

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092515** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2021.06.21**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.04.20**

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)  
*A61K 31/7068* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)

---

(54) **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ КОНЬЮГАТОМ АНТИ-CD25 АНТИТЕЛО-  
ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

---

(31) 1706252.2; 1706251.4; 1706250.6;  
1706249.8; 1706248.0; 1706247.2;  
1706246.4; 1706245.6; 1805189.6

(32) 2017.04.20; 2017.04.20; 2017.04.20;  
2017.04.20; 2017.04.20; 2017.04.20;  
2017.04.20; 2017.04.20; 2018.03.29

(33) GB

(86) PCT/EP2018/060214

(87) WO 2018/193104 2018.10.25

(71) Заявитель:

**АДС ТЕРАПЬЮТИКС СА (CH);  
МЕДИМЬОН ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:

**Ван Беркель Патрисиус Хендрикус  
Корнелис, Скелтон Лиза, Заммарчи  
Франческа (CH), Фейнголд Джей  
Маршалл (US), Вюртнер Йенс (CH),  
Хартли Джон (GB)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к вариантам комбинированной терапии для лечения патологических состояний, таких как рак. В частности, настоящее изобретение относится к вариантам комбинированной терапии, включающим лечение конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) и вторичным агентом.

---

**A1**

**202092515**

**202092515**

**A1**

# **КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ КОНЬЮГАТОМ АНТИ-CD25 АНТИТЕЛО - ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

## **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании GB1706252.2, GB1706251.4, GB1706250.6, GB1706249.8, GB1706248.0, GB1706247.2, GB1706246.4, GB1706245.6, все из которых поданы 20 апреля 2017 года, и GB1805189.6, поданной 29 марта 2017 года.

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к вариантам (средствам) комбинированной терапии для лечения патологических состояний, таких как рак. В частности, настоящее изобретение относится к вариантам комбинированной терапии, включающим лечение конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) и вторичным агентом.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

### **Терапия антителами**

Терапия антителами (терапевтические средства на основе антител) была разработана для направленного лечения субъектов, страдающих раковым заболеванием, иммунологическими и ангиогенными нарушениями (Carter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357). Применение конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), т.е. иммуноконъюгатов, для местной доставки цитотоксических или цитостатических агентов, т.е. лекарственных средств для уничтожения или подавления клеток опухоли, в лечении рака позволяет направлять доставку компонента, представляющего собой лекарственное средство, в опухоли и его накопление внутри клеток опухоли, тогда как системное введение этих неконъюгированных лекарственных агентов может приводить к уровням токсичности, неприемлемым для здоровых клеток (Xie *et al* (2006) *Expert Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun *et al* (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121; Law *et al* (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337; Wu *et al* (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trail *et al* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614).

### **CD25**

Трансмембранный белок I типа CD25 присутствует на активированных Т- и В-клетках, некоторых тимоцитах, миелоидных клетках-предшественниках и

олигодендроцитах. На активированных Т-клетках он образует гетеродимеры с бета- и гамма-субъединицами (CD122 и CD132), таким образом формируя высокоаффинный рецептор для IL-2. Этот лиганд представляет собой фактор выживания для активированных Т-клеток, поскольку удаление IL-2 приводит к немедленной гибели этих клеток.

В случае В-клеток CD25 физиологически экспрессируется на ранних стадиях развития поздних про-В- и пре-В-клеток. Злокачественные новообразования, возникающие на этой стадии дифференцировки В-клеток, могут, таким образом, также экспрессировать CD25. Поражения тучными клетками также положительны по CD25, который, таким образом, считается ключевым диагностическим критерием для определения системного мастоцитоза. Существуют данные о том, что в случае лимфом Ходжкина CD25 не экспрессируется в клетках Ходжкина/Рид-Штернберга при нодулярной лимфоме Ходжкина с лимфоцитарным преобладанием (НЛХЛП), тогда как этот же тип клеток экспрессирует CD25 на различных уровнях при классических лимфомах Ходжкина смешанно-клеточного типа. Существуют данные о том, что общие уровни экспрессии ниже, чем в лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль (ТЛ), что может приводить к проблемам с демонстрацией CD25 клеток опухоли в этих случаях (Levi et al., Merz et al, 1995).

Также существуют данные об экспрессии антигена-мишени для нескольких В- и Т-клеточных подтипов неходжкинских лимфом, т.е. В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы/хронического лимфоцитарного лейкоза, а также Т-клеточного лейкоза/лимфомы взрослых и анапластической крупноклеточной лимфомы.

CD25 может быть локализован в мембране, при этом некоторый уровень экспрессии наблюдают в цитоплазме. Растворимый CD25 можно также наблюдать вне клеток, например, в сыворотке.

### **Варианты терапевтического применения конъюгатов анти-CD25-ADC**

Была определена эффективность конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего анти-CD25 антитело (анти-CD25-ADC), в лечении, например, рака - см., например, WO2014/057119, WO2016/083468 и WO2016/166341.

Продолжается исследование для дополнительного повышения эффективности, переносимости и клинической применимости конъюгатов анти-CD25-ADC. Для этого авторы настоящего изобретения определили клинически подходящие виды комбинированной терапии, в которых анти-CD25-ADC вводят в комбинации по меньшей мере с одним вторичным агентом.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Авторы настоящего изобретения определили, что введение комбинации ADC и вторичного агента индивидууму обеспечивает неожиданные клинические преимущества.

Соответственно, согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложен способ лечения нарушения у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества ADC и вторичного агента.

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак, такой как лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ), и лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ).

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки.

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, состоящего из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки.

Новообразование-мишень или неопластические клетки-мишени могут представлять собой всю или часть солидной опухоли.

В настоящем описании термин «солидная опухоль» включает солидные гематологические раковые опухоли, такие как лимфомы (лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома), которые более подробно рассмотрены в настоящем описании.

Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, содержащие или состоящие из CD25+ неопластических клеток. Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, инфильтрированные CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия CD25 (т.е. они могут содержать или состоять из CD25- неопластических клеток).

Например, солидная опухоль может представлять собой опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих Т-клеток, таких как инфильтрирующие регуляторные Т-клетки (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., Targ Oncol (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017,

Immunity 46, 1–10; Tanaka, A., et al., Cell Res. 2017 Jan;27(1):109-118). Соответственно, солидная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

ADC может представлять собой анти-CD25-ADC, такой как ADCX25, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTKi), антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, или гипометилирующий агент.

Индивидуум может представлять собой человека. У индивидуума может быть рак или у него может быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть определен CD25+ рак или CD25+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки, такие как CD25+ инфильтрирующие В-клетки.

У индивидуума может быть или у него может быть определен PD-L1+ рак.

В описанных способах ADC может быть введен до вторичного агента, одновременно с вторичным агентом или после вторичного агента. Описанные способы могут включать введение индивидууму дополнительного химиотерапевтического агента.

-----

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена первая композиция, содержащая ADC, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей вторичный агент.

В соответствии с этим аспектом также предложена первая композиция, содержащая вторичный агент, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей ADC.

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак, такой как лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ), и лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз

(ОМЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ).

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки.

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, состоящего из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки.

Новообразование-мишень или неопластические клетки-мишени могут представлять собой всю или часть солидной опухоли.

В настоящем описании термин «солидная опухоль» включает солидные гематологические раковые опухоли, такие как лимфомы (лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома), которые более подробно рассмотрены в настоящем описании.

Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, содержащие или состоящие из CD25+ неопластических клеток. Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, инфильтрированные CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия CD25 (т.е. они могут содержать или состоять из CD25- неопластических клеток).

Например, солидная опухоль может представлять собой опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих Т-клеток, таких как инфильтрирующие регуляторные Т-клетки (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., *Targ Oncol* (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res.* 2017 Jan;27(1):109-118). Соответственно, солидная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

ADC может представлять собой анти-CD25-ADC, такой как ADCX25, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTKi), антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, или гипометилирующий агент.

Индивидуум может представлять собой человека. У индивидуума может быть рак или у него может быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть

определен CD25+ рак или CD25+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки, такие как CD25+ инфильтрирующие В-клетки.

У индивидуума может быть или у него может быть определен PD-L1+ рак.

Первая композиция может быть введена до второй композиции, одновременно со второй композицией или после второй композиции. Лечение может включать введение индивидууму дополнительного химиотерапевтического агента.

-----

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено применение ADC в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит ADC, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент.

В соответствии с этим аспектом также предложено применение вторичного агента в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит вторичный агент, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADC.

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак, такой как лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ), и лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ).

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки.

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, состоящего из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки.

Новообразование-мишень или неопластические клетки-мишени могут представлять собой всю или часть солидной опухоли.

В настоящем описании термин «солидная опухоль» включает солидные гематологические раковые опухоли, такие как лимфомы (лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома), которые более подробно рассмотрены в настоящем описании.

Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, содержащие или состоящие из CD25+ неопластических клеток. Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, инфильтрированные CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия CD25 (т.е. они могут содержать или состоять из CD25- неопластических клеток).

Например, солидная опухоль может представлять собой опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих Т-клеток, таких как инфильтрирующие регуляторные Т-клетки (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., Targ Oncol (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, Immunity 46, 1–10; Tanaka, A., et al., Cell Res. 2017 Jan;27(1):109-118). Соответственно, солидная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

ADC может представлять собой анти-CD25-ADC, такой как ADCX25, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTKi), антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, или гипометилирующий агент.

Индивидуум может представлять собой человека. У индивидуума может быть рак или у него может быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть определен CD25+ рак или CD25+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки, такие как CD25+ инфильтрирующие В-клетки.

У индивидуума может быть или у него может быть определен PD-L1+ рак.

Лекарственное средство может быть введено до композиции, одновременно с композицией или после композиции. Лечение может включать введение индивидууму дополнительного химиотерапевтического агента.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен набор, содержащий:

первое лекарственное средство, содержащее ADC;

второе лекарственное средство, содержащее вторичный агент; и необязательно

листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму первого лекарственного средства в комбинации со вторым лекарственным средством, для лечения нарушения.

В соответствии с этим аспектом также предложен набор, содержащий лекарственное средство, содержащее ADC, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент, для лечения нарушения.

В соответствии с этим аспектом также предложен набор, содержащий лекарственное средство, содержащее вторичный агент, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADC, для лечения нарушения.

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак, такой как лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ), и лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ).

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки.

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, состоящего из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки.

Новообразование-мишень или неопластические клетки-мишени могут представлять собой всю или часть солидной опухоли.

В настоящем описании термин «солидная опухоль» включает солидные гематологические раковые опухоли, такие как лимфомы (лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома), которые более подробно рассмотрены в настоящем описании.

Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, содержащие или состоящие из CD25+ неопластических клеток. Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, инфильтрированные CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия CD25 (т.е. они могут содержать или состоять из CD25- неопластических клеток).

Например, солидная опухоль может представлять собой опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих Т-клеток, таких как инфильтрирующие регуляторные Т-клетки (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., *Targ Oncol* (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res.* 2017 Jan;27(1):109-118). Соответственно, солидная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

ADC может представлять собой анти-CD25-ADC, такой как ADCX25, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTKi), антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, или гипометилирующий агент.

Индивидуум может представлять собой человека. У индивидуума может быть рак или у него может быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть определен CD25+ рак или CD25+ опухолеассоциированные неопухолевыми клетки, такие как CD25+ инфильтрирующие В-клетки.

У индивидуума может быть или у него может быть определен PD-L1+ рак.

Лекарственное средство или композицию, содержащую ADC, можно вводить до лекарственного средства или композиции, содержащей вторичный агент, одновременно с лекарственным средством или композицией, содержащей вторичный агент, или после лекарственного средства или композиции, содержащей вторичный агент. Лечение может включать введение индивидууму дополнительного химиотерапевтического агента.

-----

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложена композиция, содержащая ADC и вторичный агент.

В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения также предложен способ лечения нарушения у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества композиции, содержащей ADC и вторичный агент.

В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения также предложена композиция, содержащая ADC и вторичный агент, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума.

В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения также предложено применение композиции, содержащей ADC и вторичный агент, в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения у индивидуума.

В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения также предложен набор, содержащий композицию, содержащую ADC и вторичный агент, и набор инструкций по введению индивидууму лекарственного средства, для лечения нарушения.

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак, такой как лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ), и лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ).

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки.

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, состоящего из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки.

Новообразование-мишень или неопластические клетки-мишени могут представлять собой всю или часть солидной опухоли.

В настоящем описании термин «солидная опухоль» включает солидные гематологические раковые опухоли, такие как лимфомы (лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома), которые более подробно рассмотрены в настоящем описании.

Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, содержащие или состоящие из CD25+

неопластических клеток. Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, инфильтрированные CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия CD25 (т.е. они могут содержать или состоять из CD25- неопластических клеток).

Например, солидная опухоль может представлять собой опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих Т-клеток, таких как инфильтрирующие регуляторные Т-клетки (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., *Targ Oncol* (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res.* 2017 Jan;27(1):109-118). Соответственно, солидная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

ADC может представлять собой анти-CD25-ADC, такой как ADCX25, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTKi), антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, или гипометилирующий агент.

Индивидуум может представлять собой человека. У индивидуума может быть рак или у него может быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть определен CD25+ рак или CD25+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки, такие как CD25+ инфильтрирующие В-клетки.

У индивидуума может быть или у него может быть определен PD-L1+ рак.

Лечение может включать введение индивидууму дополнительного химиотерапевтического агента.

---

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

### **Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)**

Настоящее изобретение относится к повышению эффективности комбинаций ADC и вторичного агента.

ADC может доставлять лекарственное средство в участок-мишень. Указанный участок-мишень предпочтительно представляет собой популяцию пролиферирующих клеток. Антитело представляет собой антитело для антигена, присутствующего в

популяции пролиферирующих клеток. В соответствии с одним из аспектов антиген отсутствует или присутствует на пониженном уровне в популяции непродлиферирующих клеток по сравнению с количеством антигена, присутствующим в популяции пролиферирующих клеток, например, популяции клеток опухоли.

ADC может содержать линкер, который может расщепляться с высвобождением лекарственного средства в участке-мишени. Лекарственное средство может представлять собой соединение, выбранное из RelA, RelB, RelC, RelD или RelE. Таким образом, конъюгат можно применять для селективной доставки соединения RelA, RelB, Rel C, RelD или RelE в участок-мишень.

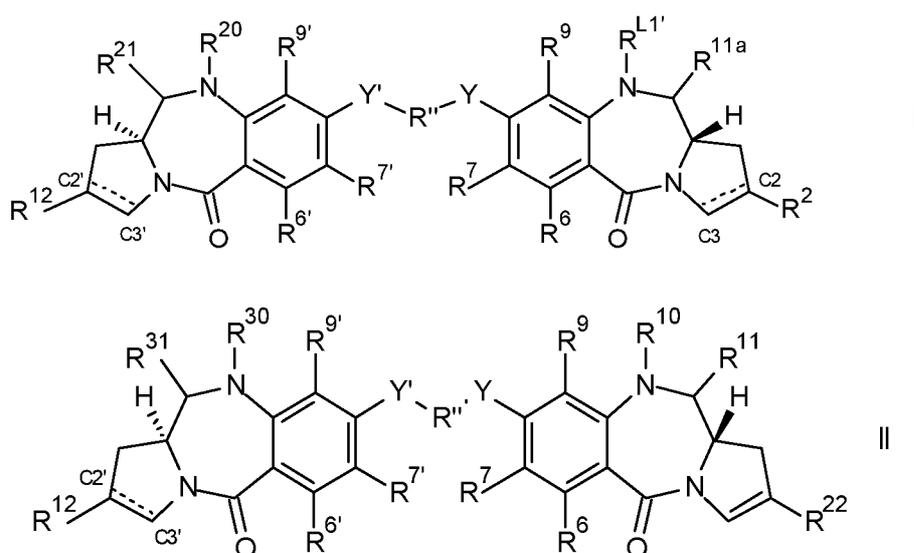
Линкер может расщепляться под действием фермента, присутствующего в участке-мишени.

Настоящее изобретение, в частности, относится к лечению анти-CD25-ADC, описанным в WO2014/057119 и описанным в настоящем документе.

### Конъюгаты анти-CD25-ADC

В настоящем описании термин «CD25-ADC» относится к ADC, в котором компонент, являющийся антителом, представляет собой анти-CD25 антитело. Термин «PBD-ADC» относится к ADC, в котором компонент, являющийся лекарственным средством, представляет собой пирролобензодиазепиновую (PBD) активную группу. Термин «анти-CD25-ADC» относится к ADC, в котором компонент, являющийся антителом, представляет собой анти-CD25 антитело, и компонент, являющийся лекарственным средством, представляет собой PBD-активную группу.

ADC может включать конъюгат формулы L -  $(D^L)_p$ , где  $D^L$  имеет формулу I или II:



где:

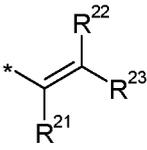
L представляет собой антитело (Ab), которое представляет собой антитело, связывающееся с CD25;

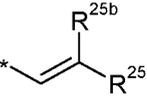
в случае, когда присутствует двойная связь между C2' и C3', R<sup>12</sup> выбран из группы, состоящей из:

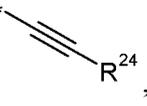
(ia) C<sub>5-10</sub> арильной группы, возможно содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C<sub>1-7</sub> алкил, C<sub>3-7</sub> гетероциклил и бис-окси-C<sub>1-3</sub> алкилен;

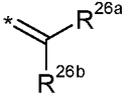
(ib) C<sub>1-5</sub> насыщенного алифатического алкила;

(ic) C<sub>3-6</sub> насыщенного циклоалкила;

(id) , где каждый из R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> и R<sup>23</sup> независимо выбран из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R<sup>12</sup> составляет не более 5;

(ie) , где один из R<sup>25a</sup> и R<sup>25b</sup> представляет собой H, а другой выбран из: фенила, при этом указанный фенил возможно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(if) , где R<sup>24</sup> выбран из: H; C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила; C<sub>2-3</sub> алкенила; C<sub>2-3</sub> алкинила; циклопропила; фенила, при этом указанный фенил возможно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; в случае, когда присутствует одинарная связь между C2' и C3',

R<sup>12</sup> представляет собой , где R<sup>26a</sup> и R<sup>26b</sup> независимо выбраны из H, F, C<sub>1-4</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, при этом алкильная и алкенильная группы возможно содержат в качестве заместителей группу, выбранную из C<sub>1-4</sub> алкиламида и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира; или, если один из R<sup>26a</sup> и R<sup>26b</sup> представляет собой H, другой выбран из нитрила и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира;

R<sup>6</sup> и R<sup>9</sup> независимо выбраны из H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', нитро, Me<sub>3</sub>Sn и галогена;

где R и R' независимо выбраны из возможно содержащей заместители C<sub>1-12</sub> алкильной, C<sub>3-20</sub> гетероциклической и C<sub>5-20</sub> арильной групп;

R<sup>7</sup> выбран из H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NHR', нитро, Me<sub>3</sub>Sn и галогена;

R'' представляет собой C<sub>3-12</sub> алкиленовую группу, цепь которой может прерываться одним или более гетероатомами, например, O, S, NR<sup>N2</sup> (где R<sup>N2</sup> представляет собой H или C<sub>1-4</sub> алкил), и/или ароматическими кольцами, например, бензолом или пиридином;

Y и Y' выбраны из O, S или NH;

R<sup>6'</sup>, R<sup>7'</sup>, R<sup>9'</sup> выбраны из тех же групп, что и R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> и R<sup>9</sup> соответственно;

**[Формула I]**

R<sup>L1'</sup> представляет собой линкер для связи с антителом (Ab);

R<sup>11a</sup> выбран из OH, OR<sup>A</sup>, где R<sup>A</sup> представляет собой C<sub>1-4</sub> алкил, и SO<sub>z</sub>M, где z равен 2 или 3, и M представляет собой одновалентный фармацевтически приемлемый катион;

R<sup>20</sup> и R<sup>21</sup> либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо

R<sup>20</sup> выбран из H и R<sup>C</sup>, где R<sup>C</sup> представляет собой кэпирующую группу;

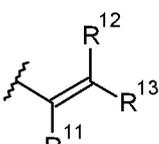
R<sup>21</sup> выбран из OH, OR<sup>A</sup> и SO<sub>z</sub>M;

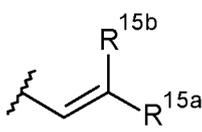
в случае, когда присутствует двойная связь между C2 и C3, R<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из:

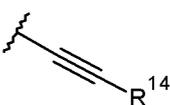
(ia) C<sub>5-10</sub> арильной группы, возможно содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C<sub>1-7</sub> алкил, C<sub>3-7</sub> гетероциклил и бис-окси-C<sub>1-3</sub> алкилен;

(ib) C<sub>1-5</sub> насыщенного алифатического алкила;

(ic) C<sub>3-6</sub> насыщенного циклоалкила;

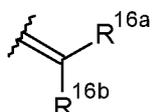
(id)  , где каждый из R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> и R<sup>13</sup> независимо выбран из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R<sup>2</sup> составляет не более 5;

(ie)  , где один из R<sup>15a</sup> и R<sup>15b</sup> представляет собой H, а другой выбран из: фенила, при этом указанный фенил возможно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(if)  , где R<sup>14</sup> выбран из: H; C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила; C<sub>2-3</sub> алкенила; C<sub>2-3</sub> алкинила; циклопропила; фенила, при этом указанный фенил возможно содержит в

качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси, пиридила; и тифенила;

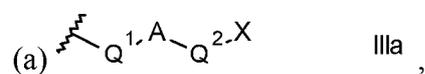
в случае, когда присутствует одинарная связь между C2 и C3,



$R^2$  представляет собой  $R^{16a}$  и  $R^{16b}$ , где  $R^{16a}$  и  $R^{16b}$  независимо выбраны из H, F,  $C_{1-4}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила, при этом алкильная и алкенильная группы возможно содержат в качестве заместителей группу, выбранную из  $C_{1-4}$  алкиламида и  $C_{1-4}$  алкилового сложного эфира; или, если один из  $R^{16a}$  и  $R^{16b}$  представляет собой H, другой выбран из нитрила и  $C_{1-4}$  алкилового сложного эфира;

**[Формула II]**

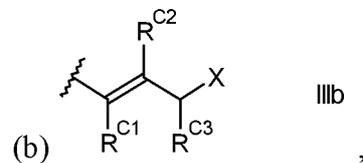
$R^{22}$  имеет формулу IIIa, формулу IIIb или формулу IIIc:



где A представляет собой  $C_{5-7}$  арильную группу и либо

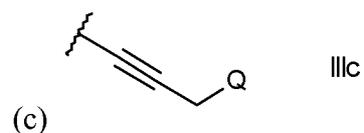
(i)  $Q^1$  представляет собой одинарную связь, и  $Q^2$  выбран из одинарной связи и  $-Z-(CH_2)_n-$ , где Z выбран из одинарной связи, O, S и NH, и n равен от 1 до 3; либо

(ii)  $Q^1$  представляет собой  $-CH=CH-$ , и  $Q^2$  представляет собой одинарную связь;



где:

$R^{C1}$ ,  $R^{C2}$  и  $R^{C3}$  независимо выбраны из H и не содержащего заместители  $C_{1-2}$  алкила;



где Q выбран из  $O-R^{L2'}$ ,  $S-R^{L2'}$  и  $NR^N-R^{L2'}$ , а  $R^N$  выбран из H, метила и этила

X выбран из группы, включающей:  $O-R^{L2'}$ ,  $S-R^{L2'}$ ,  $CO_2-R^{L2'}$ ,  $CO-R^{L2'}$ ,  $NH-C(=O)-R^{L2'}$ ,

$NHNH-R^{L2'}$ ,  $CONHNH-R^{L2'}$ , , ,  $NR^N R^{L2'}$ , где  $R^N$  выбран из группы, включающей H и  $C_{1-4}$  алкил;

$R^{L2'}$  представляет собой линкер для связи с антителом (Ab);

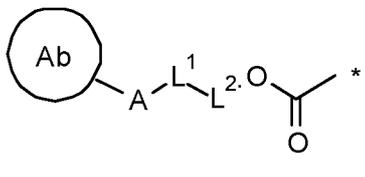
$R^{10}$  и  $R^{11}$  либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо

$R^{10}$  представляет собой H, и  $R^{11}$  выбран из OH,  $OR^A$  и  $SO_2M$ ;

$R^{30}$  и  $R^{31}$  либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо

$R^{30}$  представляет собой H, и  $R^{31}$  выбран из OH,  $OR^A$  и  $SO_2M$ ;

В некоторых вариантах реализации  $L-R^{L1'}$  или  $L-R^{L2'}$  представляет собой группу:

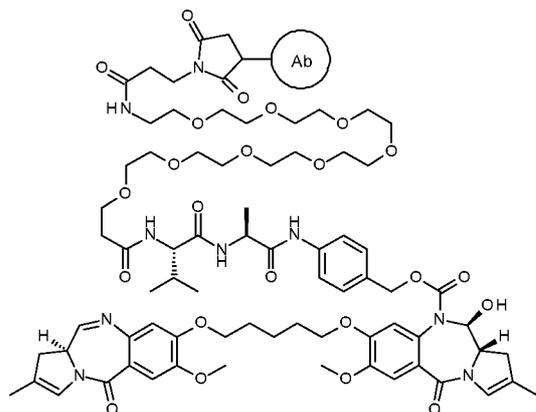


где звездочка показывает точку присоединения к PBD, Ab представляет собой антитело,  $L^1$  представляет собой расщепляемый линкер, A представляет собой связывающую группу, которая связывает  $L^1$  с антителом,  $L^2$  представляет собой ковалентную связь или вместе с  $-OC(=O)-$  образует саморасщепляющийся линкер.

