIF2AK2 или EIF2AK4.

[0098] В одном варианте осуществления ингибитор PERK не ингибирует AXL. В соответствии с этим вариантом осуществления ингибитор PERK выбран из LY3 и LY4.

[0099] В другом варианте осуществления ингибитор PERK не ингибирует Flt3, MNK2 или NTRK. В соответствии с этим вариантом осуществления ингибитор PERK представляет собой LY4.

[0100] В одном варианте осуществления контактирование осуществляется путем введения пациенту ингибитора MEK. Типичные ингибиторы MEK хорошо известны в данной области и включают, например, PD184352, PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119/BAY 869766 (см., например, Iverson et al., «RDEA119/BAY 869766: A Potent, Selective, Allosteric Inhibitor of MEK1/2 for the Treatment of Cancer», *Cancer Res.* 69 (17): 6839-47 (2009), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[0101] В другом варианте осуществления контактирование осуществляется путем введения пациенту ингибитора CDK4/6. Типичные ингибиторы CDK4/6 хорошо известны в данной области и включают, например, абемациклиб (LY2835219), палбоциклиб (PD0332991) и рибоциклиб (LEE011).

[0102] В одном варианте осуществления способ может дополнительно включать выбор пациента без признаков заболевания до указанного контакта. Например, до указанного контакта пациент может находиться в стадии ремиссии рака.

[0103] При осуществлении способов, описанных в настоящем документе, у

пациента подвергается лечению минимальный остаточный рак. Такое лечение может включать, без ограничения, введение пациенту, нуждающемуся в лечении минимального остаточного рака, одного или более соединений, эффективных для лечения состояния пациента (то есть рака или минимального остаточного рака).

[0104] В одном варианте осуществления способы лечения по настоящему раскрытию проводят в условиях, эффективных для индукции покоя в диссеминированных опухолевых клетках («DTC») и/или для индукции гибели спящих DTC.

[0105] При осуществлении способов лечения согласно настоящему раскрытию введение соединений пациенту может включать введение фармацевтических композиций, содержащих соединение(я) (т. е. белок, производный BMP7, и ингибитор PERK согласно настоящему раскрытию) в терапевтически эффективных количествах, что означает количество соединения, эффективное для лечения указанных состояний и/или нарушений у пациента. Такие количества обычно варьируются в зависимости от ряда факторов, хорошо известных специалистам в данной области. Сюда входят, без ограничения, конкретный пациент, а также его возраст, вес, рост, общее физическое состояние и история болезни, конкретное используемое соединение, а также носитель, с которым оно включено в состав, и выбранный путь введения для этого; продолжительность лечения; а также характер и серьезность заболевания, подлежащего лечению.

[0106] Введение обычно включает введение фармацевтически приемлемых лекарственных форм, что означает лекарственные формы соединений, описанных в настоящем документе, и они включают, например, таблетки, драже, порошки, эликсиры, сиропы, жидкие препараты, включая суспензии, спреи, таблетки для ингаляции, пастилки, эмульсии, растворы, гранулы, капсулы и суппозитории, а также жидкие препараты для инъекций, в том числе липосомные. Методики и составы, как правило, можно найти в последней редакции Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[0107] При осуществлении способов лечения согласно настоящему раскрытию лекарственное средство (то есть производное белка BMP7 и ингибитор PERK согласно настоящему раскрытию) может содержаться в любом подходящем количестве в любом подходящем веществе-носителе. Лекарственное средство может присутствовать в количестве вплоть до 99% по массе от общей массы композиции. Композиция может быть представлена в лекарственной форме, которая подходит для перорального, парентерального (например, внутривенного, внутримышечного), ректального подкожного, назального, вагинального, ингаляционного, кожного (пластырь) или глазного пути введения. Таким образом, композиция может быть в форме, например, таблеток, капсул, пилюль, порошков, гранулятов, суспензий, эмульсий, растворов, гелей, включая гидрогели, пасты, мази, кремы, пластыри, дозаторы для перорального введения, осмотические устройства для доставки, суппозитории, клизмы, лекарственные формы для инъекций, импланты, спреи и аэрозоли.

[0108] Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть

составлены для высвобождения активного лекарственного средства практически сразу после введения или в любое заранее определенное время или период времени после введения.

[0109] Составы с контролируемым высвобождением включают (i) составы, которые создают по существу постоянную концентрацию лекарственного средства (средств) в организме в течение продолжительного периода времени; (ii) составы, которые после заданного времени задержки создают по существу постоянную концентрацию лекарственного средства (средств) в организме в течение продолжительного периода времени; (iii) составы, которые поддерживают действие лекарственного средства (средств) в течение заданного периода времени, поддерживая относительно постоянный, эффективный уровень лекарственного средства в организме с сопутствующей минимизацией нежелательных побочных эффектов, связанных с колебаниями уровня активного лекарственного средства в плазме; (iv) составы, которые локализуют действие лекарственного средства (средств), например, пространственным размещением композиции с контролируемым высвобождением рядом с больными клетками, тканями или органами или внутри них; и (v) составы, нацеленные на действие лекарственного средства (средств) с использованием носителей или химических производных для доставки лекарственного средства к конкретному типу клеток-мишеней.

[0110] Введение лекарственных средств в форме состава с контролируемым высвобождением может быть предпочтительным в случаях, когда лекарственное средство имеет (i) узкий терапевтический индекс (то есть разница между концентрацией в плазме, приводящей к вредным побочным эффектам или токсическим реакциям, и концентрацией в плазме, приводящей к терапевтическому эффекту, невелика; как правило, терапевтический индекс (ТИ) определяется как отношение средней летальной дозы (LD₅₀) к средней эффективной дозе (ED₅₀)); (ii) узкое окно всасывания в желудочно-кишечном тракте; или (iii) очень короткий биологический период полужизни, так что требуется частое дозирование в течение дня для поддержания уровня в плазме на терапевтическом уровне.

[0111] Для получения контролируемого высвобождения, при котором скорость высвобождения превышает скорость метаболизма рассматриваемого лекарственного средства, можно применять любую из множества стратегий. Контролируемое высвобождение может быть получено соответствующим отбором различных параметров состава и ингредиентов, включая, например, различные типы композиций и покрытий для контролируемого высвобождения. Таким образом, лекарственное средство составлено с соответствующими вспомогательными веществами в фармацевтическую композицию, которая, при введении, высвобождает лекарственное средство контролируемым образом (одно- или многоэлементная таблетки или композиции капсул, масляные растворы, суспензии, эмульсии, микрокапсулы, микросферы, наночастицы, пленки и липосомы).

[0112] Таким образом, введение в соответствии со способами настоящего раскрытия может осуществляться перорально, местно, трансдермально, парентерально,

подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно, интраназальной инстилляцией, внутриполостной или внутрипузырной инстилляцией, внутриглазным, внутриартериальным, внутриочаговым путем или путем нанесения на слизистые оболочки. Соединения можно вводить отдельно или с подходящими фармацевтическими носителями, и они могут быть в твердой или жидкой форме, такой как таблетки, капсулы, порошки, растворы, суспензии или эмульсии.

[0113] Лекарственное средство (т. е. производное белка BMP7 и ингибитор PERK по настоящему раскрытию) можно вводить перорально, например, с инертным разбавителем или с ассимилируемым съедобным носителем, или оно может быть заключено в капсулы с твердой или мягкой оболочкой, или может быть спрессовано в таблетки или может быть включено непосредственно в пищу при питании. Для перорального терапевтического введения лекарственное средство может быть включено с вспомогательными веществами и использоваться в форме таблеток, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов и т. п. Такие композиции и препараты должны содержать по меньшей мере 0,001% активного соединения. Процентное содержание соединения в этих композициях может, конечно, варьироваться и обычно может составлять от примерно 0,01% до примерно 10% от массы единицы. Количество активного соединения в таких терапевтически полезных композициях таково, что будет получена подходящая дозировка. В одном варианте осуществления композиции готовят таким образом, чтобы пероральная дозированная единица содержала от примерно 1 мкг до 1 г активного соединения.

[0114] Таблетки, капсулы и т. п. могут также содержать связующее, такое как трагакантовая камедь, гуммиарабик, кукурузный крахмал или желатин; вспомогательные вещества, такие как дикальцийфосфат; разрыхлитель, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота; лубрикант, такой как стеарат магния; и подслащивающий агент, такой как сахароза, лактоза или сахарин. Когда стандартная лекарственная форма представляет собой капсулу, она может содержать, помимо материалов указанного выше типа, жидкий носитель, такой как нелетучее жидкое масло.

[0115] Различные другие материалы могут присутствовать в качестве покрытий или для модификации физической формы лекарственной формы. Например, таблетки могут быть покрыты шеллаком, сахаром или обоими. Сироп может содержать, помимо активного ингредиента, сахарозу в качестве подсластителя, метил и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и ароматизатор, такой как вишневый или апельсиновый ароматизатор.

[0116] Терапевтический агент также можно вводить парентерально. Растворы или суспензии можно приготовить в воде, смешанной подходящим образом с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Также можно приготовить дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях в маслах. Иллюстративные масла представляют собой масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, например арахисовое масло, соевое масло или

минеральное масло. Как правило, предпочтительными жидкими носителями, особенно для растворов для инъекций, являются вода, физиологический раствор, водный раствор декстрозы и родственного сахара, а также гликоли, такие как пропиленгликоль, гиалуронан и его производные, карбоксиметилцеллюлоза и другие растворимые производные полисахаридов или полиэтиленгликоль. При обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов, если они не производятся в асептических условиях.

[0117] Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы и дисперсии и стерильные порошки для препаратов для немедленного приема стерильных инъецируемых растворов или дисперсий. Форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко набрать с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, и растительными маслами.

[0118] Терапевтический агент также можно вводить непосредственно в дыхательные пути в форме аэрозоля. Для использования в виде аэрозолей терапевтическое средство в растворе или суспензии может быть упаковано в аэрозольный контейнер под давлением вместе с подходящими пропеллентами, например углеводородными пропеллентами, такими как пропан, бутан или изобутан, с обычными адьювантами. Терапевтический агент также можно вводить без давления, например в небулайзере или в распылителе.

[0119] В одном варианте осуществления введение может увеличить количество выявляемых покоящихся DCC у пациента по меньшей мере примерно на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более.

[0120] В другом варианте осуществления введение может снизить количество выявляемых DCC у пациента по меньшей мере примерно на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более.

[0121] В контексте настоящего описания «лечение» означает поддержание отсутствия признаков симптоматического заболевания (например, рака) у пациента.

[0122] В одном варианте осуществления термин «лечение» обозначает, в частности, устранение минимального остаточного рака у пациента. Термин «лечение» включает индукцию покоя в DCC. Термин «лечение» также включает устранение спящих DCC у пациента. Термин «лечение» также включает уменьшение количества или числа обнаруживаемых спящих DCC у пациента.

[0123] Другой аспект раскрытия относится к способу лечения минимального остаточного рака у пациента. Этот метод включает контактирование диссеминированных

опухолевых клеток (DCC) у пациента с ингибитором РНК-подобной протеинкиназы эндоплазматического ретикулума (PERK), выбранным из LY2, LY3 и LY4, при этом указанное контактирование уничтожает DCC у пациента для лечения минимального остаточного рака у пациента.

[0124] Как описано выше, способы по настоящему раскрытию подходят для лечения минимального остаточного рака у пациента, у которого был диагностирован одно или более из следующих состояний: рак молочной железы, множественная миелома, рак легких, немелкоклеточный рак легкого, рак мозга, рак шейки матки, мантийноклеточная лимфома, лейкоз, гепатоцеллюлярная карцинома, рак предстательной железы, меланома, рак кожи, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, глиобластома, нейробластома, колоректальный рак и другие виды рака.

[0125] Раком может быть рак молочной железы, выбранный из инвазивного рака молочной железы, протоковой карциномы *in situ* (DCIS), лобулярной карциномы *in situ* (LCIS) и воспалительного рака молочной железы.

[0126] В одном варианте осуществления рак молочной железы представляет собой рак молочной железы HER2+.

[0127] В другом варианте осуществления у пациента диагностировали диссеминированные опухолевые клетки и/или неметастатический рак.

[0128] Как описано выше, способы по настоящему раскрытию могут дополнительно включать введение пациенту химиотерапевтического агента, иммунотерапевтического агента, эпигенетического агента или ионизирующего излучения.

[0129] Когда пациенту вводят химиотерапевтический агент, химиотерапевтический агент может быть химиотерапевтическим агентом против HER2, выбранным из трастузумаба (Герцептин®) и лапатиниба (Тикерб®). В другом варианте осуществления химиотерапевтический агент может быть выбран из антрациклина, таксана, ингибитора киназы, антитела, фторпиримидина и лекарственного средства на основе платины.

[0130] Когда иммунотерапевтический агент вводят пациенту, иммунотерапевтический агент выбирают из ингибитора иммунной контрольной точки, интерферона или противоопухолевой вакцины.

[0131] Когда пациенту вводят эпигенетический агент, эпигенетический агент может быть выбран из ингибитора гистондеацетилазы (HDAC), 5-азациитидина, ретиноевой кислоты, триоксида мышьяка, ингибитора субъединицы «энхансер Zeste 2» (EZH2) репрессивного комплекса 2 Polycomb, ингибитора бромодомена (BRD) и их производных.

[0132] Контакт может быть осуществлен путем введения пациенту ингибитора PERK. Подходящие ингибиторы PERK подробно описаны выше и включают, без ограничения, LY2, LY3 и LY4.

[0133] В одном варианте осуществления способ дополнительно включает обнаружение наличия DTC у пациента до указанного контакта. Как более подробно описано выше, DTC могут быть NR2F1+, фосфо-PERK активными и/или BMPR+.

[0134] Способ может дополнительно включать контактирование DCC/DTC у пациента с белком, производным BMP7. В одном варианте осуществления контактирование DCC/DTC у пациента с белком, производным BMP7, осуществляется путем введения пациенту белка, производного BMP7. Подходящие белки, производные BMP7, описаны выше. В одном варианте осуществления белком, производным BMP7, является BMP7-F9.

[0135] В одном варианте осуществления ингибитор PERK не ингибирует EIF2AK1, EIF2AK2 или EIF2AK4.

[0136] Как описано выше, пациентом может быть млекопитающее, предпочтительно человек.

[0137] В одном варианте осуществления способ может дополнительно включать выбор пациента без признаков заболевания до указанного контактирования. Например, до указанного контактирования пациент может находиться в стадии ремиссии рака.

[0138] Еще один аспект изобретения относится к способу лечения рака пациента на поздней стадии. Этот метод включает контактирование диссеминированных опухолевых клеток (DCC) пациента с ингибитором РНК-подобной протеинкиназы эндоплазматического ретикулума (PERK), выбранным из LY2, LY3 и LY4, где указанное контактирование устраняет DTC у пациента для лечения минимального остаточного рака у пациента.

[0139] Используемый в настоящем описании термин «рак поздней стадии» относится к раку стадии II, раку стадии III и/или раку стадии IV, или к любому раку, который дал метастазы. Следует принимать во внимание, что характер «поздней стадии» болезненных состояний рака может быть определен врачом.

[0140] Как подробно описано выше, у пациента могли быть диагностированы рак груди, множественная миелома, рак легких, немелкоклеточный рак легкого, рак мозга, рак шейки матки, мантийноклеточная лимфома, лейкоз, гепатоцеллюлярная карцинома, рак предстательной железы, меланома, рак кожи, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, глиобластома, нейробластома или колоректальный рак.

[0141] В одном варианте осуществления рак представляет собой рак молочной железы, выбранный из инвазивного рака молочной железы, протоковой карциномы *in situ* (DCIS), лобулярной карциномы *in situ* (LCIS) и воспалительного рака молочной железы. Рак молочной железы может быть раком молочной железы HER2+.

[0142] Способ может дополнительно включать введение пациенту химиотерапевтического агента, иммунотерапевтического агента, эпигенетического агента или ионизирующего излучения. В одном варианте осуществления химиотерапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент против HER2, выбранный из трастузумаба (Герцептин®) и лапатиниба (Тикерб®). В другом варианте осуществления химиотерапевтический агент выбран из антрациклина, таксана, ингибитора киназы, антитела, фторпиримидина и лекарственного средства на основе платины. Иммунотерапевтический агент может быть выбран из ингибитора иммунных контрольных

точек, интерферона или противоопухолевой вакцины. Эпигенетический агент может быть выбран из ингибитора гистондеацетилазы (HDAC), 5-азацитидина, ретиноевой кислоты, триоксида мышьяка, ингибитора субъединицы «энхансер Zeste 2» (EZH2) репрессивного комплекса 2 Polycomb, ингибитора бромодомена (BRD) и их производных.

[0143] В одном варианте осуществления контактирование осуществляется путем введения пациенту ингибитора PERK.

[0144] Способ может дополнительно включать обнаружение присутствия DCC/DTC у пациента до указанного контакта.

[0145] Как описано выше, DTC могут быть NR2F1+ или фосфо-PERK-активными.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Материалы и методы для Примеров 2-6

[0146] Реагенты, культура клеток и обработки: EGF был получен от PeproTech (Rocky Hill, NJ) и использован в концентрации 100 нг/мл. Тапсигаргин был от Sigma (Сент-Луис, Миссури) и использовался в концентрации 2 нМ. Клеточная линия ZR75.1-H2B-Dendra2 была получена путем стабильной трансфекции плазмиды H2B-Dendra2 (Gurskaya et al., «Engineering of the Green-to-Red Photoactivatable Fluorescent Protein Induced by Blue Light», Nat. Biotechnol. 24: 461-465 (2006), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Для 3D-культур клетки MCF10A-HER2, SKBR3 и ZR75.1-H2B-Dendra2 помещали в матригель с пониженным содержанием фактора роста (Corning, Corning, NY) и выращивали, как описано ранее (Avivar-Valderas et al., «Regulation of Autophagy during ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK», Oncogen 32 (41): 4932-40 (2013), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Что касается «низкой плотности», было засеяно 3500 клеток на 8 лунок, а для «высокой плотности» - 20 000 клеток на 8 лунок. Обработки носителем (DMSO) или LY4 (2 μM) заменяли каждые 24 часа для 2D и каждые 48 часов для 3D культур.

[0147] Мыши, рост опухоли и обработка ткани: Штамм мышей FVB/N-Tg (MMTVneu) был получен от Jackson Laboratories (Сакраменто, Калифорния). Эти мыши экспрессируют неактивированную форму neu (HER2) под транскрипционным контролем промотора/энхансера вируса опухоли молочной железы мыши. Перед использованием в любом эксперименте у самок был один цикл беременности и не менее двух недель отсутствия лактации после отъема. Самкам в возрасте 24-32 недель внутрибрюшинно вводили носитель (90% кукурузное масло, 10% этанол) или LY4 (50 мг/кг) ежедневно в течение двух недель. Что касается комбинированной обработки, самки в возрасте 24-32 недель получали ежедневно через желудочный зонд абемациклиб (50 мг/кг) в течение 4 недель перед началом обработки, описанной ранее, с LY4. Объемы опухоли измеряли по формуле $(D \times d^2)/2$, где D - самый длинный, а d - самый короткий диаметр. Для подсчета СТС животных анестезировали и отбирали цельную кровь сердечной пункцией. Молочные железы, легкие и опухоли собирали и фиксировали в 10% забуференном формалине в течение ночи перед заливкой в парафин. Костный мозг из двух нижних

конечностей промывали иглой 26 G и дополнительно обрабатывали центрифугированием в градиенте плотности фиколла. Для детектирования СТС, а также DTC в костном мозге, ткани были лишены зрелых гемопоэтических клеток путем разделения с помощью магнитных микросфер, меченных антителами против мышинных белков (Miltenyi Biotec, San Diego, CA), перед фиксацией в формалине в течение 20 минут при 4 °С.

[0148] Окрашивание цельного образца молочной железы: молочные железы, фиксированные в 10% забуференном формалине, инкубировали в красителе кармината алюминия (кармин 0,2%, сульфат алюминия 0,5%) (Sigma, St. Louis, MO) в течение 2 дней. Затем их обезвоживали и переносили в раствор метилсалицилата перед визуализацией с помощью стереомикроскопа.

[0149] ИHC и IF: ИHC и IF из залитых парафином срезов выполняли, как описано ранее (Avivar-Valderas et al., «Regulation of Autophagy during ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK», *Oncogene* 32(41):4932-40 (2013), которая настоящим приводится ссылкой в полном объеме). Вкратце, препараты депарафинизировали и последовательно регидратировали. Вызванное нагреванием извлечение антигена выполняли либо в цитратном буфере (10 мМ, pH 6), либо в буфере EDTA (1 мМ, pH 8), либо в Tris/EDTA (pH 9). Препараты дополнительно пермеабелизовали в 0,1% Triton™-X100, блокировали и инкубировали с первичным антителом в течение ночи при 4°C при разведении 1:50-1:200. Для ИHC перед инкубацией первичных антител выполняли дополнительную стадию гашения эндогенной пероксидазы и авидина/биотина. В качестве первичных используемых антител были антитела против цитокератина 8/18 (Progen, Гейдельберг, Германия), актин-Сy3 гладких мышц (Sigma, Сент-Луис, Миссури), P-PERK (T980) (Tenkerian et al., «mTORC2 Balances AKT Activation and eIF2alpha Serine 51 Phosphorylation to Promote Survival Under Stress», *Mol. Cancer Res.* 13: 1377-1388 (2015), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), P-eIF2A, расщепленная каспаза 3, P-H3 (S10), P-HER2 (Y1221/1222) (Cell signaling, Danvers, MA), P-Rb (S249/T252) (Санта-Крус, Даллас, Техас), HER2 (Abcam, Кембридж, Массачусетс), HER2 (Millipore, Дармштадт, Германия), Ki67 (eBioscience и Abcam), коктейль цитокератина (C11 и ck7, Abcam; AE1 и AE3, Millipore) и GADD34 (Санта-Крус). Затем препараты инкубировали во вторичных антителах (Life Technologies, Norwalk, CT) и монтировали. Для ИHC срезы обрабатывали с использованием набора VectaStain ABC Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA) и набора субстратов DAB для мечения пероксидазы (Vector Laboratories) и помещали в среду VectaMount (Vector Laboratories). Для IF срезы помещали в водную среду ProLong Gold Antifade (Thermo Fisher, Waltham, MA).

[0150] В случае иммуноцитофлуоресценции цитоспины фиксированных клеток (100000-200000 клеток/цитоспин получали цитоцентрифугированием при 500 об/мин в течение 3 минут на полипрератах, и протокол окрашивания выполняли, как описано ниже, начиная с пермеабелизации. Для окрашивания 3D-культур ацинусы фиксировали в 4% PFA в течение 20 минут при 4 °С, пермеабелизовали 0,5% Triton™-X100 в PBS в течение

20 минут при комнатной температуре, промывали PBS-глицином, а затем блокировали с помощью 10% нормальной козьей сыворотки в течение 1 часа при 37°C перед проведением иммуофлуоресцентного окрашивания.

[0151] Оценка уровней P-HER2 поясняется на ФИГ. 10А. Для подсчета СК8/18 и SMA в протоках молочной железы 20 областей с низким увеличением были оценены на каждое животное для экспрессии СК8/18 как отрицательные (0), низкий уровень (1) или высокий уровень (2) и то же самое для SMA, и сумма двух оценок считалась окончательной (от 0 до 4).

[0152] Микроскопия: изображения были получены с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100, Leica DM5500 или конфокального многофотонного микроскопа Leica SP5.

[0153] Детектирование гибели клеток *in situ* с помощью TUNEL: Уровни апоптоза оценивали с использованием набора для обнаружения гибели клеток *in situ*, AP (Roche, Базель, Швейцария). Парафиновые срезы опухолей депарафинизировали, регидратировали и перемеабелизовали в фосфатно-солевом буфере (PBS) 0,2% TRITONTM-X100 в течение 8 минут. Затем препараты промывали и блокировали в 20% нормальной козьей сыворотке в течение 1 часа при 37 °C. Затем добавляли реакционную смесь TUNEL и оставляли на 1 час при 37 °C. Реакцию останавливали инкубированием с буфером I (0,3 М хлорид натрия, 30 мМ цитрат натрия). Затем препараты инкубировали с антителом против флуоресцеина-AP в течение 30 минут при 37 °C. После трех промывок в Tris-буферном физиологическом растворе (TBS) препараты инкубировали в субстрате щелочной фосфатазы в 0,1% TWEENTM-20 в течение 20 минут при комнатной температуре. Наконец, препараты монтировали с использованием водной среды для заливки. Процент TUNEL-положительных клеток рассчитывали с использованием программного обеспечения Image J (NIH).

[0154] Иммуноблот-анализ: клетки лизировали в буфере RIPA, а белок анализировали с помощью иммуноблоттинга, как описано ранее (Ranganathan et al., «Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells», *Cancer Res.* 66: 1702-1711 (2006), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Мембраны подвергали блоттингу с использованием следующих дополнительных антител: P-PERK (T982) (Tenkerian et al., «mTORC2 Balances AKT Activation and eIF2alpha Serine 51 Phosphorylation to Promote Survival Under Stress», *Mol. Cancer Res.* 13: 1377-1388 (2015), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), PERK (Санта-Крус, Даллас, Техас), P-EGFR (Y1148), EGFR, P-AKT (S473), P-S6 (S235/236) (передача сигналов в клетках, Данверс, Массачусетс), GAPDH (Millipore, Дармштадт, Германия) и β -тубулин (Abcam, Кембридж, Массачусетс). Для индукции ER-стресса клетки MCF10A-HER2 помещали на планшеты с низкой адгезией на 24 часа перед сбором.

[0155] Анализ биотинилирования и эндоцитоза клеточной поверхности: Для биотинилирования клеточной поверхности использовали набор для выделения белка

клеточной поверхности Pierce, следуя инструкциям производителя с небольшими изменениями. Вкратце, клетки MCF10A-HER2 были лишены сыворотки и EGF и обработаны +/- LY4 в течение 24 часов перед стимуляцией +/- EGF (100 нг/мл) в течение 20 минут. Затем клетки промывали ледяным PBS и биотинилировали поверхностные белки в течение 30 минут при 4 °С. После гашения клетки собирали и лизировали с использованием буфера RIPA. Лизаты белков инкубировали с гранулами агарозы NeutrAvidin, и связанные белки высвобождали путем инкубации с буфером для образцов SDS-PAGE, содержащим DTT (50 мМ). Для тестов на эндоцитоз (Cihil et al., «The Cell-Based L-Glutathione Protection Assays to Study Endocytosis and Recycling of Plasma Membrane Proteins», J. Vis. Exp. e50867 (2013), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), клетки обрабатывали аналогичным образом, но перед обработкой EGF белки клеточной поверхности были биотинилированы. После 20-минутной инкубации +/- EGF (100 нг/мл) при 37 °С (для индукции эндоцитоза) клетки промывали ледяным PBS и инкубировали с буфером стрипирования (для удаления биотинилирования клеточной поверхности: 75 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ CaCl₂, 50 мМ глутатиона и 80 мМ NaOH, pH 8,6) в течение 30 мин. Для контроля эффективности очистки клетки стрипировали без инкубации при 37 °С (t=0). Лизаты клеток готовили и обрабатывали для выделения биотинилированного белка, как описано ранее.

[0156] Анализ экспрессии генов, нацеленных на отдельные клетки: Первичные опухоли MMTV-neu 28-30-недельных самок гидролизуют коллагеназой до получения суспензии отдельных клеток. Легкие MMTV-neu самок в возрасте 15-30 недель гидролизуют в суспензию отдельных клеток с коллагеназой и ресуспендируют в буфере FACS. Затем клетки окрашивают анти-HER2-PE, анти-CD45-APC и DAPI, а популяцию клеток HER2+/CD45- отсортировывают с использованием сортера BDFACSAria. Отсортированные клетки ресуспендируют при концентрации 312 500 клеток/мл в среде и 80 мкл смешивают с 20 мкл суспензионного реагента (C1 Fluidigm). Для разделения отдельных клеток использовали C1 Single-cell Preamp IFC 10-17 μм. Предварительную амплификацию проводили с использованием набора Ambion Single Cell-to-CT qRT-PCR и 20xTaqMan анализов для экспрессии генов FAM-MGB. Полученную кДНК дополнительно разводили в реагенте для разведения ДНК C1 1/3 и использовали для анализа экспрессии генов с использованием 96,96 IFC (Fluidigm), контроллера Juno System и Biomark HD для высокопроизводительной количественной ПЦР. Для проведения количественной ПЦР использовали смесь TaqMan Fast Advanced Master Mix. Анализ проводили с использованием программного обеспечения для анализа ПЦР в реальном времени Fluidigm и веб-инструмента Clustergrammer (Fernandez et al., «Clustergrammer, A Web-Based Heatmap Visualization and Analysis Tool for High-Dimensional Biological Data», Sci. Data 4: 1-12 (2017), которая включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме) для тепловых карт иерархической кластеризации.

[0157] Биохимические анализы: каталитический домен рекомбинантного

человеческого EIF2AK3 (PERK) (аминокислоты 536-1116; № по каталогу PV5107), субстрат GFP-eIF2 α (№ по каталогу PV4809) и меченное тербием фосфо-eIF2 α антитело (№ по каталогу PR8956B) были приобретены у Invitrogen. (Карлсбад, Калифорния). Каталитический домен HIS-SUMO-GCN2 (аминокислоты 584-1019) был экспрессирован и очищен из *E. coli*. Анализы киназы TR-FRET проводили в отсутствие или в присутствии ингибиторов в реакционном буфере, состоящем из 50 мМ HEPES, pH 7,5, 10 мМ MgCl₂, 1,0 мМ EGTA, 0,01% Brij-35 и 100-200 нМ GFP-eIF2 α субстрата. Анализы PERK содержали 62,5 нг/мл фермента и 1,5 мкМ АТФ (K_m, приблизительно 1,5 мкМ), а анализы GCN2 содержали 3 нМ фермента и 90 мкМ АТФ (K_m, приблизительно ~ 200 мкМ). После добавления тестируемого соединения реакцию инициировали добавлением фермента и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут. Реакцию останавливали добавлением EDTA до конечной концентрации 10 мМ, добавляли антитело фосфо-eIF2 α , меченное тербием, до конечной концентрации 2 нМ и инкубировали в течение 90 минут. Полученную флуоресценцию контролировали с помощью считывающего устройства EnVison® Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA). Отношения TR-FRET и полученные значения IC₅₀ определяли по экспериментальным кривым ингибирования. Профили биохимической специфичности проводили в Serer (Редмонд, Вашингтон) и DiscoverX (Сан-Диего, Калифорния).

[0158] Клеточный анализ TR-FRET: Вкратце, клетки GripTite™ 293 (Invitrogen), экспрессирующие GFP-eIF2 α , высевали из расчета 10000 клеток на лунку в 384-луночные планшеты и давали им прикрепиться в течение ночи. Клетки предварительно обрабатывали тестируемыми соединениями в течение 1 часа. Туникамицин (1 мкМ) добавляли для индукции активности PERK, и планшеты инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Культуральную среду удаляли, и клетки лизировали в буфере, состоящем из 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 1% NP-40, 5 мМ NaF, ингибиторов протеаз (Sigma кат. # P8340), Ингибиторов фосфатазы (Sigma кат. # P2850) и 2 нМ антитела к фосфо-eIF2, меченные тербием (Invitrogen кат. # PM4312I). Лизаты клеток инкубировали в течение 2 часов в темноте при комнатной температуре и флуоресценцию отслеживали с помощью считывающего устройства EnVison® Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA). Соотношения TR-FRET и полученные значения IC₅₀ определяли по экспериментальным кривым ингибирования с использованием неиндуцированных (100% ингибирование) и индуцированных (0% ингибирования) лунок в качестве контролей.

[0159] Анализ ATF4-luc: клетки 293 трансдуцировали лентивирусом, экспрессирующим ATF4-luc (SABiosciences, Frederick, MD), и отбирали в питательной среде, содержащей 1 мкг/мл пуромицина. Для определения влияния соединений на активность ATF4, индуцированную ER-стрессом, клетки 293-ATF4-luc высевали из расчета 15000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты, покрытые поли-D-лизинном, и оставляли для прикрепления в течение ночи. Затем клетки предварительно обрабатывали тестируемыми соединениями в течение 30 минут. Туникамицин (2 мкМ) добавляли для индукции ER-стресса, и планшеты инкубировали при 37°C в течение 6 часов. Затем

культуральную среду аспирировали и клетки лизировали в буфере для пассивного лизиса (Promega кат. # E194A) на шейкере для планшетов в течение 5 минут. Активность люциферазы контролировали с помощью реагента для анализа люциферазы (Promega кат. # E1501) в счетчике Wallac 1420 Victor2™ Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA), и значения IC50 определяли по полученным экспериментальным кривым ингибирования с использованием неиндуцированных (100% ингибирование) и индуцированных (0% ингибирования) лунок в качестве контролей.

[0160] Анализы жизнеспособности клеток: клетки Hela, HT-1080 и Вх-РС-3 контролировали на предмет роста в 96-луночных планшетах в отсутствие или в присутствии ингибиторов PERK в течение 48, 72 или 96 часов, соответственно. Жизнеспособность клеток определяли с использованием реагента CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI), и значения IC50 определяли по полученным экспериментальным кривым ингибирования с использованием необработанных (0% ингибирования) и лунок, обработанных 20 мкМ стауроспорина (100% ингибирование) в качестве контролей.

[0161] Статистический анализ: все точки представляют собой независимые биологические образцы с планками погрешности, представляющими стандартные отклонения, а статистическая значимость была определена с использованием теста Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism Software.

Пример 2 - HER2+ DTC в состоянии покоя отображают ответ на ER-стресс

[0162] Было показано, что активация пути PERK служит решающим фактором для вызванной UPR остановки роста и выживания, связанных с неактивным фенотипом (Brewer et al., «PERK Mediates Cell-Cycle Exit During the Mammalian Unfolded Protein Response», Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:12625-30 (2000); Ranganathan et al., «Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival», Cancer Res. 68:3260-3268 (2008); и Ranganathan et al., «Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells», Cancer Res. 66: 1702-1711 (2006), каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). У животных MMTV-HER2 у большого процента мышей развиваются метастазы в легких, которые могут быть иницированы ранними или поздними DCC (Guy et al., «Expression of the Neu Protooncogene in the Mammary Epithelium of Transgenic Mice Induces Metastatic Disease», Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 89:10578-10582 (1992); Husemann et al., «Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer», Cancer Cell 13:58-68 (2008); Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», Nature 540:588-592 (2016); Hosseini et al., «Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer», Nature 540:552-558 (2016), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки). Спящие DCC демонстрируют потерю E-кадгерина и экспрессию Twist1 (Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», Nature 540: 588-592 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), и E-кадгерин-отрицательные DCC в моделях рака поджелудочной железы также

оказались в состоянии покоя и продемонстрировали повышенную регуляцию CHOP, гена, индуцированного PERK (Pommier et al., «Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases», «Science 360 (6394): eaao4908 (2018), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Чтобы оценить, присутствует ли такая же корреляция между уровнями активации пути PERK и остановкой клеточного цикла в модели спонтанных метастазов MMTV-HER2, были использованы два разных подхода - визуализация с высоким разрешением с использованием иммунофлуоресценции (IF) и анализ экспрессии генов с разрешением одной клетки DCC и метастазы. Был проведен IF MMTV-HER2 срезов легочной ткани животных, несущих большие опухоли и, следовательно, несущих спящие и пролиферативные DCC (Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», Nature 540: 588-592 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Затем ткани совместно окрашивали для обнаружения DCC, положительных по HER2, Ki67 (как маркер пролиферации) и GADD34 (или PPP1r15A). GADD34 - это ген стресса, индуцируемый PERK, ответственный за запрограммированный переход от репрессии трансляции (из-за фосфорилирования eIF2 α) к экспрессии генов, индуцированной стрессом (Novoa et al., «Stress-Induced Gene Expression Requires Programmed Recovery from Translational Repression», EMBO J 22: 1180-7 (2003), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Анализ изображений показал, что метастатические поражения HER2+ или DCC с низким индексом пролиферации (ki67^{low}) представляли высокие уровни ER-стресса, о чем свидетельствуют высокие уровни экспрессии GADD34 (ФИГ. 1А, верхние панели и график). С другой стороны, высокопролиферативные DCC или поражения показали очень низкие уровни окрашивания GADD34 (ФИГ. 1А, нижние панели и график). Два маркера, Ki67 и GADD34, антикоррелировались в 100% клеток, подтверждая, что покоящиеся UPR^{высокий} DCC и метастатические поражения могут быть биомаркированы с помощью обнаружения GADD34.

