

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292657** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2023.01.02

(51) Int. Cl. *A61K 38/46* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/04* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.03.19

**(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗУБЧАТОГО КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**

(31) 62/992,819

(32) 2020.03.20

(33) US

(86) PCT/US2021/023141

(87) WO 2021/188887 2021.09.23

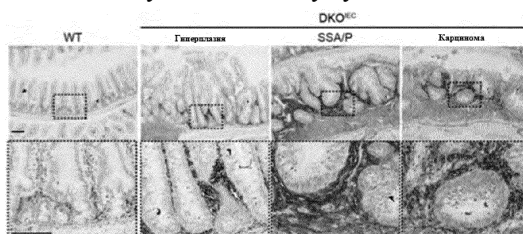
(88) 2021.11.04

(71) Заявитель:  
**СЭНФОРД БЕРНХЕМ ПРЕБИС  
МЕДИКАЛ ДИСКАВЕРИ  
ИНСТИТУТ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Москат Хорхе, Диас-Меко Мария Т.,  
Дюран Анжелес, Наканиши Юки (US)**

(74) Представитель:  
**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.  
(RU)**

(57) Изобретение относится к способам идентификации субъекта, как имеющего зубчатый колоректальный рак (CRC), и к моделям зубчатого CRC человека. Настоящее изобретение относится также к способам лечения зубчатого CRC у субъекта.



**A1**

**202292657**

**202292657**

**A1**

**КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗУБЧАТОГО**  
**КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА**  
**ОПИСАНИЕ**

**Перекрестная ссылка на родственные заявки**

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/992819, поданной 20 марта 2020 г. Приоритет испрашивается согласно 35 U.S.C. § 119. Вышеуказанная патентная заявка включена в настоящий документ посредством ссылки, как если бы полностью была приведена в настоящем документе.

**Положение относительно финансируемых из федерального бюджета исследований или разработок**

[0002] Настоящее изобретение выполнено при поддержке правительства Соединенных Штатов по грантам № R01CA207177, R01CA172025, R01CA192642 и R01CA218254, выданным Национальным институтом здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на изобретение.

**Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

[0003] Зубчатый аденокарциномный подтип колоректального рака (CRC) насчитывает 15-30% из всех CRC и является агрессивным и устойчивым к лечению. Зубчатый CRC развивается через предшественники очагов, наиболее часто обнаруживаемые в проксимальном отделе ободочной кишки. Зубчатый CRC обычно диагностируют эндоскопически посредством детекции предшественников очагов. Однако предшественники очагов сложно идентифицировать у пациента из-за ограничений, присущих технологии или специалисту в области эндоскопии. В качестве неограничивающего примера, плоские очаги в восходящей ободочной кишке, покрытые слизистыми крышечками, особенно трудно поддаются идентификации и зарегистрированы для более чем половины зубчатых полипов или аденом. Наконец, представляющие высокий риск зубчатые аденомы часто ошибочно классифицируют как представляющие низкий риск гиперпластические полипы. Таким образом, существует потребность в более точных способах диагностики зубчатого CRC у пациентов для обеспечения надлежащих режимов излечивающего и профилактического лечения.

**Сущность изобретения**

**[0004]** Немногое известно о роли микроокружения опухоли, а именно, стромальных, воспалительных и иммунных ответов, в развитии зубчатого CRC. Считают, что CRC развивается через предшественники очагов, возникающие посредством либо обычных, либо альтернативных путей. Зубчатый CRC происходит из предшественников очагов эндометриальной внутриэпителиальной карциномы (EIC) через альтернативный путь CRC, в отсутствие изменений общепринятых биомаркеров, таких как APC или  $\beta$ -катенин. Альтернативный путь начинается с формирования зубчатой аденомы, которая постепенно прогрессирует до злокачественной EIC. EIC является ассоциированной с активацией каскада MAPK, иногда в результате активирующих мутаций в *KRAS* или *BRAF*. Однако эти мутации не присутствуют во всех зубчатых аденомах, так что ранняя детекция мутаций в *KRAS* или *BRAF* имеет ограниченное применение в детекции зубчатого CRC на ранних стадиях.

**[0005]** Зубчатые предшественники очагов являются ассоциированными с транскрипционным подтипом CRC, который имеет очень плохой прогноз. Не существует четкого терапевтического соглашения относительно того, как следует лечить, или следует ли лечить CRC, возникающий посредством пути, приводящего к возникновению зубчатых очагов, в клинике способом, отличным от способа для обычного CRC, несмотря на явные отличия механизмов между ними двумя. Иммунотерапия может являться целесообразным вариантом для пациентов с зубчатым CRC. В качестве неограничивающего примера, ингибиторы иммунной контрольной точки белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1) представляют собой многообещающее терапевтическое решение для конкретных субклинических фенотипов зубчатого CRC, но не для всех из них. Следовательно, понимание иммунологического окружения зубчатых опухолей является крайне важным для идентификации более эффективных способов терапии.

**[0006]** Хронические воспалительные заболевания кишечника являются ассоциированными с повышенным риском CRC. Атипичная протеинкиназа C ( $\alpha$ PKC)  $\lambda/1$  (PKC  $\lambda/1$ ; кодируемая геном *PRKCI*) является регулятором воспаления кишечника, в частности, в контексте воспалительных заболеваний кишечника (IBD), таких как болезнь Крона (CD) и язвенный колит (UC). PKC  $\lambda/1$  является необходимой для дифференцировки клеток Панета и является отрицательным регулятором клеточной смерти в эпителии кишечника. Уровни PKC  $\lambda/1$  уменьшаются в клетках Панета пациентов с CD таким образом, что коррелируют с прогрессированием заболевания. Кроме того, анализ выживаемости Каплана-Мейера пациентов с CRC показал, что низкие уровни PKC  $\lambda/1$  коррелируют со значительно худшими показателями выживаемости пациентов. Без намерения связи с какой-либо конкретной теорией, это провоспалительное окружение

эпителия кишечника с недостаточностью РКС  $\lambda/1$  может быть связано с дефектным барьером из-за нарушенной дифференцировки клеток Панета и увеличенной смерти эпителиальных клеток кишечника (ИЕС). Интересно, что даже в присутствии хронического воспаления, избирательная генетическая инактивация РКС  $\lambda/1$  в эпителии кишечника не приводит к онкогенезу, если не присутствует в комбинации с недостаточностью *Apc*, в случае чего количество аденом кишечника значительно увеличивается посредством механизма, который зависит от воспаления и микробиома; однако, эти аденомы никогда не прогрессируют до агрессивных и инвазивных стадий. Считают, что аРКС, РКС $\zeta$  (кодируемая геном *PRKCZ*), может компенсировать потерю РКС  $\lambda/1$  посредством сохранения путей, которые могут предотвращать инициацию и прогрессирование рака в кишечниках с недостаточностью РКС  $\lambda/1$ .

**[0007]** В настоящем документе раскрыто, что генетическая инактивация обеих аРКС приводит к спонтанному онкогенезу посредством пути, приводящего к возникновению зубчатых очагов, которые прогрессируют до CRC на поздних стадиях. Недостаточность эпителиальной РКС  $\lambda/1$  приводит к смерти иммуногенных клеток, которые репрессируют инициацию образования опухоли. В то же время, потеря РКС $\zeta$  приводит к нарушению ответов интерферона и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, сопровождающемуся стромальной активацией и иммуносупрессией. Таким образом, РКС $\zeta$  и РКС  $\lambda/1$  совместно супрессируют онкогенез зубчатых опухолей. Таким образом, низкие уровни РКС $\zeta$  и РКС  $\lambda/1$ , детектированные в образце, полученном от субъекта, могут являться показателем того, что субъект имеет или у него может развиваться зубчатый CRC.

**[0008]** В настоящем документе раскрыто также, что в зубчатых опухолях у мышей из линий клеток мышей с делецией РКС $\zeta$  и РКС  $\lambda/1$  показана увеличенная экспрессия гиалуронана (НА) и CD44, который является рецептором для НА и маркером раковых стволовых клеток. Это увеличение уровня гиалуронана сопровождается значительным уменьшением уровней других маркеров стволовых клеток. Эти обнаружения позволяют предполагать, что детекция либо НА, либо CD44, или комбинации НА и CD44, в образце, полученном от субъекта, может являться показателем того, что субъект имеет или у него может развиваться зубчатый CRC.

**[0009]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам лечения подтипа заболевания или состояния у субъекта посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), при условии, что низкие уровни экспрессии РКС $\zeta$  и РКС $\lambda/1$  детектированы в биологическом образце, полученном от



субъекта, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень экспрессии гиалуронана детектирован в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с уровнем экспрессии гиалуронана у индивидуума, не имеющего подтип заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень гиалуронана детектирован посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень экспрессии гиалуронана включает рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$ , детектированная в биологическом образце, полученном от субъекта, является показателем увеличения экспрессии гиалуронана в биологическом образце, по сравнению с индивидуумом, не имеющим подтип заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления, заболевание или состояние включает колоректальный рак, рак поджелудочной железы, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, фиброз, фибростеноз или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, подтип заболевания или состояния включает заболевание или состояние, характеризующееся увеличением уровня гиалуронана в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с индивидуумом, не имеющим подтип заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления, подтип заболевания или состояния включает заболевание или состояние, характеризующееся зубчатыми полипами в кишечнике субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления, зубчатые полипы включают сидячие зубчатые аденомы (SSA). Согласно некоторым вариантам осуществления, подтип заболевания или состояния включает заболевание или состояние, характеризующееся зубчатой аденокарциномой. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым

вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит галунисертиб. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым

вариантам осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии РКСζ и РКСλ/ι детектированы посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии РКСζ и РКСλ/ι включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок.

**[0010]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам ингибирования или уменьшения активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1) у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, предусматривающим: а) идентификацию субъекта как имеющего низкие уровни экспрессии РКСζ и РКСλ/ι, по сравнению с уровнями экспрессии РКСζ и РКСλ/ι у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние; и б) введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают: идентификацию субъекта как имеющего высокий уровень экспрессии гиалуронана, по сравнению с уровнем экспрессии гиалуронана у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровень экспрессии гиалуронана идентифицируют посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровень экспрессии гиалуронана включает рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии РКСζ и РКСλ/ι являются показателями увеличения экспрессии гиалуронана у субъекта, по сравнению с индивидуумом, не имеющим заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, заболевание или состояние включает колоректальный рак (CRC), зубчатый CRC, рак поджелудочной железы, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, фиброз, фибростеноз или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или

экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым

вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит галунисертиб.

**[0011]** Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  идентифицированы посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок.

**[0012]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам лечения подтипа заболевания или состояния у субъекта посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана, при условии, что низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  детектированы в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  индивидуума, не имеющего заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень гиалуронана детектирован в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с уровнем экспрессии гиалуронана у индивидуума, не имеющего подтип заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень гиалуронана детектирован посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, детектированные уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PKC $\lambda$ , детектированная в биологическом образце, полученном от субъекта, является показателем

увеличения экспрессии гиалуронана в биологическом образце, по сравнению с индивидуумом, не имеющим подтип заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления, заболевание или состояние включает колоректальный рак, рак поджелудочной железы, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, фиброз, фибростеноз или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, подтип заболевания или состояния включает заболевание или состояние, характеризующееся увеличением уровня гиалуронана в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с индивидуумом, не имеющим подтип заболевания или состояния. Согласно некоторым вариантам осуществления, подтип заболевания или состояния включает заболевание или состояние, характеризующееся зубчатыми полипами в кишечнике субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления, зубчатые полипы включают сидячие зубчатые аденомы (SSA). Согласно некоторым вариантам осуществления, подтип заболевания или состояния включает заболевание или состояние, характеризующееся зубчатой аденокарциномой. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления,

ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит галунисертиб. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PКС $\zeta$  и PКС $\lambda/1$  детектированы посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PКС $\zeta$  и PКС $\lambda/1$  включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок.

**[0013]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам ингибирования или уменьшения активности или экспрессии гиалуронана у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, предусматривающим: а) идентификацию субъекта как имеющего низкие уровни экспрессии PКС $\zeta$  и PКС $\lambda/1$ , по сравнению с уровнями экспрессии PКС $\zeta$  и PКС $\lambda/1$  у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние; и b) введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора

активности или экспрессии гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают: идентификацию субъекта как имеющего высокий уровень экспрессии гиалуронана, по сравнению с уровнем экспрессии гиалуронана у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровень экспрессии гиалуронана идентифицируют посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень экспрессии гиалуронана включает рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  являются показателями увеличения экспрессии гиалуронана у субъекта, по сравнению с индивидуумом, не имеющим заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, заболевание или состояние включает колоректальный рак (CRC), зубчатый CRC, рак поджелудочной железы, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, фиброз, фибростеноз или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту



терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит галунисертиб. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  идентифицированы посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa), или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или

экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу.

**[0014]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам смягчения или предотвращения онкогенеза у субъекта с зубчатым колоректальным раком (CRC) посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана, при условии, что низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda$ /1 детектированы в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda$ /1 у индивидуума, не имеющего зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень экспрессии гиалуронана детектирован в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с уровнем экспрессии гиалуронана у индивидуума, не имеющего CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень экспрессии гиалуронана детектирован посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень экспрессии гиалуронана включает рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda$ , детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются показателями увеличения

экспрессии гиалуронана в биологическом образце, по сравнению с индивидуумом, не имеющим зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит галунисертиб. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит

антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  детектированы посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок.

**[0015]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам смягчения или предотвращения онкогенеза у субъекта с зубчатым колоректальным раком (CRC) посредством способа, предусматривающего: а) идентификацию субъекта как имеющего низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$ , по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  у индивидуума, не имеющего зубчатый CRC; и б) введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают: идентификацию субъекта как имеющего высокий уровень экспрессии гиалуронана, по сравнению с уровнем экспрессии гиалуронана у индивидуума, не имеющего CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, высокий уровень экспрессии гиалуронана идентифицируют посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровень экспрессии гиалуронана включает рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  являются показателями увеличения экспрессии гиалуронана у

субъекта, по сравнению с индивидуумом, не имеющим заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  идентифицированы посредством анализа, включающего полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело или

антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит галунисертиб. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1.

**[0016]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам диагностики подтипа колоректального рака (CRC) у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающим: а) получение биологического образца от нуждающегося в этом субъекта; б) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$ ; и с) диагностику у субъекта зубчатого колоректального рака (CRC), при условии, что уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$ , детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются низкими, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  у индивидуума, не имеющего CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают: а) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции подтипа рака ободочной кишки (CCS), CCS, имеющего фенотип хромосомной нестабильности (CCS1), фенотипы высокой микросателлитной нестабильности и метилятора CpG-островков (MSI/CIMP+) или фенотип микросателлитной стабильности (MSS); и б) диагностику у субъекта зубчатого CRC, при условии, что детектированный CCS имеет фенотип MSS. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  являются показателями увеличения экспрессии гиалуронана у субъекта, по сравнению с индивидуумом, не имеющим заболевание или состояние.

Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, анализ, подходящий для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$ , включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают лечение субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1), при условии, что у субъекта диагностирован зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит галунисертиб. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают лечение субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана, при условии, что у субъекта диагностирован зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам

осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают лечение субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), при условии, что у субъекта диагностирован зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1.

**[0017]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам характеристики подтипа колоректального рака (CRC) у субъекта, предусматривающим: а) получение биологического образца от субъекта с колоректальным раком (CRC); б) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$ ; и с) характеристику CRC как зубчатого CRC, при условии, что уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$ , детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются низкими, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  у индивидуума, не имеющего CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают: а) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции подтипа рака ободочной кишки (CCS), CCS, имеющего фенотип хромосомной нестабильности (CCS1), фенотипы высокой микросателлитной нестабильности и метилятора CpG-островков (MSI/CIMP+)



или фенотип микросателлитной стабильности (MSS); и b) характеристику подтипа CRC как зубчатого CRC, при условии, что детектированный CCS имеет фенотип MSS. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  являются показателями увеличения экспрессии гиалуронана у субъекта, по сравнению с индивидуумом, не имеющим заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, анализ, подходящий для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$ , включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (РТ-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают лечение субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1), при условии, что CRC охарактеризован как зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит галунисертиб. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают лечение субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана, при условии, что CRC охарактеризован как зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана

содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают лечение субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества ингибитор активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), при условии, что CRC охарактеризован как зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1.

**[0018]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам определения того, имеет ли субъект, страдающий воспалительным заболеванием кишечника (IBD), зубчатый колоректальный рак (CRC), или может ли у него развиваться зубчатый колоректальный рак (CRC), предусматривающим: а) получение биологического образца от субъекта; b) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  ; и c) определение того, что субъект имеет или у него может развиваться зубчатый CRC, при условии, что уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$ , детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются

низкими, по сравнению с уровнями экспрессии РКСζ и РКСλ/ι у индивидуума, не имеющего CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, IBD включает болезнь Крона, язвенный колит, невосприимчивый к лекарственным средствам язвенный колит, невосприимчивую к лекарственным средствам или осложненную форму болезни Крона, колит, фиброз, фибростеноз или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии РКСζ и РКСλ/ι являются показателями увеличения экспрессии гиалуронана у субъекта, по сравнению с индивидуумом, не имеющим заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, анализ, подходящий для детекции уровней экспрессии РКСζ и РКСλ/ι, включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (RT-ПЦР), секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), секвенирование рибонуклеиновой кислоты (РНК), массив для генотипирования, иммуногистохимию, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), массив отдельных молекул (Simoa) или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии РКСζ и РКСλ/ι включают рибонуклеиновую кислоту (РНК), дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или белок. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают лечение субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1), при условии, что определено, что субъект имеет или у него может развиваться зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF-β1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF-β1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF-β1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF-β1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF-β1 содержит галунисертиб. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают лечение субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана, при условии, что определено, что субъект имеет или у него может развиваться зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам

осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы дополнительно предусматривают лечение субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), при условии, что определено, что субъект имеет или у него может развиваться, зубчатый CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1.

**[0019]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к моделям зубчатого колоректального рака, содержащим: а) некоторое количество клеток, не экспрессирующих или имеющих сниженную экспрессию PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  ; b) животное, подвергнутое

инъекции некоторого количества клеток, не экспрессирующих или имеющих сниженную экспрессию PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  ; или с) трансгенное животное с трансгеном, содержащим нокаут или нокдаун Prkci и Prkcz. Согласно некоторым вариантам осуществления, некоторое количество клеток и трансгенное животное дополнительно характеризуются фенотипом микросателлитной стабильности. Согласно некоторым вариантам осуществления, некоторое количество клеток и трансгенное животное являются обогащенными по экспрессии одного или нескольких генов в пути регулируемой внеклеточными сигналами киназы (ERK) и/или пути ассоциированного с Yes белка (YAP). Согласно некоторым вариантам осуществления, для некоторого количества клеток показан более низкий уровень клеточной смерти, по сравнению с некоторым количеством клеток, не экспрессирующих или имеющих сниженную экспрессию, PKC $\zeta$  или PKC $\lambda/1$ . Согласно некоторым вариантам осуществления, для трансгенного животного показан более низкий уровень клеточной смерти, по сравнению с трансгенным животным с трансгеном, содержащим нокаут или нокдаун Prkci или Prkcz. Согласно некоторым вариантам осуществления, некоторое количество клеток имеет сверхэкспрессию гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, трансгенное животное имеет сверхэкспрессию гиалуронана в строме зубчатых опухолей трансгенного животного. Согласно некоторым вариантам осуществления, некоторое количество клеток имеет сверхэкспрессию CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, трансгенное животное имеет сверхэкспрессию CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, некоторое количество клеток имеет сниженную экспрессию биомаркеров стволовых клеток, включающих Olfm4, Ascl2 или Lgr5. Согласно некоторым вариантам осуществления, трансгенное животное имеет сниженную экспрессию биомаркера стволовых клеток, включающего Olfm4, Ascl2 или Lgr5. Согласно некоторым вариантам осуществления, трансгенное животное имеет сниженную экспрессию регулируемого интерфероном гена, включающего Irf7, Oas1a, Isg15 или Cxcl10. Согласно некоторым вариантам осуществления, некоторое количество клеток имеет сниженную экспрессию регулируемого интерфероном гена, включающего Irf7, Oas1a, Isg15 или Cxcl10. Согласно некоторым вариантам осуществления, трансгенное животное включает млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, трансгенное животное включает мышь. Согласно некоторым вариантам осуществления, трансгенное животное включает крысу. Согласно некоторым вариантам осуществления, трансгенное животное включает обезьяну. Согласно некоторым вариантам осуществления, некоторое количество клеток включает органоид. Согласно некоторым вариантам осуществления, некоторое количество клеток содержит 3D-культуру. Согласно некоторым вариантам

осуществления, трансгенное животное получают посредством скрещивания первого животного, содержащего трансген, кодирующий рекомбиназу, функционально связанную с общераспространенным промотором, в эпителиальных клетках ворсинок и крипт тонкого и толстого кишечника, и второго животного, содержащего фланкированные loxP гены, содержащие Prkci и Prkcz, для получения трансгенного животного с нокаутом или нокдауном Prkci и Prkcz, соответственно, в эпителиальных клетках ворсинок и крипт тонкого и толстого кишечника. Согласно некоторым вариантам осуществления, общераспространенный промотор включает промотор vasa, промотор c-kit, промотор Dnd1, промотор Dppa3, промотор Fkbp6, промотор Fragilis, промотор Fragilis-2, промотор GDF-3, промотор Mov10l1, промотор Nanog, промотор Nanos2, промотор Nanos3, промотор oct3/4, промотор Prdm1, промотор Prdm14, промотор Tex13, промотор Tiar или промотор TNAP.

**[0020]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам скрининга модуляторов онкогенеза зубчатых опухолей, предусматривающим: а) получение модели зубчатого колоректального рака, раскрытой в настоящем документе; b) приведение модели в контакт с предположительным модулятором онкогенеза; и c) детекцию одного или нескольких изменений одного или нескольких ассоциированных с опухолью параметров в модели. Согласно некоторым вариантам осуществления, ассоциированный с опухолью параметр включает привлечение CD8<sup>+</sup> Т-клеток к зубчатой опухоли, прогрессирование сидячей зубчатой аденомы (SSA) до аденокарциномы, количество зубчатых опухолей, размер зубчатых опухолей, суммарную нагрузку зубчатых опухолей, увеличение экспрессии альфа-актина гладких мышц ( $\alpha$ SMA) или отложение коллагена, или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что наблюдают увеличение привлечения CD8<sup>+</sup> Т-клеток к зубчатой опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления, предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что не наблюдают прогрессирование SSA до аденокарциномы. Согласно некоторым вариантам осуществления, предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что наблюдают уменьшение количества зубчатых опухолей, по сравнению с количеством зубчатых опухолей в модели до приведения модели в контакт с предположительным модулятором. Согласно некоторым вариантам осуществления, предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что наблюдают уменьшение размера зубчатой опухоли, по сравнению с размером зубчатых опухолей в модели до приведения модели в контакт с

предположительным модулятором. Согласно некоторым вариантам осуществления, предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что наблюдают уменьшение суммарной нагрузки зубчатых опухолей, по сравнению с суммарной нагрузкой зубчатых опухолей в модели до приведения модели в контакт с предположительным модулятором. Согласно некоторым вариантам осуществления, предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что не наблюдают увеличение экспрессии  $\alpha$ SMA, по сравнению с экспрессией  $\alpha$ SMA в модели до приведения модели в контакт с предположительным модулятором. Согласно некоторым вариантам осуществления, предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что не наблюдают увеличение отложения коллагена в модели, по сравнению с отложением коллагена в модели до приведения модели в контакт с предположительным модулятором. Согласно некоторым вариантам осуществления, предположительный модулятор выбран из группы, состоящей из ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 ( $TGF-\beta 1$ ) и ингибитора активности или экспрессии гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антагонист белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело против PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам

осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу - ингибитор рецептора TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит галунисертиб.

**[0021]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам получения модели зубчатого колоректального рака на животном, предусматривающим: а) получение животного, являющегося Prkci fl/fl и Prkcz fl/fl, причем животное имеет участки loxP, фланкирующие гены, включающие Prkci и Prkcz; и б) скрещивание животного, являющегося Prkci fl/fl и Prkcz fl/fl, с животным, экспрессирующим рекомбиназу Cre, функционально связанную с общераспространенным промотором, в эпителиальных клетках ворсинок и крипт тонкого и толстого кишечника, таким образом, получение трансгенного животного с делециями в Pkc $\zeta$  и PKC $\lambda$ /1 в эпителиальных клетках ворсинок и крипт тонкого и толстого кишечника. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном включает млекопитающее. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном включает мышь. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном включает крысу. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном включает обезьяну. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном характеризуется фенотипом микросателлитной стабильности. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном является обогащенной по экспрессии одного или нескольких генов в пути регулируемой внеклеточными сигналами киназы (ERK) и/или пути ассоциированного с Yes белка (YAP). Согласно некоторым вариантам осуществления, для модели на животном показан более низкий уровень клеточной смерти, по сравнению с животным, не



экспрессирующим, или имеющим сниженную экспрессию, PKC $\zeta$  или PKC $\lambda/1$ . Согласно некоторым вариантам осуществления, для модели на животном показан более низкий уровень клеточной смерти, по сравнению с животным с трансгеном, содержащим нокаут или нокдаун Prkci или Prkcz. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном имеет сверхэкспрессию гиалуронана в строме зубчатых опухолей животного. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном имеет сверхэкспрессию CD44, по сравнению с нормальным животным. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном имеет сниженную экспрессию биомаркера стволовых клеток, включающего Olfm4, Ascl2 или Lgr5, по сравнению с нормальным животным. Согласно некоторым вариантам осуществления, модель на животном имеет сниженную экспрессию регулируемого интерфероном гена, включающего Irf7, Oas1a, Isg15 или Cxcl10, по сравнению с нормальным животным.

**[0022]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, также относятся к способу лечения зубчатой опухоли у субъекта. Способ предусматривает стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана, причем биологический образец от субъекта имеет низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$ , по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  у индивидуума без зубчатой опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44. Альтернативно и/или дополнительно, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44.

**[0023]** Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Согласно таким вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу, или ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу, или ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA).

**[0024]** Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество PVHA составляет от 0,01 до 0,5 мг/кг, или терапевтически эффективное количество PVHA составляет от 0,02 до 0,4 мг/кг. Согласно некоторым

вариантам осуществления, ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA) вводят субъекту в качестве монотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения онкогенеза по меньшей мере на 30% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом. Согласно таким вариантам осуществления, является предпочтительным количественно оценивать онкогенез с использованием подсчета зубчатых полипов и карцином. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения опухолевой нагрузки по меньшей мере на 20% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом. Согласно таким вариантам осуществления, является предпочтительным количественно оценивать опухолевую нагрузку с использованием по меньшей мере одного из суммарного количества опухолей, среднего размера опухолей или нагрузки опухолей. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения гиалуронана в опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения коллагена в опухоли.

**[0025]** Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани. Согласно некоторым вариантам осуществления, низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  включают низкий уровень транскрипции, низкий уровень трансляции или низкий уровень активности PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$ .

**[0026]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам лечения зубчатой опухоли у субъекта посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). Согласно некоторым вариантам осуществления, ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA) вводят субъекту в качестве монотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество PVHA составляет от 0,01 до 0,5 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество PVHA составляет от 0,02 до 0,4 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является

достаточным для уменьшения онкогенеза по меньшей мере на 30% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец от субъекта имеет более низкие уровни экспрессии РКС $\zeta$  и РКС $\lambda/1$ , по сравнению с уровнями экспрессии РКС $\zeta$  и РКС $\lambda/1$  у индивидуума без зубчатой опухоли.

**[0027]** Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения онкогенеза по меньшей мере на 30% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом. В некоторых случаях, онкогенез количественно оценивают с использованием подсчета зубчатых полипов и карцином. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения опухолевой нагрузки по меньшей мере на 20% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом, что, необязательно, количественно оценивают с использованием по меньшей мере одного из суммарного количества опухолей, среднего размера опухолей или нагрузки опухолей. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения гиалуронана в опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения коллагена в опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани.

### **Краткое описание фигур**

**[0028]** Патентная заявка содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии этой публикации патента или патентной заявки с цветным чертежом(ами) могут быть представлены офисом после запроса и оплаты необходимого взноса.

**[0029]** Различные аспекты настоящего изобретения подробно указаны в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения можно получить со ссылкой на следующее подробное описание, в котором указаны иллюстративные варианты осуществления, в которых использованы принципы изобретения, и сопутствующие чертежи, в которых:

**[0030]** На **фиг.1, панели A-L** приведены примеры того, как одновременная инактивация РКС $\lambda/1$  и РКС $\zeta$  управляет онкогенезом зубчатых опухолей в тонком

кишечнике и ободочной кишке. На **панели А** приведен пример противопоставленных изображений для дикого типа (WT) и нокаута Pkci и Pkcz ( $\text{DKO}^{\text{IEC}}$ ). Стрелки обозначают расширенный кишечник. На **панели В** приведен пример массы тела мышей WT ( $n=15$ ) и  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$  ( $n=23$ ). На **панели С** приведен пример кривой выживаемости Каплана-Мейера для мышей WT ( $n=20$ ) и  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$  ( $n=22$ ). На **панели D** приведен пример окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) срезов тонкого кишечника и ободочной кишки от мышей WT и  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$  ( $n=20$ ). Масштабные линейки, 100 мкм. На **панели Е** приведен пример макроскопических изображений тонкого кишечника от мышей WT и  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$ . Стрелки обозначают опухоли. Масштабная линейка, 2 мм. На **панели F** приведены примеры количества макроскопических опухолей в различном возрасте в тонком кишечнике и ободочной кишке мышей  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$ . На **панели G** приведен пример количества макроскопических опухолей с различным распределением размера опухолей в тонком кишечнике и ободочной кишке мышей  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$ . Каждый круг представляет одну мышь ( $n=39$ ). На **панели H** приведен пример макроскопических изображений ободочной кишки от мышей  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$ . Стрелки обозначают опухоли в восходящих ободочных кишках. Точечный круг обозначает муцин в опухоли. Масштабные линейки, 2 мм. На **панели I** приведен пример изображений тубулярной аденокарциномы, наблюдаемой у мышей  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$ . На **панели J** приведен пример низкодифференцированной аденокарциномы, наблюдаемой у мышей  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$ . На **панели K** приведен пример перстневидноклеточной карциномы, наблюдаемой у мышей  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$ . На **панели L** приведен пример десмопластического изменения, наблюдаемого у мышей  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$ . Стрелки обозначают инвазивный фронт опухоли. Масштабные линейки, 100 мкм. Результаты показаны как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM).

**[0031]** На **фиг.2, панели A-G** приведены примеры того, что опухоли мышей  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$  имеют отдельный молекулярный характерный профиль, напоминающий зубчатые опухоли человека. На **панели А** и **панели В** приведены примеры окрашивания и количественной оценки катенина в указанных типах опухолей кишечника от мышей  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$  или  $\text{Arc}^{\text{fl/+}}$ ;  $\text{LKO}^{\text{IEC}}$  ( $n=3$ ). Масштабная линейка, 50 мкм. На **панели С** приведен пример графиков анализ обогащения наборов генов (GSEA) для обогащения указанных профилей генов в опухоли  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$  против кишечника дикого типа (WT). Термин «NES» относится к нормализованному показателю обогащения. Термин «FDR», относится к уровню ложноположительных результатов. На **панели D** приведен пример окрашивания фосфо-ERK, фосфо-EGFR и YAP в тонком кишечнике от мышей указанного генотипа ( $n=3$ ). Масштабные линейки, 25 мкм. На **панели Е** приведен пример графика GSEA в опухоли  $\text{DKO}^{\text{IEC}}$  против кишечника WT. На **панели F** приведен пример GSEA

транскриптомных данных РНК-seq для опухолей DKO<sup>IEC</sup> против кишечника WT. На **панели G** приведен пример GSEA обогащения наборов генов DKO<sup>IEC</sup> (DKO\_SIGNATURE) в базах данных зубчатых очагов человека. Результаты показаны как среднее +/- SEM.

**[0032]** На **фиг.3, панели А-М** приведены примеры кишечной иммуносупрессии в опухолях DKO<sup>IEC</sup>. На **панелях А-С** приведены примеры окрашивания CD45, CD8 и CD45, и PD-L1 в тонком кишечнике от мышей указанных генотипов и очагов, и количественная оценка (n=3). Линиями отмечена граница опухоли (Т). На **панелях D-J** приведен пример анализов проточной цитометрии популяций иммунцитов от мышей указанных генотипов. Процент CD8<sup>+</sup> Т-клеток (**фиг.3D**), PD-L1<sup>+</sup> (**панель E**), Трег-клеток (Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>TCR-β<sup>+</sup>; **панель F**) в CD45<sup>+</sup> клетках; соотношение Трег-клеток к CD8<sup>+</sup> Т-клеткам (**панель G**); процент продуцирующих IL-17A клеток в CD4<sup>+</sup> Т-клетках (**панель H**); процент CD11b<sup>+</sup> (**панель I**) и CD11b<sup>+</sup>Ly6ChighLy6G<sup>-</sup> и CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> (**J**) клеток в CD45<sup>+</sup> клетках. (n: WT=7, LKO<sup>IEC</sup>=8, и DKO<sup>IEC</sup> опухоль=4). (**Панели K-M**) окрашивание αSMA (**панель K**) и трихромное окрашивание по Массону (**панель L**), и гибридизация Ereg *in situ* (**панель M**) в тонком кишечнике от мышей для указанных генотипов и очагов (n=3). Результаты показаны как среднее +/- SEM. Масштабные линейки, 25 мкм.

**[0033]** На **фиг.4, панели А-М** приведены примеры роли CD8<sup>+</sup> Т-клеток в онкогенезе зубчатых опухолей у мышей DKO<sup>IEC</sup>. На **панели А** и **панели В** приведены примеры окрашивания CD45<sup>+</sup> (**фиг.4A**) и количественная оценка (**панель В**) в тонком кишечнике от мышей WT и DKO<sup>IEC</sup> в присутствии или в отсутствие лечения антибиотиком (Abx) (n=3). На **панели С** приведен пример анализов проточной цитометрии популяций CD45<sup>+</sup> клеток от мышей WT и DKO<sup>IEC</sup> в эксперименте с Abx (n: WT Контр.=8, WT подвергнутые лечению Abx=5, DKO<sup>IEC</sup> Контр.=4, и DKO<sup>IEC</sup> подвергнутые лечению Abx=3). На **панели D** приведен пример количественной оценки суммарного количества опухолей в тонком кишечнике и ободочной кишке, и стратификация количества опухолей тонкого кишечника, в соответствии с размером, у мышей DKO<sup>IEC</sup> в эксперименте с Abx. (n: Контр.= 6 и подвергнутые лечению Abx=7). На **панелях E-G** приведены примеры окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) (**панель E**) и окрашивания Ki67, фосфо-ERK и YAP (**панель F**) опухолей тонкого кишечника от мышей DKO<sup>IEC</sup> в эксперименте с Abx, и количественная оценка окрашивания Ki67 (**панель G**). Масштабные линейки, 100 мкм. На **панели H** приведен пример анализов проточной цитометрии CD8<sup>+</sup> Т-клеток от мышей WT и LKO<sup>IEC</sup>, подвергнутых лечению в присутствии или в отсутствие антитела αCD8 (n: WT=3,

LKO<sup>IEC</sup>=6, и LKO<sup>IEC</sup> подвергнутые лечению антителом  $\alpha$ CD8=7). На **панели I** приведен пример макроскопических изображений тонких кишечника LKO<sup>IEC</sup>, подвергнутых лечению в эксперименте истощения CD8. Стрелка обозначает опухоль. Масштабная линейка, 2 мм. На **панели J** и **панели K** приведены примеры количественной оценки встречаемости (**панель J**) и общего количества (**панель K**) опухолей тонкого кишечника в эксперименте истощения CD8 (n=7). На **панели L** и **панели M** приведены примеры окрашивания H&E, Ki67, расщепленной каспазы 3 (С-каспаза 3), TUNEL и трихромного окрашивания по Массону образцов тонкого кишечника от мышей для указанных генотипов и лечения (**панель L**), и количественная оценка (**панель M**) (n=3–5). Масштабные линейки, 100 мкм. Результаты показаны как среднее  $\pm$  SEM.

[0034] На **фиг. 5, панели A-N** приведены примеры того, что супрессия ответа на интерферон посредством потери PKC $\zeta$  нарушает зависимый от CD8<sup>+</sup> иммунологический надзор. На **панели A** приведен пример экспрессии мРНК для указанных генов в LKO<sup>IEC</sup> против WT IEC, по данным РНК-seq. На **панели B** приведен пример уровни внеклеточного АТР в клетках sgC и sgPKC  $\lambda/1$  MODE-K, подвергнутых обработке оксалиплатином в течение 24 час (20 мкм) (n=3). На **панели C** приведен пример Вестерн-блоттинга указанных белков в клетках sgC и sgPKC $\lambda/1/1$  MODE-K, обработанных в течение 24 час оксалиплатином (20 мкм), бортезомибом (0,1 мкм) или TNF $\alpha$  (10 нг/мл) плюс циклогексимид (2,5 мкг/мл). На **панели D** приведен пример анализов qRT-ПЦР уровней мРНК Cxcl10, Oas1a, Ifnb и Nlrc5 в MODE-K указанных генотипов, трансфицированных с использованием 0,5 мкг/мл поли(I:C) или подвергнутых ложной трансфекции в течение 6 час (n=3). На **панели E** приведен пример поверхностной экспрессии (средняя интенсивность флуоресценции, MFI) H-2Kb и H-2Dk в клетках MODE-K указанных генотипов, подвергнутых либо голоданию по HBSS, либо обработке оксалиплатином (20 мкм) в течение 24 час (n =3). На **панели F** приведен пример анализа уничтожения для клеток OT-I-MC38<sup>OVA</sup> (24 час) при указанных соотношениях Т:Е (слева). Окрашивание PI в клетках shNT и sgPKC  $\lambda/1$  MC38<sup>OVA</sup> после совместного культивирования с клетками OT-I в течение 24 час (справа) (n=3). На **панели G** приведен пример GSEA транскриптомных данных по РНК-seq для ZKO<sup>IEC</sup> против WT IEC. Указанные профили генов применяли в анализах. FDR, уровень ложноположительных результатов. На **панели H** приведен пример тепловой карты данных РНК-seq для WT и ZKO<sup>IEC</sup> IEC, представляющей гены, связанные с ответом на интерферон, дифференциально экспрессированные между генотипами. На **панели I** приведен пример анализов qRT-ПЦР уровней мРНК Irf7, Oas1a, Isg15 и Cxcl10 в органоидах указанных генотипов в присутствии или в отсутствие обработки 5AZA-CdR. На **панели J** приведен

пример анализов qRT-ПЦР уровней мРНК CXCL10 и IFNB в клетках 293Т указанных генотипов, трансфицированных с использованием 0,5 мкг/мл поли(I:C) или подвергнутых ложной трансфекции в течение 6 час (n=3). На **панели К** приведен пример Вестерн-блоттинга указанных белков в клетках 293Т указанных генотипов, трансфицированных с использованием 0,5 мкг/мл поли(I:C) или подвергнутых ложной трансфекции в течение 6 час (n=3). На **панели L** приведен пример анализ NextBio генов, дифференциально экспрессированных в ZKO<sup>IEC</sup> против WT IEC. На диаграмме Венна показано количество общих и уникальных генов в обеих группах. Профили генов, соответствующие терминам GO «процессинг антигена и представление пептидного антигена посредством МНС класса I». На **панели М** приведен пример анализ проточной цитометрии положительной по H-2Kb популяции клеток в органоидах указанных генотипов в присутствии или в отсутствие обработки 5AZA-CdR (n=3). На **панели N** приведен пример окрашивания МНС I (H-2) в тонком кишечнике от мышей указанных генотипов (n=3). Масштабная линейка, 50 мкм. Результаты показаны как среднее +/- SEM.