В некоторых из этих вариантов реализации  $L^1$  способен расщепляться под действием ферментов.

Ранее было показано, что такие ADC подходят для лечения раковых опухолей, экспрессирующих CD25 (см., например, WO2014/057119, полное содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки).

Термин «анти-CD25-ADC» может включать любой вариант реализации, описанный в WO 2014/057119. В частности, в предпочтительных вариантах реализации ADC может иметь химическую структуру:



, где Ab представляет собой антитело к CD25, и соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) составляет от 1 до 8.

Антитело может содержать VH-домен, содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 (CDR1) VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 3, VH CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 4 и VH CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 5.

В соответствии с некоторыми аспектами компонент анти-CD25-ADC, являющийся антителом, представляет собой антитело, содержащее: VH-домен, содержащий VH CDR1 с

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 3, VH CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 4 и VH CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 5. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 1.

Антитело может также содержать: VL-домен, содержащий VL CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 6, VL CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 7 и VL CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 8. В некоторых вариантах реализации антитело также содержит VL-домен, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 2.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен и VL-домен, при этом указанные VH- и VL-домены имеют последовательности SEQ ID NO. 1, спаренные с SEQ ID NO. 2.

VH- и VL-домен (домены) могут спариваться с образованием антигенсвязывающего центра антитела, который связывает CD25.

В предпочтительных вариантах реализации антитело представляет собой интактное антитело, содержащее VH-домен и VL-домен, при этом указанные VH- и VL-домены имеют последовательности SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 2.

В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой моноклональное антитело IgG1 полностью человеческого происхождения, предпочтительно IgG1k.

В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой антитело AB12, описанное в WO 2004/045512 (Genmab A/S).

В соответствии с одним из аспектов антитело представляет собой антитело, описанное в настоящем документе, которое было модифицировано (или дополнительно модифицировано), как описано ниже. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой гуманизированный, деиммунизированный или имеющий измененную поверхность вариант антитела, описанного в настоящем документе.

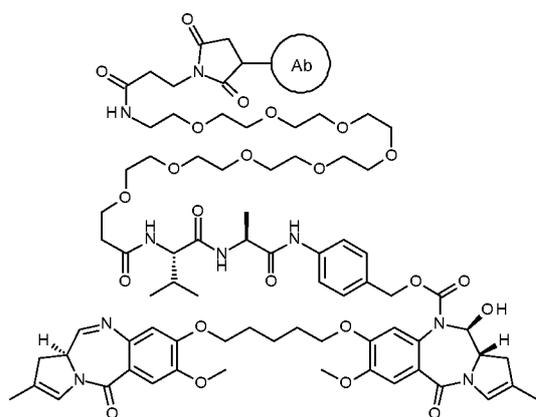
Предпочтительный анти-CD25-ADC для применения в соответствии с аспектами настоящего изобретения представляет собой ADCX25, описанный ниже.

### ADCx25

ADCx25 представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из антитела человека к CD25 человека, присоединенного к пирролобензодиазепиновой (PBD) активной группе через расщепляемый линкер. Механизм действия ADCX25 зависит от связывания CD25. CD25-специфичное антитело направляет конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) к клеткам, экспрессирующим CD25. После связывания ADC

интернализуется и переносится в лизосому, где чувствительный к протеазе линкер расщепляется, и внутри клетки-мишени высвобождается свободный димер PBD. Высвобожденный димер PBD ингибирует транскрипцию селективным в отношении последовательности образом в результате либо прямого ингибирования РНК-полимеразы, либо ингибирования взаимодействия связанных факторов транскрипции. Димер PBD образует ковалентные перекрестные связи, которые не деформируют двойную спираль ДНК и которые не распознаются факторами эксцизионной репарации нуклеотидов, что обеспечивает более длительный эффективный период (Hartley 2011).

Он имеет химическую структуру:



Ab представляет собой антитело AB12 (моноклональное антитело IgG1, К полностью человеческого происхождения с VH- и VL-последовательностями SEQ ID NO. 1 и SEQ ID NO. 2 соответственно, также известное как HuMax-TAC). Его синтезируют, как описано в WO 2014/057119 (Conj AB12-E), и, как правило, он демонстрирует DAR (соотношение лекарственного средства и антитела), составляющее 2,0 +/- 0,3.

### Связывание CD25

В настоящем описании «первый белок-мишень» (FTP) предпочтительно представляет собой CD25.

В настоящем описании термин «связывает CD25» означает, что антитело связывает CD25 с более высокой аффинностью, чем неспецифичный партнер, такой как бычий сывороточный альбумин (BSA, номер доступа Genbank CAA76847, номер версии CAA76847.1 GI: 3336842, дата обновления записи: 7 января 2011 г., 02:30 PM). В некоторых вариантах реализации антитело связывает CD25 с константой ассоциации ( $K_a$ ), которая по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000,  $10^4$ ,  $10^5$  или  $10^6$  раз выше константы ассоциации указанного антитела для BSA, при измерении в физиологических условиях. Антитела согласно настоящему изобретению могут связывать CD25 с высокой аффинностью. Например, в некоторых вариантах реализации антитело может связывать

CD25 с  $K_D$ , равной или меньше примерно  $10^{-6}$  М, такой как равная или меньше одной из:  $1 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$  или  $10^{-14}$ .

В некоторых вариантах реализации полипептид CD25 соответствует номеру доступа Genbank NP\_000408, номер версии NP\_000408.1 GI:4557667, дата обновления записи: 9 сентября 2012 г., 04:59 PM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид CD25, соответствует номеру доступа Genbank NM\_000417, номер версии NM\_000417.2 GI:269973860, дата обновления записи: 9 сентября 2012 г., 04:59 PM. В некоторых вариантах реализации полипептид CD25 соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot P01589.

## **Вторичные агенты**

Недавняя разработка агентов, которые усиливают противоопухолевый иммунитет, обуславливает быстрое изменение лечения широкого спектра раковых опухолей. Однако это лечение не является эффективным при всех видах рака, ответы зачастую бывают непродолжительными, и у многих пациентов лечение оказывает слабый полезный эффект или не оказывает полезного эффекта. В области онкологии преобладает предположение, что только комбинации иммунотерапии с другими вариантами лечения в конечном итоге смогут излечивать пациентов, страдающих раком.

ADC хорошо переносится и активен во всем спектре видов рака, и, вероятно, станет одним из компонентов комбинированной терапии, увеличивающей частоту ответов и продолжительность ответа на лечение. Цель настоящего изобретения заключается в комбинировании ADC с вторичным агентом.

Вторичный агент, описанный в настоящем документе, может представлять собой иммуноонкологическое (ИО) лекарственное средство.

Иммуноонкологические (ИО) лекарственные средства, тип противораковой терапии с опорой на помощь иммунной системы организма в борьбе с раком, продемонстрировали увеличенную продолжительность противоопухолевого ответа. Существуют различные типы ИО, включая, но не ограничиваясь ими, ингибиторы PD1, ингибиторы PD-L1, ингибиторы CLTL4, агонисты GITR и агонисты OX40. Из-за значительной доли пациентов, которых не удается излечить путем иммунотерапии одним агентом и у которых в конечном итоге происходит рецидив, необходимы виды комбинированного лечения альтернативными ИО лекарственными средствами или другими терапевтическими средствами (см. KS Peggs et al.2009, *Clinical and Experimental Immunology*, 157: 9–19 [doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03912.x]; DM Pardoll 2012 [doi:10.1038/nrc3239]).

Иммуногенная гибель клеток (ИГК) представляет собой особую форму гибели клеток, которая стимулирует иммунный ответ на антигены погибших клеток (высвобождаемые погибающими клетками), и считается одним из лучших способов индукции адаптивного иммунного ответа и повышения эффективности противоракового лечения. Зачастую этот процесс субоптимален и требует разработки комбинаторных стратегий, позволяющих восстановить полную иммуногенность гибели клеток для терапевтических целей. Существует несколько противоопухолевых агентов, которые могут индуцировать ИГК, таких как различные антрациклины (включая доксорубин, эпирубин и идарубин), алкилирующие агенты (включая оксалиплатин и циклофосфамид), ингибитор топоизомеразы II митоксантрон и ингибитор протеасом бортезомиб.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, в том числе с PBD активной группой, могут особенно подходить в качестве партнеров для комбинирования, поскольку они более направлены по сравнению с традиционной химиотерапией и, как ожидается, будут обеспечивать большее представление антигена инфильтрирующим Т-клеткам, как было показано для ADC на основе ауристатиона.

Соответственно, комбинирование конъюгатов ADC с ИО обеспечивает двойные полезные эффекты: с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать опухоль, экспрессирующую мишень, что обеспечивает немедленную противоопухолевую активность, а с другой стороны, иммуногенная гибель клеток, индуцируемая ADC-опосредованным уничтожением клеток, может способствовать более сильному и более продолжительному адаптивному иммунному ответу по сравнению с тем, когда ИО вводят в виде одного агента.

Вторичный агент может представлять собой:

- (a) ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTKi), такой как ибрутиниб (Имбрувика), акалабрутиниб/ACP-196, ONO/GS-4059, спебрутиниб/AVL-292/CC-292, HM71224 (поселтиниб) или BGB-3111 (занубрутиниб);
- (b) антагонист PD1, такой как пембролизумаб, ниволумаб, MEDI0680, PDR001 (спартализумаб), камрелизумаб, AUNP12, пидилизумаб, цемиплимаб (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (тислелизумаб) или BGB-108;
- (c) антагонист PD-L1, такой как атезолизумаб (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаб/MEDI4736 или MSB0010718C (авелумаб);
- (d) агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), такой как MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK-4166, BMS-986156 или INCAGN1876;

- (e) агонист OX40, такой как MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 или PF-04518600;
- (f) антагонист CTLA-4, такой как ипилимумаб (торговое название Ервой) или тремелимумаб (первоначально разработанный Pfizer, в настоящее время Medimmune);
- (g) флударабин или цитарабин; или
- (h) гипометилирующий агент, такой как аналоги цитидина, например, 5-азацитидин (азацитидин) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин).

Каждый из этих классов вторичного агента более подробно описан ниже.

### Ингибиторы ВТК

ВТК представляет собой нерецепторную тирозинкиназу, необходимую для развития, дифференцировки и передачи сигнала В-лимфоцитов. Связывание антигена с В-клеточным рецептором антигена (BCR) запускает передачу сигнала, что в конечном итоге приводит к активации В-клеток. После вовлечения и активации BCR на плазматической мембране ВТК фосфорилирует PLCG2 в нескольких сайтах, возбуждая нисходящий (downstream) путь передачи сигнала путем мобилизации кальция, с последующей активацией членов семейства протеинкиназы С (PKC). Фосфорилирование PLCG2 осуществляется в тесном взаимодействии с адаптерным белком - линкерным белком В-клеток BLNK [Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:604-609(1997); Rodriguez et al., J. Biol. Chem. 276:47982-47992(2001)].

ВТК выступает в качестве платформы для объединения широкого круга сигнальных белков и вовлечена в пути передачи сигнала рецепторами цитокинов. Она играет важную роль в функционировании иммунных клеток врожденного, а также адаптивного иммунитета в качестве компонента пути Toll-подобных рецепторов (TLR). TLR-путь выступает в качестве первичной системы наблюдения для детектирования патогенов и имеет критическое значение для активации защиты хозяина [Hogwood et al. J. Immunol. 176:3635-3641(2006)].

Другой ключевой ролью ВТК является регуляция активации TLR9 в В-клетках селезенки. В рамках TLR-пути ВТК индуцирует фосфорилирование тирозина TIRAP, что приводит к распаду TIRAP.

ВТК также играет критическую роль в регуляции транскрипции, поскольку она вовлечена в путь передачи сигнала, связывающий TLR8 и TLR9. В результате активность ВТК индуцирует активность NF-каппа-В, который сам вовлечен в регуляцию экспрессии сотен генов. Другие транскрипционные мишени ВТК включают ARID3A, NFAT и GTF2I;

ВТК необходима для образования функциональных ДНК-связывающих комплексов ARID3A; в то время как временное ВТК-фосфорилирование GTF2I обуславливает транслокацию в ядро для связывания регуляторных энхансерных элементов для модуляции экспрессии генов [Rajaiya, Mol. Cell. Biol. 26:4758-4768(2006)].

ВТК играет двойную роль в регуляции апоптоза.

Термин «ингибитор ВТК» означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая ингибирует активность ВТК. Например, агенты, которые препятствуют киназной активности ВТК с IC<sub>50</sub> от 0,001 мкМ до примерно 2 мкМ.

Ингибирующая активность в отношении ВТК-фермента может быть измерена на основе протокола, предоставленного производителем, с применением Btk (Invitrogen Corporation) и набора Z'-LYTE™ Kinase Assay Kit-Tyr1 peptide (Invitrogen Corporation), содержащего следующие реагенты: пептид Tyr-1, фосфопептид Thy-1, 5x киназный буфер, АТФ, проявляющий реагент В, буфер для проявления и стоп-реагент. 5 мкл/лунка раствора ингибитора ВТК разводят диметилсульфоксидом (ДМСО) или ДМСО, и 10 мкл/лунка раствора смеси субстрат/фермент вносят в 96-луночный аналитический планшет, и проводят реакцию в течение 20 минут при 30°C. Раствор смеси субстрат/фермент готовят путем разведения киназным буфером (DL-дитиотреитол (DTT, 2,7 мМ) и 1,33x киназный буфер)) с получением конечной концентрации пептида Tyr-1, составляющей 4 мкМ, и конечной концентрации ВТК, составляющей 5 нМ. Затем добавляют 5 мкл/лунка аденозинтрифосфата (АТФ, конечная концентрация = 36 мкМ) и проводят реакцию в течение 1 часа при 30°C. По завершении реакции добавляют 10 мкл проявляющего раствора, полученного путем разведения проявляющего реагента В в 128 раз с использованием буфера для проявления, и проводят реакцию в течение еще 1 часа при 30°C. Затем ферментативную реакцию останавливают путем добавлением 10 мкл стоп-раствора. Интенсивность флуоресценции при 445 нм и 520 нм в каждой лунке измеряют с использованием планшет-ридера для измерения флуоресценции Fusion Universal Microplate Analyzer (PerkinElmer Inc.). Процент фосфорилирования определяют с использованием соотношения излучения при 445 нм (излучение кумарина) и излучения при 520 нм (излучение флуоресцеина) в соответствии с протоколом, предоставленным вместе с набором.

Процент ингибирования (%) ингибитором ВТК может быть рассчитан с использованием следующего уравнения.

процент ингибирования (%) фосфорилирования =  $1 - \{(AC - AX)/(AC - AB)\} \times 100$

AX : % фосфорилирования при добавлении ингибитора ВТК

AB : % фосфорилирования без добавления АТФ (холостая проба)

АС : % фосфорилирования при добавлении только ДМСО (контроль)

Значение 50% ингибирования (значение IC50) для ингибитора ВТК может быть определено из кривой ингибирования на основе % ингибирования в каждой концентрации ингибитора ВТК.

ВТКi-ингибитор ибрутиниб (Имбрувика) представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство, которое ковалентно связывается с тирозинкиназой Брутона (ВТК) и которое применяли для лечения В-клеточных раковых опухолей, таких как лимфома из клеток мантийной зоны, хронический лимфоцитарный лейкоз и макроглобулинемия Вальденстрема, форма неходжкинской лимфомы.

Существуют данные о том, что ибрутиниб уменьшает хемотаксис клеток хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) к хемокинам CXCL12 и CXCL13, и ингибирует клеточную адгезию после стимуляции в В-клеточном рецепторе (BCR) (S Ponader et al. 2011, doi:10.1182/blood-2011-10-386417. PMID 22180443.). В дополнение к этому, ибрутиниб понижает модулирует экспрессию CD20 путем направленного воздействия на ось CXCR4/SDF1 (Pavlasova 2016, PMID 27480113). В совокупности эти данные согласуются с механистической моделью, согласно которой ибрутиниб блокирует передачу сигнала BCR, что приводит к апоптозу В-клеток и/или нарушает миграцию и адгезию клеток к защитному микроокружению опухоли.

Существуют данные о том, что в доклинических исследованиях с клетками хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) ибрутиниб способствовал апоптозу, ингибировал пролиферацию, а также препятствовал ответу клеток ХЛЛ на стимулы выживаемости, обеспечиваемые микроокружением (Pavlasova 2016). Это также приводит к снижению уровней Mcl1 (антиапоптотический белок) в злокачественных В-клетках. Обработка активированных клеток ХЛЛ ибрутинибом приводила к ингибированию фосфорилирования тирозина ВТК, а также эффективно подавляла нижележащие пути выживания, активируемые этой киназой, включая ERK1/2, PI3K и NF-κB. Более того, ибрутиниб ингибировал пролиферацию клеток ХЛЛ *in vitro*, эффективно блокируя сигналы выживания, обеспечиваемые извне, клеткам ХЛЛ из микроокружения, включая растворимые факторы (CD40L, BAFF, IL-6, IL-4 и TNF-α), вовлечение фибронектина и контакт со стромальными клетками.

Соответственно, комбинирование ADC, который направленно воздействует на первый белок-мишень (FTP), с ВТКi является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTP-положительные клетки опухоли, в то время как, с другой стороны, ВТКi будет взаимодействовать со злокачественными В-клетками, приводя к ингибированию пролиферации раковых клеток. Наряду с FTP(+)

клетками опухоли FTR-отрицательные клетки опухоли в непосредственной близости от FTR(+) клеток опухоли будут потенциально уничтожаться по механизму «эффект свидетеля» (bystander mechanism) PBD-димера, высвобождаемого после уничтожения FTR(+) клеток. Соответственно, ADC будет непосредственно уничтожать клетки опухоли.

Более того, существуют признаки того, что ВТК<sub>i</sub> уменьшает подвижность клеток опухоли и склоняет регуляторный баланс в этих клетках больше в сторону апоптоза. Полагают, что эти изменения, индуцируемые ВТК<sub>i</sub>, сделают клетки опухоли более чувствительными к прямому и опосредованному уничтожению лекарственными средствами ADC.

Для демонстрации того, что ADC действует синергетически с ВТК<sub>i</sub>, панель линий FTR(+) клеток совместно обрабатывают диапазоном концентраций как ADC, так и ВТК<sub>1</sub>. В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток обрабатывают диапазоном концентраций ВТК<sub>i</sub> или диапазоном концентраций ADC и носителя. После инкубации будут измерять два параметра: количество поверхностного FTR (определяемое путем проточной цитометрии) и цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов MTS). Для определения цитотоксичности жизнеспособность клеток измеряют путем добавления MTS в каждую лунку и инкубации в течение 4 часов при 37°C. Процент жизнеспособности клеток рассчитывают по сравнению с необработанным контролем. Цитотоксическую синергию рассчитывают путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса с использованием программы анализа CalcuSyn.

ВТК<sub>i</sub>, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

- (1) 9-(1-акрилоил-3-азетидинил)-6-амино-7-(4-феноксифенил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он,
- (2) 6-амино-9-{(3R)-1-[(2E)-4-(диметиламино)-2-бутеноил]-3-пирролидинил}-7-(4-феноксифенил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он,
- (3) 9-[(1-акрилоил-4-пиперидинил)метил]-6-амино-7-(4-феноксифенил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он,
- (4) 6-амино-9-[(3R)-1-(2-бутиноил)-3-пирролидинил]-7-(4-феноксифенил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он,
- (5) 6-амино-9-{(3S)-1-[(2E)-4-(диметиламино)-2-бутеноил]-3-пирролидинил}-7-(4-феноксиметил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он,
- (6) 6-амино-7-[4-(3-хлорфеноксифенил)]-9-{(3R)-1-[(2E)-4-(диметиламино)-2-бутеноил]-3-пирролидинил}-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он,

(7) 6-амино-9-[1-(2-бутиноил)-3-пирролидинил]-7-(4-феноксифенил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он и

(8) 6-амино-9-{1-[(2E)-4-(диметиламино)-2-бутиноил]-3-пирролидинил}-7-(4-феноксифенил)-7,9-дигидро-8Н-пурин-8-он.

Предпочтительные ингибиторы ВТК для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении включают (при этом ибрутиниб наиболее предпочтителен):

а) ибрутиниб (Имбрувика)

i. номер CAS → 936563-96-1

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

ii. ссылка NCBI Pubchem → 24821094

(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

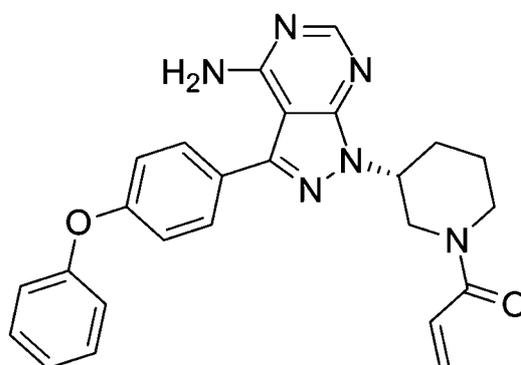
iii. ссылка IUPHAR/BPS → 6912

(см. <http://www.guidetopharmacology.org/>)

iv. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 1X70OSD4VX

(см.

<http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)



**Формула I**, ибрутиниб: 1-[(3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1Н-пирозол[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он

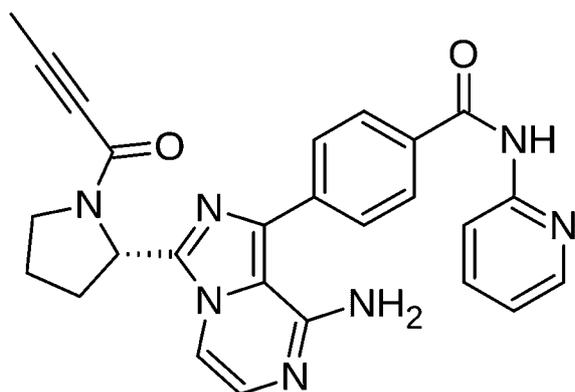
б) акалабрутиниб/АСР-196

i. номер CAS → 1420477-60-6

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

ii. Chemspider → 36764951

(см. <http://www.chemspider.com/>)

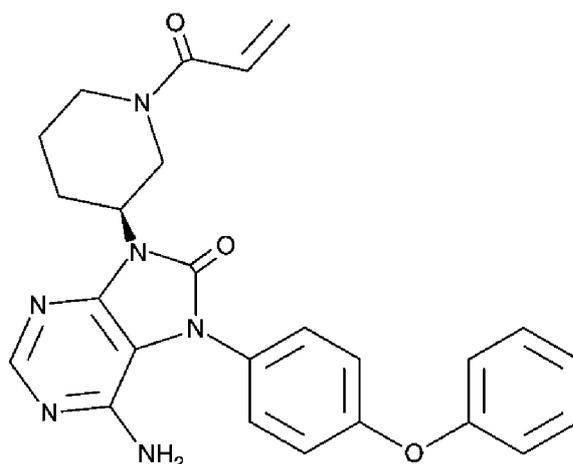


**Формула II, акалбрутиниб:** 4-{8-амино-3-[(2S)-1-(2-бутиноил)-2-пирролидинил]имидазо[1,5-а]пиазин-1-ил}-N-(2-пиридинил)бензамид

c) ONO/GS-4059

i. номер CAS → 1351635-67-0

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)



**Формула III, ONO/GS-4059:** 6-амино-7,9-дигидро-9-[(3S)-1-(1-оксо-2-пропен-1-ил)-3-пиперидинил]-7-(4-феноксифенил)-8H-пурин-8-он

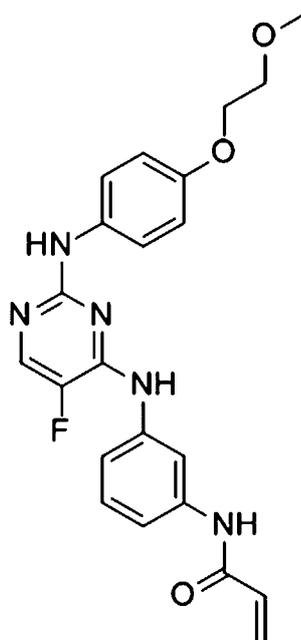
d) спебрутиниб (spebrutinib)/AVL-292/CC-292

i. номер CAS → 1202757-89-8

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

ii. PubChem ID → 59174488

(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

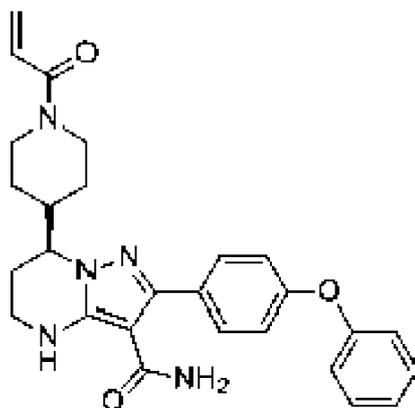


**Формула IV, спебрутиниб:** N-[3-({5-фтор-2-[4-(2-метоксиэтокс)анилино]пиримидин-4-ил}амино)фенил]проп-2-енамид

е) BGB-3111 (занубрутиниб)

і. номер CAS → 1691249-45-2

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

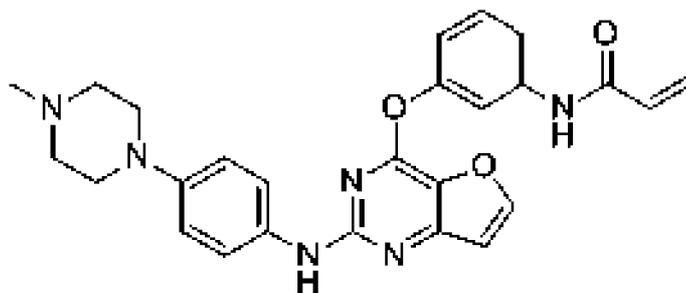


**Формула V, занубрутиниб:** (7S)-4,5,6,7-тетрагідро-7-[1-(1-оксо-2-пропен-1-ил)-4-пиперидинил]-2-(4-феноксифеніл)піразоло[1,5-а]піримідин-3-карбоксамід

ф) NM71224 (поселтиниб)

і. номер CAS → 1353552-97-2

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)



**Формула VI, поселтиниб:** N-(3-((2-((4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил)амино)фуоро[3,2-d]пиримидин-4-ил)оксо)фенил)акриламид

В некоторых вариантах реализации полипептид ВТК соответствует номеру доступа Genbank CAA41728, номер версии CAA41728.1, дата обновления записи: 2 февраля 2011 г., 10:07 AM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид ВТК, соответствует номеру доступа Genbank X58957, номер версии X58957.1, дата обновления записи: 2 февраля 2011 г., 10:07 AM. В некоторых вариантах реализации полипептид ВТК соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot Q06187.