[0163] Затем, будут ли эти корреляции справедливыми для метастатических поражений молочной железы у человека, оценивали путем тестирования 17 метастазов рака молочной железы из различных подтипов и источников (лимфатический узел, легкое, печень) (Таблица 5). Метастазы рака молочной железы окрашивали на цитокератины для идентификации метастатических поражений, Ki67 и GADD34. Метастатические поражения поздней стадии человека показали более неоднородный образец окрашивания для обоих маркеров между разными пациентами и между различными областями одного и того же поражения, чем в модели на мышах. Однако наблюдалась противоположная корреляция между уровнями пролиферации (Ki67) и активацией ER-стресса (GADD34), независимо от типа метастазов (ФИГ. 1В). Этот анализ подтверждает результаты, полученные на моделях мышей, и то, что GADD34 может помочь идентифицировать UPR^{высокий}/покоящиеся опухолевые клетки в местах метастазирования.

Таблица 5. Образцы метастазов рака молочной железы человека

Пациент	Обозначение	ER статус	PR статус	HER2 статус	Патология	Образец метастаза	Цитокератины	Ki67*	GADD34*
5	14850	-	-	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	H	L
4	14851	+	-	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	L	I
7	14852	-	-	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	H	L
8	14853	-	-	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	H	L
6	14854	+	+	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	I	L
1	14855	+	+	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	L	H
3	14856	+	+	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	L	H
9	14857	+	+	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	H	-
10	14858	-	-	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	I	-
2	14859	+	-	+	Протоковая карцинома	Лимфатический узел	+	L	H
	9876 часть D	+	+	-	Инвазивная низкодифференцированная	Лимфатический узел	+	L	I
	3603 часть B	+	+	-	Протоковая умеренно дифференцированная	Печень	+	H	L
	879 часть C	-	-	-	Не установлено	Печень	+	H	-
	1645 часть F	-	-	+	Протоковая умеренно дифференцированная	Печень	+	L	H
	1415 часть B	+	+	-	Протоковая умеренно	Печень	-	I	I

				дифференцированная				
8852 часть А	N/A	N/A	N/A	Злокачественная филоидная цитосаркома, выраженная псевдосаркома	Грудная стенка	+	L	L
943 часть С	+, слабой	-	-	Аденокарцинома, низкодифференцированная	Легкое	+	L	H

* высокий уровень (H); низкий уровень (L); промежуточный уровень (I)

[0164] Маркеры пролиферации, покоя, сна и ER-стресса, присутствующие в метастатических клетках, оценивали путем проведения анализа экспрессии генов, нацеленных на одну клетку, DCC, микрометастазов и макрометастазов, размещенных в легких мышей MMTV-HER2. Легкие самок MMTV-HER2 обрабатывали в суспензии отдельных клеток и отсортировывали клетки HER2+/CD45- (ФИГ. 2А). Затем отсортированные клетки обрабатывали для разделения отдельных клеток, лизиса, RT и предварительной амплификации с использованием технологии C1 (Fluidigm), как показано на ФИГ. 2А. Этот конвейер позволил с высокой степенью достоверности (IF и молекулярное подтверждение единичных клеток HER2+) выделить и обработать 255 одиночных DCC и 90 первичных опухолевых клеток и их соответствующих пулов. Затем с помощью высокопроизводительной кПЦР проанализировали экспрессию генов ER-стресса, генов клеточного цикла (как активаторов, так и ингибиторов) и генов покоя (Kim et al., «Dormancy Signatures and Metastasis in Estrogen Receptor Positive and Negative Breast Cancer», PloS One 7: e35569 (2012), которая полностью включена в настоящий документ в качестве ссылки; B'chir et al., «The eIF2 α /ATF4 Pathway is Essential for Stress-Induced Autophagy Gene Expression», Nucleic Acids Res. 41: 7683-99 (2013); Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», Nature 540: 588-592 (2016), каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки) (ФИГ. 2В). Экспрессия DCC генов с разрешением до одной клетки выявила существование популяции клеток (ФИГ.1С, группа 1, примерно 19% DTC), которые демонстрируют сопутствующую и сильную повышающую регуляцию всех тестируемых генов ER-стресса (включая сам PERK) (рамка, охватывающая Fam123b-Ddit3) с негативными регуляторами пролиферации клеток, такими как Rb1 и TP53, и ингибиторы CDK p21, p27, p16 и p15 (рамка, охватывающая Cdkn2a-Rb1) (ФИГ. 1С). Обогащение экспрессии генов покоя, таких как NR2F1, DEC2 (Bhlhe41), TWIST1, CDH5, STAT3 и COL4a5, также наблюдалось в этих клетках (Kim et al., «Dormancy Signatures and Metastasis in Estrogen Receptor Positive and Negative Breast Cancer» PloS One 7: e35569 (2012) и Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», Nature 540: 588-592 (2016), каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки) (рамка, охватывающая Nr2f1-Ccnd1). Другая группа DCC, группа 2 (22%), также показала высокие уровни экспрессии генов ER-стресса вместе с

p21. Группа 3 (6%) показала меньше генов ER-стресса, ингибиторов клеточного цикла и генов покоя, предполагая, что они могут представлять клетки, переходящие из состояния покоя или в режиме медленного цикла. В целом, примерно 40% DCC показали высокий или средний уровень экспрессии генов ER-стресса, одновременно с ингибиторами клеточного цикла или генами покоя. Это находится в диапазоне с процентом спящих DCC, обнаруженных у животных MMTV-HER2 с запущенной прогрессией с использованием обнаружения фосфогистона H3 и фосфо-Rb (Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», *Nature* 540: 588-592 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). В целом эти данные показывают, что даже у животных с обнаруживаемыми метастазами ~ 40% DCC демонстрируют высокую экспрессию ингибиторов клеточного цикла. Важно, что в этой модели эта субпопуляция спящих DCC обнаруживает неясный UPR с выраженной активационной экспрессией генов пути PERK.

Пример 3 - Ингибирование PERK уничтожает покоящиеся DCC в костном мозге и легких и, в свою очередь, подавляет метастазы в легких

[0165] Результаты приведенных выше примеров побудили к оценке эффектов селективных ингибиторов PERK на судьбу покоящихся DCC и образование метастазов. LY2, LY3 и LY4 (ингибиторы серии LY) были идентифицированы как сильные и селективные ингибиторы PERK с соответствующими лекарственными свойствами для поддержки исследований *in vivo* (Pytel et al., «PERK Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor: Gene Dose Determines Tumor-Suppressive Versus Tumor Promoting Properties of PERK in Melanoma», *PLoS Genet.* 12: 1-22 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Ингибиторы серии LY были протестированы в анализах киназ *in vitro* (с использованием eIF2 α в качестве субстрата) и клеточных анализах, рассматривающих фосфорилирование eIF2 α и нижележащий по сигнальному пути результат этого ATF4 (Таблица 6). Все три ингибитора показали аналогичную или более высокую эффективность по сравнению с GSK2656157 (Axten et al., «Discovery of GSK2656157: An Optimized PERK Inhibitor Selected for Preclinical Development», *ACS Med. Chem. Lett.* 4: 964-968 (2013), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки); эффективно снижает уровни P-PERK (P-T980) и его нижележащую по сигнальному пути мишень ATF4 в клетках MCF10A, экспрессирующих HER2 (ФИГ. 2С и ФИГ. 3А); и сделали эти же клетки чувствительными к лечению низкими дозами тапсигаргина, тем самым продемонстрировав, как эти ингибиторы PERK избирательно влияют на адаптацию к ER-стрессу (ФИГ. 2D).

[0166] Используя биохимические ферментативные анализы (ФИГ. 2E), LY4 показал наивысшую специфичность, представляя отсутствие вторичных мишеней киназ при концентрации ниже 15 μ M, тогда как LY2, LY3 и GSK2656157 представляли несколько вторичных мишеней ниже μ 5 M и даже при концентрации μ 1 M. Используя профилирование киназ DiscoverX scanMAXTM (Таблица 6), было подтверждено, что LY4 проявляет большую селективность по сравнению с другими ингибиторами, даже при

очень высокой концентрации (20 μM), при которой LY4 ингибирует только 20 киназ более чем на 50% от общего количества 456 по сравнению с 80 по GSK2656157, или 8 по сравнению с 58 при ингибировании > 60%. Ни одна из этих вторичных мишеней не была какой-либо из других известных киназ eIF2 α , EIF2AK1 (также известной как HRI), EIF2AK2 (также известной как PKR) и EIF2AK4 (также известной как GCN2) (Таблица 7), что указывает на то, что измеренная активность eIF2 α была высокоспецифичной в отношении ингибирования PERK.

Таблица 6. Ферментативные и клеточные значения IC₅₀ и селективность киназы различных ингибиторов PERK

Соединение	PERK ^a	PERK ^b	ATF4-luc ^c	GCN2 ^d	# ингибированные киназы > 50% ^e		
	Ферментный IC ₅₀ (μM)	Клеточный IC ₅₀ (μM)	Клеточный IC ₅₀ (μM)	Ферментный IC ₅₀ (μM)	0,2 μM	2 μM	20 μM
LY2	0,002	0,117	0,056	10,8	16	35	138
LY3	0,002	0,026	0,016	16,4	27	85	229
LY4	0,002	0,054	0,048	18,1	19	20	48
GSK2656157 ^f	0,008	0,036	0,021	>200	34	80	183

^aБиохимический анализ PERK с использованием очищенного eIF2 α в качестве субстрата

^bКлеточный анализ индуцированного туникамицином фосфорилирования eIF2 α в клетках 293.

^cКлеточный анализ индуцированной туникамицином активности ATF4-Лус в клетках 293.

^dБиохимический анализ GCN2 с использованием очищенного eIF2 α в качестве субстрата.

^eDiscoverX scanMAX™ профилирование киназ на основе данных связывания с использованием смещения зондов активного сайта, проверено 456 киназ.

^fAtkins et al., «Characterization of a Novel PERK Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity», Cancer Res. 73 (6): 1993-2002 (2013), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Таблица 7. Сравнение ингибирования in vitro других киназ eIF2 α

KINOMEscan Обозначение гена ^a	Entrez Обозначение гена	LY4			GSK-2656157 ^b		
		0,2 μM	2 μM	20 μM	0,2 μM	2 μM	20 μM
EIF2AK1	EIF2AK1	0	0	35	8	77	95
PRKR	EIF2AK2	0	0	0	20	45	67
GCN2(Kin.Dom.2, S808G)	EIF2AK4	0	0	28	7	13	79

^aDiscoverX scanMAX™ профилирование киназ на основе данных связывания с использованием смещения зондов активного сайта, протестировано 456 киназ.

^bAtkins et al., «Characterization of a Novel PERK Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity», Cancer Res. 73 (6): 1993-2002 (2013), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[0167] Одноплодных самок мышей MMTV-HER2 в возрасте 24-32 недель

обрабатывали носителем или LY4 (50 мг/кг) внутривенно ежедневно, в течение двух недель. Молочные железы, легкие, поджелудочная железа, костный мозг и опухоли были собраны для дальнейшего анализа. LY4 хорошо переносился без значительных изменений в массе тела, что согласуется с недавними исследованиями, показывающими отсутствие влияния на уровень глюкозы в крови или функцию поджелудочной железы (Pytel et al., «PERK Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor: Gene Dose Determines Tumor-Suppressive Versus Tumor Promoting Properties of PERK in Melanoma», *PLoS Genet.* 12: 1-22 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Ингибитор не оказывал значительного воздействия на гомеостаз клеток костного мозга или на лейкоциты периферической крови, о чем свидетельствует отсутствие влияния на общее количество клеток у самок MMTV-HER2 (ФИГ. 2F).

[0168] Ингибирование PERK вызывало значительное снижение уровней P-PERK и P-eIF2 α в протоках молочных желез и в ткани поджелудочной железы (хотя только частичное, особенно в островках поджелудочной железы) (ФИГ. 3B). Был сделан вывод, что системная доставка LY4 эффективно ингибирует активацию PERK и фосфорилирование eIF2 α . Ингибирование PERK не полностью истощило активность PERK, что может позволить мышам контролировать свою функцию поджелудочной железы и уровни глюкозы (Yu et al., «Type I Interferons Mediate Pancreatic Toxicities of PERK Inhibition», *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: 15420-15425 (2015), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[0169] У большого процента животных MMTV-HER2 развиваются метастазы в легкие, которые могут быть иницированы на ранней стадии прогрессирования (Guy et al., «Expression of the Neu Protooncogene in the Mammary Epithelium of Transgenic Mice Induces Metastatic Disease», *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10578-10582 (1992); Husemann et al., «Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer», *Cancer Cell* 13:58-68 (2008); Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», *Nature* 540:588-592 (2016), Hosseini et al., «Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer», *Nature* 540:552-558 (2016); Linde et al., «Macrophages Orchestrate Breast Cancer Early Dissemination and Metastasis», *Nat. Commun.* 9:21 (2018), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки).

[0170] Таким образом, влияние ингибитора PERK, LY4 на метастатическое заболевание отслеживали у животных с небольшими и/или пальпируемыми большими опухолями. У всех животных, которым вводили носитель, наблюдались метастазы, обнаруживаемые на срезах, окрашенных H&E. Поражения, которые демонстрировали > 100 клеток, были классифицированы как макрометастазы, поскольку они также обычно являются положительными по маркерам пролиферации (ФИГ. 1A). Количественная оценка макрометастазов на животное (5 непоследовательных срезов легких) показала, что всего после двухнедельной обработки LY4 уменьшал количество и частоту макрометастазов (ФИГ. 3C), не влияя на площадь этих метастазов. (ФИГ. 4A). Это предполагает, что ингибирование PERK может действовать на начальных этапах

метастазирования, а не сокращать установившиеся макрометастазы. Таким образом, затем оценивали, может ли обработка LY4 влиять на проникновение опухолевых клеток из первичного очага в кровотоки или на переход от одиночных DCC к микрометастазу (содержащему 2-100 клеток). Детектирование циркулирующих опухолевых клеток (CTC) HER2+ непосредственно в образцах крови не показало существенной разницы между животными, получавшими носитель и LY4 (ФИГ. 4B), что указывает на то, что LY4 не оказывает сильного влияния на интраваскулярную миграцию опухолевых клеток. С другой стороны, обнаружение микрометастазов и одиночных DCC с использованием обнаружения HER2 посредством ИHC выявило значительное снижение количества микрометастазов у самок, получавших LY4 (ФИГ. 3D). Более 80% одиночных DCC в легких отрицательны по P-Rb, что указывает на то, что они в основном находятся вне цикла и находятся в состоянии покоя. Это измерение воспроизводит измерения из предыдущих исследований (Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», *Nature* 540: 588-592 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Примечательно, что LY4 сильно снижает количество непролиферирующих (P-Rb-отрицательных) одиночных DCC, которые обычно связаны с кровеносными сосудами в срезах легких, не влияя на количество P-Rb-положительных одиночных DCC (ФИГ. 3E) или микрометастазов (ФИГ. 4C). Важно отметить, что LY4 значительно уменьшал количество DCC, обнаруженных в костном мозге (ФИГ. 3F). В этом органе метастазы никогда не развиваются, но DCC обнаруживаются с высокой частотой и находятся в состоянии покоя (Bragado et al., «TGF-Beta2 Dictates Disseminated Tumor Cell Fate in Target Organ Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signaling», *Nat. Cell. Biol.* 15:1351-1361 (2013); Husemann et al., «Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer», *Cancer Cell* 13:58-68 (2008); и Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», *Nature* 540:588-592 (2016), каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Эти результаты доказывают, что ингибирование PERK избирательно нацелено на непролиферативные спящие DCC, которые демонстрируют активную передачу сигналов PERK и UPR.

[0171] Чтобы дополнительно проверить, может ли обработка LY4 избирательно нацеливаться на выживание DCC человека вне цикла, этот биологический процесс был смоделирован в 3D-культурах. Клетки ZR75.1 HER2+ человека, стабильно экспрессирующие фотопереклюаемый флуоресцентный белок (Dendra2), слитый с гистоном H2B, использовали для проведения анализов длительного удержания метки из-за медленного функционального цикла нуклеосом, содержащих H2B, в покоящихся клетках (Wilson et al., «Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch From Dormancy to Self-Renewal During Homeostasis and Repair», *Cell* 135: 1118-1129 (2008), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). После воздействия света 405 нм в течение приблизительно 1 минуты белок H2B-DENDRA2 переключает флуоресценцию с зеленой на красную, становясь дважды положительной для зеленого и красного; клетки, которые возвращаются к зеленому цвету, разделили и разбавили молекулы H2B-

DENDRA2-RED, в то время как покоящиеся клетки остались ЗЕЛЕНЫМИ и КРАСНЫМИ H2B-DENDRA2 (Gurskaya et al., «Engineering of a Monomeric Green-to-Red Photoactivatable Fluorescent Protein Induced by Blue Light», *Nat. Biotechnol.* 24: 461-465 (2006), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Клетки, засеянные в матрицу 3D Matrigel с высокой плотностью (кластеры) для имитации макрометастазов или с низкой плотностью (отдельные клетки) для имитации одиночных DCC, были фотопреобразованы (100%) (ФИГ. 4D). Через восемь дней только 35% клеток с высокой плотностью были положительными по H2B-DENDRA2-RED. Напротив, 65% клеток ZR75.1 HER2+ низкой плотности были H2B-DENDRA2-RED-положительными (ФИГ. 4E), имитируя состояние покоя одиночных DCC (Bragado et al., «TGF-Beta2 Dictates Disseminated Tumour Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signalling», *Nat. Cell. Biol.* 15: 1351-1361 (2013), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Обработка ингибитором PERK LY4 не оказала значительного влияния на жизнеспособность ZR75.1 HER2+, засеянных с высокой плотностью (ФИГ. 4F). Однако она уничтожила покоящиеся одиночные клетки ZR75.1 HER2+, параллельно с результатами DCC *in vivo* (ФИГ. 3G). Эти данные указывают на то, что внутренние и/или зависимые от ECM сигналы в контексте одиночных опухолевых клеток вызывают зависимость от передачи сигналов PERK и что LY4 действительно избирательно нацелен на медленные циклические или непролиферативные DCC, которые впоследствии реактивируются с образованием метастазов.

Пример 4 - Ингибирование PERK блокирует обусловленное HER2 раннее и позднее прогрессирование опухоли молочной железы

[0172] Продемонстрировав, что существует зависимость от PERK в покоящихся UPR^{высокий} DCC, где состояние покоя наиболее важно, затем оценивали опухолевые поражения. Было обнаружено, что прогрессирование, обусловленное HER2, генетически зависит от киназы PERK в модели MMTV-HER2 (Bobrovnikova-Marjon et al., «PERK-Dependent Regulation of Lipogenesis During Mouse Mammary Gland Development and Adipocyte Differentiation», *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 16314-16319 (2008), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), и было показано, что опухоли HER2+ чувствительны к протеотоксичности и зависят от ERAD (Singh et al., «HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive», *Sci. Signal.* 8: ra52 (2015), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Кроме того, анализ базы данных cBIO (Cerami et al., «The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data», *Cancer Discovery* 2: 401-404 (2012), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки) показал, что ~ 14% опухолей молочной железы человека с амплифицированным HER2, демонстрируют повышенную регуляцию мРНК для PERK (ФИГ. 5A). Таким образом, было исследовано, влияет ли LY4 на индуцированное HER2 прогрессирование опухоли молочной железы в первичных очагах поражения, где можно выделить различные стадии прогрессирования от гиперпластических молочных желез

через DCIS и инвазивного рака (Lu et al., «Mechanism of Inhibition of MMTV-neu and MMTV-wnt1 Induced Mammary Oncogenesis by RARalpha agonist AM580», *Oncogene* 29 (25): 3665-76 (2010); Muller et al., «Single-Step Induction of Mammary Adenocarcinoma in Transgenic Mice Bearing the Activated c-neu Oncogene», *Cell* 54(1):105-115 (1988); Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», *Nature* 540:588-592 (2016); Hosseini et al., «Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer», *Nature* 540:552-558 (2016), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки).

[0173] Анализ молочных желез 24-недельных одноплодных самок показал, что у животных, получавших носитель MMTV-HER2, наблюдались протоки со вторичным и третичным плотным ветвлением (ФИГ. 6А, левые панели), а гистологический анализ показал частые гиперпластические поражения молочных желез (ФИГ. 6А, правые панели, черные стрелки). Напротив, животные, получавшие LY4, демонстрировали «нормализованную» архитектуру желез с менее плотным ветвлением, напоминающую грудное дерево нетрансгенных нормальных мышей FVB (ФИГ. 3В). Обработанные LY4 животные также показали резкое увеличение количества протоков молочной железы с полым просветом, составляющих более 60% структур по сравнению с примерно 20% у контрольных самок (ФИГ. 6В и фиг. 5С). Количество окклюзированных гиперплазий и поражений, подобных DCIS, также сократилось до менее чем половины от числа у животных, получавших носитель. Гиперпластические поражения у контрольных животных с HER2+ демонстрировали различную степень дифференцировки просвета, что оценивалось по неравномерным уровням экспрессии цитокератина 8/18 (ФИГ. 6С, верхняя панель). Миоэпителиальные клетки (определяемые как гладкомышечный актин, SMA, положительный), в остальном равномерно распределенные в протоках нормального животного FVB, были неравномерно распределены в обработанных носителем гиперплазиях мышей MMTV-HER2. Напротив, животные MMTV-HER2, обработанные LY4, показали повышенную экспрессию цитокератина 8/18 в просветном слое, часто окружающем пустой просвет, и во внешнем непрерывном слое миоэпителиальных клеток (ФИГ. 6С, нижняя панель и график). Эти данные показывают, что обработка LY4 приводит к «нормализации» ранних опухолевых поражений посредством механизма, который, по-видимому, восстанавливает программы дифференцировки.

[0174] Животных обрабатывали LY4, как только у них появлялись опухоли, объемом от 30 до 200 мм³ (две опухоли имели размер > 200 мм³) в течение двух недель (ФИГ. 7А). В группе, получавшей носитель, опухоли стабильно росли (ФИГ. 8А), достигая в 10 раз своего первоначального объема за две недели (ФИГ. 7В, верхний график). Напротив, опухоли, обработанные LY4, демонстрировали пониженную скорость роста (ФИГ. 8А), при этом некоторые опухоли оставались в полном цитостазе (определяемом как удвоение объема опухоли только один раз за 2-недельный период, 43% для LY4-обработанных против 7% для контролей) (ФИГ. 7В, нижний график) и некоторые опухоли (25%) демонстрировали регресс при обработке в течение 2-недельного окна

(ФИГ. 7С). Это привело к значительному уменьшению среднего конечного объема опухоли (ФИГ. 8В). В то время как уровни пролиферации (Р-гистон H3 ИНС) не различались между опухолями, обработанными носителем и LY4 (ФИГ. 7D), окрашивание срезов опухоли с помощью TUNEL показало значительное увеличение уровней фрагментации ДНК, присутствующих у животных, обработанных LY4. (ФИГ. 8С). Таким образом, при первичных поражениях обработка LY4 индуцировала апоптоз сформировавшихся опухолей HER2+, что свидетельствует о контекстно-зависимых функциях PERK, способствующих приспособленности во время прогрессирования.

[0175] Обработка LY4 человеческих опухолевых клеток со сверхэкспрессией HER2 (MCF10A-HER2 или ZR75.1) или HER2-амплифицированных (SKBR3) (ФИГ. 8D и ФИГ. 7E) 3D культур ацинусов в Matrigel показала, что 10-дневная обработка носителем или LY4 (2 мкМ) значительно увеличивали уровни апоптоза (расщепленная каспаза-3) в этих органоидах, особенно во внутренней клеточной массе, которая лишена контакта с ЕСМ (ФИГ. 8D). Как и *in vivo*, значительного изменения уровней пролиферации, определяемого по уровням фосфогистона H3, не наблюдалось (ФИГ. 7F). Был сделан вывод, что ранние поражения MMTV-HER2+ требуют PERK для вызванных HER2 изменений в организации эпителия протоков. В опухолевых клетках человека HER2+ и опухолях мышей HER2 зависит от PERK для выживания.

Пример 5 - Передача сигналов PERK необходима для оптимального фосфорилирования, локализации HER2 и активации АКТ и ERK

[0176] Поскольку опухоли HER2+ чувствительны к протеотоксичности (Singh et al., «HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive», *Sci. Signal.* 8: ra52 (2015), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), оценивали, могут ли ингибиторы PERK влиять на оптимальную активность HER2 из-за увеличения нагрузки белка-клиента ER. Обнаружение фосфорилирования HER2 по остаткам Y1221/1222 в опухолях показало, что область, положительная для P-HER2, указанная другими (DiGiovanna et al., «Active Signaling by Neu in Transgenic Mice», *Oncogen* 17: 1877-1884 (1998), что включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) перекрывается с окрашиванием на P-PERK и P-eIF2 α (ФИГ. 9А). Это открытие указывает на то, что активация путей PERK и HER2 ко-локализована. Точно так же профили экспрессии генов, нацеленных на одну клетку, первичных опухолевых клеток также показали популяцию первичных опухолевых клеток (около 25%) с высокими уровнями экспрессии генов ER-стресса (ФИГ.9В), которые могут соответствовать тем, которые демонстрируют активацию P-HER2. Важно отметить, что при оценке уровней P-HER2 в опухолях с учетом площади и интенсивности окрашивания (ФИГ. 10А) было обнаружено, что опухоли, обработанные LY4, показали значительно более низкие уровни P-HER2, чем контрольные животные. (ФИГ. 9С). HER2 передает сигналы как гомодимер или гетеродимер с помощью EGFR и HER3 (Moasser MM, «The Oncogene HER2: Its Signaling and Transforming Functions and its Role in Human Cancer Pathogenesis», *Oncogene* 26(45):6469-87 (2007) and Negro et al., «Essential Roles of

KINOMEscan Обозначение гена	Entrez Обозначение гена	LY4			GSK-2656157		
		0,2 μ M	2 μ M	20 μ M	0,2 μ M	2 μ M	20 μ M
AKT1	AKT1	0	5	0	14	32	0
AKT2	AKT2	0	0	0	0	4	8
AKT3	AKT3	0	0	13	24	3	0
EGFR	EGFR	30	23	16	18	16	50
ERBB2	ERBB2	0	0	0	57	64	97
ERBB3	ERBB3	0	0	0	40	22	53
ERBB4	ERBB4	0	0	4	0	0	0
ERK1	MAPK3	2	18	0	0	17	0
ERK2	MAPK1	0	0	1	0	0	0
ERK3	MAPK6	0	32	3	0	16	0
ERK4	MAPK4	0	0	0	0	35	0
ERK5	MAPK7	0	0	4	4	23	12
ERK8	MAPK15	0	0	0	0	3	6
S6K1	RPS6KB1	31	0	24	0	30	56
SRC	SRC	0	1	11	10	45	69
SYK	SYK	0	0	0	0	12	23
CSK	CSK	31	0	14	0	33	64
PIK3CA	PIK3CA	9	0	8	0	8	0
PIK3CB	PIK3CB	0	0	12	0	0	0
PIK3CG	PIK3CG	24	0	26	36	47	50
PIK3C2B	PIK3C2B	40	39	94	0	9	22
PYK2	PTK2B	0	0	6	0	0	3

¹DiscoverX scanMAX™ профилирование киназ на основе данных связывания с использованием смещения зондов активного сайта, протестировано 456 киназ.

Пример 6 - Последовательная комбинация ингибитора CDK с последующим ингибированием PERK усиливает антиметастатический эффект LY4

[0177] Было установлено влияние фармакологического ингибирования PERK на первичные поражения, и, что наиболее важно, также было установлено, что LY4 может ингибировать метастазирование за счет уничтожения спящих DCC. С помощью этой информации было оценено, можно ли использовать клинически доступные препараты, имитирующие состояние покоя, для придания опухолевым клеткам с индуцированным покоем повышения UPR и чувствительности к LY4. Это обоснование подтверждается

открытием, что UPR^{высокий} DCC с экспрессируют более высокие уровни ингибиторов CDK (ФИГ. 1С). Таким образом, затем был задан вопрос, будет ли увеличение пула покоящихся DCC выше базальных 50% посредством предварительной обработки животных ингибитором CDK4/6, Абемациклибом (50 мг/кг, 4 недели) (ФИГ. 11А), будет ли дополнительно усиливаться анти-метастатический эффект LY4. Действительно, предварительная обработка самок MMTV-HER2 одним абемациклибом приводила к поразительному увеличению количества клеток GADD34⁺ в срезах первичной опухоли (ФИГ. 11В), которые в остальном показывают очень низкие и локализованные уровни окрашивания GADD34 (контроль). Измерения в первичных опухолях служили суррогатным биомаркером UPR, связанного с покоем, вызванного Абемациклибом. Как и ожидалось, обработка LY4 устраняла экспрессию GADD34 в первичной опухоли обработанных животных (ФИГ. 11В). Последовательная обработка мышей Абемациклибом (фаза индукции, подобная покою) с последующим LY4 (фаза уничтожения покоящихся DCC) приводила к такому же снижению нагрузки макрометастазов, которое наблюдалось при однократном введении LY4 (ФИГ. 11С). Однако комбинация почти полностью устранила присутствие микрометастазов (ФИГ. 11D) и, как видно на примере одного агента, значительно уменьшила количество покоящихся одиночных диссеминированных опухолевых клеток (ФИГ. 11Е). Вместе эти результаты подтверждают рациональность последовательной комбинации цитостатического агента, такого как ингибитор CDK, с последующим LY4 в качестве многообещающей терапевтической стратегии для предотвращения метастазирования путем воздействия на покоящиеся DCC, которые реактивируют и засевают эти поражения.

Пример 7 - Обсуждение примеров 2-6

[0178] Многочисленные исследования на моделях рака молочной железы HER2⁺ привели к выводу, что онкогенез рака молочной железы HER2⁺ зависит от передачи сигналов PERK для выживания и адаптации (Bobrovnikova-Marjon et al., «PERK Promotes Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth by Limiting Oxidative DNA Damage», *Oncogene* 29(27):3881-95 (2010); Singh et al., «HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive», *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015); Avivar-Valderas et al., «PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment», *Mol. Cell. Biol.* 31:3616-3629 (2011); и Avivar-Valderas et al., «Regulation of Autophagy During ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK», *Oncogene* 32(41):4932-40 (2013), каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Интересно то, что было также обнаружено, что покоящиеся опухолевые клетки, которые существуют на периферии хирургического вмешательства, а также как спящие диссеминированные опухолевые клетки в органах-мишенях (Bragado et al., «TGF-Beta2 Dictates Disseminated Tumour Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signalling», *Nat. Cell. Biol.* 15:1351-1361 (2013); Chéry et al., «Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways»,

Oncotarget 5(20):9939-51 (2014); Sosa et al., «Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field», *Nat. Rev. Cancer* 14:611-622 (2014); и Sosa et al., «NR2F1 Controls Tumour Cell Dormancy Via SOX9- and RARbeta-Driven Quiescence Programmes», *Nat. Commun.* 6: 6170 (2015), каждая из которых настоящим включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), активировали передачу сигналов PERK для выживания наряду с другими путями ER-стресса (Adomako et al., «Identification of Markers that Functionally Define a Quiescent Multiple Myeloma Cell Sub-Population Surviving Bortezomib Treatment», *BMC Cancer* 15:444 (2015); Ranganathan et al., «Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival», *Cancer Res.* 68:3260-3268 (2008); Ranganathan et al., «Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells», *Cancer Res.* 66:1702-1711 (2006); Schewe et al., «ATF6alpha-Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells In Vivo», *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10519-10524(2008); Schewe et al., «Inhibition of eIF2alpha Dephosphorylation Maximizes Bortezomib Efficiency and Eliminates Quiescent Multiple Myeloma Cells Surviving Proteasome Inhibitor Therapy», *Cancer Res.* 69:1545-1552 (2009); и Chéry et al., «Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways», *Oncotarget* 5(20):9939-51 (2014), каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Недавно Pommier et al., «Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases», *Science* 360 (6394): eaao4908 (2018) (которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки) подтвердили эту работу, показав, что панкреатические DCC, находящиеся в печени (и других моделях), активируют UPR во время покоя. Такой уровень воспроизводимости для различных видов рака и моделей предполагает высокий уровень биологической значимости для этого биологического процесса.

