

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034884**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

**2020.04.01**

(21) Номер заявки

**201500906**

(22) Дата подачи заявки

**2014.03.06**(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/22** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**A61K 31/00** (2006.01)**(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**(31) **13158228.0**(32) **2013.03.07**(33) **EP**(43) **2016.03.31**(86) **PCT/EP2014/054300**(87) **WO 2014/135611 2014.09.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ  
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:

**Адам Пауль, Фридбихлер Катрин (DE)**

(74) Представитель:

**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,  
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,  
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,  
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) HUSSAIN ET AL.: "A phase II randomized study of cixutumumab (IMC-A12: CIX) or ramucirumab (IMC-1121B: RAM) plus mitoxantrone (M) and prednisone (P) in patients (pts) with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC) following disease progression (PD) on docetaxel (DCT) therapy", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 97, 10 February 2012 (2012-02-10), XP002705603, Retrieved from the Internet: URL: <http://meeting.ascopubs.org/cgi/content/abstract/30/5suppl/97?sid=e7985e77-14e7-47d5-adb0-50acf8bcee69> [retrieved on 2013-07-24], abstract

C. D. FAHRENHOLTZ ET AL.: "Targeting IGF-IR with Ganitumab Inhibits Tumorigenesis and Increases Durability of Response to Androgen-Deprivation Therapy in VCaP Prostate Cancer Xenografts", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 12, no. 4, 24 January 2013 (2013-01-24), pages 394-404, XP055072534, ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0648, published online on 24. January 2013; page 394

N.N.: "Bicalutamide and Goserelin or Leuprolide Acetate with or without Cixutumumab in treating patients with newly diagnosed metastatic prostate cancer", ClinicalTrials.gov, 1 February 2013 (2013-02-01), XP002705604, Retrieved from the Internet: URL: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01120236> [retrieved on 2013-07-24], the whole document

WO-A1-2011057064

WO-A1-2006008639

WO-A2-2010066868

EMINE ELIF OZKAN: "Plasma and tissue insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) as a prognostic marker for prostate cancer and anti-IGF-IR agents as novel therapeutic strategy for refractory cases: A review", MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 344, no. 1, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 1-24, XP028270833, ISSN: 0303-7207, DOI: 10.1016/J.MCE.2011.07.002 [retrieved on 2011-07-18], the whole document

G. PANDINI: "Androgens Up-regulate the Insulin-like Growth Factor-I Receptor in Prostate Cancer Cells", CANCER RESEARCH, vol. 65, no. 5, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 1849-1857, XP055072441, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1837, page 1857

(57) В изобретении описано применение антагониста рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF) для лечения рака предстательной железы, включая доброкачественную гиперплазию предстательной железы (BPH), в сочетании с антагонистом андрогенного рецептора. Причем антагонистом IGF является антитело, а антагонист андрогенного рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат. Кроме того, изобретение относится к способу лечения рака предстательной железы и соответствующей фармацевтической композиции.

**034884 B1****034884 B1**

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому лечению рака предстательной железы.

### **Предпосылки создания изобретения**

Рак предстательной железы является наиболее распространенным злокачественным заболеванием, диагностированным у мужчин, и является основной причиной смерти в западных странах (American Cancer Society, 2010 (<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-026238.pdf>)). Андрогены и стимуляция их рецептора, т.е. андрогенный рецептор (AR), играют существенную роль в развитии и функции здоровой предстательной железы и развитии и прогрессировании рака предстательной железы (см. обзор Basu S. и др., *Horm Cancer*. 1(5), октябрь 2010 г., с. 223-228; Yadav N. и др., *Minerva Urol Nefrol*. 64(1), март 2012 г., с. 35-49). При метастатическом раке предстательной железы андроген-депривационная терапия остается стандартным лечением. Несмотря на тот факт, что вначале более 90% пациентов реагируют на андроген-депривационную терапию, клиническая польза является временной, при этом опухоли становятся устойчивыми и превращаются в андроген-независимый/кастрационно-резистентный (резистентный к кастрационным уровням андрогенов) рак предстательной железы (CRPC) (Rini B.I. и др., *Curr Treat Options Oncol*. 3(5), октябрь 2003 г., с. 437-46.; Carles J. и др., *Clin Transl Oncol*. 14(3), март 2012 г., с. 169-176). CRPC ассоциирован с постоянной активацией андрогенового рецептора (AR) несмотря на гормональную кастрацию и/или лечение доступными в настоящее время антиандрогенами. Молекулярный механизм андрогенной стимуляции роста и переключения рака предстательной железы на независимость от андрогенов не полностью изучен. Развитие андроген-независимости можно объяснять изменениями, касающимися андрогенного рецептора, такими как амплификация, мутации или измененная активность сплайсинговых вариантов. Другие возможные механизмы включают автономное производство андрогенов опухолевыми клетками, лиганд-независимую активацию AR киназами типа ERK или AKT (см. обзор Dutt S.S. и др., *Future Oncol*. 5(9), ноябрь 2009 г., с. 1403-1413 и Attar R.M. и др., *Clin Cancer Res*. 15(10), 15 мая 2009 г., с. 3251-3255) или то, что андрогены могут регулировать пролиферацию рака предстательной железы посредством повышающей регуляции аутокринных петель, включающих пептидные факторы роста и их когнатные рецепторы (De Bellis A. и др., *J Clin Endocrinol Metab* 81, 1006, с. 4148-4154). Все указанные механизмы могут приводить к независимости от эндокринных андрогенов.

Доброкачественную гиперплазию предстательной железы (ВРН) можно обнаружить у огромного большинства мужчин по мере их старения (Parsons J.K., *Curr Bladder Dysfunct Rep*. 5(4), декабрь 2010 г., с. 212-218). ВРН можно определять как незлокачественное увеличение предстательной железы в результате пролиферации как доброкачественные стромальных, так и в меньшей степени эпителиальных клеток (Foster C.S. *Prostate* 9, 2009, с. 4-14). В обоих указанных клеточных типах дигидротестостерон (ДГТ), метаболит тестостерона, который является в 10 раз более эффективным вследствие его более медленной по сравнению с тестостероном диссоциации от андрогенного рецептора, связывается с ядрами андрогенных рецепторов, что приводит к транскрипции факторов роста, которые являются митогенными для эпителиальных и стромальных клеток. В предстательной железе тестостерон превращается в ДГТ с помощью фермента 5 $\alpha$ -редуктазы типа 2. При таком состоянии, как ВРН, местные уровни тестостерона могут быть повышены более чем в 100 раз по сравнению с уровнями в сыворотке, что приводит к повышенной доступности ДГТ (Gat Y. и др., *Andrologia* 40(5), октябрь 2008 г., с. 273-281). Терапия с использованием ингибиторов 5 $\alpha$ -редуктазы, таких как финастерид, существенно снижает содержание ДГТ в предстательной железе и в свою очередь снижает объем предстательной железы и во многих случаях симптомы ВРН. Вероятно, андрогены играют основную роль в возникновении ВРН, но, скорее всего, не являются единственной причиной этого состояния.

Инсулиноподобные факторы роста (IGF) и связывающиеся с ними белки могут играть важную роль в понимании этиологии заболевания предстательной железы, включая ВРН. Существует целый ряд доказательств того, что IGF участвуют в ВРН. IGF-лиганды обладают митогенными действиями на предстательную железу, а IGF-связывающие белки (IGFBP) ингибируют рост из-за их способности регулировать доступность IGF, других факторов роста и стероидных гормонов (Pollak M.N. и др., *Nat Rev* 4, 2004, с. 505-518). Для IGFBP3 характерен особенно низкий уровень секреции в стромальных клетках в ВРН-ткани (Boudon C. и др., *J Clin Endocrinol Metab* 81, 1006, с. 612-617), он может являться предпочтительным для гиперпластического роста и играть роль в развитии ВРН. Кроме того, у страдающих акромегалией пациентов, которые имеют очень высокие уровни IGF1 и соответственно низкие уровни тестостерона и ДГТ, имеет место увеличение предстательной железы и высокие уровни ВРН (Colao A. и др., *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1999, с. 1986-1991; Colao A. и др., *Eur J Endocrinol* 143, 2000, с. 61-69).

Система инсулиноподобного фактора роста (IGF) играет основную роль в стимуляции пролиферации и выживания как здоровых, так и раковых тканей (см. обзор LeRoith D., Roberts C.T. Jr., *Cancer Lett* 195, 2003, с. 127-137). В нескольких клинических и эпидемиологических исследованиях установлено, что высокие концентрации IGF-1 в кровотоке ассоциированы с повышенным риском рака предстательной железы (Price A.J. и др., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 21(9), сентябрь 2012 г., с. 1531-1541; Roddam A.W. и др., *Ann Intern Med* 149(7), 2008, с. 461-471). Установлено, что в эпителиальных клетках предстательной железы повышенный уровень экспрессии IGF-1 приводит к более высоким скоростям пролиферации и/или более низким скоростям апоптоза (Takahara K. и др., *Prostate*. 71(5), апреля 2011 г., с. 525-

537). Снижение импринтинга локуса IGF-2 и повышенная экспрессия IGF-2 обнаружены при многих видах рака, включая рак предстательной железы (Jarrard D.F. и др., *Clinical Cancer Research* 1, 1995, с. 1471-1478.; Fu V.X. и др., *Cancer Research* 68, 2008, с. 6797-6802), и могут быть связаны с риском развития рака предстательной железы (Belharazem D. и др., *Endocrine Connections* 1, 2012, с. 87-94). Кроме того, установлено, что не только экспрессия лигандов IGF-1 и IGF-2, но также и их рецептора, IGF-1R, повышена при запущенных опухолях предстательной железы (Cardillo M.R. и др., *Anticancer Res.* 23, 2003, с. 3825-3835; Liao Y. и др., *Hum. Pathol.* 36(11), 2005, с. 1186-1196; Hellowell G.O. и др., *Cancer Res.* 62(10), 15 мая 2002 г., с. 2942-2950; Turney B.W. и др., *BJU Int.* 107(9), май 2011 г., с. 1488-1499; Krueckl S.L. и др., *Cancer Res.* 64(23), 1 декабря 2004 г., с. 8620-8629; Figueroa J.A. и др., *Cancer Invest.* 19(1), 2001, с. 28-34; Ryan C.J. и др., *Urol. Oncol.* 25, 2007, с. 134-140). При рекуррентном и андроген-независимом раке продемонстрировано также повышение АКТ-фосфорилирования (Graff J.R. и др., *J. Biol. Chem* 275, 2000, с. 24500-24505; Murillo H. и др., *Endocrinology* 142, 2001, с. 4795-4805).