#### Антагонисты PD1

Рецептор запрограммированной гибели клеток I (PD1) представляет собой иммуноингибирующий рецептор, который экспрессируется главным образом на активированных Т- и В-клетках. Было показано, что взаимодействие с его лигандами ослабляет Т-клеточные ответы как *in vitro*, так и *in vivo*. Было показано, что блокада взаимодействия между PD1 и одним из его лигандов, PD-L1, усиливает опухолеспецифический CD8<sup>+</sup> Т-клеточный иммунитет и, следовательно, может способствовать клиренсу клеток опухоли иммунной системой.

PD1 (кодируемый геном Pdc1I) является членом суперсемейства иммуноглобулинов, относящимся к CD28 и CTLA-4. Было показано, что PD1 отрицательно регулирует передачу сигнала антигенным рецептором после вовлечения его лигандов (PD-L1 и/или PD-L2). Была определена структура PD1 мыши, а также сокристаллическая структура PD1 мыши с PD-L1 человека (Zhang, X., et al., (2004) *Immunity* 20: 337-347; Lin, et al., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 301 I-6). PD1 и подобные члены семейства представляют собой трансмембранные гликопротеины I типа, содержащие домен Ig переменного типа (V-типа), ответственный за связывание лигандов, и цитоплазматический концевой сегмент, ответственный за связывание сигнальных молекул. Цитоплазматический концевой сегмент

PD1 содержит два сигнальных мотива на основе тирозина, ITIM (тирозинсодержащий ингибирующий мотив иммунорецептора) и ITSM (тирозинсодержащий переключающий мотив иммунорецептора).

У людей экспрессия PD1 (на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль) и/или PD-L1 (на клетках опухоли) была обнаружена в ряде образцов первичных опухолей, полученных путем биопсии, по оценке иммуногистохимическими методами. Такие ткани включают раковые опухоли легкого, печени, яичников, шейки матки, кожи, толстой кишки, глиому, рак мочевого пузыря, молочной железы, почки, пищевода, желудка, плоскоклеточный рак ротовой полости, уротелиальный рак и рак поджелудочной железы, а также опухоли головы и шеи (Brown, J. A., et al., (2003) *J Immunol.* 170: I257-I266; Dong H., et al., (2002) *Nat. Med.* 8: 793-800; Wintterle, et al., (2003) *Cancer Res.* 63: 7462-7467; Strome, S. E., et al., (2003) *Cancer Res.* 63: 650I-6505; Thompson, R.H., et al., (2006) *Cancer Res.* 66: 338I-5; Thompson, et al., (2007) *Clin. Cancer Res.* 13: I 757-6I; Nomi, T., et al., (2007) *Clin. Cancer Res.* 13: 2I5I-7). Удивительно, что экспрессия PD-лиганда на клетках опухоли коррелировала с неблагоприятным прогнозом у страдающих раком пациентов с различными типами опухолей (рассмотрено в Okazaki and Honjo, (2007) *Int. Immunol.* 19: 813-824).

На сегодняшний день множество исследований продемонстрировали, что взаимодействие PD1 с его лигандами (PD-L1 и PD-L2) приводит к ингибированию пролиферации лимфоцитов *in vitro* и *in vivo*. Блокада взаимодействия PD1/PD-L1 может приводить к усилению опухолеспецифического Т-клеточного иммунитета и, следовательно, способствовать клиренсу клеток опухоли иммунной системой. Для изучения этого вопроса проводили ряд исследований. Терапевтическую эффективность блокады PD1/PD-L1 продемонстрировали в модели агрессивного рака поджелудочной железы у мышей (Nomi, T., et al. (2007) *Clin. Cancer Res.* 13: 2I5I-2I57). Введение либо PD1-, либо PD-L1-направленного антитела в значительной степени ингибировало рост опухоли. Блокада антителом эффективно способствовала инфильтрации опухолерективных CD8+ Т-клеток в опухоль, что приводило к повышающей регуляции противоопухолевых эффекторов, включая IFN-гамма, гранзим В и перфорин. Более того, авторы показали, что блокаду PD1 можно эффективно комбинировать с химиотерапией с обеспечением синергетического эффекта. В другом исследовании с применением модели плоскоклеточной карциномы у мышей PD1- или PD-L1-блокада антителом значительно ингибировала рост опухоли (Tsushima, F., et al., (2006) *Oral Oncol.* 42: 268-274).

Термин «антагонист PD1» означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая стимулирует иммунную реакцию путем ингибирования передачи сигнала PD1.

Для исследования степени повышения, например, активности PD1 пробы или образцы, содержащие конкретный, например, белок, ген, клетку или организм, обрабатывают потенциальным активирующим или ингибирующим агентом и сравнивают с контрольными образцами, обработанными неактивной контрольной молекулой. Контрольным образцам присваивают относительное значение активности, равное 100%. Ингибирования достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 90% или меньше, как правило 85% или меньше, обычно 80% или меньше, чаще 75% или меньше, как правило 70% или меньше, чаще 65% или меньше, чаще всего 60% или меньше, как правило 55% или меньше, обычно 50% или меньше, чаще 45% или меньше, чаще всего 40% или меньше, предпочтительно 35% или меньше, более предпочтительно 30% или меньше, еще более предпочтительно 25% или меньше и наиболее предпочтительно меньше 20%. Активации достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 110%, обычно по меньшей мере 120%, чаще по меньшей мере 140%, чаще по меньшей мере 160%, часто по меньшей мере 180%, чаще по меньшей мере в 2 раза выше, чаще всего по меньшей мере в 2,5 раза выше, обычно по меньшей мере в 5 раз выше, чаще по меньшей мере в 10 раз выше, предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз выше и наиболее предпочтительно более чем в 40 раз выше.

Комбинирование ADC, который направленно воздействует на первый белок-мишень (FTR), с ингибиторами PD1 является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTR-положительные клетки опухоли, в то время как, с другой стороны, ингибитор PD1 будет привлекать собственную иммунную систему пациента к уничтожению раковых клеток. Наряду с FTR(+) клетками опухоли FTR-отрицательные клетки опухоли в непосредственной близости от FTR(+) клеток опухоли будут потенциально уничтожаться по механизму «эффект свидетеля» PBD-димера, высвобождаемого после уничтожения CD25(+) клеток. Соответственно, ADC будет непосредственно уничтожать клетки опухоли.

Достигнутое высвобождение опухлеассоциированных антигенов из клеток, уничтоженных димером PBD, приведет к запуску иммунной системы, которую будут дополнительно усиливать путем применения ингибиторов белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD1), экспрессируемых на большей части лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), из множества разных типов опухолей. Блокада пути PD1 может усиливать противоопухолевые иммунные ответы на антигены, высвобождаемые из опухолей, уничтоженных ADC, путем снижения количества и/или супрессивной активности внутриопухолевых TReg-клеток.

Главной функцией PD1 является ограничение активности Т-клеток во время противовоспалительного ответа на инфекцию и ограничение аутоиммунитета. Индукция экспрессии PD1 происходит, когда активируются Т-клетки, и связывание одного из собственных лигандов ингибирует киназы, вовлеченные в активацию Т-клеток. Соответственно, в окружении опухоли это может приводить к значительной иммунорезистентности, поскольку многие опухоли сильно инфильтрируются TReg-клетками, которые, вероятно, дополнительно подавляют эффекторные иммунные ответы. Этот механизм резистентности ослабляют путем применения ингибиторов PD1 в комбинации с ADC.

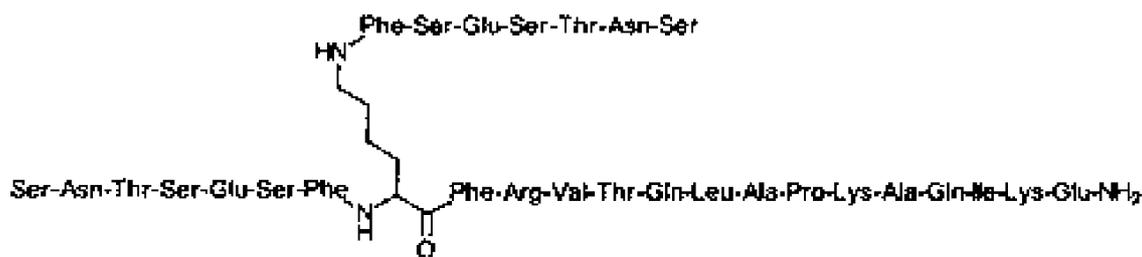
Антагонисты PD1, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

- a) антагонист PD1, который ингибирует связывание PD1 с его партнерами по связыванию, представляющими собой лиганды.
- b) антагонист PD1, который ингибирует связывание PD1 с PD-L1.
- c) антагонист PD1, который ингибирует связывание PD-1 с PDL2.
- d) антагонист PD1, который ингибирует связывание PD-1 как с PDL1, так и с PDL2.
- e) антагонист PD1 из пунктов (a)-(d), который представляет собой антитело.

Конкретные антагонисты PD1, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

- a) пембролизумаб (торговое название Китруда)
  - i. номер CAS → 1374853-91-4  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. ссылка NCBI Pubchem → 254741536  
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)
  - iii. ссылка DrugBank → DB09037  
(см. <https://www.drugbank.ca/>)
  - iv. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → DPT003T46P  
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
- b) ниволумаб (торговое название Опдиво)
  - i. номер CAS → 946414-94-4  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. ссылка DrugBank → DB09035  
(см. <https://www.drugbank.ca/>)

- c) MEDI0680 (ранее AMP-514)
- описанный в WO2014/055648, WO2015/042246, WO2016/127052, WO2017/004016, WO2012/145493, US8609089, WO2016/007235, WO2016/011160; Int. J. Mol. Sci. 2016 Jul; 17(7): 1151, doi: 10.3390/ijms17071151; и Drug Discov Today, 2015 Sep;20(9):1127-34. doi: 10.1016/j.drudis.2015.07.003.
  - см. также клинические исследования NCT02271945 и NCT02013804 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
- d) PDR001 (спартализумаб)
- i. номер CAS → 1935694-88-4  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → QOG25L6Z8Z  
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
  - описанный в WO2016/007235 и WO2016/011160
  - код тезауруса NCI → C121625  
(см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/>)
- e) камрелизумаб [INCSHR-1210] (Incyte)
- i. номер CAS → 1798286-48-2  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 73096E137E  
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
- f) AUNP12 (пептид) (Aurigene/PierreFabre)
- i. описанный в WO2011/161699 как SEQ ID NO:49, также известный как «соединение 8», см. Пример 2 на странице 77 публикации A2 WO2011/161699.
  - ii. номер CAS → 1353563-85-5  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)



или: **SNTSESF-NH**  
**SNTSESFKFRVTQLAPKAQIKE-NH<sub>2</sub>**

- g) пидилизумаб (СТ-01 1)
- i. номер CAS → 1036730-42-3  
 (см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → B932PAQ1BQ  
 (см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
- h) цемиплимаб (ранее REGN-2810, SAR-439684)
- i. номер CAS → 1801342-60-8  
 (см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 6QVL057INT  
 (см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
- описанный в WO2016/007235
  - код тезауруса NCI → C121540  
 (см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/>)
- i) BGB-A317 (тислелизумаб)
- i. описанный в US 9834606 B2
  - ii. см. клиническое исследование NCT03209973 (<https://clinicaltrials.gov/>)
  - iii. код тезауруса NCI C121775  
 (см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/>)
- j) BGB-108
- см. WO2016/000619 и US8735553
- k) AMP-224
- см. клиническое исследование NCT02298946, <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

-----

В некоторых вариантах реализации полипептид PD1 соответствует номеру доступа Genbank AAC51773, номер версии AAC51773.1, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 09:24 AM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид PD1, соответствует номеру доступа Genbank U64863, номер версии U64863.1, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 09:24 AM. В некоторых вариантах реализации полипептид PD1 соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot Q15116.

### Антагонисты PD-L1

Термин «антагонист PD-L1» означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая стимулирует иммунную реакцию путем ингибирования передачи сигнала PD-L1.

Для исследования степени повышения, например, активности PD-L1 пробы или образцы, содержащие конкретный, например, белок, ген, клетку или организм, обрабатывают потенциальным активирующим или ингибирующим агентом и сравнивают с контрольными образцами, обработанными неактивной контрольной молекулой. Контрольным образцам присваивают относительное значение активности, равное 100%. Ингибирования достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 90% или меньше, как правило 85% или меньше, обычно 80% или меньше, чаще 75% или меньше, как правило 70% или меньше, чаще 65% или меньше, чаще всего 60% или меньше, как правило 55% или меньше, обычно 50% или меньше, чаще 45% или меньше, чаще всего 40% или меньше, предпочтительно 35% или меньше, более предпочтительно 30% или меньше, еще более предпочтительно 25% или меньше и наиболее предпочтительно меньше 20%. Активации достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 110%, обычно по меньшей мере 120%, чаще по меньшей мере 140%, чаще по меньшей мере 160%, часто по меньшей мере 180%, чаще по меньшей мере в 2 раза выше, чаще всего по меньшей мере в 2,5 раза выше, обычно по меньшей мере в 5 раз выше, чаще по меньшей мере в 10 раз выше, предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз выше и наиболее предпочтительно более чем в 40 раз выше.

Комбинирование ADC, который направленно воздействует на лимфомы и лейкозы, положительные по первому белку-мишени (FTP), с ингибиторами PD-L1 является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTP-положительные клетки опухоли, в то время как, с другой стороны, ингибитор PD-L1

будет привлекать собственную иммунную систему пациента к уничтожению раковых клеток.

Наряду с FTP(+) клетками опухоли мишень-отрицательные клетки опухоли в непосредственной близости от FTP(+) клеток опухоли будут потенциально уничтожаться по механизму «эффект свидетеля» PBD-димера, высвобождаемого после уничтожения FTP(+) клеток. Соответственно, ADC будет непосредственно уничтожать клетки опухоли. Достигнутое высвобождение опухолеассоциированных антигенов из клеток, уничтоженных димером PBD, приведет к запуску иммунной системы, которую будут дополнительно усиливать путем применения ингибиторов лиганда белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1, также известный как B7-H1 или CD274).

PD-L1 обычно повышающе регулируется на поверхности клеток опухоли во многих различных опухолях человека. Влияние на лиганд PD1, экспрессируемый на опухоли, позволит избежать иммунного ингибирования в микроокружении опухоли, и, следовательно блокада пути PD1 с применением ингибиторов PDL1 может усиливать противоопухолевые иммунные ответы на антигены, высвобождаемые из опухолей, уничтоженных ADC.

Комбинирование ADC, который направленно воздействует на первый белок-мишень (FTP), с ингибиторами PD1 является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTP-положительные клетки опухоли, в то время как, с другой стороны, ингибитор PD1 будет привлекать собственную иммунную систему пациента к уничтожению раковых клеток. Наряду с FTP(+) клетками опухоли FTP-отрицательные клетки опухоли в непосредственной близости от FTP(+) клеток опухоли будут потенциально уничтожаться по механизму «эффект свидетеля» PBD-димера, высвобождаемого после уничтожения CD19(+) или CD22 (+) клеток. Соответственно, ADC будет непосредственно уничтожать клетки опухоли.

Антагонисты PD-L1, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают антагонисты PD-L1, которые:

- (a) представляют собой антагонисты связывания PD-L1;
- (b) ингибируют связывание PD-L1 с PD1;
- (c) ингибируют связывание PD-L1 с B7-1;
- (d) ингибируют связывание PD-L1 как с PD1, так и с B7-1;
- (e) представляют собой анти-PD-L1 антитела.

Конкретные антагонисты PD-L1, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

- a) атезолизумаб (MPDL3280A, торговое название Тецентрик)

- i. номер CAS → 1380723-44-3  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. ссылка DrugBank → DB11595  
(см. <https://www.drugbank.ca/>)
  - iii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 52CMI0WC3Y  
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
- b) BMS-936559/MDX-1105
- I. номер CAS → 1422185-22-5  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - II. см. клиническое исследование NCT02028403, <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
  - III. см. в WO2007/005874 последовательности антител, в частности:
    - i. антитело, содержащее:
      - a. VH CDR1 = DYGFS
      - b. VH CDR2 = WITAYNGNTNYAQLQ
      - c. VH CDR3 = DYFYGM DV
      - d. VL CDR1 = RASQSVSSYLV
      - e. VL CDR2 = DASNRAT
      - f. VL CDR3 = QQRSNWPRT
    - ii. антитело, содержащее:
      - a. VH CDR1 = TYAIS
      - b. VH CDR2 = GIPIFGKAHYA QKFQG
      - c. VH CDR3 = KFHFVSGSPFGMDV
      - d. VL CDR1 = RASQSVSSYLA
      - e. VL CDR2 = DASNRAT
      - f. VL CDR3 = QQRSNWPT
    - iii. антитело, содержащее:
      - a. VH CDR1 = SYDVH
      - b. VH CDR2 = WLHADTGITKFSQKFQG
      - c. VH CDR3 = ERIQLWFDY
      - d. VL CDR1 = RASQGISSWLA
      - e. VL CDR2 = AASSLQS
      - f. VL CDR3 = QQYNSYPYT
- c) дурвалумаб/MEDI4736

- i. номер CAS → 1428935-60-7  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 28X28X9OKV  
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
  - iii. VH-последовательность  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAN  
IKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGG  
WFGELAFDYWGQGTLVTVSS
  - iv. VL-последовательность  
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS  
SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVE  
IK
- d) авелумаб/MSB0010718C
- i. номер CAS → 1537032-82-8  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → KXG2PJ511  
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)

-----

В некоторых вариантах реализации полипептид PD-L1 соответствует номеру доступа Genbank AAF25807, номер версии AAF25807.1, дата обновления записи: 10 марта 2010 г., 10:14 PM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид PD1, соответствует номеру доступа Genbank AF177937, номер версии AF177937.1, дата обновления записи: 10 марта 2010 г., 10:14 PM. В некоторых вариантах реализации полипептид PD1 соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot Q9NZQ7.

### Агонисты GITR

В настоящем описании термин «глюкокортикоид-индуцированный рецептор TNF» (сокращенно обозначаемый в настоящем описании «GITR»), также известный как суперсемейство рецепторов TNF 18 (TNFRSF18, CD357), TEASR и 312C2, относится к

члену семейства рецепторов фактора некроза опухоли/фактора роста нервов. GITR представляет собой трансмембранный белок I типа из 241 аминокислоты, характеризующийся тремя цистеиновыми псевдоповторами во внеклеточном домене, и специфично защищает от апоптоза, индуцируемого Т-клеточными рецепторами, хотя он не защищает клетки от других апоптотических сигналов, включая запуск Fas, обработку дексаметазоном или УФ облучение (Nocentini, G., et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6216-622).

Активация GITR повышает резистентность к опухолям и вирусным инфекциям, вовлечена в аутоиммунные/воспалительные процессы и регулирует экстравазацию лейкоцитов (Nocentini выше; Cuzzocrea, et al. (2004) J Leukoc. Biol. 76:933-940; Shevach, et al. (2006) Nat. Rev. Immunol. 6:613-618; Cuzzocrea, et al. (2006) J Immunol. 177:631-641; и Cuzzocrea, et al. (2007) FASEB J 21:117-129). В моделях опухолей у мышей антитело-агонист GITR, DTA-I, комбинировали с антителом-антагонистом CTLA-4 и оно демонстрировало синергетические эффекты в отношении полной регрессии опухоли в случае опухолей на поздней стадии у некоторых мышей тестируемой группы (Ko, et al. (2005) J Exp. Med. 7:885-891).

Известны последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности GITR человека (hGITR), у которых существует три сплайс-варианта, и их можно найти, например, в GenBank под номерами доступа gi:40354198, gi:23238190, gi:23238193 и gi:23238196.

Термин «агонист GITR» означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая стимулирует иммунную реакцию путем активации передачи сигнала GITR. Также предусмотрены растворимые белки GITR-L, партнер по связыванию GITR.

Для исследования степени повышения, например, активности GITR пробы или образцы, содержащие конкретный, например, белок, ген, клетку или организм, обрабатывают потенциальным активирующим или ингибирующим агентом и сравнивают с контрольными образцами, обработанными неактивной контрольной молекулой. Контрольным образцам присваивают относительное значение активности, равное 100%. Ингибирования достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 90% или меньше, как правило 85% или меньше, обычно 80% или меньше, чаще 75% или меньше, как правило 70% или меньше, чаще 65% или меньше, чаще всего 60% или меньше, как правило 55% или меньше, обычно 50% или меньше, чаще 45% или меньше, чаще всего 40% или меньше, предпочтительно 35% или меньше, более предпочтительно 30% или меньше, еще более предпочтительно 25% или меньше и наиболее предпочтительно меньше 20%. Активации достигают, когда значение активности относительно контроля

составляет примерно 110%, обычно по меньшей мере 120%, чаще по меньшей мере 140%, чаще по меньшей мере 160%, часто по меньшей мере 180%, чаще по меньшей мере в 2 раза выше, чаще всего по меньшей мере в 2,5 раза выше, обычно по меньшей мере в 5 раз выше, чаще по меньшей мере в 10 раз выше, предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз выше и наиболее предпочтительно более чем в 40 раз выше.

Комбинирование ADC, который направленно воздействует на лимфомы и лейкозы, положительные по первому белку-мишени (FTP), с агонистами GITR является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTP-положительные клетки опухоли, в то время как, с другой стороны, агонист GITR будет привлекать собственную иммунную систему пациента к уничтожению раковых клеток. Наряду с FTP(+) клетками опухоли мишень-отрицательные клетки опухоли в непосредственной близости от FTP(+) клеток опухоли будут потенциально уничтожаться по механизму «эффект свидетеля» PBD-димера, высвобождаемого после уничтожения FTP(+) клеток. Соответственно, ADC будет непосредственно уничтожать клетки опухоли. Достигнутое высвобождение опухолеассоциированных антигенов из клеток, уничтоженных димером PBD, приведет к запуску иммунной системы, которую будут дополнительно усиливать путем применения агониста GITR.

GITR (глюкокортикоид-индуцированный TNFR-родственный белок) временно экспрессируется на активированных Т-клетках и конститутивно экспрессируется на высоких уровнях на T-reg с последующей индукцией после активации. Лигирование GITR через его лиганд GITRL стимулирует как пролиферацию, так и функцию как эффекторных, так и регуляторных CD4+ Т-клеток. Это способствует выживаемости Т-клеток и их дифференцировке в эффекторные клетки, и одновременно прекращает супрессию. Соответственно, будет благоприятным направленно воздействовать на FTP(+) опухоль конъюгатом ADC, вызывая гибель антигенных клеток, в то время как агонист GITR индуцирует более сильный продолжительный иммунный ответ.

Конкретные агонисты GITR, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

а) MEDI1873, гибридный белок лиганда GITR, разработанный MedImmune

- см. WO2016/196792, US20160304607

- код тезауруса NCI → C124651

(см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser> )

- см. также клиническое исследование NCT023126110 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

- см. Tigue NJ, Bamber L, Andrews J, et al. MEDI1873, a potent, stabilized hexameric agonist of human GITR with regulatory T-cell targeting potential. *Oncoimmunology*. 2017;6(3):e1280645. doi:10.1080/2162402X.2017.1280645.
- b) INCAGN1876, представляет собой антитело-агонист, направленно воздействующее на глюкокортикоид-индуцированный TNFR-родственный белок или GITR. Открыт во время сотрудничества с Ludwig Cancer Research. INCAGN1876 разрабатывается совместно с
- см. клинические исследования NCT02583165 и NCT03277352 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
- c) TRX518, гуманизованное агликозилированное (Fc «отключен») анти-GITR IgG1 mAb с иммуномодулирующей активностью, разработанное Leap Therapeutics
- см. в WO2006/105021 последовательности 58, 60-63; и в EP2175884 последовательности 1-7:
    - VL, содержащий последовательность (CDR подчеркнута):  
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTNVAWYQQKPGQA  
PRLLIYSASYRYSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDF  
VYYCQYNTDPLTFGGGTKVEIK
    - VH, содержащий последовательность (CDR подчеркнута):  
QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPG  
KALEWLAHIWWDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMN  
MDPVDTATYYCARTRRYFPFAYWGQGTLVTVS
  - см. клинические исследования NCT01239134 и NCT02628574 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
  - код тезауруса NCI → C95023  
(см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser>)
- d) GWN323, агонистическое моноклональное анти-GITR антитело, которое активирует GITR, обнаруживаемый на Т-клетках нескольких видов. GWN323 разработано Novartis
- см. WO2016/196792
  - код тезауруса NCI → C128028  
(см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser>)
  - см. клиническое исследование NCT02740270 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

- е) МК-1248, гуманизированное агонистическое моноклональное антитело (MoAb) IgG4 к глюкокортикоид-индуцированному рецептору фактора некроза опухоли (GITR) человека со значительно сниженной эффекторной функцией
- см. клиническое исследование NCT02553499 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
  - МК-1248 содержит такую же определяющую комплементарную область (CDR), что и МК4166 (см. Sukumar et al., Cancer Res. 2017)
- ф) МК-4166, гуманизированное агонистическое моноклональное антитело (MoAb) IgG1 к глюкокортикоид-индуцированному рецептору фактора некроза опухоли (GITR) человека с потенциальной иммуномодулирующей активностью (см. Sukumar et al., Cancer Res. 2017).
- см. клиническое исследование NCT02132754 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
  - см. Sukumar, et al., (2017), Cancer Research. 77. canres.1439.2016. 10.1158/0008-5472.CAN-16-1439.
  - код тезауруса NCI C116065  
(см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/>)
- г) BMS-986156, агонистическое моноклональное антитело к глюкокортикоид-индуцированному рецептору фактора некроза опухоли (GITR; член 18 суперсемейства факторов некроза опухоли; TNFRSF18; CD357) человека
- см. клиническое исследование NCT02598960 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
  - код тезауруса NCI C132267  
(см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/>)

-----

Последовательности анти-GITR антител-агонистов представлены в WO2011/028683 и WO2006/105021.