**[0035]** На **фиг.6, панели A-S** приведены примеры терапевтических вмешательств для опухолей у мышей DKO<sup>IEC</sup>. На **панели А** приведен пример дизайна эксперимента для лечения галунисертибом (Gal). На **панели В** и **панели С** приведены примеры количественной оценки суммарного количества, среднего размера и нагрузки опухолей тонкого кишечника (**панель В**) и встречаемости рака и инвазивного рака (**панель С**) у мышей DKO<sup>IEC</sup> в эксперименте с Gal. (n: Контр.=8 и подвергнутые лечению Gal=6). На **панели D** приведен пример окрашивания H&E, трихромного окрашивания по Массону, фосфо-Smad2, и двойного окрашивания CD45 и PD-L1 в опухолях тонкого кишечника от мышей DKO<sup>IEC</sup> в эксперименте с Gal. Масштабные линейки=100 мкм. На **панели E** приведен пример анализов qRT-ПЦР уровней мРНК Angptl2, Cdkn2b, Il11 и Ereg в эксперименте с Gal (n: WT=3, DKO<sup>IEC</sup> Контр.=4, и DKO<sup>IEC</sup>, подвергнутые лечению Gal=5). На **панелях F–J** приведен пример анализов проточной цитометрии популяций иммунцитов в опухолях DKO<sup>IEC</sup> в эксперименте с Gal. Процент продуцирующих IL-17A-клеток в CD4+ Т-клетках (**панель F**); процент CD8+ Т-клеток (**панель G**) и Foxp3+CD4+ Трег-клеток (**панель H**) в CD45+ клетках; соотношение Трег-клеток к CD8+ Т-клеткам (**панель I**); и процент CD11b+, CD11b+Ly6ChighLy6G– и CD11b+Ly6C+Ly6G+ клеток в CD45+ клетках (**панель J**). (n: Контр.=4 и подвергнутые лечению Gal=3 мыши DKO<sup>IEC</sup>). На **панели К** и **панели L** приведены примеры количественной оценки (**панель К**) и изображений (**панель L**) окрашивания CD45/PD-L1 в DKO<sup>IEC</sup> опухолях в эксперименте с Gal. Масштабная линейка, 100 мкм. Стрелки: CD45+/PD-L1+. На **панели М** приведен пример дизайна эксперимента для комбинированной терапии с использованием антитела

$\alpha$ PD-L1 и Gal. На **панели N** и **панели O** приведены примеры количественной оценки суммарного количества, среднего размера и нагрузки опухолей тонкого кишечника (**панель N**), и встречаемости рака и инвазивного рака (**панель O**) у мышей DKO<sup>IEC</sup> в эксперименте комбинированной терапии (**панель M**). (n: Контр.=6 и  $\alpha$ PD-L1+, подвергнутые лечению Gal=7 мышей DKO<sup>IEC</sup>). На **панели P** приведен пример окрашивания H&E и CD8 в опухолях тонкого кишечника у мышей DKO<sup>IEC</sup> в эксперименте комбинированной терапии (**панель M**). Точечными линиями обведены опухоли (фиг.6T). Масштабные линейки, 100 мкм. На фиг. 6Q–фиг. 6S приведены примеры анализов проточной цитометрии популяций иммуноцитов в опухолях DKO<sup>IEC</sup> в эксперименте комбинированной терапии. Процент CD8+ T (**панель Q**); Foxp3+CD4+ Трег (**панель R**); и CD11b+, CD11b+Ly6ChighLy6G– и CD11b+Ly6C+Ly6G+ (**панель S**) клеток в CD45+ клетках. (n: Контр.=5 и  $\alpha$ PD-L1+, подвергнутые лечению Gal=4 мыши DKO<sup>IEC</sup>). Результаты показаны как среднее +/-SEM.

[0036] На **фиг.7, панели A-J** приведены примеры того, что зубчатые опухоли человека имеют уменьшенную экспрессию обеих атипичных РКС. На **панели A** и **панели B** приведены примеры иммуногистохимии (**панель A**) и количественной оценки (**панель B**) аРКС для нормальной ободочной кишки (n=20), сидячих зубчатых аденом/полипов (SSA/P; n=30), и тубулярных аденом (ТА; n=30) человека. Масштабные линейки, 50 мкм. На **панели C** приведен пример графиков GSEA в образцах от пациентов с CRC из TCGA, стратифицированных на основании уровней экспрессии PRKCI и PRKCZ. На **панели D** приведен пример уровней мРНК PRKCI и PRKCZ в группе AMC-AJCCII-90 (GSE33113), стратифицированных по классификация CCS. На **панели E** приведен пример доли пациентов с CRC с подтипом CRC CCS1, CCS2 или CCS3, в соответствии с экспрессией мРНК аРКС (GSE33113). На **панели F** приведен пример кривой общей выживаемости Каплана-Мейера для пациентов с CRC (TCGA), стратифицированных на основании уровней экспрессии аРКС. На **панели G** приведен пример GSEA транскриптомных данных для образцов CRC (TCGA), стратифицированных на основании уровней экспрессии аРКС. На **панели H** приведен пример GSEA транскриптомных данных из указанных наборов данных для пациентов с IBD. Показаны нормализованные показатели обогащения (NES). Кратности изменения (FC) экспрессии PRKCI и PRKCZ при сравнении болезни Крона (CD) против здоровой ободочной кишки (Контр.), или язвенного колита (UC) против Контр. FDR <0,1 считали значимой. NS, не значимо. На **панели I** и **панели J** приведены примеры окрашивания (**панель I**) и количественной оценки (**панель J**) аРКС и CD8 при проксимальных CRC человека (n: Высокие уровни аРКС=12, Низкие уровни аРКС=13). Масштабные линейки, 50 мкм. Результаты показаны как среднее +/- SEM.



[0037] На **фиг.8, панели А-Ж** приведены примеры того, что у мышей DKO<sup>IEC</sup> развиваются зубчатые опухоли кишечника. На **панели А** приведен пример окрашивания альциановым синим и лизоцимом срезов тонкого кишечника от мышей DKO<sup>IEC</sup> (n=3). Масштабные линейки, 50 мкм. На **панели В** приведен пример микровезикулярного гиперпластического полипа и гиперпластического полипа с бокаловидными клетками в тонком кишечнике и ободочной кишке мышей DKO<sup>IEC</sup> (n=6). Масштабные линейки, 100 мкм. На **панели С** приведен пример суммарных макроскопических опухолей в тонком кишечнике LKO<sup>IEC</sup> и DKO<sup>IEC</sup> в различном возрасте (слева) и фракционированных по размеру (справа). Каждый круг представляет одну мышь. На **панели D** приведен пример секторной диаграммы распределения опухолей в тонком кишечнике (n=39) и ободочной кишке (n=27). На **панели Е** приведен пример изображений электрофореграмм пяти микросателлитных маркеров (Bat24, Bat26, Bat30, Bat37 и Bat64) для нормальной ткани от мышей WT и SSA/P, и карцином от мышей DKO<sup>IEC</sup>. На **панели F** приведен пример статуса микросателлитной нестабильности для тканей мышей WT и DKO<sup>IEC</sup> (n=3–4). Каждый столбец представляет один образец. Аллельные паттерны сравнивали. (**Панель G** и **панель H**) экспрессия мРНК генов, ассоциированных с фенотипами репарации несовпадений в ДНК (ДНК-MMR, **панель G**) и метилятора CpG-островков (CIMP, **панель H**) в тканях WT и опухоли DKO<sup>IEC</sup> по данным РНК-seq. На **панели I** приведен пример окрашивания β-галактозидазы в не относящихся к опухоли тканях и тканях опухолей DKO<sup>IEC</sup> (n=3). На **панели J** приведен пример окрашивания и количественной оценки p53, p21 и p16 в тканях тонкого кишечника для WT и опухолей DKO<sup>IEC</sup> (n=3). Масштабные линейки, 50 мкм. Результаты показаны как среднее ± SEM.

[0038] На **фиг.9, панели А-С** приведены примеры увеличения пролиферации клеток и супрессии клеточной смерти в опухолях DKO<sup>IEC</sup>. На **панелях А-С** приведен пример окрашивания и количественной оценки Ki67 (**панель А**), расщепленной каспазы 3 (С-каспазы 3) (**панель В**) и TUNEL (**панель С**) в тонком кишечнике от мышей указанных генотипов (n=3). Масштабные линейки, 50 мкм. Результаты показаны как среднее ± SEM.

[0039] На **фиг.10, панели А-F** приведены примеры иммуносупрессии и стромальной активации в опухолях DKO<sup>IEC</sup>. На **панели А** приведен пример окрашивания CD8 в SSA/P и карциноме из кишечника DKO<sup>IEC</sup> (n=6). Масштабные линейки, 50 мкм. Красными линиями отмечены границы между опухолью (Т) и периферией (Р). На **панели В** приведен пример анализа проточной цитометрии популяций иммунцитов от мышей указанных генотипов. Процент CD4<sup>+</sup> Т, B220<sup>+</sup> В и NK1.1<sup>+</sup> NK клеток в CD45<sup>+</sup> клетках. (n: WT=7, LKO<sup>IEC</sup>=8 и опухоль DKO<sup>IEC</sup>=4). Результаты показаны как среднее ± SEM. На **панели С** приведен пример тепловой карты данных РНК-seq для кишечника WT и

опухолей DKO<sup>IEC</sup>, представляющей дифференциально экспрессированные гены, связанные с коллагеном. На **панели D** приведен пример графика GSEA обогащения мишеней TGF- $\beta$  для опухоли DKO<sup>IEC</sup> против кишечника WT. На **панели E** приведен пример тепловой карты данных РНК-seq для кишечника WT и опухолей DKO<sup>IEC</sup>, представляющей дифференциально экспрессированные гены, связанные со стромальной активацией и стромальными факторами. На **панели F** приведен пример графика GSEA обогащения в DKO<sup>IEC</sup> против кишечника WT.

**[0040]** На **фиг.11, панели A-C**, приведены примеры того, что пролиферация клеток крипт и активация пути передачи сигналов YAP/ERK у мышей LKO<sup>IEC</sup> зависит от воспаления. На **панели A** и **панели B** приведен пример окрашивания H&E, Ki67, фосфо-ERK и YAP в тонком кишечнике от мышей WT и LKO<sup>IEC</sup>, в присутствии или в отсутствие лечения антибиотиком (Abx) (**панель A**), и количественной оценки окрашивания Ki67 (**панель B**) (n=3). (**Панель C**) Анализы проточной цитометрии популяции CD45<sup>+</sup> клеток от мышей WT и LKO<sup>IEC</sup> в присутствии или в отсутствие лечения Abx (n=3). Масштабные линейки=50 мкм. Результаты показаны как среднее  $\pm$  SEM.

**[0041]** На **фиг.12, панели A-D** приведены примеры нарушенного ответа на интерферон в опухолях DKO<sup>IEC</sup> и IEC. На **панели A** приведен пример жизнеспособности клеток (7-AAD<sup>+</sup> клеток) для sgC и sgPKC $\zeta$ /1 клеток MODE-K после голодания по HBSS или обработки оксалиплатином (20 мкМ) 24 час (n=3). На **панели B** приведен пример графиков GSEA обогащения для указанных профилей генов из MSigDB в опухоли DKO<sup>IEC</sup> против кишечника WT. На **панели C** приведен пример GSEA транскриптомных данных по анализу РНК-seq для DKO<sup>IEC</sup> против LKO<sup>IEC</sup> IEC. Указанные профили генов из Hallmark collection of MSigDB применяли для анализов. FDR, уровень ложноположительных результатов. На **панели D** приведен пример тепловой карты анализа транскриптома DKO<sup>IEC</sup> и LKO<sup>IEC</sup> IEC, представляющей дифференциально экспрессированные гены, связанные с ответом на интерферон.

**[0042]** На **фиг.13, панели A-I** приведен пример влияния терапии против PD-L1 на опухоли мышей DKO<sup>IEC</sup>. На **панели A** приведен пример дизайна эксперимента для лечения  $\alpha$ PD-L1. На **панели B** приведен пример окрашивания H&E и CD8 в опухолях тонкого кишечника от мышей DKO<sup>IEC</sup> в присутствии или в отсутствие лечения  $\alpha$ PD-L1. Масштабные линейки=100 мкм. На **панели C** и **панели D** приведены примеры количественной оценки суммарного количества, среднего размера и нагрузки опухолей тонкого кишечника (**панель C**), и встречаемости рака и инвазивного рака (**панель D**) у мышей DKO<sup>IEC</sup> в присутствии или в отсутствие лечения  $\alpha$ PD-L1 (n: Контр.=7, и подвергнутые лечению  $\alpha$ PD-L1 =4). На **панели E** приведен пример дизайна эксперимента

для лечения  $\alpha$ PD-L1 (n: Контр.=7, подвергнутые лечению  $\alpha$ PD-L1 =4). На **панели F** приведен пример окрашивания H&E и CD8 в опухолях тонкого кишечника от мышей DKO<sup>IEC</sup> в присутствии или в отсутствие лечения  $\alpha$ PD-L1. На **панели G** и **панели H** приведен пример количественной оценки суммарного количества, среднего размера и нагрузки опухолей тонкого кишечника (**панель G**), и встречаемости рака и инвазивного рака (**панель H**) у мышей DKO<sup>IEC</sup> в присутствии или в отсутствие лечения  $\alpha$ PD-L1 (n: Контр.=7, и подвергнутые лечению  $\alpha$ PD-L1=4). На **панели I** приведен пример окрашивания  $\alpha$ SMA и трихромного окрашивания по Массону в опухолях тонкого кишечника от мышей DKO<sup>IEC</sup> (n=3 на возраст). Масштабные линейки, 100 мкм. Результаты показаны как среднее  $\pm$  SEM. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,005.

[0043] На **фиг.14, панели A-L** приведен пример того, что для пациентов с CRC с низкой экспрессией обеих аPKC показан фенотип CCS3 с фенотипом иммуносупрессии и мезенхимальным фенотипом. На **панели A** приведен пример анализ иммуноблоттинга аPKC в образцах выделенных IEC из указанных генотипов с использованием антител, узнающих как PKC $\zeta$ , так и PKC $\eta$ . На **панели B** и **панели C** приведены примеры уровней мРНК PRKCI и PRKCZ в наборах данных TCGA (**панель B**) и Khambata-Ford (**панель C**, GSE5851). **фиг. 4D** и **фиг. 4E** приведены примеры доли пациентов с CRC с подтипом CRC CCS1, CCS2 или CCS3, в соответствии с экспрессией мРНК аPKC в TCGA (**панель D**) и в GSE5851 (**панель E**). На **панели F** приведен пример кривой выживаемости без прогрессирования (PFS) Каплана-Мейера пациентов с CRC (GSE5851), стратифицированных на основании уровней экспрессии аPKC. На **панели G** приведен пример статуса мутации для профиля экспрессии генов BRAF и KRAS и аPKC по данным TCGA. Зеленый и оранжевый прямоугольники обозначают присутствие мутаций в BRAF и KRAS, соответственно. FDR, уровень ложноположительных результатов. **Панели H-J**) GSEA транскриптомных данных пациентов с CRC (из TCGA) стратифицированных на основании уровней экспрессии аPKC и статуса мутации BRAF и KRAS: BRAF/KRAS WT (**панель H**), BRAF-мутант (**панель I**) или KRAS-мутант (**панель J**). На **панели K** приведен пример тепловой карты транскриптомных данных (нормализованных по медиане в каждом ряду) из образцов от классифицированных по CCS пациентов в GSE33113 и TCGA с использованием средних значений экспрессий для указанных генов. На **панели L** приведен пример графиков-скрипок, сравнивающих транскриптомные данные указанных генов в GSE33113 и TCGA между подгруппами CCS2 и CCS3. Результаты показаны как среднее  $\pm$  SEM.

[0044] На **фиг. 15** приведен пример того, что для стромы зубчатых опухолей аPKC-DKO<sup>IEC</sup> показана увеличенная продукция гиалуронана при прогрессировании заболевания.

[0045] На **фиг. 16, панели А-С** приведен пример того, что клетки эпителиальных опухолей у мышей аРКС-DKO<sup>IEC</sup> имеют подвергнутую повышающей регуляции экспрессию CD44, который является рецептором для гиалуронана.

[0046] На **фиг. 17, панели А-В** показаны данные, подразумевающие, что лечение PVNA уменьшает зубчатые опухоли у мышей аРКС-DKO<sup>IEC</sup>.

[0047] На **фиг. 18, панели А-С** показаны данные, подразумевающие, что лечение PVNA уменьшает опухоли аРКС-DKO<sup>IEC</sup>.

[0048] На **фиг. 19** показаны данные, подразумевающие уменьшенный уровень гиалуронана в зубчатых опухолях аРКС-DKO<sup>IEC</sup> при лечении PVNA.

[0049] На **фиг. 20** показаны данные, подразумевающие уменьшенное отложение коллагена в зубчатых опухолях аРКС-DKO<sup>IEC</sup> при лечении PVNA.

[0050] На **фиг. 21** показаны данные, подразумевающие, что лечение PVNA увеличивает инфильтрацию CD8 Т-клеток в опухолях аРКС-DKO<sup>IEC</sup>.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

#### **Определение конкретной терминологии**

[0051] Если не определено иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится заявленный объект изобретения. Следует понимать, что предшествующее общее описание и следующее подробное описание являются только иллюстративными и объясняющими, и не являются ограничивающими какой-либо заявленный объект изобретения. В настоящем документе, применение единственного числа включает множественное, если конкретно не указано иное. Следует отметить, что, как применяют в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного. В настоящем документе, применение «или» означает «и/или», если не указано иное. Кроме того, применение термина «включающий», так же как других форм, таких как «включают», «включает» и «включали», не является ограничительным.

[0052] Термин «приблизительно» или «около» означает в рамках приемлемого диапазона ошибки для конкретного значения, как определено специалистом в данной области, который может частично зависеть от того, каким образом значение измеряют или определяют, например, от ограничений системы измерения. Например, «приблизительно» может обозначать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения, согласно практике в данной области для данного значения. Термин «приблизительно» включает точное

количество. Например, «приблизительно 5 мкл» означает «приблизительно 5 мкл», а также «5 мкл». Когда конкретные значения раскрыты в описании и формуле изобретения, если не указано иное, термин «приблизительно» следует понимать, как лежащее в пределах приемлемого диапазона ошибки для конкретного значения.

**[0053]** Термин «необязательный» или «необязательно» означает, что описанное вслед за ним событие или условие может, но не обязательно, присутствовать, и что описание включает случаи, когда событие или условие присутствует, и случаи, в которых оно не присутствует.

**[0054]** Термин «нуклеиновая кислота», как применяют в настоящем документе, в общем, относится к одному или нескольким нуклеиновым основаниям, нуклеозидам или нуклеотидам. Например, нуклеиновая кислота может включать один или несколько нуклеотидов, выбранных из аденозина (A), цитозина (C), гуанина (G), тимина (T) и урацила (U) или их вариантов. Нуклеотид, как правило, включает нуклеозид и по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более фосфатных ( $\text{PO}_3$ ) групп. Нуклеотид может включать нуклеиновое основание, пятиуглеродный сахар (либо рибозу, либо дезоксирибозу) и одну или несколько фосфатных групп. Рибонуклеотиды включают нуклеотиды, в которых сахар представляет собой рибозу. Дезоксирибонуклеотиды включают нуклеотиды, в которых сахар представляет собой дезоксирибозу. Нуклеотид может представлять собой нуклеозидмонофосфат, нуклеозиддифосфат, нуклеозидтрифосфат или нуклеозидполифосфат.

**[0055]** Как применяют в настоящем документе, термины «полипептид», «белок» и «пептид» использованы взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков, который связан посредством пептидных связей и который может состоять из двух или более полипептидных цепей. Термины «полипептид», «белок» и «пептид» относятся к полимеру из по меньшей мере двух аминокислотных мономеров, соединенных вместе посредством амидных связей. Аминокислота может представлять собой L-оптический изомер или D-оптический изомер. Более конкретно, термины «полипептид», «белок» и «пептид» относятся к молекуле, состоящей из двух или более аминокислот в конкретном порядке; например, в порядке, как определено последовательностью оснований нуклеотидов в гене или РНК, кодирующих белок. В некоторых случаях, белок может представлять собой часть белка, например, домен, субдомен, или мотив белка. В некоторых случаях, белок может представлять собой вариант (или мутацию) белка, в котором один или несколько аминокислотных остатков вставлены, делетированы и/или заменены на природную (или по меньшей мере

известную) аминокислотную последовательность белка. Белок или его вариант может являться природным или рекомбинантным.

**[0056]** Как применяют в настоящем документе, термин «биологический образец» означает биологический материал, из которого полинуклеотиды, полипептиды, биомаркеры и/или метаболиты можно получать и исследовать. Неограничивающие примеры включают биоптат ткани, цельную кровь, плазму, слюну, сыворотку, буккальный мазок, образец кала, образец мочи, клеточную массу, или любую другую физиологическую жидкость или ткань.

**[0057]** Термины «вводить», «осуществление введения», «введение» и аналогичные, как применяют в настоящем документе, относятся к способам, которые можно применять для обеспечения доставки соединений или композиций к желательному участку биологического действия. Эти способы включают, но без ограничения, пероральные (p.o.) способы, интрадуоденальные (i.d.) способы, парентеральную инъекцию (включая внутривенное (i.v.), подкожное (s.c.), внутрибрюшинное (i.p.), внутримышечное (i.m.), внутрисосудистое или инфузионное (inf.)), местное (top.) и ректальное (p.r.) введение. Согласно некоторым вариантам осуществления, соединения и композиции, описанные в настоящем документе, вводят перорально.

**[0058]** Термины «совместное введение» или аналогичные, как применяют в настоящем документе, понимают как охватывающие введение избранных лекарственных средств одному пациенту, и они предназначены для включения режимов лечения, в которых средства вводят в одно и то же или в различное время; посредством одного и того же способа или отличного способа. Согласно некоторым вариантам осуществления, избранные лекарственные средства составляют одну композицию. Согласно некоторым вариантам осуществления, избранные лекарственные средства представляют собой отдельные композиции.

**[0059]** Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество», как применяют в настоящем документе, относятся к достаточному вводимому количеству средства или соединения, которое может облегчать, до некоторой степени, один или несколько симптомов заболевания или состояния, подвергаемого лечению; например, уменьшение и/или облегчение одного или нескольких признаков, симптомов или причин заболевания, или любое другое желательное изменение биологической системы. Например, «эффективное количество» для терапевтических применений может представлять собой количество средства, которое обеспечивает клинически значимое уменьшение одного или нескольких симптомов заболевания. Соответствующее «эффективное» количество можно определять с использованием таких

способов, как исследование с повышением дозы, в индивидуальных случаях. Согласно некоторым вариантам осуществления, «эффективное количество» для терапевтических применений представляет собой количество средства, которое обеспечивает клинически значимое уменьшение размера опухоли, нагрузки опухоли, количества опухолей, или предотвращение онкогенеза.

**[0060]** Термин «субъект» или «пациент» включает млекопитающих. Примеры млекопитающих включают, но без ограничения, любого члена из класса млекопитающих: людей, не являющихся человеком приматов, таких как шимпанзе и другие виды человекообразных обезьян и обезьян; сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, лошади, овцы, козы, свиньи; домашних животных, таких как кролики, собаки и кошки; лабораторных животных, включая грызунов, таких как крысы, мыши и морские свинки, и аналогичные. Согласно одному аспекту, млекопитающее представляет собой человека. Термин «животное», как применяют в настоящем документе, включает людей и не являющихся человеком животных. В одном варианте осуществления, «не являющихся человеком животное» представляет собой млекопитающее, например, грызуна, такого как крыса или мышь.

**[0061]** Термины «лечить», «осуществление лечения» или «лечение», как применяют в настоящем документе, включают облегчение, уменьшение или смягчение по меньшей мере одного симптома заболевания или состояния, предотвращение дополнительных симптомов, ингибирование заболевания или состояния, например, арест развития заболевания или состояния, облегчение заболевания или состояния, вызов регрессии заболевания или состояния, облегчение состояния, вызванного заболеванием или состоянием, или остановку симптомов заболевания или состояния, профилактически и/или терапевтически.

**[0062]** Термин «осуществление предотвращения» или «предотвращение» состояния заболевания обозначает предотвращение развития клинических симптомов состояния заболевания у субъекта, который может подвергаться воздействию или предрасположенности к состоянию заболевания, но еще не испытывает или не проявляет симптомов состояния заболевания.

**[0063]** Как применяют в настоящем документе, термин «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий» следует читать для обозначения включения любого перечисленного признака, но не исключения любых других признаков. Таким образом, как применяют в настоящем документе, термин «содержащий» является включительным и не исключает дополнительные, не перечисленные признаки. Согласно некоторым вариантам осуществления любых из композиций и способов, представленных

в настоящем документе, «содержащий» можно заменять на «в основном состоящий из» или «состоящий из». Фразу «в основном состоящий из» применяют в настоящем документе как требующую указанного признака(ов), так же как признаков, не оказывающих существенного влияния на характер или функцию заявленного изобретения. Как применяют в настоящем документе, термин «состоящий из» применяют для указания присутствия только перечисленных признаков. Заголовки разделов, применяемые в настоящем документе, присутствуют только для целей организации, и их не следует рассматривать как ограничивающие описанный объект изобретения.

**[0064]** Настоящее изобретение относится к способам идентификации субъекта как имеющего зубчатый колоректальный рак или предрасположенного к развитию зубчатого колоректального рака (CRC), на основании детекции биомаркеров, раскрытых в настоящем документе, в биологическом образце, полученном от субъекта. Настоящее изобретение относится также к способам лечения зубчатого CRC у субъекта с использованием курса лечения, нацеленного на стромальную активацию и иммуносупрессию в микроокружении зубчатого CRC. Кроме того, настоящее изобретение относится к моделям зубчатого CRC человека, включая, но без ограничения, модели на животных и модели на тканях, так же как к способам получения моделей, раскрытых в настоящем документе. Настоящее изобретение относится также к способам применения моделей, раскрытых в настоящем документе, для идентификации модуляторов онкогенеза, которые можно применять в качестве терапевтического решения для зубчатого CRC.

#### **Способы диагностики и прогнозирования зубчатого колоректального рака у субъекта**

**[0065]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам диагностики, характеристики и/или прогнозирования зубчатого колоректального рака (CRC) у субъекта, при условии, что конкретные биомаркеры детектированы в биологическом образце, полученном от субъекта. Биологический образец можно получать напрямую или опосредованно от субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит биоптат ткани из кишечника, опухоли, или из того и другого. В некоторых случаях, биопсия ткани представляет собой игольную биопсию, хирургическую биопсию или аспирационную биопсию. В некоторых случаях, тонкоигольная биопсия включает тонкоигольную аспирацию (FNA). Согласно некоторым вариантам осуществления, биологический образец содержит цельную кровь, сыворотку или плазму. В некоторых случаях, субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых случаях, субъект представляет собой мышь, крысу, обезьяну или кролика. В



некоторых случаях, субъект представляет собой человека. В некоторых случаях, субъект страдает или имеет симптомы, связанные с заболеванием или состоянием. В некоторых случаях, заболевание или состояние включает воспалительное заболевание. Неограничивающие примеры воспалительного заболевания включают воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, колит, астму, кишечный фиброз, кишечное фибростенотическое заболевание, артритное заболевание, аутоиммунное заболевание и гепатит. В некоторых случаях, заболевание или состояние включает рак кишечника. Неограничивающие примеры рака кишечника включают аденокарциному, саркому, лейомиосаркому, карциноидные опухоли, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта и лимфому.

*Биомаркеры, используемые в диагностике и прогнозировании зубчатого колоректального рака*

**[0066]** Атипичная протеинкиназа C (aPKC)  $\zeta$  и  $\lambda/1$  принадлежат к подсемейству PKC. PKC $\lambda/1$  кодирована геном *PRKCI* (Entrez Gene ID No.5584). PKC $\zeta$  кодирована геном *PRKCZ* (Entrez Gene ID No. 5590). В описании в настоящем документе раскрыто, что одновременные делеции PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$  в эпителиальных клетках кишечника приводят к развитию сидячей зубчатой аденомы/полипов (SSA/P), которые прогрессируют до зубчатого колоректального рака (CRC) на поздних стадиях с сильно реактивной и иммуносупрессивной стромой. Кроме того, в описании в настоящем документе раскрыта увеличенная экспрессия гиалуронана (HA) и его рецептора, CD44 – фактора роста, вовлеченного в онкогенез CRC, в эпителиальных клетках кишечника (IEC) из MSS/зубчатых опухолей CRC. В настоящем документе раскрыто, что PKC $\zeta$ , PKC $\lambda/1$ , HA и/или CD44 могут являться полезными биомаркерами для идентификации субъектов, страдающих от или подверженных риску развития, MSS/зубчатого CRC. Субъекты с зубчатым CRC, лишенным PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$ , и с увеличенной экспрессией HA и/или CD44, являются устойчивыми ко многим способам на основе иммунотерапии. Таким образом, биомаркеры раскрытые в настоящем документе, являются полезными для идентификации субъектов, страдающих от или подверженных риску развития, зубчатого CRC, и позволяют обнаружение и улучшение альтернативных терапевтических решений.

*Способы диагностики у субъекта зубчатого CRC*

**[0067]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам диагностики подтипа колоректального рака (CRC) у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающим: а) получение биологического образца от нуждающегося в этом субъекта; b) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/1$ ; и c) диагностику у субъекта зубчатого

колоректального рака (CRC), при условии, что уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$ , детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются низкими, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  у индивидуума, не имеющего CRC. Уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  можно детектировать посредством измерения экспрессии генов *PKCZ* и *PKCI*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *PKCZ* и *PKCI*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  включает экспрессию рибонуклеиновой кислоты (РНК). Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  включает экспрессию дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). «Низкий» уровень экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  представляет собой статистически значимый уровень экспрессии ниже уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту с диагнозом зубчатый CRC, в соответствии со способами по настоящему изобретению, вводят ингибитор TGF- $\beta$ 1, PD-L1, гиалуронана или CD44, или комбинацию их ингибиторов. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  определяют с использованием способов детекции, раскрытых в настоящем документе. В некоторых случаях, детекция низких уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  в биологическом образце, полученном от субъекта, является показателем того, что субъект имеет увеличенную экспрессию гиалуронана и/или CD44 в эпителиальных клетках кишечника (IEC).

**[0068]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам диагностики подтипа колоректального рака (CRC) у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающим: а) получение биологического образца от нуждающегося в этом субъекта; б) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии гиалуронана и/или CD44; и с) диагностику у субъекта зубчатого колоректального рака (CRC), при условии, что уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются высокими, по сравнению с уровнями экспрессии гиалуронана и/или CD44 у индивидуума, не имеющего CRC. Уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44 можно детектировать посредством измерения экспрессии генов гиалуронан-синтазы 2 (*HAS2*) и/или *CD44*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *HAS2* и *CD44*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия

гиалуронана и CD44 включает экспрессию ДНК. «Высокий» уровень экспрессии гиалуронана и/или CD44 представляет собой статистически значимый уровень экспрессии выше уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту с диагнозом зубчатый CRC, в соответствии со способами по настоящему изобретению, вводят ингибитор TGF- $\beta$ 1, PD-L1, гиалуронана или CD44, или комбинацию их ингибиторов. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44 определяют с использованием способов детекции, раскрытых в настоящем документе.

**[0069]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам диагностики подтипа колоректального рака (CRC) у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающим: а) получение биологического образца от нуждающегося в этом субъекта; б) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$ ; в) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии гиалуронана и/или CD44; и d) диагностику у субъекта зубчатого колоректального рака (CRC), при условии, что уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$ , детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются низкими, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  у индивидуума, не имеющего CRC, и при условии, что уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются высокими, по сравнению с уровнями экспрессии гиалуронана и/или CD44 у индивидуума, не имеющего CRC. Уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  можно детектировать посредством измерения экспрессии генов *PKCZ* и *PKCI*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *PKCZ* и *PKCI*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  включает экспрессию ДНК. «Низкий» уровень экспрессии PKC $\zeta$  и PKC $\lambda/\iota$  представляет собой статистически значимый уровень экспрессии ниже уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44 можно детектировать посредством измерения экспрессии генов *HAS2* и/или *CD44*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *HAS2* и *CD44*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления,

экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию ДНК. «Высокий» уровень экспрессии гиалуронана и/или CD44 представляет собой статистически значимый уровень экспрессии выше уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту с диагнозом зубчатый CRC, в соответствии со способами по настоящему изобретению, вводят ингибитор TGF- $\beta$ 1, PD-L1, гиалуронана или CD44, или комбинацию их ингибиторов. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$ , PCK $\lambda$ /1, гиалуронана и CD44 определяют с использованием способов детекции, раскрытых в настоящем документе.

#### *Характеризация подтипа колоректального рака*

**[0070]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам характеристики подтипа колоректального рака (CRC) у субъекта, предусматривающим: а) получение биологического образца от субъекта; б) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1; и с) характеристику CRC у субъекта как зубчатого CRC, при условии, что уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются низкими, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 у индивидуума, не имеющего CRC. Уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 можно детектировать посредством измерения экспрессии генов *PKCZ* и *PKCI*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *PKCZ* и *PKCI*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 включает экспрессию ДНК. «Низкий» уровень экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 представляет собой статистически значимый уровень экспрессии ниже уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту с CRC, охарактеризованным как зубчатый CRC, в соответствии со способами по настоящему изобретению вводят ингибитор TGF- $\beta$ 1, PD-L1, гиалуронана или CD44, или комбинацию их ингибиторов. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 определяют с использованием способов детекции, раскрытых в настоящем документе. В некоторых случаях, детекция низких уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 в биологическом образце, полученном от субъекта, является показателем того, что субъект имеет увеличенную экспрессию гиалуронана и/или CD44 в эпителиальных клетках кишечника (IEC).

**[0071]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам характеристики подтипа колоректального рака (CRC) у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающим: а) получение биологического образца от нуждающегося в этом субъекта; б) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии гиалуронана и/или CD44; и с) характеристику CRC как зубчатого колоректального рака (CRC), при условии, что уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются высокими, по сравнению с уровнями экспрессии гиалуронана и/или CD44 у индивидуума, не имеющего CRC. Уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44 можно детектировать посредством измерения экспрессии генов *HAS2* и/или *CD44*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *HAS2* и *CD44*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию ДНК. «Высокий» уровень экспрессии гиалуронана и/или CD44 представляет собой статистически значимый уровень экспрессии выше уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту с CRC, охарактеризованному как зубчатый CRC, в соответствии со способами по настоящему изобретению, вводят ингибитор TGF- $\beta$ 1, PD-L1, гиалуронана или CD44, или комбинацию их ингибиторов. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44 определяют с использованием способов детекции, раскрытых в настоящем документе.

**[0072]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам характеристики подтипа колоректального рака (CRC) у субъекта, предусматривающим: а) получение биологического образца от нуждающегося в этом субъекта; б) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1; с) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии гиалуронана и/или CD44; и d) характеристику подтипа CRC как зубчатого CRC, при условии, что уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются низкими, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 у индивидуума, не имеющего CRC, и при условии, что уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются высокими, по сравнению с уровнями экспрессии гиалуронана и/или CD44 у индивидуума, не имеющего CRC. Уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 можно детектировать посредством измерения экспрессии

генов *PKCZ* и *PKCI*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *PKCZ* и *PKCI*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия *PKCζ* и *РСКλ/ι* включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия *PKCζ* и *РСКλ/ι* включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия *PKCζ* и *РСКλ/ι* включает экспрессию ДНК. «Низкий» уровень экспрессии *PKCζ* и *РСКλ/ι* представляет собой статистически значимый уровень экспрессии ниже уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44 можно детектировать посредством измерения экспрессии генов *HAS2* и/или *CD44*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *HAS2* и *CD44*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию ДНК. «Высокий» уровень экспрессии гиалуронана и/или CD44 представляет собой статистически значимый уровень экспрессии выше уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту с CRC, охарактеризованному как зубчатый CRC, в соответствии со способами по настоящему изобретению, вводят ингибитор TGF-β1, PD-L1, гиалуронана или CD44, или комбинацию их ингибиторов. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии *PKCζ*, *РСКλ/ι*, гиалуронана и CD44 определяют с использованием способов детекции, раскрытых в настоящем документе.

*Определение того, имеет ли субъект, или может ли у него развиваться зубчатый колоректальный рак*

**[0073]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам определения того, имеет ли субъект, или может ли у него развиваться зубчатый колоректальный рак (CRC), предусматривающим: а) получение биологического образца от нуждающегося в этом субъекта; b) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии *PKCζ* и *РСКλ/ι*; и c) определение того, что субъект имеет или у него может развиваться зубчатый CRC, при условии, что уровни экспрессии *PKCζ* и *РСКλ/ι*, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются низкими, по сравнению с уровнями экспрессии *PKCζ* и *РСКλ/ι* у индивидуума, не имеющего CRC. Уровни экспрессии *PKCζ* и *РСКλ/ι* можно детектировать посредством измерения экспрессии генов *PKCZ* и *PKCI*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *PKCZ* и *PKCI*. Согласно некоторым вариантам

осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  включает экспрессию рибонуклеиновой кислоты (РНК). Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  включает экспрессию дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). «Низкий» уровень экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  представляет собой статистически значимый уровень экспрессии ниже уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту, у которого определено наличие или прогнозировано развитие зубчатого CRC, в соответствии со способами по настоящему изобретению, вводят ингибитор TGF- $\beta$ 1, PD- L1, гиалуронана или CD44, или комбинацию их ингибиторов. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  определяют с использованием способов детекции, раскрытых в настоящем документе. В некоторых случаях, детекция низких уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  в биологическом образце, полученном от субъекта, является показателем того, что субъект имеет увеличенную экспрессию гиалуронана и/или CD44 в эпителиальных клетках кишечника (IEC).

**[0074]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам определения того, имеет ли субъект, или может ли у него развиваться, зубчатый колоректальный рак (CRC), предусматривающим: а) получение биологического образца от нуждающегося в этом субъекта; b) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии гиалуронана и/или CD44; и c) определение того, что субъект имеет или у него может развиваться зубчатый CRC, при условии, что уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются высокими, по сравнению с уровнями экспрессии гиалуронана и/или CD44 у индивидуума, не имеющего CRC. Уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44 можно детектировать посредством измерения экспрессии генов гиалуронан-синтазы 2 (*HAS2*) и/или *CD44*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *HAS2* и *CD44*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию ДНК. «Высокий» уровень экспрессии гиалуронана и/или CD44 представляет собой статистически значимый уровень экспрессии выше уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту, у которого определено наличие или прогнозировано

развитие зубчатого CRC, в соответствии со способами по настоящему изобретению, вводят ингибитор TGF- $\beta$ 1, PD-L1, гиалуронана или CD44, или комбинацию их ингибиторов. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44 определяют с использованием способов детекции, раскрытых в настоящем документе.