Установлено, что кастрационно-резистентный рак предстательной железы является восприимчивым, а не устойчивым к продолжительной манипуляции с системой андроген/AR. С андрогенной системой можно манипулировать с использованием антиандрогенов (нилутамид, энзалутамид), ингибиторов синтеза андрогена (кетоназол, абиратерона ацетат), кортикостероидов (дексаметазон, преднизон) или обработки эстрогеном. Установлено, что после появления кастрационно-резистентного заболевания химиотерапия на основе таксанов обладала терапевтической эффективностью и пролонгировала выживание. Для пациентов, у которых наблюдалось прогрессирование при лечении доцетакселом, обнаружено благоприятное действие абиратерона ацетата, избирательного ингибитора цитохрома P450 17A1, который необходимо вводить совместно с глюкокортикоидами для того, чтобы избежать побочных действий. Энзалутамид (MDV-3100) представляет собой новый антагонист AR, который блокирует передачу сигналов AR более эффективно, чем доступные в настоящее время антагонисты AR (Tran и др., *Science* 324(5928), 2009, с. 787-790.), и обладает выраженной противоопухолевой активностью и оказывает такое же воздействие на общую выживаемость, что и абиратерон.

Антагонисты действия IGF и их применение в терапии рака известно в данной области. Описание тирозинкиназных ингибиторов IGF-рецептора см. в WO 2009/009016 и WO 2010/099139. Описание антител к IGF-рецептору см. в WO 2002/53596, WO 2003/093317, WO 2003/106621, WO 2006/013472, WO 2006/069202. Описание антител к лиганду IGF см. в WO 2003/093317, WO 2005/028515, WO 2007/022172, WO 2007/070432, WO 2008/155387, WO 2009/137758, WO 2010/066868. Предложены для применения, в том числе для лечения рака предстательной железы, антитела к рецептору IGF-1 (WO 2008/098917, WO2009/137378) и антитела к лиганду IGF (WO 2007/118214, WO 2008/155387, WO 2009/137758, WO 2010/066868).

Обсуждение известного уровня техники представлено также в других публикациях (Pollak M.N. и др., *Cancer Metastasis Rev* 17, 1998, с. 383-390; Djavan B. и др., *World J Urol* 19, 2001, с. 225-233; Wolk A. и др., *J Natl Cancer Inst* 90, 1998, с. 911-915; Jiang Y.G. и др., *Int. J. Urol.* 14, 2007, с. 1034-1039; Lin H.K. и др., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 2001, с. 7200-7205; Wen Y. и др., *Cancer Res.* 60, 2000, с. 6841-6845; Plymate S.R. и др., *Prostate* 61, 2004, с. 276-290; A.A. Lubik и др., *Endocr Relat Cancer* ERC-12-0250 2013, первая публикация от 14 января; Nickerson T. и др., *Cancer Res.* 61 (16), 2001, с. 6276-6280; Pandini G. и др., *Cancer Res.* 65, 1 марта 2005 г., с. 1849; Bedolla R. и др., *Clin Cancer Res.* 13(13), 1 июля 2007 г., с. 3860-3867; Carver B.S. и др., *Cancer Cell* 19, 17 мая 2011 г., с. 575-586; Mulholland D.J. и др., *Cancer Cell*, 19, 14 июня 2011 г., с. 792-804).

Несмотря на успехи, достигнутые в области раннего определения и лечения неоплазии предстательной железы, включая доброкачественную неоплазию предстательной железы (BPH), рак предстательной железы и прежде всего CRPC, существует выраженная необходимость в улучшениях терапии.

#### **Краткое описание чертежей**

На чертежах показано:

на фиг. 1 - ингибирующее действие блокады передачи сигналов IGF и AR на пролиферацию клеток VCaP, MDA PCa 2b и DUCaP.

Клетки линий VCaP, MDA PCa 2b и DUCaP обрабатывали MDV-3100 и нейтрализующими лиганд IGF антителами, применяемыми в виде индивидуальных агентов или в виде комбинации. На фиг. 1 показано ингибирующее действие антител IGF mAb\_1 (фиг. 1A+1B+1D) и IGF mAb\_2 (фиг. 1B+1Г+1E) и MDV-3100, при их индивидуальном применении или в виде комбинации, на 2D-пролиферацию выведенных из рака предстательной железы клеток VCaP (фиг. 1A+1B), клеток MDA PCa 2b (фиг. 1B+1Г) и клеток DUCaP (фиг. 1D+1E) в питательной среде, содержащей 10% FCS. На всех трех клеточных линиях обработка индивидуальным агентом, например антителами к IGF или MDV-3100, приводила к ингибированию клеточной пролиферации, которую можно было усиливать применением комбинации обоих агентов, которая приводила к полному ингибированию пролиферации;

на фиг. 2 - ингибирующее действие блокады передачи сигналов IGF и синтеза андрогенов на пролиферацию клеток VCaP, MDA PCa 2b и DUCaP.

На фиг. 2 продемонстрированы воздействия антител IGF mAb\_1 и IGF mAb\_2 и абиратерона ацетата (AA), применяемых в виде индивидуальных агентов или в виде комбинации, на 2D- и 3D-

пролиферацию выведенных из рака предстательной железы клеток VCaP, MDA PCa 2b и DUCaP в питательной среде, содержащей 10% FCS. На панели (А) представлены результаты обработки клеток VCaP антителом IGF mAb\_1, полученные в 2D-анализах пролиферации клеток. Антитело IGF mAb\_2 применяли для обработки клеток VCaP (Б). На панели В (IGF mAb\_1) и Г (IGF mAb\_2) представлены результаты для клеток MDA PCa 2b. Результаты обработки клеток DUCaP антителом IGF mAb\_1 представлены на панели Д, а антителом IGF mAb\_2 - на панели Е. Обработки с использованием антител IGF mAb\_1 и mAb\_2 в качестве индивидуального агента ингибировали пролиферацию клеток на 70-90%. Обработка абиратерона ацетатом приводила к ингибированию пролиферации клеток при его применении в более высоких концентрациях, которое можно было повышать путем объединения с любым из антител, снижая тем самым дозы АА, необходимые для полного ингибирования. В 3D-анализе пролиферации в мягком агаре (Ж) клетки VCaP обрабатывали абиратерона ацетатом и антителом IGF mAb\_2. Аналогично результатам, полученным с использованием 2D-анализа, обработка индивидуальным агентом в сочетании с антителом IGF mAb\_2 приводила к ингибированию пролиферации клеток на 96%. Обработка абиратерона ацетатом приводила к ингибированию пролиферации клеток при применении в более высоких концентрациях, которое можно было повышать путем объединения с антителом IGF mAb\_2;

на фиг. 3 - анализ белков клеток VCaP, MDA PCa 2b и DUCaP после ингибирования передачи сигналов IGF и AR.

На фиг. 3 продемонстрированы воздействия антитела IGF mAb\_1 и MDV-3100, индивидуально или в комбинации, на уровни IGF-1R, AR и PTEN, а также на АКТ-фосфорилирование в клетках VCaP, MDA PCa 2b и DUCaP по данным анализа Вестерн-блоттингом. Клетки высевали в 6-луночные планшеты и обрабатывали в течение 24 ч. (А) Лизаты, полученные из обработанных клеток VCaP, сравнивали с необработанными контролями и нечувствительными клетками линии PC-3 в отношении экспрессии белков IGF-1R, AR, PTEN и АКТ-фосфорилирования АКТ-Ser473. Оценивали экспрессию белков и АКТ-фосфорилирование необработанных и обработанных клеток MDA PCa 2b (Б) и DUCaP (В) и сравнивали с этими же параметрами в клетках VCaP. Необработанные клетки PC-3 служили в качестве контроля. Важно отметить, что установлено, что клетки VCaP, MDA PCa 2b и DUCaP экспрессировали IGF1-R, AR и PTEN в отличие от нечувствительной клеточной линии PC-3. Обработка MDV-3100 слегка повышала уровни белка AR, что могло являться следствием стабилизации белка. Одновременно уровни IGF-1R слегка понижались после обработки MDV-3100. Комбинированная обработка обоими агентами приводила к более полному ингибированию АКТ-фосфорилирования, чем обработка только антителом или только MDV-3100;

на фиг. 4 - ингибирование передачи сигналов IGF после обработки с применением индивидуальных агентов и комбинированной обработки антителом IGF mAb\_1 и MDV-3100;

На фиг. 4 продемонстрированы воздействия антитела IGF mAb\_1 и MDV-3100, которые применяли в качестве индивидуальных агентов или в комбинации, на уровни IGF-1R и АКТ-фосфорилирование в клетках VCaP в течение 120 ч обработки. Клетки VCaP высевали в 6-луночные планшеты и обрабатывали MDV-3100 и антителом IGF mAb\_1 в качестве индивидуальных агентов или в комбинации в течение 24, 48, 72, 96 и 120 ч. Лизаты, полученные из обработанных клеток, сравнивали с необработанными контролями в отношении фосфорилирования АКТ-Ser473. Обработка комбинацией обоих агентов приводила к более продолжительному ингибированию АКТ-фосфорилирования, чем обработка только антителом или только MDV-3100;

на фиг. 5 - пониженная пролиферативная активность клеток VCaP после обработки с применением индивидуальных агентов и комбинированной обработки антителом IGF mAb\_1 и MDV-3100.

Мониторинг пролиферации клеток VCaP осуществляли с помощью анализа включения  $H^3$ -тимидина. Обработка 10 мкМ MDV-3100 или 1 мкМ антителом IGF mAb\_1 в качестве индивидуальных агентов в течение 96 ч снижала пролиферативную активность примерно на 50%. Комбинация антитела IGF mAb\_1 и MDV-3100 снижала включение тимидина более чем на 95% по сравнению с необработанными контролями;

на фиг. 6 - снижение скорости роста клеток VCaP после обработки с применением индивидуальных агентов и комбинированной обработки антителом IGF mAb\_1 и MDV-3100.

(А) Воздействие 1 мкМ антитела IGF mAb\_1 и 10 мкМ MDV-3100, которые применяли в качестве индивидуальных агентов и в комбинации, на клеточную морфологию и рост клеток по данным микроскопических анализов. (Б) Воздействие 10 мкМ MDV-3100 на время генерации клеток VCaP по сравнению с необработанными контролями;

на фиг. 7 - комбинированная обработка антителом IGF mAb\_1 и MDV-3100 повышает индукцию апоптоза клеток VCaP.

Активность каспазы 3 применяли в качестве меры индукции апоптоза клеток VCaP после обработки 10 мкМ MDV-3100 и 1 мкМ МАт в качестве индивидуальных агентов и в комбинации в течение вплоть до 96 ч. В то время как обработка MDV-3100 не индуцировала активность каспазы 3 в течение 96-часовой обработки, после обработки антителом IGF mAb\_1 было обнаружено увеличение количества случаев апоптоза. Для комбинации обоих агентов обнаружено синергетическое действие в отношении индукции активности каспазы 3, составляющее примерно 9-кратное повышение по сравнению с контро-

лем и примерно 2,5-кратное повышение по сравнению с обработкой только антителом IGF mAb\_1;

на фиг. 8 - профили клеточного цикла VCaP-клеток, обработанных MDV-3100 и антителом IGF mAb\_1.