-----

В некоторых вариантах реализации полипептид GITR соответствует номеру доступа Genbank AAD22635, номер версии AAD22635.1, дата обновления записи: 10 марта 2010 г., 09:42 PM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид GITR, соответствует номеру доступа Genbank AF125304, номер версии AF125304.1, дата обновления записи: 10 марта 2010 г., 09:42 PM. В некоторых вариантах реализации полипептид GITR соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot Q9Y5U5.

## Агонисты OX40

OX40 (CD134; TNFRSF4) является членом суперсемейства TNFR и экспрессируется CD4 и CD8 Т-клетками во время антигенспецифического примирования. Экспрессия OX40 является в значительной степени временной после перекрестного сшивания TCR/CD3 и происходит в ответ на присутствие воспалительных цитокинов. В отсутствие активирующих сигналов относительно малое число субпопуляций зрелых Т-клеток экспрессируют OX40 на биологически значимых уровнях. Для выработки оптимальных ответов «киллерных» CD8 Т-клеток необходима активация Т-клеточных рецепторов плюс костимуляция, которая может быть обеспечена путем лигирования OX40 с применением агониста OX40. Этот активирующий механизм усиливает дифференцировку и цитолитическую функцию Т-клеток, что приводит к усилению противоопухолевого иммунитета. Соответственно, будет благоприятным направленно воздействовать на FTR(+) опухоль конъюгатом ADC, вызывая гибель антигенных клеток, в то время как агонист OX40 индуцирует более сильный продолжительный иммунный ответ.

Агонист OX40 может быть выбран из группы, состоящей из антитела-агониста OX40, фрагмента агониста OX40L, олигомерного рецептора OX40 и иммуноадгезина OX40. В некоторых вариантах реализации агонист связывания OX40 представляет собой тримерный белок OX40L-Fc.

В некоторых вариантах реализации агонист связывания OX40 представляет собой фрагмент агониста OX40L, содержащий один или более внеклеточных доменов OX40L. В некоторых вариантах реализации агонист связывания OX40 представляет собой антитело-агонист OX40, связывающее OX40 человека. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 истощает клетки, которые экспрессируют OX40 человека. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 истощает клетки, которые экспрессируют OX40 человека, *in vitro*. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой CD4+ эффекторные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой Treg-клетки. В некоторых вариантах реализации истощение происходит посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или фагоцитоза. В некоторых вариантах реализации истощение происходит посредством АЗКЦ. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 связывает OX40 с аффинностью меньше или равной примерно 1 нМ. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 усиливает пролиферацию CD4+ эффекторных Т-клеток и/или повышает выработку цитокинов CD4+ эффекторными Т-клетками по сравнению с пролиферацией и/или выработкой цитокинов до лечения антителом-агонистом OX40 человека. В некоторых

вариантах реализации цитокин представляет собой гамма-интерферон. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 усиливает пролиферацию Т-клеток памяти и/или повышает выработку цитокинов Т-клеткой памяти. В некоторых вариантах реализации цитокин представляет собой гамма-интерферон. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 ингибирует функцию Treg. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 ингибирует Treg-супрессию функции эффекторных Т-клеток. В некоторых вариантах реализации функция эффекторных Т-клеток представляет собой пролиферацию эффекторных Т-клеток и/или выработку цитокинов. В некоторых вариантах реализации эффекторная Т-клетка представляет собой CD4+ эффекторную Т-клетку. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 увеличивает передачу сигнала OX40 в клетке-мишени, экспрессирующей OX40. В некоторых вариантах реализации передачу сигнала OX40 детектируют путем мониторинга нисходящей передачи сигнала NFkB.

Термин «агонист OX40» означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая стимулирует иммунную реакцию путем активации передачи сигнала OX40.

Для исследования степени повышения, например, активности OX40 пробы или образцы, содержащие конкретный, например, белок, ген, клетку или организм, обрабатывают потенциальным активирующим или ингибирующим агентом и сравнивают с контрольными образцами, обработанными неактивной контрольной молекулой. Контрольным образцам присваивают относительное значение активности, равное 100%. Ингибирования достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 90% или меньше, как правило 85% или меньше, обычно 80% или меньше, чаще 75% или меньше, как правило 70% или меньше, чаще 65% или меньше, чаще всего 60% или меньше, как правило 55% или меньше, обычно 50% или меньше, чаще 45% или меньше, чаще всего 40% или меньше, предпочтительно 35% или меньше, более предпочтительно 30% или меньше, еще более предпочтительно 25% или меньше и наиболее предпочтительно меньше 20%. Активации достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 110%, обычно по меньшей мере 120%, чаще по меньшей мере 140%, чаще по меньшей мере 160%, часто по меньшей мере 180%, чаще по меньшей мере в 2 раза выше, чаще всего по меньшей мере в 2,5 раза выше, обычно по меньшей мере в 5 раз выше, чаще по меньшей мере в 10 раз выше, предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз выше и наиболее предпочтительно более чем в 40 раз выше.

Комбинирование ADC, который направленно воздействует на лимфомы и лейкозы, положительные по первому белку-мишени (FTR), с агонистами OX40 является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTR-положительные клетки опухоли, в то время как, с другой стороны, агонист OX40 будет привлекать собственную иммунную систему пациента к уничтожению раковых клеток. Наряду с FTR(+) клетками опухоли мишень-отрицательные клетки опухоли в непосредственной близости от FTR(+) клеток опухоли будут потенциально уничтожаться по механизму «эффект свидетеля» PBD-димера, высвобождаемого после уничтожения FTR(+) клеток. Соответственно, ADC будет непосредственно уничтожать клетки опухоли. Достигнутое высвобождение опухолеассоциированных антигенов из клеток, уничтоженных димером PBD, приведет к запуску иммунной системы, которую будут дополнительно усиливать путем применения агониста OX40.

Конкретные агонисты OX40, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

- a) MEDI0562 (также известный как таволиксизумаб, таволимаб)
  - i. номер CAS → 1635395-25-3  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 4LU9B48U4D  
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
- см. клиническое исследование NCT02318394 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
- описанный в WO2015/095423, WO2015/153514, WO2016/073380 и WO2016/081384
- код тезауруса NCI → C120041  
(см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/> )

- Последовательность тяжелой цепи:  
 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEIYIGYIS  
 YNGITYHNPSLKSRTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDG  
 GHAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP  
 EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH  
 KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT  
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
 VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- Последовательность легкой цепи:  
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSK  
 LHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEI  
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG  
 NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
 NRGEC

b) MEDI6383 (эфизонеримод альфа (Efizonerimod alfa))

- i. номер CAS → 1635395-27-5  
 (см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 1MH7C2X8KE  
 (см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
- см. клиническое исследование NCT02221960 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
  - описанный в WO2015/095423, WO2016/081384 и WO2016/189124
  - код тезауруса NCI → C118282  
 (см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/>)
  - Аминокислотная последовательность (Seq ID no.17 из WO2016/189124):  
 ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPE  
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQQDWLNGKEYK  
 KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS  
 VMHEALHNHYTQKSLSLGLGKDKIEALSSKVQQLERSIGLKDGLAMADLE  
 QKVLEMEASTQVSHRYPRIQSIKVFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNS

VIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTY  
KDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL

- c) MOXR0916 (также известный как RG7888, погализумаб (Pogalizumab)), гуманизированное моноклональное анти-OX40 антитело
- i. номер CAS → 1638935-72-4  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → C78148TF1D  
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
  - iii. код тезауруса NCI → C121376  
(см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/>)
- d) OX40mAb24 (9B12)
- i. OX40mAb24 представляет собой гуманизированный вариант 9B12. 9B12 представляет собой анти-OX40 mAb IgG1 мыши, направленное против внеклеточного домена OX40 человека (CD134) (Weinberg, A.D., et al. J Immunother 29, 575-585 (2006)).
  - ii. см. в WO2016/057667 Seq ID no.59 для VH-последовательности OX40mAb24, no.29 для VL-последовательности (no.32 представляет собой альтернативный VL):  
VH-последовательность  
QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTLCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGGLEYIGYIS  
YNGITYHNPSLKSRTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDG  
GHAMDYWGQGTLVTVSS  
VL-последовательность  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSK  
LHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFTGQGTKVEI  
K
- e) INCAGN1949
- i. см. Gonzalez et al. 2016, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-3204
  - ii. см. клиническое исследование NCT02923349 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
  - iii. последовательности антител описаны в WO2016/179517 A1:
    - i. в частности, антитело, содержащее последовательности:  
VH CDR1 → GSAMH  
VH CDR2 → RIRSKANSYATAYAASVKG

VH CDR3 → GIYDSSGYDY  
VL CDR1 → RSSQSLLSNGYNYLD  
VL CDR2 → LGSNRAS  
VL CDR3 → MQALQTPLT

ii. например, антитело, содержащее последовательности:

VH →  
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGK  
GLEWVGRIRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNS  
LKTEDTAVYYCTSGIYDSSGYDYWGQGLTVTVSS  
VL →  
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKP  
GQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV  
YYCMQALQTPLTFGGGTKVEIK

g) GSK3174998, гуманизированное агонистическое IgG1 моноклональное анти-OX40 антитело (mAb)

- см. клиническое исследование NCT02528357 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

h) PF-04518600 (PF-8600) представляет собой исследуемое моноклональное антитело (mAb) полностью человеческого происхождения, направленно воздействующее на белок OX40

- см. патент [WO 2017/130076 A1](https://patents.google.com/patent/WO2017130076A1)

- см. клиническое исследование NCT02315066 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

- код тезауруса NCI → C121927

(см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/> )

-----

В некоторых вариантах реализации полипептид OX40 соответствует номеру доступа Genbank CAA53576, номер версии CAA53576.1, дата обновления записи: 2 февраля 2011 г., 10:10 AM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид OX40, соответствует номеру доступа Genbank X75962, номер версии X75962.1, дата обновления записи: 2 февраля 2011 г., 10:10 AM. В некоторых вариантах реализации полипептид OX40 соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot P43489.

#### Антагонист CTLA

CTLA4 (CD152) экспрессируется на активированных Т-клетках и служит в качестве коингибитора для контроля Т-клеточных ответов после CD28-опосредованной активации Т-клеток. Полагают, что CTLA4 регулирует амплитуду ранней активации наивных Т-

клеток и Т-клеток памяти после вовлечения TCR и является частью центрального ингибиторного пути, который отрицательно влияет как на противоопухолевый иммунитет, так и на аутоиммунитет. CTLA4 экспрессируется исключительно на Т-клетках, и экспрессия его лигандов CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2) сильно ограничена антигенпредставляющими клетками, Т-клетками и другими опосредующими иммунитет клетками. Существуют данные о том, что антагонистические анти-CTLA4 антитела, которые блокируют путь передачи сигнала CTLA4, усиливают активацию Т-клеток. Одно из таких антител, ипилимумаб, было одобрено FDA в 2011 году для лечения метастатической меланомы. Другое анти-CTLA4 антитело, тремелимумаб, тестировали в исследованиях III фазы для лечения меланомы на поздней стадии, но оно значительно не увеличивало общую выживаемость пациентов по сравнению со стандартом лечения (темозоломид или дакарбазин) в то время.

Термин «антагонист CTLA4» означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая стимулирует иммунную реакцию путем ингибирования передачи сигнала CTLA4.

Для исследования степени повышения, например, активности CTLA4 пробы или образцы, содержащие конкретный, например, белок, ген, клетку или организм, обрабатывают потенциальным активирующим или ингибирующим агентом и сравнивают с контрольными образцами, обработанными неактивной контрольной молекулой. Контрольным образцам присваивают относительное значение активности, равное 100%. Ингибирования достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 90% или меньше, как правило 85% или меньше, обычно 80% или меньше, чаще 75% или меньше, как правило 70% или меньше, чаще 65% или меньше, чаще всего 60% или меньше, как правило 55% или меньше, обычно 50% или меньше, чаще 45% или меньше, чаще всего 40% или меньше, предпочтительно 35% или меньше, более предпочтительно 30% или меньше, еще более предпочтительно 25% или меньше и наиболее предпочтительно меньше 20%. Активации достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 110%, обычно по меньшей мере 120%, чаще по меньшей мере 140%, чаще по меньшей мере 160%, часто по меньшей мере 180%, чаще по меньшей мере в 2 раза выше, чаще всего по меньшей мере в 2,5 раза выше, обычно по меньшей мере в 5 раз выше, чаще по меньшей мере в 10 раз выше, предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз выше и наиболее предпочтительно более чем в 40 раз выше.

Комбинирование ADC, который направлен на воздействие на лимфомы и лейкозы, положительные по первому белку-мишени (FTP), с ингибиторами CTLA4 является

предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTP-положительные клетки опухоли, в то время как, с другой стороны, ингибитор CTLA4 будет привлекать собственную иммунную систему пациента к уничтожению раковых клеток. Наряду с FTP(+) клетками опухоли мишень-отрицательные клетки опухоли в непосредственной близости от FTP(+) клеток опухоли будут потенциально уничтожаться по механизму «эффект свидетеля» PBD-димера, высвобождаемого после уничтожения FTP(+) клеток. Соответственно, ADC будет непосредственно уничтожать клетки опухоли. Достигнутое высвобождение опухлеассоциированных антигенов из клеток, уничтоженных димером PBD, приведет к запуску иммунной системы, которую будут дополнительно усиливать путем применения ингибиторов CTLA4, экспрессируемых на большей части лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), из множества разных типов опухолей.

Основная функция CTLA4 (CD152) заключается в регуляции амплитуды ранних стадий активации Т-клеток, и в этом качестве он препятствует активности костимулирующего рецептора Т-клеток, CD28, в микроокружении опухоли. Соответственно, блокада пути CTLA4 может усиливать активность эффекторных CD4+Т-клеток с одновременным ингибированием иммуносупрессии, зависимой от TReg-клеток. Соответственно, будет благоприятным направленно воздействовать на FTP(+) опухоль конъюгатом ADC, вызывая гибель антигенных клеток, в то время как блокада CTLA4 индуцирует более сильный продолжительный иммунный ответ.

Конкретные антагонисты CTLA4, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

a) ипилимумаб

- i. номер CAS → 477202-00-9

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

- ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 6T8C155666

(см.

<http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)

b) тремелимумаб

- i. номер CAS → 745013-59-6

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

- ii. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → QEN1X95CIX

(см.

<http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)

iii. VH-последовательность

GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYY  
YGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG  
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH [SEQ ID NO. 1]

iv. VL-последовательность

PSSLASVGDRTITCRASQSINSYLDWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV [SEQ ID NO. 2]

-----

В некоторых вариантах реализации полипептид CTLA соответствует номеру доступа Genbank AAL07473, номер версии AAL07473.1, дата обновления записи: 11 марта 2010 г., 01:28 AM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид CTLA4, соответствует номеру доступа Genbank AF414120, номер версии AF414120.1, дата обновления записи: 11 марта 2010 г., 01:28 AM. В некоторых вариантах реализации полипептид OX40 соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot P16410.

### Флударабин и цитарабин

Комбинация агентов, обладающих различными механизмами действия, представляет собой установленный принцип лечения для борьбы с раком. Она может являться способом повышения противоопухолевой активности, когда проявляется синергетический эффект и/или когда наблюдают пониженную токсичность. Конъюгаты антитело-лекарственное средство, в том числе с PBD активной группой, могут особенно подходить в качестве партнеров для комбинирования, поскольку они являются более нацеленными по сравнению с традиционной химиотерапией. Поскольку димеры PBD перекрестно сшивают ДНК ковалентно, комбинирование их с другими агентами, которые нарушают синтез ДНК по другому механизму, вероятно, обеспечивает полезный эффект. Примерами таких потенциальных комбинаций являются флударабин и цитарабин.

### Флударабин

Флударабин или фосфат флударабина (Флудара) представляет собой химиотерапевтическое лекарственное средство, применяемое в лечении гематологических злокачественных новообразований, таких как лейкозы и лимфомы. Он является аналогом пурина, который нарушает синтез ДНК, препятствуя действию рибонуклеотидредуктазы (RNAR) и ДНК-полимеразы. Он активен в отношении как делящихся, так и дремлющих клеток. Также было показано, что флударабин подавляет транскрипцию ERCC1, и это может объяснить наблюдаемую синергию между флударабином и димером PBD SJG136 (SG2000) в отношении клеток хронического лимфоцитарного лейкоза. CLAG/CLAG-M—кладрибин представляет собой еще один аналог пурина, который ингибирует RNR.

Комбинирование ADC, который направленно воздействует на лимфомы и лейкозы, положительные по первому белку-мишени (FTP), с флударабином является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTP-положительные клетки опухоли по механизмам, зависящим от перекрестного сшивания ДНК и приводящим к апоптозу, в то время как, с другой стороны, флударабин будет ингибировать РНК- и ДНК-полимеразу клеток, а также одновременно подавлять ферменты репарации ДНК, необходимые для устранения перекрестных связей ДНК, индуцированных димером PBD.

Для демонстрации того, что ADC действует синергетически с флударабином панель линий FTP(+) клеток совместно обрабатывают диапазоном концентраций как ADC, так и флударабина. В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток совместно обрабатывают диапазоном концентраций флударабина и не направленного контрольного ADC или диапазоном концентраций ADC и носителя. После инкубации измеряют два параметра: количество поверхностного FTP (определяемое путем проточной цитометрии) и цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов CellTiter-Glo® или MTS). Цитотоксическую синергию рассчитывают путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса с использованием программы анализа CalcuSyn.

Номер CAS → 21679-14-1

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

ii. ссылка NCBI Pubchem → 657237

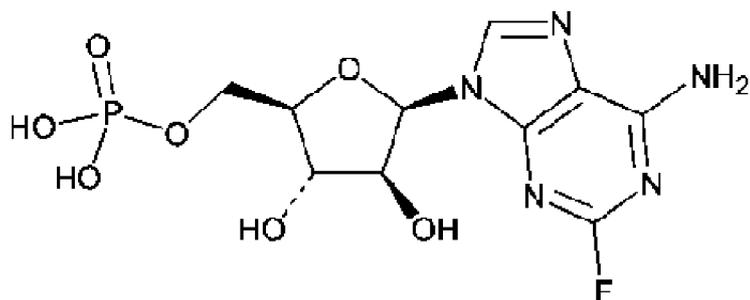
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

iii. ссылка IUPHAR/BPS → 4802

(см. <http://www.guidetopharmacology.org/>)

iv. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 1X9VK9O1SC

(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)



**Формула VII, флударабин:** [(2R,3R,4S,5R)-5-(6-амино-2-фтор-пурин-9-ил)-3,4-дигидроксиоксолан-2-ил]метилфосфоновая кислота

### Цитарабин

Цитарабин или цитозинарабинозид (Цитозар-U или Депоцит) представляет собой антиметаболическое химиотерапевтическое лекарственное средство, применяемое в лечении гематологических злокачественных новообразований, таких как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и неходжкинская лимфома. Он также известен как ага-С (арабинофуранозилцитидин). Он уничтожает раковые клетки путем нарушения синтеза ДНК. Он активно метаболизируется до трифосфата цитозинарабинозида, который повреждает ДНК, когда клеточный цикл находится в S-фазе (синтез ДНК). Следовательно, больше всего поражаются быстро делящиеся клетки, которым необходима репликация ДНК для митоза. Цитозинарабинозид также ингибирует как ДНК- и РНК-полимеразы, так и ферменты нуклеотидредуктазы, необходимые для синтеза ДНК.

Комбинирование ADC, который направленно воздействует на лимфомы и лейкозы, положительные по первому белку-мишени (FTR), с цитарабином является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTR-положительные клетки опухоли по механизмам, зависящим от перекрестного сшивания ДНК и приводящим к апоптозу, в то время как, с другой стороны, цитарабин будет ингибировать РНК- и ДНК-полимеразу клеток, а также одновременно подавлять синтез ДНК.

Для демонстрации того, что ADC действует синергетически с цитарабином панель линий FTR(+) клеток совместно обрабатывают диапазоном концентраций как ADC, так и цитарабина. В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток совместно обрабатывают диапазоном концентраций цитарабина и не направленного контрольного ADC или диапазоном концентраций ADC и носителя. После инкубации измеряют два

параметра: количество поверхностного FTP (определяемое путем проточной цитометрии) и цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов CellTiter-Glo® или MTS). Цитотоксическую синергию рассчитывают путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса с использованием программы анализа CalcuSyn (см. пример 4).

Номер CAS → 147-94-4

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

ii. ссылка NCBI Pubchem → 6253

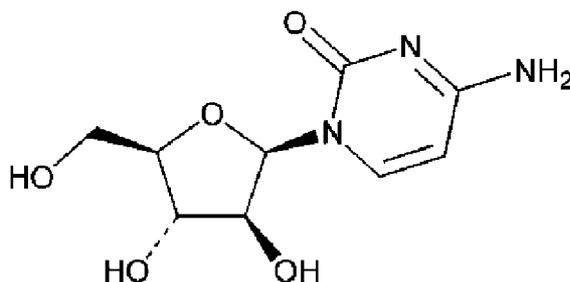
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

iii. ссылка IUPHAR/BPS → 4827

(см. <http://www.guidetopharmacology.org/>)

iv. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 04079A1RDZ

(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)



**Формула VIII, цитарабин:** 4-амино-1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидроксиметил)оксолан-2-ил]пиримидин-2-он

Гипометилирующий агент

Термин «гипометилирующий агент» относится к классу соединений, нарушающих метилирование ДНК, которое представляет собой присоединение метильной группы по 5-положению пиримидинового кольца цитозина или азоту в положении 6 пуринового кольца аденина. Метилирование ДНК стабильно изменяет паттерн экспрессии генов в клетках, т.е. снижает экспрессию генов (т.е. для рецептора витамина D). Гипометилирующий агент представляет собой соединения, которые могут ингибировать метилирование, что приводит к экспрессии ранее гиперметилированных молчащих генов. Аналоги цитидина, такие как 5-азациитидин (азациитидин) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин), представляют собой наиболее часто применяемые гипометилирующие агенты. Эти соединения действуют путем связывания с ферментами, которые катализируют реакцию метилирования, т.е. с ДНК-метилтрансферазами.

Для исследования степени гипометилирования пробы или образцы, содержащие конкретный, например, белок, ген, клетку или организм, обрабатывают потенциальным активирующим или ингибирующим агентом и сравнивают с контрольными образцами, обработанными неактивной контрольной молекулой. Контрольным образцам присваивают относительное значение активности, равное 100%. Ингибирования достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 90% или меньше, как правило 85% или меньше, обычно 80% или меньше, чаще 75% или меньше, как правило 70% или меньше, чаще 65% или меньше, чаще всего 60% или меньше, как правило 55% или меньше, обычно 50% или меньше, чаще 45% или меньше, чаще всего 40% или меньше, предпочтительно 35% или меньше, более предпочтительно 30% или меньше, еще более предпочтительно 25% или меньше и наиболее предпочтительно меньше 20%. Активации достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 110%, обычно по меньшей мере 120%, чаще по меньшей мере 140%, чаще по меньшей мере 160%, часто по меньшей мере 180%, чаще по меньшей мере в 2 раза выше, чаще всего по меньшей мере в 2,5 раза выше, обычно по меньшей мере в 5 раз выше, чаще по меньшей мере в 10 раз выше, предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз выше и наиболее предпочтительно более чем в 40 раз выше.

Комбинирование ADC, который направленно воздействует на лимфомы и лейкозы, положительные по первому белку-мишени (FTP), с гипометилирующим агентом является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTP-положительные клетки опухоли, в то время как, с другой стороны, гипометилирующий агент будет нарушать метилирование ДНК. Это нарушение происходит путем осуществления деметилирования в той последовательности, которая отрицательно влияет на способ, которым регуляторные белки клетки могут связываться с субстратом ДНК/РНК. Возникает синергия этой активности с ADC, поскольку димеры PBD перекрестно сшивают ДНК ковалентно, поэтому комбинирование их с другими агентами, которые нарушают синтез ДНК по другому механизму, обеспечивает полезный эффект.

Конкретные гипометилирующие агенты, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

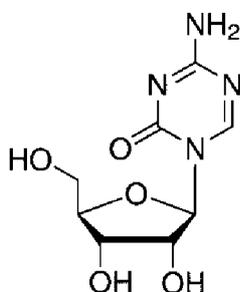
- a) 5-азациитидин (азациитидин)
  - i. номер CAS → 320-67-2  
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
  - ii. ссылка NCBI Pubchem → 9444  
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)
  - iii. ссылка IUPHAR/BPS → 6796

(см. <http://www.guidetopharmacology.org/>)

iv. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → M801H13NRU

(см.