**[0075]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам определения того, имеет ли субъект, или может ли у субъекта развиваться зубчатый CRC, предусматривающим: а) получение биологического образца от нуждающегося в этом субъекта; b) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /i; c) подвергание биологического образца анализу, подходящему для детекции уровней экспрессии гиалуронана и/или CD44; и d) определение того, что субъект имеет или у него может развиваться зубчатый CRC, при условии, что уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /i, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются низкими, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /i у индивидуума, не имеющего CRC, и при условии, что уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44, детектированные в биологическом образце, полученном от субъекта, являются высокими, по сравнению с уровнями экспрессии гиалуронана и/или CD44 у индивидуума, не имеющего CRC. Уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /i можно детектировать посредством измерения экспрессии генов *PKCZ* и *PKCI*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *PKCZ* и *PKCI*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /i включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /i включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /i включает экспрессию ДНК. «Низкий» уровень экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /i представляет собой статистически значимый уровень экспрессии ниже уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием, индивидуума. Уровни экспрессии гиалуронана и/или CD44 можно детектировать посредством измерения экспрессии генов *HAS2* и/или *CD44*, или продуктов генов, экспрессированных с генов *HAS2* и *CD44*. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию РНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию белка. Согласно некоторым вариантам осуществления, экспрессия гиалуронана и CD44 включает экспрессию ДНК. «Высокий» уровень экспрессии гиалуронана и/или CD44 представляет собой статистически значимый уровень экспрессии выше уровня экспрессии у нормального, или не пораженного заболеванием,



индивидуума. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъекту, у которого определено наличие или прогнозировано развитие зубчатого CRC, в соответствии со способами по настоящему изобретению, вводят ингибитор TGF- $\beta$ 1, PD-L1, гиалуронана или CD44, или комбинацию их ингибиторов. Согласно некоторым вариантам осуществления, уровни экспрессии PKC $\zeta$ , PKC $\lambda$ /1, гиалуронана и CD44 определяют с использованием способов детекции, раскрытых в настоящем документе.

**[0076]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам оценки биологического образца, полученного от субъекта, по присутствию, отсутствию и/или количеству последовательности нуклеиновой кислоты из гена, включающего *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*, или продукта гена, экспрессированного с гена, включающего *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты содержит дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты содержит денатурированную молекулу ДНК или ее фрагмент. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты содержит ДНК, выбранную из: геномной ДНК, вирусной ДНК, митохондриальной ДНК, плазмидной ДНК, амплифицированной ДНК, кольцевой ДНК, циркулирующей ДНК, внеклеточной ДНК или экзосомной ДНК. В некоторых случаях, ДНК представляет собой одноцепочечную ДНК (оцДНК), двухцепочечную ДНК, денатурированную двухцепочечную ДНК, синтетическую ДНК и их комбинации. Кольцевая ДНК может являться расщепленной или фрагментированной. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты содержит рибонуклеиновую кислоту (РНК). В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты содержит фрагментированную РНК. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты содержит частично деградированную РНК. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты содержит микроРНК или ее часть. В некоторых случаях, последовательность нуклеиновой кислоты содержит молекулу РНК или фрагментированную молекулу РНК (фрагменты РНК), выбранные из: микроРНК (мкРНК), пре-мкРНК, пре-мкРНК, мРНК, пре-мРНК, вирусной РНК, вироидной РНК, вирусоидной РНК, кольцевой РНК (кольцРНК), рибосомной РНК (рРНК), транспортной РНК (тРНК), пре-тРНК, длинной некодирующей РНК (днкРНК), малой ядерной РНК (мяРНК), циркулирующей РНК, внеклеточной РНК, экзосомной РНК, экспрессируемой посредством вектора РНК, транскрипта РНК, синтетической РНК и их комбинаций.

**[0077]** Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к анализам детекции на основе нуклеиновой кислоты, которые можно использовать для детекции присутствия, отсутствия и/или количества последовательности

нуклеиновой кислоты из гена, включающего *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*, или продукта гена, экспрессированного с гена, включающего *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*. В некоторых случаях, анализ детекции на основе нуклеиновой кислоты включает количественную полимеразную цепную реакцию (qПЦР), электрофорез в геле (включая, например, для Нозерн- или Саузерн-блоттинга), иммунохимию, гибридизацию *in situ*, такую как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), цитохимию или секвенирование. Согласно некоторым вариантам осуществления, способ секвенирования включает секвенирование нового поколения. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы предусматривают анализ гибридизации, такой как флуорогенная qПЦР (например, с TaqMan™ или SYBR зеленым), предусматривающий реакцию амплификации нуклеиновой кислоты со специфической парой праймеров и гибридизацию амплифицированных зондов на основе нуклеиновой кислоты, содержащих поддающуюся детекции группу или молекулу, которая является специфической для последовательности нуклеиновой кислоты - мишени. Дополнительный приведенный в качестве примера анализ детекции на основе нуклеиновой кислоты предусматривает применение зондов на основе нуклеиновой кислоты, конъюгированных или иным образом иммобилизованных на бусине, многолуночной планшете или другом субстрате, причем зондам на основе нуклеиновой кислоты придана конфигурация для гибридизации с последовательностью нуклеиновой кислоты - мишенью. В некоторых случаях, применяют зонд на основе нуклеиновой кислоты, специфический для одного или нескольких генов, раскрытых в настоящем документе. В некоторых случаях, зонд на основе нуклеиновой кислоты является специфическим для *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*, или продукта гена, экспрессированного с гена, включающего *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*.

**[0078]** Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способам детекции гена у индивидуума посредством подвергания образца, полученного от индивидуума, анализу амплификации нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях, анализ амплификации включает полимеразную цепную реакцию (ПЦР), qПЦР, самоподдерживающуюся репликацию последовательности, систему транскрипционной амплификации, репликазу Q-бета, репликацию по типу катящегося кольца или любой другой пригодный способ амплификации нуклеиновой кислоты. Пригодный способ амплификации нуклеиновой кислоты имеет конфигурацию для амплификации области последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей один или несколько генов, или экспрессии продуктов генов из них, раскрытых в настоящем документе. В некоторых случаях, анализы амплификации требуют праймеров. Последовательность нуклеиновой кислоты для гена, или его продуктов экспрессии гена, известная или представленная в

настоящем документе, является достаточной, чтобы позволить специалисту в данной области выбор праймеров для амплификации любой части гена или генетических вариантов. Образец ДНК, пригодный в качестве праймера, можно получать, например, посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации геномной ДНК, фрагментов геномной ДНК, фрагментов геномной ДНК, лигированных с адаптерными последовательностями, или клонированных последовательностей. Специалист в данной области может применять компьютерные программы для конструирования праймеров с желательной специфичностью и оптимальными свойствами амплификации, такие как Oligo версии 7.0 (National Biosciences). Специалисту в данной области очевидно, что контролируемые роботизированные системы являются полезными для выделения и амплификации нуклеиновых кислот и могут быть применены.

**[0079]** Согласно некоторым вариантам осуществления, детекция присутствия или отсутствия, и/или количества гена, включающего *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*, или экспрессии продукта экспрессии гена с гена *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*, предусматривает секвенирование генетического материала, полученного из биологического образца от субъекта. Секвенирование можно проводить с использованием любого подходящего способа секвенирования, включая, но без ограничения, секвенирование отдельной молекулы с детекцией в реальном времени (SMRT), полони-секвенирование, секвенирование посредством лигирования, секвенирование с использованием обратимых терминаторов, секвенирование с протонной детекцией, ионное полупроводниковое секвенирование, секвенирование в нанопорах, электронное секвенирование, пиросеквенирование, секвенирование по Максаму-Гилберту, секвенирование с терминацией цепей (например, по Сэнгеру), +S секвенирование, или секвенирование посредством синтеза. Способы секвенирования также включают секвенирование нового поколения, например, современные способы секвенирования, такие как секвенирование Illumina (например, Solexa), секвенирование Roche 454, секвенирование ионного потока и секвенирование SOLiD. В некоторых случаях, секвенирование нового поколения предусматривает высокопроизводительные способы секвенирования. Можно также применять дополнительные способы секвенирования, доступные специалисту в данной области.

**[0080]** В некоторых случаях, количество нуклеотидов, подвергаемых секвенированию, составляет по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 20000, 50000, 100000 или более чем 100000 нуклеотидов. В некоторых случаях, количество секвенированных нуклеотидов лежит в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 100000 нуклеотидов, от

приблизительно 1 до приблизительно 10000 нуклеотидов, от приблизительно 1 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 1 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 1 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 1 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 1 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 5 до приблизительно 100000 нуклеотидов, от приблизительно 5 до приблизительно 10000 нуклеотидов, от приблизительно 5 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 5 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 5 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 5 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 100000 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 10000 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 100000 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 10000 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 20 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 30 до приблизительно 100000 нуклеотидов, от приблизительно 30 до приблизительно 10000 нуклеотидов, от приблизительно 30 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 30 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 30 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 30 до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 30 до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 100000 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 10000 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 1000 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 500 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 50 до приблизительно 200 нуклеотидов, от или приблизительно 50 до приблизительно 100 нуклеотидов.

**[0081]** Согласно некоторым вариантам осуществления, детекция присутствия или отсутствия, и/или количества гена, включающего *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*, или экспрессии продукта экспрессии гена с гена, включающего *HAS2*, *CD44*, *PKCZ* и/или *PKCI*, предусматривает гибридизацию зонда или репортерной последовательности с

нуклеиновой кислотой-мишенью, раскрытой в настоящем документе. Примеры молекул, используемых в качестве зондов, включают, но без ограничения, РНК и ДНК. Согласно некоторым вариантам осуществления, термин «зонд», применительно к нуклеиновым кислотам, относится к любой молекуле, которая является способной к избирательному связыванию со специфически намеченной последовательностью нуклеиновой кислоты - мишенью. В некоторых случаях, зонды специфически конструируют для мечения, например, с использованием радиоактивной метки, флуоресцентной метки, фермента, хемилюминесцентной метки, колориметрической метки или других меток или ярлыков, известных в данной области. В некоторых случаях, флуоресцентная метка содержит флуорофор. В некоторых случаях, флуорофор представляет собой ароматическое или гетероароматическое соединение. В некоторых случаях, флуорофор представляет собой пирен, антрацен, нафталин, акридин, стильбен, бензоксазол, индол, бензиндол, оксазол, тиазол, бензотиазол, цианин, карбоцианин, салицилат, антранилат, ксантеновые красители, кумарин. Приведенные в качестве примера ксантеновые красители включают, например, флуоресцеиновые и родаминовые красители. Флуоресцеиновые и родаминовые красители включают, но без ограничения, 6-карбоксифлуоресцеин (FAM), 2'7'-диметокси-4'5'-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (JOE), тетрахлорфлуоресцеин (TET), 6-карбоксиродамин (R6G), N,N,N; N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA), 6-карбокси-X-родамин (ROX). Пригодные флуоресцентные зонды также включают нафтиламиновые красители, имеющие аминогруппу в альфа- или бета-положении. Например, нафтиламиновые соединения включают 1-диметиламинонафтил-5-сульфонат, 1-анилино-8-нафталинсульфонат и 2-п-толуидинил-6-нафталинсульфонат, 5-(2'-аминоэтил)аминонафталин-1-сульфоновую кислоту (EDANS). Приведенные в качестве примера кумарины включают, например, 3-фенил-7-изоцианаткумарин; акридины, такие как 9-изотиоцианатакридин и акридиновый оранжевый; N-(п-(2-бензоксазолил)фенил)малеинимид; цианины, например, такие как индодикарбоцианин 3 (Cy3), индодикарбоцианин 5 (Cy5), индодикарбоцианин 5,5 (Cy5.5), 3-(-карбокси-пентил)-3'-этил-5,5'-диметилксакарбоцианин (CyA); 1H, 5H, 11H, 15H-ксантено[2,3, 4-ij: 5,6, 7-i'j']дихинолизин-18-ий, 9-[2 (или 4)-[[[6-[2,5-диоксо-1-пирролидинил)окси]-6-оксогексил]амино]сульфонил]-4 (или 2)-сульфофенил]-2,3, 6,7, 12,13, 16,17-октагидро-внутреннюю соль (TR или техасский красный); или красители BODIPY™. В некоторых случаях, зонд содержит FAM в качестве окрашивающей метки.

**[0082]** В некоторых случаях, праймеры и/или зонды, раскрытые в настоящем документе для детекции нуклеиновой кислоты – мишени, применяют в реакции амплификации. В некоторых случаях, реакция амплификации представляет собой qПЦР.

Приведенная в качестве примера qПЦР представляет собой способ, предусматривающий анализ TaqMan™.

**[0083]** В некоторых случаях, qПЦР предусматривает применение интеркалирующего красителя. Примеры интеркалирующих красителей включают SYBR зеленый I, SYBR зеленый II, SYBR золотой, бромид этидия, метиленовый синий, Pyronin Y, DAPI, акридиновый оранжевый, Blue View или фикоэритрин. В некоторых случаях, интеркалирующий краситель представляет собой SYBR.

**[0084]** В некоторых случаях, количество циклов амплификации для детекции нуклеиновой кислоты – мишени в анализе амплификации составляет от приблизительно 5 до приблизительно 30 циклов. В некоторых случаях, количество циклов амплификации для детекции нуклеиновой кислоты – мишени составляет по меньшей мере приблизительно 5 циклов. В некоторых случаях, количество циклов амплификации для детекции нуклеиновой кислоты – мишени составляет, самое большее, приблизительно 30 циклов. В некоторых случаях, количество циклов амплификации для детекции нуклеиновой кислоты – мишени составляет от приблизительно 5 до приблизительно 10, от приблизительно 5 до приблизительно 15, от приблизительно 5 до приблизительно 20, от приблизительно 5 до приблизительно 25, от приблизительно 5 до приблизительно 30, от приблизительно 10 до приблизительно 15, от приблизительно 10 до приблизительно 20, от приблизительно 10 до приблизительно 25, от приблизительно 10 до приблизительно 30, от приблизительно 15 до приблизительно 20, от приблизительно 15 до приблизительно 25, от приблизительно 15 до приблизительно 30, от приблизительно 20 до приблизительно 25, от приблизительно 20 до приблизительно 30 или от приблизительно 25 до приблизительно 30 циклов.

**[0085]** Согласно одному аспекту, способы, представленные в настоящем документе для определения присутствия, отсутствия, и/или количества последовательности нуклеиновой кислоты конкретного генотипа, предусматривают реакцию амплификации, такую как qПЦР. В приведенном в качестве примера способе, генетический материал получают из образца от субъекта, например, образца крови или сыворотки. Согласно конкретным вариантам осуществления, в которых выделяют нуклеиновые кислоты, нуклеиновые кислоты выделяют с использованием любого способа, не создающего помех для последующего анализа. Согласно конкретным вариантам осуществления, в этом способе применяют преципитацию спиртом с использованием этанола, метанола или изопропилового спирта. Согласно конкретным вариантам осуществления, в этом способе применяют фенол, хлороформ или любую их комбинацию. Согласно конкретным вариантам осуществления, в этом способе применяют хлорид цезия. Согласно

конкретным вариантам осуществления, в этом способе применяют ацетат натрия, калия или аммония, или любую другую соль, общеупотребительную для преципитации ДНК. Согласно конкретным вариантам осуществления, в этом способе применяют схему очистки нуклеиновой кислоты на основе колонки или смолы, таких как обычно продаваемые коммерчески, одним неограничивающим примером может являться набор GenElute Bacterial Genomic DNA, доступный из Sigma Aldrich. Согласно конкретным вариантам осуществления, после экстракции нуклеиновую кислоту хранят в воде, буфере Трис, или буфере Трис-ЭДТА до последующего анализа. Согласно иллюстративному варианту осуществления, материал нуклеиновой кислоты экстрагируют в воде. В некоторых случаях, экстракция не предусматривает очистку нуклеиновой кислоты.

**[0086]** В приведенном в качестве примера анализе qПЦР, образец нуклеиновой кислоты комбинируют с праймерами и зондами, специфическими для нуклеиновой кислоты-мишени, которая может присутствовать или может не присутствовать в образце, и ДНК-полимеразой. Реакцию амплификации проводят с использованием термоциклера, который нагревает и охлаждает образец для амплификации нуклеиновой кислоты, и освещает образец при специфической длине волны для возбуждения флуорофора на зонде и детекции излученной флуоресценции. Для способов с TaqMan™, зонд может представлять собой гидролизуемый зонд, содержащий флуорофор и гаситель, который подвергается гидролизу посредством ДНК-полимеразы при гибридизации с нуклеиновой кислотой - мишенью. В некоторых случаях, присутствие нуклеиновой кислоты – мишени определяют, когда количество циклов амплификации для достижения порогового значения составляет менее, чем 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21 или 20 циклов.

**[0087]** Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к детекции и количественной оценке уровней растворимых белков гиалуронана, CD44, PKC $\zeta$ , и/или PCK $\lambda/1$  у субъекта посредством детекции и количественной оценки указанных уровней по биологическому образцу, полученному от субъекта. Гиалуронан, CD44, PKC $\zeta$  и/или PCK $\lambda/1$  можно детектировать посредством использования анализа на основе антител, в котором используют антитело, специфическое к гиалуронану, CD44, PKC $\zeta$ , и/или PCK $\lambda/1$  (например, антитела против гиалуронана, против CD44, против PKC $\zeta$ , и/или против PCK $\lambda/1$ ). Для способов детекции на основе антител, антитело может связываться с любой областью гиалуронана, CD44, PKC $\zeta$  и/или PCK $\lambda/1$ . Приведенный в качестве примера способ анализа предусматривает проведение твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Анализ ELISA может представлять собой сэндвич-ELISA или прямой ELISA. Другой приведенный в качестве примера способ анализа предусматривает массив отдельных молекул, например, Simoa. Другие приведенные в

качестве примера способы детекции включают иммуногистохимию и горизонтальный проточный анализ.

**[0088]** В некоторых случаях, белок гиалуронан и/или CD44 можно детектировать посредством детекции связывания между гиалуронаном и/или CD44 и другими партнерами по связыванию гиалуронана и/или CD44. Способы анализа связывания между гиалуронаном и/или CD44, так же как с другими партнерами по связыванию, предусматривают проведение анализа *in vivo* или *in vitro*, или *ex vivo*. В некоторых случаях, анализ может предусматривать коиммунопреципитацию (co-IP), осаждение, анализ взаимодействия белков с перекрестным сшиванием, анализ взаимодействия белков с переносом метки или анализ дальнего Вестерн-блоттинга, анализ на основе FRET, включая, например, FRET-FLIM, дрожжевой двухгибридный анализ, BiFC или анализ расщепленной люциферазы.

#### **Способы лечения зубчатого колоректального рака**

**[0089]** В настоящем документе раскрыто, что лечение субъектов с имеющим микросателлитную стабильность (MSS) зубчатым колоректальным раком (CRC) с использованием антагониста лиганда-1 программируемой клеточной смерти (PD-L1) вызывало регрессию зубчатых опухолей на стадии инициации/аденомы. В то же время, лечение субъектов с MSS/зубчатым CRC с аденокарциномами на поздних стадиях, характеризующимися сильно реактивной и иммуносупрессивной стромой, с использованием антагониста PD-L1, вызывало регрессию зубчатых опухолей только при совместном введении ингибитора рецептора трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1), который служит для сенсibilизации зубчатых опухолей к лечению посредством антитела против PD-L1. Кроме того, раскрыто, что увеличенная экспрессия гиалуронана (HA) и его рецептора, CD44 – фактора роста, вовлеченного в онкогенез, в эпителиальных клетках кишечника (IEC) из опухолей MSS/зубчатого CRC, позволяет предполагать, что прерывание взаимодействия между HA и CD44 может обеспечивать подходящее терапевтическое решение для смягчения онкогенеза у субъекта с MSS/зубчатым CRC.

**[0090]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам лечения заболевания или состояния, или подтипа заболевания или состояния, у субъекта посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества одного или нескольких из лекарственных средств, раскрытых в настоящем документе. В некоторых случаях, заболевание или состояние включает колоректальный рак (CRC), рак поджелудочной железы, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона, фиброз, фиброзноз или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам



осуществления, субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых случаях, подтип CRC включает зубчатый CRC. В некоторых случаях, зубчатый CRC включает подтип MSS зубчатого CRC. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, субъект представляет собой мышь, крысу, обезьяну или кролика.

#### *Лекарственные средства*

**[0091]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам лечения заболевания или состояния, или подтипа заболевания или состояния, у субъекта посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества лекарственного средства, раскрытого в настоящем документе, при условии, что низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  детектированы в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние. Согласно некоторым вариантам осуществления, лекарственное средство является эффективным для уменьшения или увеличения активности или экспрессии терапевтической мишени. Неограничивающие примеры терапевтических мишеней включают PD-L1, PD-1, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ R1, гиалуронан, CD44 и гиалуронидазу. Неограничивающие примеры лекарственных средств включают агонисты и антагонисты вышеуказанных терапевтических мишеней.

#### *Ингибитор активности или экспрессии PDL-1*

**[0092]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам лечения заболевания или состояния, или подтипа заболевания или состояния, у субъекта посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), при условии, что низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  детектированы в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние. Согласно конкретным вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способам ингибирования или уменьшения активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1) у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, предусматривающим: а) идентификацию субъекта как имеющего низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$ , по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние; и б) введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии PD-L1. Субъекта можно идентифицировать как имеющего низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda/1$  с использованием любого из способов детекции, раскрытых в настоящем документе.

**[0093]** В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 представляет собой не прямой ингибитор. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 представляет собой прямой ингибитор. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит аллостерический модулятор PD-L1, или белка 1 программируемой клеточной смерти (PD-1), или обоих. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит антитело, или фрагмент антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления, антитело включает моноклональное антитело, химерное антитело, антитело с привитой CDR, гуманизированное антитело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, связанный дисульфидными связями Fv, scFv, однодоменное антитело, диатело, мультиспецифическое антитело, антитело с двойной специфичностью, антиидиотипическое антитело, биспецифическое антитело или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает антитело IgG. В некоторых случаях, антитело или фрагмент антитела связывается с PD-L1. В некоторых случаях, антитело или фрагмент антитела связывается с белком 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии PD-L1 содержит малую молекулу. В некоторых случаях, малая молекула - ингибитор PD-L1 специфически связывается с PD-L1. В некоторых случаях, малая молекула - ингибитор PD-L1 специфически связывается с PD-1. Неограничивающие примеры ингибиторов активности или экспрессии PD-L1 включают пембролизумаб, атезолизумаб (например, Тецентрик®), авелумаб (например, Бавенсио®), дурвалумаб (например, Имфинзи®), ниволумаб (например, Опдиво®), eFT508, LY3300054, HMS-936559, CK-301, пидилизумаб, AMP-224, AM P-514, PDR001, цемиплимаб.

#### *Ингибитор активности или экспрессии TGF-β1*

**[0094]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам лечения заболевания или состояния, или подтипа заболевания или состояния, у субъекта посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии TGF-β1, при условии, что низкие уровни экспрессии PCKζ и PCKλ/ι детектированы в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с уровнями экспрессии PCKζ и PCKλ/ι у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние. Согласно конкретным вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способам ингибирования или уменьшения активности или экспрессии TGF-β1 у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием, предусматривающим: а) идентификацию субъекта как имеющего низкие уровни экспрессии PCKζ и PCKλ/ι, по сравнению с уровнями экспрессии PCKζ и PCKλ/ι у индивидуума, не имеющего

заболевание или состояние; и b) введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1. Субъекта можно идентифицировать как имеющего низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1, с использованием любого из способов детекции, раскрытых в настоящем документе.

**[0095]** В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 представляет собой не прямой ингибитор. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 представляет собой прямой ингибитор. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит аллостерический модулятор TGF- $\beta$ 1 или рецептора TGF- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ R1), или обоих. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит антитело, или фрагмент антитела. Согласно некоторым вариантам осуществления, антитело включает моноклональное антитело, химерное антитело, антитело с привитой CDR, гуманизированное антитело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, связанный дисульфидными связями Fv, scFv, однодоменное антитело, диатело, мультиспецифическое антитело, антитело с двойной специфичностью, антиидиотипическое антитело, биспецифическое антитело, или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит антитело IgG. В некоторых случаях, антитело или фрагмент антитела связывается с TGF- $\beta$ 1. В некоторых случаях, антитело или фрагмент антитела связывается с TGF- $\beta$ R1. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 содержит малую молекулу. В некоторых случаях, малая молекула - ингибитор TGF- $\beta$ 1 специфически связывается с TGF- $\beta$ 1. В некоторых случаях, малая молекула - ингибитор TGF- $\beta$ 1 специфически связывается с TGF- $\beta$ R1. Неограничивающие примеры ингибиторов активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 включают галунисертиб (LY2157299), фрезолимуаб (GC1008), луканикс (белагенпуматуцел-L) LY550410, LY580276 и трабедерсен.

#### *Ингибитор активности или экспрессии гиалуронана*

**[0096]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам лечения заболевания или состояния, или подтипа заболевания или состояния, у субъекта посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана, при условии, что низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 детектированы в биологическом образце, полученном от субъекта, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние. Согласно конкретным вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способам ингибирования или уменьшения активности или экспрессии гиалуронана у субъекта, страдающего заболеванием или состоянием,

предусматривающим: а) идентификацию субъекта как имеющего низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1, по сравнению с уровнями экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 у индивидуума, не имеющего заболевание или состояние; и б) введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана. Субъекта можно идентифицировать как имеющего низкие уровни экспрессии PKC $\zeta$  и PCK $\lambda$ /1 с использованием любого из способов детекции, раскрытых в настоящем документе.

**[0097]** В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана представляет собой непрямой ингибитор. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана представляет собой прямой ингибитор. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит аллостерический модулятор гиалуронана или CD44, или обоих.

**[0098]** В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит гиалуронидазу, или агонист активности или экспрессии гиалуронидазы. Неограничивающий пример гиалуронидазы включает ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA). В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу. В некоторых случаях, экзогенная гиалуронидаза содержит рекомбинантную гиалуронидазу. В некоторых случаях, рекомбинантная гиалуронидаза содержит рекомбинантную гиалуронидазу человека.

**[0099]** Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана (например, PVHA) можно вводить субъекту в качестве монотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления, когда вводят ингибитор активности или экспрессии гиалуронана, субъекту не вводят никакие другие лекарственные средства. Предусматривают, что, согласно некоторым вариантам осуществления, применение ингибитора активности или экспрессии гиалуронана отдельно, в качестве монотерапии, в терапевтически эффективной дозе, является достаточно эффективным для лечения зубчатой опухоли у субъекта, по сравнению с другими способами комбинированного лечения.

**[0100]** Согласно некоторым вариантам осуществления, доза ингибитора активности или экспрессии гиалуронана, гиалуронидазы, или агониста активности или экспрессии гиалуронидазы представляет собой терапевтически эффективную дозу. Например, когда ингибитор активности или экспрессии гиалуронана представляет собой PVHA, терапевтически эффективное количество PVHA составляет между 0,01 и 0,5 мг/кг, между 0,02 и 0,4 мг/кг или между 0,05 и 0,3 мг/кг.

**[0101]** Альтернативно и/или дополнительно, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения онкогенеза по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом. Согласно некоторым вариантам осуществления, онкогенез количественно оценивают с использованием подсчета зубчатых полипов и карцином.

**[0102]** Альтернативно и/или дополнительно, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения опухолевой нагрузки по меньшей мере на 20% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом. Согласно некоторым вариантам осуществления, опухолевую нагрузку количественно оценивают с использованием по меньшей мере одного из суммарного количества опухолей, среднего размера опухолей или нагрузки опухолей. Альтернативно и/или дополнительно, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения гиалуронана в опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления, терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения коллагена в опухоли.

**[0103]** В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист, антитело, или фрагмент антитела. В некоторых случаях, антагонист, антитело или фрагмент антитела связывается с гиалуронаном. В некоторых случаях, антитело или фрагмент антитела связывается с 70%, 80%, 90% или 100% молекул гиалуронана. В некоторых случаях, антитело или фрагмент антитела связывается с CD44. В некоторых случаях, антитело или фрагмент антитела ингибирует связывание и/или агонизм между гиалуронаном и CD44.

**[0104]** В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу. В некоторых случаях, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу, эффективную для ингибирования связывания и/или агонизма между гиалуронаном и CD44. В некоторых случаях, малая молекула - ингибитор гиалуронана специфически связывается с гиалуронаном. В некоторых случаях, малая молекула - ингибитор гиалуронана специфически связывается с CD44. Неограничивающие примеры ингибиторов активности или экспрессии гиалуронана включают 4-метилумбеллиферон (4-MU), гиалуронидазу PH20 (rHuPH20),

рекомбинантную человеческую гиалуронидазу, пэгилированную рекомбинантную человеческую гиалуронидазу.

**[0105]** В некоторых случаях, непрямой ингибитор гиалуронана содержит прямой ингибитор CD44. В некоторых случаях, прямой ингибитор CD44 содержит антитело или фрагмент антитела против CD44. В некоторых случаях, прямой ингибитор CD44 содержит ДНК-вакцину. В некоторых случаях, прямой ингибитор CD44 содержит мРНК CD44. В некоторых случаях, непрямой ингибитор гиалуронана содержит прямой ингибитор CD44. В некоторых случаях, прямой ингибитор CD44 включает терапию с использованием конъюгированных с антителом против CD44 клеток. Неограничивающие примеры ингибиторов активности или экспрессии CD44 включают AMC303 и RG7356.

#### *Фармацевтические композиции*

**[0106]** Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим ингибитор активности или экспрессии PD-L1, ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 и/или ингибитор активности или экспрессии гиалуронана, другое лекарственное средство, или любые их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция содержит ингибитор активности или экспрессии PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция содержит ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция содержит ингибитор активности или экспрессии PD-L1 и ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция содержит ингибитор активности или экспрессии PD-L1 и ингибитор активности или экспрессии гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция содержит ингибитор активности или экспрессии TGF- $\beta$ 1 и ингибитор активности или экспрессии гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция содержит ингибитор гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтические композиции по настоящему изобретению получают в форме растворов, дисперсий в глицерине, жидких полиэтиленгликолях, и любых их комбинаций в маслах, в твердых лекарственных формах, лекарственных формах для ингаляции, в интраназальных лекарственных формах, в форме липосомных составов, в лекарственных формах, содержащих наночастицы, лекарственных формах, содержащих микрочастицы, полимерных лекарственных формах, или любых их комбинациях. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция как раскрыто в настоящем документе, содержит наполнитель. Наполнитель, в некоторых примерах, представляет

собой наполнитель, раскрытый в Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association (1986). Неограничивающие примеры пригодных наполнителей включают забуферивающее средство, консервант, стабилизатор, связующее средство, уплотняющее средство, смазывающее средство, хелатирующее средство, диспергирующее средство, дезинтегрирующее средство, вкусоароматическое средство, подсластитель, окрашивающее средство.

**[0107]** Согласно некоторым вариантам осуществления, наполнитель представляет собой забуферивающее средство. Неограничивающие примеры пригодных забуферивающих средств включают гистидин, цитрат натрия, карбонат магния, бикарбонат магния, карбонат кальция и бикарбонат кальция. В качестве забуферивающего средства, гистидин, бикарбонат натрия, бикарбонат калия, гидроксид магния, лактат магния, глюкомат магния, гидроксид алюминия, цитрат натрия, тартрат натрия, ацетат натрия, карбонат натрия, полифосфат натрия, полифосфат калия, пирофосфат натрия, пирофосфат калия, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат дикалия, фосфат тринатрия, фосфат трикалия, метафосфат калия, оксид магния, гидроксид магния, карбонат магния, силикат магния, ацетат кальция, глицерофосфат кальция, хлорид кальция, гидроксид кальция и другие соли кальция или их комбинации используют, согласно некоторым вариантам осуществления, в фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

**[0108]** Согласно некоторым вариантам осуществления, наполнитель содержит консервант. Неограничивающие примеры пригодных консервантов включают антиоксиданты, такие как альфа-токоферол и аскорбат, и противомикробные средства, такие как парабены, хлорбутанол и фенол. Согласно некоторым примерам, антиоксиданты дополнительно включают, но без ограничения ЭДТА, лимонную кислоту, аскорбиновую кислоту, бутилированный гидрокситолуол (БНТ), бутилированный гидроксианизол (БНА), сульфит натрия, п-аминобензойную кислоту, глутатион, пропилгаллат, цистеин, метионин, этанол и N-ацетилцистеин. В некоторых случаях консерванты включают валидамицин А, TL-3, ортованадат натрия, фторид натрия, N-а-тозил-Phe-хлорметилкетон, N-а-тозил-Lys-хлорметилкетон, апротинин, фенолметилсульфонилфторид, диизопропилфторфосфат, ингибитор киназ, ингибитор фосфатаз, ингибитор каспаз, ингибитор гранзимов, ингибитор клеточной адгезии, ингибитор клеточного деления, ингибитор клеточного цикла, ингибитор сигнальных липидов, ингибитор протеаз, восстанавливающее средство, алкилирующее средство, противомикробное средство, ингибитор оксидаз или другой ингибитор.

**[0109]** Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция, как раскрыто в настоящем документе, содержит связующее в качестве

наполнителя. Неограничивающие примеры пригодных связующих средств включают крахмалы, прежелатинизированные крахмалы, желатин, поливинилпирролидон, целлюлозу, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, этилцеллюлозу, полиакриламиды, поливинилоксоазолидон, поливинилспирты, спирт C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> жирной кислоты, полиэтиленгликоль, полиолы, сахараиды, олигосахарида и их комбинации. Связующие средства, используемые в фармацевтическом составе, согласно некоторым примерам, выбраны из крахмалов, таких как картофельный крахмал, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал; сахаров, таких как сахароза, глюкоза, декстроза, лактоза, мальтодекстрин; природных и синтетических камедей; желатина; производных целлюлозы, таких как микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза; поливинилпирролидона (повидона); полиэтиленгликоля (PEG); восков; карбоната кальция; фосфата кальция; спиртов, таких как сорбит, ксилит, маннит, и воды или любых их комбинаций.

**[0110]** Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция, как раскрыто в настоящем документе, содержит смазывающее средство в качестве наполнителя. Неограничивающие примеры пригодных смазывающих средств включают стеарат магния, стеарат кальция, стеарат цинка, гидрогенизированные растительные масла, стеротекс, моностеарат полиоксиэтилена, тальк, полиэтиленгликоль, бензоат натрия, лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат магния и легкое минеральное масло. Смазывающие средства, используемые в фармацевтическом составе, согласно некоторым вариантам осуществления, следует выбирать из стеаратов металлов (таких как стеарат магния, стеарат кальция, стеарат алюминия), сложных эфиров жирных кислот (таких как стеарилфумарат натрия), жирных кислот (таких как стеариновая кислота), жирных спиртов, глицерилбегената, минерального масла, парафинов, гидрогенизированных растительных масел, лейцина, полиэтиленгликолей (PEG), лаурилсульфатов металлов (таких как лаурилсульфат натрия, лаурилсульфат магния), хлорида натрия, бензоата натрия, ацетата натрия и талька или их комбинации.

**[0111]** Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтический состав содержит диспергирующее средство в качестве наполнителя. Неограничивающие примеры пригодных диспергирующих средств включают, согласно некоторым примерам, крахмал, альгиновую кислоту, поливинилпирролидоны, гуаровую камедь, каолин, бентонит, очищенную древесную целлюлозу, натриевую соль гликолята крахмала, изоморфный диоксид кремния и микрокристаллическую целлюлозу в качестве эмульгирующих поверхностно-активных веществ с высоким HLB.



**[0112]** Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция, как раскрыто в настоящем документе, содержит дезинтегрирующее средство в качестве наполнителя. Согласно некоторым вариантам осуществления, дезинтегрирующее средство представляет собой нешипучее дезинтегрирующее средство. Неограничивающие примеры пригодных нешипучих дезинтегрирующих средств включают крахмалы, такие как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, прежелатинизированные и модифицированные крахмалы из них, подсластители, глины, такие как бентонит, микрокристаллическую целлюлозу, альгинаты, натриевую соль гликолята крахмала, камеди, такие как агар, гуаровая камедь, камедь плодов рожкового дерева, камедь карайя, пектин и трагакант. Согласно некоторым вариантам осуществления, дезинтегрирующее средство представляет собой шипучее дезинтегрирующее средство. Неограничивающие примеры пригодных шипучих дезинтегрирующих средств включают бикарбонат натрия в комбинации с лимонной кислотой и бикарбонат натрия в комбинации с виннокаменной кислотой.

**[0113]** Согласно некоторым вариантам осуществления, наполнитель содержит вкусоароматическое средство. Вкусоароматические средства, включенные во внешний слой, согласно некоторым примерам, выбраны из синтетических ароматических масел и отдушек; природных масел; экстрактов из растений, листьев, цветов и плодов; и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления, вкусоароматическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из коричных масел; масла гаультерии; масел мяты перечной; гвоздичного масла; масла с запахом сена; анисового масла; эвкалипта; ванили; цитрусового масла, такого как лимонное масло, апельсиновое масло, виноградное и грейпфрутовое масло; и фруктовых эссенций, включая яблочную, персиковую, грушевую, клубничную, малиновую, вишневую, сливовую, ананасовую и абрикосовую.

**[0114]** Согласно некоторым вариантам осуществления, наполнитель содержит подсластитель. Неограничивающие примеры пригодных подсластителей включают глюкозу (кукурузный сироп), декстрозу, инвертированный сахар, фруктозу и их смеси (когда их не применяют в качестве носителя); сахарин и его различные соли, такие как натриевая соль; дипептидные подсластители, такие как аспартам; дигидрохальконовые соединения, глицирризин; *Stevia Rebaudiana* (стевиозид); хлорные производные сахарозы, такие как сукралоза; и сахарные спирты, такие как сорбит, маннит, силит и аналогичные.

**[0115]** В некоторых случаях, фармацевтическая композиция, как раскрыто в настоящем документе, содержит окрашивающее средство. Неограничивающие примеры пригодных окрашивающих средств включают красители для пищевых продуктов,

лекарственных средств и косметических средств (FD&C), красители для лекарственных средств и косметических средств (D&C), и красители для наружных лекарственных средств и косметических средств (Ext. D&C). Окрашивающие средства можно использовать в форме красителей или соответствующих им лаков.

**[0116]** В некоторых случаях, фармацевтическая композиция, как раскрыто в настоящем документе, содержит хелатирующее средство. В некоторых случаях, хелатирующее средство представляет собой фунгицидное хелатирующее средство. Примеры включают, но без ограничения: этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту (ЭДТА); динатриевую, тринатриевую, тетранатриевую, дикалиевую, трикалиевую, дилитиевую и диаммониевую соль ЭДТА; хелат бария, кальция, кобальта, меди, диспрозия, европия, железа, индия, лантана, магния, марганца, никеля, самария, стронция, или цинка с ЭДТА; моногидрат транс-1,2-диаминоциклогексан-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты; N,N-бис(2-гидроксиэтил)глицин; 1,3-диамино-2-гидроксипропан-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту; 1,3-диаминопропан-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту; этилендиамин-N,N'-диуксусную кислоту; дигидрохлорид этилендиамин-N,N'-дипропионовой кислоты; гемигидрат этилендиамин-N,N'-бис(метиленфосфоновой кислоты); N-(2-гидроксиэтил)этилендиамин-N,N',N'-триуксусную кислоту; этилендиамин-N,N,N',N'-тетракис(метиленфосфоновую кислоту); O,O'-бис(2-аминоэтил)этиленгликоль-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту; N,N-бис(2-гидроксибензил)этилендиамин-N,N'-диуксусную кислоту; 1,6-гексаметилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту; N-(2-гидроксиэтил)иминодиуксусную кислоту; иминодиуксусную кислоту; 1,2-диаминопропан-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту; нитрилотриуксусную кислоту; нитрилотрипропионовую кислоту; тринатриевую соль нитрилотрис(метиленфосфорной кислоты); гексагидробромид 7,19,30-триокса-1,4,10,13,16,22,27,33-октаазабицикло[11,11,11]пентатриаконтана; или триэтилететрамин-N,N,N',N'',N''',N''''-гексауксусную кислоту.