Профили клеточного цикла VCaP-клеток после 24, 48 и 72 ч обработки 10 мкМ MDV-3100 и 1 мкМ МАт при их применении в качестве индивидуальных агентов и в комбинации определяли с помощью окрашивания йодидом пропидия с использованием проточной цитометрии. Первая популяция слева соответствует суб-G1-популяции, представляющей собой клетки на стадии апоптоза, вторая популяция характеризуется G1/G0-пиком, окрашенная светло-серым цветом популяция соответствует клеткам на S-фазе, а популяция справа представляет собой клетки на G2/M-фазе клеточного цикла. Среди клеток VCaP, обработанных антителом IGF mAb\_1, и в большей степени среди клеток, обработанных комбинацией антителом IGF mAb\_1 и MDV-3100, популяция апоптозных клеток увеличивалась в зависимости от времени, в то время среди клеток VCaP, обработанных MDV-3100, указанная популяция не изменялась. Наоборот, обработка MDV-3100 приводила к увеличению G1/G0-популяции по сравнению с необработанными контролями;

на фиг. 9 - анализ белков апоптоза и регуляторов клеточного цикла после ингибирования передачи сигналов IGF.

Воздействия обработки 10 мкМ MDV-3100 и 1 мкМ антителом IGF mAb\_1 в виде индивидуальных агентов и в комбинации на уровне АКТ-фосфорилирования, PАРP-расщепления, p21, CDK2, циклина Е и PCNA после 8-, 24-, 48- и 72-часовой обработки анализировали с помощью Вестерн-блоттинга. Обработка антителом IGF mAb\_1 приводила к блокаде АКТ-фосфорилирования, а совместная обработка антителом IGF mAb\_1 и MDV-3100 приводила к повышению уровней PАРP-расщепления и циклина Е, но к снижению уровней CDK2 и PCNA. Обработка MDV-3100 повышала уровни p21 через 8 и 24 ч.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Одним из объектов настоящего изобретения применение антагониста рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF) для лечения рака предстательной железы в сочетании с антагонистом андрогенного рецептора, где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 11 (HCDR1), SEQ ID NO: 12 (HCDR2) и SEQ ID NO: 13 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 14 (LCDR1), SEQ ID NO: 15 (LCDR2) и SEQ ID NO: 16 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 21 (HCDR1), SEQ ID NO: 22 (HCDR2) и SEQ ID NO: 23 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 24 (LCDR1), SEQ ID NO: 25 (LCDR2) и SEQ ID NO: 26 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 31 (HCDR1), SEQ ID NO: 32 (HCDR2) и SEQ ID NO: 33 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 34 (LCDR1), SEQ ID NO: 35 (LCDR2) и SEQ ID NO: 36 (LCDR3), и антагонист андрогенного рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения антагонист IGF рецептора представляет собой антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 8, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 18, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 28, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 38.

Кроме того, антагонист IGF рецептора может представлять собой антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 10, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 20, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 30, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 40.

Предпочтительно рак предстательной железы может быть кастрационно-резистентным раком предстательной железы.

В наиболее предпочтительном варианте применяемое антитело содержит тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 40.

Вторым объектом данного изобретения является способ лечения рака предстательной железы, включающий введение в терапевтически эффективном количестве антагониста IGF-рецептора пациенту, который нуждается в этом, и дополнительного введения в терапевтически эффективном количестве антагониста андрогенного рецептора этому же пациенту в пределах 7 дней до или после введения антагониста IGF-рецептора, где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, и антагонист андрогенного рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат.

белые участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 11 (HCDR1), SEQ ID NO: 12 (HCDR2) и SEQ ID NO: 13 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 14 (LCDR1), SEQ ID NO: 15 (LCDR2) и SEQ ID NO: 16 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 21 (HCDR1), SEQ ID NO: 22 (HCDR2) и SEQ ID NO: 23 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 24 (LCDR1), SEQ ID NO: 25 (LCDR2) и SEQ ID NO: 26 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 31 (HCDR1), SEQ ID NO: 32 (HCDR2) и SEQ ID NO: 33 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 34 (LCDR1), SEQ ID NO: 35 (LCDR2) и SEQ ID NO: 36 (LCDR3), и антагонист андрогенного рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат.

Третьим объектом данного изобретения является применение антагониста IGF-рецептора для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака предстательной железы, где антагонист IGF-рецептора подлежит применению в сочетании с антагонистом андрогенного рецептора, и где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 11 (HCDR1), SEQ ID NO: 12 (HCDR2) и SEQ ID NO: 13 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 14 (LCDR1), SEQ ID NO: 15 (LCDR2) и SEQ ID NO: 16 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 21 (HCDR1), SEQ ID NO: 22 (HCDR2) и SEQ ID NO: 23 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 24 (LCDR1), SEQ ID NO: 25 (LCDR2) и SEQ ID NO: 26 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 31 (HCDR1), SEQ ID NO: 32 (HCDR2) и SEQ ID NO: 33 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 34 (LCDR1), SEQ ID NO: 35 (LCDR2) и SEQ ID NO: 36 (LCDR3), а антагонист андрогенного рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат.

В предпочтительном варианте осуществления этого применения антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 8, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 18, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 28, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 38.

Причем предпочтительно антагонист IGF-рецептора может представлять собой антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 10, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 20, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 30, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 40.

Наконец последним объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция для лечения рака предстательной железы, содержащая антагонист IGF-рецептора и антагонист андрогенового рецептора в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 11 (HCDR1), SEQ ID NO: 12 (HCDR2) и SEQ ID NO: 13 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 14 (LCDR1), SEQ ID NO: 15 (LCDR2) и SEQ ID NO: 16 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 21 (HCDR1), SEQ ID NO: 22 (HCDR2) и SEQ ID NO: 23 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 24 (LCDR1), SEQ ID NO: 25 (LCDR2) и SEQ ID NO: 26 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 31 (HCDR1), SEQ ID NO: 32 (HCDR2) и SEQ ID NO: 33 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 34 (LCDR1), SEQ ID NO: 35 (LCDR2) и SEQ ID NO: 36 (LCDR3), и антагонист андрогенного рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к лечению неоплазии предстательной железы.

В контексте настоящего изобретения подразумевается, что "неоплазия предстательной железы"

включает неоплазию предстательной железы, которая представляет собой рак предстательной железы, доброкачественные и злокачественные опухоли и прежде всего кастрационно-резистентный рак; а также доброкачественную гиперплазию предстательной железы.

Причем рак предстательной железы может представлять собой гормончувствительный рак предстательной железы, или рак предстательной железы после объединенной андрогенной блокады. Рак предстательной железы может быть раком предстательной железы, который лечили с помощью антиангиогенной терапии или рак предстательной железы, который лечили или собираются лечить с помощью химиотерапевтического средства. Рак предстательной железы также может быть раком предстательной железы, который лечили или собираются лечить с помощью лучевой терапии или раком предстательной железы, который лечили или собираются лечить с помощью терапии, применяемой при потере костной ткани, например, с использованием деносуаба и аблации гормонов.

Рак предстательной железы может быть кастрационно-резистентным раком предстательной железы (CRPC) или кастрационно-резистентным раком предстательной железы, который лечили или собираются лечить химиотерапевтическим средством или лучевой терапией. Рак предстательной железы может представлять собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы в состоянии до или после воздействия доцетаксела или кастрационно-резистентный рак предстательной железы после лечения кабацитакселом, или кастрационно-резистентный рак предстательной железы после лечения ингибиторами синтеза андрогенов, например абиратерона ацетатом, или кастрационно-резистентный рак предстательной железы после лечения антагонистами андрогенового рецептора, например энзалутамидом, или кастрационно-резистентный рак предстательной железы после лечения иммуномодуляторами, например си-пулеуцелом-Т.

Кроме того, рак предстательной железы может быть гормончувствительным раком предстательной железы раком предстательной железы после объединенной андрогенной блокады, или раком предстательной железы, который лечили с помощью антиангиогенной терапии или раком предстательной железы, который лечили или собираются лечить с помощью химиотерапевтического средства, или раком предстательной железы, который лечили или собираются лечить с помощью лучевой терапии, или раком предстательной железы, который лечили или собираются лечить с помощью терапии, применяемой при потере костной ткани, например, с использованием деносуаба и аблации гормонов.

В контексте настоящего изобретения антагонист IGF-рецептора представляет собой соединение, которое взаимодействует либо прямо, либо косвенно с IGF-рецептором и снижает или блокирует передачу сигналов IGF-рецептора. Антагонист IGF-рецептора, применяемый в настоящем изобретении, является антителом, которое связывается с лигандом IGF и в результате снижает или предупреждает связывание лиганда с рецептором.

Понятие "антитело" включает антитела, фрагменты антител, антителоподобные молекулы и конъюгаты, включающие любую из вышеперечисленных субстанций. Антитела включают (но, не ограничиваясь только ими) поли- или моноклональные, химерные, гуманизированные, человеческие, моно-, би- или мультиспецифические антитела. Под понятие "антитело" могут подпадать полные иммуноглобулины, продуцируемые лимфоцитами и, например, присутствующие в сыворотке крови, моноклональные антитела, секретируемые клеточными линиями гибридом, полипептиды, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, которые обладают связывающей специфичностью иммуноглобулинов или моноклональных антител, и молекулы, выведенные из указанных иммуноглобулинов, моноклональных антител или полипептидов путем дополнительного процессинга, если они сохраняют их связывающую специфичность. В частности, понятие "антитело" включает полные иммуноглобулины, содержащие две тяжелые цепи и две легкие цепи. В другом варианте осуществления изобретения понятие "антитело" относится к фрагменту иммуноглобулина, типа Fab-фрагментов. В другом варианте осуществления изобретения понятие "антитело" относится к полипептиду, имеющему один или несколько переменных доменов, выведенных из иммуноглобулина, типа одноцепочечных антител (scFv), однодоменных антител и т.п.

Антитело к лиганду IGF, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3).

Антагонист IGF-рецептора также представляет собой антитело к лиганду IGF, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 11 (HCDR1), SEQ ID NO: 12 (HCDR2) и SEQ ID NO: 13 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 14 (LCDR1), SEQ ID NO: 15 (LCDR2) и SEQ ID NO: 16 (LCDR3).

Кроме того, антагонист IGF-рецептора может быть антителом к лиганду IGF, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 21 (HCDR1), SEQ ID NO: 22 (HCDR2) и SEQ ID NO: 23 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 24 (LCDR1), SEQ ID NO: 25 (LCDR2) и SEQ ID NO: 26 (LCDR3), или же антагонист IGF-рецептора может служить к лиганду IGF, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, имеющие SEQ ID NO: 31 (HCDR1), SEQ ID NO: 32 (HCDR2) и SEQ ID NO: 33 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, имеющие SEQ ID NO: 34 (LCDR1), SEQ ID NO: 35 (LCDR2) и SEQ ID NO: 36 (LCDR3). Приведенное в каче-

стве примера антитело, имеющее указанные гипервариабельные участки, обозначено в контексте настоящего описания как "IGF mAb\_1".

Антагонистом IGF-рецептора может служить антитело к лиганду IGF, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 8, или антитело к лиганду IGF, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 18, или антитело к лиганду IGF, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 28.

Антагонист IGF-рецептора может быть антителом к лиганду IGF, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 38. Приведенное в качестве примера антитело, имеющее указанные вариабельные области, обозначено в контексте настоящего описания как "IGF mAb\_1".