[0179] Приведенные в настоящем описании примеры демонстрируют, что ингибитор PERK LY4 может избирательно воздействовать на зависимость HER2 в DCC и в первичных поражениях. Важным открытием для обсуждения является ингибирующий эффект LY4 на метастазирование. В модели MMTV-HER2, как и у пациентов, метастазы могут быть асинхронными с первичной опухолью и иногда развиваться даже при скрытых первичных поражениях, причем некоторые метастазы возникают раньше, чем явное обнаружение опухоли (Husemann et al., «Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer», *Cancer Cell* 13: 58-68 (2008); Pavlidis et al., «Cancer of Unknown Primary (CUP)», *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 54:243-250 (2005); Harper et al., «Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer», *Nature* 540:588-592 (2016); and Hosseini et al., «Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer», *Nature* 540:552-558 (2016), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки). Обработка LY4 уменьшала все метастазы, как появившиеся раньше (до того, как явные опухоли стали очевидными), так и те метастазы, которые совпадали с явным ростом

первичной опухоли (ФИГ. 8). Это важно, поскольку доказывает, что эффект на метастазирование был вызван не только уменьшением первичной опухолевой нагрузки, вызванной LY4. Удивительно, но метастатическая нагрузка была уменьшена при обработке LY4 за счет устранения непролиферативных одиночных или небольших кластеров P-Rb-отрицательных DCC. Визуализация и мультиплексная кПЦР одиночных клеток показали, что эти DCC чаще демонстрируют положительную регуляцию GADD34 (белка) и большого набора генов ER-стресса, включая сам PERK, а также демонстрируют покоящийся фенотип, выявленный при положительной регуляции нескольких негативных регуляторов пролиферации клеток. Следует принимать во внимание, что часть программы ER-стресса, индуцированной PERK, влечет за собой регуляцию транскрипции, а другая часть - это предпочтительная трансляция вышестоящих в пути сигнальной трансдукции ORF-содержащих генов, таких как ATF4 и GADD34 (Young et al., «Upstream Open Reading Frames Differencing Regulate Gene Specific Translation in the Integrated Stress Response», *J. Biol. Chem.* 291: 16927-16935 (2016), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Аналогичным образом, UPR-индуцированный арест G1, как было показано, вызывается ингибированием трансляции циклина D1 (Brewer et al., «Mammalian Unfolded Protein Response Inhibits Cyclin D1 Translation and Cell-Cycle Progression», *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8505-8510 (1999), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Эксперименты по трехмерному органогенезу с использованием линий опухолевых клеток человека HER2+ подтвердили избирательное уничтожение LY4 покоящихся единичных опухолевых клеток. Эти данные утверждают, что покоящиеся DCC с большей вероятностью полагаются на передачу сигналов PERK для выживания. Точно так же субпопуляция метастатических клеток человека от пациентов с раком молочной железы также показала отрицательную корреляцию между GADD34 и Ki67, подтверждая связь, обнаруженную у мышей. Эти данные предполагают, что наряду с NR2F1 (Borgen et al., «NR2F1 Stratifies Dormant Disseminated Tumor Cells in Breast Cancer Patients», *Breast Cancer Research* 20: 120 (2018), который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки), GADD34 отдельно или в комбинации с NR2F1 может служить надежным набором биомаркеров для покоящихся/UPR^{высокий} DCC и, таким образом, определять выбор пациента для лечения.

[0180] Обнаружение мишени и лекарства, которое может искоренить спящие DCC, очень важно, поскольку известно, что спящие DCC уклоняются от антипролиферативной терапии с помощью активных и пассивных механизмов (Aguirre-Ghiso et al., «Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer», *Nat. Med.* 19:276-277 (2013); Naumov et al., «Ineffectiveness of Doxorubicin Treatment on Solitary Dormant Mammary Carcinoma Cells or Late-Developing Metastases», *Breast Cancer Res. Обращаться.* 82(3):199-206 (2003); Oshimori et al., «TGF-Beta Promotes Heterogeneity and Drug Resistance in Squamous Cell Carcinoma», *Cell* 160:963-976 (2015); и Fluegen et al., «Phenotypic Heterogeneity of Disseminated Tumour Cells is Preset by Primary Tumour Hypoxic Microenvironments», *Nat. Cell Biol.* 19 (2): 120-132 (2017), каждая из которых полностью включена в настоящее

описание в качестве ссылки). Уничтожение DCC в костном мозге, где эти клетки также обычно находятся в спящем состоянии (Bragado et al., «TGF-Beta2 Dictates Disseminated Tumour Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signalling», *Nat. Cell. Biol.* 15:1351-1361 (2013); Chéry et al., «Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways», *Oncotarget* 5(20):9939-51 (2014); Ghajar et al., «The Perivascular Niche Regulates Breast Tumour Dormancy», *Nat. Cell Biol.* 15: 807-817 (2013); и Husemann et al., «Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer», *Cancer Cell* 13: 58-68 (2008), которые полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки), дополнительно усиливает понятие ингибирования PERK как терапии против покоящихся DCC (Aguirre-Ghiso et al., «Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer», *Nat. Med.* 19: 276-277 (2013), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), который может быть использован в качестве адъюванта для устранения покоящегося минимального остаточного заболевания (Aguirre-Ghiso et al., «Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer», *Nat. Med.* 19: 276-277 (2013), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[0181] Точные механизмы, с помощью которых ингибирование киназы PERK блокирует рост опухоли, неясны. Возможно, механизм заключается в сниженной адаптации к стрессу, вызванному протеотоксичностью (Singh et al., «HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive», *Sci. Signal.* 8: ra52 (2015), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). Результаты, описанные в настоящем документе, демонстрируют, что LY4 снижает уровни фосфо-HER2 *in vivo*, а LY4 снижает количество активного рецептора в мембране за счет усиления эндоцитоза. Изменений в деградации белка HER2 не наблюдалось. Что касается того, как именно PERK контролирует локализацию мембраны HER2 или эндоцитоз, возможно, что интернализация рецептора позволяет лучше или быстрее дефосфорилировать рецептор или снижает шансы рецептора на активацию, что, следовательно, приводит к снижению активации нижележащих путей сигнальной трансдукции. Было показано, что эндоцитоз рецепторов может снижать сигнальный выход многих рецепторов, локализованных на плазматической мембране, путем физического снижения концентрации рецепторов на клеточной поверхности (Sorkin and Zastrow, «Endocytosis and Signaling: Intertwining Molecular Networks», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10: 609-22 (2009), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

[0182] Приведенные в настоящем описании результаты дополнительно демонстрируют, что в ранних поражениях LY4 индуцировал фенотип дифференцировки. Однако в развитых опухолях LY4 подталкивал опухоли к стазу или регрессии как единственный агент. Это свидетельствует о том, что на ранних этапах нарушение регуляции передачи сигналов PERK при ранних поражениях HER2+ больше связано с потерей программ дифференцировки, но механизмы еще предстоит определить. Затем, когда биологическое состояние опухоли меняется, которая становится

высокопролиферативной, зависимость от PERK для этих опухолей HER2+ все еще очень высока. Это может быть связано с тем, как функции HER2 меняются во время прогрессирования; на ранних стадиях он в основном дерегулирует программу морфогенеза, что приводит к устойчивости и распространению аноксиза, тогда как позже он в основном участвует в программах пролиферации и выживания.

[0183] Описанные в настоящем документе результаты также указывают на ценность комбинации стандартной антипролиферативной терапии с LY4, которая устраняет оставшиеся покоящиеся клетки. Такой подход был протестирован с использованием комбинации ингибитора CDK4/6 Абемациклиба с последующим LY4, которая показала улучшенный антиметастатический эффект. Обнадеживает то, что используемые дозы LY4 не оказали значительного влияния на уровни глюкозы, костный мозг или количество клеток периферической крови, поведение мышей, не страдающих опухолями или раком, и пищевое поведение. Это свидетельствует о том, что используемые дозы, сильно блокируя рост опухоли и метастазирование за счет уничтожения спящих DCC, не влияли на нормальную функцию органа хозяина. Поскольку также было обнаружено, что спящие/UPR^{высокий} DCC подавляют экспрессию МНС-I на поверхности (Pommier et al., «Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Metastases», *Science* 360 (6394): eaao4908 (2018) (которая настоящим включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), LY4 может также способствовать нацеливанию адаптивного иммунного ответа на DCC и, возможно, также на развившиеся опухоли. Текущая работа рассматривает такую возможность. Описанные в настоящем документе результаты открывают дверь к терапии выживания против спящих DCC как нового способа нацеливания на метастатическое заболевание. Это позволит нацеливание на полную фенотипическую гетерогенность диссеминированного заболевания, которое может включать пролиферативные, медленные и спящие DCC (Aguirre-Ghiso et al., «Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer», *Nat. Med.* 19: 276-277 (2013), которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Пример 8 - Комбинация ингибитора CDK4/6 абемациклиба и ингибитора PERK LY4 в клеточной линии меланомы

[0184] Поскольку было показано, что ингибиторы CDK4/6 вызывают арест клеточного цикла, а LY4 индуцирует гибель клеток в DTC, остановленных в бездействующем клеточном цикле (ФИГ. 12A), затем было исследовано, будет ли комбинация ингибитора CDK4/6 и LY4 снижать жизнеспособность клеток в клеточной линии *in vitro*. Было показано, что ингибитор CDK 4/6 Абемациклиб подавляет рост клеток меланомы WM35 как в 2D, так и в 3D культурах клеток *in vitro*. Кратковременная обработка *in vitro* (48 часов) 2 мкМ LY4 после 1 недели предварительной обработки 50 нМ Абемациклибом (2D) снижает жизнеспособность Braf-мутантных меланомных клеток WM35 по сравнению с обработкой клеток только 2 мкМ LY4 (ФИГ. 12B). В 3D-культурах *in vitro* добавление 2 мкМ LY4 после предварительной обработки Абемациклибом в

течение 1 недели имело аддитивный эффект на снижение жизнеспособности клеток (ФИГ. 12С). Результаты, показанные на ФИГ. 12С предполагают, что предварительная обработка абемациклибом может вызывать арест роста и некоторую гибель клеток в трехмерной культуре клеток. Затем добавление LY4, по-видимому, усиливает этот эффект на гибель клеток. Это согласуется с представлением о том, что клетки, арестованные с помощью Абемациклиба, могут активировать стрессовую реакцию ER, как показано положительной регуляцией GADD34 (ФИГ. 12G), а затем становиться чувствительными к LY4.

[0185] В клетках меланомы фенотип устойчивости к Абемациклибу возникает после 4-5 недель непрерывной обработки. Совместная обработка клеток LY4 и Абемациклибом снижает количество жизнеспособных клеток, устойчивых к Абемациклибу, в культуре 2D-клеток, но не демонстрирует ожидаемого увеличения при проведении этих экспериментов в 2D-культурах. Однако в клетках, устойчивых к Абемациклибу, LY4 оказывает аддитивный эффект на снижение жизнеспособности в 3D-культуре клеток после постоянной обработки Абемациклибом (ФИГ. 12D-12E). Эти данные свидетельствуют о том, что для выживания клетки, устойчивые к ингибитору CDK4/6 меланомы, остаются зависимыми от стрессового ответа ER, опосредованного PERK. В 3D-культурах *in vitro* добавление LY4 после 5-недельной предварительной обработки Абемациклибом имело аддитивный эффект на снижение жизнеспособности клеток (ФИГ. 12F), как измерено по апоптозу клеток, которые поглощают DAPI. Хотя устойчивые клетки растут так же, как контрольные клетки в 2D-культурах, предварительная обработка Абемациклибом, по-видимому, вызывает клеточную смерть в 3D-культуре (ФИГ. 12F).

Пример 9 - BMP7-F9 индуцирует и поддерживает состояние покоя DTC (HNSCC)

[0186] BMP7-F9 снижает соотношение активности ERK/p38 и индуцирует различные мРНК в сигнатуре покоя (ФИГ. 13A-13C). ФИГ. 13A показывает, что обработка BMP7-F9 при 2 нг/мл, 5 нг/мл и 10 нг/мл (вторая, третья и четвертая серые полосы, соответственно; контроль - первая черная полоса) снижает соотношение активности ERK/p38 по сравнению с контролем, как определено вестерн-блоттингом в клетках HEp3 HNSCC. Влияние на соотношение активности ERK/p38 наблюдается через 2-6 и 24 часа (вторая-четвертая группа столбцов). В первые 30 минут активность ERK стимулируется BMP7 (первый набор столбцов). ФИГ. 13B показывает, что обработка BMP7-F9 индуцирует мРНК DEC2, p53 и p27 (10 нг/мл BMP7-F9, 24 часа), которые кодируют гены сигнатуры покоя. На ФИГ. 13C показано, что обработка тех же клеток BMP7-F9 индуцирует накопление в ядре NR2F1, фактора транскрипции, мощного индуктора покоя, как определено с помощью иммунофлуоресценции (10 нг/мл, 24 часа). Различия на ФИГ. 13A и ФИГ. 13B, $p < 0,05$, рассчитанное с использованием t-критерия Стьюдента.

[0187] *In vitro* и *in vivo* BMP7-F9 вызывает арест роста клеток T-HEp3 (ФИГ. 14A-14E). На ФИГ. 14A показано, что обработка BMP7-F9 клеток T-HEp3 ингибирует их пролиферацию *in vitro* в течение 48 часов, как определено анализом титра клеток трипановым синим (RFU, относительные единицы флуоресценции). ФИГ. 14B

представляет собой схематическую иллюстрацию экспериментальной процедуры *in vivo*, использованной на ФИГ. 14С-14D. Клетки Т-Нер3 предварительно обрабатывали в течение 24 часов ВМР7-F9 *in vitro*, а затем инокулировали на хориоаллантоисных мембранах куриных эмбрионов (САМ) (ФИГ. 14С), где их ежедневно обрабатывали *in vivo* носителем или ВМР7-F9 (50 нг/ мл) перед сбором опухолей и количественным определением количества клеток Нер3 HNSCC/опухоль (ФИГ. 14D) и уровней Р-НЗ (ФИГ. 14Е).

[0188] Мышей NSG обрабатывали в соответствии с протоколом, показанным на ФИГ. 15А на 3 и 6 недель. В эти временные точки оценивали процент локальных рецидивов и количество случаев DTC. Табулированные результаты, соответствующие ФИГ. 15В показывают, что ВМР7 ограничивает частоту местных рецидивов (Таблица 9), а встречаемость DTC в легких (Таблица 10) после хирургического вмешательства, показана ниже (Таблица 11).

Таблица 9. Влияние ВМР7-F9 в адьювантных условиях на локальные рецидивы в хирургических краях

Обработка (обработка только адьювантом)		n	+локальный рецидив	Число случаев локального рецидива (%)
3 недели	контроль	11	4	36,4
	ВМР7	11	1	9,1
6 недель	контроль	8	2	25
	ВМР7	7	0	0

Таблица 10. Влияние ВМР7-F9 на встречаемость DCC в легких

Обработка (обработка только адьювантом)		n	+DCC в легких	Количество случаев DCC (%)
3 недели	контроль	11	9	81,8
	ВМР7	10	5	50,0
6 недель	Контроль	8	6	75,0
	ВМР7	7	3	42,9

Таблица 11. Среднее количество опухолевых клеток GFP +/виментина +/-легкое в тех же экспериментах, показанных на ФИГ. 15А-15В и в Таблицах 9 и 10

Обработка (обработка только адьювантом)		n	Медианное количество GFP ⁺ /Виментин ⁺ опухолевые клетки/легкое	диапазон	p величина
3 недели	контроль	11	2,2E+04	0-1,14E+0,6	0,2294
	ВМР7	10	0,62E+04	0-333333	
6 недель	контроль	8	25,2E+04	0-1,05E+06	0,2859
	ВМР7	7	0	0-6,8E+06	

[0189] Опухоли Нер3-GFP HNSCC выращивали до тех пор, пока они не стали

примерно 300 мм³, а затем обрабатывали в условиях нео-адьюванта 50 мкг/кг BMP7-F9 до тех пор, пока опухоли не стали примерно 600 мм³. Затем опухоли удаляли хирургическим путем. Через 1-2 дня после операции адьювантная обработка с BMP7-F9 продолжалась еще 4 недели. Затем животных умерщвляли, и нагрузку DCC в легких оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. BMP7 ограничивал развитие местных и отдаленных рецидивов после хирургической резекции опухоли. Мышей NSG обрабатывали в соответствии с протоколом, показанным на ФИГ. 15А на 3 и 6 недель. В эти временные точки оценивали процент местного рецидива и встречаемость DCC. После обработки подсчитывали количество GFP-положительных клеток в диссоциированных легких. Это показатель нагрузки DCC в легких, которая значительно снижается при обработке BMP7-F9. Обратите внимание, что медиана нагрузки DCC снижается на один log и что BMP-7, очевидно, излечивает от DCC 3 из 7 животных.

[0190] Влияние BMP7-F9 в схеме неоадьювант+адьювант на локальные рецидивы на краях хирургического вмешательства (Таблица 12) и встречаемость DCC в легких (Таблица 13) показано ниже. Результаты сведены в таблицу на основе результатов на ФИГ. 15С, где мышей обрабатывали, как на ФИГ. 15А, за исключением того, что адьювантная обработка продолжалась 4 недели. После обработки подсчитывали количество GFP-положительных клеток в диссоциированных легких. Результаты показывают, что BMP7 ограничивает встречаемость местных рецидивов (Таблица 12) и встречаемость DCC в легких (Таблица 13) после хирургического вмешательства с неоадьювантной и адьювантной терапией. В Таблице 14 показан показатель нагрузки DCC в легких, которая значительно снижается обработкой BMP7-F9. Обратите внимание, что медиана нагрузки DCC снижается на один log и что BMP-7, очевидно, излечивает от DCC 3 из 7 животных.

Таблица 12. Влияние BMP7-F9 в режиме «Неоадьювант+адьювант» на местные рецидивы на краях хирургического вмешательства

Обработка (обработка нео- адьювантом и адьювантом)		n	+локальный рецидив	%
4 недели	Контроль	8	5	62,5
	BMP7	7	3	42,9

Таблица 13. Встречаемость DCC в легких

Обработка (обработка нео- адьювантом и адьювантом)		n	+DCC в легких	%
4 недели	Контроль	8	8	100
	BMP7	7	4	57,1

Таблица 14. Среднее количество GFP +/-виментин+опухолевых клеток/ легкое мышей, представленное в Таблицах 12 и 13.

Обработка (обработка нео- адьювантом и адьювантом)		n	Медианное количество GFP⁺/Виментин⁺ опухолевые клетки/легкое	диапазон	p величина
4 недели	контроль	8	5,4E+04	0,02-3,2E+05	0,046
	ВМР7	7	0,02E+04	0-2,4E+04	

[0191] Хотя предпочтительные варианты осуществления были изображены и подробно описаны в настоящем документе, специалистам в соответствующей области техники будет очевидно, что различные модификации, дополнения, замены и т. п. могут быть выполнены без отхода от сущности изобретения, и поэтому они считаются находиться в пределах объема изобретения, определенного в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения минимального остаточного рака у пациента, включающий:
контактирование диссеминированных опухолевых клеток (DCC) у пациента с белком, производным костного морфогенетического белка 7 («BMP7»), где указанное контактирование вызывает или поддерживает состояние покоя в контактирующих DTC пациента для лечения минимального остаточного рака у пациента.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что у пациента диагностирован рак груди, множественная миелома, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак мозга, рак шейки матки, мантийноклеточная лимфома, лейкоз, гепатоцеллюлярная карцинома, рак предстательной железы, меланома, рак кожи, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, глиобластома, нейробластома или колоректальный рак.
3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы, выбранный из инвазивного рака молочной железы, протоковой карциномы *in situ* (DCIS), лобулярной карциномы *in situ* (LCIS) и воспалительного рака молочной железы.
4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что рак молочной железы представляет собой HER2+ рак молочной железы.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что у пациента диагностированы диссеминированные опухолевые клетки и/или неметастатический рак.
6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что производным BMP7 является BMP7-F9.
7. Способ по любому из пп. 1-6, дополнительно включающий:
введение пациенту химиотерапевтического агента, иммунотерапевтического агента, эпигенетического агента или ионизирующего излучения.
8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что пациенту вводят химиотерапевтический агент, и где химиотерапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент против HER2, выбранный из трастузумаба (Герцептин®) и лапатиниба (Тикерб®).
9. Способ по п. 7, отличающийся тем, что пациенту вводят химиотерапевтический агент, и где химиотерапевтический агент выбран из антрациклина, таксана, ингибитора киназы, антитела, фторпиримидина и лекарственного средства на основе платины.
10. Способ по п. 7, отличающийся тем, что пациенту вводят иммунотерапевтический агент, и где иммунотерапевтический агент выбран из ингибитора иммунных контрольных точек, интерферона или противоопухолевой вакцины.
11. Способ по п. 7, отличающийся тем, что пациенту вводят эпигенетический агент, и где эпигенетический агент выбирают из ингибитора гистондеацетилазы (HDAC), 5-азациитидина, ретиноевой кислоты, триоксида мышьяка, ингибитора субъединицы «энхансер Zeste 2» (EZH2) репрессивного комплекса 2 Polycomb, ингибитора бромодомена (BRD) и их производных.
12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанное контактирование осуществляют путем введения пациенту белка, производного BMP7.
13. Способ по любому из пп. 1-12, дополнительно включающий:

обнаружение присутствия DCC у пациента до указанного контактирования.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что DCC представляют собой NR2F1+.

15. Способ по п. 13 или п. 14, отличающийся тем, что DCC являются положительными по рецептору костного морфогенетического белка («BMPR+»).

16. Способ по любому из пп. 13-15, отличающийся тем, что DCC являются фосфо-PERK активными.

17. Способ по любому из пп. 1-16, дополнительно включающий:

контактирование DCC у пациента с ингибитором РНК-подобной протеинкиназы эндоплазматического ретикулума (PERK), ингибитором MEK, ингибитором CDK4/6 или любой их комбинацией.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанное контактирование осуществляют путем введения пациенту ингибитора PERK.

19. Способ по п. 17 или п. 18, отличающийся тем, что указанное контактирование проводят с ингибитором PERK, выбранным из LY2, LY3, LY4 и их комбинаций.

20. Способ по любому из пп. 17-19, отличающийся тем, что указанное контактирование проводят с ингибитором PERK, который не ингибирует EIF2AK1, EIF2AK2 или EIF2AK4.

21. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанное контактирование проводят путем введения пациенту ингибитора MEK.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что ингибитор MEK выбран из PD184352, PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119/BAY 869766.

23. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанное контактирование проводят путем введения пациенту ингибитора CDK4/6.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что ингибитор CDK4/6 выбран из абемациклиба (LY2835219), палбоциклиба (PD0332991) и рибоциклиба (LEE011).

25. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что пациентом является человек.

26. Способ по любому из пп. 1-25, дополнительно включающий:

выбор пациента в стадии ремиссии рака до указанного контактирования.

27. Способ лечения минимального остаточного рака у пациента, включающий:

контактирование диссеминированных опухолевых клеток (DCC) у пациента с ингибитором РНК-подобной протеинкиназы эндоплазматического ретикулума (PERK), выбранным из LY2, LY3 и LY4, при этом указанное контактирование уничтожает DCC у пациента для лечения минимального остаточного рака у пациента.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что у пациента диагностирован рак молочной железы, множественная миелома, рак легких, немелкоклеточный рак легкого, рак мозга, рак шейки матки, мантийноклеточная лимфома, лейкоз, гепатоцеллюлярная карцинома, рак предстательной железы, меланома, рак кожи, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, глиобластома, нейробластома или колоректальный рак.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной

железы, выбранный из инвазивного рака молочной железы, протоковой карциномы *in situ* (DCIS), лобулярной карциномы *in situ* (LCIS) и воспалительного рака молочной железы.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что рак молочной железы представляет собой рак молочной железы HER2+.

31. Способ по п. 27, отличающийся тем, что у пациента диагностировали диссеминированные опухолевые клетки и/или метастатический рак.

32. Способ по любому из пп. 27-31, дополнительно включающий:

введение пациенту химиотерапевтического агента, иммунотерапевтического агента, эпигенетического агента или ионизирующего излучения.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что пациенту вводят химиотерапевтический агент, и где химиотерапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент против HER2, выбранный из трастузумаба (Герцептин®) и лапатиниба (Tykerb®).

34. Способ по п. 32, отличающийся тем, что пациенту вводят химиотерапевтический агент, и где химиотерапевтический агент выбран из антрациклина, таксана, ингибитора киназы, антитела, фторпиримидина и лекарственного средства на основе платины.

35. Способ по п. 32, отличающийся тем, что пациенту вводят иммунотерапевтический агент, и где иммунотерапевтический агент выбран из ингибитора иммунных контрольных точек, интерферона или противоопухолевой вакцины.

36. Способ по п. 32, отличающийся тем, что пациенту вводят эпигенетический агент, и где эпигенетический агент выбирают из ингибитора гистондеацетилазы (HDAC), 5-азациитидина, ретиноевой кислоты, триоксида мышьяка, ингибитора субъединицы «энхансер Zeste 2» (EZH2) репрессивного комплекса 2 Polycomb, ингибитора бромодомена (BRD) и их производных.

37. Способ по любому из пп. 27-36, отличающийся тем, что указанное контактирование проводят путем введения пациенту ингибитора PERK.

38. Способ по любому из пп. 27-37, дополнительно включающий:

обнаружение присутствия DCC у пациента до указанного контактирования.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что DCC представляют собой NR2F1+.

40. Способ по п. 38 или п. 39, отличающийся тем, что DCC являются фосфо-PERK активными.

41. Способ по любому из пп. 38-40, отличающийся тем, что DCC являются положительными по рецептору костного морфогенетического белка («BMPR+»).

42. Способ по п. 41, дополнительно включающий:

контактирование DCC у пациента с белком, производным костного морфогенетического белка 7 (BMP7).

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что указанное контактирование DCC у пациента с белком, производным BMP7, осуществляется путем введения пациенту белка, производного BMP7.

44. Способ по п. 42 или п. 43, отличающийся тем, что белком, производным BMP7, является BMP7-F9.

45. Способ по любому из пп. 27-44, отличающийся тем, что ингибитор PERK не ингибирует EIF2AK1, EIF2AK2 или EIF2AK4.

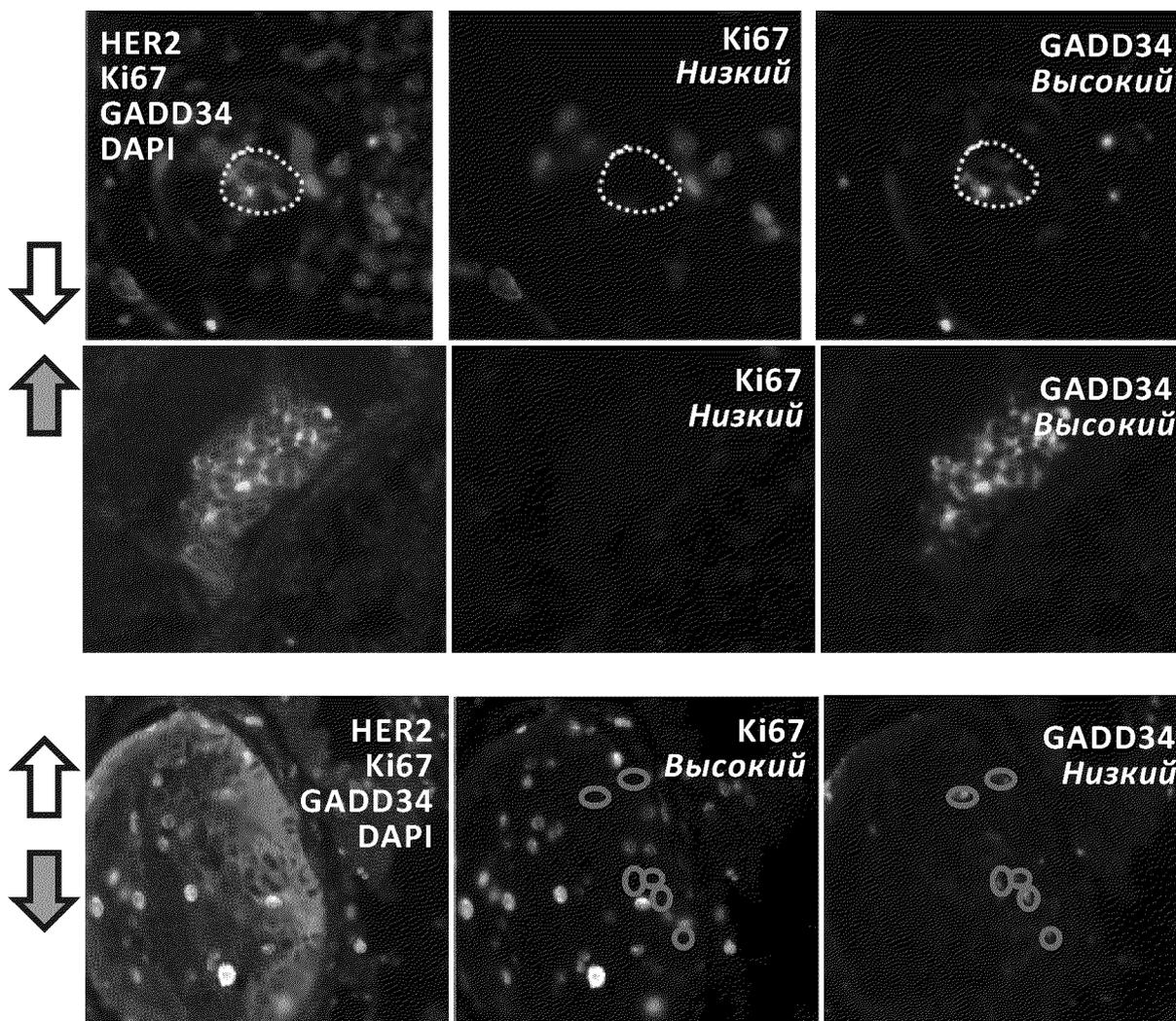
46. Способ по любому из пп. 27-45, отличающийся тем, что пациентом является человек.

47. Способ по любому из пп. 27-46, дополнительно включающий:
выбор пациента в стадии ремиссии рака до указанного контактирования.

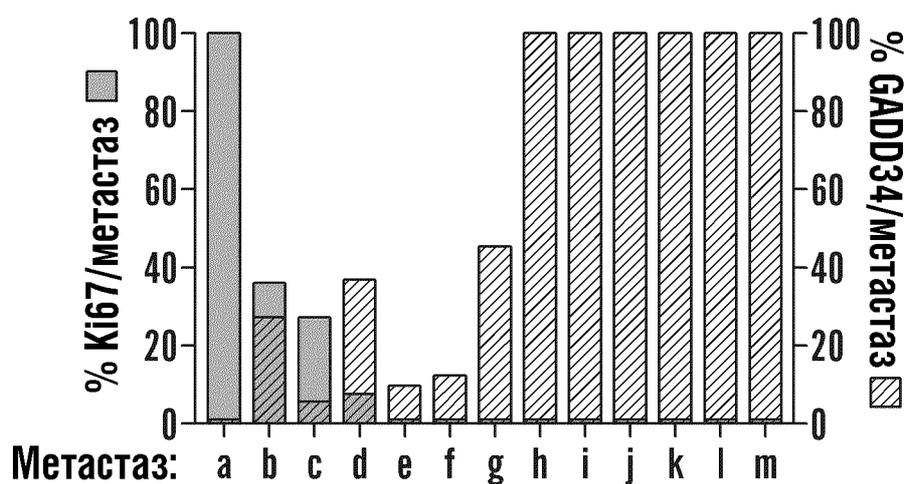
По доверенности

ФИГ.1А

Метастазы рака молочной железы мышей MMTV-neu



100% исключение: GADD34 +/Ki67-

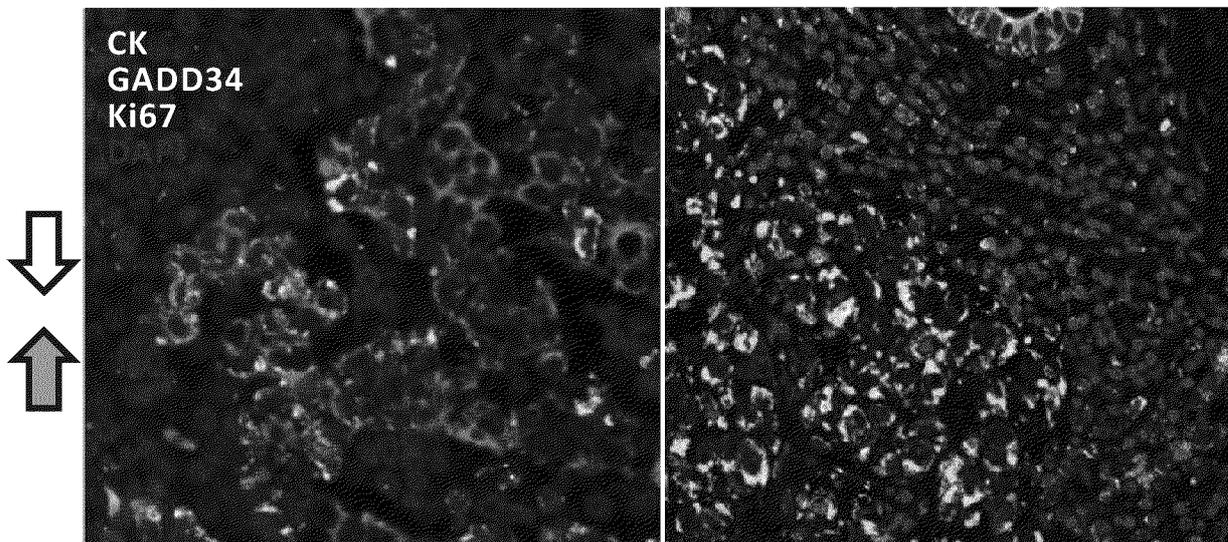


ФИГ.1В

Метастазы рака молочной железы человека

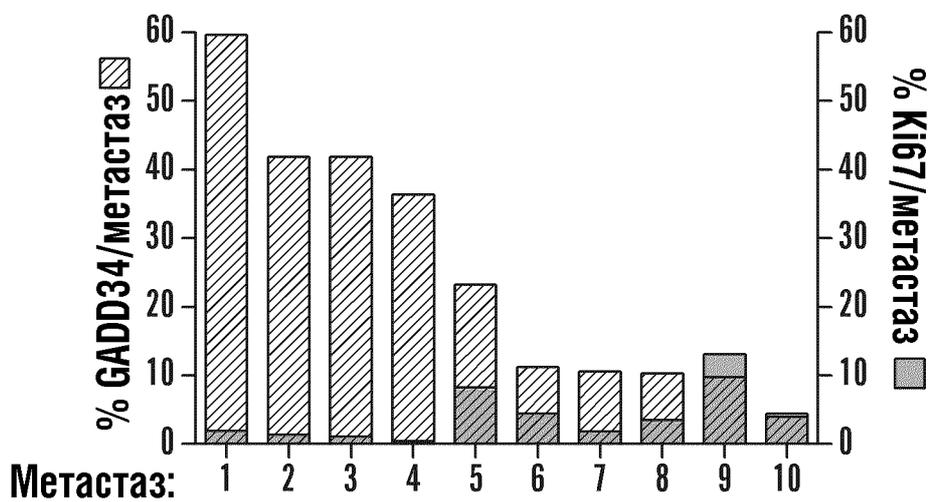
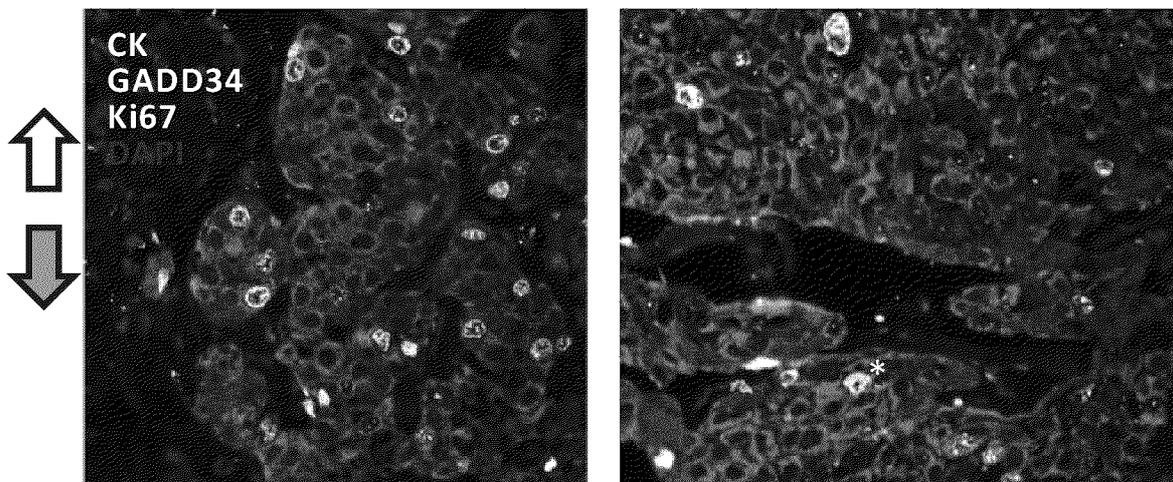
Лимфатический узел (9867)