**[0117]** Настоящее изобретение относится также к комбинированным продуктам, включающим одно или несколько иммунолекарственных средств, раскрытых в настоящем документе, и одно или несколько других противомикробных или противогрибковых средств, например, полиены, такие как амфотерицин В, липидный комплекс амфотерицина В (ABCD), липосомный амфотерицин В (L-AMB) и липосомный нистатин, азолы и триазолы, такие как вориконазол, флуконазол, кетоконазол, итраконазол, позаконазол и аналогичные; ингибиторы глюкансинтазы, такие как каспофунгин, микафунгин (FK463), и V-эхинокандин (LY303366); гризеофульвин; аллиламины, такие как тербинафин; флуцитозин, или другие противогрибковые средства, включая средства,

раскрытые в настоящем документе. Кроме того, предусматривают, что пептид можно комбинировать с местными противогрибковыми средствами, такими как циклопироксоламин, галопротин, толнафтат, ундециленат, местный нистатин, аморолфин, бутенафин, нафтифин, тербинафин и другие местные средства. В некоторых случаях, фармацевтическая композиция содержит дополнительное средство. В некоторых случаях, дополнительное средство присутствует в терапевтически эффективном количестве в фармацевтической композиции.

**[0118]** В обычных условиях хранения и применения, фармацевтические композиции, как раскрыто в настоящем документе, содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. В конкретных примерах, фармацевтические композиции, как раскрыто в настоящем документе, не содержат консервант. Фармацевтические формы, пригодные для применения для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления непосредственно перед применением стерильных пригодных для инъекций растворов или дисперсий. Фармацевтические композиции содержат носитель, который представляет собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и аналогичные), и/или растительные масла, или любые их комбинации. Надлежащую текучесть поддерживают, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов достигают посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и аналогичных. Во многих случаях, включают изотонические средства, например, сахара или хлорид натрия. Длительной абсорбции пригодных для инъекции композиций можно достигать посредством использования в композициях средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

**[0119]** Для парентерального введения в водном растворе, например, жидкую лекарственную форму соответствующим образом забуферивают, при необходимости, и жидкий разбавитель делают изотоническим с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Жидкие лекарственные формы являются особенно подходящими для внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутриопухолевого и внутрибрюшинного введения. В связи с этим, стерильные водные среды, которые можно использовать, известны специалисту в данной области в свете настоящего изобретения. Например, одну дозу растворяют, в конкретных случаях, в 1 мл - 20 мл изотонического

раствора NaCl и либо добавляют к 100 мл - 1000 мл жидкости, например, забуференного бикарбонатом натрия солевого раствора, либо инъецируют в намеченном участке инфузии.

**[0120]** Согласно конкретным вариантам осуществления, стерильные пригодные для инъекции растворы получают посредством введения лекарственного средства в необходимом количестве в подходящий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по необходимости, с последующей стерилизацией посредством фильтрации. Как правило, дисперсии получают посредством введения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, содержащий базовую диспергирующую среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. Композиции, раскрытые в настоящем документе, в некоторых случаях, формулируют в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают, например, кислотно-аддитивные соли (сформированные с использованием свободных аминогрупп белка) и сформированные с использованием неорганических кислот, например, таких как соляная или фосфорная кислоты, или таких органических кислот, как уксусная, щавелевая, виннокаменная, миндальная и аналогичные. Соли, сформированные с использованием свободных карбоксильных групп, в некоторых случаях, получены из неорганических оснований, например, таких как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и аналогичные. После формулирования, фармацевтические композиции вводят, согласно некоторым вариантам осуществления, способом, совместимым с дозированным составом, и в таком количестве, какое является терапевтически эффективным.

**[0121]** Согласно конкретным вариантам осуществления, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит эффективное количество лекарственного средства, как раскрыто в настоящем документе, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. «Фармацевтически приемлемый», как применяют в настоящем документе, включает любой носитель, который не создает помех для эффективности биологической активности активных ингредиентов и/или который не является токсичным для пациента, которому его вводят. Неограничивающие примеры пригодных фармацевтических носителей включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы увлажняющих средств и стерильных растворов. Дополнительные неограничивающие примеры фармацевтически совместимых носителей могут включать гели, материалы биоадсорбируемого матрикса, имплантируемые элементы, содержащие

иммунотерапевтические средства, или любые другие пригодные носитель, средства или материал для доставки или диспергирования. Такие носители формулируют, например, посредством общепринятых способов и вводят субъекту в эффективном количестве.

**[0122]** Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой состав, содержащий иммунотерапевтическое средство (например, ингибитор, регулятор, или активатор иммунной контрольной точки) и забуферивающее средство. Согласно некоторым вариантам осуществления, иммунотерапевтическое средство присутствует при концентрации от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/мл, от приблизительно 15 до приблизительно 50 мг/мл, от приблизительно 20 до приблизительно 45 мг/мл, от приблизительно 25 до приблизительно 40 мг/мл, от приблизительно 30 до приблизительно 35 мг/мл, от приблизительно 25 до приблизительно 35 мг/мл или от приблизительно 30 до приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 33,3 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления, состав содержит забуферивающее средство, содержащее гистидин (например, гистидиновый буфер). Согласно конкретным вариантам осуществления, забуферивающее средство (например, гистидиновый буфер) присутствует при концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ, от приблизительно 2 мМ до приблизительно 15 мМ, от приблизительно 3 мМ до приблизительно 10 мМ, от приблизительно 4 мМ до приблизительно 9 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 8 мМ или от приблизительно 6 мМ до приблизительно 7 мМ, приблизительно 1 мМ, приблизительно 2 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 4 мМ, приблизительно 5 мМ, приблизительно 6 мМ, приблизительно 6,7 мМ, приблизительно 7 мМ, приблизительно 8 мМ, приблизительно 9 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 11 мМ, приблизительно 12 мМ, приблизительно 13 мМ, приблизительно 14 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 16 мМ, приблизительно 17 мМ, приблизительно 18 мМ, приблизительно 19 мМ или приблизительно 20 мМ. Согласно некоторым вариантам осуществления, забуферивающее средство (например, гистидиновый буфер) присутствует при концентрации от приблизительно 6 мМ до приблизительно 7 мМ, приблизительно 6,7 мМ. В других вариантах осуществления, забуферивающее средство (например, гистидиновый буфер) имеет рН от приблизительно 4 до приблизительно 7, от приблизительно 5 до приблизительно 6, приблизительно 5,5 или приблизительно 6.

**[0123]** Согласно некоторым вариантам осуществления, состав дополнительно содержит углевод. Согласно конкретным вариантам осуществления, углевод представляет собой сахарозу. Согласно некоторым вариантам осуществления, углевод (например, сахароза) присутствует при концентрации от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 25 мМ до приблизительно 150 мМ, от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ, от приблизительно 60 мМ до приблизительно 90 мМ, от приблизительно 70 мМ до приблизительно 80 мМ или от приблизительно 70 мМ до приблизительно 75 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 90 мМ, приблизительно 100 мМ или приблизительно 150 мМ.

**[0124]** Согласно некоторым вариантам осуществления, состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. Согласно конкретным вариантам осуществления, поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20. Согласно некоторым вариантам осуществления, поверхностно-активное вещество или полисорбат 20) присутствует при концентрации от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,025% (масс./масс.), от приблизительно 0,0075% до приблизительно 0,02% или от приблизительно 0,01% до 0,015% (масс./масс.), приблизительно 0,005%, приблизительно 0,0075%, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,013%, приблизительно 0,015% или приблизительно 0,02% (масс./масс.). Согласно конкретным вариантам осуществления, состав представляет собой разведенный состав. Например, разведенный состав получают, в некоторых случаях, посредством разведения лиофилизированного состава в разбавителе, так что иммунотерапевтическое средство является диспергированным в разведенном составе. Согласно некоторым вариантам осуществления, лиофилизированный состав разводят с использованием от приблизительно 0,5 мл до приблизительно 2 мл, например, приблизительно 1 мл, воды или буфера для инъекций. Согласно конкретным вариантам осуществления, лиофилизированный состав разводят с использованием 1 мл воды для инъекций в клиническом центре.

#### *Виды комбинированной терапии*

**[0125]** Согласно конкретным вариантам осуществления, способы по настоящему изобретению предусматривают введение лекарственного средства, как раскрыто в настоящем документе, до и после или в комбинации с одним или несколькими видами дополнительной терапии. Примеры дополнительной терапии могут включать, но без ограничения, химиотерапию, радиоактивное облучение, противораковое средство или любые их комбинации. Дополнительную терапию можно проводить одновременно или

последовательно, по отношению к проведению иммунотерапии. Согласно конкретным вариантам осуществления, способы по настоящему изобретению предусматривают проведение иммунотерапии, как раскрыто в настоящем документе, до, после или в комбинации с одним или несколькими противораковыми средствами или видами противораковой терапии. Противораковые средства включают, но без ограничения, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства, цитокины, ингибиторы иммунной контрольной точки, антиангиогенные средства, индуцирующие апоптоз средства, противораковые антитела и/или средства против циклин-зависимой киназы. Согласно конкретным вариантам осуществления, виды противораковой терапии включают химиотерапию, биологическую терапию, радиотерапию, иммунотерапию, клеточную терапию, гормональную терапию, антивазкулярную терапию, криотерапию, терапию токсинами и/или хирургию, или их комбинации. Согласно конкретным вариантам осуществления, способы по настоящему изобретению предусматривают проведение иммунотерапии, как раскрыто в настоящем документе, до, после или в комбинации с одним или несколькими дополнительными иммуномодулирующими средствами. Иммуномодулирующее средство включает, согласно некоторым примерам, любое соединение, молекулу или вещество, способное супрессировать противовирусный иммунитет, ассоциированный с опухолью или раком. Неограничивающие примеры дополнительных иммуномодулирующих средств включают антитело против CD33 или его вариабельную область, антитело против CD11b или его вариабельную область, ингибитор COX2, например, целекоксиб, цитокины, такие как IL-12, GM-CSF, IL-2, IFN $\gamma$  и 1FN $\gamma$ , и хемокины, такие как MIP-1, MCP-1 и IL-8.

**[0126]** В конкретных примерах, когда дополнительная терапия представляет собой клеточную терапию, приведенные в качестве примера виды клеточной терапии включают, без ограничения, терапию эффекторными клетками, терапию Т-клетками с химерным рецептором антигена (CAR-T), терапию клетками естественными киллерами и терапию клетками естественными киллерами (NK) с химерным рецептором антигена. Клетки NK или клетки CAR-NK, или комбинацию как клеток NK, так и клеток CAR-NK, можно использовать в комбинации со способами, раскрытыми в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления, клетки NK и клетки CAR-NK происходят из человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), пуповинной крови или линии клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления, клетки NK и клетки CAR-NK содержат рецептор цитокина и ген самоубийства. Согласно некоторым вариантам осуществления, клетки NK и клетки CAR-NK характеризуются присутствием поверхностного маркера CD56 и отсутствием поверхностного маркера CD3. Согласно

некоторым вариантам осуществления, клетки NK и клетки CAR-NK нацелены на клетки опухолей (включая солидные опухоли) и/или клетки, несущие вирусы. Согласно некоторым вариантам осуществления, клетки NK и клетки CAR-NK вводят в комбинации с ингибитором гиалуронана. Согласно некоторым вариантам осуществления, клетки NK и клетки CAR-NK вводят в комбинации с терапией против PD-L1.

**[0127]** В конкретных примерах, когда дополнительная терапия представляет собой радиоактивное облучение, приведенные в качестве примера дозы составляют от 5000 рад (50 Гр) до 100000 рад (1000 Гр) или 50000 рад (500 Гр), или другие подходящие дозы в рамках перечисленных диапазонов. Альтернативно, дозы радиоактивного облучения составляют приблизительно от 30 до 60 Гр, от приблизительно 40 до приблизительно 50 Гр, приблизительно от 40 до 48 Гр, или приблизительно 44 Гр, или другие подходящие дозы в рамках перечисленных диапазонов, причем дозу определяют, например, посредством дозиметрического исследования, как описано выше. «Гр», как применяют в настоящем документе, может относиться к единице специфической поглощенной дозы радиации, равной 100 рад. Гр является сокращенным обозначением для «Грей».

**[0128]** В конкретных примерах, когда дополнительная терапия представляет собой химиотерапию, приведенные в качестве примера химиотерапевтические средства включают, без ограничения, алкилирующие средства (например, производные азотистого иприта, этиленимины, алкилсульфонаты, гидразины и триазины, нитрозомочевины и соли металлов), алкалоиды растений (например, алкалоиды барвинка, таксаны, подофиллотоксины и аналоги камптотекина), противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины, хромомицины и аналогичные), антиметаболиты (например, антагонисты фолиевой кислоты, антагонисты пиримидинов, антагонисты пуринов и ингибиторы аденозиндезаминазы), ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы топоизомеразы II и неклассифицированные антинеопластические средства (например, ингибиторы рибонуклеотидредуктазы, ингибиторы адренокортикостероидов, ферменты, средства против микротрубочек и ретиноиды). Приведенные в качестве примера химиотерапевтические средства могут включать, без ограничения, анастрозол (Аримидекс®), бикалутамид (Казодекс®), сульфат блеомицина (Бленоксан®), бусульфан (Милеран®), бусульфан для инъекций (Бусульфекс®), капецитабин (Кселода®), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксидефторцитидин, карбоплатин (Параплатин®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Лейкеран®), цисплатин (Платинол®), кладрибин (Леустатин®), циклофосфамид (Цитоксан® или Неозар®), цитарабин, арабинозид цитозина (Цитозар-U®), цитарабин липосомный для инъекций (DepoCyt®), декарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (Актиномицин D, Cosmegen), гидрохлорид даунорубицина (Церубидин®),



цитрат даунорубицина липосомный для инъекций (Дауноксом®), дексаметазон, доцетаксел (Таксотер®), гидрохлорид доксорубицина (Адриаамин®, Рубекс®), этопозид (Вепезид®), фосфат флударабина (Флудара®), 5-фторурацил (Адруцил®, Эфудекс®), флутамид (Эйлексин®), тезацитибин, гемцитабин (дифтордезокситидин), гидроксимочевину (Гидреа®), идарубицин (Идамицин®), ифосфамид (ИФЕКС®), иринотекан (Камптосар®), L-аспарагиназу (ЭЛСПАР®), лейковорин кальция, мелфалан (Алкеран®), 6-меркаптопурин (Пуринтол®), метотрексат (Фолекс®), митоксантрон (Новантрон®), милотарг, паклитаксел (Таксол®), phoenix (Иттрий90/MX-DTPA), пентостатин, полифепросан 20 с имплантатом кармустина (Wafer®), цитрат тамоксифена (Нолвадекс®), тенипозид (Вумон®), 6-тиогуанин, тиотепа, тирапазамин (Тиразон®), гидрохлорид топотекана для инъекций (Гикамπτин®), винбластин (Велбан®), винкристин (Онковин®) и винорелбин (Навелбин®), ибрутиниб, иделалисиб и брентуксимаб ведотин.

[0129] Приведенные в качестве примера алкилирующие средства включают, без ограничения, азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевину и триазены: урамустин (Аминоурамустин®, Хлорэтаминоцил®, Деметилдопан®, Десметилдопан®, Гемантамин®, Нордопан®, урациловый азотистый иприт®, Урациллот®, Урацилмостаза®, Урамустин®, Урамустин®), хлорметин (Мустарген®), циклофосфамид (Цитоксан®, Неозар®, Клафен®, Эндоксан®, Прокитокс®, Ревиммун™), ифосфамид (Митоксана®), мелфалан (Алкеран®), хлорамбуцил (Лейкеран®), пипоброман (Амедел®, Верцит®), триэтиленмеламин (Гемел®, Гексален®, Гексастат®), триэтилентиофосфорамин, темозололмид (Темодар®), тиотепа (Тиоплекс®), бусульфан (Бузилвекс®, Милеран®), кармустин (BiCNU®), ломустин (CeeNU®), стрептозоцин (Заносар®) и декарбазин (DTIC-Dome®). Дополнительные приведенные в качестве примера алкилирующие средства включают, без ограничения, оксалиплатин (Элоксатин®); темозололмид (Темодар® и Темодал®); дактиномицин (также известный как актиномицин-D, Космеген®); мелфалан (также известный как L-PAM, L-сарколизин и фенилаланиновый иприт, Алкеран®); алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Гексален®); кармустин (BiCNU®); бендамустин (Треанда®); бусульфан (Бусульфекс® и Милеран®); карбоплатин (Параплатин®); ломустин (также известный как CCNU, CeeNU®); цисплатин (также известный как CDDP, Платинол® и Платинол®-AQ); хлорамбуцил (Лейкеран®); циклофосфамид (Цитоксан® и Неозар®); декарбазин (также известный как DTIC, DIC и имидазолкарбоксамид, DTIC-Dome®); алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Гексален®); ифосфамид (Ифекс®); преднумустин; прокарбазин (Матулан®); мехлорэтамин (также известный как азотистый иприт, мустин и

гидрохлорид мехлорэтамидина, Мустарген®); стрептозоцин (Заносар®); тиотепа (также известный как тиофосфоамид, TESPA и TSPA, Тиоплекс®); циклофосфамид (Эндоксан®, Цитоксан®, Неозар®, Процитокс®, Ревиммун®); и бендамустин HCl (Треанда®).

**[0130]** Приведенные в качестве примера антрациклины могут включать, без ограничения, например, доксорубин (Адриаамин® и Рубекс®); блеомицин (Леноксан®); даунорубин (гидрохлорид даунорубина, дауномицин и гидрохлорид рубидомицина, Церубидин®); даунорубин липосомный (цитрат даунорубина липосомный, Дауноксом®); митоксантрон (DHAD, Новантрон®); эпирубин (Элленс™); идарубин (Идамин®, Идамин PFS®); митомицин C (Мутамицин®); гелданамицин; гербимицин; равидомицин; и дезацетилавидомицин.

**[0131]** Приведенные в качестве примера алкалоиды барвинка включают, но без ограничения, тартрат винорелбина (Навелбин®), винкрестин (Онковин®) и виндезин (Элдицин®); винбластин (также известный как сульфат винбластина, винкалейкобластин и VLB, Алькабан-AQ® и велбан®); и винорелбин (Навелбин®).

**[0132]** Приведенные в качестве примера ингибиторы протеасом могут включать, но без ограничения, бортезомиб (Велкад®); карфилзомиб (PX-171-007, (S)-4-метил-N-((S)-1-(((S)-4-метил-1-((R)-2-метилоксиран-2-ил)-1-оксопентан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)-2-((S)-2-(2-морфолинацетиамидо)-4-фенилбутанамидо)-пентанамид); маризомиб (NPI-0052); цитрат иксазомиба (MLN-9708); деланзомиб (CEP-18770); и O-метил-N-[(2-метил-5-тиазолил)карбонил]-L-серил-O-метил-N-[(1S)-2-[(2R)-2-метил-2-оксиранил]-2-оксо-1-(фенилметил)этил]-L-серинамид (ONX-0912).

**[0133]** «В комбинации с», как применяют в настоящем документе, означает, что введению лекарственного средства и дополнительной терапии подвергают субъекта в качестве части режима или плана лечения. Согласно конкретным вариантам осуществления, применение в комбинации не требует, чтобы иммунотерапевтическое средство и дополнительное терапевтическое средство физически комбинировали до введения, или чтобы их вводили на протяжении одной и той же временной рамки. Например, и не в качестве ограничения, иммунотерапевтическое средство и одно или несколько средств вводят параллельно субъекту, подвергаемому лечению, или вводят в одно и то же время, или последовательно в любом порядке, или в различных временных точках.

**[0134]** Дополнительное терапевтическое средство вводят, в различных вариантах осуществления, в жидкой лекарственной форме, в твердой лекарственной форме, в форме суппозитория, в пригодной для ингаляции лекарственной форме, в интраназальной лекарственной форме, в липосомном составе, в лекарственной форме, содержащей

наночастицы, в лекарственной форме, содержащей микрочастицы, в полимерной лекарственной форме или в любых их комбинациях. Согласно конкретным вариантам осуществления, дополнительное терапевтическое средство вводят на протяжении периода от приблизительно 1 недели до приблизительно 2 недель, от приблизительно 2 недель до приблизительно 3 недель, от приблизительно 3 недель до приблизительно 4 недель, от приблизительно 4 недель до приблизительно 5 недель, от приблизительно 6 недель до приблизительно 7 недель, от приблизительно 7 недель до приблизительно 8 недель, от приблизительно 8 недель до приблизительно 9 недель, от приблизительно 9 недель до приблизительно 10 недель, от приблизительно 10 недель до приблизительно 11 недель, от приблизительно 11 недель до приблизительно 12 недель, от приблизительно 12 недель до приблизительно 24 недель, от приблизительно 24 недель до приблизительно 48 недель, приблизительно 48 недель или приблизительно 52 недель, или более. Частота введения дополнительного терапевтического средства составляет, в конкретных случаях, один раз в сутки, два раза в сутки, один раз в каждую неделю, один раз в каждые три недели, один раз в каждые четыре недели (или один раз в месяц), один раз в каждые 8 недель (или один раз в каждые 2 месяца), один раз в каждые 12 недель (или один раз в каждые 3 месяца), или один раз в каждые 24 недели (один раз в каждые 6 месяцев).

### **Модели зубчатого колоректального рака человека**

#### *Модели*

**[0135]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к модели зубчатого колоректального рака (CRC) человека. В некоторых случаях, модель представляет собой модель на ткани. В некоторых случаях, модель на ткани содержит органоид. В некоторых случаях, модель содержит модель на животном. В некоторых случаях, модель содержит генетическую информацию, которая специфически ингибирует экспрессию *PRKCI* и *PRKCZ*, так что *PKC $\lambda$ /1* и *PKC $\zeta$*  не экспрессируются. В некоторых случаях, модель содержит генетическую информацию, которая специфически уменьшает экспрессию *PRKCI* и *PRKCZ*, что приводит к уменьшенной экспрессии *PKC $\lambda$ /1* и *PKC $\zeta$* .

**[0136]** Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к модели на животном зубчатого CRC человека. В некоторых случаях, модель на животном содержит нокаут или нокдаун *PRKCI* и *PRKCZ*. В некоторых случаях, нокаут или нокдаун получают с использованием гомологичной рекомбинации, редактирования генов на основе нуклеаз (например, CRISPR/Cas9), сайт-специфической рекомбинации (например, опосредованного рекомбинацией обмена кассет, переворотов-вырезаний с использованием системы рекомбинации Cre-loxP), систем на основе тетрациклина (например, Tet-On/Off), внутреннего участка связывания рибосомы, или их комбинации. В

некоторых случаях, модель на животном включает млекопитающее. В некоторых случаях, модель на животном включает мышь, крысу, обезьяну. В некоторых случаях,

**[0137]** Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способам получения модели зубчатого колоректального рака на животном, предусматривающим: а) получение животного, являющегося  $Prkci^{fl/fl}$  и  $Prkcz^{fl/fl}$ , причем животное имеет участки loxP, фланкирующие гены, включающие  $Prkci$  и  $Prkcz$ ; и скрещивание животного, являющегося  $Prkci^{fl/fl}$  и  $Prkcz^{fl/fl}$ , с животным, экспрессирующим рекомбиназу Cre, функционально связанную с общераспространенным промотором, в эпителиальных клетках ворсинок и крипт тонкого и толстого кишечника, таким образом, получение трансгенного животного с делециями в  $Prkcz$  и  $Prkcl$  в эпителиальных клетках ворсинок и крипт тонкого и толстого кишечника.

**[0138]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к модели на животном зубчатого CRC человека с делециями  $PKC\lambda/l$  и  $PKC\zeta$  для зубчатого CRC человека. Модель на животном может характеризоваться уменьшенными размером и массой тела, так же как худшим показателем выживаемости, чем у животных дикого типа (WT) (**фиг. 1, панели А-С**). В некоторых случаях, кишечника для модели на животном являются расширенными и заполненными, что позволяет предполагать измененную функцию кишечника (**фиг. 1, панель А**). Модель на животном может характеризоваться уменьшением количества клеток Панета в криптах кишечника, и/или смещенной локализацией клеток Панета (**фиг. 8, панель А**). В некоторых случаях, модель на животном имеет деформированное гиперпластическое проявление, как в тонком кишечнике, так и в ободочной кишке, напоминающее зубчатый фенотип у человека (**фиг. 1, панель D**). В некоторых случаях, модель на животном имеет цитоморфологические признаки, являющиеся сходными с микровезикулярной или богатой бокаловидными клетками зубчатой гиперплазией у человека (**фиг. 8, панель В**), которая представляет собой предзлокачественное поражение, которое может прогрессировать до CRC посредством альтернативного пути. В некоторых случаях, в модели на животном развиваются спонтанные сидячие зубчатые аденомы/полипы (SSA/P) в ободочной кишке и кишечнике, с расширенными и деформированными криптами (**фиг. 1, панели D и E**). В некоторых случаях, SSA/P развивались в опухоли кишечника, с увеличением количества по мере старения животного (**фиг. 1, панель F и фиг. 9, панель C**). В некоторых случаях опухоли локализуются в проксимальной локализации в ободочной кишке (**фиг. 1, панель G, фиг. 1, панель H, и фиг. 8, панель D**). В некоторых случаях, опухоли прогрессируют до подслизистой (**фиг. 1, панель D**) и/или инвазивной аденокарциномы (**фиг. 1, панель I**). В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться транскриптомным

характерным профилем ДКО<sup>IEC</sup>, содержащим множество генов, выбранных из **таблицы 7**. В некоторых случаях, транскриптомный профиль содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или 30 генов из **таблицы 7**.

**[0139]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к модели на животном зубчатого CRC человека с делециями PKC $\lambda$ /1 и PKC $\zeta$ , характеризующимися отдельным транскриптомным профилем раковых стволовых клеток. В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться увеличением (например, сверхэкспрессией) экспрессии гиалуронана, по сравнению с животным без делеции PKC $\lambda$ /1 и PKC $\zeta$ . В некоторых случаях, сверхэкспрессия гиалуронана локализована в строме зубчатых опухолей в модели на животном. В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться увеличением экспрессии CD44. В некоторых случаях, сверхэкспрессия CD44 локализована в эпителиальных клетках кишечника. В некоторых случаях, экспрессия гиалуронана и/или CD44 увеличивается, по мере прогрессирования зубчатого CRC от гиперплазии до сидячей зубчатой аденомы/полипов (SSA/P) и от SSA/P до карциномы. В некоторых случаях, модель на животном характеризуется уменьшением экспрессии регулируемых интерфероном генов, включающих *Irf7*, *Oas1a*, *Isg15* и/или *Cxcl10*, по сравнению с животным с делецией либо PKC $\lambda$ /1, либо PKC $\zeta$ ; и/или по сравнению с животным дикого типа (WT). В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться уменьшением экспрессии биомаркеров стволовых клеток, включающих *Olfm4*, *Ascl2* и/или *Lgr5*.

**[0140]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к модели на животном зубчатого CRC человека с делециями PKC $\lambda$ /1 и PKC $\zeta$ , в которой развиваются опухоли, являющиеся высоко сходными с MMS зубчатыми опухолями человека на транскрипционном уровне. В некоторых случаях, модель на животном дополнительно характеризуется имеющим микросателлитную стабильность (MSS) транскриптомным профилем зубчатого CRC (**фиг. 8, панель E и фиг. 8, панель F**). Неограничивающие примеры генов, ассоциированных с фенотипом MSS в CRC, включают *FLNB*, *GLCE*, *CCDC146*, *GTF2IRD2*, *GTF2IRD2B*, *GTF2IRD2P1*, *INADL*, *DOCK5*, *MACF1*, *AKAP7*, *TTC19*, *MAP1B*, *PTK7*, *BIK*, *SHROOM3*, *KLK7*, *RHBDL2*, *PLK2*, *EPM2AIP1*, *AHNAK*, *PSTPIP2*, *NMU*, *EPB41L4A*, *ACTA2*, *PHLDB2*, *ISM1*, *KITLG*, *PTPRD*, *SLC7A8*, *RASGRF1*, *YPEL1*, *UBASH3B*, *VSIG2*, *MYCL1*, *IL8*, *TCF7*, *TLR4*, *ACAA2*, *TET2*, *ENPP3*, *ST6GAL2*, *CFTR*, *MYCN*, *PALLD*, *ARAP2*, *MYOF*, *ARHGAP29*, *MT1E*, *BICC1*, *ABCC3*, *NRXN3*, *C19orf45*, *SFRP5*, *REN*, *NEDD9*, *APCDD1*, *CXCL6*, *C6orf15*, *INPP4B*, *SGPL1*, *KIT*, *TMEM211*, *CCDC3*, *CXCL14*, *UCA1*, *C16orf62*, *HSPA2*, *SPATA18*, *MPZL2*, *FHL2*, *CSGALNACT1*, *LOC100506403*, *RUNX1*, *ID4*, *ACTG1P4*, *AMY1A*, *AMY1B*, *AMY1C*, *AMY2A*,

*AMY2B, NDP, CD200, PDE9A, SLCO1B3, TUBA1A, ANXA3, IL17RD, PTCHD4, NTRK2, LPAR6, CHRNBI, ANXA1, CAPN8, EDN1, TSPAN2, KLK10, PDE4D, CYP4X1, ATP8A1, TWSG1, MYLK, TGFB3, TRIM22* и *FSTL1*. В некоторых случаях, модель на животном является обогащенной по экспрессии одного или нескольких генов в пути регулируемой внеклеточными сигналами киназы (ERK) и/или пути ассоциированного с Yes белка (YAP). В некоторых случаях, обогащение одного или нескольких генов детектировано в эпителиальных клетках кишечника (IEC). Неограничивающие примеры генов в пути ERK, которые могут являться обогащенными в модели на животном, включают *ARAF, DLK1, MAP3K1 (MEKK1), MAP3K2 (MEKK2), MAP3K3 (MEKK3), MAP3K4 (MEKK4), MAP4K1 (HPK1), MOS, PAK1, RAF1, MAP2K1 (MEK1), MAP2K2 (MEK2), MAP2K3 (MEK3), MAP2K4 (MKK4, JNKK1), MAP2K5 (MEK5), MAP2K6 (MEK6, MKK6), MAP2K7 (JNKK2), MAPK1 (ERK2), MAPK3 (ERK1), MAPK6 (ERK3), MAPK7 (ERK5), MAPK8 (JNK1), MAPK9 (JNK2), MAPK10 (JNK3), MAPK11 (P38БЕТА), MAPK12 (P38ГАММА), MAPK13 (SAPK4, SERK4), MAPK14 (P38АЛЬФА), ATF2 (CREB2), CREB1, CREBBP (CBP), EGFR, ELK1, ETS1, ETS2, JUN, KCNN1 (KCA2.1), MAPKAPK2, MAPKAPK5, MAX, MEF2C, MKNK1, MYC, NFATC4 (NFAT3), SMAD4 (MADH4), TRP53 (P53). COL1A1, EGR1, FOS, HSPA5 (GRP78), HSPB1 (HSP27), JUN, MYC, TRP53 (P53), HRAS, KRAS, KSR1, MAP2K1 (MEK1), MAP2K2 (MEK2), NRAS, CDC42, CHUK (IKBKA), GRB2, HRAS, KCNN1 (KCA2.1), KRAS, MAP2K1 (MEK1), MAP2K2 (MEK2), MAP2K4 (MKK4, JNKK1), MAP4K1 (HPK1), NRAS, RAC1, SFN (14-3-3Σ), LAMTOR3 (MP1), MAP3K1 (MEKK1), MAPK8IP1 (JIP1), MAPK8IP2 (JIP2), MAPK8IP3 (JIP3), CCNA1, CCNA2, CCNB1, CCNB2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDK2, CDK4, CDK6, CDKN1A (P21CIP1, WAF1), CDKN1B (P27KIP1), CDKN1C (P57KIP2), CDKN2A (P16INK4A), CDKN2B (P15INK4B), CDKN2C (P18INK4C), CDKN2D (P19INK4D) и *E2F1, RB1*, или их аналоги. Неограничивающие примеры генов в пути YAP, которые могут являться обогащенными в модели на животном, включают *ACTG1, AMOT, AMOTL1, AMOTL2, CASP3, CRB1, CRB2, CRB3, CSNK1D, CSNK1E, DCHS1, DCHS2, DIAP2, DLG1, DVL2, FAT1, FAT2, FAT3, FAT4, FJX1, AJUBA, LIMD1, LIX1L, LLGL1, LLGL2, LPP, NF2, RASSF2, RASSF4, SCRIB, WTIP, WWC1, ZDHHC18, LATS2, MOB1B, MOB1A, SAV1, STK3, STK4, TAZ, YAP1, MST1, WWTR1, HIPK2, MAPK10 (JNK3), MEIS1, PRKCI, PRKCH, SMAD1 (MADH1), TEAD1, TEAD2, TEAD3, TEAD4, TRP63 (TP73L), TSHZ1, TSHZ2, TSHZ3, WNT1, CASP3, CCNE1, CCNE2, MYC, PPP2CB, PPP2R1A, PPP2R2D, PTPN14, RERE, NF2, TAZ, YAP1, CRB1, CRB2, CRB3, DCHS1, DCHS2, FAT1, FAT2, FAT3, FAT4, LATS1, LATS2, MST1, SCRIB, STK3, STK4, GPC5, HMCN1, POTEG, TAOK1, TAOK2, TAOK3, TJP1, TJP2, MPDZ, MPP5, NPHP4, PARD3, PARD6G, YWHAB, YWHAЕ, YWHAQ и YWHAZ*, или их аналоги.*

**[0141]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к модели на животном зубчатого CRC человека с делециями PKC $\lambda$ /1 и PKC $\zeta$ , в которой развивается иммуносупрессивное окружение опухоли, аналогично зубчатому CRC человека. В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться увеличением количества CD45<sup>+</sup> клеток, по сравнению с животным без делеций PKC $\lambda$ /1 и PKC $\zeta$ ; и по сравнению с животным с делециями либо PKC $\lambda$ /1, либо PKC $\zeta$  (**фиг.3, панель А**). В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться увеличением уровня экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), по сравнению с уровнем экспрессии PD-L1 у животного WT. В некоторых случаях, увеличение уровня экспрессии PD-L1 поддается детекции в CD45<sup>+</sup> клетках. В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться уменьшением количества CD8<sup>+</sup> клеток, по сравнению с животным WT. В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться нарушенным ответом на интерферон. Неограничивающие примеры генов, вовлеченных в ответ на интерферон, включают *IRF7*, *OAS1A*, *ISG15* и *CXCL10*.

**[0142]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к модели на животном зубчатого CRC человека с делециями PKC $\lambda$ /1 и PKC $\zeta$ , в которой развивается ответ активированной стромы, аналогично зубчатому CRC человека. В некоторых случаях модель на животном может характеризоваться увеличением уровня альфа-актина гладких мышц ( $\alpha$ SMA) (**фиг. 3, панель К**). В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться увеличением отложения коллагена (**фиг. 3, панель L и фиг. 10, панель С**). В некоторых случаях, модель на животном может характеризоваться увеличением уровня стромальных факторов роста, включая лиганды для рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) амфирегулин (Areg) и эпирегулин (Ereg).

#### *Способы применения модели зубчатого колоректального рака человека*

**[0143]** Аспекты, раскрытые в настоящем документе, относятся к способам скрининга модуляторов онкогенеза зубчатых опухолей с использованием моделей, раскрытых в настоящем документе. Модуляторы онкогенеза зубчатых опухолей могут включать лекарственные средства или дополнительные виды терапии, раскрытые в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способам скрининга модуляторов онкогенеза зубчатых опухолей, предусматривающим: а) получение модели зубчатого колоректального рака (CRC) человека, раскрытой в настоящем документе; б) приведение модели в контакт с предположительным модулятором онкогенеза; и с) детекцию одного или нескольких изменений одного или нескольких ассоциированных с опухолью параметров в модели. Неограничивающие примеры ассоциированных с опухолью параметров включают

привлечение CD8<sup>+</sup> Т-клеток к зубчатой опухоли, прогрессирование сидячей зубчатой аденомы (SSA) до аденокарциномы, количество зубчатых опухолей, размер зубчатых опухолей, суммарную нагрузку зубчатых опухолей, увеличение экспрессии альфа-актина гладких мышц ( $\alpha$ SMA) или отложение коллагена, или их комбинацию. В неограничивающих примерах того, как ассоциированные с опухолью параметры можно применять, в соответствии со способами по настоящему изобретению, предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что наблюдают увеличение привлечения CD8<sup>+</sup> Т-клеток к зубчатой опухоли; предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что не наблюдают прогрессирование SSA до аденокарциномы; предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что наблюдают уменьшение количества зубчатых опухолей, по сравнению с количеством зубчатых опухолей в модели до приведения модели в контакт с предположительным модулятором; предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что наблюдают уменьшение размера зубчатой опухоли, по сравнению с размером зубчатых опухолей в модели до приведения модели в контакт с предположительным модулятором; предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что наблюдают уменьшение суммарной нагрузки зубчатых опухолей, по сравнению с опухолевой нагрузкой зубчатых опухолей в модели до приведения модели в контакт с предположительным модулятором; предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что не наблюдают увеличение экспрессии  $\alpha$ SMA, по сравнению с экспрессией  $\alpha$ SMA в модели до приведения модели в контакт с предположительным модулятором; предположительный модулятор осуществляет отрицательную модуляцию онкогенеза, при условии, что не наблюдают увеличение отложения коллагена, по сравнению с отложением коллагена в модели до приведения модели в контакт с предположительным модулятором; предположительный модулятор выбран из группы, состоящей из ингибитора активности или экспрессии лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1), ингибитора активности или экспрессии трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1) и ингибитора активности или экспрессии гиалуронана.

### **Примеры**

[0144] Следующие примеры представлены для лучшей иллюстрации заявленного изобретения и не должны быть интерпретированы как ограничивающие объем



изобретения. В той степени, в которой упомянуты конкретные материалы, это сделано только с целью иллюстрации и не предназначено для ограничения изобретения. Специалист в данной области может разрабатывать эквивалентные способы или реагенты без проявления изобретательской способности и без отклонения от объема изобретения.

**Пример 1. Потеря обеих аРКС приводит к развитию зубчатых опухолей в тонком кишечнике и ободочной кишке**

[0145] Для тестирования того, является ли комбинированная потеря РКС $\lambda/\lambda$  и РКС $\zeta$  в эпителии кишечника достаточной для управления онкогенезом в отсутствие других онкогенных стимулов, мышей Prkci<sup>fl/fl</sup> и Prkcz<sup>fl/fl</sup> скрещивали с мышами Villin-cre для получения линий мышей с делециями в РКС  $\lambda/\lambda$  (LKO<sup>IEC</sup>), РКС $\zeta$  (ZKO<sup>IEC</sup>) или обеих аРКС (DKO<sup>IEC</sup>) в IEC. Мыши DKO<sup>IEC</sup> были рождены в ожидаемых менделевских соотношениях, но для них показаны уменьшенные размер и масса тела, так же как худший показатель выживаемости, чем у мышей дикого типа (WT) (фиг. 1, панели А-С). Кишечники DKO<sup>IEC</sup> часто выглядели расширенными и заполненными, что позволяет предполагать измененную функцию и непроходимость кишечника (фиг. 1, панель А), и имели сильное уменьшение количества клеток Панета в криптах, как определено посредством иммуногистохимии (ИНС) по лизоциму (фиг. 8, панель А). Оставшиеся клетки Панета имели смещенную локализацию в верхних частях крипт и ворсинках, и обнаружена также популяция незрелых дифференцированных клеток, окрашенных положительно по маркерам как клеток Панета (лизоцим), так и бокаловидных клеток (альциановый синий) (фиг. 8, панель А). Для мышей DKO<sup>IEC</sup> показано деформированное, имеющее «пилообразные зубы» гиперпластическое проявление как в тонком кишечнике, так и в ободочной кишке, которое напоминало зубчатый фенотип у человека (фиг.1, панель D). Это сходство простиралось на существование в кишечниках DKO<sup>IEC</sup> цитоморфологических признаков, являющихся сходными с микровезикулярной или богатой бокаловидными клетками зубчатой гиперплазией у человека (фиг. 8, панель В), которая представляет собой предзлокачественное поражение, которое может прогрессировать до CRC посредством пути, альтернативного обычной последовательности «аденома-карцинома». После возраста 7 недель, как в тонком кишечнике, так и в ободочной кишке мышей DKO<sup>IEC</sup> развивались спонтанные сидячие зубчатые аденомы/полипы (SSA/P), с расширенными и деформированными криптами (фиг. 1, панель D и фиг. 1, панель Е). С явным отличием от мышей с недостаточностью одной аРКС (LKO<sup>IEC</sup> и ZKO<sup>IEC</sup>), у которых почти никогда не развивались опухоли (фиг. 8, панель С), для мышей DKO<sup>IEC</sup> показано эффективное и прогрессирующее развитие опухолей кишечника, которое увеличивалось по мере старения мышей (фиг. 1, панель F и

**фиг. 8, панель С).** Хотя не обнаружено значимых различий в распределении опухолей среди отдельных областей тонкого кишечника, присутствовало предпочтение проксимальной локализации в ободочной кишке (**фиг. 1, панель G, фиг. 1, панель H, и фиг. 8, панель D**), что близко отражает поведение зубчатого CRC человека. Опухоли ободочной кишки иногда сопровождалась включениями муцина (**фиг.1, панель H**). Наблюдали также образование аберрантных крипт в форме бокового почкования крипт и цитологическую атипию, указывающие на присутствие сопутствующих диспластических изменений (**фиг. 1, панель D**). Кроме того, большая подгруппа опухолей кишечника DKOIEC прогрессировала до подслизистой (**фиг. 1, панель D**) и даже инвазивной аденокарциномы (**фиг. 1, панель I**). То есть, у 72,2% (13/18) и 81,3% (13/16) мышей развивалась аденокарцинома в тонком кишечнике и ободочной кишке, соответственно.