Возможно применение в качестве антагониста IGF-рецептора антитела к лиганду IGF, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 41, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 42 или антитела к лиганду IGF, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую SEQ ID NO: 43, и вариабельную область легкой цепи, имеющую SEQ ID NO: 44, или антитела к лиганду IGF, содержащего тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 10, или антитела к лиганду IGF, содержащему тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 20, или антитела к лиганду IGF, содержащему тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 30, или антитела к лиганду IGF, содержащему тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 40. Приведенное в качестве примера антитело, имеющее указанные тяжелую и легкую цепи, обозначено в контексте настоящего описания как "IGF mAb\_1".

Антитело к IGF-рецептору также может содержать тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 45, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 46.

Предпочтительно антагонистом IGF-рецептора является антитело IGF mAb\_1, описанное выше.

Получение и терапевтическое применение вышеперечисленных антител описано в WO 2002/53596, WO 2007/070432, WO 2008/152422, WO 2008/155387 и WO 2010/066868.

Применяемые антитела получают путем рекомбинантной экспрессии в клетке млекопитающего-хозяина, очищают с помощью ряда хроматографических и нехроматографических стадий и включают в содержащую водный буфер композицию для парентеральной (внутривенной) инфузии или инъекции с концентрацией антитела 10 мг/мл, указанный буфер содержит, например, 25 мМ Na-цитрат, pH 6, 115 мМ NaCl и 0,02% полисорбата 20. Для внутривенной инфузии фармацевтическую композицию можно разводить физиологическим раствором, например 0,9%-ным раствором хлорида натрия или G5-раствором.

Антитело можно вводить пациенту в дозе, составляющей от 1 до 20 мг/кг, с помощью одного или нескольких отдельных введений или путем непрерывной инфузии, например, инфузии, продолжающейся в течение 1 ч. Типичная схема лечения, как правило, включает введение антитела от одного раза каждую неделю до одного раза каждые три недели. Например, недельная доза может составлять 5, 10 или 15 мг/кг. Предпочтительно антитело IGF mAb\_1 приготавливают в концентрации 10 мг/мл. Антитело предпочтительно можно вводить пациенту в виде дозы, составляющей в целом 750 мг (вплоть до 1000 мг), с помощью одночасовой i.v.-инфузии, которую можно повторять один раз в неделю вплоть до прогрессирования заболевания.

Антагонист IGF-рецептора вводят пациенту в сочетании с введением антагониста андрогенового рецептора. "В сочетании (в комбинации)" означает, что оба лекарственных средства вводят одному и тому же пациенту в определенной временной рамке для достижения терапевтического действия, вызываемого совместным эффектом обоих механизмов действия. Антагонист андрогенового рецептора вводят в тот же день, что антагонист IGF-рецептора или же антагонист андрогенового рецептора вводят на один, два, три, четыре, пять, шесть или семь дней раньше или позже введения антагониста IGF-рецептора.

Оба действующих вещества могут присутствовать в одной и той же фармацевтической композиции. Антагонист андрогенового рецептора (AR-антагонист) представляет собой соединение, которое блокирует передачу сигналов андрогенового рецептора (AR). Антагонисты андрогенового рецептора препятствуют проявлению андрогенами биологических воздействий на чувствительные ткани. Указанные соединения могут изменять путь андрогенов посредством блокады соответствующих рецепторов, конкуренции за сайты связывания на рецепторе, оказывая воздействие на ядерную транслокацию, ДНК-связывание с рецептором, или воздействуя на производство андрогенов.

Антагонистом андрогенового рецептора может быть энзалутамид или абиратерона ацетат.

Энзалутамид (Tan и др., Science 324(5928), 2009, с. 787-790) можно получать, например, от фирм Medivation или Astellas под названием Xtandi®. Энзалутамид предпочтительно вводят в дозе 160 мг один раз ежедневно в течение каждого цикла лечения.

Антагонист андрогенового рецептора может представлять собой абиратерон, например, в форме абиратерона ацетата (Agarwal и др., Future Oncology 6(5), 2010, с. 665-679). Абиратерон можно получать,



например, от фирмы Janssen Biotech, Inc.

Получение, приготовление форм и применение антагониста андрогенового рецептора зависит от фактически выбранного соединения, соответствующую информацию можно почерпнуть из существующего уровня техники. "Терапевтически эффективное количество" антагониста IGF- или андрогенового рецептора, подлежащего введению, представляет собой минимальное количество, необходимое для предупреждения, облегчения или лечения неоплазии предстательной железы, прежде всего кастрационно-резистентного рака предстательной железы или доброкачественной неоплазии предстательной железы.

#### **Примеры Материалы и методы Соединения**

IGF mAb\_1 представляет собой антитело к лиганду IGF, которое содержит тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 40. Его получение описано в WO 2010/066868.

IGF mAb\_2 представляет собой антитело к лиганду IGF, которое содержит тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 30. Его получение описано в WO 2010/066868.

#### **Клеточные культуры**

Клетки линий DU-145 (ATCC, HTB-81), VM-1604 (DSMZ, ACC 298), PC-3 (ATCC, CRL-1435), 22Rv1 (ATCC, CRL-2505), LNCaP (ATCC, CRL-1740) и DUCaP (полученные в лаборатории проф. K.J. Pienta, университет Халлим, медицинский колледж, Сеул, Корея; Lee Y.G. и др., *In Vivo* 15(2), 2001, с. 157-162) культивировали в питательной среде RPMI 1640 (фирма GIBCO, № 31870), дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой сыворотки плода коровы (FCS; фирма JRH, № 12103) и 2 mM L-глутамином (фирма GIBCO, № 25030); Клетки NCI-H660 (ATCC, CRL-5813) выращивали в RPMI, дополненной 5% FCS, 4 mM L-глутамином, 5 мкг/мл инсулина, 0,01 мг/мл трансферрина, 30 нМ селенитом натрия, 10 нМ бета-эстрадиолом и 10 нМ гидрокортизоном. Клетки C4-2 и C4-2b (обе линии по лицензии MD Anderson Cancer Center; Thalmann G.N. и др., *Cancer Res.* 54, 1994, с. 2577-2581) и VCaP (ATCC, CRL-2876) культивировали в среде DMEM (фирма Lonza, № 12-604F), дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой FCS, 2 mM L-глутамином и R1881 (фирма Sigma, № R0908; для клеток VCaP 0,1 нМ и для клеток C4-2/C4-2и 1нМ). Клетки MDA-PCa-2b (ATCC, CRL-2422) выращивали в среде F-12K (фирма GIBCO, № 21127), дополненной 20% инактивированной тепловой обработкой FCS, 25 нг/мл холерного токсина, 0,005 mM этаноламина, 100 пг/мл гидрокортизона и 45 нМ селенистой кислотой. Клетки Bob (ECACC, № 10021102) культивировали в бессывороточной среде для кератиноцитов (keratinocyte-SFM) (фирма Invitrogen, № 37010-022), дополненной предварительно приготовленным человеческим рекомбинантным эпидермальным фактором роста 1-53, экстрактом бычьего гипофиза и глутамином, 2 нг/мл лейкоингибирующего фактора, 2 нг/мл фактора стволовых клеток, 100 нг/мл холерного токсина и 1 нг/мл колониестимулирующего фактора гранулоцитов-макрофагов. Клетки Shmac 4 (ECACC, № 10112302), Shmac 5 (ECACC, № 10112303) и P4E6 (ECACC, № 10112301) выращивали в среде для кератиноцитов Stemline™ II (фирма Sigma, № S0196) с добавкой для роста кератиноцитов (Stemline™ Keratinocyte Growth Supplement) (фирма Sigma, № S9945), 2 mM L-глутамином и 2% FCS. Клетки поддерживали в 75 см<sup>2</sup>-колбах для культуры ткани (фирма Nunc, № 178905) при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2D-анализ клеточной пролиферации**

Описанный ниже метод применяли для определения ингибирующего действия нейтрализующих лиганд IGF МАт и ингибиторов связанной с андрогенами передачи сигналов в отношении роста клеточных линий рака предстательной железы. Анализы осуществляли в питательной среде для клеток, содержащей 10% сыворотки.

Прикрепившиеся клетки отделяли с помощью раствора трипсина/ЭДТК (фирма GIBCO, № 043-9031FU), ресуспендировали в питательной среде, центрифугировали в среде для анализа (дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой FCS и 2 mM L-глутамином) и разводили до 5000-40000 клеток на мл. По 100 мкл/лунку клеточной суспензии добавляли в каждую лунку стерильного плоскодонного белого 96-луночного планшета (фирма PerkinElmer, № 6005280) и планшеты инкубировали в течение ночи во влажной камере при +37°C и 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день супернатанты отсасывали и во все лунки добавляли по 35 мкл/лунку среды для анализа.

Приготавливали серийные разведения IGF mAb\_1 и mAb\_2 (наиболее высокая концентрация 1 мкМ), MDV-3100 (наиболее высокая концентрация 10 мкМ), абиратерона ацетата (наиболее высокая концентрация 100 мкМ) в отдельном планшете в среде для анализа (без добавления факторов роста или гормонов). Все агенты тестировали в виде индивидуальных агентов или в комбинации. Все образцы тестировали, используя взятые в трех повторностях лунки (для анализа применяли 100 мкл/лунку). Планшеты инкубировали в течение 5 дней во влажной камере при +37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После указанного периода инкубации уравнивали температуру CellTiter-Glo-буфера, субстрата и тестируемых планшетов до комнатной температуры (КТ). CellTiter-Glo представляет собой биолюминесцентный анализ (фирма Promega, № G7571), созданный для определения количества жизнеспособных клеток в культуре, в кото-

ром генерация люминесцентного сигнала пропорциональна количеству АТФ, присутствующего в клетке. В каждую лунку добавляли по 100 мкл свежеприготовленного CellTiter-Glo-реагента. После центрифугирования в течение 2 мин на орбитальном шейкере (MTS 2/4, фирма IKA) и 10-минутной инкубации при 37°C определяли люминесценцию (ридер для люминесценции (Genios Pro, Tecan или Victor X4, фирма Perkin Elmer), время интегрирования 1 с).

#### **Получение клеточных лизатов и иммуноблоттинг**

Высевали  $1 \times 10^6$  и  $4 \times 10^6$  клеток в 6-луночные планшеты и 10-сантиметровые чашки соответственно в среду, содержащую 10% инактивированной тепловой обработкой FCS, и после инкубации в течение ночи клетки обрабатывали 1 мкМ MDV-3100 и ЮОнМ IGF mAb\_1 или комбинацией антитела и ингибитора передачи сигналов AR. Через 24 ч клетки лизировали на планшетах, выделяли общий белок и определяли концентрацию белка с помощью анализа Брэдфорда. Клеточные лизаты немедленно замораживали и хранили при  $-80^\circ\text{C}$ .