Печень (1645)

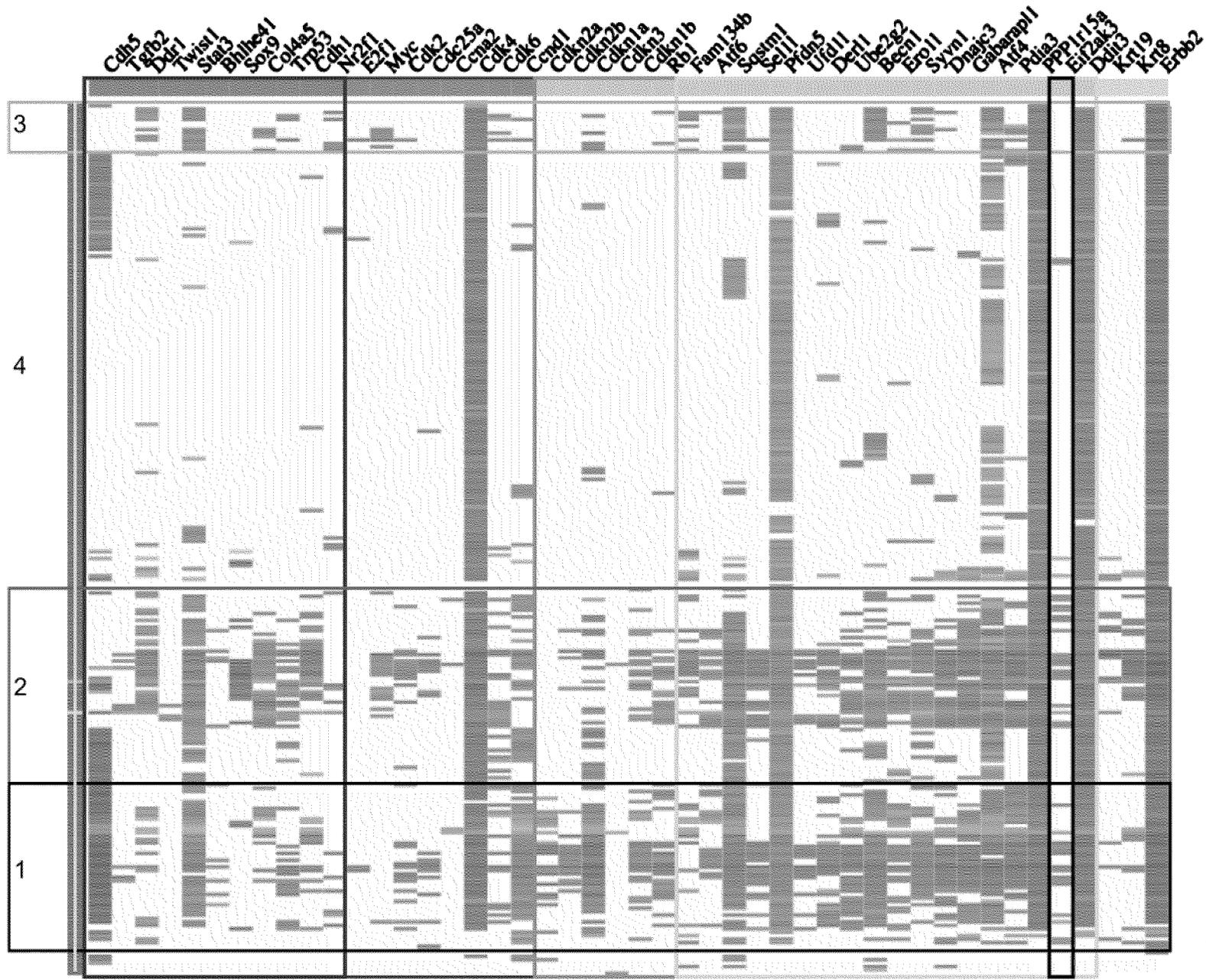


Печень (879)

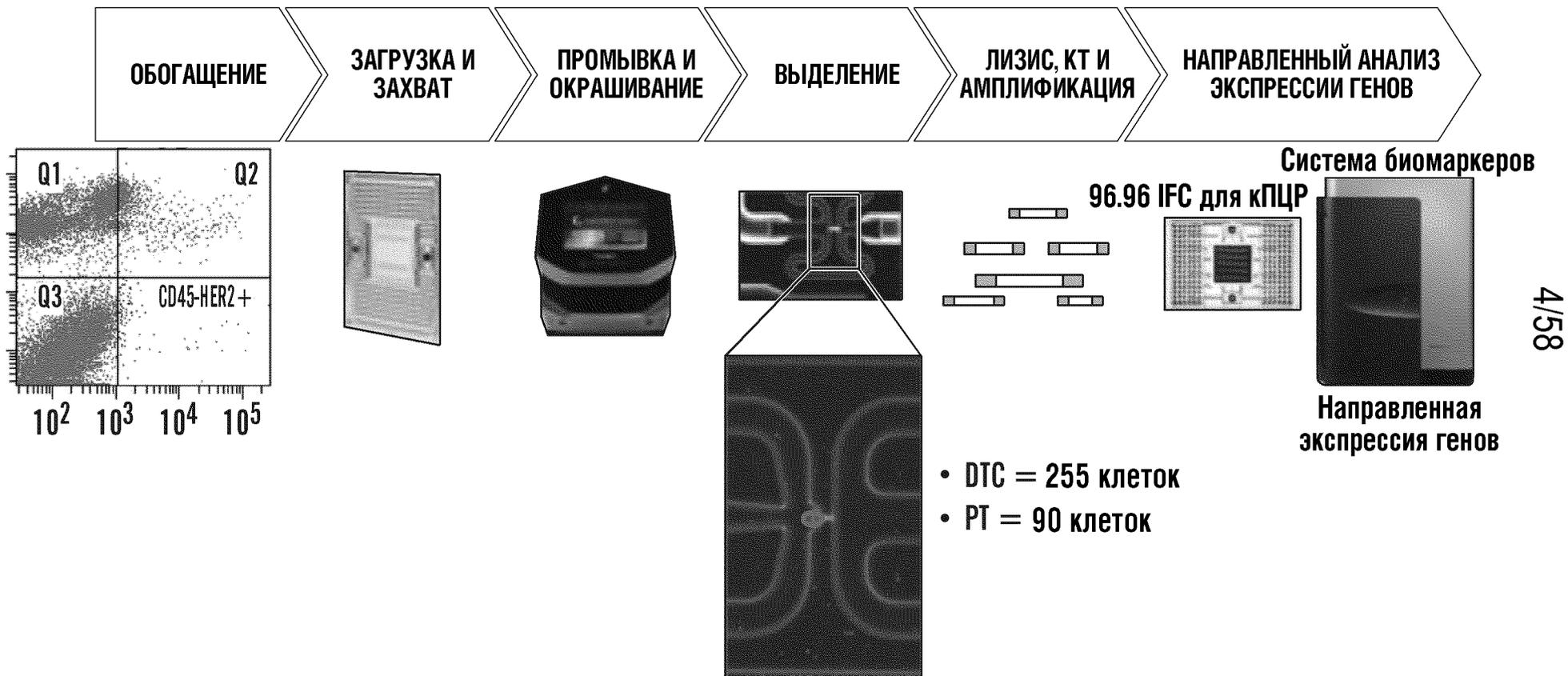
Печень (3603)



ФИГ.1С



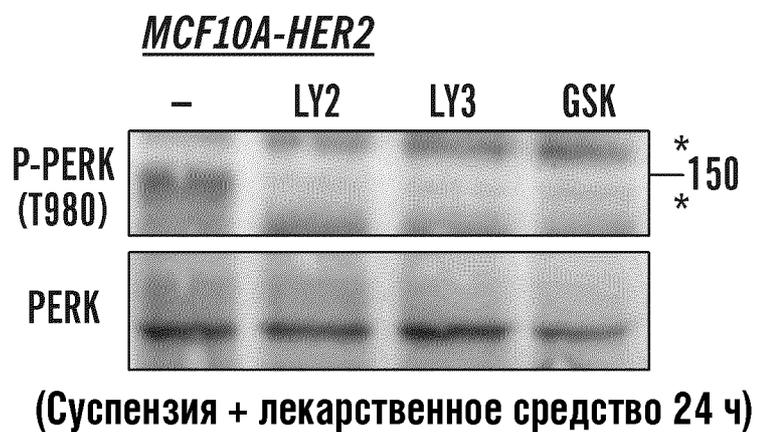
ФИГ.2А



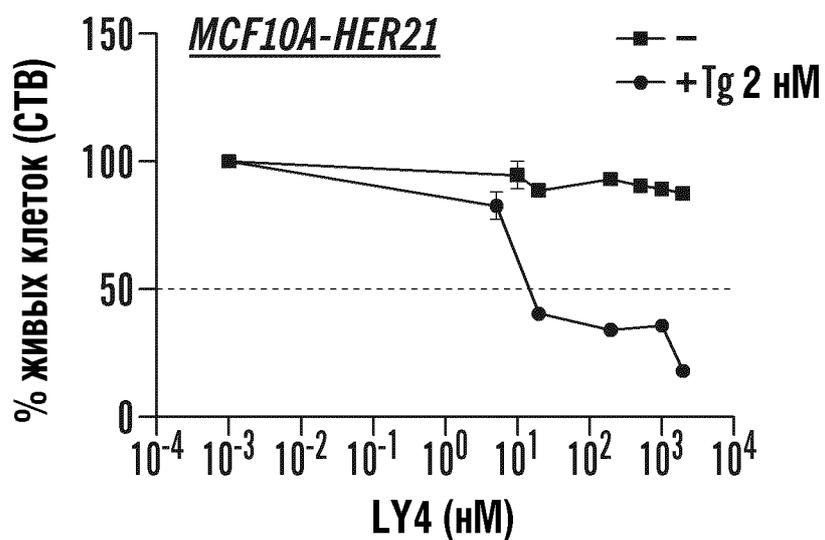
ФИГ.2В

Верх клеточного цикла	ER-стресс	Состояние покоя
Cdk4	Eif2ak3	Trp53
Cdc25a	Atf4	Bhlhe41
Cdk2	Ero1l	Cdh1
Ccne1	Pfdn5	Sox9
Myc	Fam134b	Stat3
E2f1	Ddit3	Twist1
Cdk6	PPP1r15a	Tgfb2
Ccnd1	Gabarapl1	Ddr1
Ccna2	Derl1	Col4a5
Низ клеточного цикла	Pdia3	Nr2f1
	Dnajc3	Cdh5
Cdkn1a	Becn1	ID клеток
Cdkn2b	Syvn1	
Cdkn2a	Ube2g2	ErbB2
Cdkn1b	Ufd1l	
Rb1	Sel1l	
Cdkn3	Atf6	
Trp53	Sqstm1	

ФИГ.2С



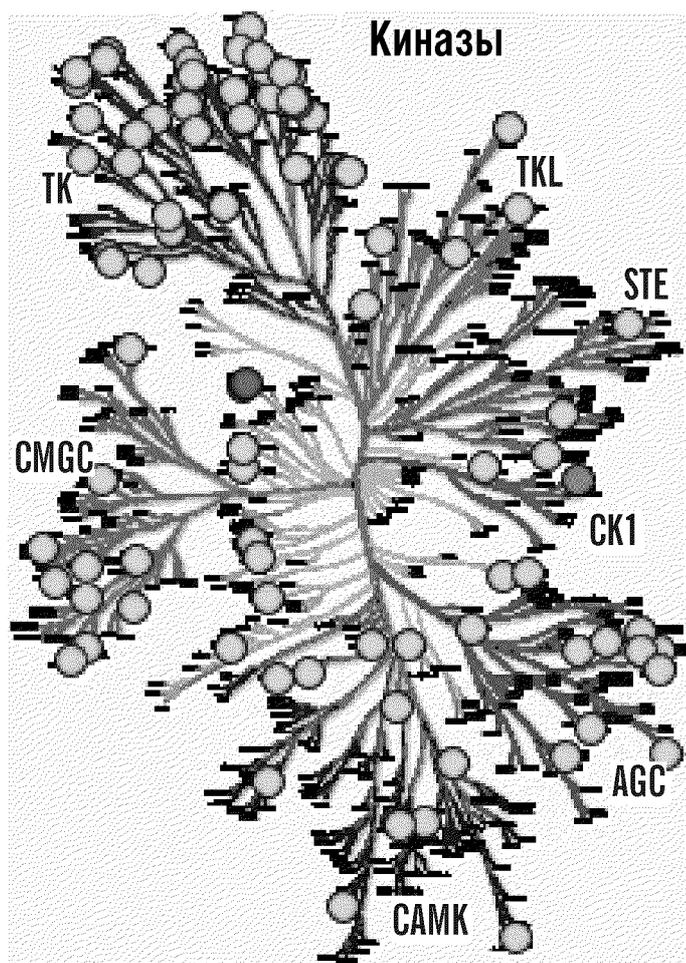
ФИГ.2D



ФИГ.2Е

LY4

PERK клеточный анализ

IC₅₀ = 0.054 мкМ

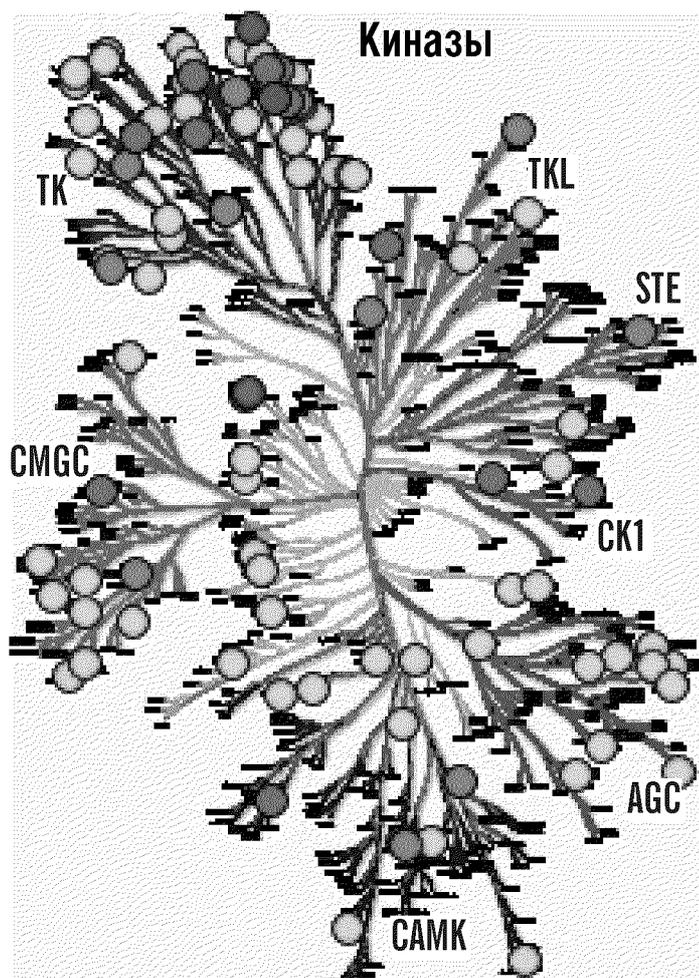
Отсутствие других активностей ниже 15 мкМ

ФИГ.2Е (продолжение)

LY2

PERK клеточный анализ

IC₅₀ = 0.117 мкМ



Другие активности

FGFR3 IC₅₀ 0.088 мкМ

IC₅₀ 1-5 μМ (ALK, AXL, CDK7,
CSNK1E, EPHA7, FLT1,3,4,
GSK3β, HIPK2

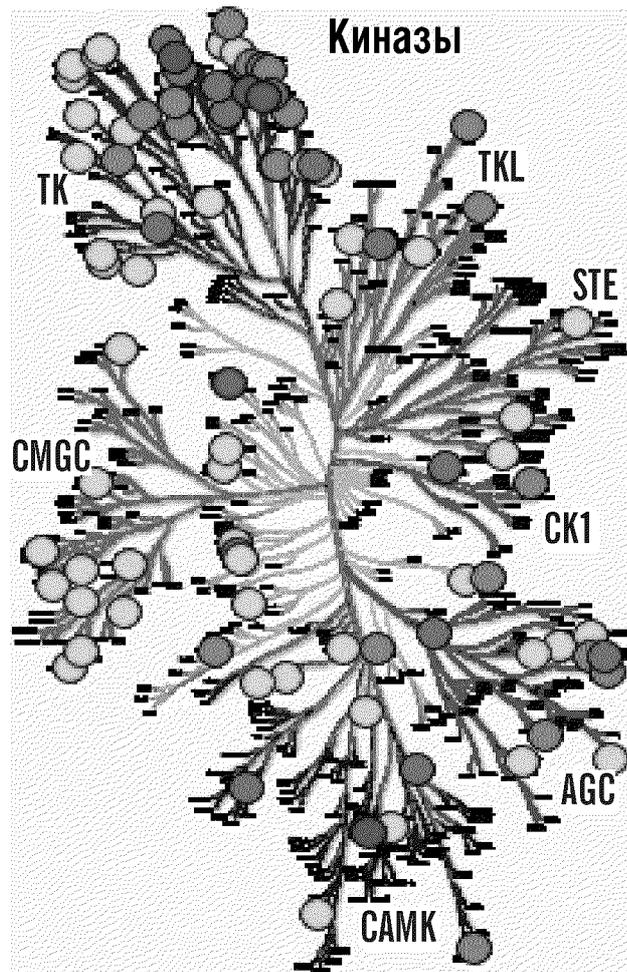
KDR, STK17A, WEE1)

ФИГ.2Е (продолжение)

LY3

PERK клеточный анализ

IC₅₀ = 0.026 мкМ



Другие активности

Flt3 IC₅₀ 0.100 мкМ

MNK2 IC₅₀ 0.230 мкМ

NTRK IC₅₀ 0.63 мкМ

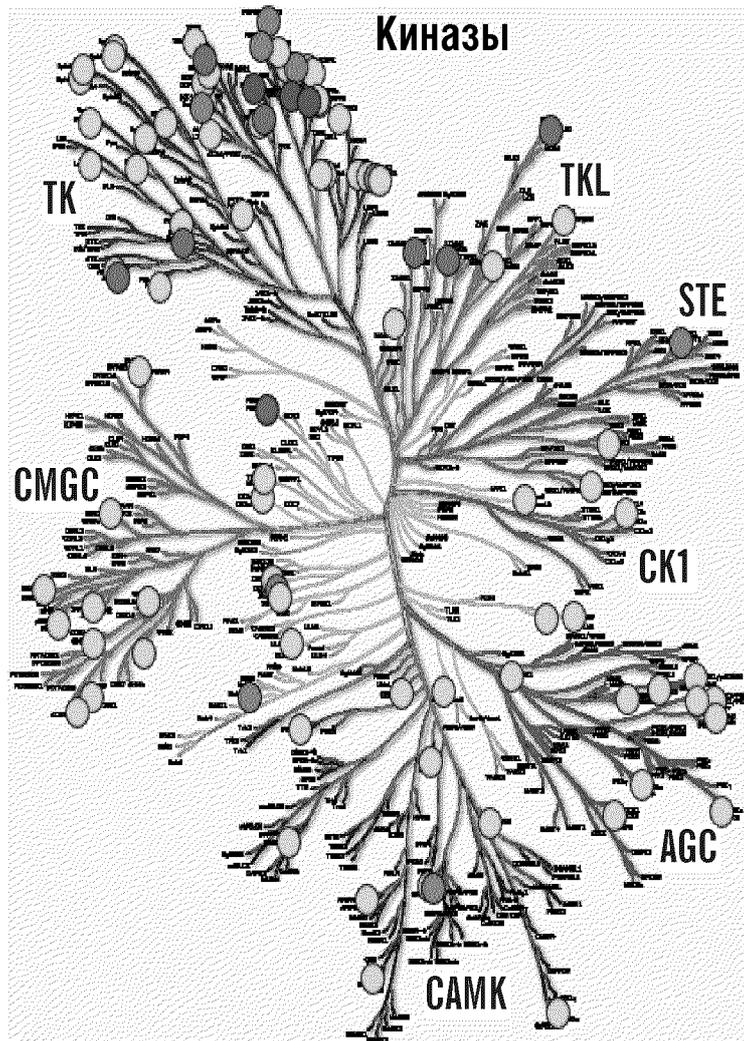
IC₅₀ 1-5 μМ (AKT1, AXL,
FLT4, CHEK2, IKBKE,
JAK1, LIMK1, MET,
MST1R, MUSK, NTRK2,
PDGFRα, PDPK1, PTK6,
STK17A, WEE1)

ФИГ.2Е (продолжение)

GSK2656157

PERK клеточный анализ

IC₅₀ = 0.036 мкМ

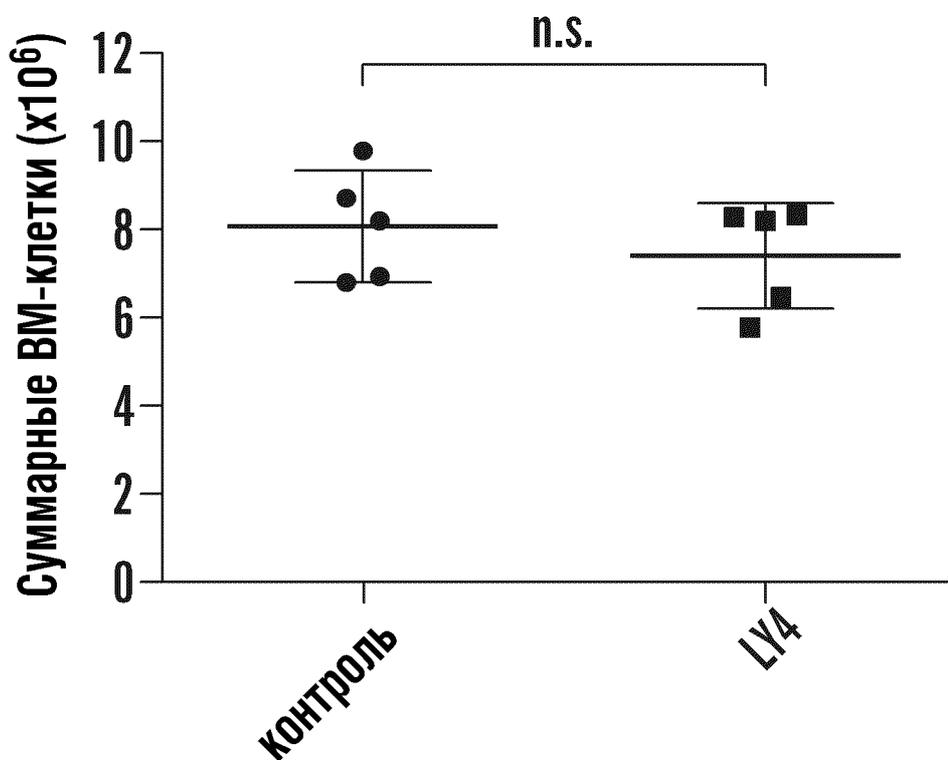


Другие активности

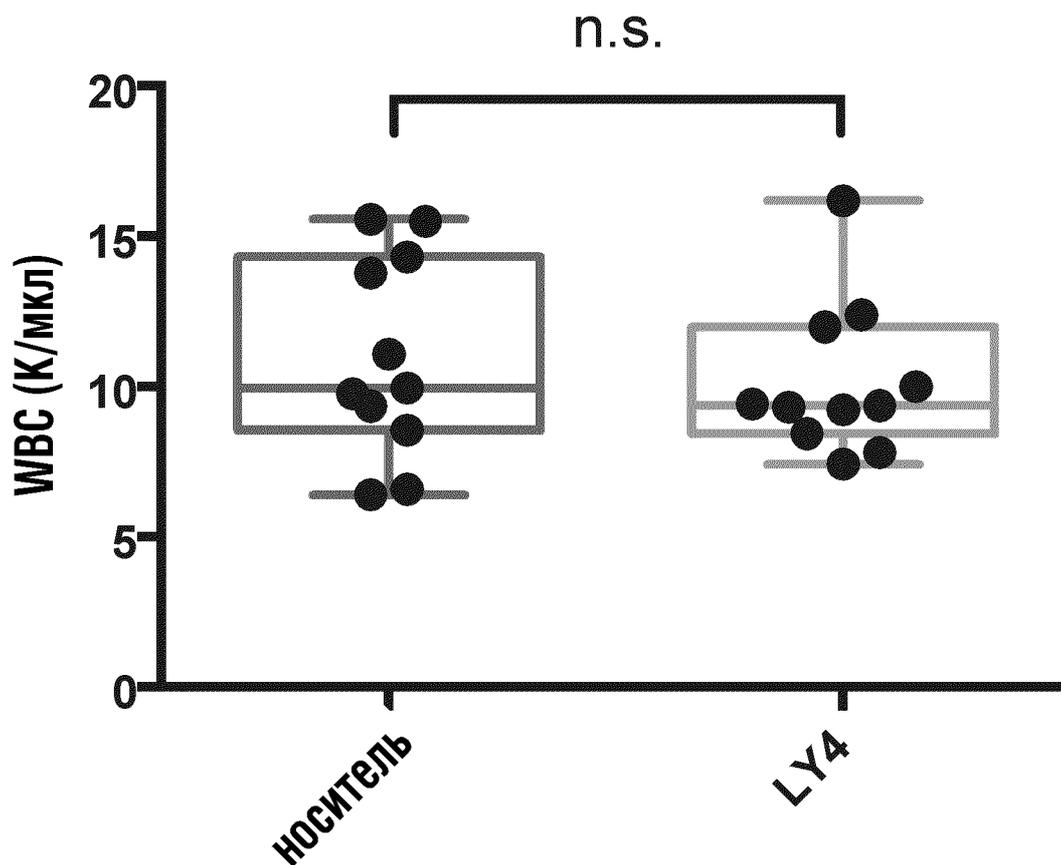
AXL IC₅₀ 0.480 мкМ

IC₅₀ 1-5 μМ (ABL; BRK,
FLT3, FLT4, IRAK1, TRK-A)

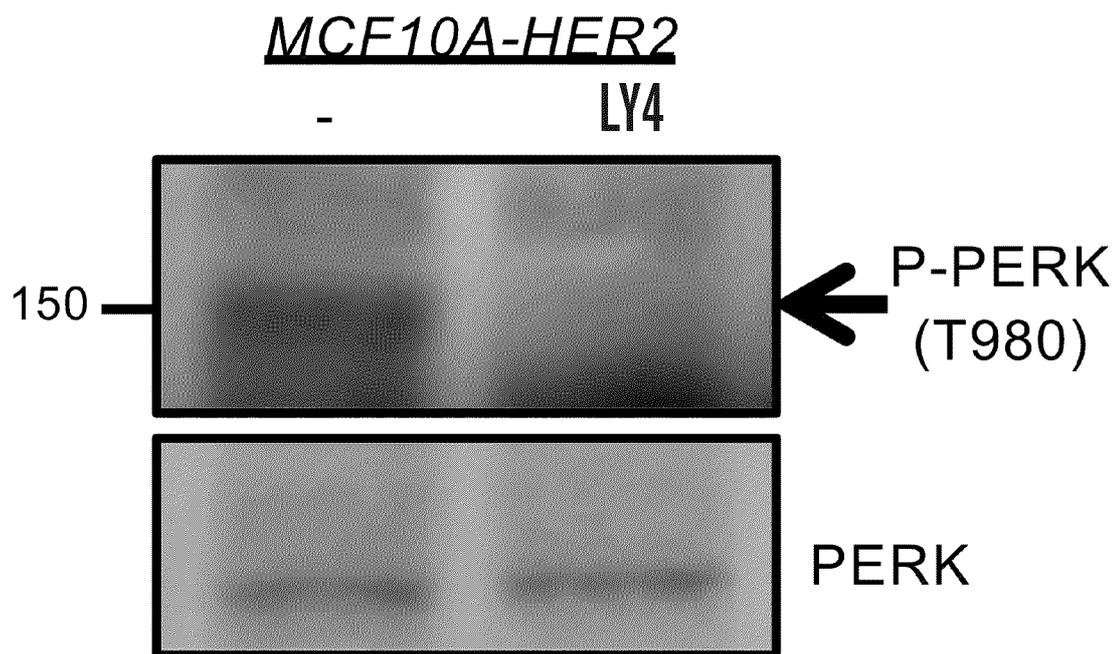
ФИГ.2F



ФИГ.2G



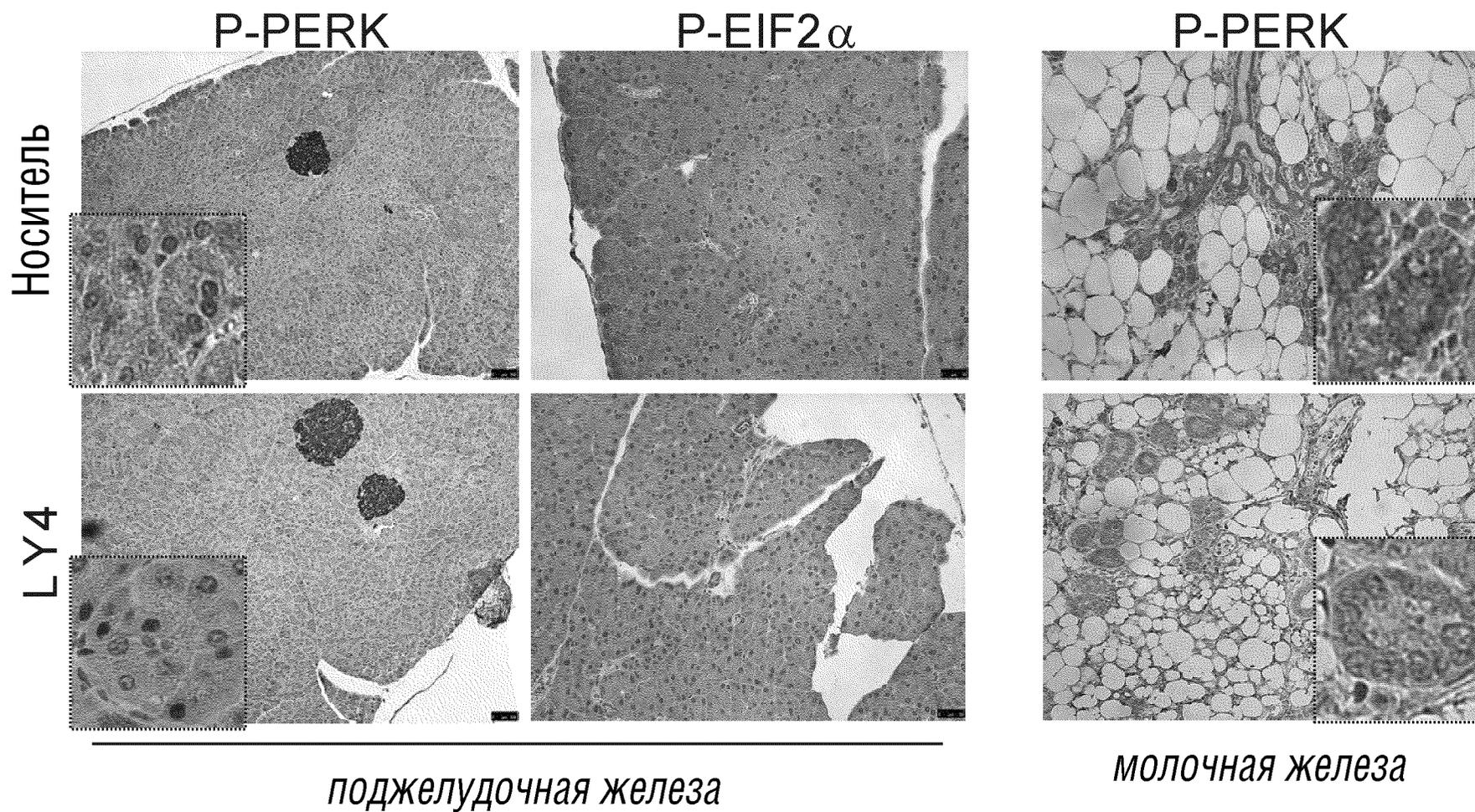
ФИГ.3А



(Суспензия + лекарственное средство 24 ч)

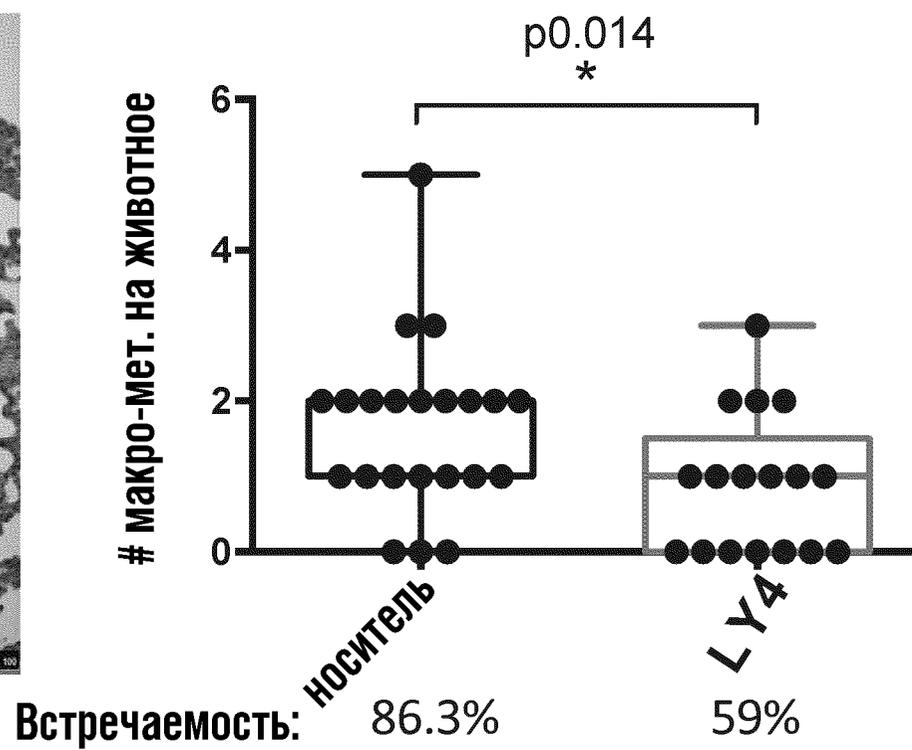
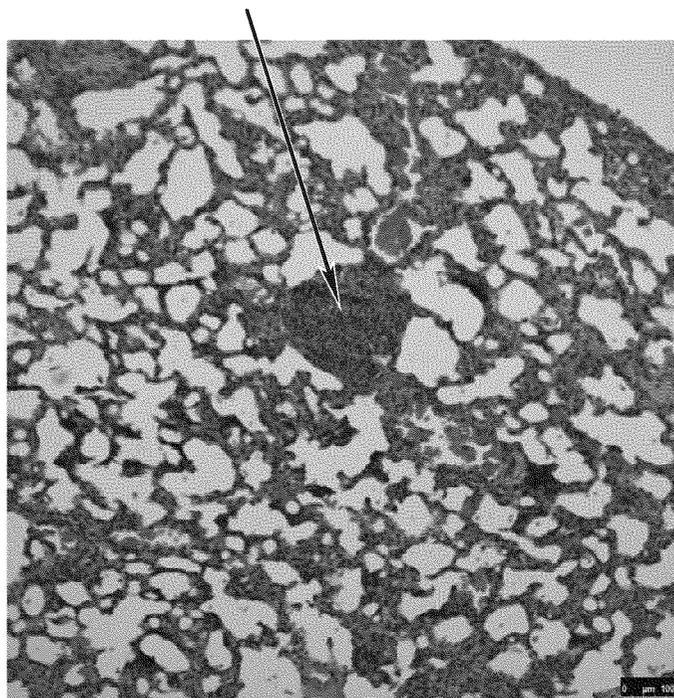
ФИГ.3В