**[0146]** Инвазивная аденокарцинома включает не только компонент тубулярной аденокарциномы, но также иногда низкодифференцированную карциному (**фиг. 1, панель J**) или перстневидноклеточную карциному, морфологически характеризующуюся обильным внутрицитоплазматическим муцином, который выталкивает ядро к периферии, как показано посредством клеток, дважды положительных по Ki67 и альциановому синему (**фиг. 1, панель K**). Авторы настоящего изобретения также наблюдали сильное десмопластическое изменение, указывающее на высокую агрессивность этих опухолей (**фиг. 1, панель L**). Принимая во внимание, что низкодифференцированные муцинозные и перстневидноклеточные проявления были ассоциированы с MSS и агрессивными фенотипами зубчатых опухолей человека, позволяет уверенно предполагать, что опухоли мышей DKOIEC морфологически имитируют MSS зубчатое заболевание человека. Действительно, анализ маркеров микросателлитных повторов показал, что DKOIEC опухоли являлись MSS (**фиг. 8, панель E и фиг. 8, панель F**). Не наблюдали изменений экспрессии мРНК репрезентативных генов ДНК-MMR в этих опухолях (**фиг. 8, панель G**). В согласовании с положительной ассоциацией в зубчатых опухолях человека между MSS/MSI-L и профилями фенотипа метилятора CpG-островков (CIMP)-низким/CIMP-отрицательным, ни один из маркеров, определяющих CIMP, не был изменен (**фиг. 8, панель H**). Кроме того, старение не детектировали в кишечниках мышей DKO<sup>IEC</sup> (**фиг. 8, панель I**). Аналогично тому, что опубликовано для зубчатых опухолей, управляемых посредством KRAS или BRAF, и в соответствии с мнением, что SSA/P представляют собой предзлокачественные очаги, которые не являются полностью трансформированными, авторы настоящего изобретения наблюдали увеличенную экспрессию p53, p21 и p16 в SSA/P, которая для всех из них возвращалась к исходному состоянию, когда опухоли достигали стадии карциномы (**фиг. 8, панель J**). В

совокупности, эти результаты показывают, что одновременная потеря PKC $\lambda$ /1 и PKC $\zeta$  в эпителии кишечника приводит к развитию SSA/P, которые далее прогрессируют до MSS инвазивных карцином с высоко десмопластическим агрессивным фенотипом.

**Пример 2. Передача сигналов ERK, но не Wnt/ $\beta$ -катенина, является активированной в эпителии кишечника DKO<sup>IEC</sup>**

[0147] Колоректальный рак (CRC), образованный посредством пути, приводящего к возникновению зубчатых очагов, отличается от обычного фенотипа аденомы-карциномы не только морфологически, но также с точки зрения передачи сигналов и генетики. Генетические отличия характеризуются мутациями в пути передачи сигналов Wnt/ $\beta$ -катенина, которые являются намного менее частыми в зубчатых полипах. Примечательно, что ни для клеток SSA/P, ни для клеток аденокарциномы в опухолях DKO<sup>IEC</sup> не показано накопления ядерного окрашивания  $\beta$ -катенина. Однако, накопление ядерного окрашивания  $\beta$ -катенина наблюдали в опухолях от мышей *Apc<sup>fl/+</sup>;LKO<sup>IEC</sup>* (фиг. 2, панель А и фиг. 2, панель В). Для определения путей передачи сигналов, лежащих в основе фенотипа кишечника DKO<sup>IEC</sup>, проводили несмещенный транскриптомный анализ (RNA-seq) образцов кишечника от этих мышей. Запрос транскриптомных данных для опухолей DKO<sup>IEC</sup> выявил положительное обогащение характерных профилей *MEK*, *EGFR* и *KRAS* (фиг. 2, панель С). Иммуногистохимия (ИHC) тканей кишечника DKO<sup>IEC</sup> показала сильную активацию пути *ERK*, как определено посредством увеличения окрашивания для фосфо-*ERK* и фосфо-*EGFR* (фиг. 2, панель D). Направленное геномное секвенирование не идентифицировало никаких изменений в потенциальных кодирующих горячих точках для мутаций в мышинных генах *Braf* (B637E) и *Kras* (G12D, G12V и G13D), которые были ассоциированы с онкогенезом зубчатых опухолей. Это позволяет уверенно предполагать, что одновременная инактивация обеих аPKC активирует путь ERK, независимо от генетических изменений в *Braf* или *Kras*. Примечательно, что анализ обогащения наборов генов (GSEA) транскриптомных данных для тканей кишечника DKO<sup>IEC</sup> также выявил активацию пути *YAP* (фиг. 2, панель E), что было подтверждено посредством ИHC (фиг. 2, панель D). Сравнение этих транскриптомных данных с характерными профилями генов, полученных для органоидов человека из зубчатых очагов, тубулярной или тубулярно-ворсинчатой аденомы и MSI или MSS CRC, показало, что гены, подвергнутые повышающей регуляции в опухолях DKO<sup>IEC</sup>, положительно коррелировали с характерными профилями генов зубчатого и MSS CRC (фиг. 2, панель F). Аналогично, характерный профиль генов из DKO<sup>IEC</sup> IEC был подвергнут значимой повышающей регуляции, при сравнении зубчатых опухолей человека с обычными карциномами, тубулярными аденомами, аденоматозными полипами, или нормальными ободочными

кишками (**фиг. 2, панель G**). Эти два дополняющих способа выявили, что опухоли DKO<sup>IEC</sup> являются высоко сходными с MSS зубчатыми опухолями человека на транскрипционном уровне.

### **Пример 3. Кишечная иммуносупрессия и стромальная активация у мышей DKO<sup>IEC</sup>**

**[0148]** Комбинированная потеря обеих аPKC в IEC стимулировала синергическое увеличение пролиферации клеток, как определено с использованием окрашивания Ki67, которое коррелировало со спонтанным образованием зубчатых опухолей (**фиг. 9, панель A**). Для эпителия кишечника LKO<sup>IEC</sup> также показано увеличение клеточной смерти, как показано посредством окрашивания расщепленной каспазы 3 и TUNEL, но клеточная смерть являлась значимо более низкой в опухолях DKO<sup>IEC</sup>, чем в опухолях LKO<sup>IEC</sup> (**фиг. 9, панель B** и **фиг. 9, панель C**). Уменьшение клеточной смерти в опухолях DKO<sup>IEC</sup> может объяснить, почему у этих мышей развивался рак, в то время как у мышей LKO<sup>IEC</sup> не развивался, и они не могли переходить дальше пренеопластической стадии. Примечательно, что присутствовала сильная инфильтрация CD45<sup>+</sup> клеток в тканях LKO<sup>IEC</sup>, но не ZKO<sup>IEC</sup> (**фиг. 3, панель A**). Важно, что эта инфильтрация являлась синергически увеличенной в DKO<sup>IEC</sup> SSA/P и карциномах (**фиг.3, панель A**), что указывает на то, что одновременная потеря обеих аPKC в эпителии кишечника запускает иммунологический ответ, который может являться критическим для онкогенного фенотипа мышей DKO<sup>IEC</sup>. Без связи с конкретной теорией, эти обнаружения позволяют предполагать, что иммунное микроокружение у мышей DKO<sup>IEC</sup> допускает развитие спонтанного зубчатого CRC. Для ткани кишечника LKO<sup>IEC</sup> показана значимо более высокая инфильтрация CD8<sup>+</sup> Т-клеток, чем для ткани WT (**фиг.3, панель B**), что позволяет предполагать, что потеря PKC $\lambda$ /i приводит к активации управляемого CD8<sup>+</sup> иммунного ответа. Однако, CD8<sup>+</sup> Т-клетки были исключены из областей SSA/P и карциномы мышей DKO<sup>IEC</sup> (**фиг. 3, панель B** и **фиг. 10, панель A**). Наблюдали очень сильную экспрессию лиганда 1 программируемой клеточной смерти (PD-L1) в CD45<sup>+</sup> клетках в опухолях DKOIEC (**фиг. 3, панель C**), в согласовании с наблюдением, что одновременная потеря обеих аPKC приводит к сильному иммуносупрессивному окружению, вероятно, приводящему к раку. Анализ проточной цитометрии популяций иммунцитов показал, что доля CD8<sup>+</sup> Т-клеток являлась увеличенной в ткани кишечника LKO<sup>IEC</sup> и уменьшенной до нормальной в опухолях DKOIEC (**фиг. 3, панель D**), в то время как доля PD-L1+/CD45<sup>+</sup> клеток являлась специфически увеличенной в опухолях DKOIEC (**фиг. 3, панель E**). Кроме того, для опухолей DKO<sup>IEC</sup> показано также значимое увеличение доли Foxp3<sup>+</sup> Трег-клеток (**фиг. 3, панель F**), что приводило к сильному

увеличению соотношения Трег/CD8<sup>+</sup> в опухоли (**фиг.3, панель G**). Кроме того, значимое увеличение доли продуцирующих IL-17A CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Th17-клеток ) наблюдали в опухолях DKO<sup>IEC</sup> (**фиг. 3, панель H**). Кроме того, для этих опухолей показано сильное накопление CD11b<sup>+</sup> миелоидных клеток (фигура 3I), включая как Ly6ChighLy6G<sup>+</sup> моноцитарные клетки, так и Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> полиморфноядерные клетки (**фиг. 3, панель J**). Эти популяции напоминали моноцитарные (M-MDSC) и гранулоцитарные (G-MDSC) супрессорные клетки миелоидного происхождения, соответственно. Однако, доля тотальных CD4<sup>+</sup> Т, B220<sup>+</sup> В, и NK1.1<sup>+</sup> NK клеток не изменялись (**фиг. 10, панель В**). Эти данные позволяют уверенно предполагать, что опухоли DKO<sup>IEC</sup> имеют иммуносупрессивное микроокружение, которое ингибирует ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток, и таким образом, позволяет пренеопластическим клеткам прогрессировать до злокачественности посредством пути, приводящего к возникновению зубчатых очагов.

[0149] Для очагов в кишечнике DKO<sup>IEC</sup> показана увеличенная экспрессия  $\alpha$ SMA, надежного маркера ассоциированных с раком фибробластов, с наивысшей экспрессией в карциномах (**фиг. 3, панель K**). Этот стромальный ответ сопровождался увеличенной экспрессией и отложением коллагена в областях опухолей (**фиг. 3, панель L и фиг. 10, панель C**), и обогащением зависимых от TGF- $\beta$  транскриптов (**фиг. 10, панель D**). Кроме того, в опухолях DKO<sup>IEC</sup> присутствовала повышающая регуляция транскриптов, связанных со стромальной активацией, и стромальных факторов роста, таких как лиганды для EGFR Areg и Ereg (**фиг. 10, панель E**), что было подтверждено посредством гибридизации *in situ* для Ereg (**фиг. 3, панель M**). Поддерживая активированный стромальный/мезенхимальный фенотип опухолей DKO<sup>IEC</sup>, GSEA транскриптов опухоли DKO<sup>IEC</sup> выявил, что характерный профиль генов эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) являлся положительно обогащенным (**фиг. 10, панель F**). Эти результаты, совместно с увеличением иммуносупрессивного фенотипа и ингибированием инфильтрации CD8<sup>+</sup> Т-клеток в опухолях DKO<sup>IEC</sup>, показывают, что потеря обеих aPKC в IEC приводит к индукции микроокружения кишечника, приводящей к раку. Это микроокружение управляется посредством пути, приводящего к возникновению зубчатых очагов, и имеет сильные десмопластические и мезенхимальные ответы.

#### **Пример 4. Воспаление кишечника управляет онкогенезом зубчатых опухолей**

[0150] Лечение мышей DKO<sup>IEC</sup> с использованием комбинации антибиотиков широкого спектра действия, прекращающее воспаление и иммунный ответ кишечника, сильно уменьшало инфильтрацию CD45<sup>+</sup> клеток, как показано посредством анализов ИНС и FACS (**фиг. 4, панели A-C**). Более важно, что это лечение значимо прекращало онкогенез (**фиг. 4, панели D-E**). Этот эффект сопровождался уменьшением количества

клеток Ki67<sup>+</sup> и уменьшением окрашивания фосфо-*ERK* и *YAP* (фиг. 4, панели F-G). Аналогично мышам DKO<sup>IEC</sup>, мыши LKO<sup>IEC</sup> имели увеличенную пролиферацию клеток крипт и инфильтрацию CD45<sup>+</sup> клеток, так же как усиленную экспрессию фосфо-*ERK* и *YAP*, которую возвращали к нормальным уровням посредством лечения антибиотиком (фиг. 11, панели A-C). Однако, у мышей DKO<sup>IEC</sup> развивались спонтанные зубчатые опухоли, а у мышей LKO<sup>IEC</sup> не развивались (фиг. 1, панели A-L). Таким образом, несмотря на то, что онкогенез зубчатых опухолей в большой степени зависит от управляемого воспалением процесса, воспаление не является достаточным. Отсутствие PKC $\zeta$  в эпителии кишечника DKO<sup>IEC</sup> обеспечивает дополнительные изменения, необходимые для развития опухоли.

**Пример 5. Роль CD8<sup>+</sup> Т-клеток в онкогенезе, управляемом посредством пути, приводящего к возникновению зубчатых очагов**

[0151] Если увеличенное накопление CD8<sup>+</sup> Т-клеток отвечает за неспособность мышей LKO<sup>IEC</sup> к развитию спонтанных опухолей, тогда истощение CD8<sup>+</sup> *in vivo* должно стимулировать онкогенез зубчатых опухолей у мышей LKO<sup>IEC</sup>, до степени, сравнимой с DKO<sup>IEC</sup>. Введение нейтрализующего антитела против CD8 эффективно истощало приблизительно 70% инфильтрующих CD8<sup>+</sup> Т-клеток (фиг. 4, панель H) и, что важно, воспроизводило фенотип зубчатой опухоли мышей DKO<sup>IEC</sup> (фиг. 4, панели I-K). Аналогично опухолям DKO<sup>IEC</sup>, для опухолей LKO<sup>IEC</sup>, индуцированных посредством истощения CD8<sup>+</sup> Т-клеток, показаны цитоморфологические признаки SSA/P, включая развитие аденокарциномы (фиг. 4, панель L), так же как увеличенная пролиферация, уменьшенная клеточная смерть, и усиленная стромальная активация (фиг. 4, панели L-M). Таким образом, отсутствие ответа CD8<sup>+</sup>Т-клеток в DKO<sup>IEC</sup> IEC лежит в основе спонтанной инициации образования зубчатых опухолей кишечника. В этом контексте, тот факт, что клеточная смерть является уменьшенной в опухолях DKO<sup>IEC</sup>, лишенных инфильтрации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, позволяет предполагать, что, в то время как увеличенная клеточная смерть и последующее воспаление, вероятно, являются важными для инициации образования опухолей, клеточная смерть должна уменьшаться, чтобы опухоли прогрессировали до более злокачественных стадий. Таким образом, прорыв иммунологического надзора вносит вклад в уменьшение клеточной смерти в опухолях DKO<sup>IEC</sup>; это позволяет мышам DKO<sup>IEC</sup> подвергаться развитию опухолей более эффективно, чем мышам LKO<sup>IEC</sup>, которые не могут переходить дальше пренеопластической стадии.

**Пример 6. Нарушенный ответ на интерферон в эпителиальных клетках кишечника DKO<sup>IEC</sup>**

**[0152]** Для лучшего понимания механизмов, посредством которых DKO<sup>IES</sup> IEC нарушают ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток и управляют инициацией развития зубчатых опухолей, исследовали пути, посредством которых потеря PKC $\lambda/1$  в IEC стимулирует ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Одной из ключевых характеристик IEC с недостаточностью PKC  $\lambda/1$  является увеличенная клеточная смерть, которая может инициировать ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток, связанный с иммуногенной клеточной смертью (ICD). Данные RNA-Seq показали повышающую регуляцию нескольких сигналов опасности, что согласуется с ответом ICD (фиг. 5, панель А), вместе с секрецией АТР (фиг. 5, панель В). В соответствии с этими данными, для эпителиальных клеток кишечника MODE-K с недостаточностью PKC  $\lambda/1$  показан увеличенный апоптоз в ответ на несколько стимулов ICD (фиг. 5, панель С и фиг.12, панель А), что позволяет предполагать, что IEC являются более склонными подвергаться ICD в отсутствие PKC  $\lambda/1$ .

**[0153]** Путь интерферона также является критическим каскадом, ответственным за опосредованный CD8<sup>+</sup> Т-клетками противоопухолевый иммунитет. Таким образом, исследовали роль PKC  $\lambda/1$  в ответе на интерферон клеток MODE-K при стимуляции с использованием поли(I:C). Интересно, что для клеток MODE-K с недостаточностью PKC  $\lambda/1$  показана более сильная индукция связанных с интерфероном транскриптов, включая *Cxcl10*, необходимый хемокин для привлечения CD8<sup>+</sup> (фиг. 5, панель D). Поскольку ответ на интерферон регулирует представление антигена, анализировали экспрессию белков МНС класса I посредством проточной цитометрии. Согласованно, потеря PKC  $\lambda/1$  значительно увеличивает экспрессию обеих тяжелых цепей H-2K<sup>k</sup> и H-2D<sup>k</sup> на поверхности клеток MODE-K (фиг. 5, панель E). Все эти данные указывают на более высокий ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток в отсутствие PKC  $\lambda/1$ . Для подкрепления этих результатов, проводили анализ опосредованной CD8<sup>+</sup> Т-клетками цитотоксичности, с использованием клеток MC38, экспрессирующих модельный антиген овалбумин (OVA), в качестве клеток-мишеней, и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных от мышей OT-I, в качестве специфических эффекторных клеток. Важно, что отсутствие PKC  $\lambda/1$  в клетках MC38 значительно увеличивает опосредованное клетками OT-I уничтожение (фиг. 5, панель F), демонстрируя, что потеря PKC  $\lambda/1$  в эпителиальных клетках кишечника стимулирует ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток, который является инструментом для предотвращения инициации образования опухоли.

**[0154]** Чтобы определить, каким образом потеря PKC $\zeta$  нарушает ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток, индуцированный потерей PKC  $\lambda/1$ , проводили анализ транскриптомных данных. Анализ выявил, что гены ответа на интерферон альфа и интерферон гамма представляли собой подвергнутые сильной понижающей регуляции характерные профили генов в

опухолях DKO<sup>IEC</sup>, по сравнению с тканями WT (**фиг. 12, панель В**). Однако, этот анализ не определил, является ли дефект в пути интерферона прямым следствием делеции *aPKC* в IEC, или он включает другой инфильтрующий тип клеток в опухоли. Транскриптомный анализ образцов IEC от мышей WT, LKO<sup>IEC</sup>, ZKO<sup>IEC</sup> и DKO<sup>IEC</sup> показал гены, вовлеченные в ответ на интерферон гамма, как подвергнутые наибольшей понижающей регуляции характерные профили генов в DKO<sup>IEC</sup>. Кроме того, эти два характерных профиля являлись также подвергнутыми наибольшей понижающей регуляции в ZKO<sup>IEC</sup> IEC, по сравнению с IEC WT (**фигура 5, панель G**). Уменьшение экспрессии регулируемых интерфероном генов также наблюдали в ZKO<sup>IEC</sup> IEC, по сравнению с WT, и в DKO<sup>IEC</sup>, по сравнению с LKO<sup>IEC</sup> (**фиг. 5, панель H и фиг. 12, панель D**). Эти данные установили, что потеря PKC $\zeta$  вносит вклад в онкогенез зубчатых опухолей посредством супрессии клеточного ответа на интерферон автономным для клеток образом.

**[0155]** Проводили серии экспериментов *ex vivo* с использованием 3D культур органоидов, либо содержащих (WT), либо лишенных (ZKO) PKC $\zeta$ . Ингибиторы ДНК-метилтрансферазы (DNMTi) недавно использовали для повышающей регуляции транскрипции эндогенных активаторов человека из пути детекции двухцепочечной РНК, кульминацией которого является стимуляция ответов на интерферон типа I и III. Оба типа органоидов инкубировали с DNMTi 5-аза-2-дезоксцитидином (5-AZA-CdR) в течение 24 часов, с последующим культивированием клеток в отсутствие этого лекарственного средства. Важно, что обработка 5-AZA-CdR сильно индуцировала экспрессию ключевых регулируемых интерфероном генов *Irf7*, *Oas1a*, *Isg15* и *Cxcl10* в органоидах WT, и эта экспрессия была сильно подавлена в органоидах ZKO (**фиг. 5, панель I**). Эти результаты показывают, что PKC $\zeta$  в IEC является необходимой для эндогенной активации пути интерферона *ex vivo*. Важно, что генетическая делеция PKC $\zeta$  в контексте клеток с недостаточностью PKC $\lambda/1$  сильно ингибировала экспрессию транскриптов интерферона (**фиг. 5, панель J**) и экспрессию ключевых элементов в каскадах передачи сигналов интерферона (**фиг. 5, панель K**), которые являются гиперактивированными в клетках с недостаточностью PKC $\lambda/1$ . Наблюдали также отрицательное обогащение характерного профиля «ALLOGRAFT\_REJECTION» в ZKO<sup>IEC</sup> IEC (**фиг. 5, панель G**). Анализ NextBio генов, подвергнутых понижающей регуляции в ZKO<sup>IEC</sup> IEC, выявил значимые корреляции с термином GO «процессинг антигена и представление пептидного антигена посредством МНС класса I» (**фиг. 5, панель L**). Соответственно, стимуляция с использованием 5-AZA-CdR подвергала повышающей регуляции экспрессию длинной цепи H-2K<sup>b</sup> МНС класса I на поверхности органоидов WT, но не на органоидах ZKO (**фиг. 5, панель M**), демонстрируя дефект в представлении антигена в условиях недостаточности PKC $\zeta$ . Кроме



того, анализ ИНС показал в тканях кишечника повышающую регуляцию маркера МНС класса I у мышей LKO<sup>IEC</sup>, которая была полностью прекращена у мышей DKO<sup>IEC</sup> (фиг. 5, панель N).

[0156] В совокупности, эти результаты устанавливают, что РКСζ играет критическую роль в контроле ответа на интерферон в IEC и поддерживают обнаружение, что нарушенный ответ на интерферон у мышей DKO<sup>IEC</sup> ответственен за дефект инфильтрации CD8<sup>+</sup> и спонтанное развитие зубчатых опухолей кишечника.

#### **Пример 7. Терапевтические вмешательства при зубчатых опухолях, управляемых потерей aPKC**

[0157] Для терапевтического применения увеличенной инфильтрации опухолей DKO<sup>IEC</sup> клетками PD-L1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, мышей DKO<sup>IEC</sup> подвергали лечению с использованием антитела против PD-L1 в течение 3 недель, начиная с возраста 10 недель (фиг. 13, панель A). Это лечение привело к сильному уменьшению количества, среднего размера и суммарной нагрузки опухолей, так же как встречаемости рака, которое коррелировало с сопутствующим увеличением привлечения CD8<sup>+</sup> клеток в области опухолей (фиг. 13, панели B–D). Однако, для лечения антителом против PD-L1 не показано никакого терапевтического эффекта, когда мышей подвергали лечению, начиная с возраста 13 недель (фиг. 13, панель E), в точке, в которой у этих мышей проявлялась нагрузка опухолей на более поздних стадиях и увеличенная агрессивность опухолей (фиг. 13, панели F–H). Таким образом, как только зубчатые опухоли развивались и становились более агрессивными, они становились устойчивыми к терапии антителом против PD-L1. Одной из характеристик опухолей DKO<sup>IEC</sup> на поздних стадиях является высокий десмопластический ответ, который, как предположили, является критическим механизмом для прогрессирования CRC по направлению к высокой злокачественности и инвазии, и плохой выживаемости пациентов. Примечательно, что для опухолей от мышей DKO<sup>IEC</sup> в возрасте 16 недель показаны увеличенная экспрессия αSMA и отложение коллагена, по сравнению с опухолями от мышей в возрасте 13 недель (фиг. 13, панель I), что позволяет предполагать потенциальный вклад активированной стромы в устойчивость опухолей DKO<sup>IEC</sup> к терапии.

[0158] Затем исследовали, может ли сильный стромальный ответ зубчатых опухолей DKO<sup>IEC</sup> являться центральным для прогрессирования опухоли и приобретения более агрессивного фенотипа. Поскольку стромальная активация при CRC основана на передаче сигналов TGF-β, авторы настоящего изобретения подвергали мышей DKO<sup>IEC</sup> в возрасте 10 недель лечению с использованием специфического для TGF-βR1 ингибитора галунисертиба (LY2157299) (фиг. 6, панель A). Хотя это лечение не уменьшало

количество, размер или нагрузку опухолей у мышей DKO<sup>IEC</sup> (фиг. 6, панель В), оно супрессировало прогрессирование SSA/P до стадии аденокарциномы, и особенно уменьшало встречаемость инвазивного рака (фиг. 6, панель С и фиг. 6, панель D). В соответствии с хорошо установленной ролью TGF- $\beta$  в стромальной активации, лечение с использованием галунисертиба приводило к ингибированию стромального фосфо-SMAD2 и отложения коллагена (фиг. 6, панель D), так же как к уменьшенной экспрессии отвечающих на TGF- $\beta$  генов, таких как *Angptl2*, *Cdkn2b*, *Il11* и *Ereg* (фиг. 6, панель E). Кроме того, анализы проточной цитометрии показали уменьшение доли Th17-клеток в опухолях при этом лечении (фиг. 6F), что согласуется с критической ролью TGF- $\beta$  в дифференцировке Th17-клеток. Однако, это лечение значимо не изменяло доли CD8<sup>+</sup> Т-, Трег- или CD11b<sup>+</sup> миелоидных клеток (фиг. 6, панели G–J).

[0159] Доля PD-L1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> клеток, инфильтрующих опухоли DKO<sup>IEC</sup>, не подвергалась влиянию галунисертиба (фиг. 6, панели K–L), что могло объяснить, почему это лечение не восстанавливало инфильтрацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Это также позволяет предполагать, что активированная строма вносит вклад в онкогенез у мышей DKO<sup>IEC</sup> посредством стимуляции прогрессирования опухоли, но не является критической для инициации возникновения зубчатых опухолей, которая, наиболее вероятно, обусловлена инактивацией ответа CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Потенциально важно с терапевтической точки зрения, что когда параллельную когорту мышей DKO<sup>IEC</sup> в возрасте 23 недель подвергали лечению с использованием комбинации галунисертиба и антитела против PD-L1 (фиг. 6, панель M), присутствовало очень сильное уменьшение количества, размера, нагрузки и агрессивности опухолей (фиг. 6, панели N–O), с сопутствующим увеличением инфильтрации CD8<sup>+</sup> Т-клеток в опухоли (фиг. 6, панель P и фиг. 6, панель Q). Однако, не присутствовало изменений доли Трег-клеток, хотя присутствовало значимое уменьшение количества CD11b<sup>+</sup> миелоидных клеток (фиг. 6, панель R и фиг. 6, панель S). Эти результаты показывают, что, несмотря на то, что терапия антителом против PD-L1 не является эффективной для находящегося на более поздних стадиях и десмопластического зубчатого рака, эти виды рака становятся чувствительными к лечению антителом против PD-L1, когда прогрессирование SSA/P до аденокарциномы ослабляют посредством супрессии передачи сигналов TGF- $\beta$ .

**Пример 8. Для зубчатых опухолей человека показана уменьшенная экспрессия aPKC**

[0160] Для установления важности потери aPKC в зубчатых опухолях человека, анализировали полипы, патологически классифицированные как SSA/P или тубулярная аденома (ТА). Считают, что SSA/P являются предшественниками эпителиальных очагов,

которые могут прогрессировать до зубчатого колоректального рака (CRC), в то время как за ТА следует обычный CRC. Антитело, узнающее обе аPKC (фиг. 14, панель А), использовали для иммуноокрашивания 30 образцов SSA/P и 30 ТА, вместе с 20 контрольными образцами от здоровых индивидуумов. Уровни аPKC являлись значимо уменьшенными только в образцах SSA/P, а не в образцах ТА (фиг. 7, панель А и фиг. 7, панель В), что устанавливало важность потери аPKC в зубчатых опухолях человека.

[0161] Для определения того, коррелируют ли низкие уровни обеих аPKC с зубчатыми признаками в образцах CRC, биоинформатику использовали для проверки большого набора данных от пациентов с колоректальной аденокарциномой в The Cancer Genome Atlas Network (TCGA). Поскольку эти образцы CRC являются генетически и морфологически гетерогенными и не аннотированы по происхождению их предшественников посредством пути образования зубчатых очагов или обычного пути, пациентов сначала стратифицировали на основании экспрессии аPKC и проводили GSEA с использованием характерных профилей генов зубчатой или обычной аденомы. Пациентов классифицировали в соответствии с медианной экспрессией *PRKCI* и *PRKCZ*. Этот анализ показал значимое положительное обогащение характерных для зубчатых опухолей профилей генов в группе  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$ , по сравнению с группой  $PRKCI^{Hi}PRKCZ^{Hi}$  (фиг. 7, панель С).

[0162] Затем, пациентов с CRC классифицировали на основании молекулярных профилей с использованием классификации CCS (подтипов рака ободочной кишки). Эта классификация включает три подгруппы: CCS1 представляет хромосомно нестабильный; CCS2 является MSI/CIMP<sup>+</sup>; и CCS3 является по большей части MSS и относится к зубчатым опухолям, включая опухоли с повышающей регуляцией стромальных генов и генов EMT, и определяет подгруппу пациентов с наихудшей выживаемостью. Уровни мРНК обеих аPKC являлись значимо уменьшенными в подтипе CCS3 (фиг. 7, панель D, фиг. 14, панель В, и фиг. 14, панель С). Также, для образцов, стратифицированных по экспрессии обеих аPKC, показана заметная сегрегация пациентов по классификации CCS. Подтип CCS3 преимущественно состоял из группы  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$  (фиг. 7, панель Е, фиг. 14, панель D и фиг. 14, панель Е), которая являлась ассоциированной с худшим прогнозом, чем подгруппа  $PRKCI^{Hi}PRKCZ^{Hi}$  (фиг. 7, панель F и фиг. 14, панель F), в соответствии с неблагоприятным прогнозом, ассоциированным с пациентами с CCS3. Стратификация TCGA пациентов в соответствии с их уровнями аPKC также подтвердила критическую роль этих киназ в отрицательной регуляции EMT и путей KRAS и YAP, так же как в активации передачи сигналов TGF- $\beta$  (фиг. 7, панель G). Кроме того, анализ пациентов с CRC, в соответствии с их статусом мутаций *KRAS* или *BRAF*, выявил

существование подгруппы, охарактеризованной как  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$ , которая являлась также WT для *BRAF* и *KRAS* (**фиг. 14, панель G**). GSEA транскриптомов этих пациентов показал положительную корреляцию с подвергнутыми повышающей регуляции характерными профилями зубчатых опухолей и подвергнутыми понижающей регуляции характерными профилями аденомы, и положительное обогащение характерных профилей ЕМТ и воспалительных характерных профилей (**фиг. 14, панель H**), в превосходном соответствии с фенотипом опухолей DKO<sup>IEC</sup>. Для образцов  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$ , которые также имели мутации либо в *KRAS*, либо в *BRAF*, показан более мезенхимальный и воспалительный фенотип, чем для образцов, которые являлись мутантными по любому из этих двух онкогенов, но являлись  $PRKCI^{Hi}PRKCZ^{Hi}$  (**фиг. 14, панель I** и **фиг. 14, панель J**). Эти результаты показывают, что одновременная потеря обеих аPKC при CRC человека образует дополнительный фенотип к фенотипу группы зубчатых опухолей - мутантов *KRAS* или *BRAF*, характеризующийся стромальным и воспалительным ответом. Таким образом, за худший прогноз для пациентов  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$  (**фиг. 7, панель F** и **фиг.14, панель F**) могут отвечать ЕМТ/воспалительные окружения, образованные посредством инактивации обеих аPKC.

[0163] Отрицательная корреляция между уровнями аPKC и воспалительным ответом у пациентов с CRC из группы  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$  (**фиг. 7, панель G** и **фиг. 14, панели H–J**) позволила предположить потенциальную связь между воспалением кишечника человека и онкогенезом зубчатых опухолей. Исследовали наборы данных для воспалительного заболевания кишечника (IBD) человека, которые включали данные для пациентов как с болезнью Крона (CD), так и с язвенным колитом (UC). В большинстве наборов данных показаны уменьшенные уровни транскриптов обеих аPKC, вместе с увеличенным обогащением характерных профилей генов для зубчатых очагов, ЕМТ и воспаления для обоих типов пациентов с IBD, по сравнению со здоровыми индивидуумами (**фиг. 7, панель H**). В отличие от этого, для подтипа CCS3 показан иммуносупрессивный фенотип, характеризующийся более низкими уровнями иммуностимулирующих молекул (особенно по сравнению с подтипом CCS2 [MSI/CIMP<sup>+</sup>]) и увеличенными уровнями иммуноингибирующих молекул, и те, и другие из которых являлись ассоциированными с уменьшенными уровнями *PRKCI* и *PRKCZ* (**фиг. 14, панель K** и **фиг. 14, панель L**). Результаты для опухолей DKO<sup>IEC</sup>, раскрытые выше, показали дефект иммунологического надзора, ответственный за инициацию развития зубчатых опухолей в модели на мышах DKO<sup>IEC</sup>, характеризующийся исключением CD8<sup>+</sup> Т-клеток из опухолей DKO<sup>IEC</sup>. Для подтверждения этого фенотипа у пациентов-людей, авторы настоящего изобретения использовали антитела против CD8<sup>+</sup> и против аPKC для

иммуноокрашивания когорты образцов CRC человека, собранных из проксимального отдела ободочной кишки, где, как точно установлено, часто локализованы SSA/P и зубчатый рак. Примечательно, что для образцов CRC с низкими уровнями аPKC показана значимо более низкая инфильтрация CD8<sup>+</sup> Т-клеток, чем для образцов с высокими уровнями экспрессии аPKC (фиг. 7, панель I и фиг. 7, панель J). В совокупности, эти результаты сильно поддерживают наблюдение, что хроническое воспаление является критическим для развития CRC посредством пути, приводящего к возникновению зубчатых очагов, и что потеря аPKC является центральным событием в этом процессе и в развитии иммуносупрессивного фенотипа.

### **Пример 9. Общие способы**

#### **[0164] Мыши**

**[0165]** Мышей *Prkcz*<sup>fl/fl</sup>, *Prkci*<sup>fl/fl</sup>, *Apc*<sup>fl/fl</sup>, Villin-cre и Lgr5-EGFP-iRES-creERT2 (Lgr5-creERT2) получали в соответствии со способами, раскрытыми в Llado et al., Repression of Intestinal Stem Cell Function and Tumorigenesis through Direct Phosphorylation of  $\beta$ -catenin and Yap by PKC $\zeta$ . Cell Reports (2015) 10,740-754; Nakanishi et al., Control of Paneth Cell Fate, Intestinal Inflammation, and Tumorigenesis by PKC $\lambda$ /i. Cell Reports (2016) 16, 3297-3310. Для анализа опосредованной CD8<sup>+</sup> Т-клетками цитотоксичности (фиг. 5, панели A-N), использовали мышей OT-I TCR Tg (OT-I) (Jackson Laboratory) в возрасте между 8 и 12 недель. Все линии мышей получали на фоне C57BL/6, и они рождались и содержались в свободных от патогенов условиях. Мышей умерщвляли, и тонкие кишечники и ободочные кишки собирали для анализов. Манипуляции и экспериментальные процедуры с животными соответствовали институциональным руководствам и были одобрены Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute. Все генотипирование проводили посредством ПЦР. Совпадающих по возрасту и полу мышей использовали для всех экспериментов. Для лечения антибиотиками, мышам DKO<sup>IEC</sup> или LKO<sup>IEC</sup> в возрасте 10 недель вводили комбинацию ампициллина (1 г/л), неомицина (1 г/л), метронидазола (1 г/л) и ванкомицина (0,5 г/л) в питьевой воде в течение 6 или 4 недель, соответственно, пока их не умерщвляли.

**[0166]** Для истощения CD8<sup>+</sup> Т-клеток (фиг. 4, панели A-L), мышам LKO<sup>IEC</sup> в возрасте 10 недель инъектировали внутривенно 200 мкг антитела против CD8 (клон 2.43) или контрольного IgG дважды в неделю в течение 5 недель, пока их не умерщвляли. Для эксперимента специфического для TGF- $\beta$ R1 ингибирования, мышей DKO<sup>IEC</sup> в возрасте 10 недель подвергали лечению дважды в сутки с использованием дозы 10 мг галунисертиба (Tauriello et al., 2018) перорально в течение 6 недель, пока их не

умерщвляли. Контрольных мышей подвергали обработке носителем. Для иммунотерапии с воздействием на контрольные точки, мышам DKO<sup>IEC</sup> либо в возрасте 10 недель, либо в возрасте 13 недель инъецировали внутривентрально дозу 10 мг/кг (массы тела) антитела против PD-L1 (клон 6E11) дважды в неделю в течение 3 недель, пока их не умерщвляли. Для комбинированной терапии антителом против PD-L1 и специфическим для TGF- $\beta$ R1 ингибитором, мышей DKO<sup>IEC</sup> в возрасте 23 недель подвергали лечению дважды в сутки с использованием дозы 10 мг галунисертиба перорально и инъецировали внутривентрально дозу 10 мг/кг (массы тела) антитела против PD-L1 дважды в неделю в течение 3 недель, пока их не умерщвляли. Антитело против PD-L1 было предоставлено de Sauvage FJ (Genentech).

**[0167] Образцы от человека**

**[0168]** Образцы тканей собирали в ходе колоноскопии или хирургической операции из ободочной кишки 20 нормальных здоровых индивидуумов, 30 индивидуумов с сидячей зубчатой аденомой/полипом, 30 индивидуумов с тубулярной аденомой, 25 индивидуумов с проксимальным раком ободочной кишки. Письменное информированное согласие получали от всех пациентов по протоколу, одобренному Этическим комитетом Scripps Green Hospital. Деидентифицированные образцы посылали в Sanford Burnham Prebys (SBP) Medical Discovery Institute и использовали для гистологических анализов. Исследование было одобрено Комитетом IRB SBP Medical Discovery Institute.