Вестерн-блоттинг осуществляли, внося 30-50 мкг общих белков лизатов на 4-12% бис-Трис ПААГ (фирма Bio Rad) и осуществляя блоттирование с помощью системы Bio Rad trans-blot® Turbo, используя ПВДФ-мембрану. Мембраны инкубировали в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$  с антителами к следующим белкам: IGF-1R бета (№ 3027, фирма Cell Signaling; 1:1000), p-S473 АКТ (№ 4060, фирма Cell Signaling; 1:2000), АКТ (№ 9272, фирма Cell Signaling; 1:1000), PTEN (№ 9559, фирма Cell Signaling; 1:1000), AR (N-20, № sc-816, фирма Santa Cruz; 1:200), и GAPDH (№ 7298, фирма Cell Signaling; 1:1000) (которые служили в качестве контроля загрузки). Регуляторы клеточного цикла и маркеры пролиферации и апоптоза анализировали, используя следующие антитела: p21 Waf1/Cip1 (12D1; № 2947, фирма Cell Signaling; 1:1000), CDK2 (78B2; № 2546, фирма Cell Signaling; 1:1000), циклин E (C-19; sc-198, фирма Santa Cruz; 1:1000), PCNA (№ 2586, фирма Cell Signaling; 1:2000) и PARP (№ 9542, фирма Cell Signaling; 1:1000).

Разведения антител приготавливали в 5% БСА или 5% обезжиренного сухого молока в TBS-0,5% Tween20 (TBS-T). После промывки в TBS-T мембраны инкубировали с поликлональным конъюгированным с HRP козьим антикроличьим вторичным антителом (фирма DAKO, № P0448) в течение 1 ч и после дополнительной промывки в TBS-T определяли реактивность антител с помощью ECL/Супер ECL (фирма GE Healthcare) и экспонировали на ImageQuant LAS4000. Для обнаружения уровней общего белка мембраны, инкубированные с анти-фосфо-антителами, подвергали стриппингу в буфере для стриппинга ("отшпаривания") для Вестерн-блоттинга (Restore® Western Blot Stripping) (фирма Thermo, № 21059) в течение 15-20 мин, блокировали и инкубировали с антителом к общему белку перед описанной выше обработкой мембраны.

#### **Анализ клеточного цикла с помощью проточной цитометрии**

$4 \times 10^5$  VCaP-клеток обрабатывали 1 мкМ IGF mAb\_1 и 10 мкМ MDV-3100, и комбинацией обоих агентов и инкубировали в 6-луночных планшетах при  $37^\circ\text{C}$  в течение 24, 48 и 72 ч. Затем супернатант переносили в пробирки для FACS, прикрепившиеся клетки отделяли с помощью трипсина и собирали в соответствующие пробирки для FACS. После центрифугирования среду отбрасывали и клеточный дебрис фиксировали в охлажденном на льду 70%-ном этаноле минимум в течение 2 ч при  $4^\circ\text{C}$ . После полного удаления этанола фиксированные клетки окрашивали йодидом пропидия (10 мкг/мл; фирма Sigma; P4864-10 мл) в гипотоническом буферном растворе (0,1% цитрата натрия, 0,1 об.% Тритон X-100, 100 мкг/мл свободной от ДНКазы РНКазы А) и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки анализировали с помощью проточного цитометра Becton Dickinson FACS Canto II и данные анализировали с помощью программы FACS Diva.

#### **Анализ включения тимидина**

VCaP-клетки обрабатывали 1 мкМ IGF mAb\_1 и 10 мкМ MDV-3100 и комбинацией обоих агентов и инкубировали в трех повторностях в плоскодонных 96-луночных планшетах в течение 96 ч при плотности  $5 \times 10^4$  клеток на лунку в отсутствие R1881. Для последней 24-часовой инкубации добавляли 3Н-тимидин (0,4 мКи/лунку; фирма PerkinElmer, NET355001MC). Затем планшеты замораживали и инкубировали при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Для сбора планшеты подвергали оттаиванию и в каждую лунку добавляли 40 мкл трипсина для отделения клеточных фрагментов. Суспензию переносили в фильтрационные планшеты. Затем планшеты промывали трижды дистиллированной водой и сушили при  $60^\circ\text{C}$  в течение 3 ч. Добавляли по 25 мкл на лунку Microscint и определяли уровень пролиферации путем измерения включения тимидина (CPM; число импульсов в мин) с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика (1450 Microbeta Wallac Trilux, фирма Perkin-Elmer).

#### **Анализ времени удвоения клеток**

$3 \times 10^5$  VCaP-клеток/лунку высевали в 2 мл среды для культивирования клеток. Через 24 ч после посева среду для культивирования клеток удаляли и заменяли средой DMEM+10% FCS без R1881. Через 24 ч после обмена сред собирали содержимое предварительно обработанных лунок и подсчитывали количество клеток с помощью устройства Beckman Coulter™ Vi-CELL XR 2.03, и к оставшимся клеткам добавляли 10 мкМ MDV-3100. Четыре раз каждый раз через 24 ч определяли количество VCaP-клеток в 3 лунках в каждый момент времени. Для этих трех повторностей рассчитывали среднюю величину. Для определения времени генерации использовали следующую формулу:

$$\text{время генерации (ч)} = \frac{\log 2 \times \text{время культивирования (ч)}}{\log N - \log N_0}$$

*N*<sub>0</sub>: количество клеток в момент времени *T*<sub>0</sub>

*N*: количество клеток после культивирования

$$\text{время генерации (ч)} = \frac{\log 2 \times \text{время культивирования (ч)}}{\log N - \log N_0}$$

*N*<sub>0</sub>: количество клеток в момент времени *T*<sub>0</sub>

*N*: количество клеток после культивирования

### Оценка активности каспазы 3

Для получения изображений живых клеток, подвергающихся опосредуемому каспазой-3/7 апоптозу при обработке взятыми в различных концентрациях MDV-3100, IGF mAb\_1 и комбинацией обоих агентов, применяли реагент CellPlayer™ 96-Well Kinetic Caspase-3/7 (фирма Essen BioScience; № 4440). Высеивали по 50000 VCaP-клеток/ 100 мкл/ лунку и на следующий день обрабатывали взятыми в соответствующей концентрации обоими агентами в питательной среде в присутствии R1881. Реагент каспаза-3/7 разводили до конечной концентрации 5 мкМ в 100 мкл питательной среды на лунку и добавляли в среду. Планшет помещали в камеру для микропланшетов в устройстве IncuCyte™ 2011A и получали по 3 изображения для каждой лунки каждые 4 ч в течение 7 дней, используя фазово-контрастный и флуоресцентный каналы.

Пример 1. Ингибирующее действие обусловленной IGF и AR блокады передачи сигналов на пролиферацию клеток рака предстательной железы

Для оценки антипролиферативных воздействий ингибирования комбинацией AR и IGF-1/2 десять различных клеточных линий рака предстательной железы (Bob, C4-2, C-4-2B, DUCaP, MDA PCa 2b, P4E6, PC-3, Shmac 4, Shmac 5, VCaP) обрабатывали антагонистом AR MDV-3100 и полностью человеческими моноклональными антителами к лигандам IGF (IGF mAb\_1 и IGF mAb\_2) в виде индивидуальных агентов или в комбинации, осуществляя 2D-анализ клеточной пролиферации (табл. 1). У трех из тестируемых клеточных линий (VCaP и DUCaP - обе клеточные линии выведены из одного и того же страдающего раком предстательной железы пациента из различных пораженных метастазами областей, и MDA PCa 2b) обнаружен антипролиферативный ответ на ингибирование передачи сигналов как AR, так и IGF при индивидуальном применении указанных агентов и более сильный ответ при их применении в комбинации (фиг. 1).

Пример 2. Ингибирующее действие обусловленной IGF блокады передачи сигналов и синтеза андрогенов на пролиферацию клеток рака предстательной железы

В качестве второго подхода к тестированию объединенного потенциала ингибирования андрогенов и передачи сигналов IGF обрабатывали 8 различных клеточных линий рака предстательной железы (22Rv1, VM 1604, DU-145, DUCaP, LNCaP, MDA PCa 2b, PC-3, VCaP) абиратерона ацетатом, который избирательно ингибирует CYP17A и в результате ингибирует синтез de novo андрогенов, индивидуально и в сочетании с нейтрализующими лигандами IGF моноклональными антителами (IGF mAb\_1 и IGF mAb\_2). Результаты этих анализов также позволили идентифицировать клетки VCaP, MDA PCa 2b и DUCaP в качестве единственных клеточных линий, которые реагировали как на обработку индивидуальными агентами, так и их комбинацией. Однако при обработке абиратерона ацетатом требовалось аутокринное производство андрогенов опухолевыми клетками для того, чтобы абиратерона ацетат проявлял антипролиферативное действие. Это может ограничивать количество клеток, чувствительных к обработке абиратерона ацетатом. Результаты 2D- и 3D-анализов пролиферации для VCaP-клеток и 2D-анализа для клеток линий MDA PCa 2b и DUCaP представлены на фиг. 2. Эти данные подтвердили, что при применении абиратерона ацетата в качестве индивидуального агента его действие на клеточную пролиферацию можно повышать путем объединения с антителами, нейтрализующими лигандами IGF.

Пример 3. Присутствие андрогенового рецептора и IGF-1R, а также экспрессия PTEN и wt PIK3CA характеризует клетки рака предстательной железы, чувствительные к комбинации ингибиторов передачи сигналов андрогенов и IGF

На фиг. 3 представлены данные об экспрессии сигнальных белков в клеточных линиях VCaP, MDA PCa 2b и DUCaP, чувствительных к ингибированию передачи сигналов AR и IGF, в сравнении с нечувствительной клеточной линией PC-3. Клетки обрабатывали MDV-3100 и IGF mAb\_1 в качестве индивидуальных агентов или в комбинации в течение 24 ч и белковые лизаты сравнивали с лизатами необработанных контролей в отношении экспрессии белков IGF-1R, AR, PTEN и АКТ-фосфорилирования АКТ-Ser473. Чувствительные линии клеток экспрессировали wt (дикого типа) AR, IGF-1R и PTEN. Эти характеристики отсутствовали в клетках PC-3 или других тестируемых клеточных линиях, у которых не обнаружен антипролиферативный ответ как на обработки индивидуальными агентами, так и комбинацией обоих агентов (табл. 1).

Эти результаты свидетельствуют о том, что в присутствии андрогенового рецептора, IGF-1R и экс-

прессии PTEN (и wt PIK3CA) комбинация ингибиторов передачи сигналов андрогенов и IGF приводила к повышенной эффективности в отношении блокады пролиферации клеток рака предстательной железы *in vitro*.

Пример 4. Пролонгированное ингибирование АКТ-фосфорилирования после комбинированной обработки MDV-3100 и IGF mAb\_1

Воздействие MDV-3100 и МАт к лиганду IGF (IGF mAb\_1) при их применении в качестве индивидуальных агентов и при комбинированной обработке на ингибирование АКТ-фосфорилирования анализировали с помощью Вестерн-блоттинга при обработке от 4 до 120 ч. Комбинация обоих агентов приводила к более полному и длительному ингибированию АКТ-фосфорилирования по сравнению с обработкой одним антителом (фиг. 4).