MMTV-neu/HER+ модель рака молочной железы

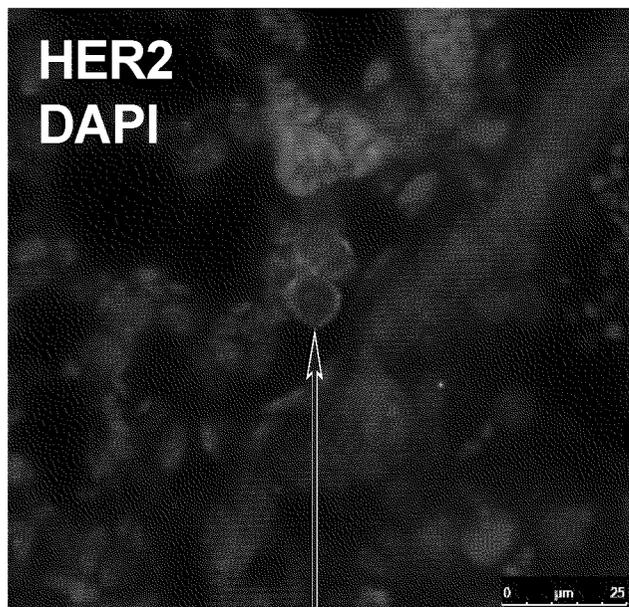


ФИГ.3С

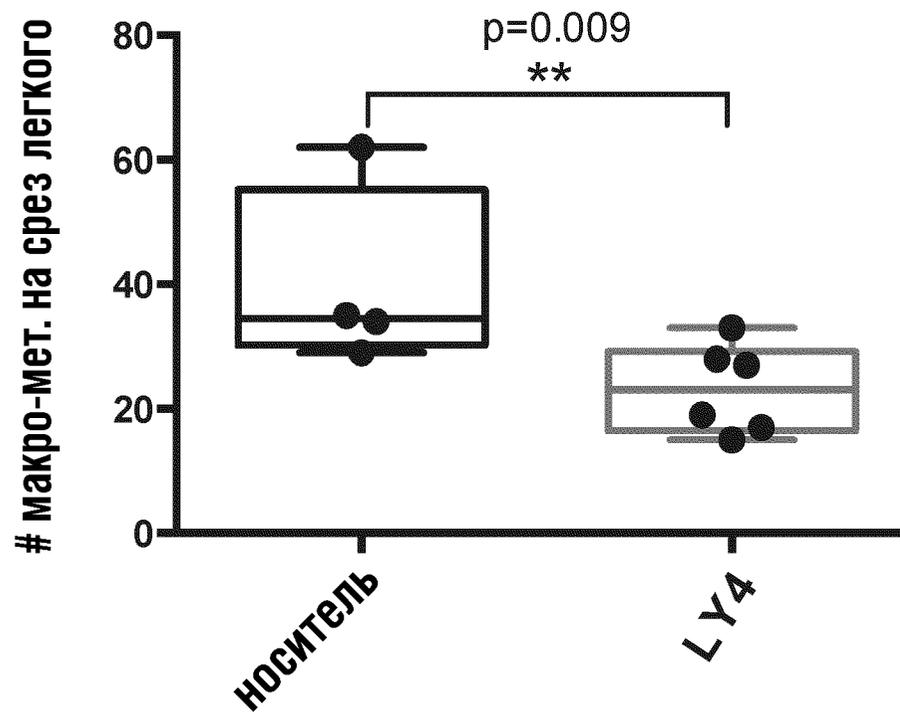
МАКРО-МЕТАСТАЗ



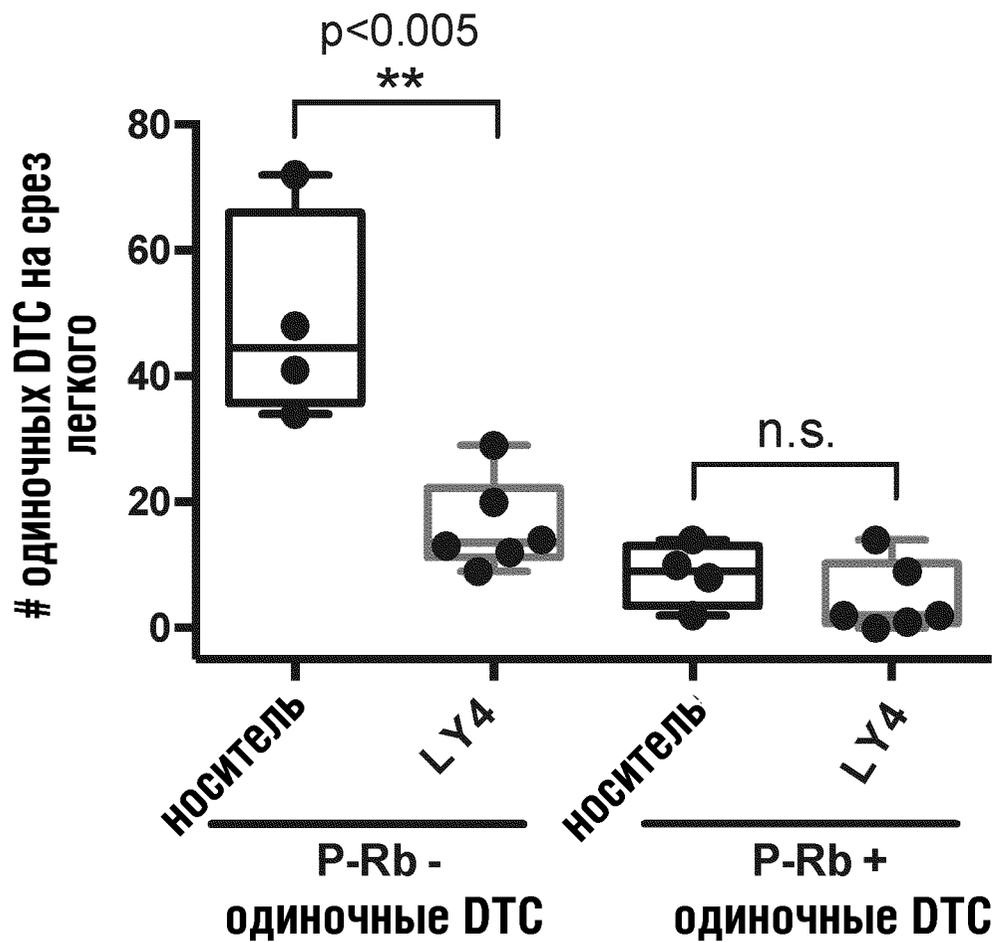
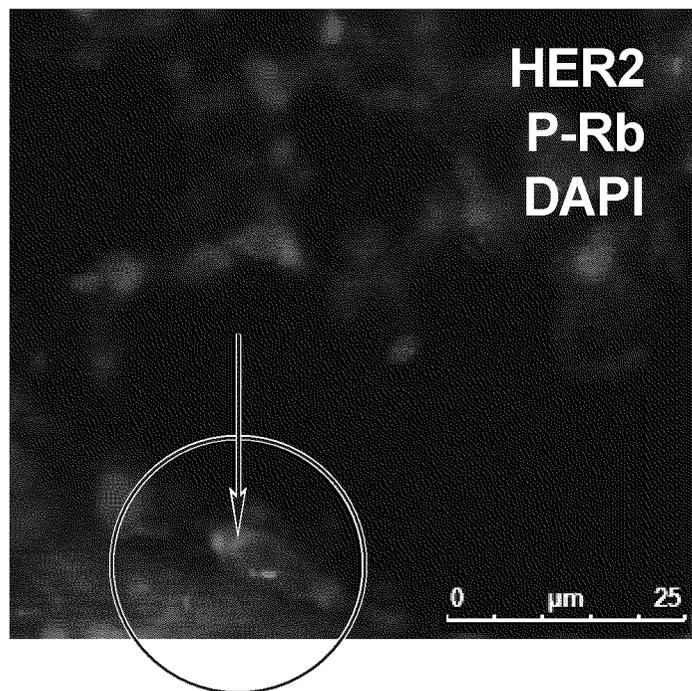
ФИГ.3D



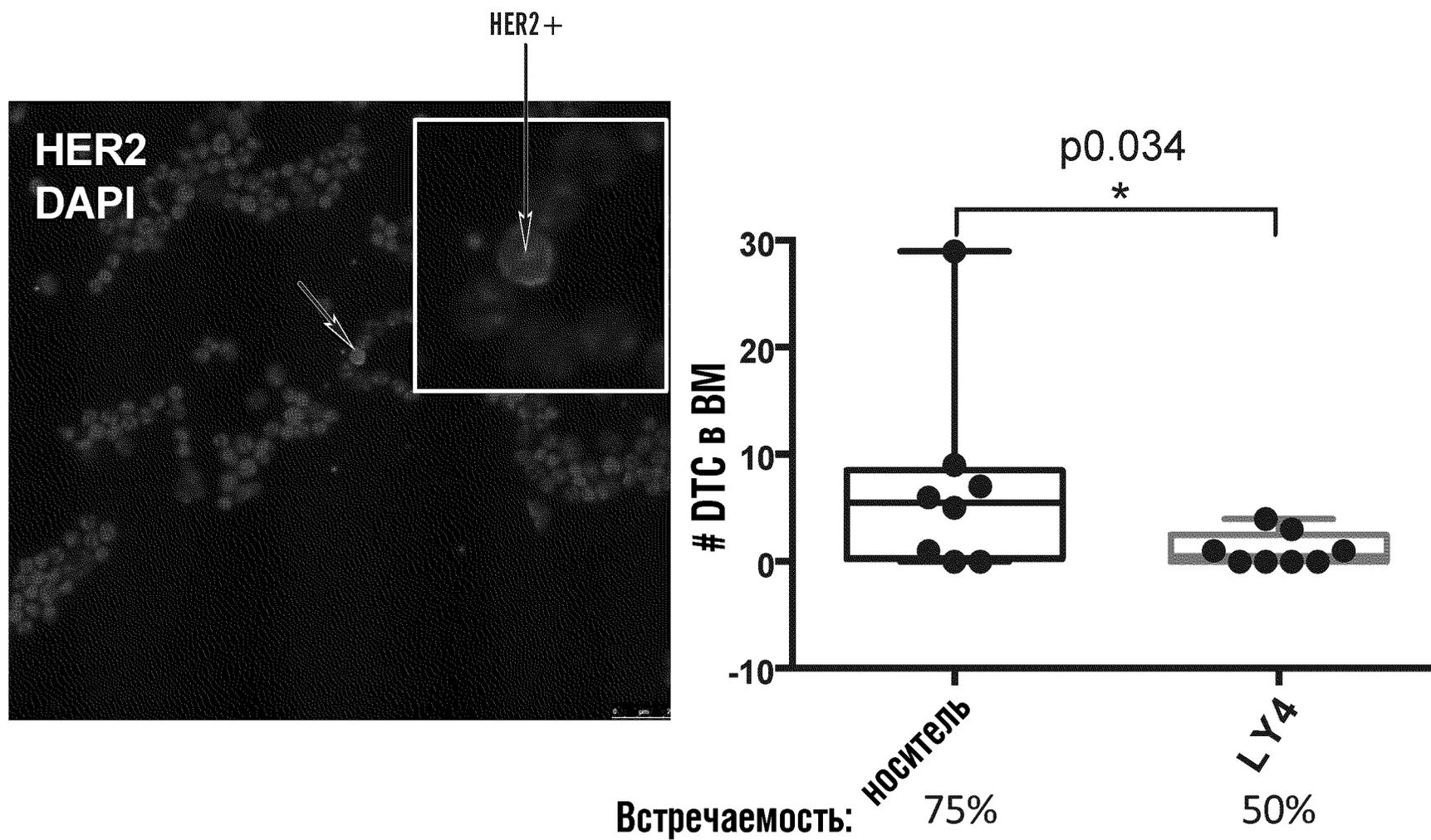
HER2+ КЛЕТКИ
(2 КЛЕТКИ)



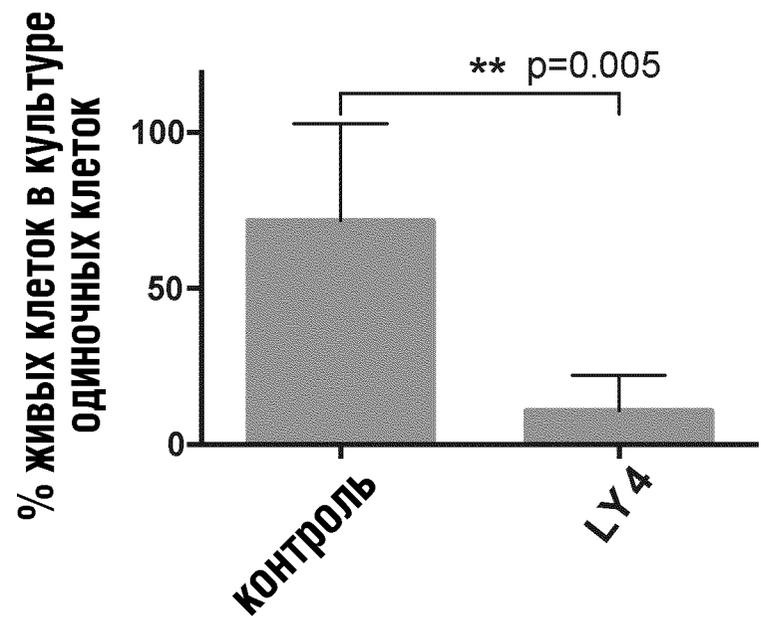
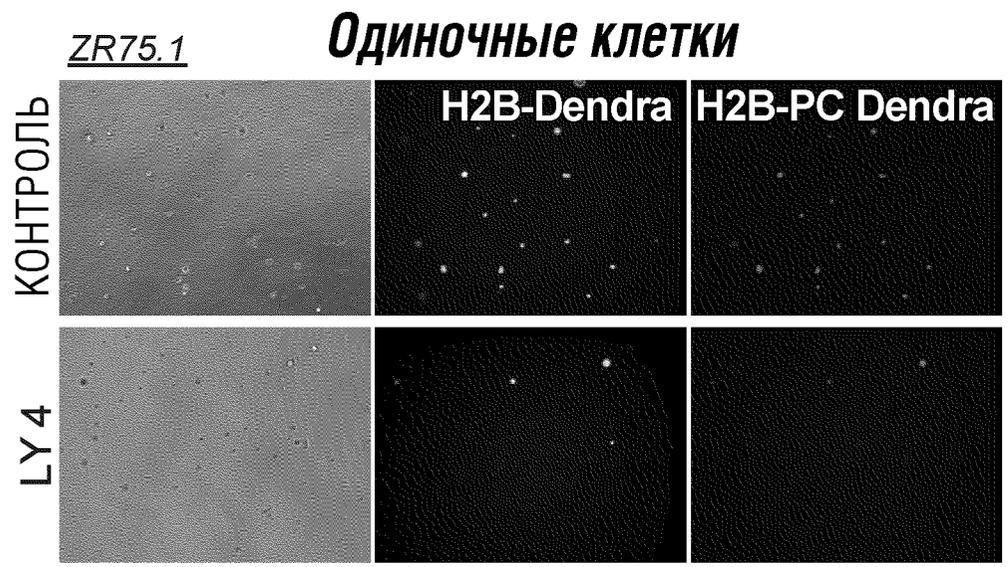
ФИГ.3Е



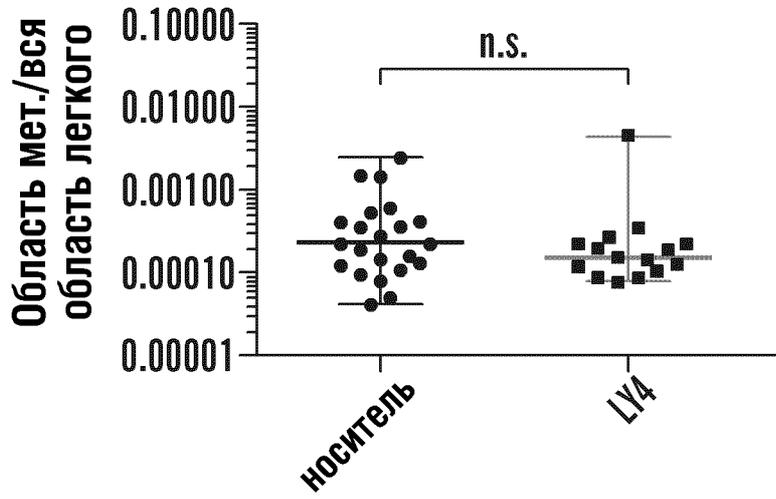
ФИГ.3F



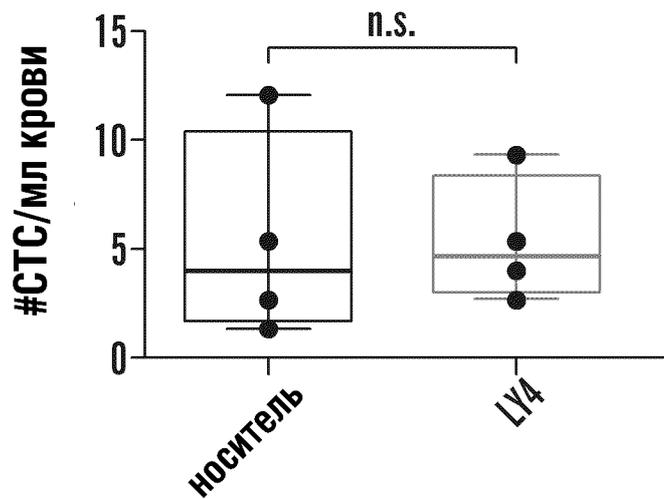
ФИГ.3G



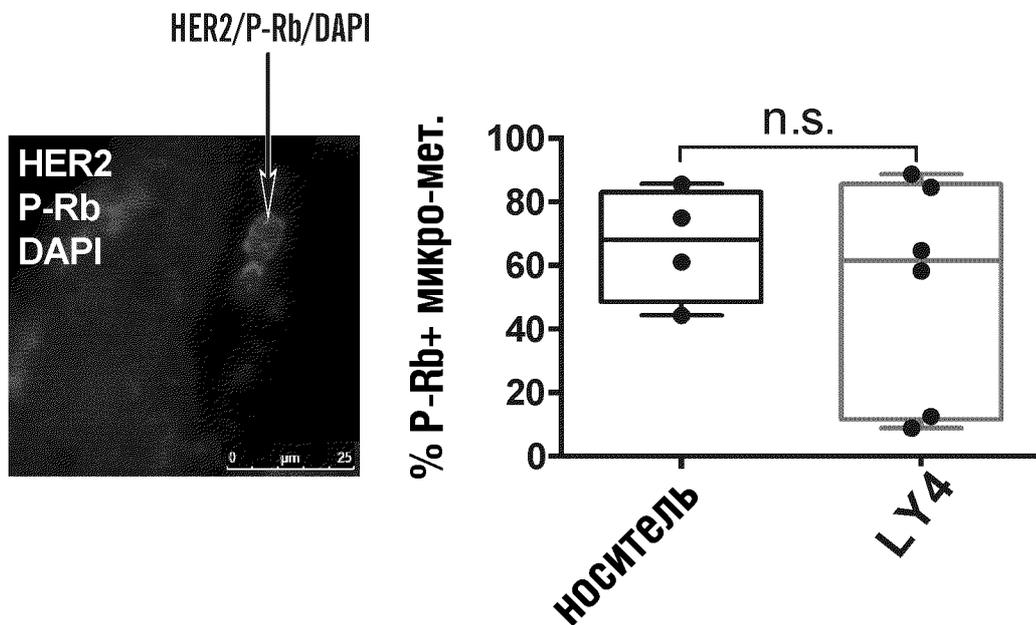
ФИГ.4А



ФИГ.4В



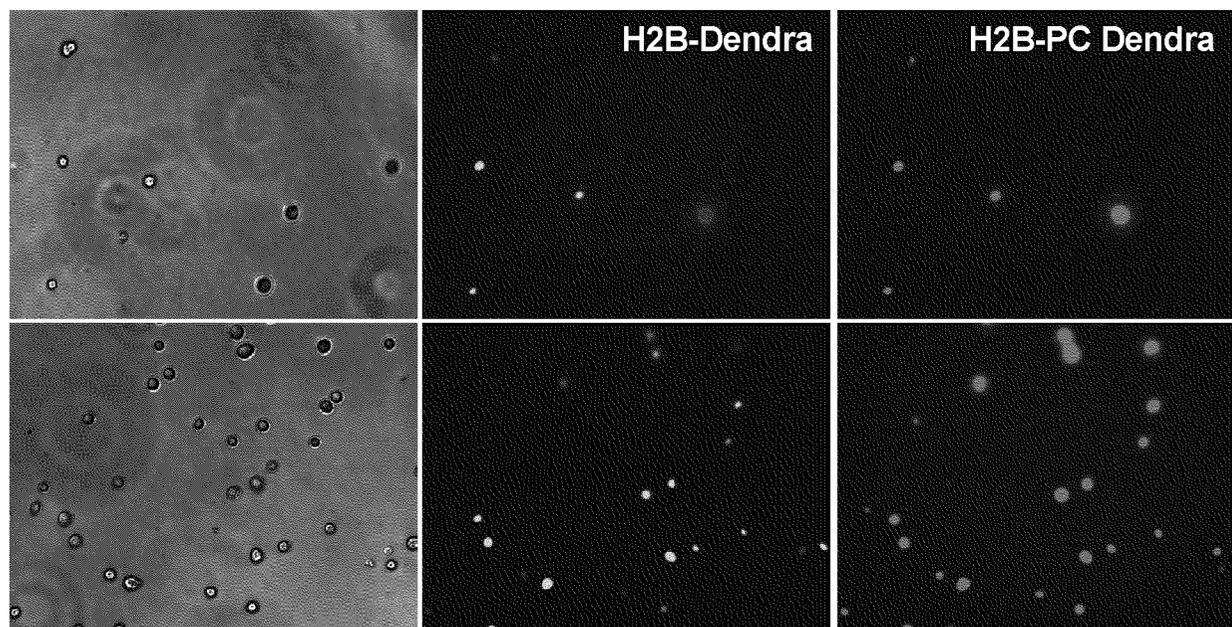
ФИГ.4С



ФИГ.4D

ZR75.1

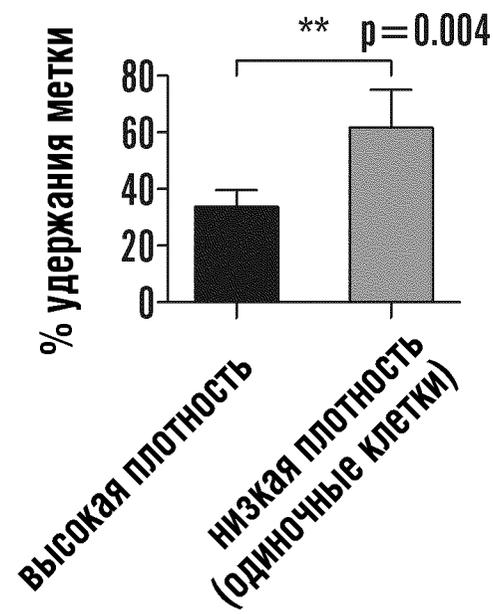
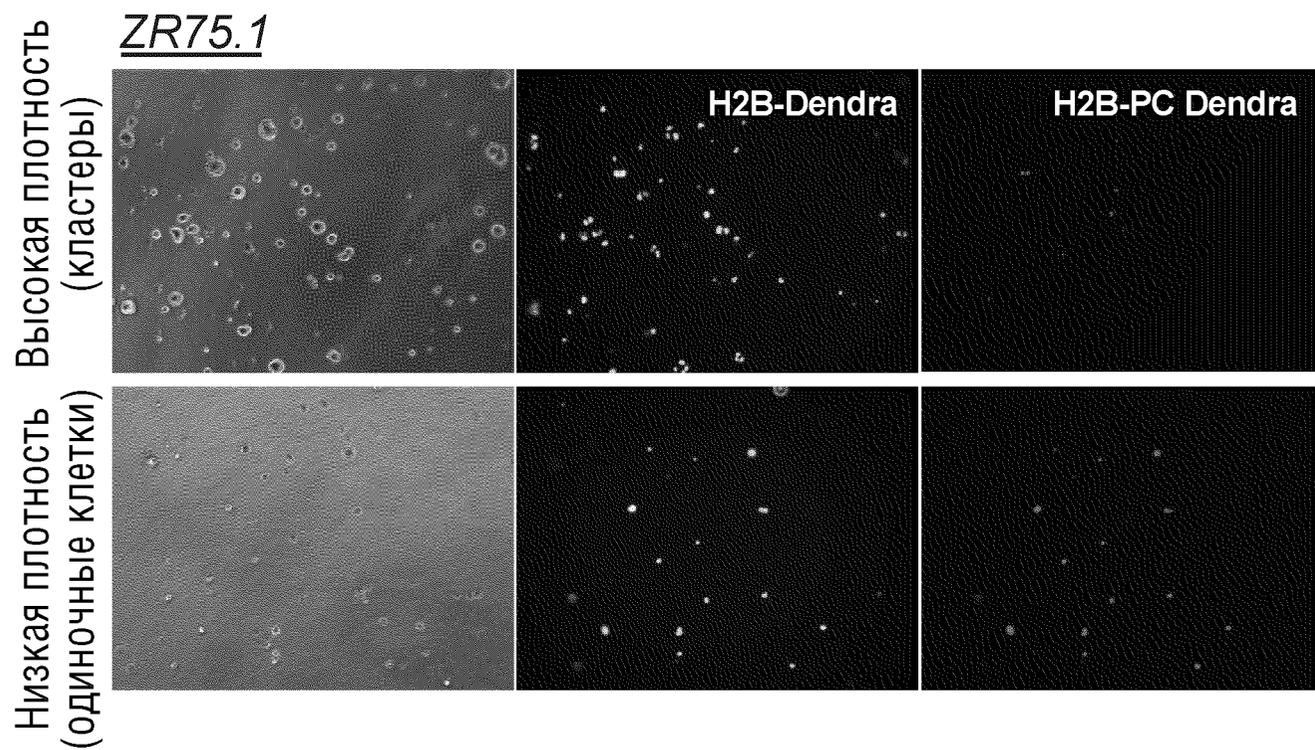
День 0, после фотопреобразования



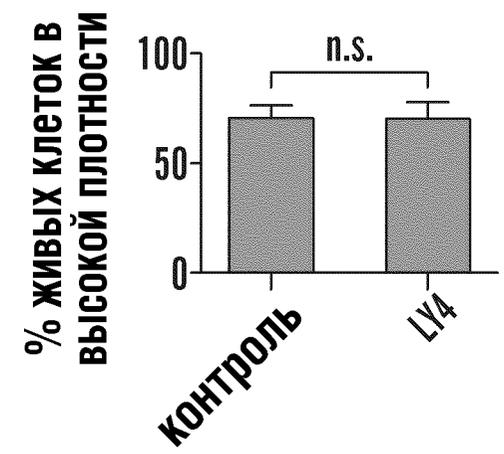
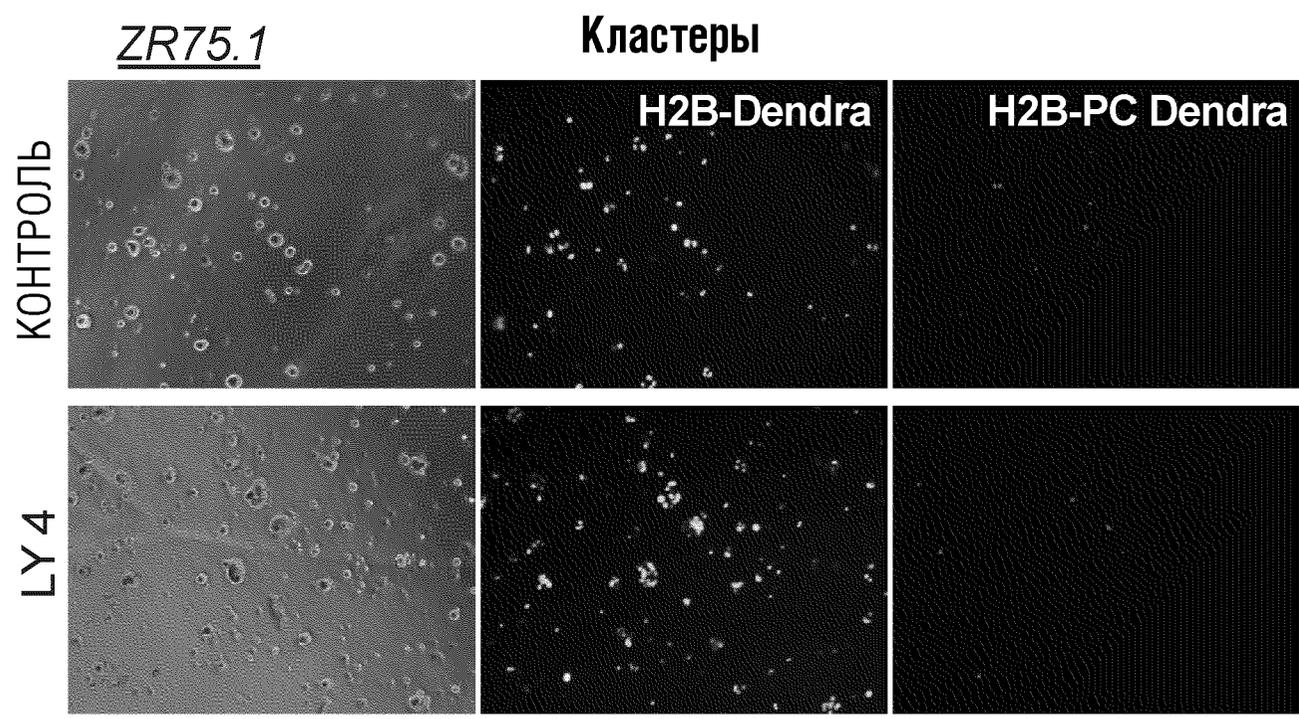
Низкая плотность
(одиночные клетки)