**[0169] Эксперименты с культурами клеток**

**[0170]** Клетки MODE-K, 293T и MC38OVA культивировали в DMEM (Cellgro, #15-017-CV), дополненной 10% FBS, 2 mM глутамином, и 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, в атмосфере 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>. Для измерения АТФ и Вестерн-блоттингов для иммуногенной клеточной смерти, клетки обрабатывали с использованием оксалиплатина (20 мкМ), бортезомиба (0,1 мкМ) или 10 нг/мл TNF $\alpha$  (Sigma) и 2,5 мкг/мл CHX (Sigma) в течение 24 часов. Уровни внеклеточного АТФ измеряли посредством анализа ATPlite на основе люциферина (например, Perkin Elmer) с использованием считывателя Varioskan Lux (например, Thermo Fisher, как указано производителем). Для обработки с использованием поли(I:C), клетки трансфицировали с использованием 0,5 мкг/мл поли(I:C) (например, InVivoGen) с использованием липофектамина 2000 (например, Invitrogen). Клетки для анализа белка лизировали в буфере RIPA (20 mM Трис-HCl, 37 mM NaCl, 2 mM ЭДТА, 1% Triton-X, 10% глицерина, 0,1% SDS и 0,5% дезоксихолата натрия), с ингибиторами фосфатазы и протеазы. Экстракты клеток денатурировали, подвергали SDS-PAGE, переносили на мембраны из поливинилидендифторида (PVDF) (например, GE Healthcare) и подвергали

иммуноблоттингу со специфическими антителами, как перечислено в таблице реагентов для способов STAR.

**[0171]** Для нокдауна PKC $\zeta$  в клетках 293T sgPKC $\lambda/1$  и PKC  $\lambda/1$  в клетках MC38OVA, лентивирусную кшПНК TRC, нацеленную на PKC $\zeta$  человека (TRCN0000001219) и кшПНК TRC, нацеленную на PKC $\lambda/1$  мыши (TRCN000022757), получали из Open Biosystems. Кодированные кшПНК плазмиды трансфицировали совместно с упаковывающими плазмидами psPAX2 (например, плазмидой Addgene #12260) и pMD2.G (например, плазмидой Addgene #12259) в активно растущие клетки 293T посредством использования реагента для трансфекции XtremeGene HP (например, Roche). Содержащие вирус супернатанты собирали через 48 час после трансфекции, фильтровали для удаления клеток, и затем использовали для инфекции клеток-мишеней в присутствии 8 мкг/мл полибрена (например, Millipore). Клетки анализировали после отбора с пурамицином (1 мкг/мл) для подтверждения нокдауна. Для нокаута PKC $\zeta$  в клетках 293T sgPKC  $\lambda/1$ , лентивирусную плазмиду с направляющей РНК, нацеленной на PKC $\zeta$  человека (BRDN0001149519), и лентивирусный вектор, экспрессирующий Cas9 и ген устойчивости к бластицидину, получали из Addgene. Клетки обрабатывали содержащими вирус супернатантами и подвергали отбору с пурамицином и бластицидином. Колонии из отдельных клеток размножали и подвергали скринингу по PKC $\zeta$  посредством иммуноблоттинга. Для нокаута PKC  $\lambda/1$  в клетках MODE-K, 20-нуклеотидную последовательность одиночной направляющей РНК (онРНК), нацеливающую на PKC  $\lambda/1$  мыши, конструировали с использованием инструмента дизайна CRISPR. онРНК клонировали в вектор lentiCRISPR v2 и трансдуцировали в клетки MODE-K. Клетки отбирали с пурамицином, и колонии из отдельных клеток размножали и подвергали скринингу по PKC  $\lambda/1$  посредством иммуноблоттинга.

**[0172]** *Гистология, иммуногистохимия, иммуофлуоресценция и гибридизация in situ*

**[0173]** Органы выделяли, промывали в ледяном PBS, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение ночи при 4°C, дегидратировали и погружали в парафин. Срезы (5 мкм) окрашивали с использованием гематоксилина и эозина (H&E). Для иммуногистохимии, срезы депарафинизировали, регидратировали и затем обрабатывали для демаскировки антигена. После блокирования в белковых блокирующих бессывороточных растворах (DAKO), ткани инкубировали с первичным антителом в течение ночи при 4°C, с последующей инкубацией с биотинилированным вторичным антителом. Реакции эндогенной пероксидазы останавливали в 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в воде

в течение 10 мин при комнатной температуре. Антитела визуализировали с использованием комплекса авидин/биотин (например, Vectastain Elite; Vector Laboratories) с использованием диаминобензидина в качестве хромогена. Для иммунофлуоресценции, свежемороженные органы погружали в соединение Tissue-Tek OCT (например, Sakura), и срезы по 10 мкм фиксировали в метаноле, промывали с использованием PBS и затем инкубировали с первичными антителами. Промытые срезы инкубировали с конъюгированными с Alexa вторичными антителами (например, Life Technologies) и исследовали с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 710 NLO. Гибридизацию *in situ* для мышиногo Ereg проводили с использованием набора для мультиплексного флуоресцентного анализа RNAscope (Advanced Cell Diagnostics), следуя инструкциям производителя. Зонд, соответствующий области CDS мышиногo Ereg (# доступа: NM\_007950.2, область зонда: 116–1496; Advanced Cell Diagnostics; кат.#: 437981). Клеточную смерть анализировали с использованием набора для детекции клеточной смерти *in-situ*, TMR красного (Thermo) для TUNEL. Трихромное окрашивание по Массону проводили, следуя инструкциям производителя (Sigma HT15-1KT).

#### **[0174] Анализ проточной цитометрии**

**[0175]** Эксперименты проточной цитометрии проводили с использованием свежих препаратов тканей и органоидов тонкого кишечника. Для анализов тканей тонкого кишечника, половину двенадцатиперстной кишки, тощей кишки и подвздошной кишки использовали для количественного анализа проточной цитометрии популяции иммуноцитов из собственной пластинки слизистой оболочки. Кратко, тонкие кишечника промывали в холодном PBS, нарезали на мелкие куски, инкубировали в HBSS с ЭДТА (5 мМ) и расщепляли с использованием коллагеназы (0,05 мг/мл) в течение 30 мин при 37°C, с последующим способом ступенчатого разделения на перколле (40 и 75%) для очистки иммуноцитов. Клетки, сконцентрированные на границе раздела, собирали и промывали в холодном PBS. Эритроциты удаляли с использованием лизирующего буфера (BD Pharm Lyse), и живые клетки подсчитывали с использованием трипанового синего и затем насыщали с использованием блокирования мышиногo Fc (очищенного антитела против CD16/CD32 мыши; 1:50; клон 2.4G2; BD Pharmingen) 30 мин при 4°C до инкубации со специфическими окрашенными антителами.

**[0176]** Для внутриклеточного окрашивания IL-17A, клетки предварительно обрабатывали с использованием 50 нг/мл фоболмиристатацетата и 500 нг/мл иономицина в присутствии 10 мкг/мл брефелдина А в течение 3 час при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем клетки окрашивали с использованием специфических внеклеточных антител, пермеабелизировали с использованием набора растворов для фиксации/пермеабелизации



(например, BD Cytofix/Cytoperm), согласно инструкциям производителя, и наконец, инкубировали со специфическим антителом против IL-17A (клон TC11-18H10; BD Pharmingen) в буфере для пермеабилзации/промывки в течение ночи при 4°C. Для внутриклеточного окрашивания FOXP3, клетки окрашивали с использованием специфических внеклеточных антител, пермеабилзировали с использованием такого же набора BD Cytofix/Cytoperm и наконец, окрашивали с использованием специфического антитела против FOXP3 (клон FJK-16s) в буфере для пермеабилзации/промывки в течение ночи при 4°C.

[0177] Для получения органоидов тонкого кишечника, органоиды собирали в ледяном растворе TrypLE (например, Life Technologies) для удаления матригеля, затем пипетировали 5 циклов и инкубировали 5 мин при 37°C для получения суспензии отдельных клеток. Клетки промывали дважды в PBS 3% FBS и ресуспендировали при комнатной температуре с использованием PBS с 100 мкг/мл ДНКазы I в течение 10 мин до окрашивания с использованием антитела против H-2Kb (клон AF6-88.5.5.3; eBioscience). Для представления антигена в клетках MODE-K, клетки промывали в PBS, трипсинизировали и промывали теплой средой. Затем клетки ресуспендировали и окрашивали с использованием антитела против H-2Kk (клон 36-7-5; BioLegend) и антитела против H-2Dk (клон 15-5-5; BD Pharmingen). Мертвые клетки исключали после окрашивания 7-AAD. Все эксперименты проточной цитометрии проводили в 14-цветном анализаторе BD LSRFortessa в отделении FACS, общем с Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, и данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star Inc.).

[0178] Для анализа уничтожения Т-клетками для клеток MC38OVA, CD8<sup>+</sup> Т-клетки выделяли из селезенки мышей OT-I посредством магнитной сортировки с использованием набора для выделения CD8<sup>+</sup> Т-клеток мыши EasySep (например, Stemcell Technologies), в соответствии с инструкциями производителя. Для получения эффекторных клеток, наивные Т-клетки культивировали при 10<sup>6</sup>/мл в течение 3 суток с иммобилизованным антителом против CD3 (10 мкг/мл) и растворимым антителом против CD28 (5 мкг/мл) (Bio X Cell). Через 3 суток, эффекторные CD8<sup>+</sup> Т-клетки совместно культивировали с 1x10<sup>4</sup> экспрессирующих OVA клеток-мишеней MC38 (shNT и shλ/1) или клеток-мишеней MC38 в различных соотношениях (2:1; 1:1; 1:2 ; 1:10; 1:20; 1:50) в течение 24 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Линию клеток MC38 использовали в качестве отрицательного контроля. Супернатанты собирали и анализировали с использованием набора для анализа цитотоксичности Pierce LDH (Thermo Scientific) для определения специфической цитотоксичности, в соответствии с инструкциями производителя. Для

окрашивания PI, 100 мкм иодид пропидия добавляли в культуральную среду, когда добавляли клетки OT-I. Сигнал PI измеряли через 24 часа после совместного культивирования с клетками OT-I с использованием многорежимного считывателя для микропланшетов Varioskan LUX (например, ThermoFisher Scientific).

**[0179] Выделение эпителиальных клеток кишечника и культивирование органоидов тонкого кишечника**

**[0180]** Выделение эпителиальных клеток кишечника (IEC) проводили, как раскрыто ранее в Llado et al., Repression of Intestinal Stem Cell Function and Tumorigenesis through Direct Phosphorylation of  $\beta$ -catenin and Yap by PKC $\zeta$ . Cell Reports (2015) 10,740-754, с некоторыми модификациями. Кратко, тонкие кишечника извлекали, промывали холодным PBS без хлорида магния и кальция (PBS<sup>-/-</sup>), раскрывали в продольном направлении, нарезали на фрагменты 5 мм, и затем промывали несколько раз холодным PBS<sup>-/-</sup> до чистоты. Нарезанные фрагменты ткани инкубировали с PBS<sup>-/-</sup> ЭДТА (5 мМ), содержащим 10% FBS, в течение 40–60 мин при 4°C. Затем IEC механически отделяли от соединительной ткани посредством интенсивного встряхивания, и затем фильтровали через 100-мкм сито в 50 мл коническую пробирку для удаления фрагментов ткани. Выделенные IEC осаждали и затем лизировали для экстракции РНК или белка. Для культивирования органоидов тонкого кишечника, авторы настоящего изобретения собирали ткани аденомы тонкого кишечника от мышей Lgr5-creERT2; Apc<sup>fl/fl</sup> (WT) или Lgr5-creERT2;Apc<sup>fl/fl</sup>;Prkcz<sup>fl/fl</sup> (ZKO), подвергнутых инъекции тамоксифена (например, Sigma) внутрибрюшинно. Выделенные ткани аденомы нарезали на мелкие куски и инкубировали в буфере для расщепления (модифицированная способом Дульбекко среда Игла с 10% FBS, пенициллином/стрептомицином, 1 мг/мл коллагеназы типа XI, 0,1 мг/мл ДНКазы I, 10 мкм Y-27632) в течение 15–20 минут при 37°C. Расщепленные фрагменты аденомы промывали с использованием PBS<sup>-/-</sup> и затем фильтровали через сито 100 мкм в 50-мл коническую пробирку для удаления стромальных фрагментов. Фрагменты аденомы подсчитывали после выделения, и всего 250–500 фрагменты смешивали с 100 мкл матригеля с уменьшенным уровнем факторов роста и рассеивали в 12- или 24-луночные планшеты. После полимеризации матригеля, добавляли 1 мл культуральной среды (усовершенствованная DMEM/F12, содержащая 10 мМ HEPES, 1X Glutamax, 1X добавку B27, 50 нг/мл EGF и 10 мкм Y-27632). Для эксперимента для проверки ответа на интерферон, органоиды обрабатывали с использованием 3 мкМ 5-AZA-CdR (Sigma). После 24 час инкубации, среду заменяли на свежую среду, не содержащую лекарственное средство, и затем органоиды культивировали в течение дополнительных 3 суток для анализов РНК или проточной цитометрии.

### [0181] Анализ микросателлитной нестабильности (MSI)

[0182] Для проверки микросателлитной нестабильности (MSI), пять маркеров микросателлитных повторов амплифицировали посредством ПЦР с использованием ДНК, выделенной из тканей мышей WT и DKO<sup>IEC</sup>. 10 нг ДНК амплифицировали с использованием меченных FAM прямых праймеров и обратных праймеров, представленных в **таблице 1**, специфических для ранее подтвержденных мышинных микросателлитных маркеров Bat24, Bat26, Bat30, Bat37, Bat64. Hi-Di и стандарт размера LIZ добавляли к образцам, и разделение и детекцию амплифицированных фрагментов проводили в анализаторе ДНК 3730xl (Eton Bioscience). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Peak Scanner<sup>TM</sup> от Applied Biosystems для идентификации аллельных паттернов для каждого маркера. Аллельные паттерны для нормальных тканей и тканей опухоли сравнивали и оценивали в баллах на основании размера пика для преобладающего аллеля и присутствия аллельных вариантов. Образцы опухолей с большей или равной 40% MSI классифицировали как MSI-высокую (MSI-H), меньшей чем 40%, как MSI-низкую (MSI-L), и образцы без изменений классифицировали как имеющие микросателлитную стабильность (MSS).

Таблица 1. Приведенные в качестве примера последовательности праймеров для анализа MSI

| Символ гена | Последовательность прямого праймера | Последовательность обратного праймера |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Bat24       | 6FAM-CATAGACCCAGTGCTCATCTTCGT       | CATTCGGTGGAAAGCTCTGA                  |
| Bat26       | 6FAM-TCACCATCCATTGCACAGTT           | CTGCCGAGAAGGTACTCACCC                 |
| Bat30       | 6FAM-ATTTGGCTTTCAAGCATCCATA         | GGGAAGACTGCTTAGGGAAGA                 |
| Bat37       | 6FAM-TCTGCCCAAACGTGCTTAAT           | CCTGCCTGGGCTAAAATAGA                  |
| Bat64       | 6FAM-CCCACACTCCTGAAAACAGTCAT        | CCCTGGTGTGGCAACTTTAAGC                |

### [0183] Выделение и анализ РНК

[0184] Тотальную РНК из тканей и культивированных органоидов мышей выделяли с использованием реагента TRIZOL (например, Invitrogen) и набора RNeasy Mini (например, Qiagen), с последующей обработкой ДНКазой. После количественной оценки с использованием спектрофотометра Nanodrop 1000 (например, Thermo Scientific), РНК подвергали либо переработке для РНК-seq, либо обратной транскрипции с использованием случайных праймеров и обратной транскриптазы MultiScribe (например, Applied Biosystems). Экспрессию гена анализировали посредством амплификации 20 нг комплементарной ДНК с использованием системы для детекции ПЦР в реальном времени CFX96 с готовой реакционной смесью с SYBR зеленым (BioRad) и праймерами, раскрытыми в **таблице 2**. Параметры амплификации были установлены как 95°C в течение 30 секунд, 58°C в течение 30 секунд и 72°C в течение 30 секунд (всего 40 циклов). Значения экспрессии генов для каждого образца нормализовали по 18S РНК.

Таблица 2 Приведенные в качестве примера последовательности праймеров для анализа qRT-ПЦР

| Символ гена | Последовательность прямого праймера | Последовательность обратного праймера |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Angptl2     | GGAGGTTGGACTGTCATCCAGAG             | GCCTTGGTTCGTCAGCCAGTA                 |
| Cdkn2b      | ACGCTGCCACTGGAGATTG                 | ATGGGGCTGGGGAGAAAGA                   |
| Il11        | CTGCACAGATGAGAGACAAATTCC            | GAAGCTGCAAAGATCCCAATG                 |
| Ereg        | ATCCGAGGATAACTGTACCG                | TCACATCGCAGACCAGTGTAG                 |
| Irf7        | ATGCACAGATCTTCAAGGCCTGGGC           | GTGCTGTGGAGTGCACAGCGGAAGT             |
| Oas1a       | GAGGTTTCAGCATGAGAGACGTT             | ACACAGTTGGTACCAGTGCTTG                |
| Isg15       | TGGGACCTAAAGGTGAAGATGCTG            | TCAGGCGCAAATGCTTGATCAC                |
| Cxcl10      | GGATCCCTCTCGCAAGGA                  | ATCGTGGCAATGATCTCAACA                 |
| 18s         | GTAACCCGTTGAACCCATT                 | CCATCCAATCGGTAGTAGCG                  |
| Ifnb        | TTGCCATCCAAGAGATGCTCCAGA            | AGAAACACTGTCTGCTGGTGGAGT              |
| Nlrc5       | TGGAGGAGGTCAGTTTGC                  | ATGCTCCTGATTGCTGTGTAG                 |
| CXCL10      | GTGGCATTCAGGAGTACCTC                | GCCTTCGATTCTGGATTACAG                 |
| IFNB        | AGGACAGGATGAACCTTTGAC               | TGATAGACATTAGCCAGGAG                  |

**[0185] РНК-секвенирование (РНК-seq)**

**[0186]** Для РНК-seq цельных тканей тонкого кишечника, тотальную РНК выделяли из 3 тощих кишок WT, 3 тощих кишок DKO<sup>IEC</sup> без опухолей и 3 опухолей DKOIEC. Для РНК-seq эпителиальных клеток кишечника (IEC), тотальную РНК выделяли из нормальных IEC тощей кишки от 3 мышей WT, 4 мышей LKO<sup>IEC</sup>, 3 мышей ZKO<sup>IEC</sup> и 4 мышей DKO<sup>IEC</sup>. Каждый образец выделяли от независимой мыши. Исследования РНК-seq проводили в отделении геномики в SBP Medical Discovery Institute. Кратко, поли(А) РНК выделяли с использованием модуля для магнитного выделения поли(А) мРНК NEBNext®, и снабженные штрих-кодами библиотеки получали с использованием набора для получения библиотек NEBNext® UltraTM Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB, Ipswich MA). Библиотеки пулировали и секвенировали с одного конца (1X75) в Illumina NextSeq 500 с использованием набора с высоким выходом High output V2 (Illumina). Файлы секвенирования Fastq загружали в BaseSpace и обрабатывали с использованием RNAexpress App (Illumina) для получения необработанного количества прочтений для каждого гена. Файлы gene matrix получали с использованием RNAexpress App и сравнивали с использованием сравнения посредством Т-критерия и log2 отношения классов.

**[0187] Биоинформатические анализы**

К необработанным наборам данным экспрессии генов для образцов зубчатых опухолей (GSE4045, GSE76987, GSE79460, GSE43841, GSE36758, GSE46513, GSE45270), CRC (GSE5851, GSE33113) и воспалительного заболевания кишечника (GSE36807, GSE59071, GSE 10616, GSE10714, GSE52746, GSE6731 и GSE9386) получали прямой доступ посредством Gene Expression Omnibus (GEO). Данные RNS-seq из The Cancer Genome Atlas (TCGA) для колоректальной аденокарциномы (образцы опухолей с данными

мРНК (RNA Seq V2), 382 образца опухолей от 379 пациентов) скачивали посредством cBioportal. GenePattern использовали для свертывания файлов gene matrix или для оценки статистической значимости дифференциальной экспрессии генов. Представление экспрессии генов посредством тепловой карты получали с использованием программного обеспечения GENE-E. Анализ обогащения наборов генов (GSEA) проводили с использованием программного обеспечения GSEA 3.0 с 1000 перестановок наборов генов с использованием метрического Т-критерия ранжирования генов, с использованием коллекций h.all.v6.1.symbols (H), c2.all.v6.1.symbols (C2), c6.all.v6.1.symbols (C6) или созданных пользователем наборов генов. В **таблице 3** показан список генов, содержащий гены, ассоциированные с фенотипом микросателлитной стабильности колоректального рака (MSS CRC). В **таблице 4** представлен характерный профиль генов, содержащий гены, подвергнутые повышающей регуляции в MSS CRC, зубчатых очагах и тубулярной или тубулярно-ворсинчатой аденоме. В **таблице 5** представлен характерный профиль генов, содержащий гены, подвергнутые понижающей регуляции в MSS CRC, зубчатых очагах и тубулярной или тубулярно-ворсинчатой аденоме. В **таблице 6** представлен характерный профиль генов, полученный на основании списка из 50 транскриптов генов, с наиболее увеличенным уровнем по РНК-seq в сидячих зубчатых полипах (SSA/P) у пациентов с зубчатым полипозом, по сравнению с контролем. В **таблице 7** представлен характерный профиль генов, полученный на основании списка транскриптов генов со значимым увеличением уровня по РНК-seq в DKO<sup>IEC</sup> IEC, по сравнению с WT IEC ( $\log FC > 1$ ,  $FDR < 0,01$ ).

Таблица 3. Характерный профиль генов для имеющего микросателлитную стабильность (MSS) колоректального рака (CRC)

|          |          |          |            |            |
|----------|----------|----------|------------|------------|
| FLNB     | EPB41L4A | MYCN     | CCDC3      | NTRK2      |
| GLCE     | ACTA2    | PALLD    | CXCL14     | LPAR6      |
| CCDC146  | PHLDB2   | ARAP2    | UCA1       | CHRNA1     |
| GTF2IRD2 | ISM1     | MYOF     | C16orf62   | ANXA1      |
| INADL    | KITLG    | ARHGAP29 | HSPA2      | CAPN8      |
| DOCK5    | PTPRD    | MT1E     | SPATA18    | EDN1       |
| MACF1    | SLC7A8   | BICC1    | MPZL2      | TSPAN2     |
| AKAP7    | RASGRF1  | ABCC3    | FHL2       | KLK10      |
| TTC19    | YPEL1    | NRXN3    | CSGALNACT1 | PDE4D      |
| MAP1B    | UBASH3B  | C19orf45 | RUNX1      | CYP4X1     |
| PTK7     | VSIG2    | SFRP5    | ID4        | ATP8A1     |
| BIK      | MYCL1    | REN      | ACTG1P4    | TWSG1      |
| SHROOM3  | IL8      | NEDD9    | NDP        | MYLK       |
| KLK7     | TCF7     | APCDD1   | CD200      | TGFB3      |
| RHBDL2   | TLR4     | CXCL6    | PDE9A      | TRIM22     |
| PLK2     | ACAA2    | C6orf15  | SLCO1B3    | FSTL1      |
| EPM2AIP1 | TET2     | INPP4B   | TUBA1A     | GTF2IRD2B  |
| AHNAK    | ENPP3    | SGPL1    | ANXA3      | GTF2IRD2P1 |
| PSTPIP2  | ST6GAL2  | KIT      | IL17RD     |            |
| NMU      | CFTR     | TMEM211  | PTCHD4     |            |

Таблица 4. Характерный профиль генов, подвергнутых повышающей регуляции в MSS-CRC, зубчатых очагах и тубулярной или тубулярно-ворсинчатой аденоме

|          |               |           |         |         |          |         |
|----------|---------------|-----------|---------|---------|----------|---------|
| ZIC5     | PCSK7         | CEACAM6   | CCDC68  | FAM214B | SAMD9    | CCRL1   |
| SDR16C5  | FKBP1A-SDCBP2 | ANXA1     | OBFC1   | SLC16A5 | BTLN3    | IL1RN   |
| SLCO1B3  | IL18          | C14orf129 | CA2     | LRRC66  | CD55     | DHRS9   |
| CIDEC    | SLC16A4       | DSG3      | VPS13D  | GCNT3   | INSC     | NR1H4   |
| AHCYL    | ANTXR2        | CAPN8     | ABCG2   | TSPAN1  | SULTIC2  | TCN1    |
| IFI27    | RSAD2         | GPR128    | DUOX2   | ITGA3   | HRSLS2   | BHLHE41 |
| TWSG1    | SERPINB8      | KRT7      | NXF3    | ARL14   | HPGD     | SULT1C3 |
| SSPN     | CLIC5         | SEMG1     | EMP1    | F3      | CHST5    | CLCA4   |
| SLC35A3  | CYP3A4        | LIMA1     | PTPRH   | REG4    | EVI2B    | ANXA10  |
| KRT18P55 | TMEM92        | RHOF      | IL33    | HYAL1   | TM4SF4   | CTSE    |
| SERPINB5 | CRIP1         | KLK10     | MYOF    | MUC17   | FOS      | APOL2   |
| BAK1     | APOL1         | APOL6     | KLHDC7A | GPRC5A  | C2orf88  |         |
| MAP3K5   | PPP1R36       | SLC17A5   | MLPH    | ATP8A1  | HSD17B2  |         |
| C12orf36 | FA2H          | BCAS1     | SGMS2   | XKR9    | MMP1     |         |
| GSDMB    | C19orf33      | FBLIM1    | GJB5    | BTNL8   | PTAFR    |         |
| GJB4     | PLCD3         | TIMP2     | COL17A1 | MMP7    | PI3      |         |
| CARD6    | GBP1          | TFF2      | LIPH    | RGS2    | CXCL11   |         |
| AQP5     | PRDM8         | RARRES3   | KCTD1   | TFF1    | VSIG2    |         |
| AGPAT9   | VILL          | MSLN      | ALOX5   | GPR110  | RAB27B   |         |
| CEACAM5  | DDX60L        | TLR4      | CDKN2B  | PADI2   | C12orf28 |         |

Таблица 5. Характерный профиль генов, подвергнутых понижающей регуляции в MSS-CRC, зубчатых очагах и тубулярной или тубулярно-ворсинчатой аденоме

|         |          |          |          |                    |                    |          |
|---------|----------|----------|----------|--------------------|--------------------|----------|
| CTSE    | DDB2     | CDKN2B   | SYTL1    | TFF1               | KLHDC7A            | MARCH3   |
| TCN1    | PLA2G4A  | CDKN1A   | INPP4B   | ALOX5              | DDX60L             | RNF144A  |
| PDE4D   | KLK10    | AKR1A1   | ATL3     | OSBPL1A            | TXK                | DNAH2    |
| DUSP4   | SDR16C5  | ANXA10   | NTRK2    | ANTXR2             | SREBF1             | PTCHD4   |
| BHLHE41 | CAV2     | KLK11    | CBR4     | RAET1L ///         | SHROOM3            | MXD1     |
| AFAP1L2 | C12orf57 | KITLG    | TNFSF9   | ANXA3              | PDLIM5             | RAET1G   |
| ANXA1   | GPR110   | LDLR     | HOXC6    | TP53I3             | SCG5               | KRT19    |
| TRIB2   | TSPAN1   | COL17A1  | THBDL2   | PPP4R1             | SPRED1             | SGPP2    |
| RAB27B  | EPB41L4A | O3FAR1   | IL8      | FAM169A            | RBBP8              | EGLN3    |
| REG4    | TLR4     | PELI2    | RASSF6   | CAMK2D             | MAP3K6             | CD44     |
| MLPH    | HSD17B2  | RNF144B  | LMO4     | MB21D2             | ULBP2              | GDA      |
| SGMS2   | ZBTB7C   | CD109    | LPIN1    | SEMA3B             | IL18               | FLRT3    |
| TWSG1   | DAPK1    | IER5     | SH3PXD2A | KLF2               | HIST1HIC           | PRDMI    |
| TRIM22  | MYOF     | KRT7     | EMP1     | TRIM16             | KIAA0040           | OXCT1    |
| CA2     | CAPN8    | LGMN     | TLR3     | TTC9               | DST                | SH2D4A   |
| SPATA18 | PRDM8    | SERPINB5 | SYNJ2BP  | CYB5D2             | NXN                | C19orf33 |
| F3      | TTC19    | ANXA2    | PLA2G3   | UGT8               | TRIM16-<br>TRIM16L | ARNT2    |
| AGR3    | TET2     | FRMD4B   | SGCB     | RPL17-<br>C18ORF32 | ZNF488             | RALBP1   |
| ATP8A1  | SBSPON   | VSIG2    | EXPH5    | RUNX1              | SULT1C3            | FUT8     |

|         |         |          |           |          |         |         |
|---------|---------|----------|-----------|----------|---------|---------|
| PALLD   | SMCHD1  | FRAS1    | KIAA1211  | SSPN     | LIF     | MED11   |
| TRIM7   | PASI2   | IL17RD   | C14orf129 | BACE2    | PPP1R9A | PPP2CB  |
| SAMD9   | LYZ     | TNFAIP8  | PNPLA3    | IGFL2    | KLF4    | NRP1    |
| DOCK5   | BLVRA   | CFD      | PLCG2     | GPR126   | S100A13 | ID2     |
| UBASH3B | MT1E    | CCDC68   | TCF7L2    | LCK      | FSTL1   | PSD3    |
| FOS     | SLC01B3 | PHLDB2   | AHNAK     | USP18    | ARAP2   | FGFR2   |
| KCTD1   | CLCA4   | FHL2     | FSCN1     | C2orf88  | ADORA2B | TRIOBP  |
| IL1RN   | IMPACT  | C11orf9  | NUDT6     | FAM63B   | GSN     | PPFIBP1 |
| CRIP1   | ABHD3   | RPS27L   | TGFA      | ARHGAP29 | FAS     | CHST5   |
| PLK2    | CD55    | CCNDBP1  | LPAR6     | SERPINB8 | GCNT3   | CHMP1B  |
| NAPG    | SLC6A14 | TMEM66   | ANXA2     | PLA2G16  | ITGA3   |         |
| INO80C  | SS18    | HPGD     | ZBTB8A    | NMU      | ULBP2   |         |
| PAPSS1  | S100A2  | C12orf28 | PLXNB2    | ANXA2P2  | ULBP2   |         |
| SDC3    | RARRES3 | FAM46A   | GPRC5A    | RAET1L   | ABCD4   |         |

Таблица 6. Характерный профиль генов по РНК-seq, подвергнутых повышающей регуляции в сидячих зубчатых полипах (SSA/P)

|          |         |         |         |          |
|----------|---------|---------|---------|----------|
| MUC5AC   | TFF1    | AQP5    | ST3GAL4 | DPCR1    |
| KLK10    | SLC6A14 | PI3     | SDR16C5 | RAB3B    |
| TM4SF4   | DUOX2   | CLDN1   | ALDOB   | FIBCD1   |
| CTSE     | ANXA10  | S100P   | HOXB13  | NXF3     |
| VSIG1    | HTR1D   | DUSP4   | KRT7    | PDZK1IP1 |
| TFF2     | KLK11   | GJP5    | GJB4    | ZIC5     |
| SERPINB5 | DUOXA2  | SLC6A20 | APOB    | CEACAM18 |
| KLK7     | CDH3    | TRIM29  | PSCA    | CXCL1    |
| REG4     | VNN1    | PRSS22  | CIDEA   | MDF1     |
| MUC17    | SULT1C2 | TACSTD2 | XKR9    | ONECUT2  |

Таблица 7. Транскриптомный характерный профиль ДКО эпителиальных клеток кишечника

|               |          |               |          |               |          |
|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|
| ANXA10        | KCNQ1OT1 | MIRA          | PPL      | AREG          | MVD      |
| CLU           | PCSK9    | MT1H          | KRT7     | ANXA3         | PIR      |
| 4930461G14RIK | MYL7     | EMP2          | PMVK     | NIPAL2        | IL3RA    |
| IL1RN         | HLA-A    | DDAH1         | C15orf62 | APOBEC2       | LSS      |
| ANXA1         | AIM2     | HOXA7         | HOXA3    | CAPN2         | TMSB10   |
| ETV4          | CES1     | BTBD19        | MACC1    | SLAMF9        | C10orf99 |
| NES           | CAPG     | FDPS          | LRP8     | KHDC1         | SLC45A3  |
| MT1E          | SYT8     | ANXA5         | ACAT2    | GSTA3         | PLAUR    |
| MBOAT1        | PARP3    | LPCAT4        | PAQR8    | SPRY4         | GSTA4    |
| AKR1B10       | TLR4     | LY6A          | MIF      | CLMP          | CD9      |
| SPTSSB        | TCF23    | MAPK11        | PLAT     | LY6G6E        | TSTD1    |
| ECSCR         | HAUS7    | IIGP1         | GBP2     | PRDX6         | ANKRD22  |
| LRFN4         | AK4      | KRT19         | N4BP3    | SYNGR1        | FDFT1    |
| ALDOC         | ZNF185   | FA2H          | ADAMTS1  | TSPAN1        | TNNI2    |
| RBPMS         | GCNT1    | ID11          | C17orf96 | ANKRD37       | ELAVL2   |
| CNN2          | RSU1     | SH3TC1        | GLIPR1   | SIGMAR1       | GSTA5    |
| R3HDMML       | S100A16  | NT5DC3        | SLIT2    | FAM126A       | GP1BB    |
| ATF5          | HOXA2    | D930048N14RIK | ADAM8    | 2210407C18RIK | BEND5    |
| DPYSL3        | FAM162A  | MAGI2         | BTBD3    | SQLE          | IGFBP4   |

|                |               |               |               |               |               |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| DDIT4          | IGF2BP3       | ACSL4         | MYEF2         | PDX1          | NR4A1         |
| 9230102K24 RIK | TRIP6         | ANXA9         | VSTM2L        | ARHGAP44      | IMPDH1        |
| UFSP1          | PLK3          | TULP3         | TBC1D9        | NCMAP         | NQO1          |
| PRR5-ARHGAP8   | NBEAL2        | FBXW9         | BTC           | PIEZO1        | CEACAM4       |
| PPARG          | CERS5         | CCDC134       | FAR1          | LDLR          | SOCS5         |
| KRT18          | ARNT2         | CTSE          | CBR3          | 4930546K05RIK | POP1          |
| AVPI1          | FAM57A        | GBP8          | FAM43A        | S100A14       | C17orf97      |
| 1110038B12RIK  | MTAP          | KRT23         | OPN3          | RRP1B         | HAGHL         |
| UBE2E2         | BNIP1         | CD276         | SMTNL1        | RRAS          | LAMC1         |
| NHP2           | LAMC2         | PITPNM3       | PIP           | ZNF296        | HMGN1         |
| BGLAP          | RENB          | SRM           | CSF1          | CHML          | GM766         |
| CD44           | GUSB          | NSDHL         | MS4A15        | MAPT          | AIF1L         |
| TMEM184C       | MMP14         | 3930402G23RIK | TNIP3         | MYCN          | TMEM237       |
| GSTA5          | LY6D          | ALDOA         | BAIAP2        | DCBLD2        | MYO15A        |
| THBS1          | ABCC4         | SLC2A1        | CLDN2         | CELA1         | ADRB3         |
| CYP51A1        | HOXA5         | PHLDA2        | PHGDH         | SLC2A6        | HDDC2         |
| CKB            | GRHL3         | PPFIBP1       | TGFB2         | PQLC3         | CTSH          |
| FADS3          | S100A6        | PFKL          | OXCT1         | MDF1          | ABCC8         |
| PGAP1          | CXCL9         | CA9           | RNF157        | RGCC          | SLC37A2       |
| C12orf75       | MVK           | MATN2         | GSTA5         | CES2          | PENK          |
| FGFR4          | SCD           | ACACA         | AACS          | S100A9        | 4930526115RIK |
| CSRP1          | LYSMD2        | SLC29A1       | ECM1          | DUSP3         | THEM6         |
| PRSS16         | INSIG1        | CLCN1         | HK1           | MID1IP1       | FHDC1         |
| FAM3D          | STARD5        | ETV5          | NEK8          | PMM1          | RBP1          |
| TRIM35         | NKAIN1        | SSSCA1        | FLNA          | LONRF1        | SNAI3         |
| SETD4          | SCMH1         | FAM13A        | THOP1         | AKR1C13       | TFRC          |
| DYNLL1         | CCDC86        | RHBDF1        | WWTR1         | KIAA1841      | GSPT2         |
| DMWD           | GSTP1         | F3            | MNS1          | STX1A         | CA8           |
| FASN           | TNF           | STEAP1        | ARHGAP40      | RTN4          | TMED1         |
| ADAT3          | NAP1L1        | NT5C2         | NOC4L         | RBMS1         | SGCB          |
| PSAT1          | MFGE8         | FAM101B       | NOX1          | PCOLCE        | TMEFF1        |
| SPATA6         | HUNK          | SNHG3         | S100B         | 1500011B03RIK | LAMA5         |
| ABCC1          | EIF2B3        | CEACAM4       | EMP3          | GM11974       | TRAIP         |
| ID4            | FCHO1         | C630043F03R1K | SUSD1         | ZNF593        | SLC20A1       |
| VILL           | SNHG5         | PRRG4         | TTR           | WDR31         | KIAA1107      |
| PINX1          | HPDL          | SH3PX2B       | HEBP2         | SLC1A4        | SUN3          |
| CCNE1          | 1500009C09RIK | PAOX          | 2010204K13RIK | MTHFD1L       | RBM3          |
| CYP2D6         | S100A8        | METTL22       | PHF21B        | PLA2G2E       | TNFSF9        |
| MTL5           | BAG2          | CD6           | GRASP         | B9D1          |               |
| MSTO1          | RARB          | SPATA24       | CHCHD6        | SLC29A2       |               |
| RPS6KL1        | ILDR1         | RRM2          | ACHE          | ARL6          |               |

#### [0188] Анализ выживаемости

[0189] Образцы от пациентов с CRC (GSE5851, GSE33113, TCGA) сегрегировали на четыре подгруппы:  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$ ,  $PRKCI^{Hi}PRKCZ^{Low}$ ,  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Hi}$  и  $PRKCI^{Hi}PRKCZ^{Hi}$ , на основании экспрессии  $PRKCI$  и  $PRKCZ$ . Медианное значение экспрессии каждого гена использовали в качестве порога отсечения. Группы  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$  и  $PRKCI^{Hi}PRKCZ^{Hi}$  сравнивали посредством анализов GSEA или выживаемости. Для получения кривых Каплана-Мейера для пациентов из TCGA, обрабатывали клинические данные и данные экспрессии генов для 369 пациентов с полной информацией об общей выживаемости (OS), и показатель 5-летней OS сравнивали между группами  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$  (n=88) и  $PRKCI^{Hi}PRKCZ^{Hi}$  (n=87). Для GSE5851,



показатель выживаемости без заболевания (DFS) сравнивали между группами  $PRKCI^{Low}PRKCZ^{Low}$  (n=27) и  $PRKCI^{Hi}PRKCZ^{Hi}$  (n=27).

#### [0190] Статистический анализ

[0191] Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM. Статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism 7. Значимые различия между группами определяли с использованием Т-критерия Стьюдента (двустороннего непарного), когда данные соответствовали нормальному распределению, тестируемому посредством теста Д'Агостино. Если данные не соответствовали этому критерию, использовали критерий Манна-Уитни. Различия встречаемости опухолей анализировали посредством критерия хи-квадрат (фигура 4J). Различия в графиках Каплана-Мейера анализировали посредством логарифмического рангового критерия (Мантеля-Кокса) (фигура 1C, 7F, S7E). Различия в окрашивании аPKC для образцов от человека (фигура 7B) анализировали посредством проведения ANOVA для множественных сравнений (критерий Крускала-Уоллиса). Значение  $p$  обозначает различия между интенсивностью сигнала (сильный/умеренный против слабый/отрицательный) для нормы, SSA/P и ТА. Различия в долях пациентов с CRC в подтипах CRC CCS1, CCS2 или CCS3, в соответствии с экспрессией мРНК аPKC анализировали посредством точного критерия Фишера для CCS3 против CCS1/CCS2 (фиг.7, панель E, фиг. 14, панель C, фиг. 14, панель D). Уровень значимости для статистического тестирования устанавливали на  $p < 0,05$ .