Пример 5. Объединенная обработка IGF mAb\_1 и MDV-3100 приводит к синергетическому действию в отношении индукции апоптоза в VCaP-клетках

Подтверждая данные, представленные на фиг. 1, результаты, полученные на основе оценки включения тритированного тимидина, которые представлены на фиг. 5, продемонстрировали, что и MDV-3100, и IGF mAb\_1 при их индивидуальном применении обладали ингибирующим действием в отношении клеточной пролиферации (примерно 50%), однако комбинация обоих агентов оказалась существенно более эффективной. Обработка клеток VCaP только IGF mAb\_1 приводила к небольшому повышению апоптоза при оценке с помощью фазово-контрастного микроскопа (фиг. 6А), активности каспазы 3 (фиг. 7), по данным анализа с помощью FACS клеточного цикла (фиг. 8) и анализа расщепления PARP (фиг. 9). В противоположность этому пониженное количество клеток, обнаруженное после обработки только MDV-3100 (фиг. 6А), было результатом пролонгирования времени удвоения клеток (фиг. 6Б). MDV-3100 не индуцировал активность каспазы 3 (фиг. 7), суб-G1-популяции апоптозных клеток (фиг. 8) или расщепления PARP (фиг. 9). Однако при объединении IGF mAb\_1 и MDV-3100 обнаружено синергетическое действие в отношении активности каспазы 3 (фиг. 7), дополнительного увеличения суб-G1-популяции апоптозных клеток (фиг. 8) и расщепленного PARP (фиг. 9).

Пример 6. Предполагаемое исследование IGF mAb\_1 в сочетании с энзалутамидом

#### **Введение**

В этом исследовании предполагается изучать безопасность и противоопухолевую активность IGF mAb\_1 в сочетании с энзалутамидом в сравнении с индивидуальным применением энзалутамида на страдающих CRPC пациентах.

Указанное рандомизированное открытое испытание должно быть проведено для изучения противоопухолевой активности и профиля безопасности комбинации IGF mAb\_1 и энзалутамида ("плечо" А) в сравнении с индивидуальным применением энзалутамида ("плечо" Б). Перед началом рандомизированного опыта должна быть осуществлена фаза Ib для определения переносимости и безопасности для определения максимальной переносимой дозы (MTD) и/или рекомендованной для фазы II дозы в дополнение к любым данным о безопасности.

IGF mAb\_1 следует вводить еженедельно в течение 28-дневных циклов лечения путем однократной внутривенной инфузии в начале каждого цикла лечения. Энзалутамид следует вводить ежедневно путем постоянного орального дозирования в течение каждого цикла лечения.

#### **Предпосылки**

IGF mAb\_1 представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело (HumAt) IgG1-изотипа. Ат связывается с высокой аффинностью с IGF-1 и IGF-2 и в значительной степени нейтрализует запускаемые обоими белками сигналы пролиферации и вероятности выживания.

Энзалутамид является антагонистом андрогенового рецептора, который действует на различных стадиях пути передачи сигналов андрогенового рецептора. Его химическое название 4-{3-[4-циан-3-(трифторметил)фенил]-5,5-диметил-4-оксо-2-сульфанилиденимидазолидин-1-ил}-2-фтор-N-метилбензамид. Молекулярная масса равна 464,44 и молекулярная формула представляет собой C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S. Энзалутамид показан для лечения пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (CRPC).

#### **Схема введения**

IGF mAb\_1 следует вводить еженедельно в течение 28-дневных циклов лечения путем однократной внутривенной инфузии в начале каждого цикла лечения. Энзалутамид следует вводить ежедневно путем постоянного орального дозирования в течение каждого цикла лечения.

#### **Отбор популяции для испытания**

В целом для включения в опыт можно отбирать вплоть для 140 пациентов. Примерно 15-18 пациентов следует включать в фазу I опыта по оценке переносимости и безопасности для гарантии безопасности комбинированной терапии и для определения доз, рекомендованных для фазы II. При осуществлении фазы II опыта следует произвольно разделять 120 пациентов для включения в одно из двух "плечей" опыта, по 60 пациентов, произвольно отобранных для каждого "плеча" ("плечо" А=60, "плечо" Б=60).

Фазу I опыта следует осуществлять в трех или большем количестве центров. Фазу II опыта следует осуществлять в десяти или большем количестве центров в мире.

Протоколирование всех пациентов, включенных в опыт (т.е. давших информированное согласие),

должно поддерживаться в ISF вместе в исследовании вне зависимости от того, лечили ли его исследуемым лекарственным средством или нет.

#### **Основной диагноз для включения в испытание**

Пациенты, подлежащие включению в испытание, должны быть диагностированы и у них гистологически или цитологически должен быть подтвержден метастатический CRPC и они должны были подвергаться терапии первой линии доцетакселом, и после нее у них должно было наблюдаться прогрессирование заболевания. В любых случаях пациенты могли (но это не является обязательным) ранее получать абиратерон или кабазитаксел, лечение которыми было безуспешным.

#### **Критерии включения**

1. У пациента гистологически или цитологически подтверждена аденокарцинома предстательной железы.
2. Пациент представляет собой мужчину возрастом  $\geq 18$  лет.
3. У пациентов радиологически доказан метастатический рак предстательной железы (стадия M1 или D2). Отдаленные метастазы поддаются оценке с помощью радионуклидного сканирования костей, КТ-сканирования или ЯМР-томографии в течение 28 дней от начала исследуемого лечения.
4. Пациенты, у которых несмотря на лечение доцетакселом имеет место прогрессирование заболевания (подтвержденное биохимически, клинически или радиологически) или у которых в пределах 120 дней завершена химиотерапия на основе доцетаксела и для которых по мнению исследователя является маловероятным существенное благоприятное действие дополнительной терапии на основе доцетаксела, или которые не переносили лечение этим средством.
5. У пациентов должно быть доказано развитие заболевания на основе по меньшей мере одного из следующих показателей:
  - а) Поддающееся оценке прогрессирование заболевания: по данным общепринятых критериев для солидных опухолей RECIST 1.1;
  - б) Прогрессирование по данным сканирования костей: наличие по меньшей мере двух новых повреждений при сканировании костей;
  - в) Повышение уровня PSA (простатический антиген): по меньшей мере повышение уровней PSA относительно референс-уровня (PSA № 1) в двух последовательных пробах, взятых по меньшей мере через 1 неделю друг после друга. Требуется, что уровень PSA (PSA № 3) в третьей пробе превышал уровень PSA № 2 (вторая проба); если это не имеет места, то требуется, чтобы уровень PSA в четвертой пробе (PSA № 4) превышал уровень PSA № 2.
6. Пациенты с уровнем PSA  $\geq 2$  нг/мл.
7. Пациенты с предшествующей хирургической или медицинской кастрацией с уровнями сывороточного тестостерона  $< 50$  нг/мл. Если метод кастрации основан на применении агонистов релизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LHRH), то пациент должен продолжать применение агонистов LHRH в процессе протокола лечения.
8. Статус работоспособности согласно критериям Западной кооперативной онкологической научно-исследовательской группы (ECOG PS) 0, 1 или 2.
9. Пациенты имеют соответствующую гематологическую функцию (абсолютное количество нейтрофилов [ANC]  $\geq 1500$ /мкл, гемоглобин  $\geq 9$  г/дл и тромбоциты  $\geq 100000$ /мкл).
10. Пациенты имеют соответствующую печеночную функцию (билирубин  $\leq 1,5$  превышает верхнюю границу нормы (ULN)], аспартаттрансаминаза [AST] и аланинтрансаминаза [ALT]  $\leq 3$  раза относительно ULN, или  $\leq 5$  раз относительно ULN, если присутствуют метастазы в печени).
11. Соответствующая почечная функция (креатинин  $\leq 1,5 \times$  ULN или рассчитанный клиренс креатинина  $> 40$  мл/мин).
12. Белок мочи  $\leq 1+$  при штриховом (дипстик) или обычном анализе мочи (UA). Если штриховой или обычный анализ свидетельствует о протеинурии  $\geq 2+$ , то следует осуществлять сбор 24-часовой мочи и в нем должно быть  $< 1000$  мг белка в течение 24 ч для того, чтобы можно было принимать участие в испытании.
13. Соответствующая функция свертываемости крови (международное стандартизованное соотношение [INR]  $\leq 1,5$  и частичное тромбопластиновое время [PTT]  $\leq 5$  с превышает ULN [если не применяют оральную антикоагулянтную терапию]). Пациенты, получающие антикоагулянтную терапию полными дозами, могут быть включены, если они удовлетворяют всем другим критериям, принимают стабильную дозу орального антикоагулянта или их лечат низкомолекулярным гепарином (за исключением варфарина, применение которого не допускается).
14. Уровень глюкозы в крови натощак  $< 8,9$  ммоль/л ( $< 160$  мг/дл) или HbA1c  $< 8,0\%$ .

#### **Критерии исключения**

1. Пациенты, подвергавшиеся более чем двум предшествующим режимам цитотоксической химиотерапии на основе таксанов по поводу метастатического заболевания. Пациенты с перерывом лечения доцетакселом после второй или третьей схемы лечения доцетакселом, после чего имело место прогрессирования заболевания, могут быть включены в испытание.

2. Пациенты, ранее получавшие энзалутамид, в любом варианте не могут быть включены.
  3. Пациенты, которых ранее лечили абиратероном или кабазитакселом в пределах 4 недель до начала исследуемого лечения.
  4. Пациенты, ранее подвергавшиеся терапии на основе митоксантрона по поводу запущенного рака предстательной железы (разрешается применение митоксантрона перед адъювантной терапией).
  5. Пациенты, которых в пределах 4 недель до начала лечением исследуемыми лекарственными средствами подвергали химиотерапии, иммунотерапии, биологическим терапиям, целенаправленной молекулярной терапии, терапии с использованием гормонов, лучевой терапии (исключением является локализованная лучевая терапия для аналогичной цели или в случае литических повреждений при риске перелома, которая должна быть завершена за 2 недели до исследуемой обработки).
  6. Применение любого находящегося на стадии испытаний лекарственного средства за 4 недели до начала исследуемой обработки или одновременно с указанным испытанием.
  7. Пациенты, которых лечили сильными ингибиторами CYP2C8; сильными или умеренными индукторами CYP3A4 или CYP2C8; субстратами CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19 с узким терапевтическим индексом, в пределах 4 недель до испытания.
  8. Пациенты, имеющие в анамнезе симптоматическую застойную сердечную недостаточность или имеющие перед испытанием подтвержденную на эхограмме или с помощью многофазовой ангиографии (MUGA-сканирование) фракцию выброса левого желудочка (LVEF), которая на  $\geq 10\%$  ниже LLN.
  9. Удлиненный интервал QTcF  $> 450$  мс или удлиненный интервал QT, который является клинически значимым для исследователя (например, синдром врожденного удлиненного интервала QT). QTcF следует рассчитывать как среднюю величину по данным трех ЭКГ, сделанных при скрининге.
  10. Пациенты с мелкоклеточными или нейроэндокринными опухолями.
  11. Пациенты с известными или прогнозируемыми лептоменингеальными метастазами.
  12. Неконтролируемая или плохо контролируемая гипертензия.
  13. Пациенты с плохо контролируемым сахарным диабетом. Пациенты, имеющие в анамнезе диабет, могут участвовать в испытании при условии, что у них уровень глюкозы в крови находится в нормальном диапазоне (натощак  $< 160$  мг/дл или ниже ULN), и они находятся на стабильной диете или терапевтическом режиме, которые приняты при этом состоянии.
  14. Известное заражение вирусом иммунодефицита человека или заболеванием, связанным с синдромом приобретенного иммунодефицита.
  15. Пациенты с эпилепсией, эпилептическими припадками или с предрасполагающими по мнению исследователя факторами эпилептического припадка.
  16. Пациенты, не способные по мнению исследователя соблюдать протокол.
  17. Активное злоупотребление алкоголем или активное злоупотребление наркотиками по мнению исследователя.
  18. Наличие в анамнезе аллергии на человеческие моноклональные антитела.
  19. Предшествующая терапия с использованием агентов, мишенью которых является путь IGF и/или IGF1R.
  20. Пациенты, которые являются сексуально активными и которые не склонны к применению приемлемого с медицинской точки зрения метода контрацепции (такого, например, как имплантаты, инъекционные средства, комбинированные оральные контрацептивы, некоторые внутриматочные устройства или вазэктомированный партнер для участвующих в испытании женщин, презервативы для участвующих в испытании мужчин) в течение всего времени испытания и по меньшей мере в течение трех месяцев после окончания активной терапии. Мужчины, не склонные соглашаться жертвовать спермой в процессе осуществления испытания лекарственного средства и вплоть до 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства.
- Дополнительные критерии исключения для фазы II:
21. Пациенты, которых подвергают необязательной биопсии опухоли, имеющие в анамнезе наследственное нарушение, связанное с кровотечением, или клинический значимый случай большой кровопотери в последние 6 месяцев, по решению исследователя.