Высокая плотность

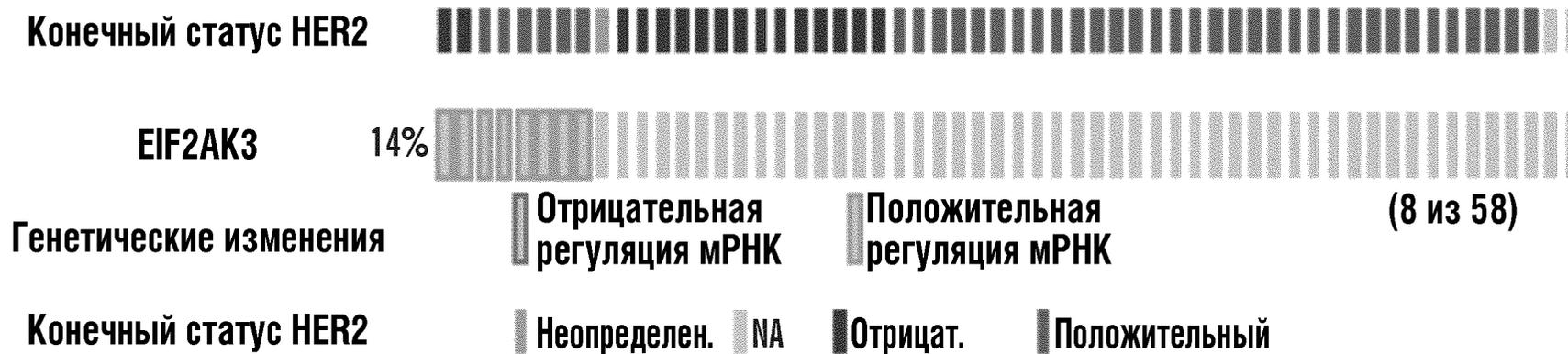
ФИГ.4Е



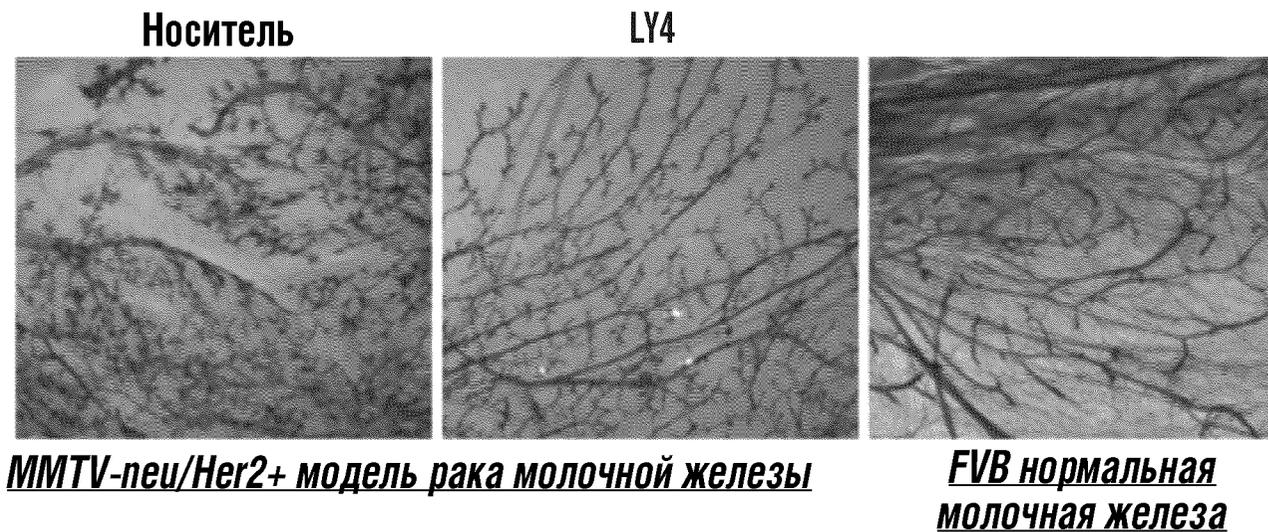
ФИГ.4F



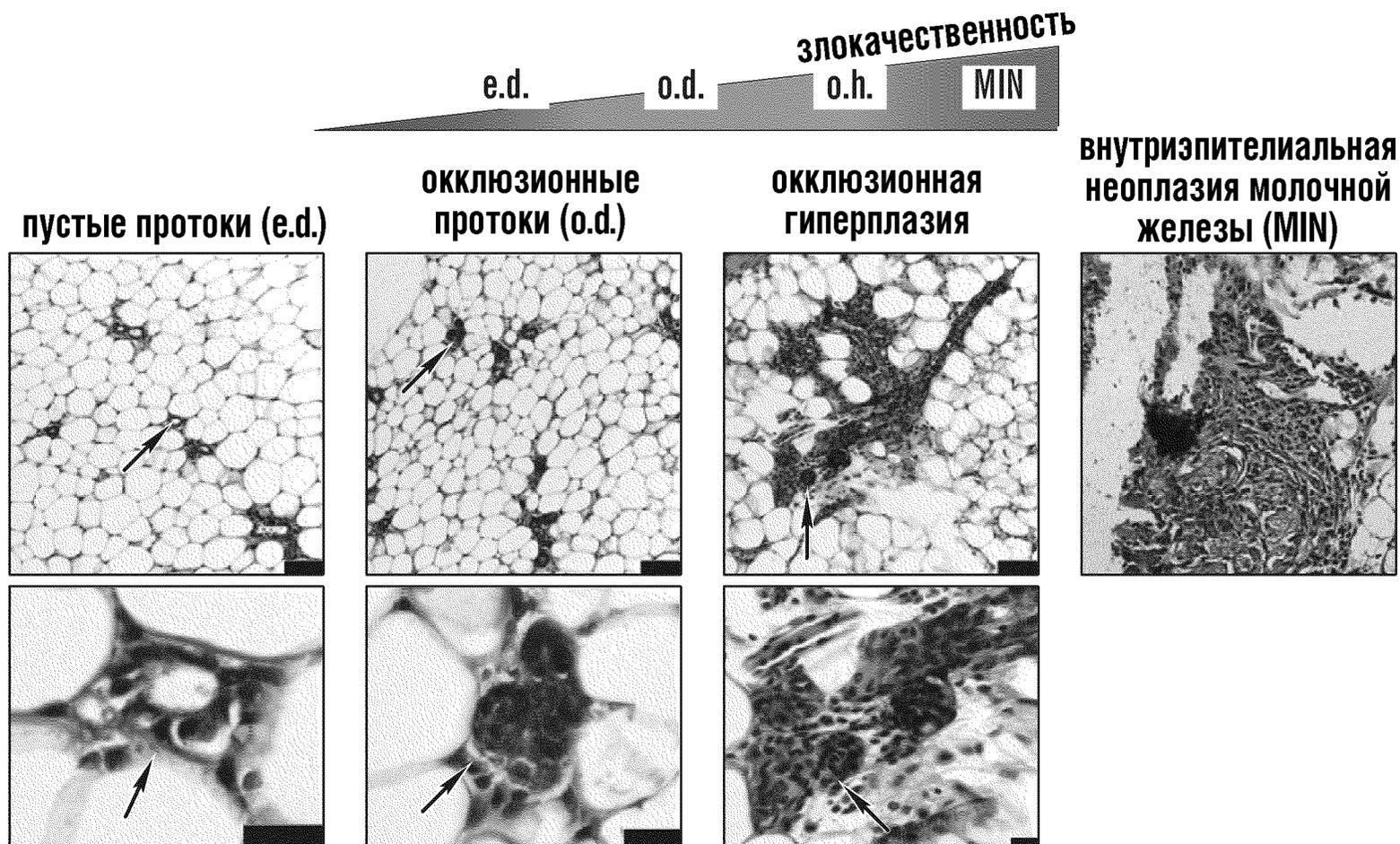
ФИГ.5А



ФИГ.5В

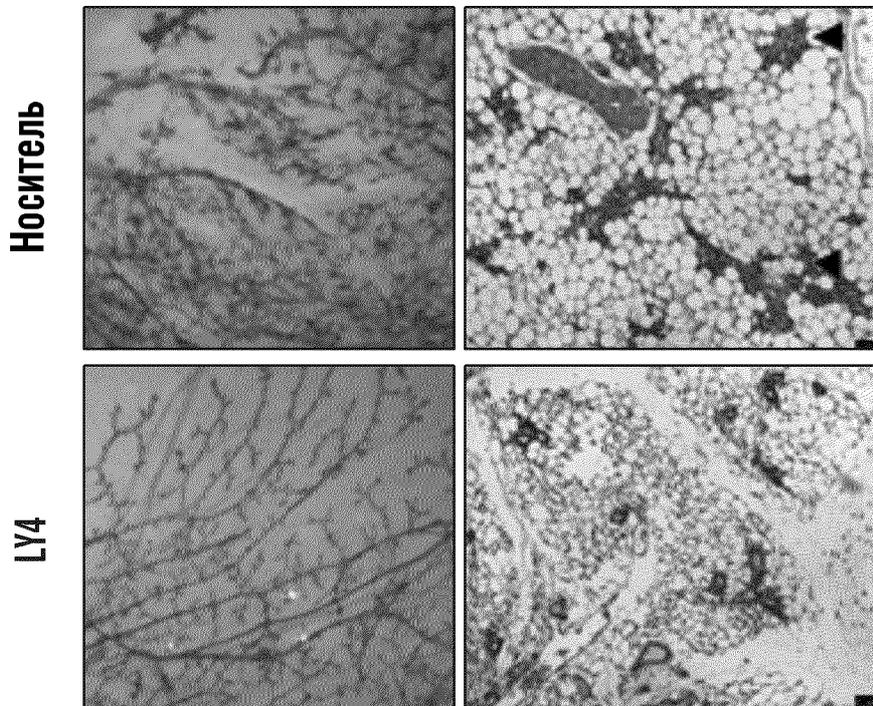


ФИГ.5С

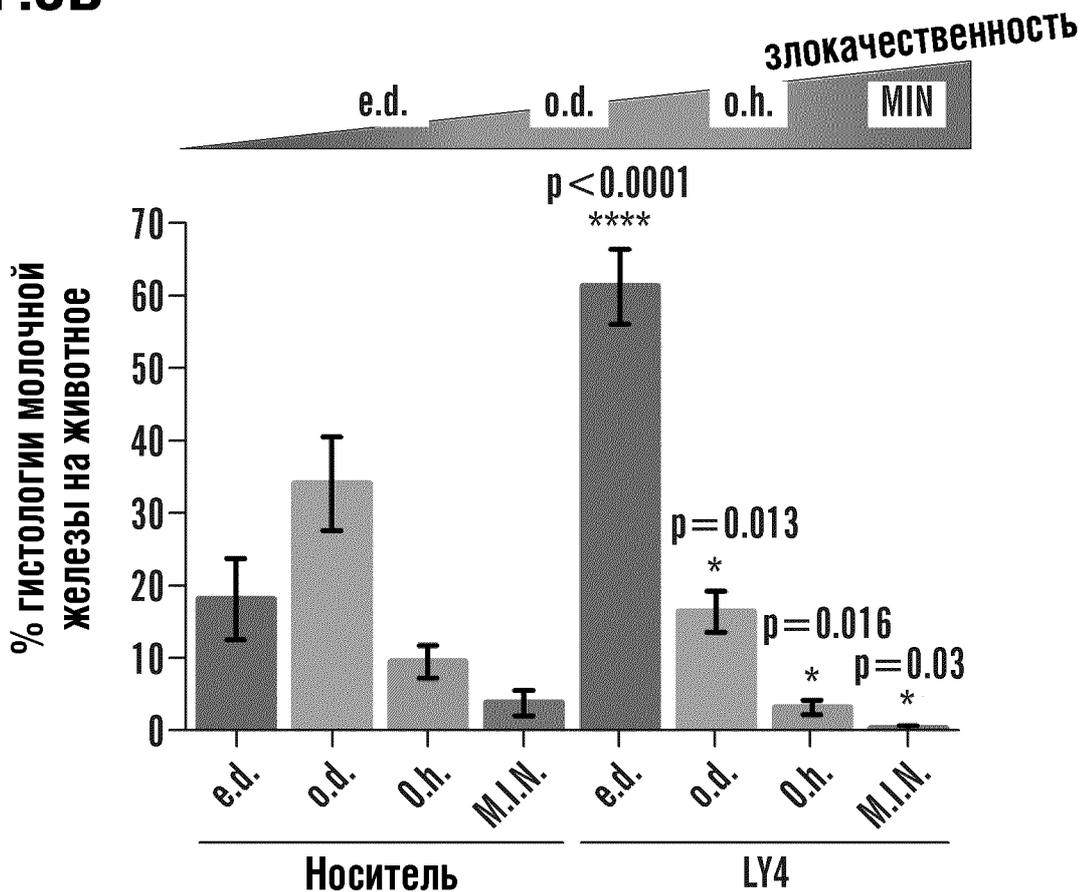


ФИГ.6А

MMTV-neu/Her2⁺ модель рака молочной железы

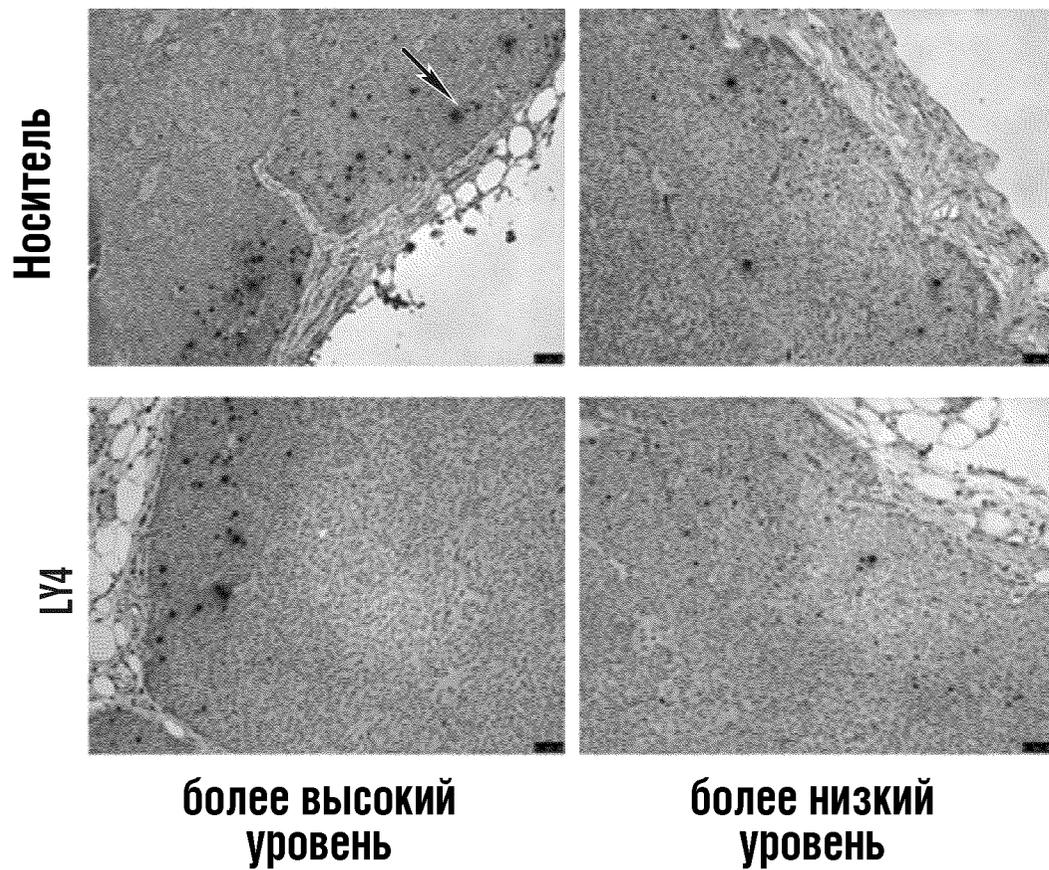


ФИГ.6В

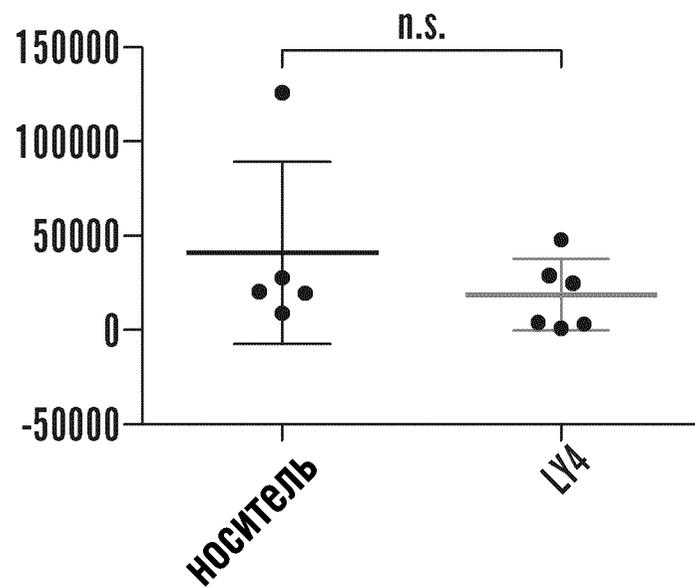


ФИГ.7D

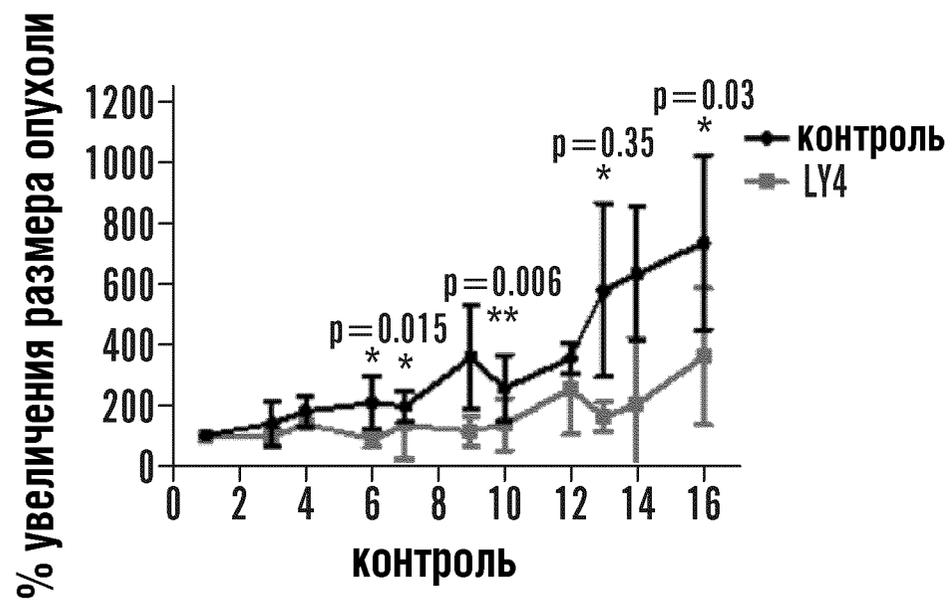
Р-гистон H3



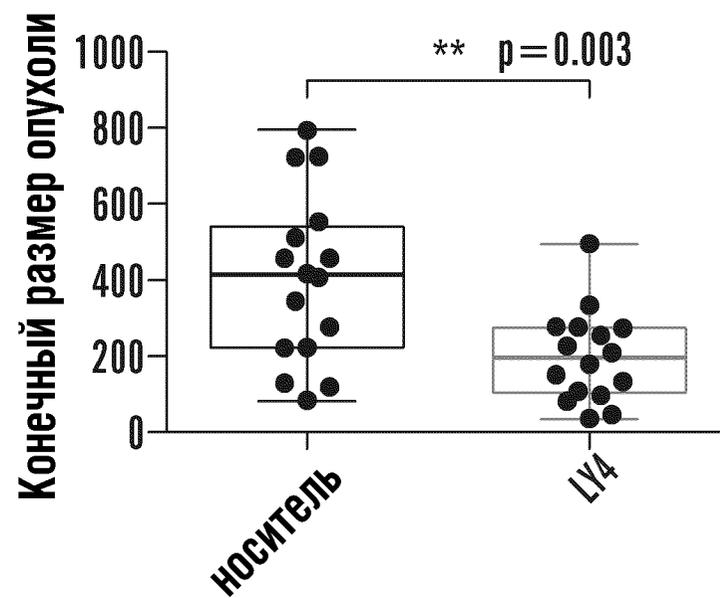
**Р-H3 положительные клетки/
единица площади**



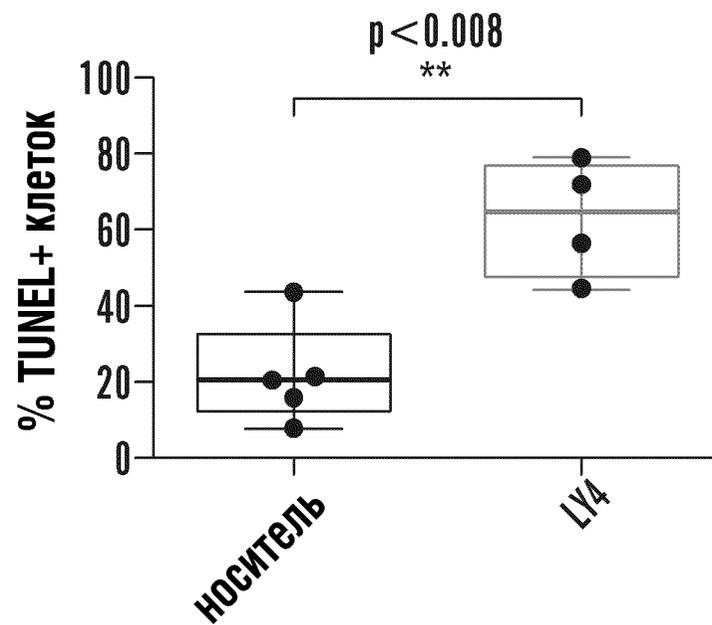
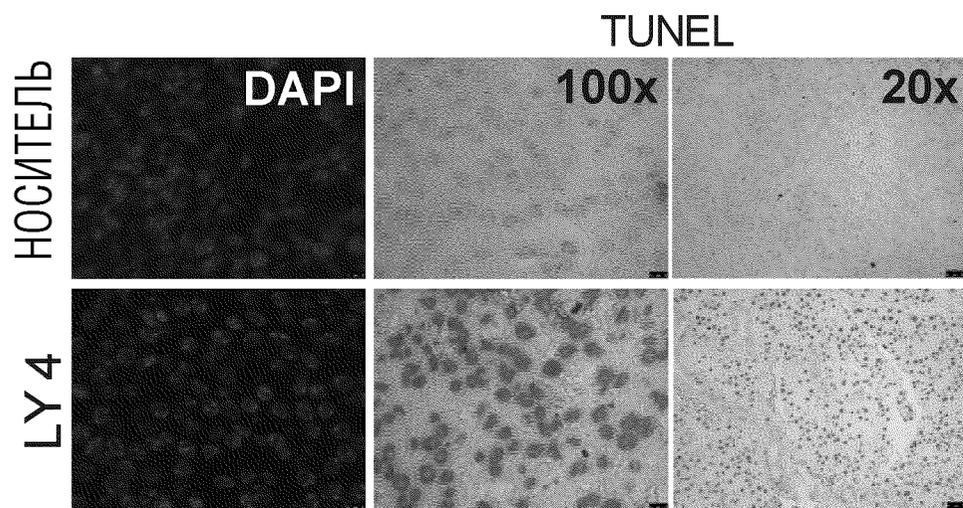
ФИГ.8А



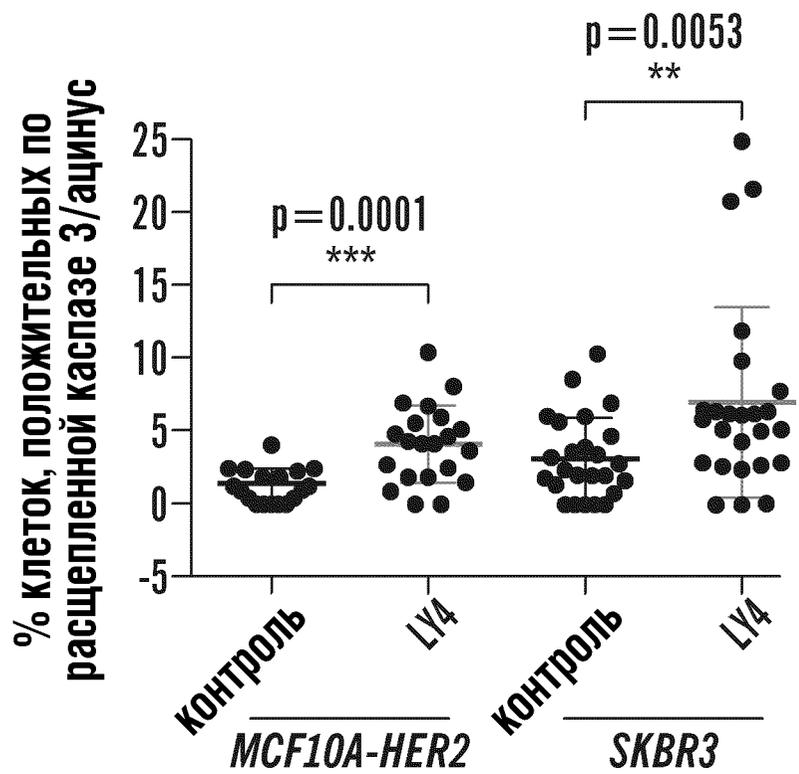
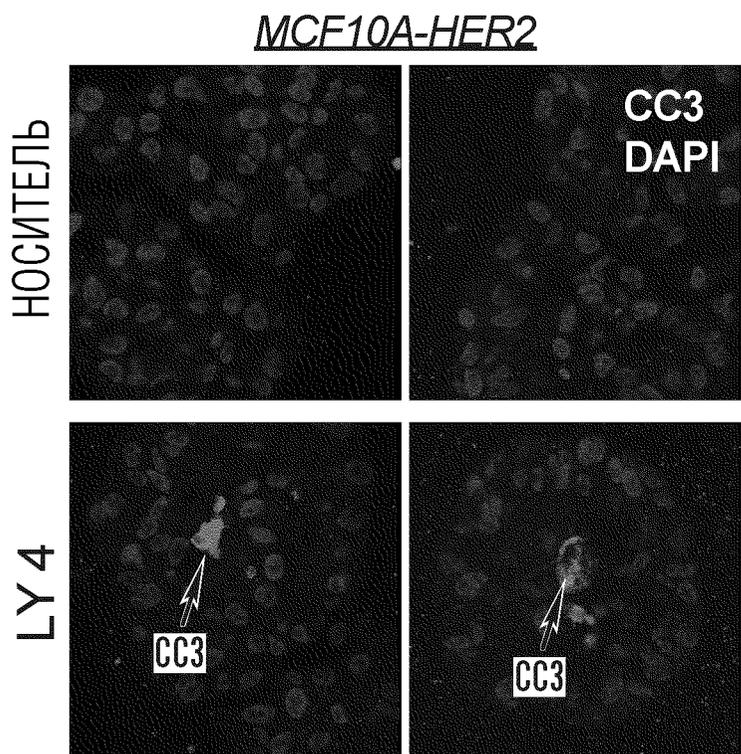
ФИГ.8В



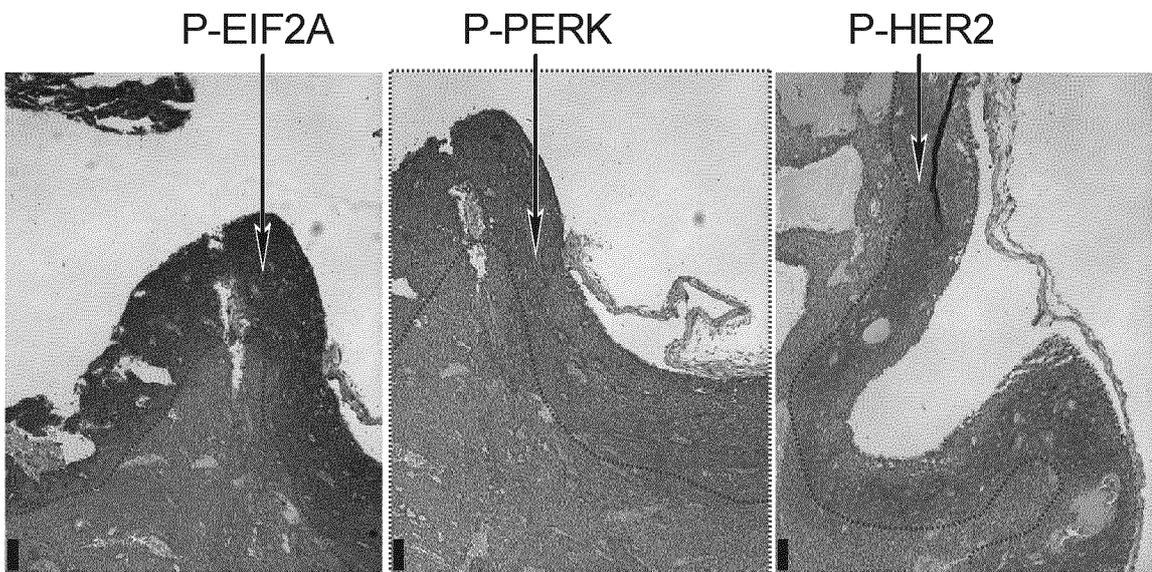
ФИГ.8С



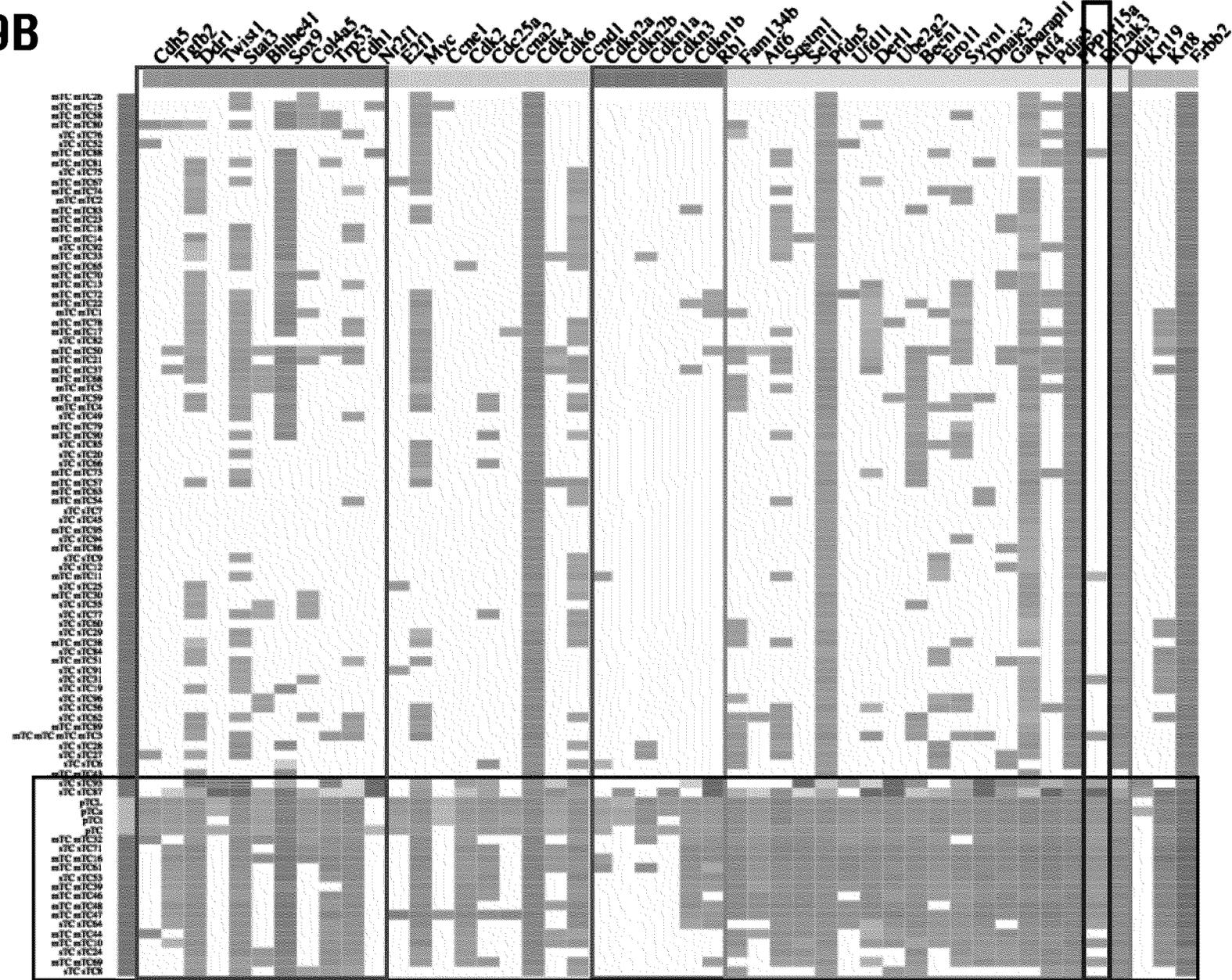
ФИГ.8D



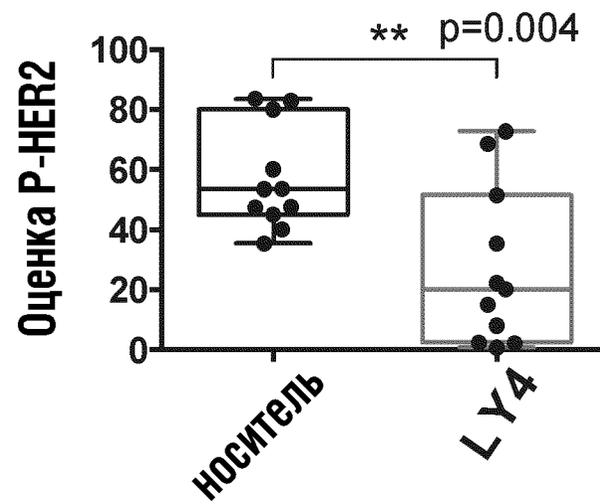
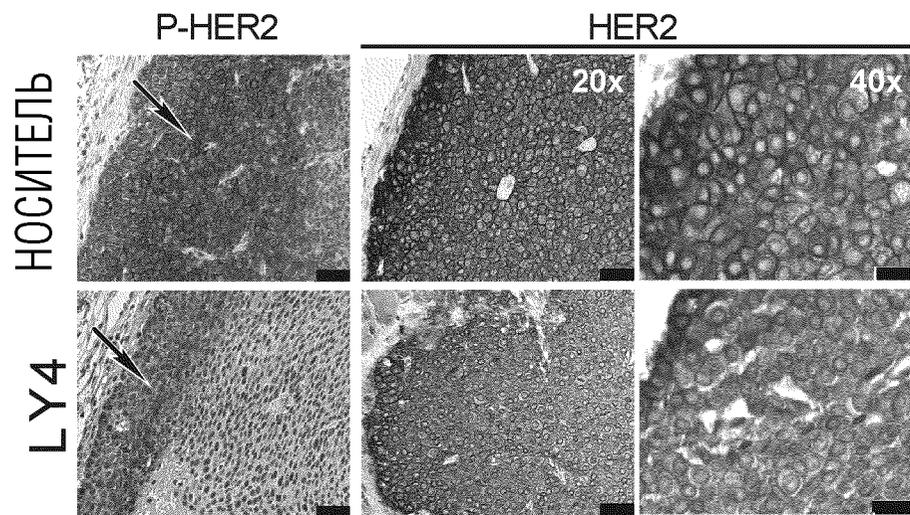
ФИГ.9А



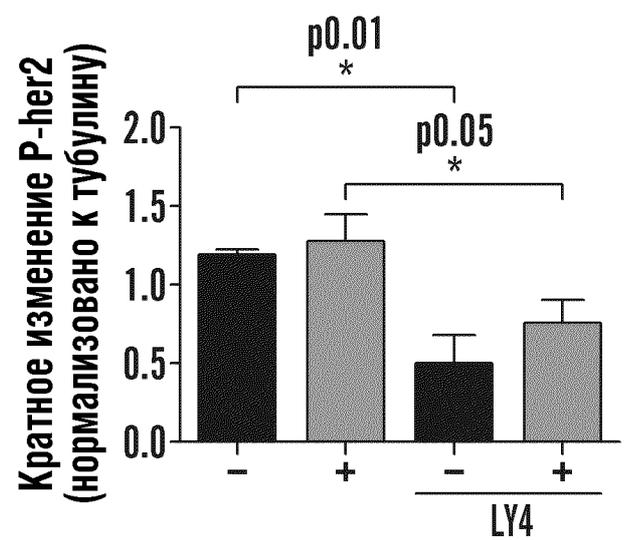
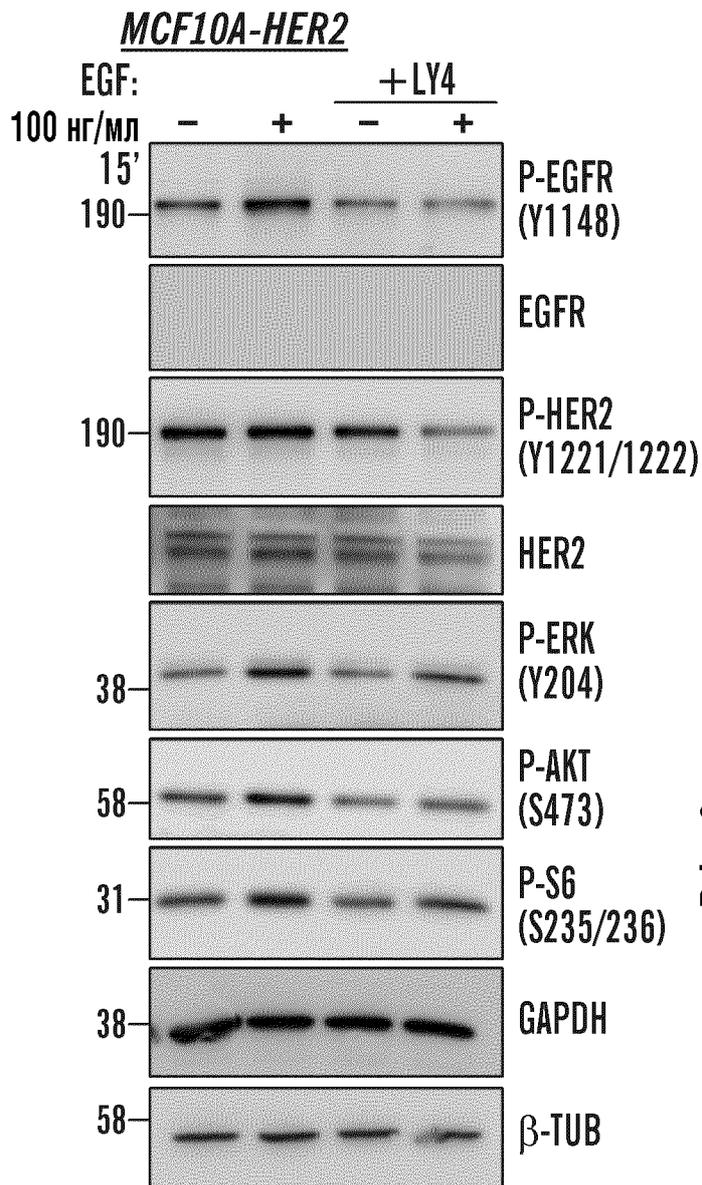
ФИГ.9В