<http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)



**Формула IX**, 5-азацитидин: 4-амино-1-β-D-рибофуранозил-1,3,5-триазин-2(1H)-он

b) 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин)

i. номер CAS → 2353-33-5

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

ii. ссылка NCBI Pubchem → 451668

(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

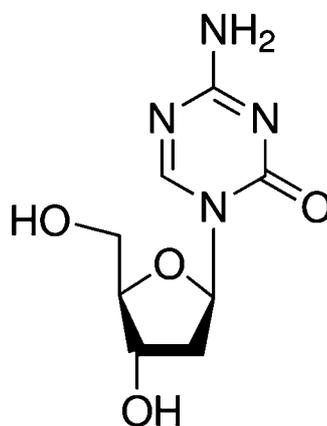
iii. ссылка IUPHAR/BPS → 6805

(см. <http://www.guidetopharmacology.org/>)

iv. уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 776B62CQ27

(см.

<http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)



**Формула X**, b) 5-аза-2'-дезоксцитидин: 4-амино-1-(2-деокси-β-D-эритропентофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он

## **Предпочтительные свойства описанных комбинаций**

Как ADC, так и вторичный агент при применении в качестве единственного агента по отдельности продемонстрировали клиническую применимость - например, в лечении рака. Однако, как описано в настоящем документе, ожидают, что комбинация ADC и вторичного агента обеспечит одно или более из следующих преимуществ по сравнению с лечением либо одним ADC, либо одним вторичным агентом:

- 1) эффективное лечение более широкого спектра раковых опухолей;
- 2) эффективное лечение резистентных или не поддающихся лечению форм нарушений, таких как рак, и индивидуумов с нарушениями, такими как рак, у которых произошел рецидив после периода ремиссии;
- 3) повышение частоты ответов на лечение; и/или
- 4) увеличение продолжительности ответа на лечение.

В настоящем описании термин «эффективное лечение более широкого спектра раковых опухолей» означает, что после лечения комбинацией наблюдают полный ответ в случае большего спектра известных видов рака. То есть полный ответ наблюдают от видов рака, о которых ранее не сообщали, что они полностью отвечают либо на один ADC, либо на один вторичный агент.

В настоящем описании термин «эффективное лечение резистентных, не поддающихся лечению или рецидивирующих форм» означает, что после лечения комбинацией наблюдают полный ответ у индивидуумов, которые либо частично, либо полностью резистентны или не поддаются лечению либо одним ADC, либо одним вторичным агентом (например, индивидуумы, которые демонстрируют отсутствие ответа или лишь частичный ответ после лечения каждым агентом отдельно, или индивидуумы с рецидивом нарушения). В некоторых вариантах реализации полный ответ после лечения комбинацией ADC/вторичный агент наблюдают по меньшей мере у 10% индивидуумов, которые либо частично, либо полностью резистентны или не поддаются лечению либо одним ADC, либо одним вторичным агентом. В некоторых вариантах реализации полный ответ после лечения комбинацией ADC/вторичный агент наблюдают по меньшей мере у 20%, по меньшей мере у 30%, по меньшей мере у 40%, по меньшей мере у 50%, по меньшей мере у 60%, по меньшей мере у 70%, по меньшей мере у 80%, по меньшей мере у 90%, по меньшей мере у 95%, по меньшей мере у 98% или по меньшей мере у 99% индивидуумов, которые либо частично, либо полностью резистентны или не поддаются лечению либо одним ADC, либо одним вторичным агентом.

В настоящем описании термин «повышенная частота ответов на лечение» означает, что после лечения комбинацией наблюдают полный ответ у большей части индивидуумов,

чем наблюдают после лечения либо одним ADC, либо одним вторичным агентом. В некоторых вариантах реализации полный ответ после лечения комбинацией ADC/вторичный агент наблюдают по меньшей мере у 10% получавших лечение индивидуумов. В некоторых вариантах реализации полный ответ после лечения комбинацией ADC/вторичный агент наблюдают по меньшей мере у 20%, по меньшей мере у 30%, по меньшей мере у 40%, по меньшей мере у 50%, по меньшей мере у 60%, по меньшей мере у 70%, по меньшей мере у 80%, по меньшей мере у 90%, по меньшей мере у 95%, по меньшей мере у 98% или по меньшей мере у 99% получавших лечение индивидуумов.

В настоящем описании термин «увеличенная продолжительность ответа на лечение» означает, что средняя продолжительность полного ответа у индивидуумов, которых лечат комбинацией, больше чем у индивидуумов, достигающих полного ответа после лечения либо одним ADC, либо одним вторичным агентом. В некоторых вариантах реализации средняя продолжительность полного ответа после лечения комбинацией ADC/вторичный агент составляет по меньшей мере 6 месяцев. В некоторых вариантах реализации средняя продолжительность полного ответа после лечения комбинацией ADC/вторичный агент составляет по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца, по меньшей мере 3 года, по меньшей мере 4 года, по меньшей мере 5 лет, по меньшей мере 6 лет, по меньшей мере 7 лет, по меньшей мере 8 лет, по меньшей мере 9 лет, по меньшей мере 10 лет, по меньшей мере 15 лет или по меньшей мере 20 лет.

В настоящем описании термин «полный ответ» означает отсутствие каких-либо клинических признаков заболевания у индивидуума. Признаки могут быть оценены с применением соответствующих методик в данной области техники, например, КТ или ПЭТ-томографии, или биопсии при необходимости. Количество доз, необходимое для достижения полного ответа, может составлять одну, две, три, четыре, пять, десять или больше. В некоторых вариантах реализации индивидуумы достигают полного ответа не позднее, чем через год после введения первой дозы, например, не позднее чем через 6 месяцев, не позднее чем через 3 месяца, не позднее чем через месяц, не позднее чем через две недели или не позднее чем через неделю после введения первой дозы.

### **Вылечиваемые нарушения**

Варианты комбинированной терапии, описанные в настоящем документе, включают те, которые демонстрируют полезную противораковую активность. В частности, в соответствии с некоторыми аспектами указанные виды терапии включают антитело, конъюгированное, т.е. ковалентно присоединенное линкером к компоненту,

представляющему собой лекарственное средство PBD, т.е. токсину. Когда лекарственное средство не конъюгировано с антителом, лекарственное средство PBD оказывает цитотоксическое действие. Таким образом, биологическую активность компонента, представляющего собой лекарственное средство PBD, модулируют путем конъюгации с антителом. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению селективно доставляют эффективную дозу цитотоксического агента в опухолевую ткань, благодаря чему может быть обеспечена более высокая селективность, т.е. более низкая эффективная доза.

Таким образом, в соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения предложены виды комбинированной терапии, включающие введение ADC, который связывает первый белок-мишень, для применения в терапии, при этом указанный способ включает выбор субъекта на основе экспрессии указанного белка-мишени.

В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения предложена комбинированная терапия с этикеткой, на которой указано, что эта терапия подходит для применения у субъекта, который, как было определено, подходит для такого применения. На этикетке может быть указано, что терапия подходит для применения у субъекта, демонстрирующего экспрессию первого белка-мишени, такую как сверхэкспрессия первого белка-мишени. На этикетке может быть указано, что субъект страдает конкретным видом рака.

Первый белок-мишень предпочтительно представляет собой CD25. Рак может представлять собой лимфому, такую как ОМЛ. На этикетке может быть указано, что субъект страдает CD25+ лимфомой.

В соответствии с другим аспектом также предложена комбинированная терапия, описанная в настоящем документе, для применения в лечении пролиферативного заболевания. В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено применение соединения, представляющего собой конъюгат, в изготовлении лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания.

Специалист в данной области техники легко может определить, лечит ли потенциальная комбинированная терапия пролиферативное состояние в случае какого-либо конкретного типа клеток. Например, анализы, которые можно с удобством применять для оценки активности, обеспечиваемой конкретным соединением, описаны ниже.

Варианты комбинированной терапии, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения пролиферативного заболевания. Термин «пролиферативное заболевание» относится к ненужной или неконтролируемой клеточной пролиферации

избыточных или аномальных клеток, которая нежелательна, такой как неопластический или гиперпластический рост, будь то *in vitro* или *in vivo*.

Примеры пролиферативных состояний включают, но не ограничиваются ими, доброкачественную, предзлокачественную и злокачественную пролиферацию клеток, включая, но не ограничиваясь ими, новообразования и опухоли (например, гистiocитому, глиому, астроцитому, остеому), раковые опухоли (например, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичка, рак печени, рак почки, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), лимфомы, лейкозы, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные нарушения (например, соединительных тканей) и атеросклероз. Представляющие интерес раковые опухоли включают, но не ограничиваются ими, лейкозы и рак яичников.

Можно лечить любой тип клетки, включая, но не ограничиваясь ими, легкое, желудочно-кишечный тракт (включая, например, кишечник, толстую кишку), молочную железу (клетки молочной железы), яичники, предстательную железу, печень (печеночные клетки), почки (почечные клетки), мочевой пузырь, поджелудочную железу, мозг и кожу.

Пролиферативные нарушения, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ), и лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ) [Fielding A., Haematologica. 2010 Jan; 95(1): 8–12].

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки.

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, состоящего из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки.

Новообразование-мишень или неопластические клетки-мишени могут представлять собой всю или часть солидной опухоли.

В настоящем описании термин «солидная опухоль» включает солидные гематологические раковые опухоли, такие как лимфомы (лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома), которые более подробно рассмотрены в настоящем описании.

Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, содержащие или состоящие из CD25+ неопластических клеток. Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, инфильтрированные CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия CD25 (т.е. они могут содержать или состоять из CD25- неопластических клеток).

Например, солидная опухоль может представлять собой опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих Т-клеток, таких как инфильтрирующие регуляторные Т-клетки (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., *Targ Oncol* (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res.* 2017 Jan;27(1):109-118). Соответственно, солидная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

Предполагается, что виды комбинированной терапии согласно настоящему изобретению можно применять для лечения различных заболеваний или нарушений, например, характеризующихся сверхэкспрессией опухолевого антигена. Типичные состояния или гиперпролиферативные нарушения включают доброкачественные или злокачественные опухоли; лейкоз, гематологические и лимфоидные злокачественные новообразования. Другие включают нейрональные, глиальные, астроцитальные, гипоталамические, glandулярные, макрофагальные, эпителиальные, стромальные, бластоцельные, воспалительные, ангиогенные и иммунологические, в том числе аутоиммунные нарушения и болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ).

Как правило, заболевание или нарушение, которое лечат, представляет собой гиперпролиферативное заболевание, такое как рак. Примеры рака, который лечат согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваясь ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких раковых опухолей включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшной полости, печеночно-клеточный рак, гастральный рак или рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы,

глиобластома, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатомы, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак толстой и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки или почечный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, анальную карциному, карциному полового члена, а также рак головы и шеи.

Аутоиммунные заболевания, в лечении которых можно применять виды комбинированной терапии, включают ревматологические нарушения (такие как, например, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, склеродермия, волчанка, такая как системная красная волчанка (СКВ) и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемия, синдром антифосфолипидных антител и псориатический артрит), остеоартрит, аутоиммунные нарушения желудочно-кишечного тракта и печени (такие как, например, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит и глютенная болезнь), васкулит (такой как, например, АНЦА-ассоциированный васкулит, включая васкулит Черджа-Стросса, гранулематоз Вегенера и полиартериит), аутоиммунные неврологические нарушения (такие как, например, рассеянный склероз, синдром опсоклонус-миоклонус, миастения гравис, нейромиеелит зрительного нерва, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полинейропатии), нарушения почек (такие как, например, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера и болезнь Бергера), аутоиммунные дерматологические нарушения (такие как, например, псориаз, уртикария, крапивница, вульгарная пузырчатка, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические нарушения (такие как, например, тромбоцитопеническая пурпура, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные заболевания органов слуха (такие как, например, заболевание внутреннего уха и потеря слуха), болезнь Бехчета, синдром Рейно, трансплантацию органов, болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ) и аутоиммунные эндокринные нарушения (такие как, например, аутоиммунные заболевания, связанные с диабетом, такие как инсулинозависимый сахарный диабет (ИЗСД), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, болезнь Грейвса и тиреоидит)). Более предпочтительные такие заболевания включают, например, ревматоидный артрит, язвенный колит, АНЦА-ассоциированный васкулит, волчанку, рассеянный склероз, синдром Шегрена, болезнь Грейвса, ИЗСД, пернициозную анемию, тиреоидит и гломерулонефрит.

В соответствии с некоторыми аспектами субъект страдает пролиферативным нарушением, выбранным из (классических) лимфом Ходжкина смешанно-клеточного типа (клетки Ходжкина/Рид-Штернберга: CD25 +/-) или неходжкинской лимфомы, включая В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ), и лейкозов, таких как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ) [Fielding A., *Haematologica*. 2010 Jan; 95(1): 8–12], мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, Т-клеточного лейкоза/лимфомы взрослых и анапластической крупноклеточной лимфомы.

В соответствии с некоторыми аспектами субъект страдает пролиферативным заболеванием, характеризующимся присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки.

Пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, состоящего из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки.

Новообразование-мишень или неопластические клетки-мишени могут представлять собой всю или часть солидной опухоли.

Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, содержащие или состоящие из CD25+ неопластических клеток. Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, инфильтрированные CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия CD25 (т.е. они могут содержать или состоять из CD25- неопластических клеток).

Например, солидная опухоль может представлять собой опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих Т-клеток, таких как инфильтрирующие регуляторные Т-клетки (Treg; Ménérier-Caux, C., et al., *Targ Oncol* (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res*. 2017 Jan;27(1):109-118). Соответственно, солидная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому,

меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

Классическая лимфома Ходжкина включает подтипы: нодулярная склерозирующая, с лимфоцитарным преобладанием, с лимфоцитарным истощением и смешанно-клеточная. Подтип лимфомы Ходжкина может быть не определен. В соответствии с некоторыми аспектами пациенты, тестируемые согласно способам, описанным в настоящем документе, страдают лимфомой Ходжкина подтипов: нодулярная склерозирующая и смешанно-клеточная.

В соответствии с некоторыми аспектами субъект страдает диффузной В-крупноклеточной лимфомой или периферической Т-клеточной лимфомой, включая подтипы: анапластическая крупноклеточная лимфома и ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома.

### **Выбор пациентов**

В соответствии с некоторыми аспектами индивидуумов выбирают в качестве подходящих для лечения видами комбинированного лечения до введения указанного лечения.

Согласно настоящему изобретению индивидуумы, считающиеся подходящими для лечения, представляют собой тех индивидуумов, которые, как ожидают, получают полезный эффект от лечения или ответят на него. Индивидуумы могут иметь или у них могут подозревать, или они могут подвергаться риску возникновения рака. Индивидуумы могли получить диагноз рак. В частности, индивидуумы могут иметь или у них могут подозревать, или они могут подвергаться риску возникновения лимфомы. В некоторых случаях индивидуумы могут иметь или у них могут подозревать, или они могут подвергаться риску возникновения солидного рака, который содержит ассоциированные с опухолью неопухолевые клетки, которые экспрессируют первый белок-мишень, такие как инфильтрирующие Т-клетки, которые экспрессируют первый белок-мишень.

В соответствии с некоторыми аспектами индивидуумов выбирают на основе уровня или паттерна экспрессии первого белка-мишени. В соответствии с некоторыми аспектами выбор основан на экспрессии первого белка-мишени на поверхности клетки. Таким образом, в некоторых случаях индивидуумов выбирают на основании того, что у них есть или у них подозревают, они подвергаются риску возникновения рака, или им поставлен диагноз пролиферативное заболевание, характеризующееся присутствием новообразования, содержащего клетки, которые демонстрируют низкий уровень экспрессии первого белка-мишени (такого как CD25) на поверхности. Новообразование

может состоять из клеток, демонстрирующих низкий уровень экспрессии первого белка-мишени (такого как CD25) на поверхности. В некоторых случаях низкие уровни экспрессии на поверхности означают, что среднее количество связанных анти-FTP антител на неопластическую клетку меньше 20000, например, меньше 10000, меньше 5000, меньше 2000, меньше 1000, меньше 500, меньше 400, меньше 300, меньше 200 или меньше 100. В некоторых случаях среднее количество связанных антител на клетку измеряют с использованием анализа, описанного в Примере 9.

В соответствии с некоторыми аспектами индивидуумов выбирают на основе наличия у них новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки. Новообразование может состоять из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки. Новообразование или неопластические клетки могут представлять собой всю или часть солидной опухоли. Сольдная опухоль может быть частично или полностью CD25-отрицательной (CD25-) и может инфильтрироваться CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки.

В соответствии с некоторыми аспектами мишень представляет собой второй белок-мишень. В соответствии с некоторыми аспектами выбор основан на экспрессии второго белка-мишени на поверхности клетки.

В соответствии с некоторыми аспектами выбор основан на уровнях как первого белка-мишени, так и второго белка-мишени на поверхности клетки.

В некоторых случаях определяют экспрессию мишени в конкретной ткани, представляющей интерес. Например, в образце лимфоидной ткани или опухолевой ткани. В некоторых случаях определяют системную экспрессию мишени. Например, в образце циркулирующей жидкости, такой как кровь, плазма, сыворотка или лимфа.

В соответствии с некоторыми аспектами индивидуума выбирают в качестве подходящего для лечения из-за наличия экспрессии мишени в образце. В этих случаях индивидуумов без экспрессии мишени можно считать неподходящими для лечения.

В соответствии с другими аспектами уровень экспрессии мишени используют для выбора индивидуума в качестве подходящего для лечения. В случае, когда уровень экспрессии мишени выше порогового уровня, определяют, что индивидуум подходит для лечения.

В соответствии с некоторыми аспектами присутствие первого белка-мишени и/или второго белка-мишени в клетках в образце указывает на то, что индивидуум подходит для лечения комбинацией, содержащей ADC и вторичный агент. В соответствии с другими аспектами уровень экспрессии первого белка-мишени и/или второго белка-мишени должен

быть выше порогового уровня, чтобы указывать на то, что индивидуум подходит для лечения. В соответствии с некоторыми аспектами наблюдение изменения локализации первого белка-мишени и/или второго белка-мишени в образце по сравнению с контролем указывает на то, что индивидуум подходит для лечения.

В соответствии с некоторыми аспектами индивидуум подходит для лечения, если клетки, полученные из лимфатического узла или внеузловых участков, реагируют с антителами к первому белку-мишени и/или второму белку-мишени, как определено иммуногистохимическими методами (ИГХ).

В соответствии с некоторыми аспектами определяют, что пациент подходит для лечения, если по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или более всех клеток в образце экспрессируют первый белок-мишень. В соответствии с некоторыми аспектами, описанными в настоящем документе, определяют, что пациент подходит для лечения, если по меньшей мере 10% клеток в образце экспрессируют первый белок-мишень.

В соответствии с некоторыми аспектами определяют, что пациент подходит для лечения, если по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или более всех клеток в образце экспрессируют второй белок-мишень. В соответствии с некоторыми аспектами, описанными в настоящем документе, определяют, что пациент подходит для лечения, если по меньшей мере 10% клеток в образце экспрессируют второй белок-мишень.

Первый белок-мишень предпочтительно представляет собой CD25.

Второй белок-мишень может представлять собой BTK, PD1, PDL1, GITR, OX40 или CTLA. Второй белок-мишень предпочтительно представляет собой PD-L1.

## Образцы

Образец может содержать или может быть получен из: количества крови; количества сыворотки, полученной из крови индивидуума, которая может содержать жидкую часть крови, полученную после удаления фибринового сгустка и клеток крови; количества сока поджелудочной железы; образца ткани или биопсийного образца; или клеток, полученных от указанного индивидуума.

Образец может быть взят из любой ткани или жидкости организма. В соответствии с некоторыми аспектами образец может включать или может быть получен из образца ткани, биопсийного образца, полученного путем резекции образца или выделенных клеток от указанного индивидуума.

В соответствии с некоторыми аспектами образец представляет собой образец ткани. Указанный образец может представлять собой образец опухолевой ткани, такой как ткань раковой опухоли. Образец может быть получен путем биопсии опухоли. В соответствии с некоторыми аспектами образец представляет собой образец лимфоидной ткани, такой как образец лимфоидного поражения или образец, полученный путем биопсии лимфатического узла. В некоторых случаях образец представляет собой биопсийный образец кожи.

В соответствии с некоторыми аспектами образец берут из жидкости организма, более предпочтительно, циркулирующей по организму. Соответственно, образец может представлять собой образец крови или образец лимфы. В некоторых случаях образец представляет собой образец мочи или образец слюны.

В некоторых случаях образец представляет собой образец крови или полученный из крови образец. Полученный из крови образец может представлять собой выбранную фракцию крови индивидуума, например, выбранную фракцию, содержащую клетки, или фракцию плазмы или сыворотки.

Выбранная фракция, содержащая клетки, может содержать представляющие интерес виды клеток, которые могут включать лейкоциты (WBC), в частности мононуклеарные клетки периферической крови (PBC) и/или гранулоциты, и/или эритроциты (RBC). Соответственно, способы согласно настоящему изобретению могут включать детектирование первого полипептида-мишени или нуклеиновой кислоты-мишени в крови, в лейкоцитах, мононуклеарных клетках периферической крови, гранулоцитах и/или эритроцитах.

Образец может быть свежевзятым или архивным. Например, архивная ткань может быть получена при первой диагностике у индивидуума или взята путем биопсии при рецидиве. В соответствии с некоторыми аспектами образец представляет собой свежевзятый биопсийный образец.

Первый полипептид-мишень предпочтительно представляет собой CD25.

### Статус индивидуума

Индивидуум может представлять собой животное, млекопитающее, плацентарное млекопитающее, сумчатое (например, кенгуру, вомбата), однопроходное животное (например, утконоса), грызуна (например, морскую свинку, хомяка, крысу, мышь), относящееся к мышам животное (например, мышь), зайцеобразное (например, кролика), пернатое (например, птицу), относящееся к псовым животное (например, собаку), относящееся к кошачьим животное (например, кошку), относящееся к семейству лошадиных животное (например, лошадь), относящееся к свиньям животное (например,

свинью), относящееся к овцам животное (например, овцу), крупный рогатый скот (например, корову), примата, обезьянообразное (например, обезьяну или человекообразную обезьяну), обезьяну (например, мартышку, павиана), человекообразную обезьяну (например, гориллу, шимпанзе, орангутана, гиббона) или человека.

Более того, индивидуум может представлять собой любую из форм своего развития, например, плод. В одном из предпочтительных вариантов реализации индивидуум представляет собой человека. В настоящем описании термины «субъект», «пациент» и «индивидуум» являются взаимозаменяемыми.

В соответствии с некоторыми аспектами, описанными в настоящем документе, индивидуум имеет или у него подозревают рак, или он был определен как подверженный риску возникновения рака. В соответствии с некоторыми аспектами, описанными в настоящем документе, индивидууму уже поставлен диагноз рак. Индивидууму мог быть поставлен диагноз (классическая) лимфома Ходжкина (включая тип: нодулярная склерозирующая, с лимфоцитарным преобладанием, лимфоцитарная или смешанно-клеточная, или неустановленный тип), диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) или периферическая Т-клеточная лимфома (ПТКЛ) (включая подтипы: анапластическая крупноклеточная лимфома (АККЛ) или ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (АИТЛ). В некоторых случаях индивидууму поставлен диагноз нодулярная склерозирующая или смешанно-клеточная классическая лимфома Ходжкина, диффузная В-крупноклеточная лимфома или ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома.

В некоторых случаях у индивидуума есть или у него подозревают пролиферативное заболевание, характеризующееся присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки. Новообразование может состоять из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки. Новообразование или неопластические клетки могут представлять собой всю или часть солидной опухоли. Сольдная опухоль может представлять собой новообразование, включая негематологический рак, содержащее или состоящее из CD25+ неопластических клеток. Сольдная опухоль может представлять собой новообразование, включая негематологическую раковую опухоль, инфильтрированную CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия CD25 (т.е. они могут содержать или состоять из CD25- неопластических клеток).

В некоторых случаях у индивидуума есть или у него подозревают солидную опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих Т-клеток, таких как инфильтрирующие регуляторные Т-клетки (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., Targ Oncol (2012) 7:15–28; Arce

Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res.* 2017 Jan;27(1):109-118). Некоторые или все неопластические клетки в опухоли могут быть CD25-отрицательными (CD25-). Солидная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

В некоторых случаях индивидууму поставлен диагноз (классическая) лимфома Ходжкина (смешанно-клеточный тип) или неходжкинская лимфома (включая В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ), и лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ) [Fielding A., *Haematologica.* 2010 Jan; 95(1): 8–12], мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых и анапластическую крупноклеточную лимфому.

В некоторых случаях индивидууму поставлен диагноз кожная Т-клеточная лимфома, фунгоидный микоз, синдром Сезари, системный мастоцитоз, В-клеточная лимфома, негемопоэтические опухоли, периферическая Т-клеточная лимфома и гистиоцитарная пролиферация.

В некоторых случаях у индивидуума есть или у него подозревают, или ему поставлен диагноз пролиферативное заболевание, характеризующееся присутствием новообразования, содержащего клетки, которые демонстрируют низкий уровень экспрессии первого белка-мишени (такого как CD25) на поверхности. Новообразование может состоять из клеток, демонстрирующих низкий уровень экспрессии первого белка-мишени (такого как CD25) на поверхности. В некоторых случаях низкие уровни экспрессии на поверхности означают, что среднее количество связанных анти-FTP антител на неопластическую клетку меньше 20000, например, меньше 10000, меньше 5000, меньше 2000, меньше 1000, меньше 500, меньше 400, меньше 300, меньше 200 или меньше 100. В некоторых случаях среднее количество связанных антител на клетку измеряют с использованием анализа, описанного в Примере 9.