#### **Применяемая обработка**

- Субстанция: IGF mAb\_1 - человеческое моноклональное антитело.  
 Фармацевтическая форма: жидкая композиция.  
 Источник: фирма Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG.  
 Стандартная доза: 10 мг/мл IGF mAb\_1 в 20-миллилитровых пузырьках. Для получения требуемой дозы IGF mAb\_1 следует разводить физиологическим раствором хлорида натрия (0,9%).  
 Длительность применения: 1 ч в начале каждой недели (дни 1, 8, 15 и 22) 28-дневного цикла лечения вплоть до прогрессирования заболевания или чрезмерной токсичности. Продолжительность инфузии можно удлинять так, чтобы длительность инфузии составляла свыше 1 ч в случае реакции на инфузию или нежелательных явлений.  
 Путь введения: внутривенный.  
 Начальная доза: общая доза 750 мг (вплоть до 1000 мг) на 1-часовую i.v.-инфузию.

Дополнительная информация: Доза может регулироваться в процессе фазы I при изучении переносимости/безопасности и на фазе отбора дозы.

Субстанция: Энзалутамид (Xtandi®)

Фармацевтическая форма: заполненная жидкостью мягкая желатиновая капсула.

Источник: фирма Astellas.

Стандартная доза: 40 мг

Длительность применения: 160 мг один раз в день в течение каждого цикла лечения.

Путь введения: оральный.

Исходная доза: 160 мг один раз в день.

Дополнительная информация: Доза может регулироваться в процессе фазы I при изучении переносимости/безопасности и на фазе отбора дозы, относительно указанной в обобщении характеристик продукта (SPC).

В таблице представлено обобщение данных о мутациях, экспрессии белка и воздействии ингибирования передачи сигналов андрогенов и IGF, полученных с использованием 15 различных тестируемых клеточных линий рака предстательной железы.

Таблица

Клеточная линия	AR (белок)	IGF-1R (белок)	PTEN (белок)	PI3K (ДНК)	Слияние TMPRSS2	Воздействие ингибирования передачи сигналов AR	Воздействие ингибирования передачи сигналов IGF	Воздействие ингибирования передачи сигналов AR/IGF	Комментарии
22Rv1	+	~	+	mut (Q546R)	-	+	~		
BM-1604	-	+	~	wt	-	+	~		Выведена из DU-145
Bob	-	~	~	mut (I391H)	-	-	-		Спонтанно иммортализованная линия CRPC
C 4-2	+	+	-	wt	-	+	-		Выведенные из LNCaP клеточные линии
C4-2B	+	+	-	wt	-	+	-		(ксенотрансплантаты в кастрированных мышцах)
DU 145	-	+	-	wt	-	-	~		
* DUCaP	+	+	+	wt	ERG	+	+	+++	Выведена из других метастазов того же РСa-пациента, у которого была взята VCaP
LNCaP.FGC	+	+	-	wt	-	+	-		
* MDA PCa 2b	+	+	+	wt	-	+	+	++	
NCI-H660	-	~	-	n.d.	ERG	-	n.d.	n.d.	
P4E6	-	+	~	wt	-	-	-		
PC-3	-	+	-	wt	-	-	-		
Shmac4	-	+	~	wt	-	-	-		
Shmac5	-	+	~	wt	-	-	-		
* VCaP	+	+	+	wt	ERG	+	+	+++	Выведена из других метастазов того же РСa-пациента, у которого была взята DUCaP

Помеченные звездочкой клеточные линии представляют собой чувствительные клеточные линии, экспрессирующие wt AR, wt PI3K, PTEN и IGF-1R.

Сокращения: AR=андрогенный рецептор; IGF-1R=рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; mut=мутантная; n.d.=не определяли; wt=дикий тип.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антагониста рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF) для лечения рака предстательной железы в сочетании с антагонистом андрогенного рецептора, где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 11 (HCDR1), SEQ ID NO: 12 (HCDR2) и SEQ ID NO: 13 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 14 (LCDR1), SEQ ID NO: 15 (LCDR2) и SEQ ID NO: 16 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 21 (HCDR1), SEQ ID NO: 22 (HCDR2) и SEQ ID NO: 23 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 24 (LCDR1), SEQ ID NO: 25 (LCDR2) и SEQ ID NO: 26 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 31 (HCDR1), SEQ ID NO: 32 (HCDR2) и SEQ ID NO: 33 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 34 (LCDR1), SEQ ID NO: 35 (LCDR2) и SEQ ID NO: 36 (LCDR3), и антагонист андрогенного рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат.

2. Применение по п.1, где антагонист IGF рецептора представляет собой антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи,

которая имеет SEQ ID NO: 8, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 18, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 28, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 38.

3. Применение по п.1 или 2, где антагонист IGF рецептора представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 10, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 20, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 30, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 40.

4. Применение по пп.1-3, где рак предстательной железы представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы.

5. Применение по пп.1-4, где антитело содержит тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 40.

6. Способ лечения рака предстательной железы, включающий введение в терапевтически эффективном количестве антагониста IGF-рецептора пациенту, который нуждается в этом, и дополнительного введения в терапевтически эффективном количестве антагониста андрогенного рецептора этому же пациенту в пределах 7 дней до или после введения антагониста IGF-рецептора, где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 11 (HCDR1), SEQ ID NO: 12 (HCDR2) и SEQ ID NO: 13 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 14 (LCDR1), SEQ ID NO: 15 (LCDR2) и SEQ ID NO: 16 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 21 (HCDR1), SEQ ID NO: 22 (HCDR2) и SEQ ID NO: 23 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 24 (LCDR1), SEQ ID NO: 25 (LCDR2) и SEQ ID NO: 26 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 31 (HCDR1), SEQ ID NO: 32 (HCDR2) и SEQ ID NO: 33 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 34 (LCDR1), SEQ ID NO: 35 (LCDR2) и SEQ ID NO: 36 (LCDR3), и антагонист андрогенного рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат.

7. Применение антагониста IGF-рецептора для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака предстательной железы, где антагонист IGF-рецептора подлежит применению в сочетании с антагонистом андрогенного рецептора и где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 11 (HCDR1), SEQ ID NO: 12 (HCDR2) и SEQ ID NO: 13 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 14 (LCDR1), SEQ ID NO: 15 (LCDR2) и SEQ ID NO: 16 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 21 (HCDR1), SEQ ID NO: 22 (HCDR2) и SEQ ID NO: 23 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 24 (LCDR1), SEQ ID NO: 25 (LCDR2) и SEQ ID NO: 26 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 31 (HCDR1), SEQ ID NO: 32 (HCDR2) и SEQ ID NO: 33 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 34 (LCDR1), SEQ ID NO: 35 (LCDR2) и SEQ ID NO: 36 (LCDR3), а антагонист андрогенного рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат.

8. Применение по п.7, где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 8, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 18, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 28, или антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет SEQ ID NO: 38.

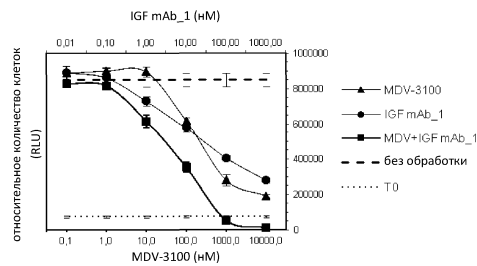
9. Применение по п.7 или 8, где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 10, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 20, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 30, или антитело, содержащее тяжелую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 39, и легкую цепь, которая имеет SEQ ID NO: 40.

10. Фармацевтическая композиция для лечения рака предстательной железы, содержащая антаго-

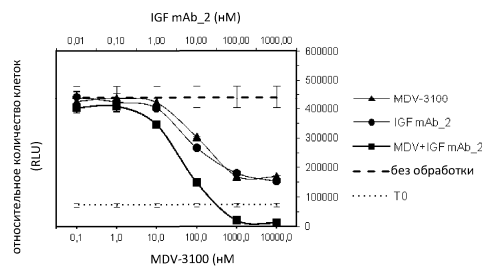


нист IGF-рецептора и антагонист андрогенового рецептора в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, где антагонист IGF-рецептора представляет собой антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 11 (HCDR1), SEQ ID NO: 12 (HCDR2) и SEQ ID NO: 13 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 14 (LCDR1), SEQ ID NO: 15 (LCDR2) и SEQ ID NO: 16 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 21 (HCDR1), SEQ ID NO: 22 (HCDR2) и SEQ ID NO: 23 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 24 (LCDR1), SEQ ID NO: 25 (LCDR2) и SEQ ID NO: 26 (LCDR3), или антитело, содержащее гипервариабельные участки тяжелой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 31 (HCDR1), SEQ ID NO: 32 (HCDR2) и SEQ ID NO: 33 (HCDR3), и гипервариабельные участки легкой цепи, которые имеют SEQ ID NO: 34 (LCDR1), SEQ ID NO: 35 (LCDR2) и SEQ ID NO: 36 (LCDR3), и антагонист андрогенового рецептора представляет собой энзалутамид или абиратерона ацетат.