#### **Пример 10. Характеризация эффектов гиалуронидазы PVHA в новой модели колоректального рака на мышах**

[0192] Для клеток эпителиальных опухолей в модели зубчатых очагов ( $DKO^{IEC}$ ) на мышах показаны увеличенные уровни CD44 и строма, высоко активированная, экспрессирующая гиалуронан (HA). HA является лигандом для CD44, представляющего собой рецептор стволовых клеток. HA вносит вклад в роль стромы в качестве барьера, который делает иммунотерапию неэффективной для некоторых пациентов. Проведен эксперимент для понимания эффектов ингибитора HA в модели на мышах  $DKO^{IEC}$  для определения того, происходит ли ингибирование онкогенеза без дополнительного лечения или при совместном лечении с использованием терапии против PD-L1.

[0193] Получают мышей  $Prkcz^{fl/fl}$ ,  $Prkci^{fl/fl}$ ,  $Apc^{fl/fl}$ , Villin-cre и Lgr5-EGFP-ires-creERT2 (Lgr5-creERT2). Мышей  $Prkci^{fl/fl}$  и  $Prkcz^{fl/fl}$  скрещивают с мышами Villin-cre для получения линии мышей с делециями в обеих аPKC ( $DKO^{IEC}$ ) в IEC. Определяют генотипы мышей  $DKO^{IEC}$ . Приведенные в качестве примера способы определения генотипа включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

**[0194]** Мышей DKO<sup>IEC</sup> подвергают лечению дважды в неделю, начиная с возраста 16 недель, посредством лечения с использованием ПЭГ-воргиалуронидазы альфа (PVHA) и/или антитела против PD-L1 (например, моноклонального антитела против PD-L1) в течение 4 недель. Контрольных мышей DKO<sup>IEC</sup> подвергают обработке с использованием носителя дважды в неделю, начиная с возраста 16 недель, в течение 4 недель. При подвергании совместному лечению с использованием PVHA и антитела против PD-L1, PVHA вводят мышам DKO<sup>IEC</sup> за 24 часа до подвергания лечению с использованием антитела против PD-L1. В Таблице 8 показаны приведенные в качестве примера режимы лечения для 6 групп мышей DKO<sup>IEC</sup>.

**Таблица 8. Приведенные в качестве примера режимы лечения мышей DKO<sup>IEC</sup>**

| Группа | # животных | Тестируемый препарат 1 (мг/кг) | Тестируемый препарат 2 (мг/кг) |
|--------|------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 1      | 10         | Носитель                       | Носитель                       |
| 2      | 10         | PVHA (0,0375)                  | Носитель                       |
| 3      | 10         | PVHA (1,0)                     | Носитель                       |
| 4      | 10         | Носитель                       | Антитело против PD-L1 (10,0)   |
| 5      | 10         | PVHA (0,0375)                  | Антитело против PD-L1 (10,0)   |
| 6      | 10         | PVHA (1,0)                     | Антитело против PD-L1 (10,0)   |

**[0195]** Мышей DKO<sup>IEC</sup> подвергают эвтаназии для оценки в различных конечных точках противоопухолевой активности в период времени после конечной обработки. Пригодные периоды времени включают, но без ограничения, 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 10 часов, 15 часов, 20 часов, 1 сутки, 1,5 суток, 2 суток или 3 суток, после конечной обработки. Анализируют показатели конечных точек противоопухолевой активности, включая оценку опухолей в баллах (например, количество, размер, патологическую характеристику, встречаемость инвазии), окрашивание H&E, окрашивание HA, окрашивание CD44, окрашивание CD8. Проводят проверку микросателлитной нестабильности (MSI) посредством детекции присутствия или отсутствия пяти маркеров микросателлитных повторов. Пригодный анализ для детекции присутствия или отсутствия пяти маркеров микросателлитных повторов включает ПЦР. Образцы плазмы получают от мышей DKO<sup>IEC</sup> и оценивают по присутствию или отсутствию HA/биомаркеров.

#### **Пример 11. Характеризация эффектов PVHA гиалуронидазы в новой модели колоректального рака на мышях**

**[0196]** Лечение мышей с использованием PVHA: Для эксперимента специфического для гиалуронидазы ингибирования, мышам aPKC-DKO<sup>IEC</sup> в возрасте 11 недель инъектировали внутривенно дважды в неделю низкую дозу 0,0375 мг или высокую дозу 0,2 мг/кг PVHA (Halozyne) в течение 3 недель, пока их не умерщвляли. Контрольных мышей подвергали обработке с использованием носителя.

[0197] Гистология, иммуногистохимия: Органы выделяли, промывали ледяным PBS, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение ночи при 4 °C, дегидратировали и погружали в парафин. Для трихромного окрашивания по Массону, срезы (5 мкм) депарафинизировали, регидратировали и затем окрашивали с использованием набора для трихромного окрашивания (по Массону) (Sigma-Aldrich, #HT15) следуя инструкциям производителя. Для окрашивания гиалуронана, срезы (5 мкм) депарафинизировали, регидратировали и инкубировали с биотинилированным связывающим гиалуронан белком (Millipore Sigma, #385911) в течение ночи при 4°C, с последующей инкубацией с конъюгатом стрептавидина с HRP (Invitrogen, #434323). Окрашивание проявляли с использованием диаминобензидина. Для окрашивания CD8, срезы (5 мкм) депарафинизировали, регидратировали, и затем обрабатывали для демаскировки антигена (цитрат, pH6) с нагреванием. После блокирования в белковых блокирующих бессывороточных растворах (DAKO), ткани инкубировали с первичным антителом (антитело против CD8 мыши (BD, #557654) в течение ночи при 4°C с последующей инкубацией с биотинилированным вторичным антителом. Реакции эндогенной пероксидазы останавливали в 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в воде в течение 10 мин при комнатной температуре. Антитела визуализировали с использованием комплекса авидин/биотин (Vectastain Elite; Vector Laboratories) с использованием диаминобензидина в качестве хромогена.

[0198] Для зубчатых опухолей от мышей aPKC-DKO<sup>IEC</sup> показана увеличенная стромальная активация, и одним из главных стромальных компонентов является гиалуронан. **Фиг. 17, панель А** иллюстрирует дизайн эксперимента для лечения PVHA у мышей aPKC-DKO<sup>IEC</sup>, начиная с недели 11. На неделе 14, подвергнутых лечению мышей умерщвляли, и количественно оценивали общее количество зубчатых полипов и карцином, и встречаемость инвазивного рака. Как показано на **фиг. 17, панель В**, лечение этих мышей с использованием гиалуронидазы (PVHA, Halozyme) супрессировало прогрессирование SSA/P до стадии аденокарциномы, и особенно уменьшало встречаемость инвазивного рака как при низкой, так и при высокой дозе PVHA (n: Носитель=10, подвергнутые лечению низкой дозой PVHA=12, подвергнутые лечению высокой дозой PVHA=9).

[0199] Лечение PVHA также уменьшало количество, размер и нагрузку опухолей у мышей aPKC-DKO<sup>IEC</sup>. Как показано на **фиг. 18, панель А**, макроскопические изображения тонких кишечника aPKC-DKO<sup>IEC</sup>, подвергнутых лечению в эксперименте с PVHA, получали и анализировали по количеству опухолей, среднему размеру и нагрузке опухолей. Стрелка обозначает опухоль (**фиг. 18, панель А**). На **фиг.18, панели В-С**

показаны графики, иллюстрирующие количественную оценку общего количества опухолей, среднего размера и нагрузки опухолей (**фиг. 18, панель В**), и стратификация количества опухолей тонкого кишечника, в соответствии с размером, в эксперименте с PVHA (**фиг. 18, панель С**; n: Носитель=10, подвергнутые лечению низкой дозой PVHA=12, подвергнутые лечению высокой дозой PVHA =9). Как низкая, так и высокая доза при лечении PVHA являлись эффективными для уменьшения опухолевой нагрузки значительно и статистически значимым образом.

**[0200]** Лечение с использованием PVHA у мышей aPKC-DKO<sup>IEC</sup> также приводило к уменьшенному отложению гиалуронана (**фиг. 19**) и коллагена (**фиг. 20**) в опухолях. На **фиг. 19** показано окрашивание гиалуронана опухолей тонкого кишечника от мышей DKO<sup>IEC</sup>, подвергнутых лечению с использованием низкой дозы PVHA (0,0375 мг/кг) (n=5) или носителя (n=5), и на **фиг. 20** показано трихромное окрашивание по Массону опухолей тонкого кишечника от мышей DKO<sup>IEC</sup>, подвергнутых лечению с использованием PVHA (n=5) или носителя (n=5).

**[0201]** Кроме того, лечение опухолей PVHA может восстанавливать инфильтрацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток в опухолях. На **фиг. 21** показано окрашивание CD8 тонкого кишечника для тонкого кишечника из участков опухолей тонкого кишечника от мышей DKO<sup>IEC</sup>, подвергнутых лечению с использованием PVHA (n=5) или носителя (n=5). Следует учитывать, что количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток, окрашенных в ткани опухоли, было значительно увеличено в тканях, подвергнутых лечению с использованием PVHA, по сравнению с обработанными носителем образцами, подразумевая увеличенную инфильтрацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток в опухоли при лечении PVHA. В совокупности, эти результаты показывают, что зубчатый рак можно ослаблять посредством супрессии отложения гиалуронана с использованием ингибитора гиалуронана, PVHA.

**[0202]** На протяжении настоящего описания, различные варианты осуществления представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона присутствует просто для удобства и краткости, и его не следует рассматривать как жесткое ограничения объема никаких вариантов осуществления. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретно описывающее все возможные поддиапазоны, так же как любые индивидуальные числовые значения внутри этого диапазона до десятой части единицы нижнего предела, если контекст явно не требует иного. Например, описание диапазона, например, от 1 до 6, следует рассматривать как включающее конкретно описанные поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., так же как индивидуальные числовые значения внутри этого диапазона, например, 1,1, 2, 2,3, 5, и 5,9. Это применимо вне зависимости от

ширины диапазона. Верхний и нижний пределы этих промежуточных диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, а также включены в объект изобретения, ограниченный любым конкретно исключенным пределом в указанном диапазоне. Когда указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в изобретение, если контекст явно не требует иного.

**[0203]** Терминология, применяемая в настоящем документе, предназначена только для цели раскрытия конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения никакого варианта осуществления. Как применяют в настоящем документе, формы единственного числа предназначены также для включения форм множественного числа, если контекст явно не указывает на иное. Кроме того, следует понимать, что термины «содержит» и/или «содержащий», при применении в настоящем документе, обозначают присутствие указанных признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов и/или компонентов, но не препятствуют присутствию или добавлению одного или нескольких из других признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов, компонентов и/или их групп. Как применяют в настоящем документе, термин «и/или» включает все без исключения комбинации одного или нескольких из ассоциированных перечисленных пунктов.

**[0204]** В то время как предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения показаны и раскрыты в настоящем документе, специалисту в данной области очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены в настоящее время очевидны специалисту в данной области без отклонения от изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, раскрытым в настоящем документе, можно применять в практическом осуществлении изобретения. Подразумевают, что следующие ниже пункты формулы изобретения определяют объем изобретения, и что способы и структуры в пределах объема этих пунктов формулы изобретения и их эквивалентов охвачены таким образом.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения зубчатой опухоли у субъекта, предусматривающий:  
введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана, причем биологический образец от субъекта имеет более низкие уровни экспрессии РКС $\zeta$  и РКС  $\lambda/1$ , по сравнению с уровнями экспрессии РКС $\zeta$  и РКС  $\lambda/1$  у индивидуума без зубчатой опухоли.
2. Способ по п.2, в котором ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу.
3. Способ по любому из пп. 1-2, в котором ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ингибитор связывания или агонизма гиалуронана-CD44.
4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антагонист CD44.
5. Способ по п.4, в котором ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит антитело - ингибитор активности или экспрессии CD44.
6. Способ по п.4, в котором, ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит малую молекулу - ингибитор активности или экспрессии CD44.
7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит агонист активности или экспрессии гиалуронидазы.
8. Способ по п.7, в котором ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит экзогенную гиалуронидазу.
9. Способ по п.7, в котором ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит рекомбинантную гиалуронидазу.
10. Способ по п.7, в котором ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA).
11. Способ по п.10, в котором терапевтически эффективное количество PVHA составляет от 0,01 до 0,5 мг/кг.
12. Способ по любому из пп. 10-11, в котором терапевтически эффективное количество PVHA составляет от 0,02 до 0,4 мг/кг.
13. Способ по пп. 10-12, в котором ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA) вводят субъекту в качестве монотерапии.
14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения онкогенеза по меньшей мере на 30% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом.

15. Способ по п.14, в котором онкогенез количественно оценивают с использованием подсчета зубчатых полипов и карцином.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения опухолевой нагрузки по меньшей мере на 20% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом.

17. Способ по п.16, в котором опухолевую нагрузку количественно оценивают с использованием по меньшей мере одного из суммарного количества опухолей, среднего размера опухолей или нагрузки опухолей.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения гиалуронана в опухоли.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения коллагена в опухоли.

20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани.

21. Способ по любому из пп. 1-20, в котором низкие уровни экспрессии РКС $\zeta$  и РКС  $\lambda/1$  включают низкий уровень транскрипции, низкий уровень трансляции или низкий уровень активности РКС $\zeta$  и РКС  $\lambda/1$ .

22. Способ лечения зубчатой опухоли у субъекта, предусматривающий:  
введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора активности или экспрессии гиалуронана.

23. Способ по п.22, в котором ингибитор активности или экспрессии гиалуронана содержит ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA).

24. Способ по п.23, в котором ПЭГ-воргиалуронидазу альфа (PVHA) вводят субъекту в качестве монотерапии.

25. Способ по любому из пп. 23-24, в котором терапевтически эффективное количество PVHA составляет от 0,01 до 0,5 мг/кг.

26. Способ по любому из пп. 23-25, в котором терапевтически эффективное количество PVHA составляет от 0,02 до 0,4 мг/кг.

27. Способ по любому из пп. 23-26, в котором терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения онкогенеза по меньшей мере на 30% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом.

28. Способ по любому из пп. 22-27, в котором биологический образец от субъекта имеет более низкие уровни экспрессии РКС $\zeta$  и РКС  $\lambda/1$ , по сравнению с уровнями экспрессии РКС $\zeta$  и РКС  $\lambda/1$  у индивидуума без зубчатой опухоли.

29. Способ по любому из пп. 22-28, в котором терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения онкогенеза по меньшей мере на 30% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом.

30. Способ по п.29, в котором онкогенез количественно оценивают с использованием подсчета зубчатых полипов и карцином.

31. Способ по любому из пп. 22-30, в котором терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения опухолевой нагрузки по меньшей мере на 20% у субъекта, по сравнению с не подвергнутым лечению индивидуумом.

32. Способ по п.31, в котором опухолевую нагрузку количественно оценивают с использованием по меньшей мере одного из суммарного количества опухолей, среднего размера опухолей или нагрузки опухолей.

33. Способ по любому из пп. 22-32, в котором терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения гиалуронана в опухоли.

34. Способ по любому из пп. 22-33, в котором терапевтически эффективное количество ингибитора активности или экспрессии гиалуронана является достаточным для уменьшения отложения коллагена в опухоли.

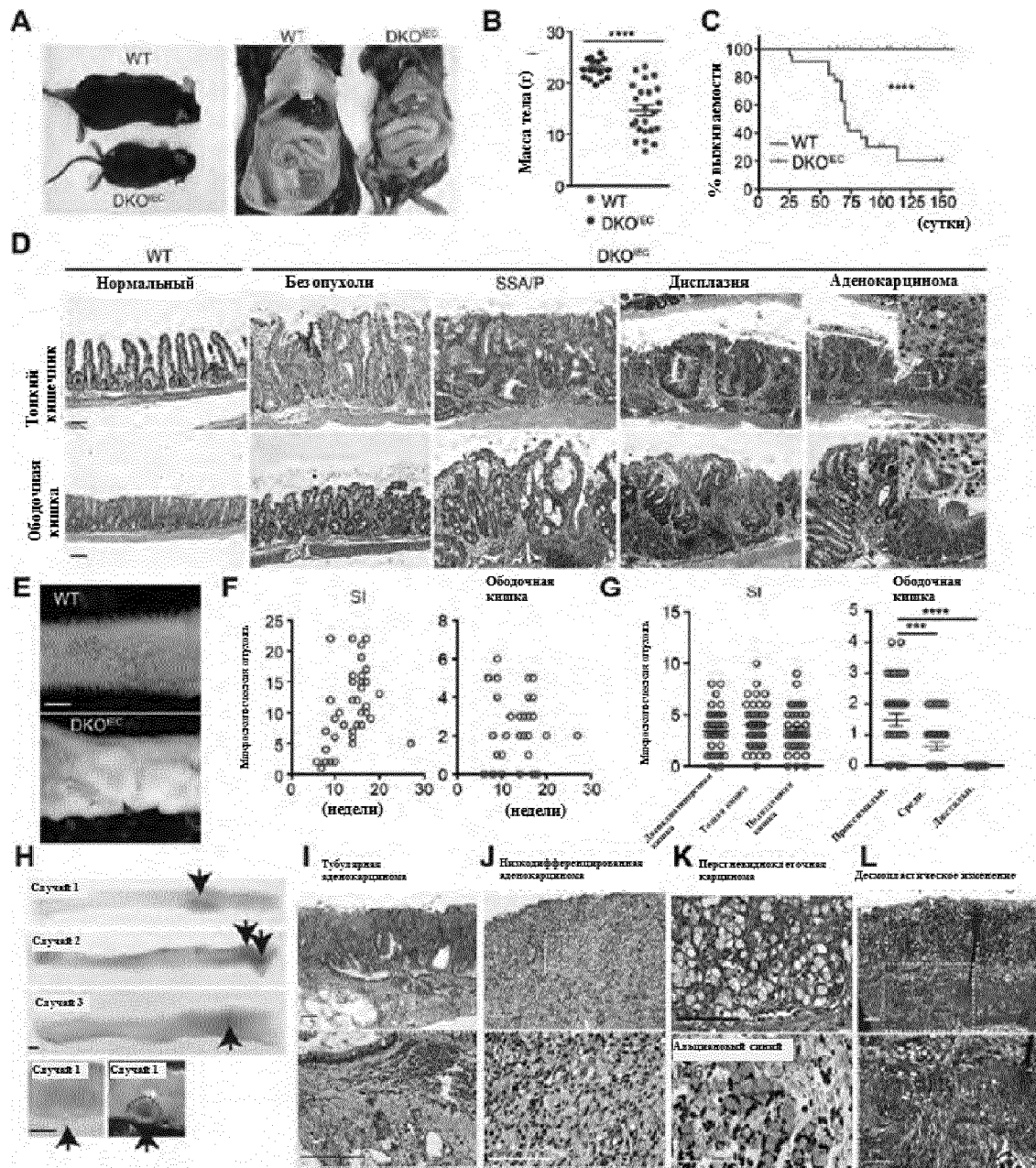
35. Способ по любому из пп. 28-34, в котором биологический образец содержит кровь, плазму крови, сыворотку или биоптат ткани.