В некоторых случаях индивидууму поставлен диагноз пролиферативное заболевание, характеризующееся присутствием новообразования, содержащего как CD25+,

так и CD25- клетки. Новообразование может состоять из CD25- неопластических клеток, при этом возможно указанные CD25- неопластические клетки ассоциированы с CD25+ неопластическими клетками, такими как CD25+ Т-клетки. Новообразование или неопластические клетки могут представлять собой всю или часть солидной опухоли. Сплошная опухоль может представлять собой новообразование, включая негематологический рак, содержащее или состоящее из CD25+ неопластических клеток. Сплошная опухоль может представлять собой новообразование, включая негематологическую раковую опухоль, инфильтрированную CD25+ клетками, такими как CD25+ Т-клетки; в таких сплошных опухолях может отсутствовать экспрессия CD25 (т.е. они могут содержать или состоять из CD25- неопластических клеток).

В некоторых случаях индивидууму поставлен диагноз сплошная опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих Т-клеток, таких как инфильтрирующие регуляторные Т-клетки (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., *Targ Oncol* (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res.* 2017 Jan;27(1):109-118). Некоторые или все неопластические клетки в опухоли могут быть CD25-отрицательными (CD25-). Сплошная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, мелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

В некоторых случаях индивидууму поставлен диагноз сплошной рак, содержащий инфильтрирующие Т-клетки, экспрессирующие CD25+.

Индивидуума могут подвергать или он мог быть подвергнут терапевтическому лечению этого рака. Субъект ранее мог получать или мог не получать ADCX25. В некоторых случаях рак представляет собой лимфому, включая лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому.

### Контроли

В соответствии с некоторыми аспектами экспрессию мишени у индивидуума сравнивают с экспрессией мишени в контроле. Контроли подходят для подтверждения достоверности окрашивания и выявления экспериментальных артефактов.

В некоторых случаях контроль может представлять собой эталонный образец или эталонный набор данных. Эталон может представлять собой образец, который был ранее получен от индивидуума с известной степенью соответствия. Эталон может представлять собой набор данных, полученный в результате анализа эталонного образца.

Контроли могут представлять собой положительные контроли, в которых молекула-мишень, как известно, присутствует или экспрессируется на высоком уровне, или отрицательные контроли, в которых молекула-мишень, как известно, отсутствует или экспрессируется на низком уровне.

Контроли могут представлять собой образцы ткани, полученные от индивидуумов, на которых, как известно, лечение оказывает полезный эффект. Ткань может быть того же типа, что и тестируемый образец. Например, образец опухолевой ткани от индивидуума может быть сравнен с контрольным образцом опухолевой ткани от индивидуума, который, как известно, подходит для лечения, такого как индивидуум, который ранее отвечал на лечение.

В некоторых случаях контроль может представлять собой образец, полученный от того же индивидуума, что и тестируемый образец, но из ткани, о которой известно, что она здоровая. Таким образом, образец раковой ткани от индивидуума может быть сравнен с образцом нераковой ткани.

В некоторых случаях контроль представляет собой образец культуры клеток.

В некоторых случаях тестируемый образец анализируют до инкубации совместно с антителом с определением уровня фонового окрашивания, присущего этому образцу.

В некоторых случаях используют изотипический контроль. В изотипических контролях используют антитело того же класса, что и специфическое антитело-мишень, но указанные контроли не иммунореактивны в отношении образца. Такие контроли подходят для распознавания неспецифических взаимодействий специфического антитела-мишени.

Методы могут включать гематопатологическую интерпретацию морфологии и иммуногистохимию для обеспечения точной интерпретации результатов тестирования. Метод может включать подтверждение того, что паттерн экспрессии коррелирует с ожидаемым паттерном. Например, когда анализируют уровень экспрессии первого белка-мишени и/или второго белка-мишени, метод может включать подтверждение того, что в тестируемом образце экспрессию наблюдают в виде окрашивания мембраны, с цитоплазматическим компонентом. Метод может включать подтверждение того, что отношение сигнала-мишени к шуму выше порогового уровня, что таким образом позволяет четко различать специфические и неспецифические фоновые сигналы.

Первый белок-мишень предпочтительно представляет собой CD25.

Второй белок-мишень может представлять собой BTK, PD1, PDL1, GITR, OX40 или CTLA. Второй белок-мишень предпочтительно представляет собой PD-L1.

## Способы лечения

В настоящем описании термин «лечение» в контексте лечения состояния, в целом, относится к лечению и терапии как человека, так и животного (например, при применении в ветеринарии), при которой достигают определенного желаемого терапевтического эффекта, например, ингибирования прогрессирования состояния, и включает снижение скорости прогрессирования, прекращение прогрессирования, ремиссию состояния, облегчение состояния и излечение состояния. Этот термин также включает лечение как профилактическую меру (т.е. профилактику, предотвращение).

В настоящем описании термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к такому количеству активного соединения или вещества, композиции или лекарственной формы, содержащей активное соединение, которое эффективно оказывает желаемый терапевтический эффект при разумном соотношении польза/риск, при введении в соответствии с желаемой схемой лечения.

В настоящем описании термин «профилактически эффективное количество» подобным образом относится к такому количеству активного соединения или вещества, композиции или лекарственной формы, содержащей активное соединение, которое эффективно оказывает желаемый профилактический эффект при разумном соотношении польза/риск, при введении в соответствии с желаемой схемой лечения.

В настоящем документе описаны способы терапии. Также предложен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества ADC и вторичного агента. Термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для оказания субъекту полезного эффекта. Такой полезный эффект может представлять собой по меньшей мере облегчение по меньшей мере одного симптома. Фактическое вводимое количество и частота, и период действия введения будут зависеть от природы и тяжести того, что лечат. Назначение лечения, например, решения относительно дозы, находится в рамках ответственности врачей общей практики и других врачей. Субъекта возможно тестировали для определения подходит ли он для получения лечения в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. Способ лечения может включать этап определения подходит ли субъект для лечения с применением способа, описанного в настоящем документе.

ADC может содержать анти-CD25 антитело. Анти-CD25 антитело может представлять собой NuMax-TAC™. ADC может содержать лекарственное средство, которое представляет собой димер PBD. ADC может представлять собой анти-CD25-ADC

и, в частности, ADCx25. ADC может представлять собой ADC, описанный в WO2014/057119.

Вторичный агент может представлять собой:

- (a) ингибитор тирозинкиназы Брутона (BTKi), такой как ибрутиниб (Имбрувика), акалабрутиниб/АСР-196, ONO/GS-4059, спебрутиниб/AVL-292/СС-292, HM71224 (поселтиниб) или BGB-3111 (занубрутиниб);
- (b) антагонист PD1, такой как пембролизумаб, ниволумаб, MEDI0680, PDR001 (спартализумаб), камрелизумаб, AUNP12, пидилизумаб, цемиплимаб (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (тислелизумаб) или BGB-108;
- (c) антагонист PD-L1, такой как атезолизумаб (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаб/MEDI4736 или MSB0010718C (авелумаб);
- (d) агонист GTR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), такой как MEDI1873, TRX518, GWN323, МК-1248, МК-4166, BMS-986156 или INCAGN1876;
- (e) агонист OX40, такой как MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 или PF-04518600;
- (f) антагонист CTLA-4, такой как ипилимумаб (торговое название Ервой) или тремелимумаб (первоначально разработанный Pfizer, в настоящее время Medimmune);
- (g) флударабин или цитарабин; или
- (h) гипометилирующий агент, такой как аналоги цитидина, например, 5-азациитидин (азациитидин) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин).

Лечение может включать введение комбинации ADC/вторичный агент отдельно или в дополнительной комбинации с другими видами лечения либо одновременно, либо последовательно в зависимости от состояния, которое лечат. Примеры видов лечения и терапии включают, но не ограничиваются ими, химиотерапию (введение активных агентов, включая, например, лекарственные средства, такие как химиотерапевтические препараты); оперативное вмешательство; и лучевую терапию.

«Химиотерапевтический агент» представляет собой химическое соединение, подходящее для лечения рака независимо от механизма действия. Классы химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими: алкилирующие агенты, антиметаболиты, растительные алкалоиды, представляющие собой веретенные яды, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизаторы и ингибиторы киназ. Химиотерапевтические агенты

включают соединения, применяемые в «направленной терапии» и традиционной химиотерапии.

Примеры химиотерапевтических агентов включают: леналидомид (РЕВЛИМИД®, Celgene), вориностат (ЗОЛИНЗА®, Merck), панобиностат (ФАРИДАК®, Novartis), моцетиностат (MGCD0103), эверолимус (ЭВЕРОЛИМУС®, СЕРТИКАН®, Novartis), бендамустин (ТРЕАКИСИМ®, РИБОМУСТИН®, ЛЕВАКТ®, ТРЕАНДА®, Mundipharma International), эрлотиниб (ТАРЦЕВА®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (ТАКСОТЕР®, Sanofi-Aventis), 5-ФУ (фторурацил, 5-фторурацил, номер CAS 51-21-8), гемцитабин (ГЕМЗАР®, Lilly), PD-0325901 (номер CAS 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-диаминдихлорплатина(II), номер CAS 15663-27-1), карбоплатин (номер CAS 41575-94-4), паклитаксел (ТАКСОЛ®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси), трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН®, Genentech), темозоломид (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабицикло[4.3.0]нона-2,7,9-триен-9-карбоксамид, номер CAS 85622-93-1, ТЕМОДАР®, ТЕМОДАЛ®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)фенокси]-N,N-диметилэтанамин, НОЛВАДЕКС®, ИСТУБАЛ®, ВАЛОДЕКС®) и доксорубицин (АДРИАМИЦИН®), Akti-1/2, HPPD и рапамицин.

Больше примеров химиотерапевтических агентов включают: оксалиплатин (ЭЛОКСАТИН®, Sanofi), бортезомиб (ВЕЛКЕЙД®, Millennium Pharm.), сутент (СУНИТИНИБ®, SU11248, Pfizer), летрозол (ФЕМАРА®, Novartis), иматиниба мезилат (ГЛИВЕК®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), РТК787/ЗК 222584 (Novartis), фулвестрант (ФАЗЛОДЕКС®, AstraZeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамицин (сиролимус, РАПАМУН®, Wyeth), лапатиниб (ТАЙКЕРБ®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (САРАСАР™, SCH 66336, Schering Plough), сорафениб (НЕКСАВАР®, ВАУ43-9006, Bayer Labs), гефитиниб (ИРЕССА®, AstraZeneca), иринотекан (КАМПТОСАР®, СРТ-11, Pfizer), типифарниб (ЗАРНЕСТРА™, Johnson & Johnson), АБРАКСАН™ (не содержащий кремофор), альбумин-стабилизированную форму паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL), вандетаниб (rINN, ZD6474, ЗАКТИМА®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролимус (ТОРИЗЕЛ®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (ТЕЛЦИТА®, Telik), тиотепу и циклофосфамид (ЦИТОКСАН®, НЕОСАР®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида,

триэтилентрифосфоридам и триметилметиламин; ацетогенины (особенно буллатин и буллатинон); камптотексин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; хлорметины, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевинны, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндиинового антибиотики (например, калихеамицин, калихеамицин гамма II, калихеамицин омега II (*Angew Chem. Intl. Ed. Engl.* (1994) 33:183-186); динемистин, динемистин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамистин; а также неокарциностаина хромофор и хромофоры, родственные входящим в состав эндиинового антибиотиков - хромопротеидов), аклациномистины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролидинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, неморубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестостерон; средства, подавляющие функцию коры надпочечников, такие как аминоклотеимид, митоган, трилостан; добавку для восполнения фолиевой кислоты, такую как фолиевая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиниум ацетат, эпотилон, этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и анзамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный

комплекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, Орегон); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецины (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ага-С»); циклофосфамид; тиотепу; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платиновые аналоги, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (НАВЕЛЬБИН®); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; капецитабин (КСЕЛОДА®, Roche); ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеуказанных агентов. Можно применять комбинации агентов, такие как СНР (доксорубицин, преднизон, циклофосфамид) или СНОР (доксорубицин, преднизон, циклофосфамид, винкристин).

В определение «химиотерапевтический агент» также включены: (i) антигормональные средства, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (СМЭР), включая, например, тамоксифен (включая НОЛВАДЕКС®; тамоксифена цитрат), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и ФАРЕСТОН® (торемифена цитрат); (ii) ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, регулирующий выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, МЕГЕЙС® (мегестрола ацетат), АРОМАЗИН® (экземестан; Pfizer), форместан, фадрозол, РИВИЗОР® (ворозол), ФЕМАРА® (летрозол; Novartis) и АРИМИДЕКС® (анастрозол; AstraZeneca); (iii) антиандрогенные средства, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (цитозинового нуклеозидный аналог 1,3-диоксолана); (iv) ингибиторы протеинкиназ, такие как ингибиторы МЕК (WO 2007/044515); (v) ингибиторы липидкиназ; (vi) антисмысловые олигонуклеотиды, в частности, те, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигнала, вовлеченных в нарушенную пролиферацию клеток, например, РКС-альфа, Raf и H-Ras, такие как облимерсен (ГЕНАСЕНС®, Genta Inc.); (vii) рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например, АНГИОЗИМ®) и ингибиторы экспрессии HER2; (viii) вакцины, такие как геннотерапевтические вакцины, например, АЛЛОВЕКТИН®, ЛЕЙВЕКТИН® и ВАКСИД®, ПРОЛЕЙКИН® rIL-2; ингибиторы топоизомеразы 1, такие как ЛУРТОТЕКАН®, АБАРЕЛИКС® gmRH; (ix) антиангиогенные агенты, такие как бевацизумаб (АВАСТИН®, Genentech); и

фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеуказанных средств.

В определение «химиотерапевтический агент» также включены терапевтические антитела, такие как алемтузумаб (Кэмпас), бевацизумаб (АВАСТИН®, Genentech); цетуксимаб (ЭРБИТУКС®, Imclone); панитумумаб (ВЕКТИБИКС®, Amgen), ритуксимаб (РИТУКСАН®, Genentech/Biogen Idec), офатумумаб (АРЗЕРРА®, GSK), пертузумаб (ПЕРЪЕТА™, ОМНИТАРГ™, 2C4, Genentech), трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН®, Genentech), тозитумомаб (Бексар, Corixa), MDX-060 (Medarex) и конъюгат антитело-лекарственное средство, гемтузумаб озогамицин (МИЛОТАРГ®, Wyeth).

Гуманизированные моноклональные антитела, обладающие терапевтическим действием в качестве химиотерапевтических агентов в комбинации с конъюгатами согласно настоящему изобретению, включают: алемтузумаб, аполизумаб, азелизумаб, атлизумаб, бапинеузумаб, бевацизумаб, биватузумаб мертанзин, кантузумаб мертанзин, целелизумаб, цертолизумаб пэгол, цидфуситузумаб, цидтузумаб, даклизумаб, экулизумаб, эфализумаб, эпратузумаб, эрлизумаб, фелвизумаб, фонтолизумаб, гемтузумаб озогамицин, инотузумаб озогамицин, ипилимумаб, лабетузумаб, линтузумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, мотовизумаб, натализумаб, нимотузумаб, ноловизумаб, нумавизумаб, окрелизумаб, омализумаб, паливизумаб, пасколизумаб, пекфуситузумаб, пектузумаб, пертузумаб, пекселизумаб, раливизумаб, ранибизумаб, ресливизумаб, реслизумаб, резивизумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сибротузумаб, сиплизумаб, сонтузумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, тефибазумаб, тосилизумаб, торализумаб, трастузумаб, тукотузумаб целмолейкин, тукуситузумаб, умавизумаб, уртоксазумаб и визилизумаб.

Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно представляют собой фармацевтические композиции. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению и для применения в соответствии с настоящим изобретением в дополнение к активному ингредиенту, т.е. соединению, представляющему собой конъюгат, могут содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие вещества, хорошо известные специалисту в данной области техники. Такие вещества должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого вещества будет зависеть от пути введения, который может быть пероральным или посредством инъекции, например, кожным, подкожным или внутривенным.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблетки, капсулы, порошка или жидкой форме. Таблетка может содержать твердый

носитель или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции, как правило, содержат жидкий носитель, такой как вода, нефть, масла животного или растительного происхождения, минеральное масло или синтетическое масло. Может быть включен физиологический раствор, раствор декстрозы или другого сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции, или инъекции в месте поражения активный ингредиент будет иметь форму парентерально приемлемого водного раствора, который не содержит пирогенных веществ и имеет подходящий pH, изотоничность и стабильность. Специалист в данной области техники может приготовить подходящие растворы с применением, например, изотонических носителей, таких как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактатный раствор Рингера для инъекций. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

### **Доза**

Для специалиста в данной области техники очевидно, что подходящие дозы ADC и/или вторичного агента, и композиций, содержащих эти активные элементы, могут варьироваться от субъекта к субъекту. Определение оптимальной дозы, как правило, будет включать сопоставление уровня полезного терапевтического эффекта с любым риском или отрицательными побочными эффектами. Выбранный уровень дозы будет зависеть от различных факторов, включая, но не ограничиваясь ими, активность конкретного соединения, путь введения, время введения, скорость выведения соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или вещества, применяемые в комбинации, тяжесть состояния и вид, пол, возраст, массу тела, состояние, общее состояние здоровья и историю болезни субъекта. Количество соединения и путь введения в конечном итоге будут представлены на усмотрение врача, ветеринара или клинического врача, хотя, как правило, дозу будут выбирать для достижения локальных концентраций в месте действия, которые обеспечивают желаемый эффект, не оказывая при этом значительных вредных или отрицательных побочных эффектов.

В соответствии с некоторыми аспектами дозу ADC определяют по экспрессии первого белка-мишени, наблюдаемой в образце, полученном от субъекта. Таким образом, уровень или локализация экспрессии первого белка-мишени в образце может указывать на то, что необходима более высокая или более низкая доза ADC. Например, высокий уровень экспрессии первого белка-мишени может указывать на то, что будет подходящей более высокая доза ADC. В некоторых случаях высокий уровень экспрессии первого белка-

мишени может указывать на необходимость введения другого агента в дополнение к ADC. Например, введение ADC совместно с химиотерапевтическим агентом. Высокий уровень экспрессии первого белка-мишени может указывать на более интенсивную терапию.

В соответствии с некоторыми аспектами уровень дозы определяют по экспрессии первого белка-мишени на неопластических клетках в образце, полученном от субъекта. Например, когда новообразование-мишень состоит из или содержит неопластические клетки, экспрессирующие первый белок-мишень.

В соответствии с некоторыми аспектами уровень дозы определяют по экспрессии первого белка-мишени на клетках, ассоциированных с новообразованием-мишенью. Например, новообразование-мишень может представлять собой солидную опухоль, состоящую из или содержащую неопластические клетки, экспрессирующие первый белок-мишень. Например, новообразование-мишень может представлять собой солидную опухоль, состоящую из или содержащую неопластические клетки, которые не экспрессируют первый белок-мишень. Клетки, экспрессирующие первый белок-мишень, могут представлять собой неопластические клетки, инфильтрирующие солидную опухоль, такие как инфильтрирующие Т-клетки.

В соответствии с некоторыми аспектами дозу вторичного агента определяют по экспрессии второго белка-мишени, наблюдаемой в образце, полученном от субъекта. Таким образом, уровень или локализация экспрессии второго белка-мишени в образце может указывать на то, что необходима более высокая или более низкая доза вторичного агента. Например, высокий уровень экспрессии второго белка-мишени может указывать на то, что будет подходящей более высокая доза вторичного агента. В некоторых случаях высокий уровень экспрессии второго белка-мишени может указывать на необходимость введения другого агента в дополнение к вторичному агенту. Например, введение вторичного агента совместно с химиотерапевтическим агентом. Высокий уровень экспрессии второго белка-мишени может указывать на более интенсивную терапию.

Введение можно осуществлять в одной дозе, непрерывно или с перерывами (например, разделенными дозами с подходящими интервалами) на протяжении курса лечения. Способы определения наиболее эффективных путей и дозы введения хорошо известны специалисту в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от состава, применяемого для терапии, цели терапии, клетки (клеток)-мишени, подвергаемой лечению, и вылечиваемого субъекта. Однократное или многократное введение можно осуществлять с использованием уровня дозы и схемы, выбираемой лечащим врачом, ветеринаром или клиническим врачом.

В целом, подходящая доза каждого активного соединения находится в диапазоне от примерно 100 нг до примерно 25 мг (как правило, от примерно 1 мкг до примерно 10 мг) на килограмм массы тела субъекта в сутки. Когда активное соединение представляет собой соль, сложный эфир, амид, пролекарство и т.п., вводимое количество рассчитывают на основе исходного соединения и, таким образом, фактическую применяемую массу увеличивают пропорционально.

В одном из вариантов реализации каждое активное соединение вводят субъекту, представляющему собой человека, в соответствии со следующим режимом дозирования: примерно 100 мг 3 раза в сутки.

В одном из вариантов реализации каждое активное соединение вводят субъекту, представляющему собой человека, в соответствии со следующим режимом дозирования: примерно 150 мг 2 раза в сутки.

В одном из вариантов реализации каждое активное соединение вводят субъекту, представляющему собой человека, в соответствии со следующим режимом дозирования: примерно 200 мг 2 раза в сутки.

Однако в одном из вариантов реализации каждое соединение, представляющее собой конъюгат, вводят субъекту, представляющему собой человека, в соответствии со следующим режимом дозирования: примерно 50 мг или примерно 75 мг 3 или 4 раза в сутки.

В одном из вариантов реализации каждое соединение, представляющее собой конъюгат, вводят субъекту, представляющему собой человека, в соответствии со следующим режимом дозирования: примерно 100 мг или примерно 125 мг 2 раза в сутки.

Для ADC, когда он представляет собой ADC, содержащий PBD, величины доз, описанные выше, могут относиться к указанному конъюгату (содержащему PBD-компонент и линкер к антителу) или к эффективному количеству получаемого соединения PBD, например, количеству соединения, высвобождаемому после расщепления линкера.

Первый белок-мишень предпочтительно представляет собой CD25. ADC может содержать анти-CD25 антитело. Анти-CD25 антитело может представлять собой HuMax-TAC™. ADC может содержать лекарственное средство, которое представляет собой димер PBD. ADC может представлять собой анти-CD25-ADC и, в частности, предпочтительно представляет собой ADCx25. ADC может представлять собой ADC, описанный в WO2014/057119.

Второй белок-мишень может представлять собой BTK, PD1, PDL1, GITR, OX40 или CTLA. Второй белок-мишень предпочтительно представляет собой PD-L1. Вторичный агент может представлять собой:

- (a) ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТКi), такой как ибрутиниб (Имбрувика), акалабрутиниб/АСР-196, ONO/GS-4059, спебрутиниб/AVL-292/СС-292, НМ71224 (поселтиниб) или ВGB-3111 (занубрутиниб);
- (b) антагонист PD1, такой как пембролизумаб, ниволумаб, MEDI0680, PDR001 (спартализумаб), камрелизумаб, AUNP12, пидилизумаб, цемиплимаб (REGN-2810), AMP-224, ВGB-A317 (тислелизумаб) или ВGB-108;
- (c) антагонист PD-L1, такой как атезолизумаб (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаб/MEDI4736 или MSB0010718C (авелумаб);
- (d) агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), такой как MEDI1873, TRX518, GWN323, МК-1248, МК-4166, BMS-986156 или INCAGN1876;
- (e) агонист OX40, такой как MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 или PF-04518600;
- (f) антагонист CTLA-4, такой как ипилимумаб (торговое название Ервой) или тремелимумаб (первоначально разработанный Pfizer, в настоящее время Medimmune);
- (g) флударабин или цитарабин; или
- (h) гипометилирующий агент, такой как аналоги цитидина, например, 5-азациитидин (азациитидин) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин).

## **Антитела**

В настоящем описании термин «антитело» употребляется в самом широком смысле и, в частности, включает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), интактные антитела (также описанные как «полноразмерные» антитела) и фрагменты антител, если они проявляют желаемую биологическую активность, например, способность связывать первый белок-мишень (Miller *et al* (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Антитела могут представлять собой антитела мыши, человека, гуманизированные, химерные антитела или происходить от других видов, таких как кролик, коза, овца, лошадь или верблюд.

Антитело представляет собой белок, вырабатываемый иммунной системой, который способен распознавать конкретный антиген и связываться с ним. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York). Антиген-мишень, как правило, содержит несколько центров связывания, также называемых эпитопами, распознаваемых определяющими комплементарность областями (CDR) на

различных антителах. Каждое антитело, которое специфично связывается с отличным от других эпитопом, имеет отличающуюся структуру. Таким образом, один антиген может иметь больше одного соответствующего антитела. Антитело может содержать полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т.е. молекулу, которая содержит антигенсвязывающий центр, который иммуноспецифично связывает антиген представляющей интерес мишени или его часть, при этом такие мишени включают, но не ограничиваются ими, раковую клетку или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, связанные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса, или аллотипа (например, человеческий G1m1, G1m2, G1m3, не-G1m1 [т.е. любой аллотип, отличный от G1m1], G1m17, G2m23, G3m21, G3m28, G3m11, G3m5, G3m13, G3m14, G3m10, G3m15, G3m16, G3m6, G3m24, G3m26, G3m27, A2m1, A2m2, Km1, Km2 и Km3) молекулы иммуноглобулина. Иммуноглобулины могут быть получены от любых видов, включая человека, мышь или кролика.