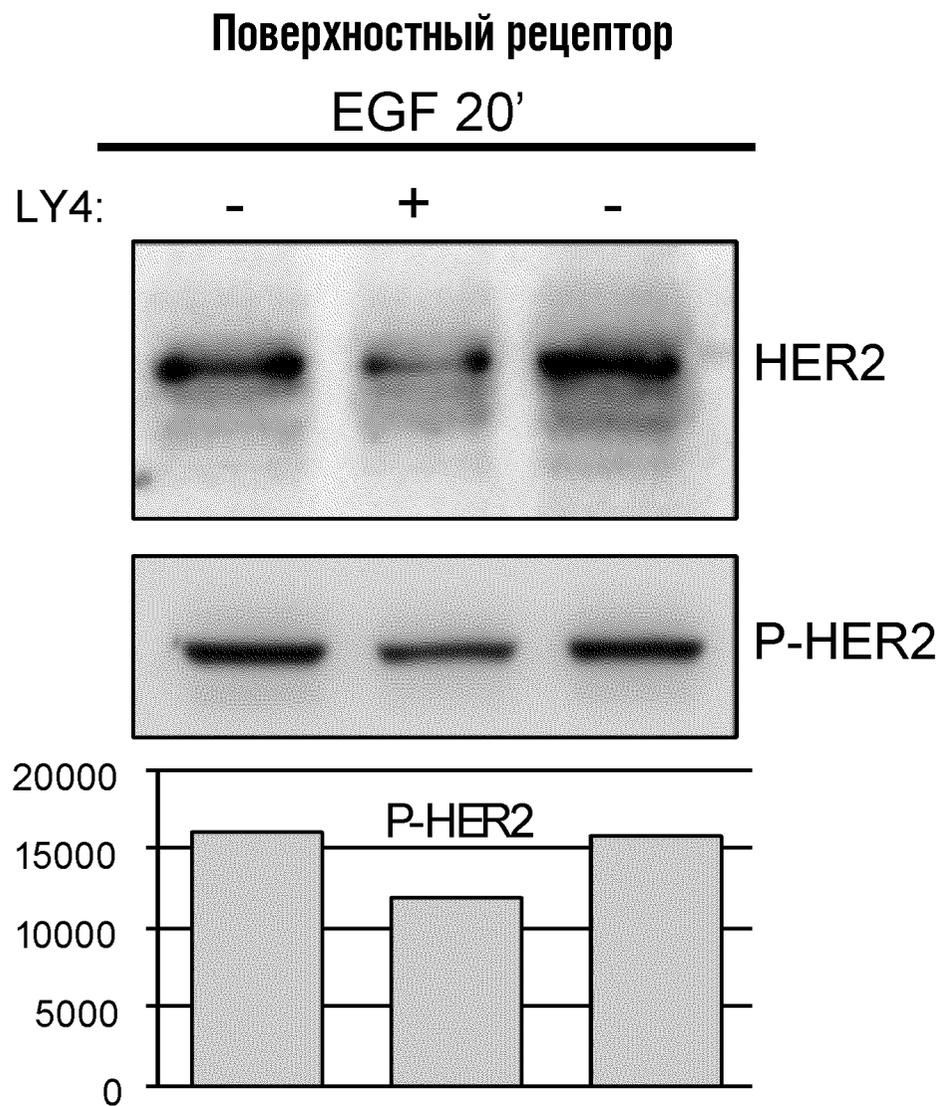
ФИГ.9С



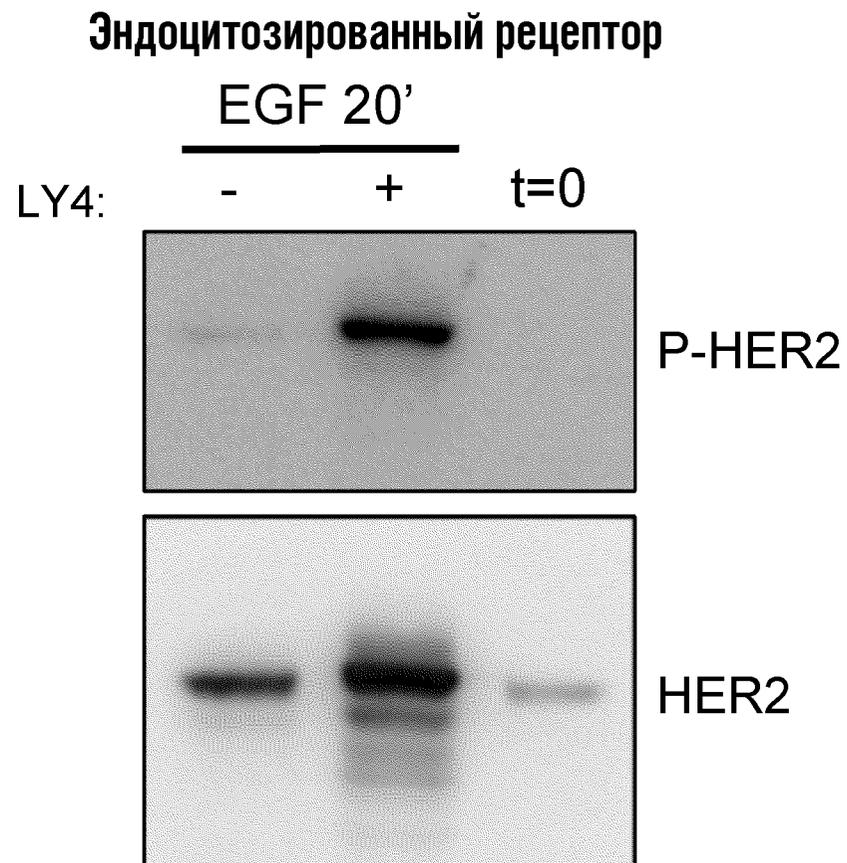
ФИГ.9D



ФИГ.9Е

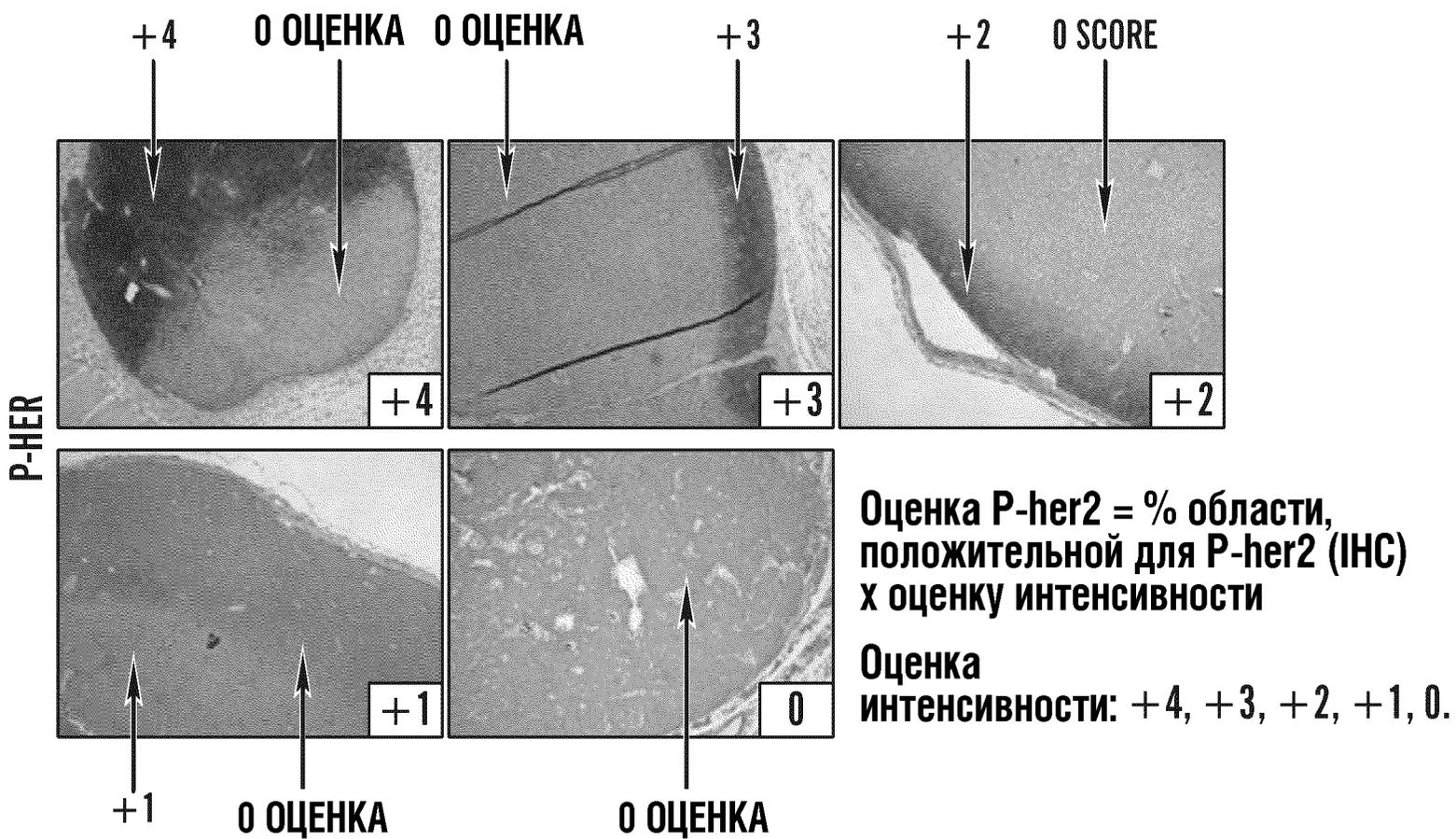


ФИГ.9F

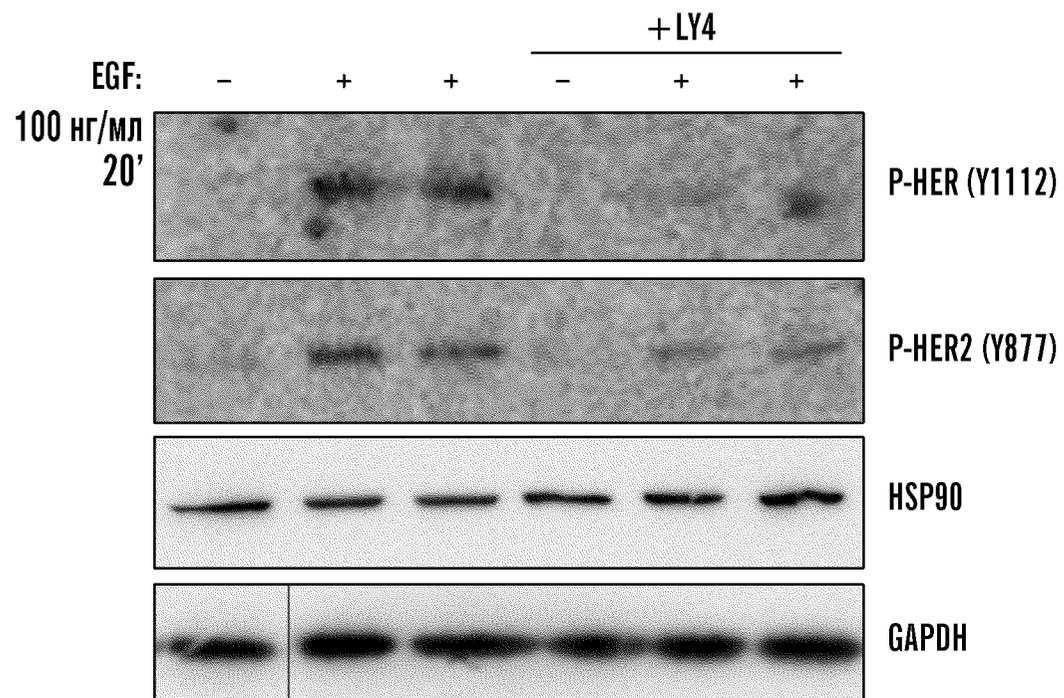


37/58

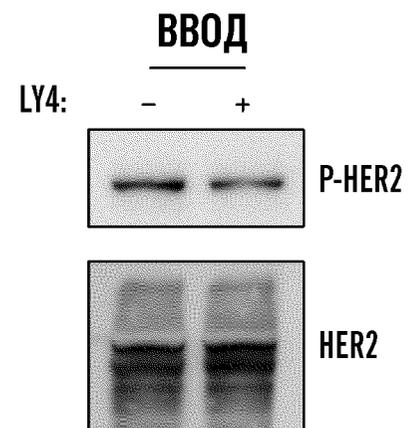
ФИГ.10А



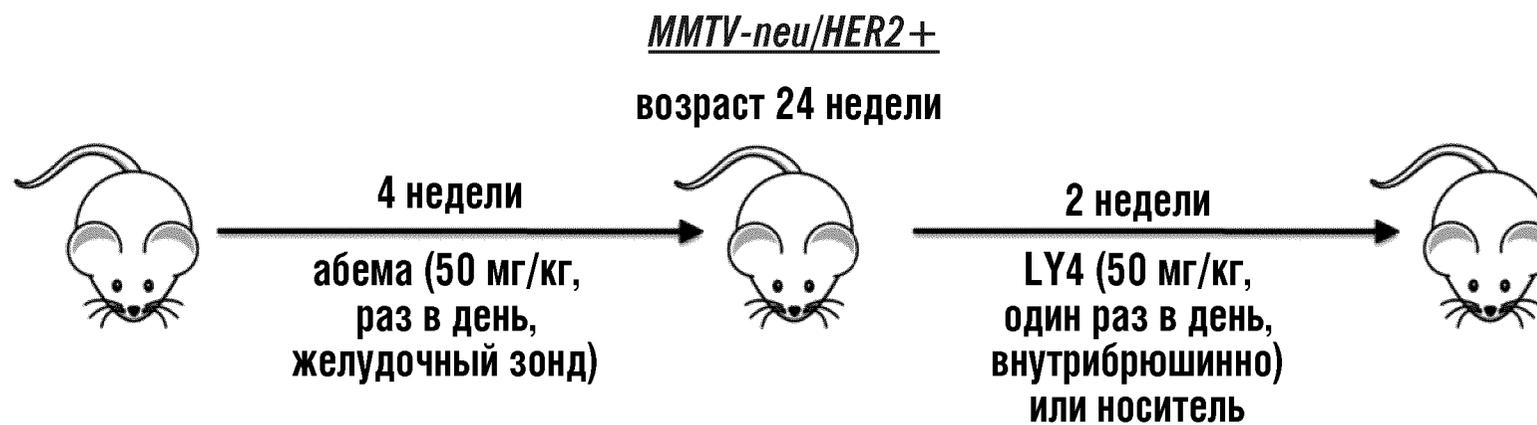
ФИГ.10В



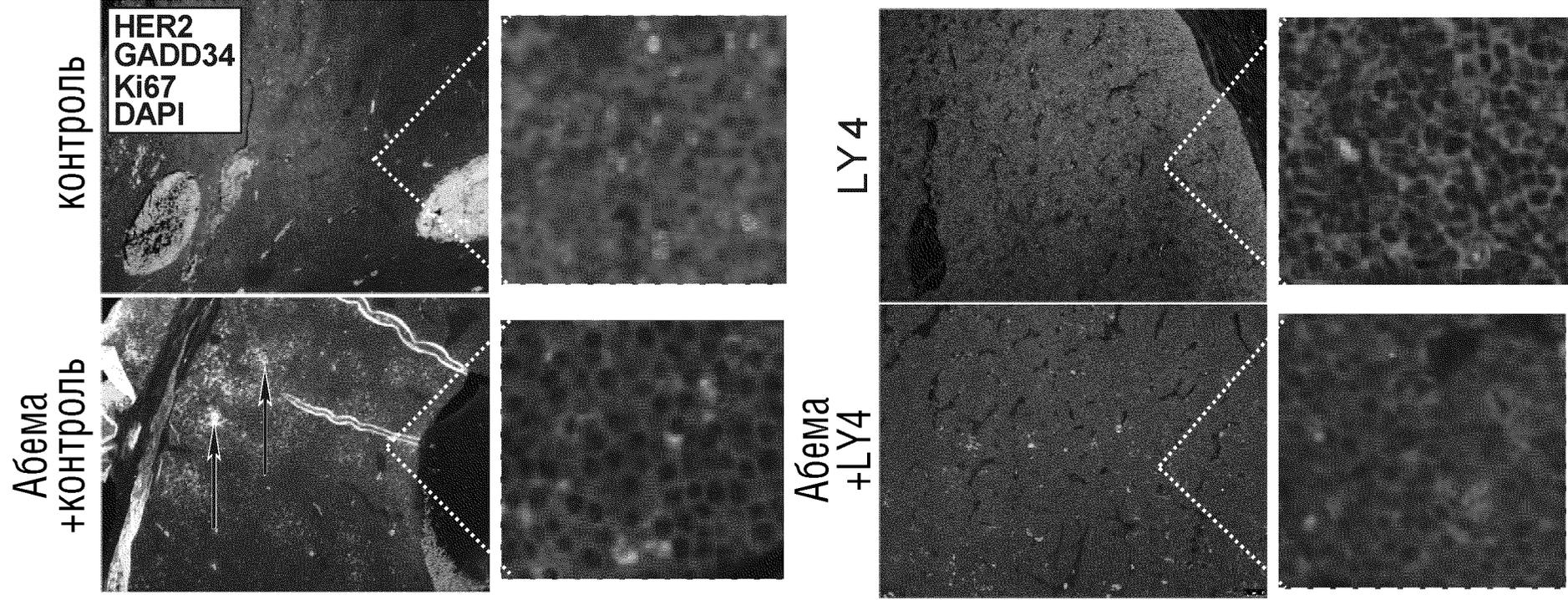
ФИГ.10С



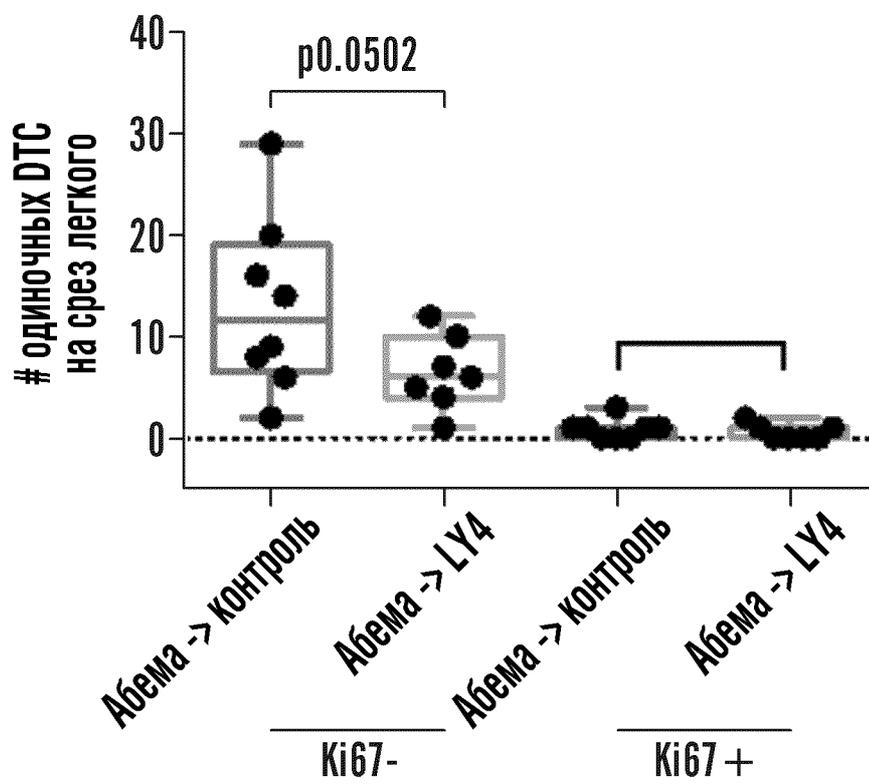
ФИГ.11А



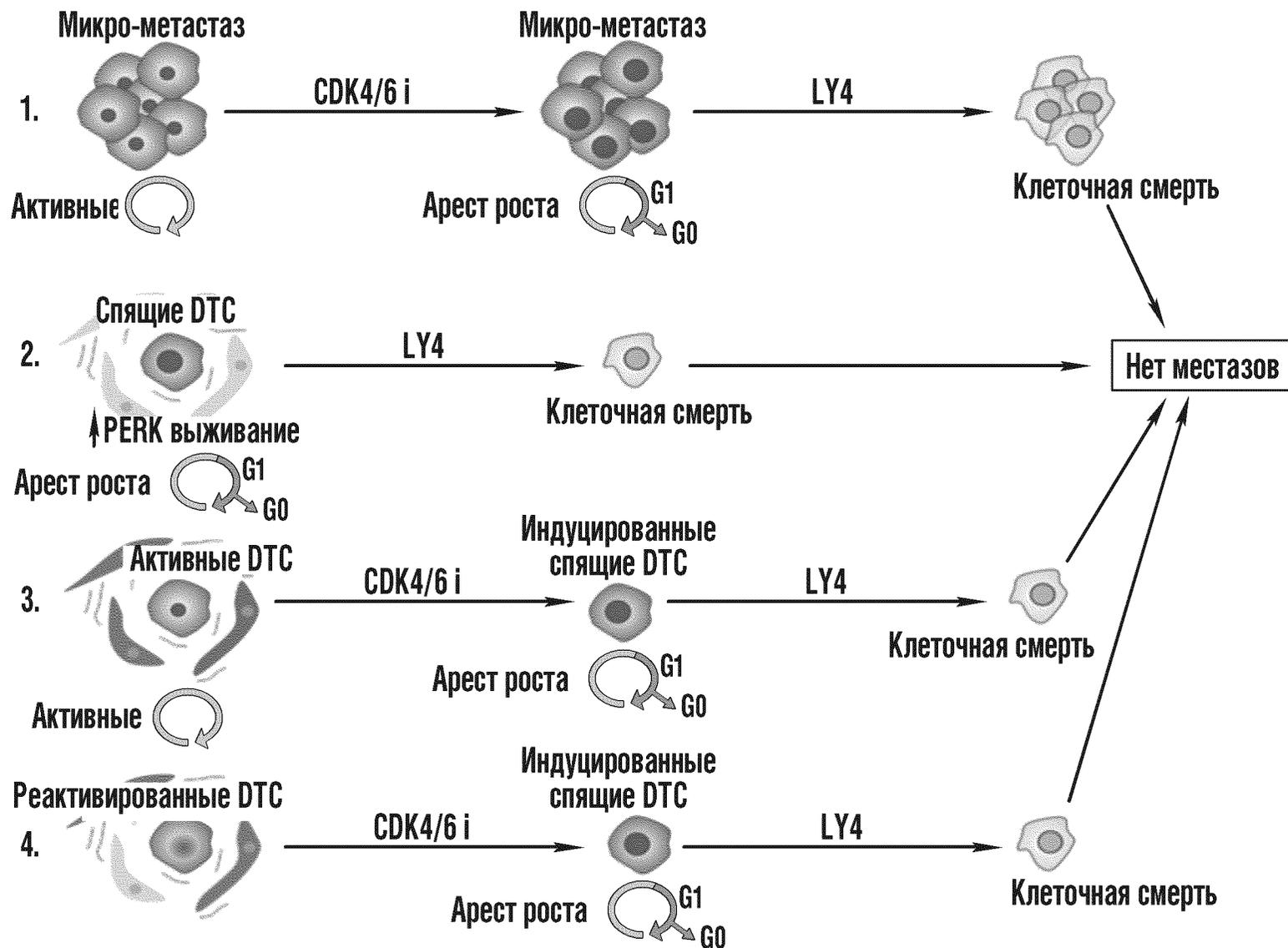
ФИГ.11В



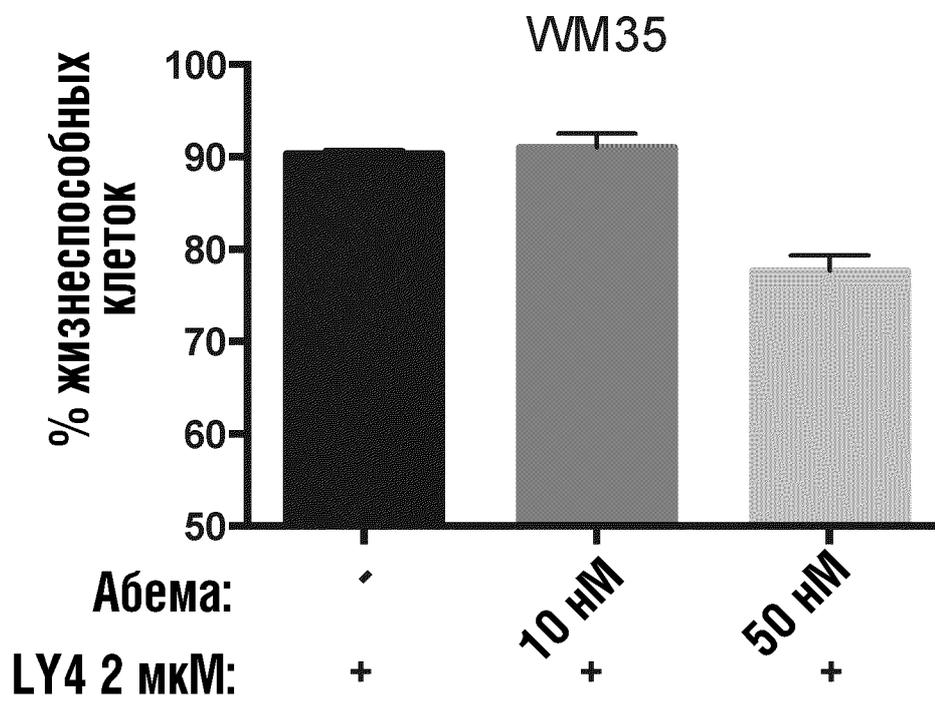
ФИГ.11Е



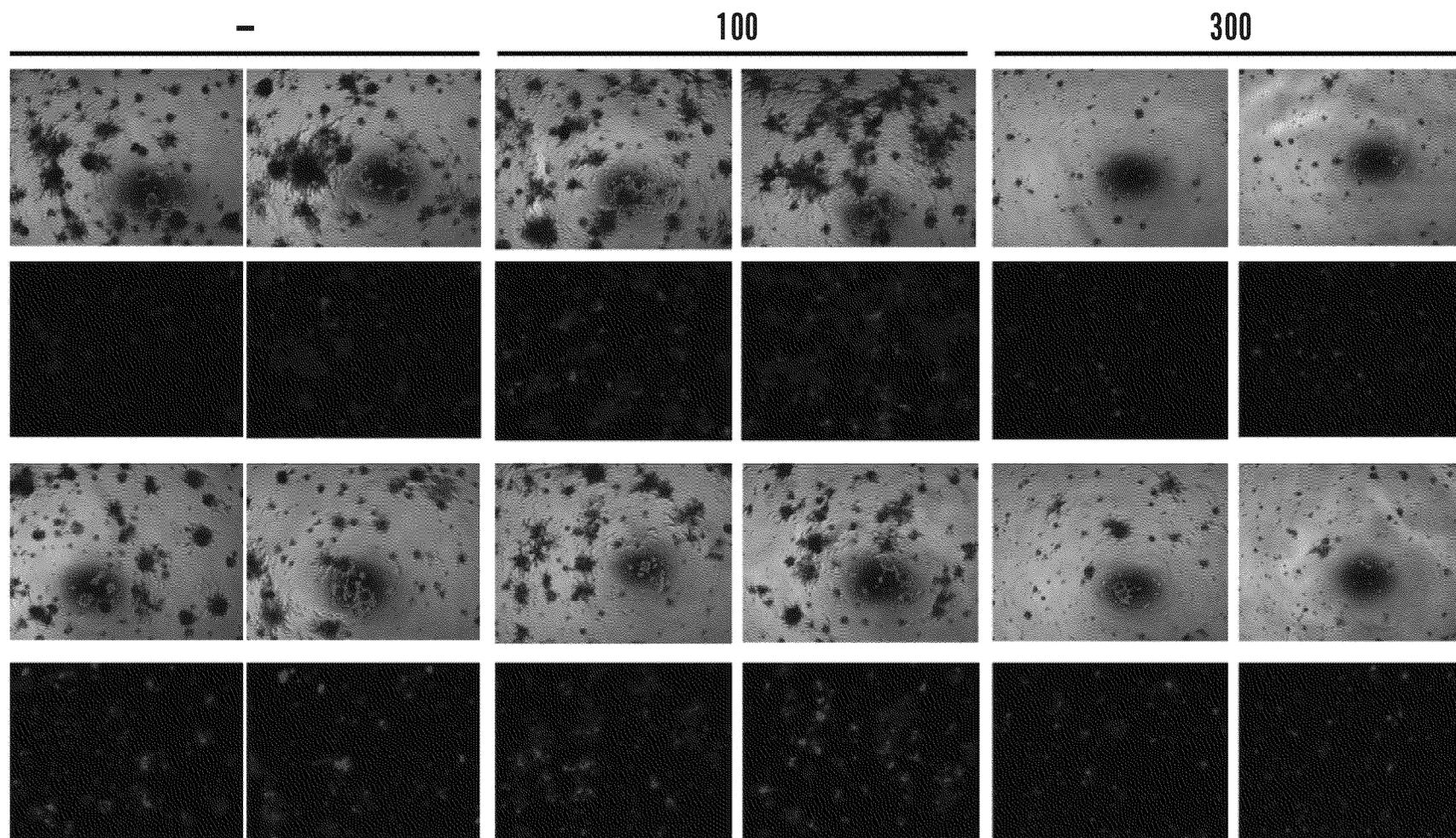
ФИГ.12А



ФИГ.12В



ФИГ.12С

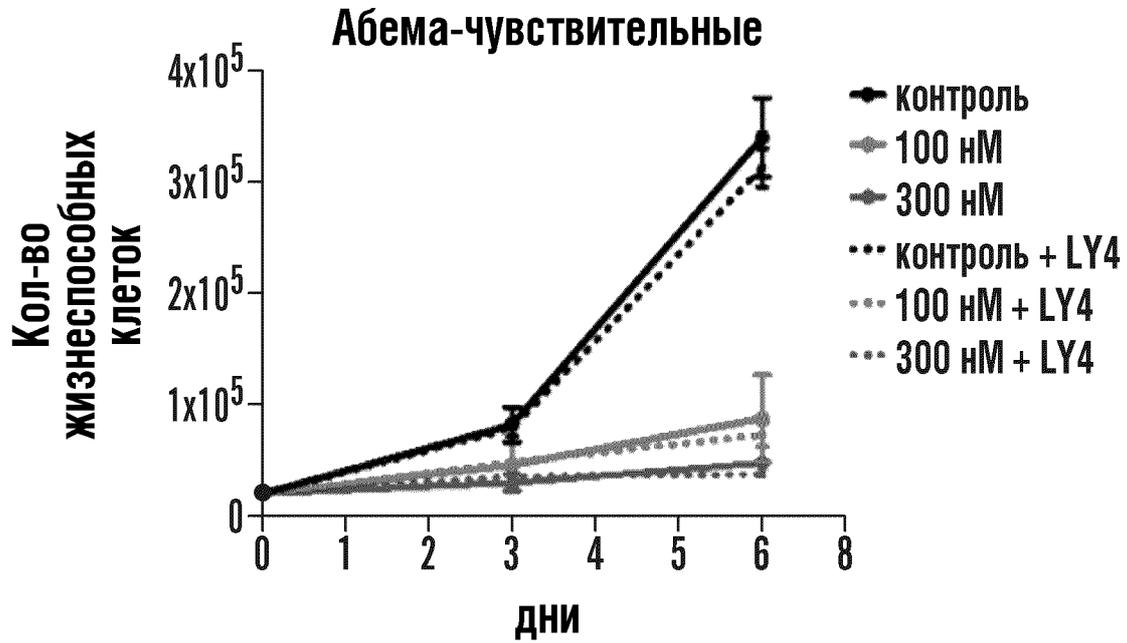


46/58

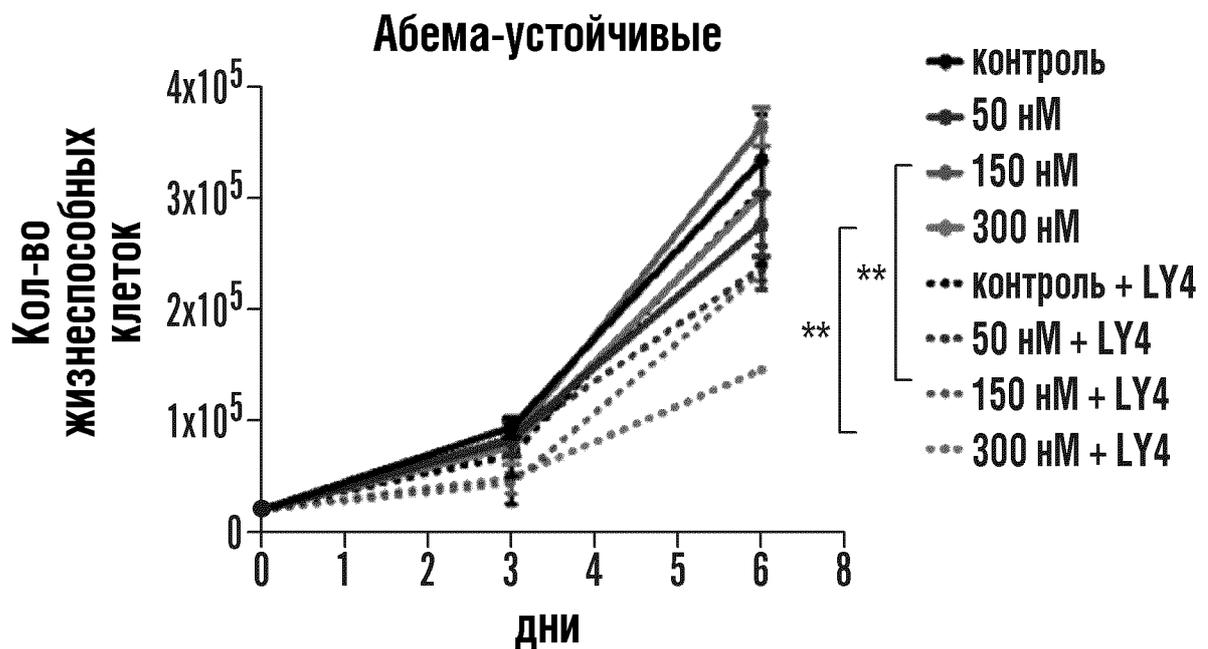
+LV4

День 17 (d14 LY)