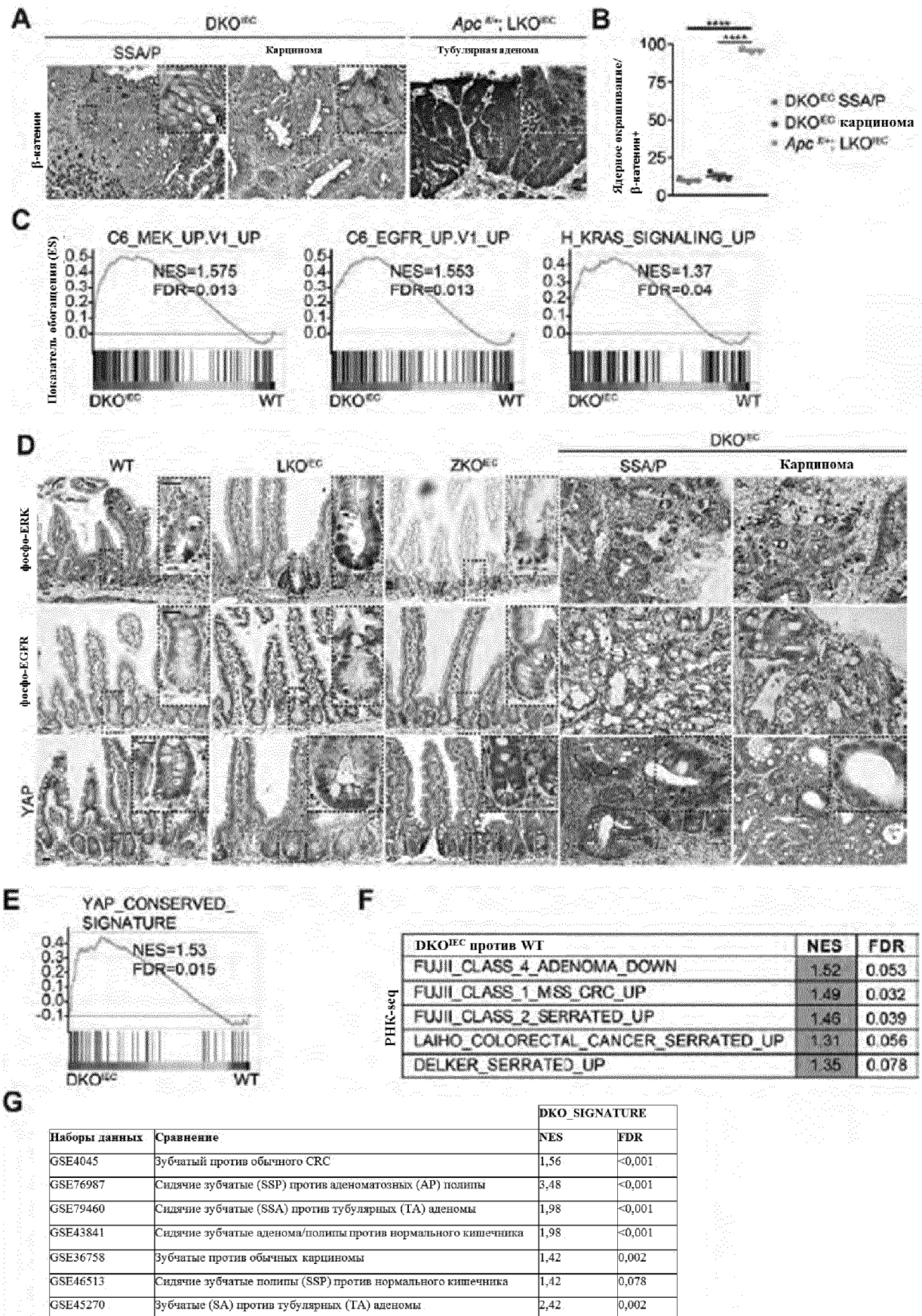
# ФИГУРЫ

1/21

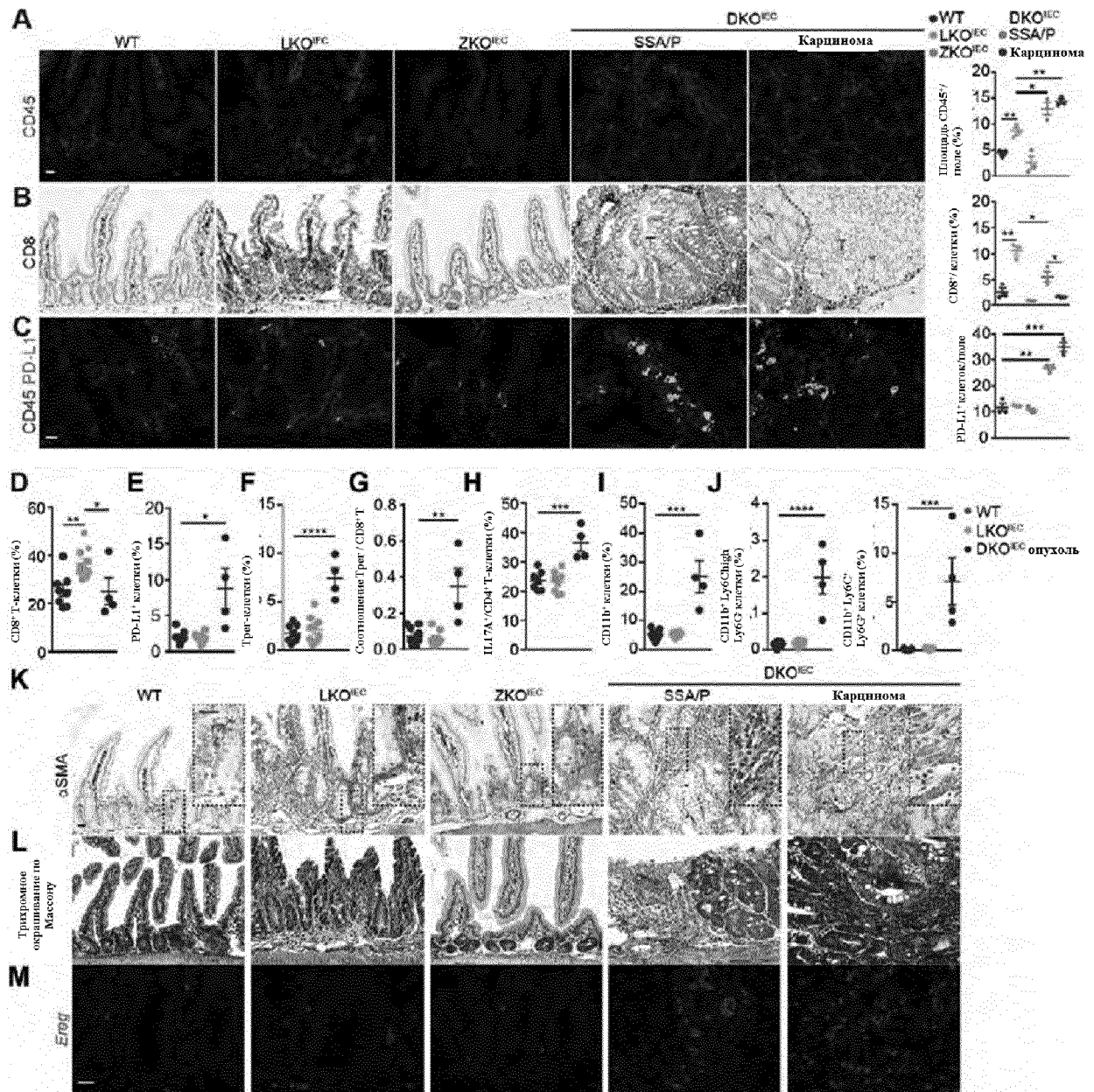
Фиг. 1



Фиг. 2

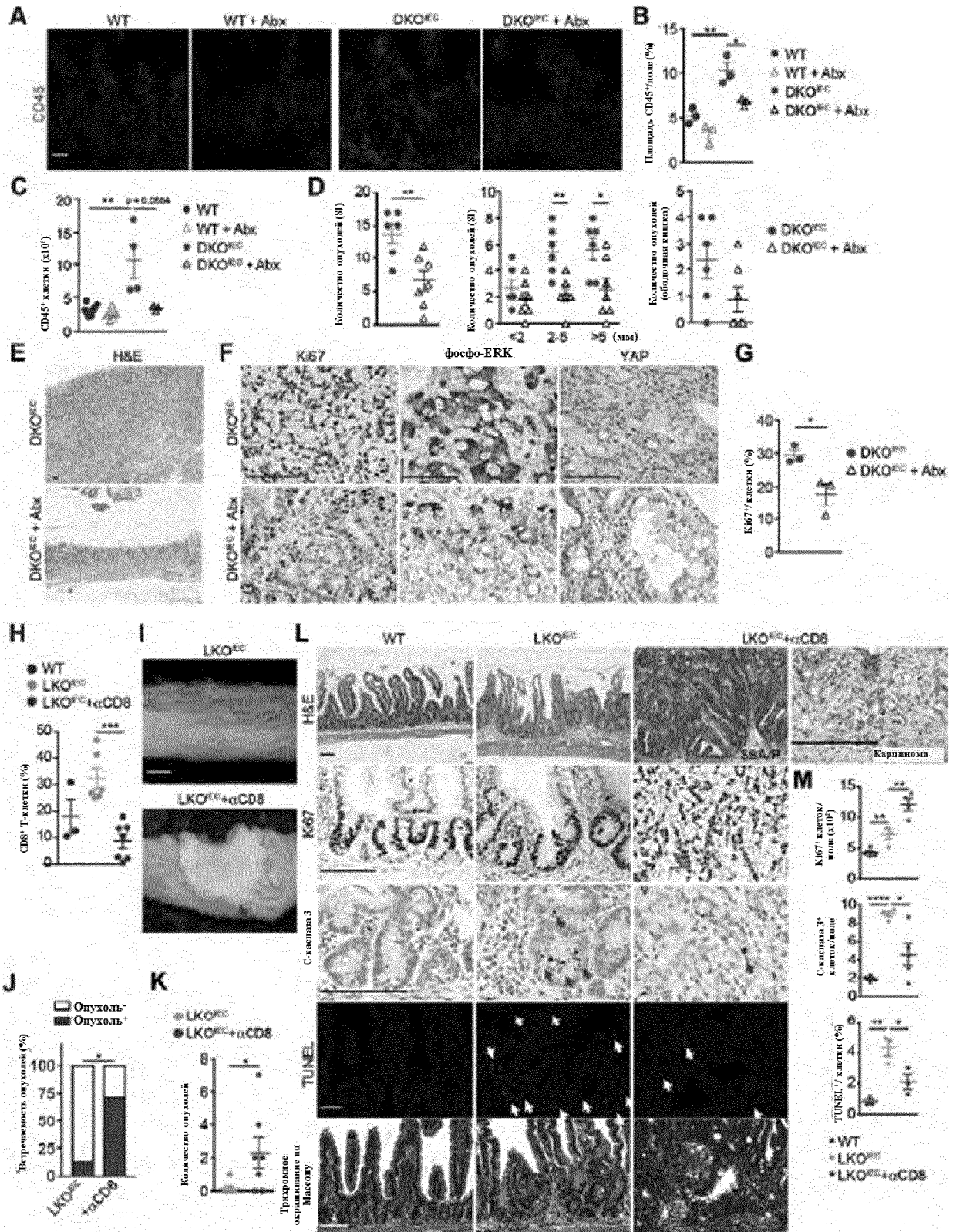


Фиг. 3



4/21

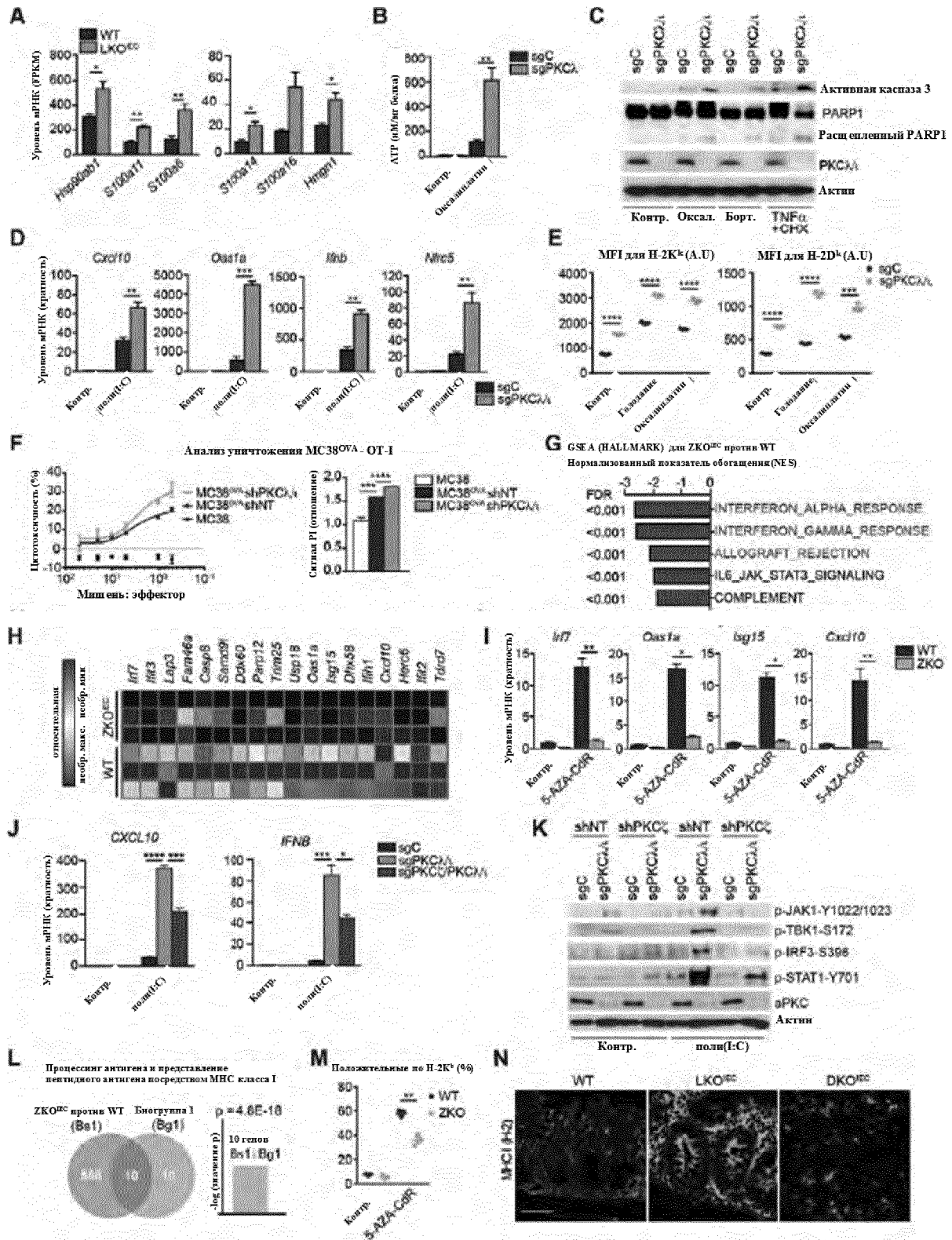
Фиг. 4



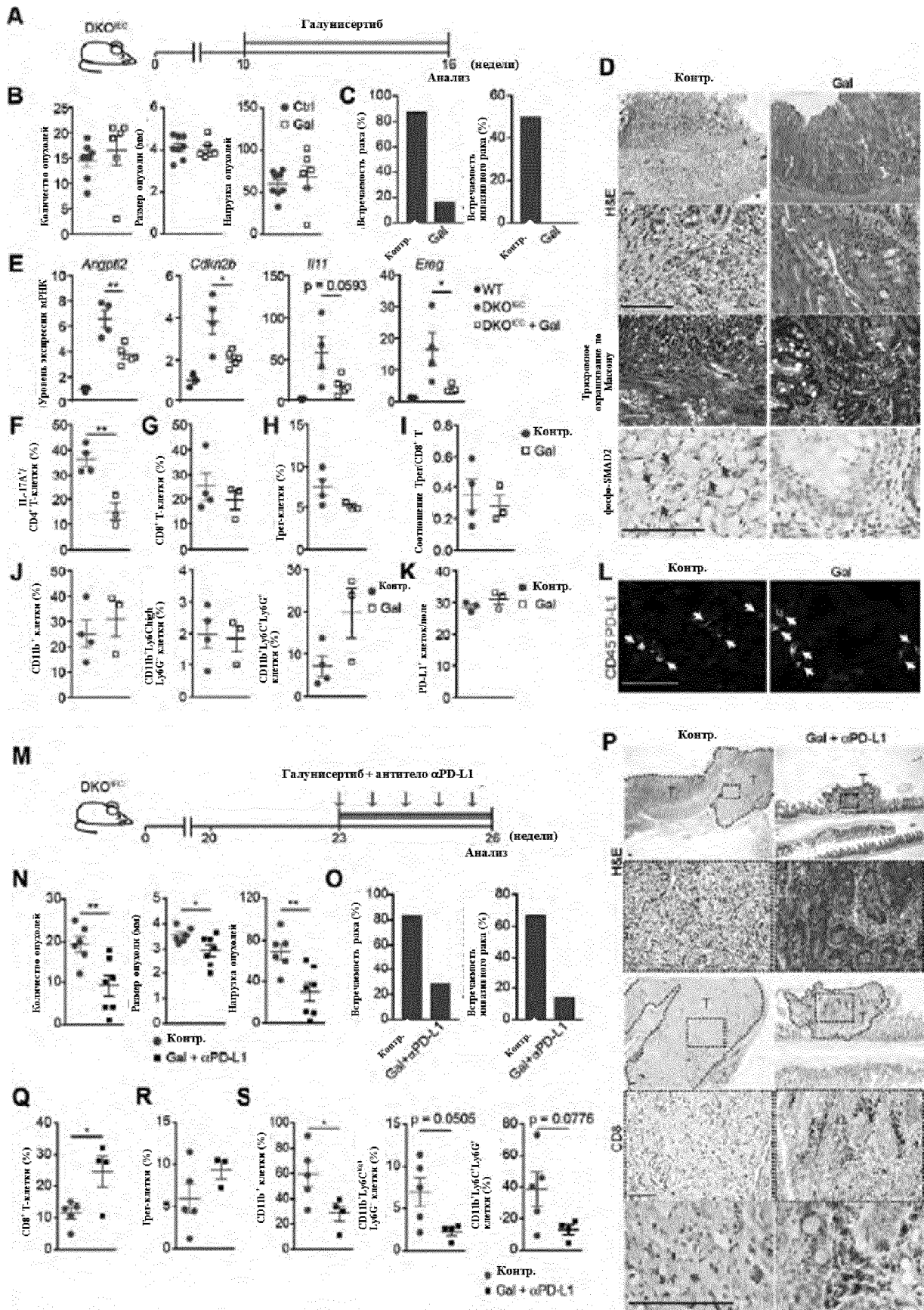


5/21

Фиг. 5

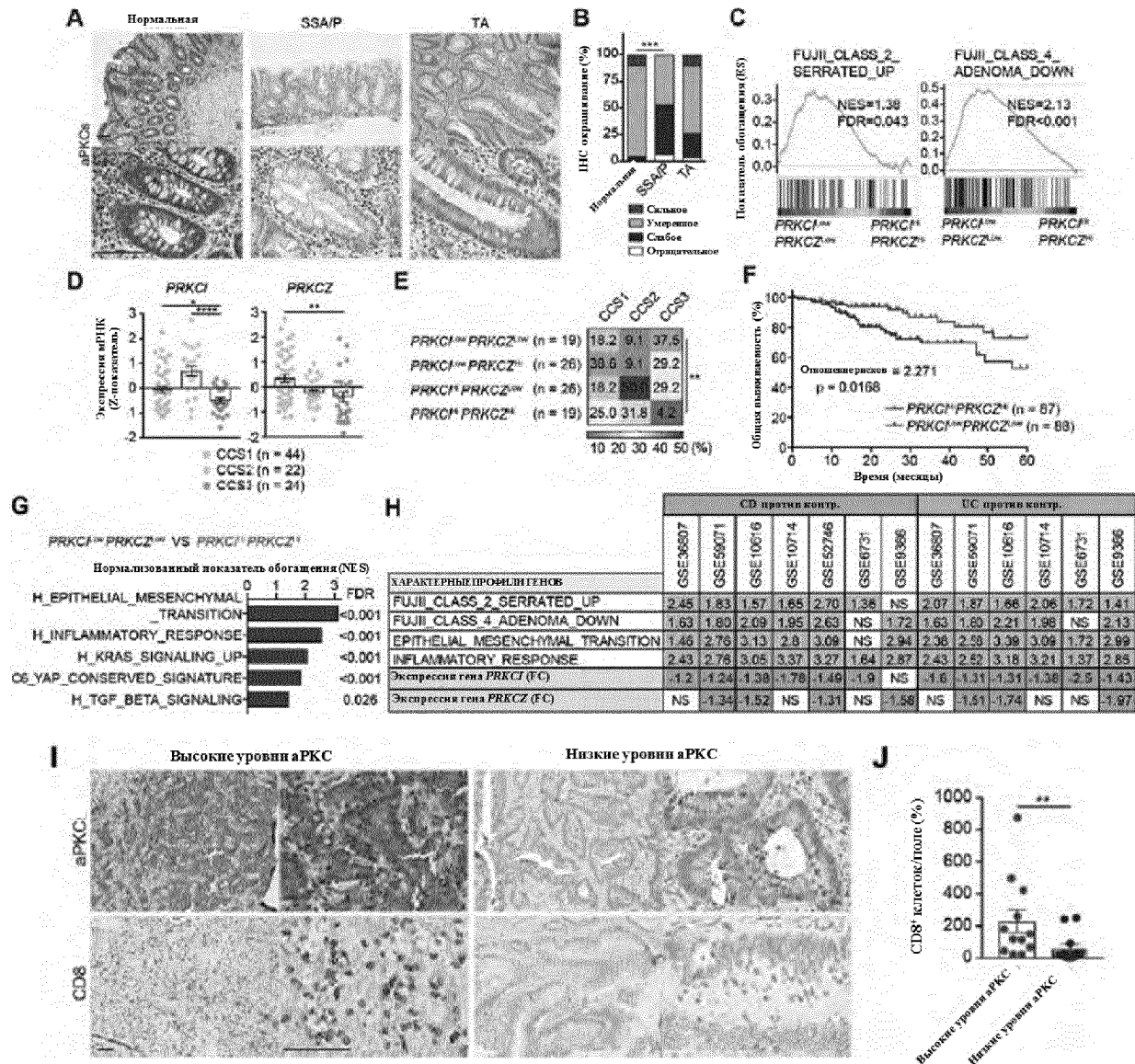


Фиг. 6

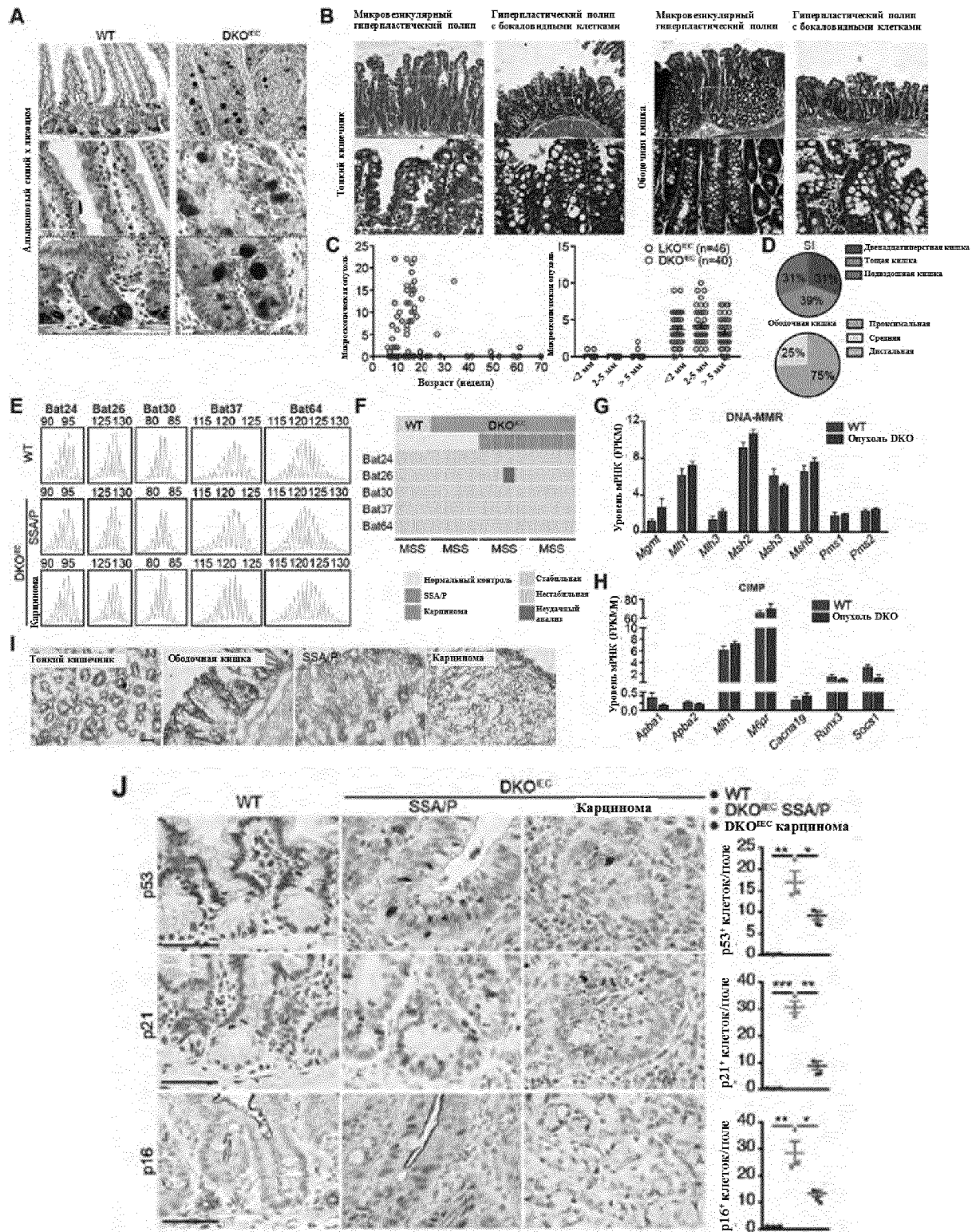


7/21

Фиг. 7

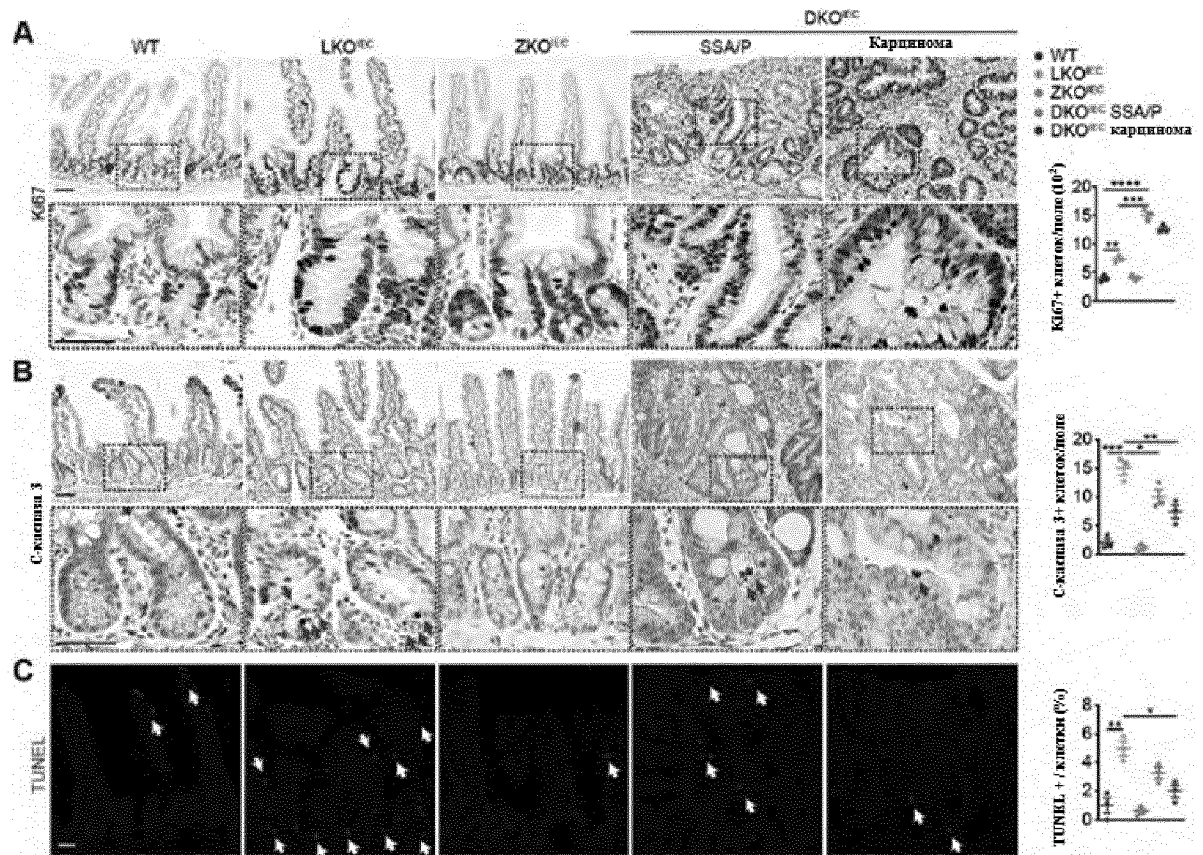


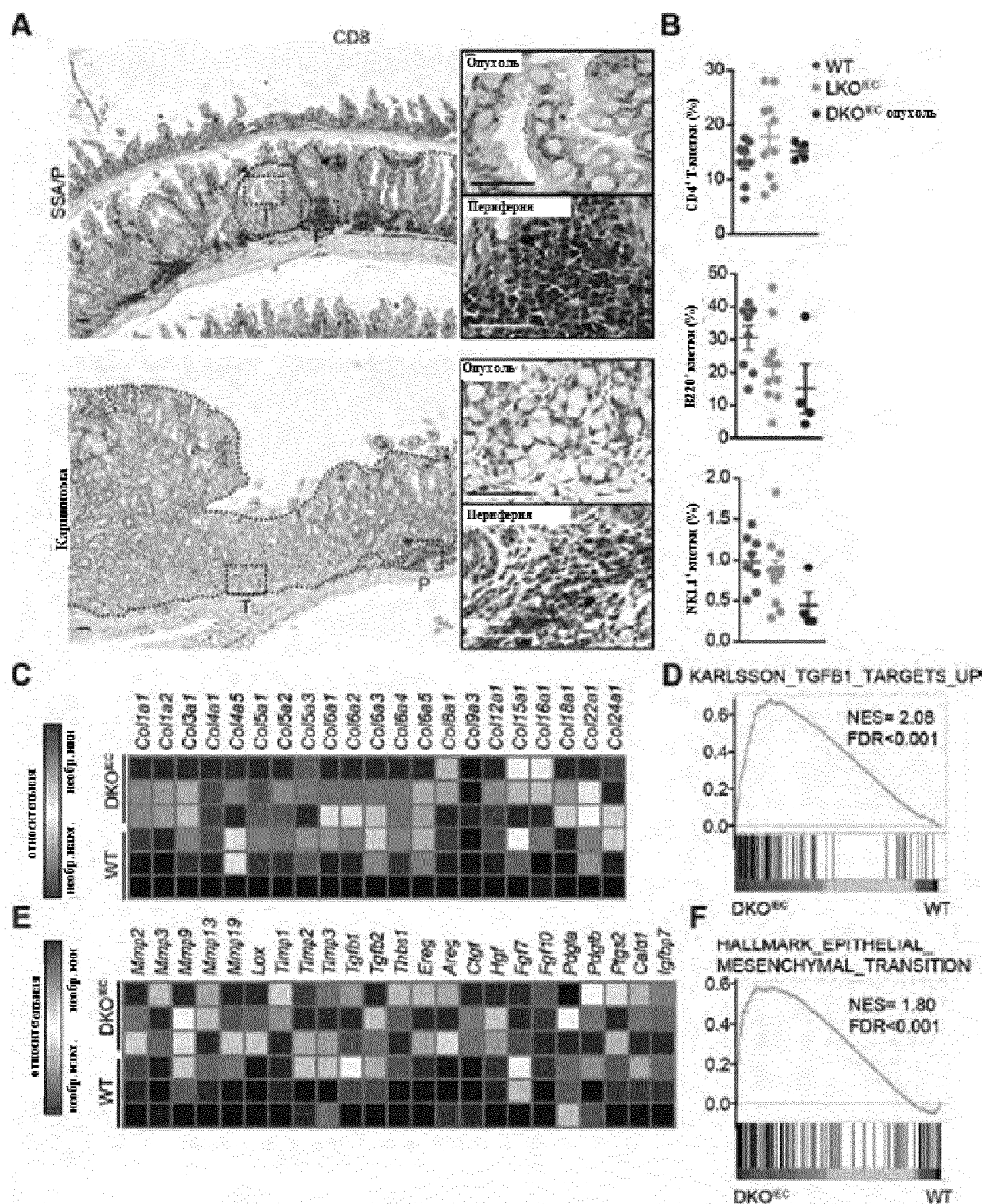
Фиг. 8



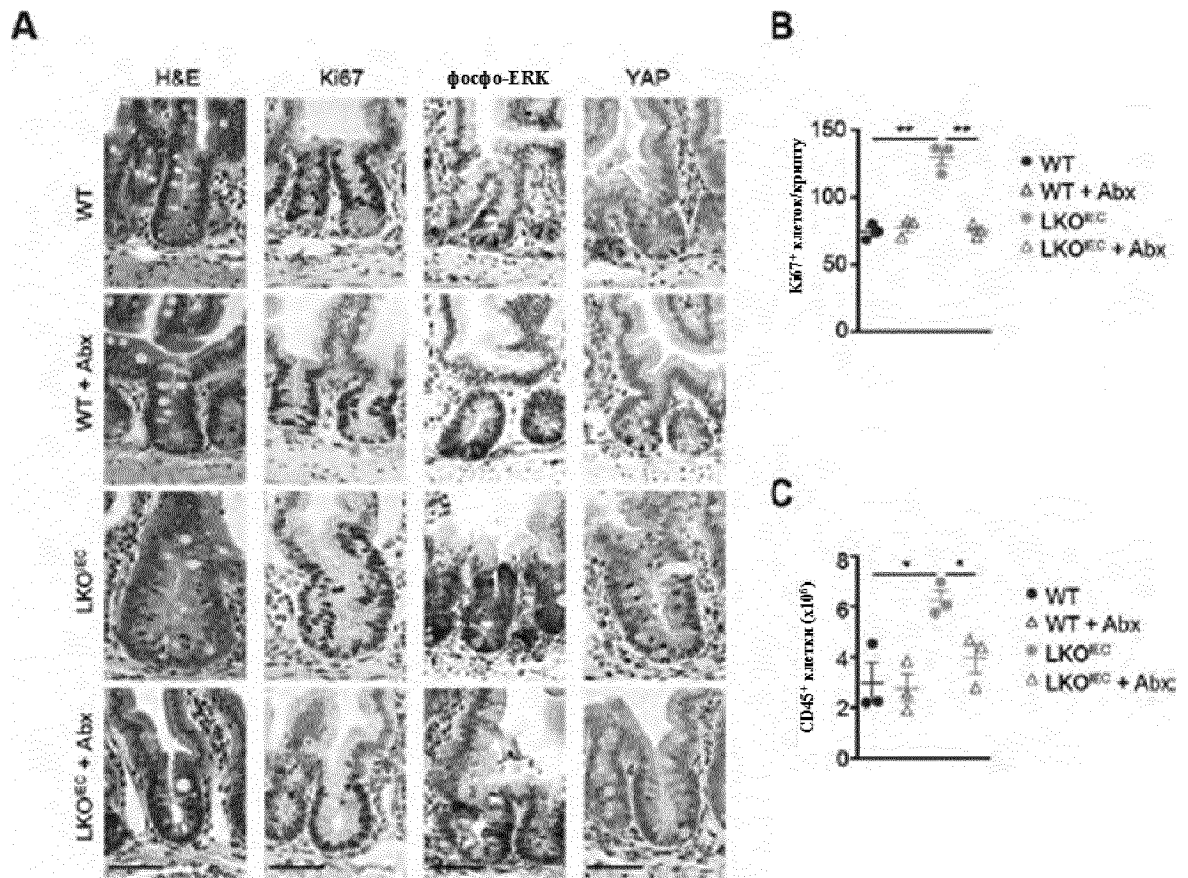


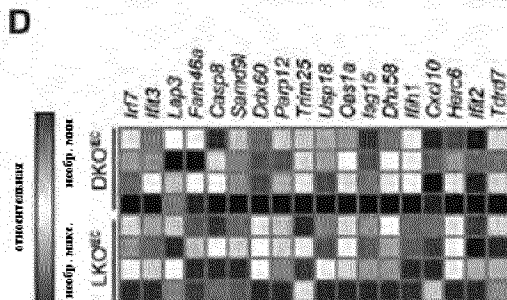
Фиг. 9

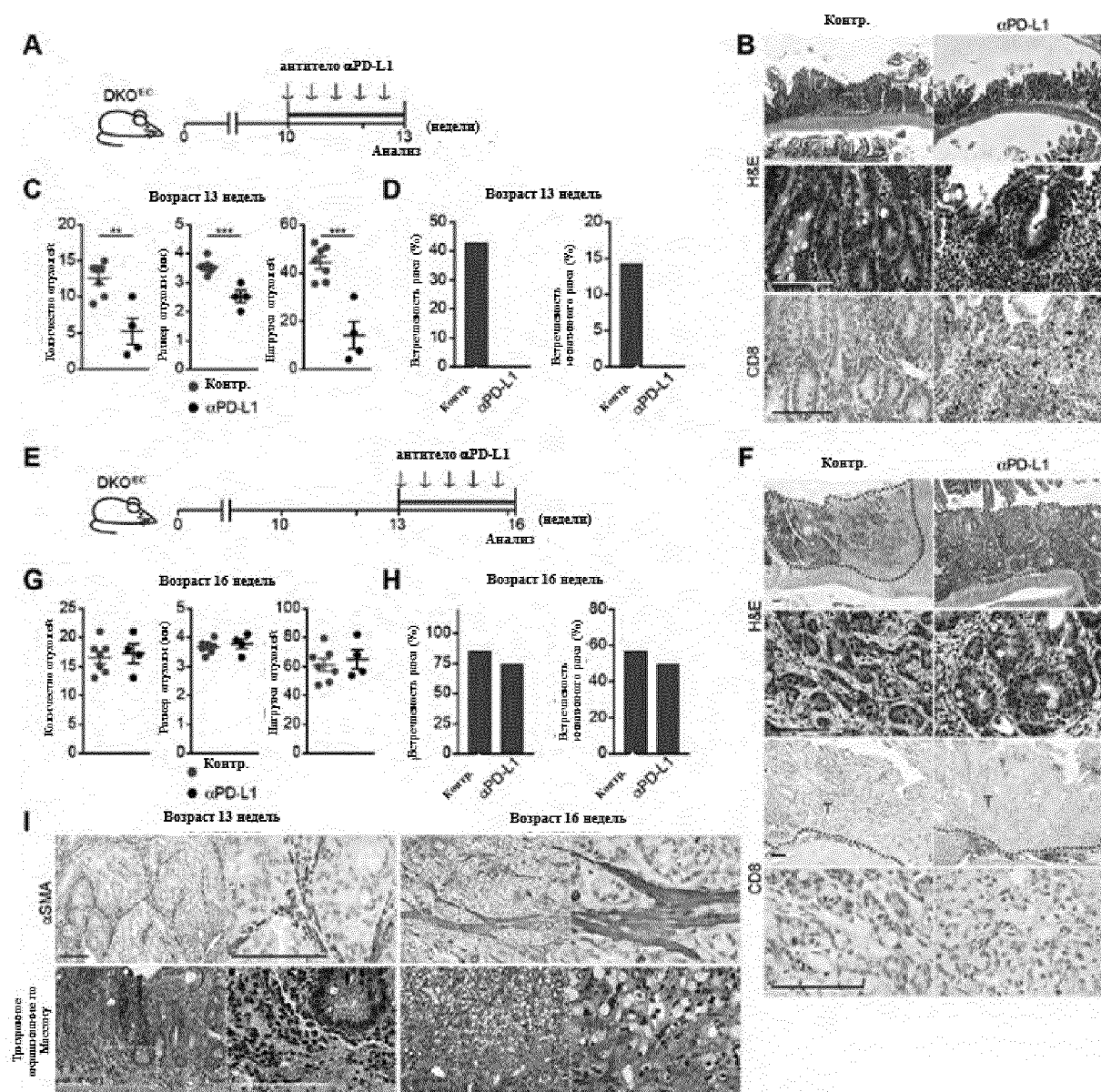




Фиг. 11

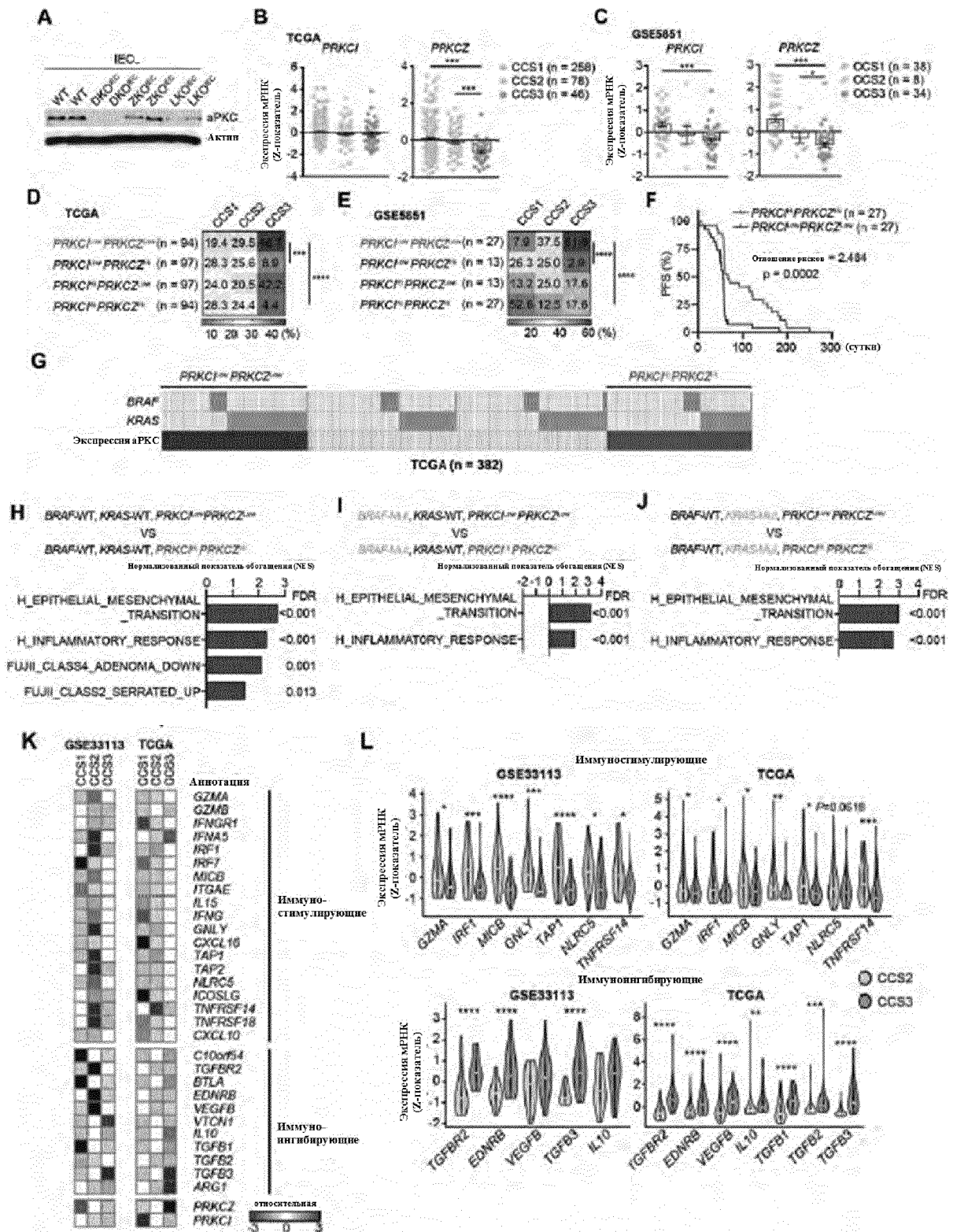






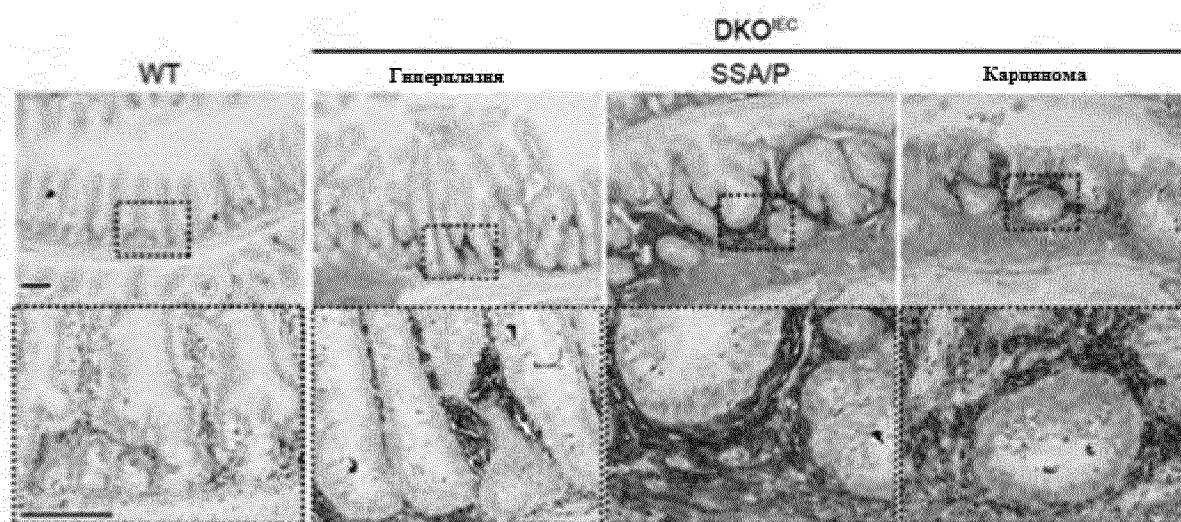
14/21

Фиг. 14

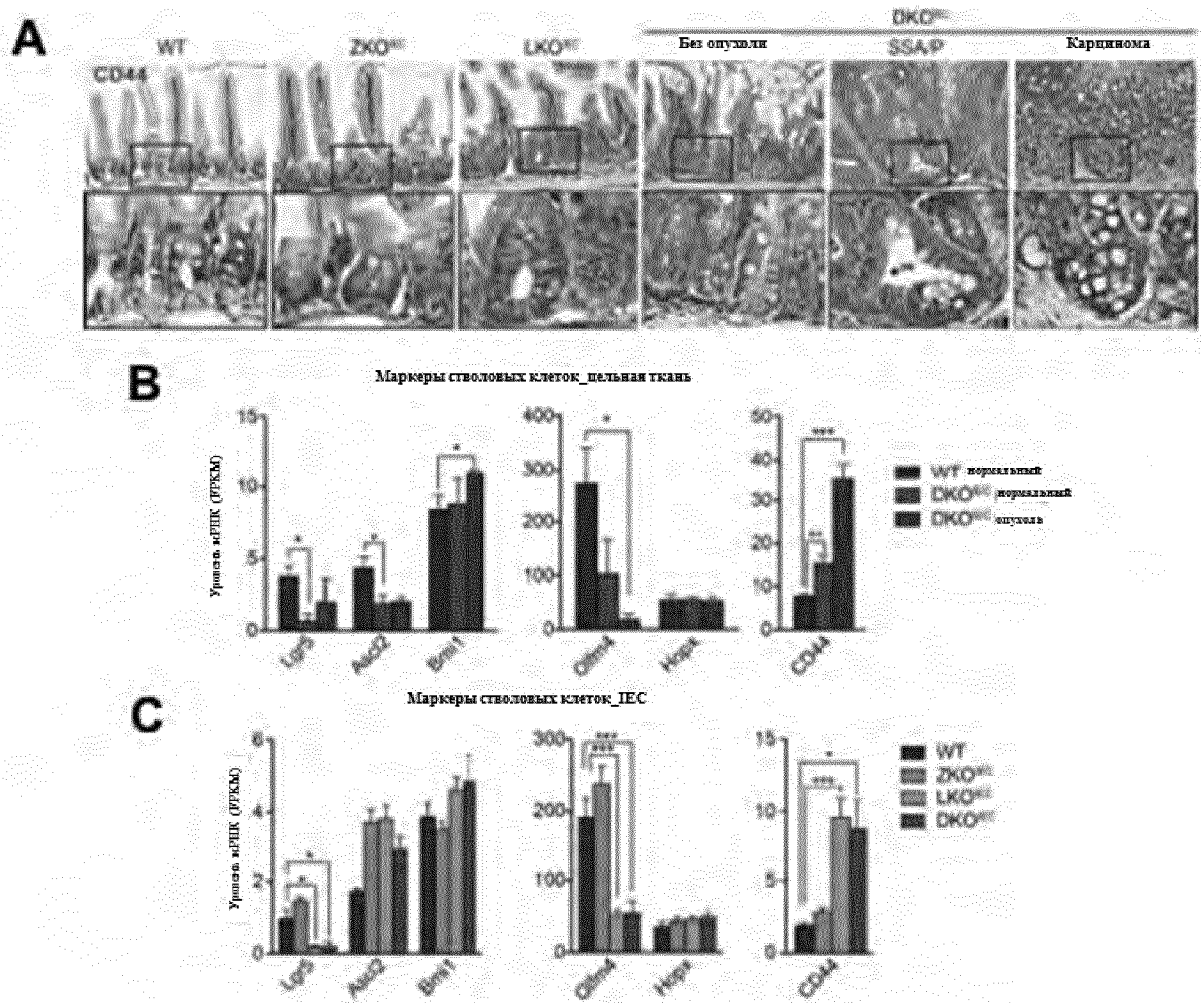




Фиг. 15

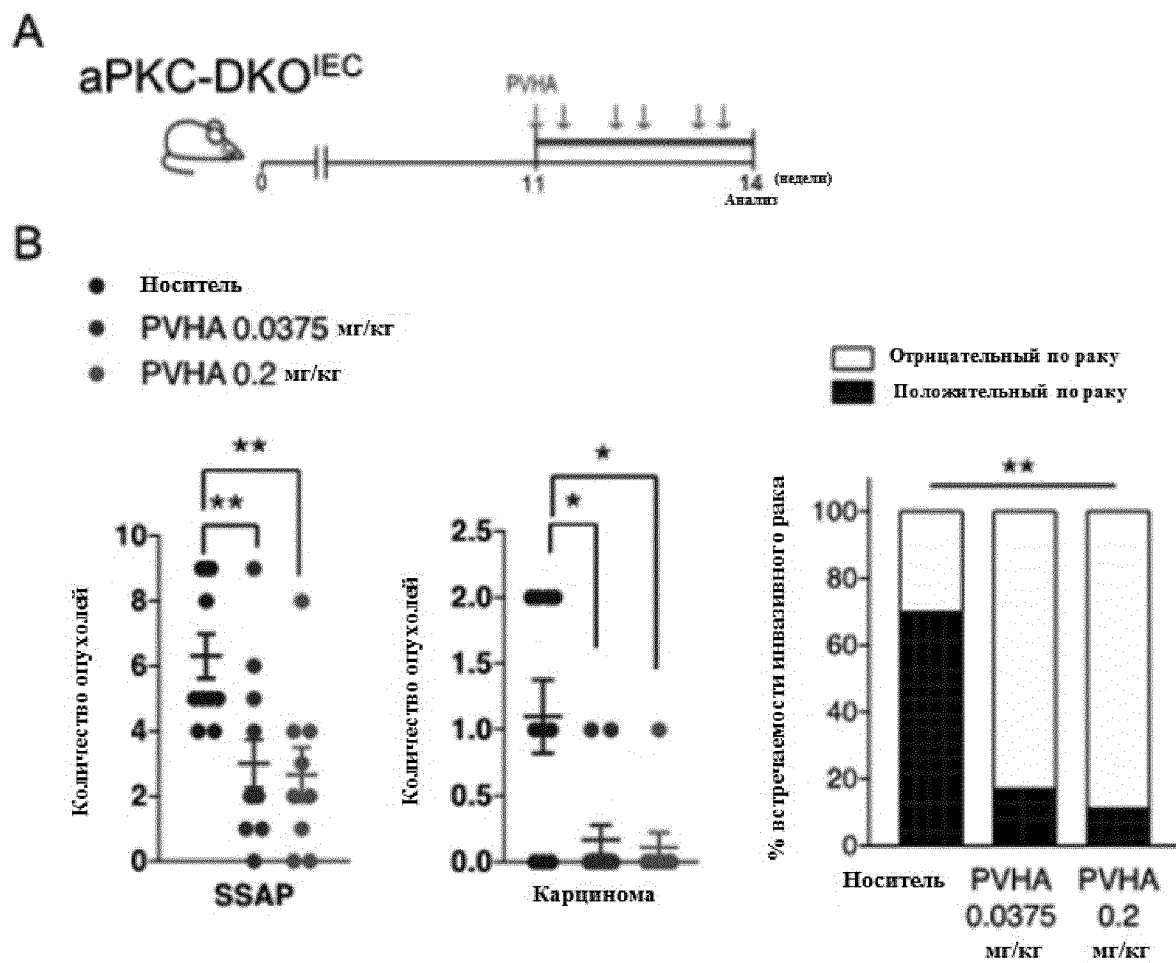


Фиг. 16



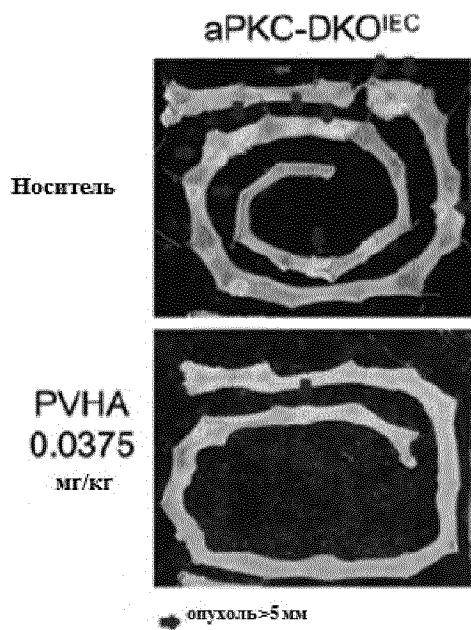


Фиг. 17

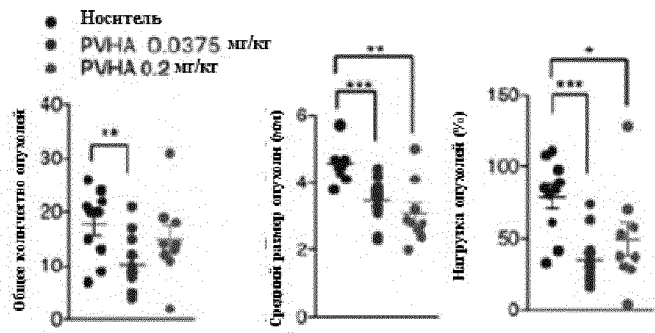


Фиг. 18

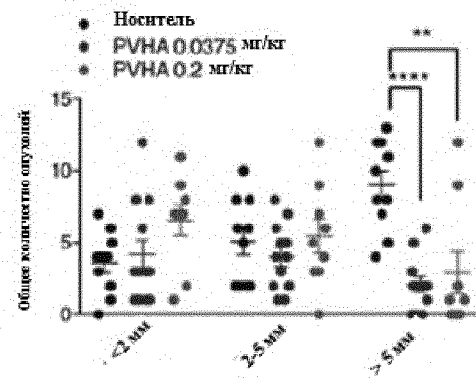
A



B



C



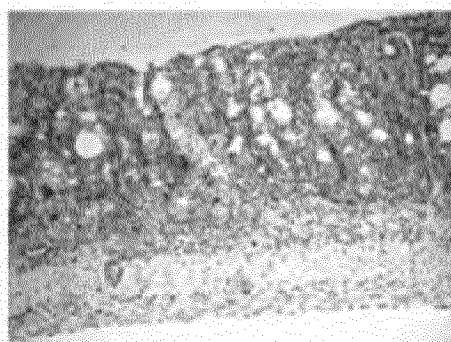
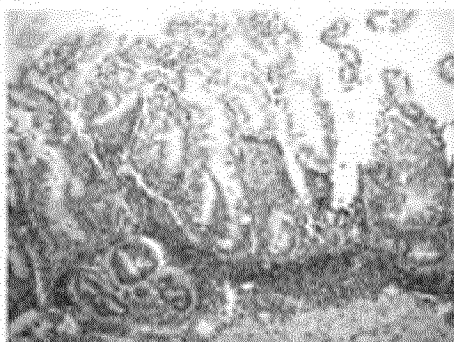
19/21

Фиг. 19

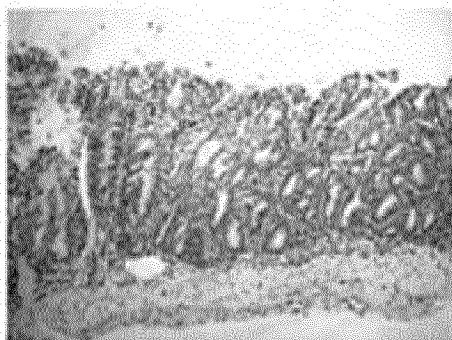
Окрашивание  
гиалуронана

aPKC-DKO<sup>IEC</sup>

Носитель



PVHA  
0.0375  
мг/кг



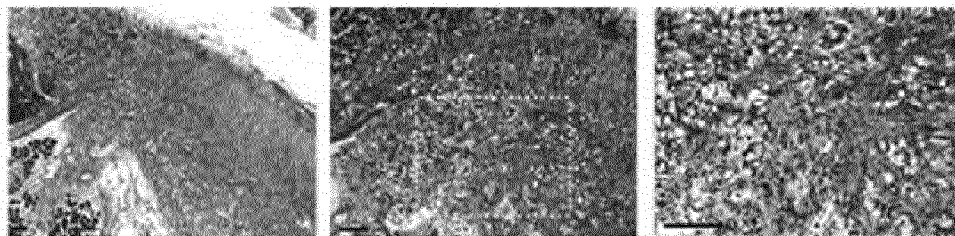
20/21

Фиг. 20

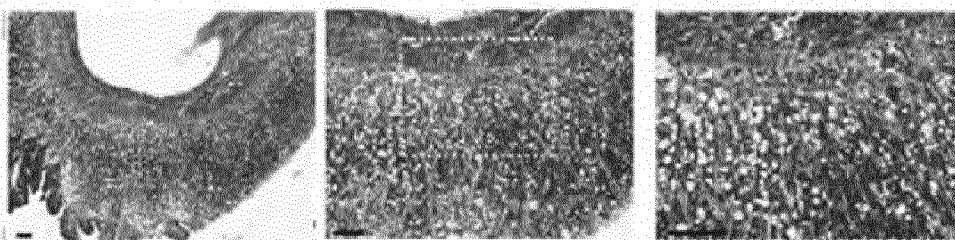
Трихромное  
окрашивание  
по Массону

aPKC-DKO<sup>IEC</sup>

Носитель



PVHA  
0.0375  
мг/кг



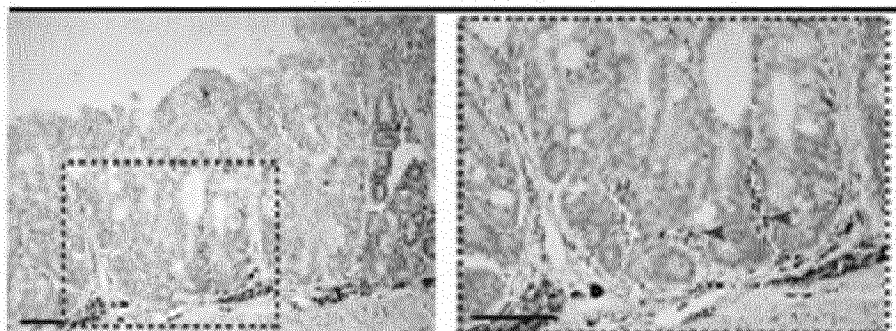
21/21

Фиг. 21

Окрашивание  
CD8

aPKC-DKO<sup>IEC</sup>

Носитель



PVHA  
0.0375  
мг/кг