Термин «фрагменты антител» включает часть полноразмерного антитела, как правило, его антигенсвязывающую или переменную область. Примеры фрагментов антител включают Fab-, Fab'-, F(ab')<sub>2</sub>- и scFv-фрагменты; диатела; линейные антитела; фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (определяющую комплементарность область) и эпитопсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленного, которые иммуноспецифично связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами; одноцепочечные молекулы антител; и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

В настоящем описании термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против одной антигенной детерминанты. Более того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности, преимуществом моноклональных антител является то, что они могут быть синтезированы без примесей других антител. Определение «моноклональное» указывает на характер

антитела как антитела, полученного по существу из однородной популяции антител, и его не следует рассматривать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения согласно настоящему изобретению могут быть получены способом на основе гибридом, впервые описанным Kohler *et al* (1975) *Nature* 256:495, или могут быть получены способами на основе рекомбинантных ДНК (см. US 4816567). Моноклональные антитела могут быть также выделены из фаговых библиотек антител с применением методик, например, описанных в Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks *et al* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, или из трансгенных мышей, несущих иммуноглобулиновую систему полностью человеческого происхождения (Lonberg (2008) *Curr. Opin* 20(4):450-459).

В настоящем описании термин «моноклональные антитела», в частности, включает «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, если они проявляют желаемую биологическую активность (US 4816567; и Morrison *et al* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855). Химерные антитела включают «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменного домена, полученные от нечеловекообразного примата (например, мартышки или обезьяны), и последовательности константной области человека.

«Интактное антитело» согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, содержащее VL- и VH-домены, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены с нативной последовательностью человека) или вариант их аминокислотной последовательности. Интактное антитело может обладать одной или более «эффекторными функциями», которые относятся к тем видам биологической активности, которые присущи Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области с вариантом аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора, антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; и понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности, таких как В-клеточный рецептор и BCR.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей интактные антитела могут быть отнесены к разным «классам». Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно поделены на «подклассы» (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, обозначаются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Антитела анти-CD25 известны в данной области техники и подходят для применения в способах, описанных в настоящем документе. Они включают антитела 4C9 (доступны у Ventana Medical Systems, Inc.). Другие подходящие антитела включают антитело AB12, описанное в WO 2004/045512 (Genmab A/S), IL2R.1 (доступно у Life Technologies, номер по каталогу MA5-12680) и RFT5 (описанное в US6383487). Другие подходящие антитела включают B489 (143-13) (доступно у Life Technologies, номер по каталогу MA1-91221), SP176 (доступно у Novus, номер по каталогу NBP2-21755), 1B5D12 (доступно у Novus, номер по каталогу NBP2-37349), 2R12 (доступно у Novus, номер по каталогу NBP2-21755) или BC96 (доступно у BioLegend, номер по каталогу VT-072) и M-A251 (доступно у BioLegend, номер по каталогу IV A053). Другие подходящие анти-CD25 антитела представляют собой даклизумаб (Зенапакс™) и базиликсимаб (Симулект™), оба из которых разрешены для клинического применения.

Анти-PD-L1 антитела известны в данной области техники и подходят для применения в способах, описанных в настоящем документе. Эти антитела включают атезолизумаб (MPDL3280; номер CAS 1380723-44-3), авелумаб (MSB0010718C; номер CAS 1537032-82-8) и дурвалумаб (номер CAS 1428935-60-7).

### **Краткое описание фигур**

Варианты реализации и эксперименты, иллюстрирующие принципы настоящего изобретения, далее будут рассмотрены со ссылкой на прилагаемые фигуры, на которых:

Фиг.1. Последовательности

Фиг.2. Объем опухоли *in vivo* после монолечения суррогатным ADCx25, лечения анти-PD1 или контрольным ADC (согласно Примеру 4)

Фиг.3. Объем опухоли *in vivo*, демонстрирующий синергию между лечением низкой дозой суррогатного ADCx25 и анти-PD1 (согласно Примеру 4)

Фиг.4. Данные цитотоксичности *in vitro* в отношении линии клеток Karpas299 для цитарабина отдельно (левый график) или в комбинации с ADCx25 (правый график)

Фиг.5. Данные цитотоксичности *in vitro* в отношении линии клеток KG-1 для цитарабина отдельно (левый график) или в комбинации с ADCx25 (правый график)

Фиг.6. Уровни CD25 на поверхности в линии клеток Каrpaс299 (левый график) и линии клеток KG-1 (правый график), инкубированных совместно с цитарабином или без него

Фиг.7. Цитотоксичность *in vitro* для децитабина отдельно (левый график) или ADCx25 в комбинации с децитабином (правый график)

Фиг.8. Уровни CD25 на поверхности клеток (необработанных или после инкубации совместно с 30 мМ децитабином)

Фиг.9. Цитотоксичность *in vitro* в отношении клеток Каrpaс299 для ADCx25 в комбинации с цитарабином (9А) или децитабином (9В)

Фиг.10. Цитотоксичность *in vitro* в отношении клеток KG-1 для ADCx25 в комбинации с цитарабином (9А) или децитабином (9В)

Настоящее изобретение включает комбинацию описанных аспектов и предпочтительных признаков за исключением случаев, когда такая комбинация является явным образом неприемлемой или ее следует избегать.

В настоящем описании заголовки разделов приведены только для целей организации и никоим образом не ограничивают описанный объект изобретения.

Аспекты и варианты реализации настоящего изобретения далее будут проиллюстрированы в качестве примера со ссылкой на прилагаемые фигуры. Другие аспекты и варианты реализации будут очевидны специалисту в данной области техники. Содержание всех документов, упомянутых в настоящем описании, включено в настоящее описание посредством ссылки.

На всем протяжении настоящего описания, включая нижеследующую формулу изобретения, если контекст не предусматривает иное, термин «содержать (включать)» и такие вариации, как «содержит (включает)» и «содержащий (включающий)» означает включение указанного целого числа или этапа, или группы целых чисел или этапов, но не исключение какого-либо другого целого числа или этапа, или группы целых чисел или этапов.

Следует отметить, что в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множество объектов, если в контексте явным образом не указано иное. В настоящем описании диапазоны могут быть указаны в виде от «примерно» одного конкретного значения и/или до «примерно» другого конкретного значения. Когда указан такой диапазон, другой вариант реализации включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Подобным образом, когда

значения указаны в виде приблизительных значений путем использования предшествующего «примерно», очевидно, что конкретное значение составляет другой вариант реализации.

## НЕКОТОРЫЕ ВАРИАНТЫ РЕАЛИЗАЦИИ

Следующие пункты описывают некоторые конкретные варианты реализации настоящего изобретения:

1. Способ лечения рака у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества ADCX25 и вторичного агента.
2. Первая композиция, содержащая ADCX25, для применения в способе лечения рака у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей вторичный агент.
3. Первая композиция, содержащая вторичный агент, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей ADCX25.
4. Применение ADCX25 в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит ADCX25, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент.
5. Применение антагониста PD1 в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит вторичный агент, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADCX25.
6. Набор, содержащий:  
первое лекарственное средство, содержащее ADCX25;  
второе лекарственное средство, содержащее вторичный агент; и возможно  
листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму первого лекарственного средства в комбинации со вторым лекарственным средством, для лечения рака.
7. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее ADCX25, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент, для лечения рака.
8. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее вторичный агент, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADCX25, для лечения рака.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая ADCX25 и вторичный агент.

10. Способ лечения рака у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества композиции по п. 9.
11. Композиция по п. 9 для применения в способе лечения рака у индивидуума.
12. Применение композиции по п. 9 в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума.
13. Набор, содержащий композицию по п. 9 и набор инструкций по введению индивидууму лекарственного средства, для лечения рака.
14. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение включает введение ADCX25 до вторичного агента, одновременно с вторичным агентом или после вторичного агента.
15. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение дополнительно включает введение химиотерапевтического агента.
16. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что индивидуум представляет собой человека.
17. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак.
18. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, характеризующийся присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25-клетки.
19. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, характеризующийся присутствием новообразования, содержащего или состоящего из CD25- неопластических клеток.
20. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что рак или новообразование представляет собой всю или часть солидной опухоли.
21. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий CD25, или CD25+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки, такие как CD25+ инфильтрирующие Т-клетки.
22. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак с низким уровнем поверхностной экспрессии CD25.

23. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий второй белок-мишень.

24. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение:

- a) эффективно лечит более широкий спектр нарушений,
- b) эффективно лечит резистентные, не поддающиеся лечению или рецидивирующие нарушения,
- c) демонстрирует повышенную частоту ответов и/или
- d) демонстрирует увеличенную продолжительность ответа на лечение;

по сравнению с лечением либо одним ADCX25, либо одним вторичным агентом.

25. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что рак выбран из группы, включающей:

лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ);

лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ);

рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

26. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТКi).

27. Композиция, способ, применение или набор по п. 26, характеризующийся тем, что указанный ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТКi) выбран из ибрутиниба (Имбрувика), акалбрутиниба/АСР-196, ОНО/GS-4059, спебрутиниба/AVL-292/СС-292, НМ71224 (поселтиниб) и ВGB-3111 (занубрутиниб).

28. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист PD1.

29. Композиция, способ, применение или набор по п. 28, характеризующийся тем, что указанный антагонист PD1 выбран из пембролизумаба, ниволумаба, MEDI0680, PDR001 (спартализумаб), камрелизумаба, AUNP12, пидилизумаба, цемиплимаба (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (тислелизумаб) и BGB-108.
30. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист PD-L1.
31. Композиция, способ, применение или набор по п. 30, характеризующийся тем, что указанный антагонист PD-L1 выбран из атезолизумаба (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаба/MEDI4736 и MSB0010718C (авелумаб).
32. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка).
33. Композиция, способ, применение или набор по п. 32, характеризующийся тем, что указанный агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка) выбран из MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK 4166, BMS-986156 и INCAGN1876.
34. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой агонист OX40.
35. Композиция, способ, применение или набор по п. 34, характеризующийся тем, что указанный агонист OX40 выбран из MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 и PF-04518600.
36. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист CTLA-4.
37. Композиция, способ, применение или набор по п. 36, характеризующийся тем, что указанный антагонист CTLA-4 выбран из ипилимумаба и тремелиумаба.
38. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой флударабин.
39. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой цитарабин.
40. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой гипометилирующий агент.
41. Композиция, способ, применение или набор по п. 40, характеризующийся тем, что указанный гипометилирующий агент выбран из 5-азациитидина (азациитидин) и 5-аза-2'-дезоксцитидина (децитабин).

42. Композиция, способ, применение или набор по п. 40, характеризующийся тем, что указанный гипометилирующий агент представляет собой децитабин.

## ПРИТЯЗАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения нарушения у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества ADC и вторичного агента.
2. Первая композиция, содержащая ADC, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей вторичный агент.
3. Первая композиция, содержащая вторичный агент, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей ADC.
4. Применение ADC в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит ADC, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент.
5. Применение вторичного агента в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит вторичный агент, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADC.
6. Набор, содержащий:
  - первое лекарственное средство, содержащее ADC;
  - второе лекарственное средство, содержащее вторичный агент; и возможно
  - листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму первого лекарственного средства в комбинации со вторым лекарственным средством, для лечения нарушения.
7. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее ADC, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент, для лечения нарушения.
8. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее вторичный агент, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADC, для лечения нарушения.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая ADC и вторичный агент.
10. Способ лечения нарушения у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества композиции по п. 9.
11. Композиция по п. 9 для применения в способе лечения нарушения у индивидуума.

12. Применение композиции по п. 9 в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения у индивидуума.
13. Набор, содержащий композицию по п. 9 и набор инструкций по введению индивидууму лекарственного средства, для лечения нарушения.
14. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение включает введение ADC до вторичного агента, одновременно с вторичным агентом или после вторичного агента.
15. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение дополнительно включает введение химиотерапевтического агента.
16. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что индивидуум представляет собой человека.
17. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть нарушение или у него определено нарушение.
18. Композиция, способ, применение или набор по п. 17, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий первый белок-мишень (FTR), или FTR+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки, такие как FTR+ инфильтрирующие Т-клетки.
19. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий второй белок-мишень (STR).
20. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение:
  - a) эффективно лечит более широкий спектр нарушений,
  - b) эффективно лечит резистентные, не поддающиеся лечению или рецидивирующие нарушения,
  - c) демонстрирует повышенную частоту ответов и/или
  - d) демонстрирует увеличенную продолжительность ответа на лечение;по сравнению с лечением либо одним ADC, либо одним вторичным агентом.
21. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что ADC представляет собой анти-CD25-ADC.
22. Композиция, способ, применение или набор по п. 21, характеризующийся тем, что анти-CD25-ADC представляет собой ADCX25.

23. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что FTP представляет собой CD25.
24. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что нарушение представляет собой пролиферативное заболевание.
25. Композиция, способ, применение или набор по п. 24, характеризующийся тем, что нарушение представляет собой рак.
26. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или у него определено нарушение, характеризующееся присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки.
27. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или у него определено нарушение, характеризующееся присутствием новообразования, содержащего или состоящего из CD25- неопластических клеток.
28. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 26 или 27, характеризующийся тем, что новообразование представляет собой всю или часть солидной опухоли.
29. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что нарушение выбрано из группы, включающей:  
лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ);  
лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ);  
рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.
30. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТКi).

31. Композиция, способ, применение или набор по п. 30, характеризующийся тем, что указанный ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТКi) выбран из ибрутиниба (Имбрувика), акалабрутиниба/АСР-196, ОНО/GS-4059, спебрутиниба/AVL-292/СС-292, НМ71224 (поселтиниб) и ВGB-3111 (занубрутиниб).
32. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-29, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист PD1.
33. Композиция, способ, применение или набор по п. 32, характеризующийся тем, что указанный антагонист PD1 выбран из пембролизумаба, ниволумаба, MEDI0680, PDR001 (спартализумаб), камрелизумаба, AUNP12, пидилизумаба, цемиплимаба (REGN-2810), AMP-224, ВGB-A317 (тислелизумаб) и ВGB-108.
34. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-29, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист PD-L1.
35. Композиция, способ, применение или набор по п. 34, характеризующийся тем, что указанный антагонист PD-L1 выбран из атезолизумаба (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаба/MEDI4736 и MSB0010718C (авелумаб).
36. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-29, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка).
37. Композиция, способ, применение или набор по п. 36, характеризующийся тем, что указанный агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка) выбран из MEDI1873, TRX518, GWN323, МК-1248, МК 4166, BMS-986156 и INCAGN1876.
38. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-29, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой агонист OX40.
39. Композиция, способ, применение или набор по п. 38, характеризующийся тем, что указанный агонист OX40 выбран из MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 и PF-04518600.
40. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-29, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист CTLA-4.
41. Композиция, способ, применение или набор по п. 40, характеризующийся тем, что указанный антагонист CTLA-4 выбран из ипилимумаба и тремелиумаба.
42. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-29, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой флударабин или цитарабин.

43. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-29, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой гипометилирующий агент.
44. Композиция, способ, применение или набор по п. 43, характеризующийся тем, что указанный гипометилирующий агент выбран из 5-азацитидина (азацитидин) и 5-аза-2'-дезоксидеозидина (децитабин).
45. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что STP представляет собой BTK, PD1, PDL1, GITR, OX40 или CTLA.
46. Композиция, способ, применение или набор по п. 33, характеризующийся тем, что STP представляет собой PD-L1.

## **ПРИМЕРЫ**

В следующих примерах:

- FTP предпочтительно представляет собой CD25.
- Линии клеток, экспрессирующие CD25 и подходящие для применения в примерах, включают клетки L540, Karpas299, Sudhl1, HDLM-2.
- Заболевание А - диффузная В-крупноклеточная лимфома/ДВККЛ представляет собой агрессивный тип неходжкинской лимфомы, который развивается из В-клеток в лимфатической системе. Она составляет самую большую подгруппу неходжкинской лимфомы.
- Заболевание В - лимфома из клеток мантийной зоны/ЛКМЗ представляет собой редкую В-клеточную НХЛ, которая чаще всего поражает мужчин в возрасте старше 60 лет. Указанное заболевание может быть агрессивным (быстро развивающимся), но у некоторых пациентов оно также может вести себя более неактивно (медленно развиваться). ЛКМЗ составляет примерно пять процентов от всех НХЛ.
- Заболевание С - фолликулярная лимфома/ФЛ представляет собой довольно медленно прогрессирующий тип НХЛ с длительным временем жизни, но при котором очень трудно добиться излечения; она может также трансформироваться в более агрессивные формы лимфомы.

### **Пример 1**

Для демонстрации того, что PBD-ADC может индуцировать ИГК и, следовательно, может являться подходящим агентом для комбинирования с иммуноонкологическими (ИО) лекарственными средствами, линии клеток, экспрессирующие первый белок-мишень (FTP), инкубировали в течение 0, 6, 24 и 48 часов совместно с этопозидом (отрицательный контроль) и оксалиплатином (положительный контроль), 1 мкг/мл ADC, 1 мкг/мл анти-FTP (антитело в ADC) и 1 мкг/мл B12-SG3249 (несвязывающий контрольный ADC с той же PBD-нагрузкой, что и у ADC).

После инкубации количество аннексинV-/PI+ (ранних апоптотических клеток) измеряли путем проточной цитометрии наряду с повышающей регуляцией поверхностного кальретикулина и HSP-70. Стресс эндоплазматического ретикулума (ЭР) измеряли путем нозерн-блоттинга фосфорилирования IRE1, фосфорилирования ATF4 и JNK.

### **Пример 2**

В отдельном эксперименте линии клеток, экспрессирующие FTP, инкубировали в течение 0, 6, 24 и 48 часов совместно с этопозидом (отрицательный контроль) и

оксалиплатином (положительный контроль), 1 мкг/мл ADC (ADC, направленно воздействующий на FTP, с активной группой димера PBD), 1 мкг/мл анти-FTP (антитело в ADC) и 1 мкг/мл B12-SG3249 (несвязывающий контрольный ADC с той же PBD-нагрузкой, что и у ADC).

После инкубации клетки промывали и загружали к дендритным клеткам человека (ДК) еще на 24 часа. Затем активацию ДК измеряли по повышенной экспрессии CD86 на поверхности в популяции ДК (определенной путем проточной цитометрии) и путем измерения ДК-опосредованного высвобождения IL-8 и MIP2.

### **Пример 3**

Цель этого исследования заключалась в предварительной оценке безопасности, переносимости, фармакологической и клинической активности этой комбинации.

Для исследования были выбраны следующие виды рака: заболевание А, заболевание В и заболевание С

Для обоих лекарственных средств существуют доказательства эффективности в качестве отдельных агентов:

- ADC (см., например, WO2014/057119, WO2016/083468 и WO2016/166341)
- Вторичный агент (см. KS Peggs et al.2009, *Clinical and Experimental Immunology*, 157: 9–19 [doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03912.x])

Главная цель этого исследования заключалась в изучении того, можно ли эти агенты безопасно комбинировать и если да, то в определении дозы (доз) и схем, подходящих для будущего исследования. Указанное исследование также оценивало, индуцирует ли каждая комбинация фармакологические изменения в опухоли, которые позволили бы предположить потенциальный полезный клинический эффект.

Кроме того, оно обеспечивало предварительное подтверждение, что комбинация может увеличивать частоту ответов и продолжительность ответа по сравнению с опубликованными данными лечения одним агентом ADC или вторичным агентом.

Каждая группа заболеваний могла включать подгруппу пациентов, которых ранее лечили вторичным агентом, для изучения того, может ли комбинированная терапия преодолеть резистентность к терапии вторичным агентом. Для каждого заболевания не предполагали применять конкретный молекулярный отбор, поскольку имеющиеся в настоящее время данные, в целом, не подтверждают исключение пациентов на основании утвержденных молекулярно-диагностических тестов.

#### Обоснование начальной дозы ADC

Рекомендуемую дозу для расширения числа пациентов (RDE) для уже установленной для ADC (в мкг/кг, вводимых один раз в три недели) применяли для всех

пациентов в этом исследовании. Для обеспечения безопасности пациентов применяли начальную дозу ниже RDE; уровень начальной дозы был таким, при котором полезный эффект для пациента мог быть по-прежнему продемонстрирован в исследовании ADC1, что позволяет предположить, что участие всех пациентов, включенных в исследование на таком уровне дозы, окажет на них по меньшей мере некоторый полезный эффект.

#### Обоснование начальной дозы вторичного агента

RDE для уже установленной для вторичного агента (в мкг/кг, вводимых один раз в три недели) применяли для всех пациентов в этом исследовании. Для обеспечения безопасности пациентов применяли начальную дозу ниже RDE; уровень начальной дозы был таким, при котором полезный эффект для пациента мог быть по-прежнему продемонстрирован в исследовании вторичного агента 1 (SA1), что позволяет предположить, что участие всех пациентов, включенных в исследование на таком уровне дозы, окажет на них по меньшей мере некоторый полезный эффект.

#### Цели и связанные с ними конечные точки

<b>Цель</b>	<b>Конечная точка</b>
<p><i>Первичная цель</i></p> <p>Получение характеристик безопасности и переносимости ADC в комбинации с вторичным агентом и определение рекомендуемой дозы и схем для будущих исследований</p>	<p>Частота и тяжесть возникших во время лечения нежелательных явлений (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (СНЯ)</p> <p>Изменения между исходными лабораторными показателями и основными жизненными показателями и этими показателями после исходного уровня</p> <p>Частота случаев дозолимитирующей токсичности (ДЛТ) во время первого цикла лечения (только повышение дозы)</p> <p>Частота приостановки лечения и снижения дозы</p>
<p><i>Вторичные цели</i></p> <p>Оценка клинической активности комбинации ADC с вторичным агентом</p>	<p>Общая частота ответов (ORR), продолжительность ответа (DOR), выживаемость без прогрессирования (PFS), общая выживаемость (OS)</p>
<p>Получение характеристик</p>	<p>ППК и Cmax для каждого соединения</p>

<p>фармакокинетического (ФК) профиля для каждого из двух соединений ADC и вторичного агента</p> <p>Подтверждение иммуногенности и антител к лекарственному средству (ADA) - к ADC</p>	<p>Антитела к лекарственному средству (ADA) до, во время и после лечения ADC</p>
<p><i>Поисковые цели</i></p> <p>Исследование возможной корреляции ФК-профилей с безопасностью/переносимостью и эффективностью</p> <p>Получение характеристик изменений иммунного инфильтрата в опухолях</p> <p>Получение характеристик изменений уровней циркулирующих цитокинов в плазме и маркеров активации в циркулирующих иммунных клетках</p>	<p>Коэффициенты корреляции между ППК и/или Cmax каждого соединения или показателя соединения и любой из переменных безопасности или эффективности</p> <p>Иммуногистохимия биопсийных образцов опухолей до и во время лечения,</p> <p>Измерения (например, путем ELISA) иммунологически значимых цитокинов в плазме или сыворотке; уровней окрашивания для маркеров активации циркулирующих иммунных клеток (например, FACS)</p>

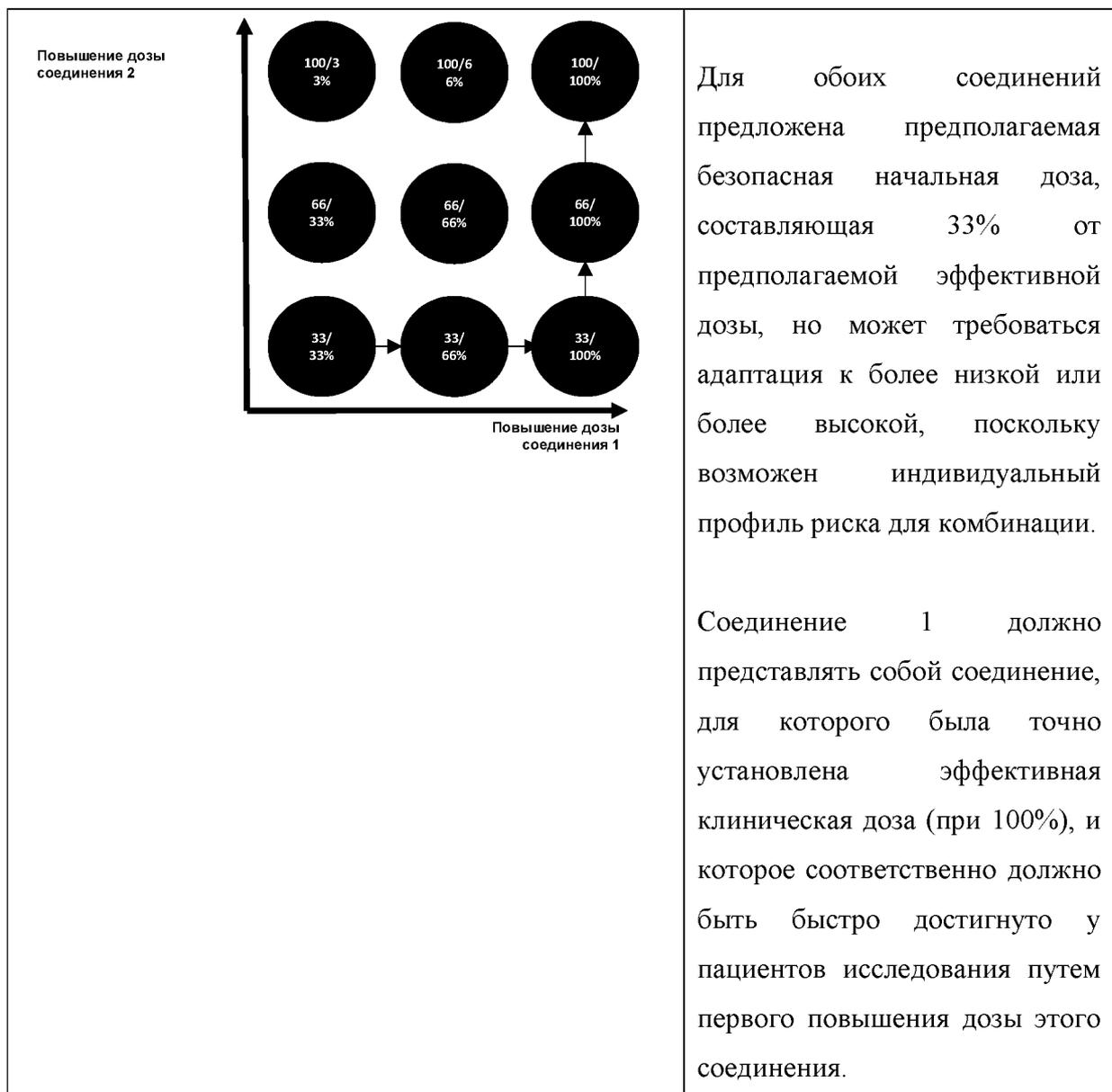
### Дизайн исследования

Это исследование фазы Ib, многоцентровое, открытое исследование для получения характеристик безопасности, переносимости, фармакокинетики (ФК), фармакодинамики (ФД) и противоопухолевой активности ADC в комбинации с вторичным агентом у пациентов с заболеванием А, заболеванием В и заболеванием С.