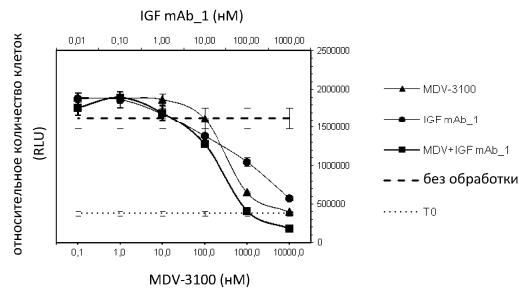
А



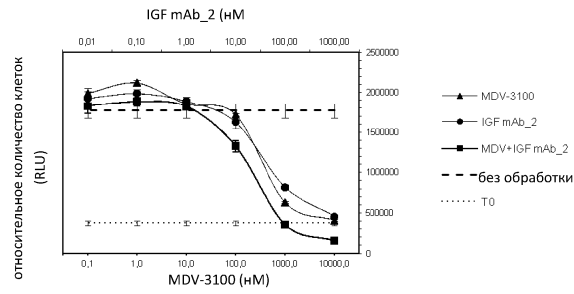
Б



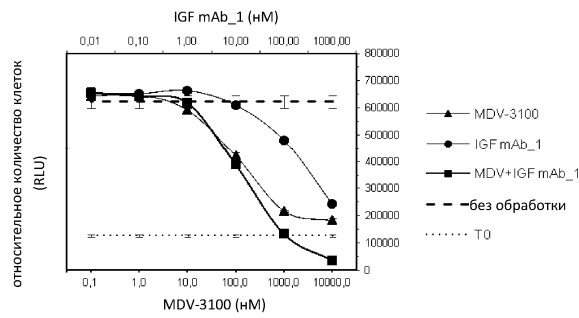
В



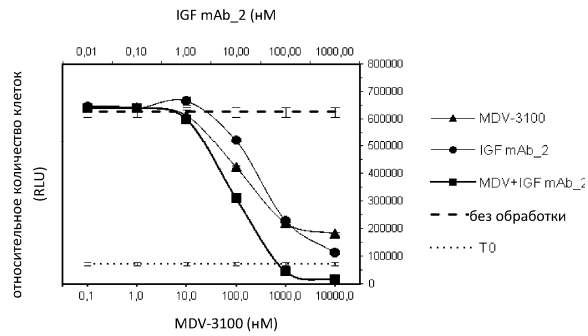
Г



Д

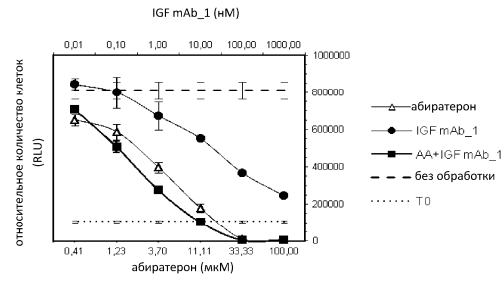


Е

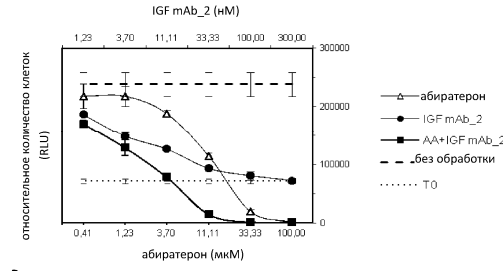


Фиг. 1А-Е

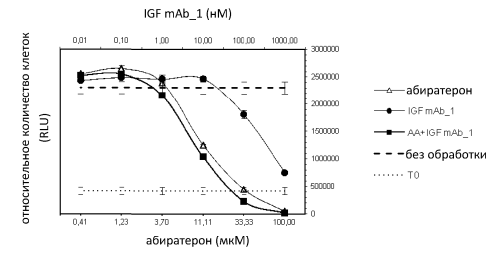
А



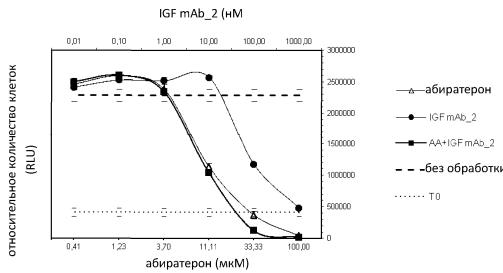
Б



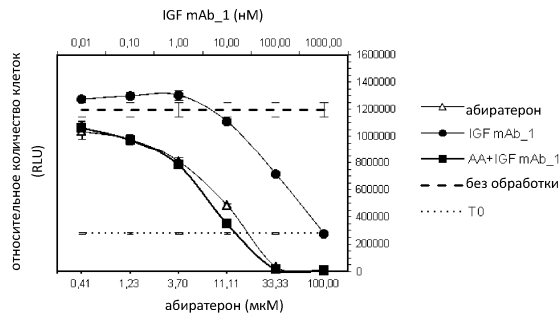
В



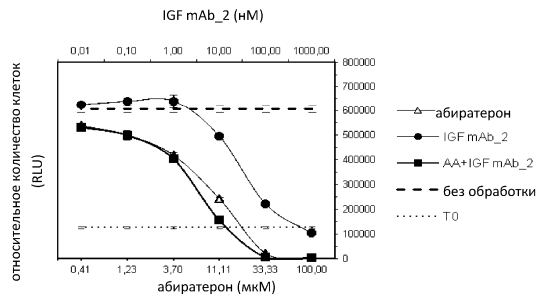
Г



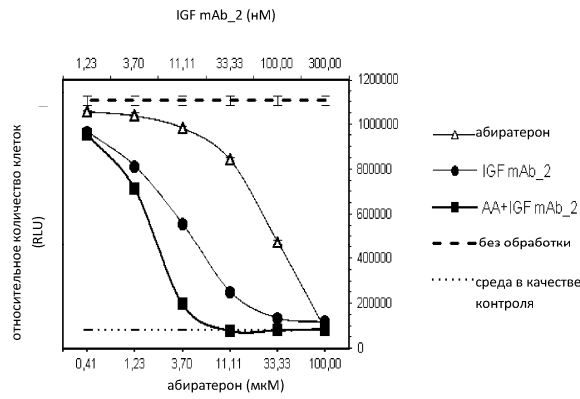
Д



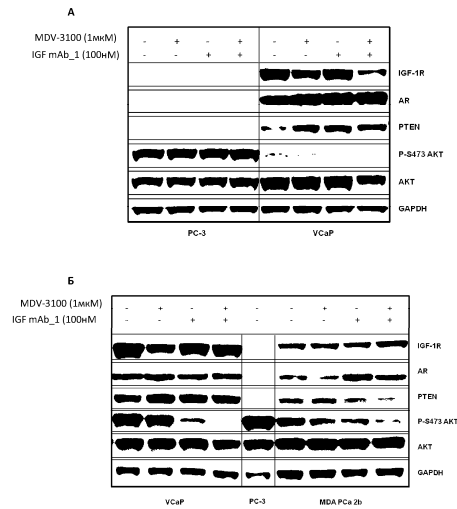
Е

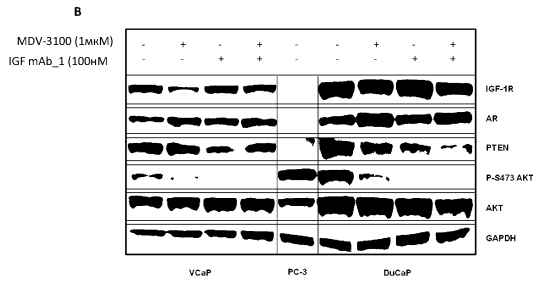


Ж

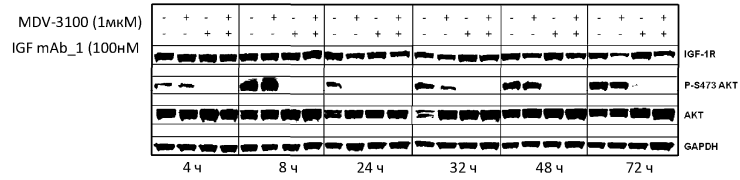


Фиг. 2А-Ж

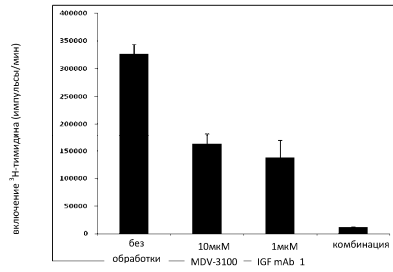




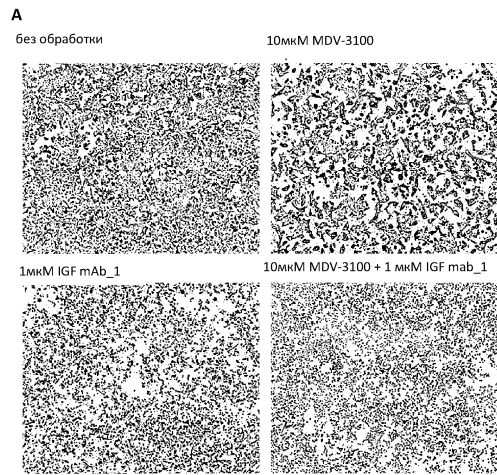
Фиг. 3А-В



Фиг. 4

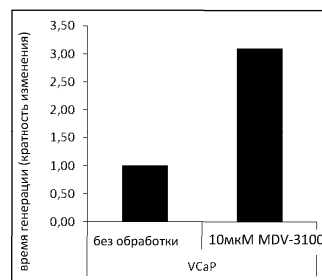


Фиг. 5

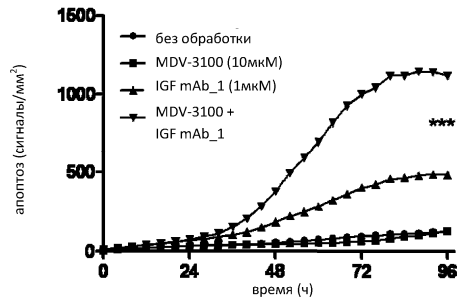


96 ч

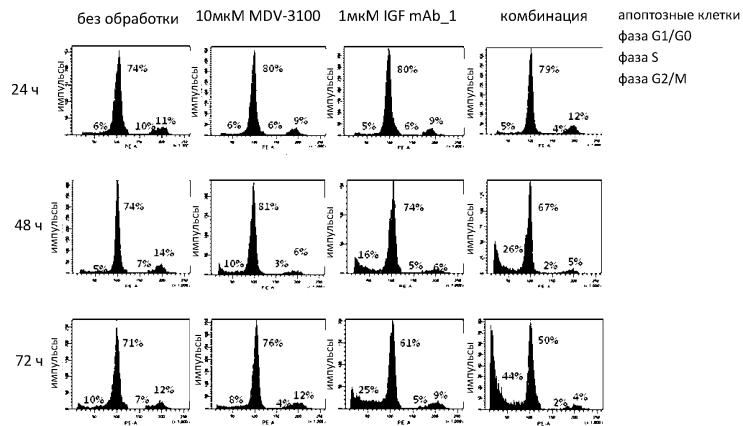
**Б**



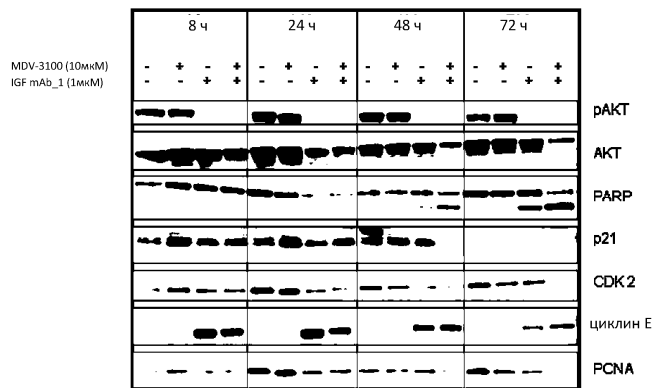
Фиг. 6А-Б



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