ФИГ.12D

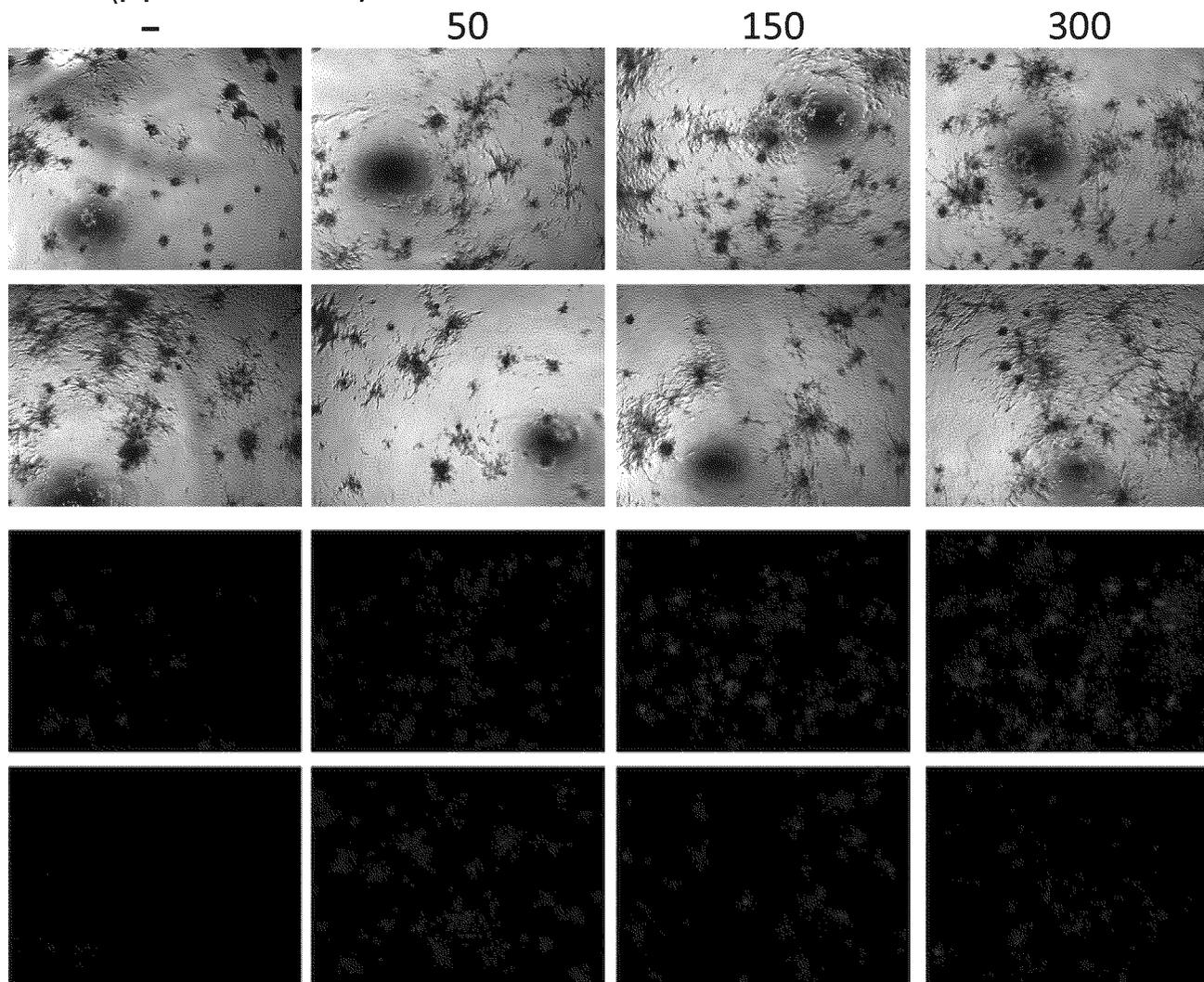


ФИГ.12E

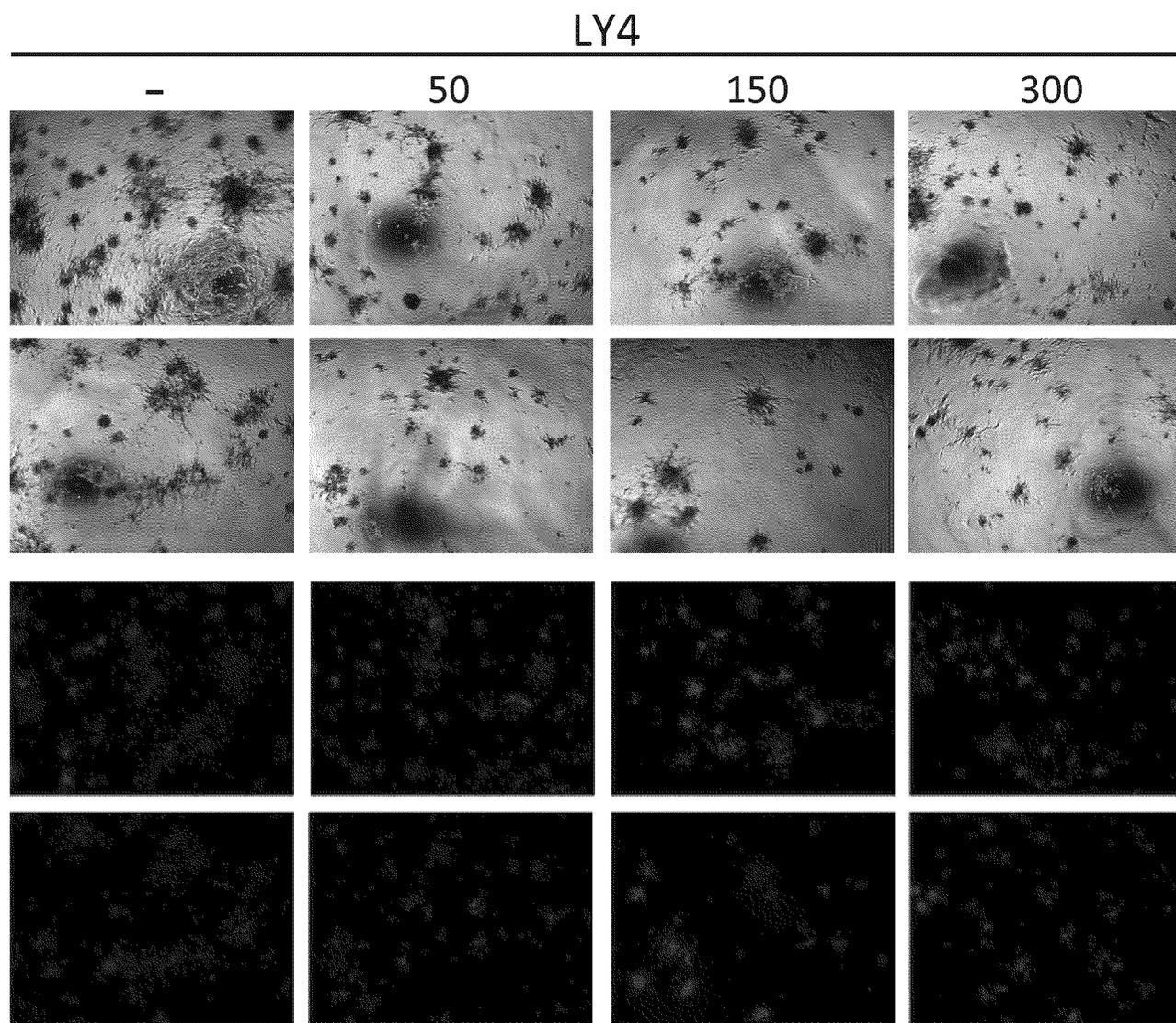


ФИГ.12F

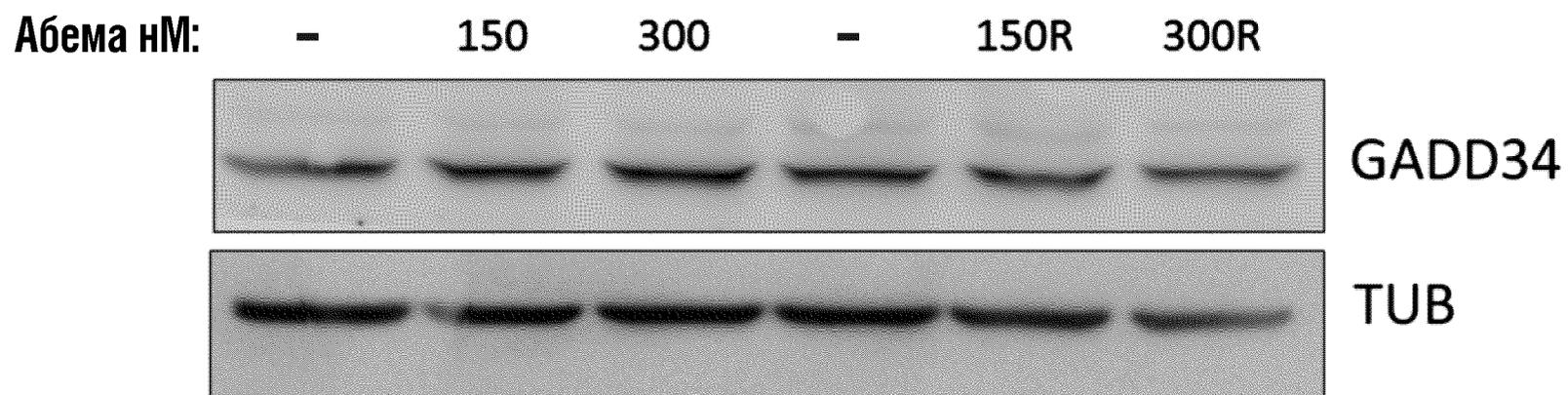
День 15 (День 12 LY4)



ФИГ.12F (продолжение)

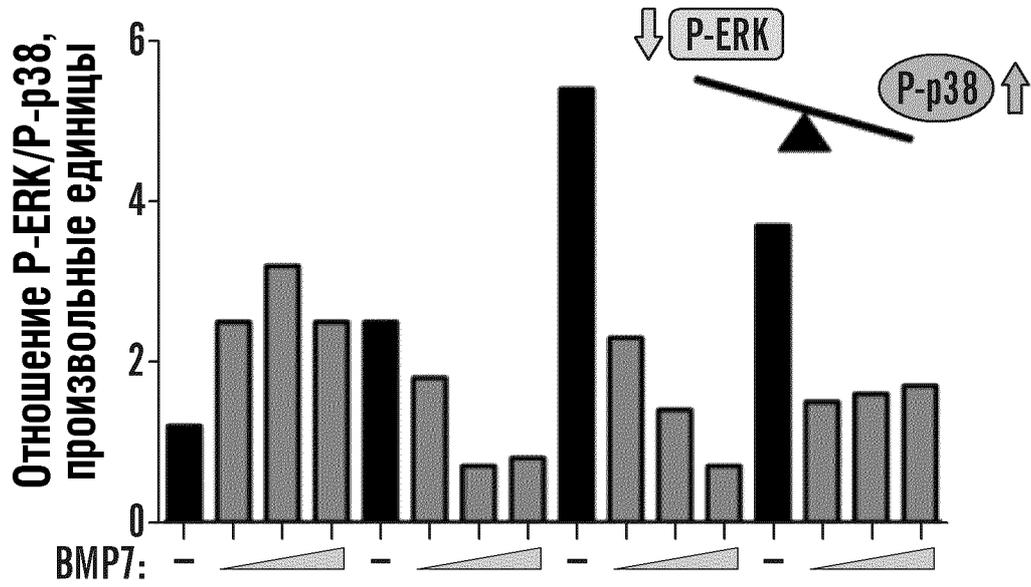


ФИГ.12G

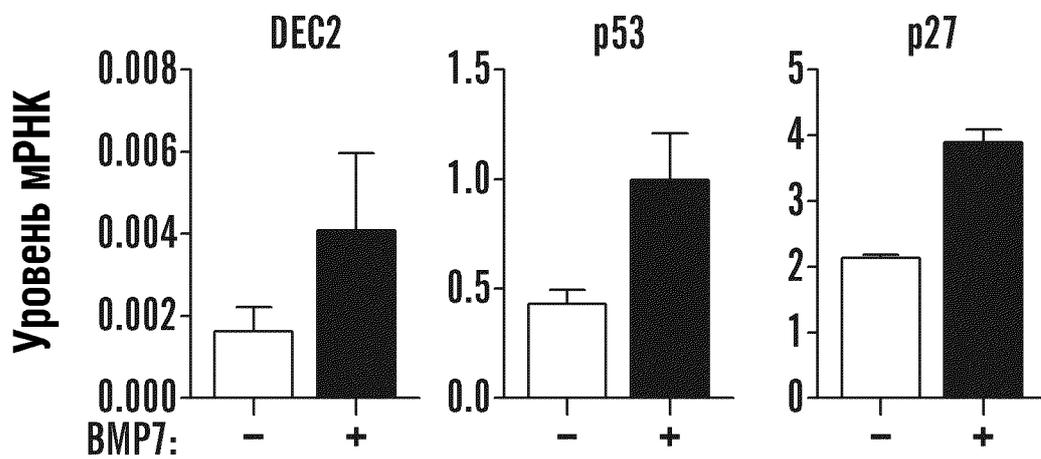


50/58

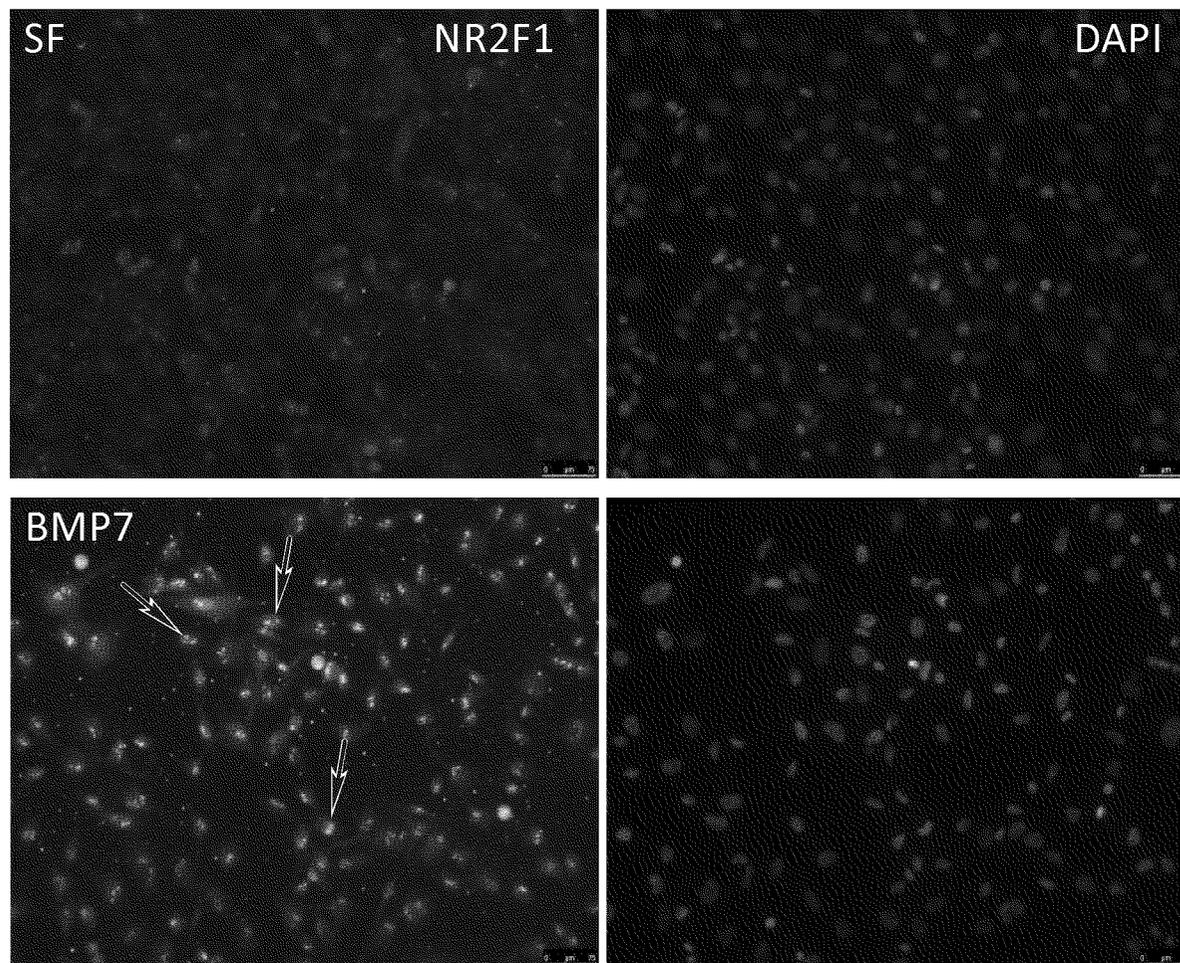
ФИГ.13А



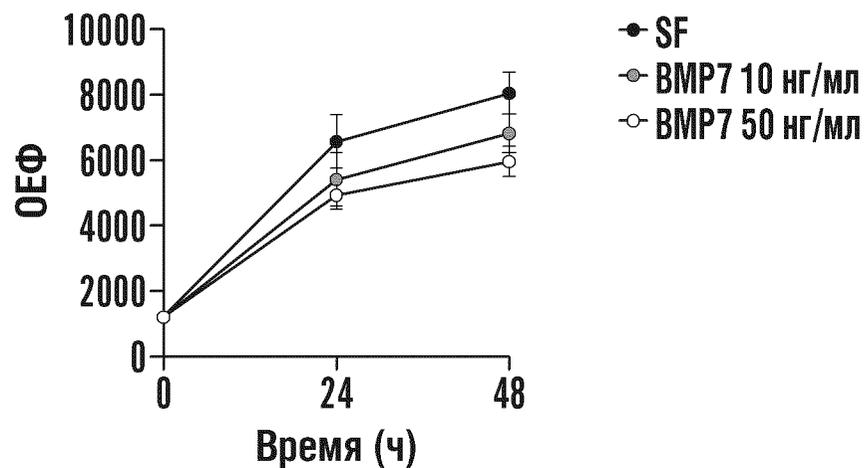
ФИГ.13В



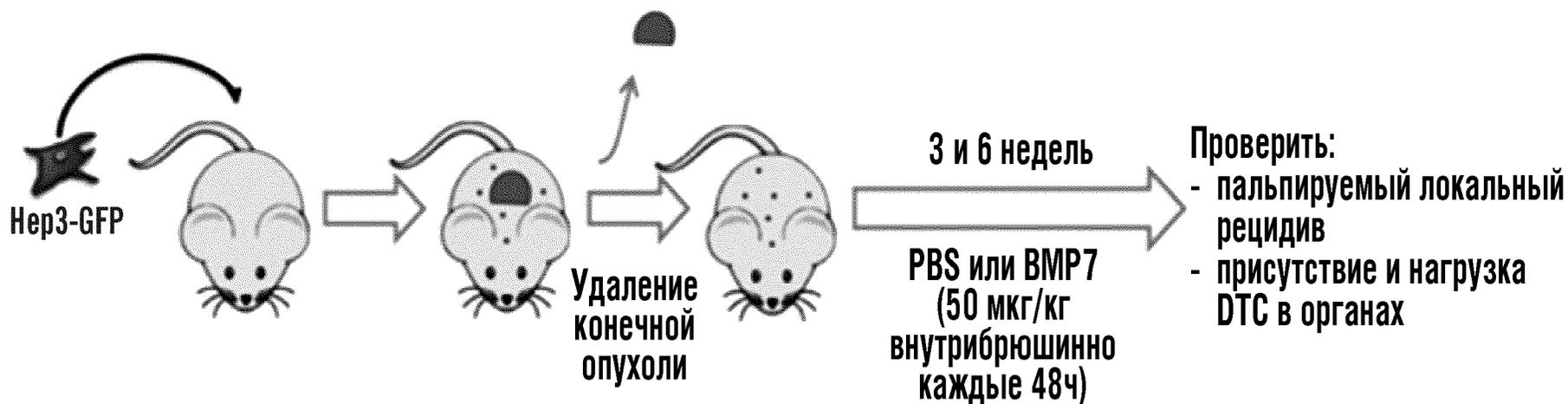
ФИГ.13С



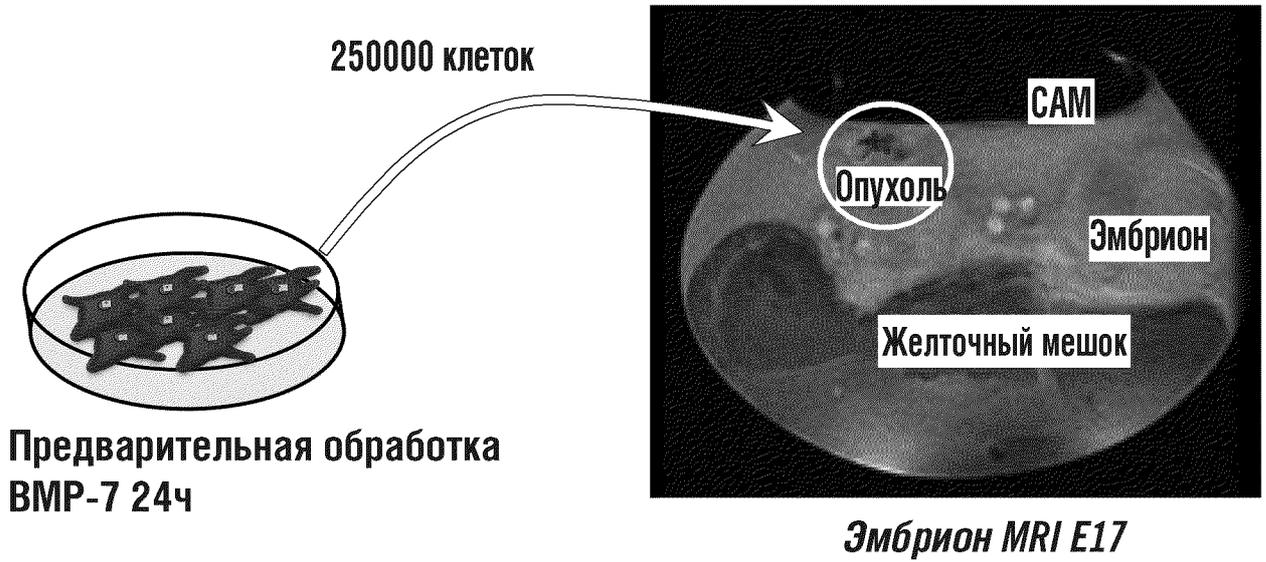
ФИГ.14А



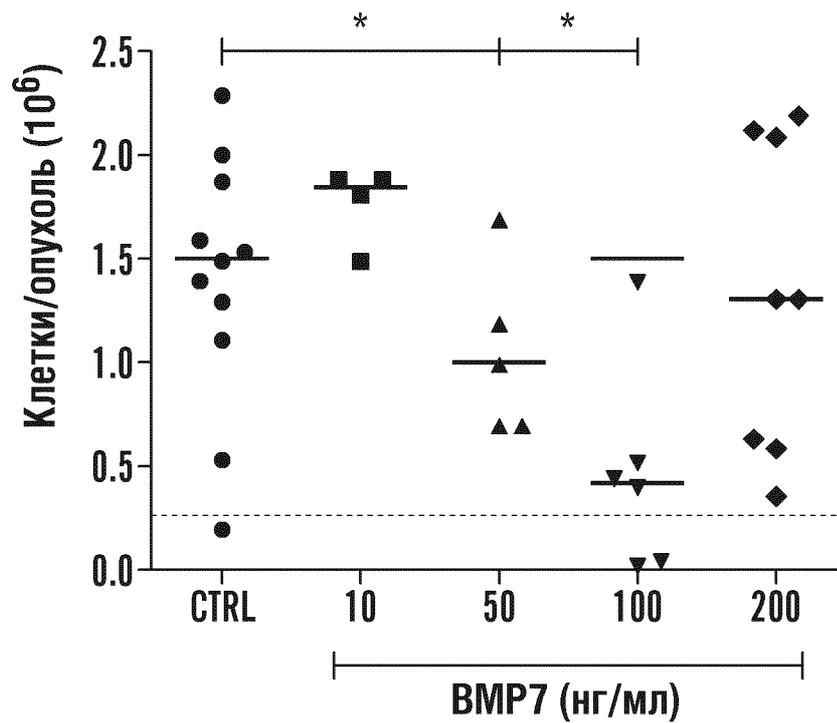
ФИГ.14В



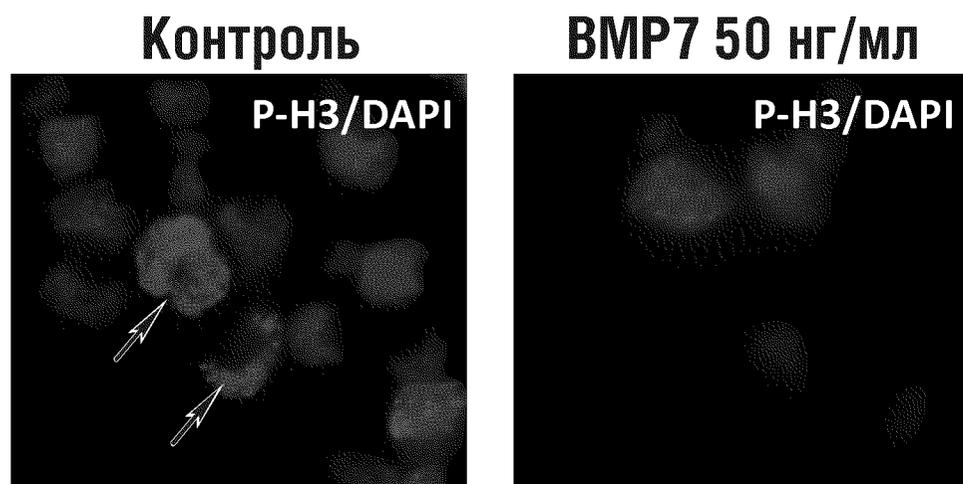
ФИГ.14С



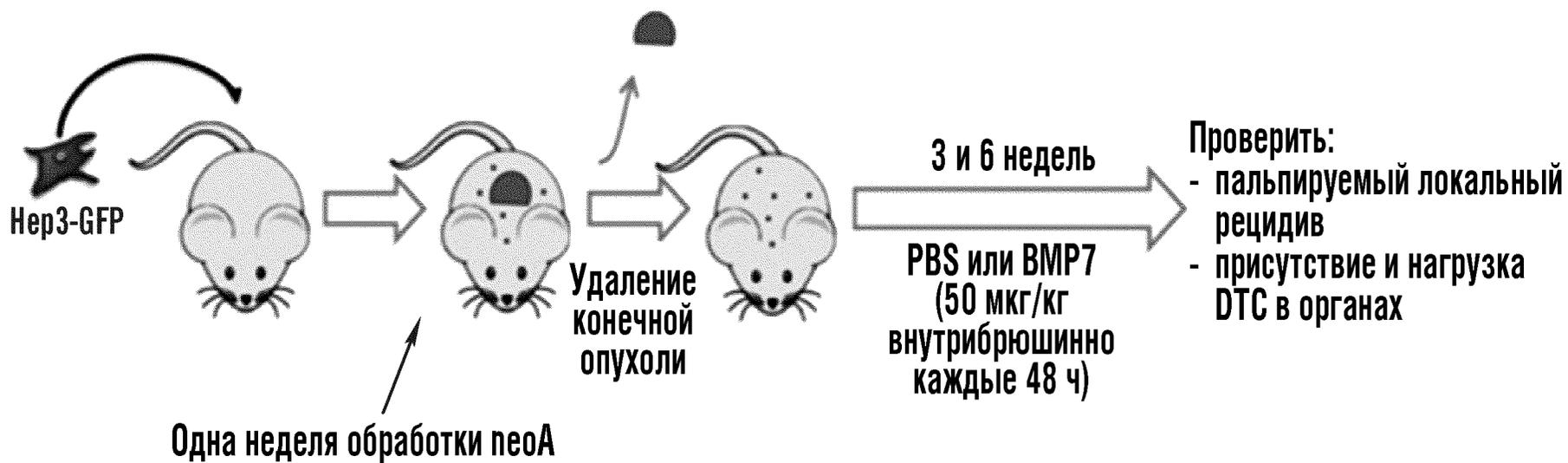
ФИГ.14D



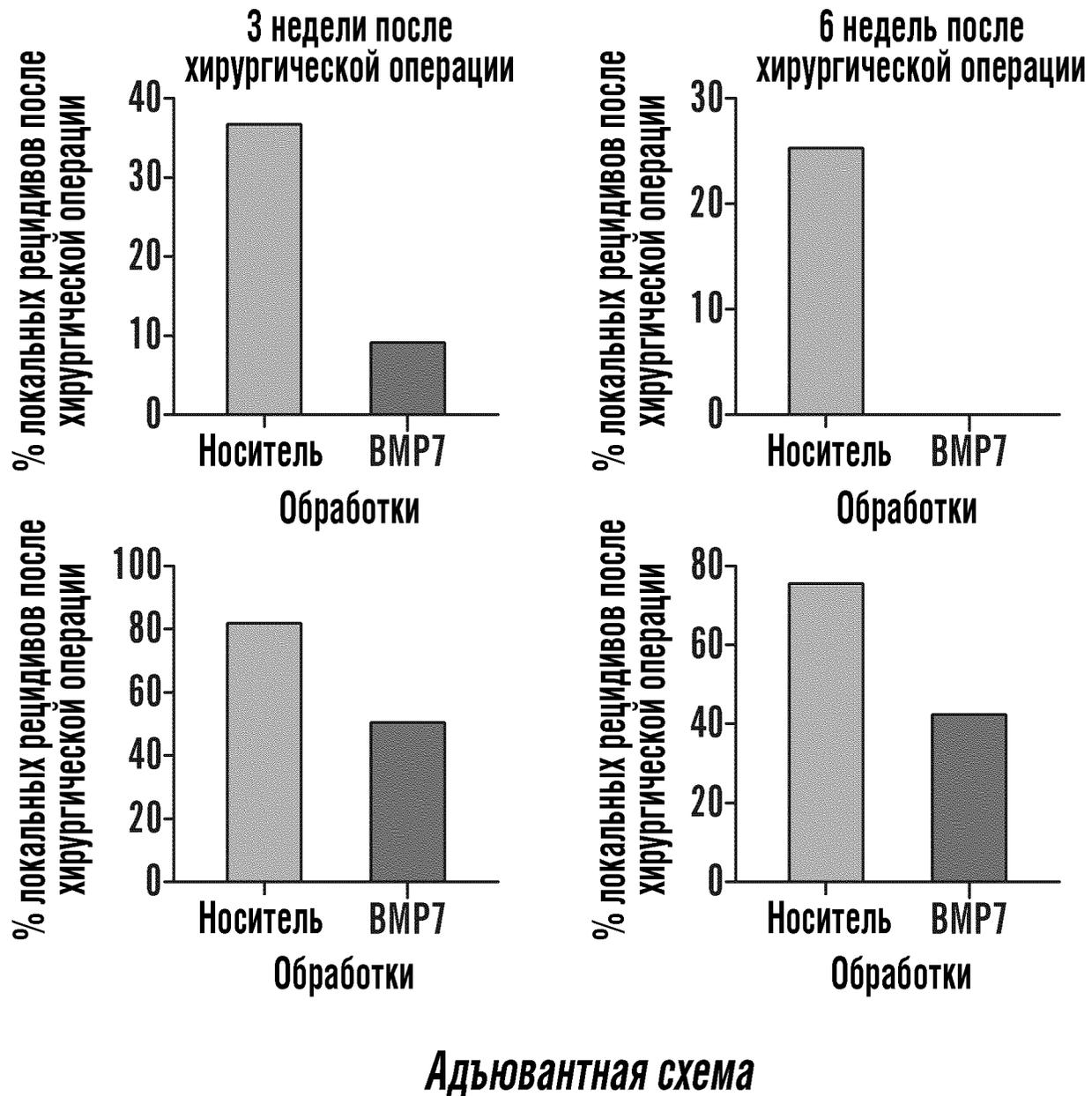
ФИГ.14Е



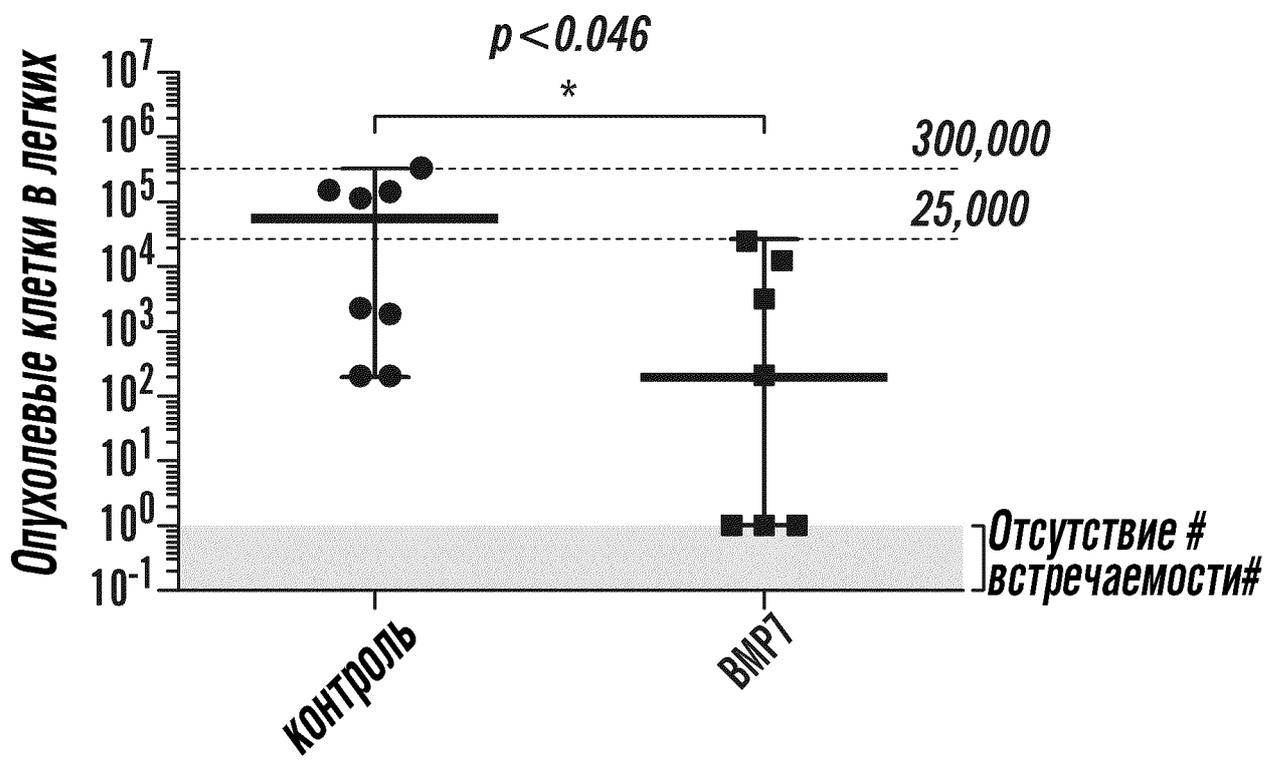
ФИГ.15А



ФИГ.15В



ФИГ.15С



Нео-адьювант - адьювантная схема