Исследование состоит из части повышения дозы с последующей частью расширения числа пациентов, получающих установленную дозу.

Повышение доз начинают с пониженных начальных доз (по сравнению с их соответствующими рекомендованными уровнями доз фазы 2 или разрешенными уровнями доз) как для ADC, так и для вторичного агента, для обеспечения безопасности пациентов. Начальные дозы составляют 33% (или 50%) от RDE для каждого соединения. Затем дозы

сначала повышают для вторичного агента до достижения RDE или разрешенной дозы, или более низкой дозы при необходимости по причинам переносимости. Затем дозу ADC повышают до достижения RDE для комбинированного лечения. Это представлено на диаграмме ниже:



Если определяют, что комбинация доз является безопасной, она может быть протестирована на дополнительных пациентах для подтверждения безопасности и переносимости на этом уровне дозы. Может быть проведена дополнительная адаптация дозы каждого соединения и/или может быть модифицирована схема.

Руководством для повышения дозы комбинации является байесовская логистическая регрессионная модель (BLRM) на основе любых значений дозолимитирующей токсичности (ДЛТ), наблюдаемых в первых (или первых двух, ТВС) циклах терапии. Использование

BLRM является надежным методом оценки максимальной переносимой дозы (MTD)/рекомендуемой дозы для расширения числа пациентов (RDE) у пациентов, страдающих раком. Руководством для адаптивной BLRM служит принцип повышения дозы с контролем передозировки (EWOC) для контроля риска ДЛТ у будущих пациентов в исследовании. Использование адаптивных байесовских моделей ответа для небольших наборов данных было принято FDA и EMEA ("Guideline on clinical trials in small populations", 1 февраля 2007 г.) и подтверждено многочисленными публикациями (Babb et al. 1998, Neuenschwander et al. 2008).

Решения по новым комбинациям доз принимают исследователи и персонал спонсорского исследования в ходе вызова, связанного с безопасностью повышения дозы (DESC), на основе анализа информации о переносимости и безопасности у пациентов (включая сводные данные BLRM о риске ДЛТ если применимо) наряду с ФК, ФД и предварительной информацией об активности, доступной на момент принятия решения.

После определения MTD/RDE для комбинации можно начинать часть исследования с расширением числа пациентов, получающих установленную дозу, для дополнительной оценки безопасности, переносимости и предварительной эффективности.

- Для комбинаций с ИО также получают характеристики изменений иммунного инфильтрата в опухолях после комбинированного лечения при заболеваниях-мишенях.

С учетом имеющегося предшествующего клинического опыта в случае с агентами в этом исследовании, ожидается, что в большинстве случаев доза комбинации может быть определена без тестирования большого количества уровней доз или схем введения доз. Для оценки фармакодинамической активности комбинаций пациентов просят пройти биопсию опухоли в момент включения в исследование и снова после приблизительно двух циклов терапии.

- Для ИО-комбинации: Степень изменения инфильтрации опухоли иммунными клетками, включая лимфоциты и макрофаги, вносит вклад в решение о любом потенциальном полезном эффекте.

#### Часть исследования с повышением дозы

Во время части исследования с повышением дозы пациентов лечат фиксированной дозой ADC, вводимой внутривенно, и повышающимися дозами вторичного агента до достижения RDE для вторичного агента. Затем дозы ADC повышают (в разных когортах), тогда как дозу вторичного агента сохраняют постоянной.

В каждой когорте повышения дозы лечат от двух до приблизительно 3 или 4

пациентов с заболеванием А, заболеванием В или заболеванием С до определения МТD-дозы (доз)/RDE-дозы (доз).

Перед включением в исследование второго пациента на уровне дозы 1 осуществляют 24-часовое наблюдение. Период наблюдения ДЛТ на каждом уровне дозы составляет либо 1 цикл (3 недели), либо 2 цикла (6 недель) в соответствии с предписаниями соответствующих органов для ИО-терапии, после чего определяют, повышать ли до следующего уровня дозы, оставаться ли на текущем уровне дозы или снижать ли до предшествующего уровня дозы для следующей когорты. Снижение дозы не осуществляют с уровня дозы 1. Повышение дозы у одного и того же пациента не допускается.

Повышение дозы не допускается, если 2 или более пациентов не имеют полной информации о ДЛТ в течение первого цикла при любом конкретном уровне дозы. Повышение дозы определяют путем использования mCRM с целевой частотой ДЛТ, составляющей 30%, и интервалом эквивалентности от 20% до 35%, а также повышения дозы с контролем передозировки (EWOC) и без пропуска дозы.

Пациентов относят к когорте, в которую ведут активный набор. Повышение дозы осуществляют для каждой комбинации после завершения одного цикла лечения. Проводят тщательный мониторинг оценки безопасности, включая нежелательные явления (НЯ) и данные лабораторных анализов, для всех включенных пациентов для выявления любой ДЛТ. Определяют одну МТD/RDE; не устанавливают специфичную для заболевания МТD/RDE.

Для повышения дозы используют mCRM под контролем Управляющего комитета по повышению дозы (Dose Escalation Steering Committee, DESC). DESC подтверждает каждый уровень повышения дозы после изучения всех доступных данных по безопасности. ФК-данные от пациентов с этим уровнем дозы и предыдущими уровнями доз могут также служить основой для принятия решения. DESC может остановить повышение дозы перед определением МТD на основе появляющихся данных о ФК, ФД, токсичности или ответе.

На любом уровне дозы могут быть включены дополнительные пациенты для дополнительной оценки безопасности и переносимости, если по меньшей мере 1 пациент в исследовании достиг частичного ответа или большего, или если DESC считает необходимым провести дополнительную оценку данных о ФК или ФД для определения RDE.

Повышение дозы прекращают после последовательного назначения 3 когортам (или по меньшей мере 6 пациентам) одного и того же уровня дозы. Если не достигают МТD, определяют рекомендуемую дозу для расширения числа пациентов (RDE). Перед

определением MTD/RDE минимум 6 пациентов должны получить лечение комбинацией.

Предполагается получение парных биопсийных образцов опухоли от пациентов во время повышения дозы. Анализ этих биопсийных образцов вносит вклад в улучшение понимания взаимосвязи между дозой и фармакодинамической активностью комбинации.

#### Контроль Управляющего комитета по повышению дозы за безопасностью

DESC, состоящий из терапевтов и исследователей ADC, непрерывно оценивает безопасность пациентов во время повышения дозы, чтобы определить требует ли модификации схема повышения дозы, назначенная mCRM. В дополнение к наблюдениям за безопасностью данные ФК и/или ФД могут также служить основой для принятия решений. Промежуточные дозы могут быть назначены после согласования между терапевтами и исследователями ADC. DESC может продолжать осуществлять контроль во время 2 части исследования. Не учитывают Независимый комитет по мониторингу данных безопасности (DSMB).

#### Часть исследования с расширением числа пациентов, получающих установленную дозу

После указания MTD/RDE можно начинать проведение части исследования с расширением числа пациентов, получающих установленную дозу. Основная цель части исследования с расширением числа пациентов, получающих установленную дозу, заключается в дополнительной оценке безопасности и переносимости исследуемого лечения в MTD/RDE и достижении предварительного понимания эффективности комбинации по сравнению с ранее полученными данными эффективности одного агента.

Важной поисковой целью является оценка изменений иммунного инфильтрата в опухоли в ответ на лечение. Их оценивают в парных биопсийных образцах опухолей, полученных от пациентов, с минимум десятью оцениваемыми биопсийными парами (биопсийные материалы должны содержать достаточное количество опухоли для анализа) у пациентов, получавших лечение в MTD/RDE. Если это невыполнимо, сбор этих биопсийных материалов может быть прекращен. В каждой группе исследования планируют лечить минимум от 10 до 20 пациентов.

Открывают несколько разных групп исследования, по одной на заболевание. В части исследования с расширением числа пациентов, получающих установленную дозу, всего может быть задействовано девять групп исследования. Если включение для какой-либо из этих групп невозможно, то включение в эту группу может быть завершено до достижения целевого показателя от 10 до 20 пациентов.

В каждой группе лечения разрешено лечение максимум приблизительно шести пациентов, которые получили предшествующее введение одного (т.е. не в комбинации) вторичного агента и у которых произошло прогрессирование на нем. Это количество может

быть увеличено, если комбинация демонстрирует перспективу преодоления резистентности к предшествующему лечению одним вторичным агентом.

#### Популяция пациентов

Исследование проводят на взрослых пациентах с заболеванием А, заболеванием В или заболеванием С на поздней стадии, как указано выше. Исследователь или назначенное лицо должно обеспечить лечение в исследовании только тех пациентов, которые соответствуют всем следующим критериям включения и не соответствуют ни одному из критериев исключения.

#### Критерии включения

Пациенты, подходящие для включения в это исследование, должны соответствовать всем следующим критериям:

1. Информированное согласие в письменной форме должно быть получено до проведения любых процедур
2. Возраст: 18 лет
3. Пациенты с распространенным/метастатическим раком, с измеримыми проявлениями заболевания по данным RECIST, версия 1.1, у которых произошло прогрессирование несмотря на стандартную терапию или которые не переносят стандартную терапию, или для которых не существует стандартной терапии. Пациенты должны попадать в одну из следующих групп:
  - Заболевания А
  - Заболевания В
  - Заболевания С
4. Общее состояние онкологического пациента по шкале ECOG (0 - 1) (или 2 ТВС)
5. ТВС: У пациента должен быть очаг заболевания, поддающийся биопсии, и пациент должен подходить для биопсии опухоли в соответствии с руководством лечебного учреждения. Пациент должен быть готов вновь пройти биопсию опухоли в начале исследования и снова во время терапии в этом исследовании.
6. Допустима предшествующая терапия вторичным агентом или родственными соединениями (т.е. тем же МОА)

#### Критерии исключения

Пациенты, подходящие для этого исследования, должны не соответствовать любому из следующих критериев:

1. Тяжелые реакции гиперчувствительности на другие mAb в анамнезе (ИЛИ на то же mAb остова, что и в ADC, ИЛИ на то же mAb ИО, если применимо)
2. Известное положительное ADA человека в сыворотке к остову mAb, что и в ADC, в

анамнезе

3. Только заболевание центральной нервной системы (ЦНС) (если применимо)
4. Симптоматические метастазы в ЦНС или признаки лептоменингеального заболевания (МРТ головного мозга или ранее документально зафиксированная цитология спинномозговой жидкости (СМЖ))

- Ранее подвернутые лечению бессимптомные метастазы в ЦНС допустимы при условии, что последнее лечение (системная противораковая терапия и/или местная лучевая терапия) было завершено за  $\geq 8$  недель до 1-го дня дозирования, за исключением того, что допускается использование низких доз стероидов с постепенным снижением)
- Пациенты с отдельными метастазами в твердой мозговой оболочке подходят для участия.

5. Пациент, у которого значения лабораторных анализов за пределами диапазона определены следующим образом:

- Креатинин в сыворотке  $\leq 1,5$  x верхней границы нормы (ВГН) Если креатинин в сыворотке  $> 1,5$ , клиренс креатинина (рассчитанный с использованием формулы Кокрофта-Голта или измеренный) должен быть  $> 60$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, чтобы пациент подходил для участия
- Общий билирубин  $> 1,5$  x ВГН, за исключением пациентов с синдромом Жильбера, которых исключают, если общий билирубин  $> 3,0$  x ВГН или прямой билирубин  $> 1,5$  x ВГН
- Аланинаминотрансфераза (АЛТ)  $> 3$  x ВГН, за исключением пациентов с опухолевым поражением печени, которых исключают, если АЛТ 5 x ВГН
- Аспаратаминотрансфераза (АСТ)  $> 3$  x ВГН, за исключением пациентов с опухолевым поражением печени, которых исключают, если АСТ 5 x ВГН
- Абсолютное число нейтрофилов  $< 1,0 \times 10^9$ /л
- Количество тромбоцитов  $< 75 \times 10^9$ /л
- Гемоглобин (Hgb)  $< 8$  г/дл
- Нарушение уровня калия, магния, кальция или фосфата  $> 1$  степени по STCAE несмотря на соответствующую заместительную терапию

6. Нарушение функции сердца или клинически значимое заболевание сердца, включая любое из следующего:

- Клинически значимое и/или неконтролируемое заболевание сердца, такое как застойная сердечная недостаточность, требующая лечения (III или IV степень по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA)) или

неконтролируемая гипертензия, определяемая систолическим артериальным давлением (САД) 160 мм рт.ст. и/или диастолическим артериальным давлением (ДАД) 100 мм рт.ст., с антигипертензивным препаратом или без него

- Интервал QTcF > 470 мсек для женщин или >450 мсек для мужчин на ЭКГ-скрининге с использованием коррекции по формуле Фридеричиа, врожденный синдром удлиненного интервала QT
- Острый инфаркт миокарда или нестабильная стенокардия за < 3 месяца до включения в исследование
- Клинически значимый порок клапанов сердца с документально зафиксированным нарушением функции сердца
- Симптоматический перикардит
- Кардиомиопатия в анамнезе или сохраняющаяся документально зафиксированная кардиомиопатия
- Фракция выброса левого желудочка (ФВЛЖ) <40% по данным эхокардиограммы (ЭХО-КГ) или мультигейтированной радионуклидной ангиографии (MUGA)
- Наличие в анамнезе или присутствие каких-либо клинически значимых сердечных аритмий, например, желудочковой, наджелудочковой, узловых аритмий или нарушения проводимости (классификатор ТВС: ... требуется водитель ритма или не контролируется с помощью лекарственных средств)
- Наличие нестабильной фибрилляции предсердий (частота желудочкового ответа > 100 ударов в минуту)
  - ПРИМЕЧАНИЕ: Пациенты со стабильной фибрилляцией предсердий могут быть включены в исследование при условии, что они не соответствуют другим критериям исключения по сердцу
- Полная блокада левой ножки предсердно-желудочкового пучка (LBBB), двухпучковая блокада
- Любые клинически значимые отклонения ST-сегмента и/или Т-зубца от нормы

7. Токсичность, связанная с предшествующей ИО терапией, которая привела к прекращению терапии. Не исключаются пациенты, получившие подходящее лечение от кожной сыпи, связанной с лекарственным средством, или с заместительной терапией при эндокринопатиях, при условии, что эта токсичность не приводила к прекращению предшествующего лечения.

8. Пациенты с активным, известным аутоиммунным заболеванием или

подозрением на него. Субъектов с витилиго, сахарным диабетом I типа, остаточным гипотиреозом вследствие аутоиммунного состояния, требующим только гормонозаместительной терапии, псориазом, не требующим системного лечения, или состояниями, которые, как ожидают, не рецидивируют при отсутствии внешнего триггера, разрешается включать в исследование при условии, что указанного триггера можно избежать.

9. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) или активная вирусная инфекция вируса гепатита В (ВГВ) или гепатита С (ВГС)

- Для того, чтобы подходить для включения, тестирование не является обязательным. Проведение тестирования на ВГС следует рассматривать, если у пациента есть риск недиагностированного ВГС (например, инъекционное употребление наркотиков в анамнезе).

10. Злокачественное заболевание, отличное от того, которое лечат в этом исследовании. Исключения для этого критерия исключения включают следующее: злокачественные новообразования, которые удавалось излечить и рецидив которых не происходил в течение 2 лет до начала тестируемого лечения; полностью иссеченный базальноклеточный и плоскоклеточный рак кожи; любое злокачественное новообразование, которое считается медленно прогрессирующим и которое никогда не требовало терапии; и полностью иссеченная карцинома *in situ* любого типа.

11. Системная противораковая терапия в течение 2 недель после первой дозы исследуемого лечения. Для цитотоксических агентов, обладающих значительной отсроченной токсичностью, например, митомицина С и нитрозомочевин, указан период «отмывки» 4 недели. Для пациентов, получающих противоопухолевую иммунотерапию, такую как антагонисты CTLA-4, указан период «отмывки» 6 недель.

12. Активная диарея 2 степени по СТСАЕ или состояние, связанное с хронической диареей (такое как синдром раздраженного кишечника, воспалительное заболевание кишечника)

13. Наличие 2: токсичности 2 степени по СТСАЕ (за исключением алопеции, периферической нейропатии и ототоксичности, из-за которых исключают, если степень  $\geq$  3 степени по СТСАЕ) вследствие предшествующей противораковой терапии.

14. Активная инфекция, требующая системной антибиотикотерапии.

15. Активное изъязвление верхних отделов желудочно-кишечного тракта или желудочно-кишечное кровотечение

16. Активный геморрагический диатез или пероральный прием антивитамина К (за исключением низких доз варфарина и аспирина или эквивалента, если международное

нормализованное отношение (МНО)  $\leq 2,0$ )

17. Активное аутоиммунное заболевание, моторная нейропатия аутоиммунного происхождения и другое аутоиммунное заболевание ЦНС

18. Пациенты, которым требуются сопутствующие иммунодепрессанты или постоянное лечение кортикоидами, кроме:

- заместительная доза стероидов при надпочечниковой недостаточности
- разрешены топические, ингаляционные, назальные и офтальмологические стероиды

19. Применение любых живых вакцин от инфекционных заболеваний (например, гриппа, ветряной оспы, пневмококка) в течение 4 недель после начала исследуемого лечения (NB применение живых вакцин не разрешено на протяжении всего исследования)

20. Применение гематопозитических колониестимулирующих факторов роста (например, G-CSF, GM-CSF, M-CSF)  $< 2$  недели до начала введения исследуемого лекарственного средства. Агент стимуляции эритроидов разрешен, если он был начат по меньшей мере за 2 недели до первой дозы исследуемого лечения.

21. Обширное оперативное вмешательство в течение 2 недель после первой дозы исследуемого лечения (NB медиастиноскопия, установка устройства центрального венозного доступа или установка зонда для искусственного кормления не считаются обширным оперативным вмешательством).

22. Лучевая терапия в течение 2 недель после первой дозы исследуемого лекарственного средства, за исключением паллиативной лучевой терапии в ограниченной области, например, для лечения боли в костях или болезненной массы опухоли в очаге. Для того, чтобы ответ на лечение можно было оценить, у пациентов должны сохраняться измеримые проявления заболевания, которые не были подвергнуты облучению.

23. Участие в интервенционном, экспериментальном исследовании в течение 2 недель после первой дозы исследуемого лечения.

24. Любое состояние, которое, по мнению исследователя, препятствует участию пациента в клиническом исследовании из-за проблем безопасности, соблюдения процедур клинического исследования или интерпретации результатов исследования.

25. Ведущие половую жизнь мужчины, если они не используют презерватив во время полового акта, при приеме лекарственного средства и в течение 90 дней после прекращения исследуемого лечения, и не должны планировать зачатие ребенка в этот период. Презерватив также должны использовать мужчины, перенесшие вазэктомию,

для предотвращения передачи лекарственного средства через семенную жидкость.

26. Беременные или кормящие женщины, при этом беременность определяется как состояние женщины после зачатия и до завершения беременности, и подтверждена положительным лабораторным тестом на ХГЧ. В редких случаях эндокринно-секретирующей опухоли уровни ХГЧ могут быть выше пределов нормы, но при отсутствии беременности у пациента. В этих случаях для исключения беременности необходимо проведение повторного теста на ХГЧ в сыворотке (с не повышающимся результатом) и ультразвуковое исследование влагалища/органов малого таза. После подтверждения результатов и обсуждения с медицинским представителем эти пациенты могут войти в исследование.

27. Женщины, способные к деторождению, определяемые как все женщины, физиологически способные забеременеть, если они не используют высокоэффективные методы контрацепции во время исследуемого лечения и в течение 90 дней после последней любой дозы исследуемого лечения. Высокоэффективные методы контрацепции включают:

- Полное воздержание (когда это соответствует предпочтительному и обычному образу жизни пациента). Периодическое воздержание (например, календарный, овуляционный, симптотермальный, постовуляционный методы) и прерванный половой акт не являются приемлемыми методами контрацепции
- Стерилизацию женщины (перенесла хирургическую двустороннюю овариэктомию с гистерэктомией или без нее), тотальную гистерэктомию или перевязку маточных труб по меньшей мере за 6 недель до исследуемого лечения. В случае одной овариэктомии, только когда репродуктивный статус женщины был подтвержден последующей оценкой уровня гормонов
- Стерилизацию мужчины (по меньшей мере за 6 месяцев до скрининга). Для пациентов-женщин в исследовании партнер-мужчина, перенесший вазэктомию, должен быть единственным партнером для этого пациента.
- Использование пероральных (эстроген и прогестерон), инъекционных или имплантируемых комбинированных гормональных методов контрацепции или установку внутриматочного устройства (ВМУ) или внутриматочной системы (ВМС), или другие формы гормональной контрацепции, обладающие сопоставимой эффективностью (частота неэффективности <1%), например, гормонального вагинального кольца или трансдермальной гормональной контрацепции.

- В случае использования пероральной контрацепции женщины должны были стабильно принимать одни и те же пилюли в течение минимум 3 месяцев до начала исследуемого лечения.
- Женщины считаются находящимися в постменопаузе и не способными к деторождению, если у них была на протяжении 12 месяцев естественная (спонтанная) аменорея с соответствующим клиническими характеристиками (например, соответствующий возраст, вазомоторные симптомы в анамнезе) или они перенесли хирургическую двустороннюю овариэктомию (с гистерэктомией или без нее) или перевязку маточных труб по меньшей мере 6 недель назад. В случае одной овариэктомии, только когда репродуктивный статус женщины был подтвержден последующей оценкой уровня гормонов, если она считается не способной к деторождению.

#### Дозолимитирующая токсичность и руководство по коррекции доз

Дозолимитирующая токсичность (ДЛТ) определяется как любое из следующих явлений, считающихся по мнению исследователя по меньшей мере возможно связанными с ADC, которое возникает на протяжении 21-дневного периода оценки ДЛТ. Токсичность, которая очевидно и непосредственно связана с первичным заболеванием или имеет другую этиологию, исключают из этого определения.

#### Определения ДЛТ

**Гематологическая ДЛТ** определена как:

- фебрильная нейтропения или нейтропеническая инфекция 3 или 4 степени
- нейтропения 4 степени длительностью >7 дней
- тромбоцитопения 4 степени
- тромбоцитопения 3 степени с клинически значимым кровотечением или тромбоцитопения 3 степени, требующая переливания тромбоцитов
- анемия 3 степени, требующая переливания
- анемия 4 степени

**Негематологическая ДЛТ** определена как:

- Негематологическая токсичность 4 степени
- Негематологическая токсичность 3 степени длительностью >3 дней несмотря на оптимальное поддерживающее лечение или медицинское вмешательство
- Случай, соответствующий закону Хая (АСТ и/или АЛТ > 3х ВГН и билирубин > 2х ВГН, и без первоначальных признаков холестаза (активность щелочной фосфатазы в сыворотке (ALP) < 2х ВГН) и при отсутствии другой причины, которая могла бы

объяснить комбинацию повышенных уровней трансаминаз и общего билирубина в сыворотке, такой как вирусный гепатит А, В или С, предшествующее или острое заболевание печени, или другое лекарственное средство, способное вызывать наблюдаемое поражение)

- Реакция гиперчувствительности/инфузионная реакция 3 степени или выше (независимо от премедикации). Реакцию гиперчувствительности/инфузионную реакцию 3 степени, которая разрешается в течение 8 часов после начала при соответствующем клиническом ведении, не относят к ДЛТ.
- Снижение ФВЛЖ до  $< 40\%$  или снижение  $> 20\%$  от исходного уровня
- Синдром лизиса опухоли 4 степени (СЛО 3 степени не является ДЛТ, если он не приводит к необратимому ишемическому поражению органов)

Следующие состояния не считаются негематологической ДЛТ:

- Утомляемость 3 степени в течение  $\leq 7$  дней
- Диарея, тошнота или рвота 3 степени при отсутствии премедикации, которая отвечает на терапию и уменьшается по меньшей мере на 1 степень в течение 3 дней для явлений 3 степени или до  $\leq 1$  степени в течение 7 дней.
- Повышение уровня АСТ или АЛТ  $\geq 5$  x ВГН, но  $\leq 8$  x ВГН без сопутствующего повышения уровня билирубина, который понижается до  $\leq 2$  степени в течение 5 дней после появления.
- Липаза сыворотки или амилаза сыворотки 3 степени в течение  $\leq 7$  дней, если нет клинических признаков или симптомов панкреатита

Пациенты, испытывающие ДЛТ, которая разрешается или стабилизируется при соответствующем лечении, могут продолжать лечение по усмотрению исследователя после консультации со спонсором.

### Коррекция доз

В таблице ниже приведено подробное руководство по управлению специфической токсичностью. Для управления явлениями, не указанными в таблицах, следующее может служить руководством для исследователей:

Степень НЯ	Руководство по применению ADC
1	Коррекция дозы не требуется
2	<p><u>Первое возникновение:</u></p> <p>Рассматривают приостановку введения одного или обоих лекарственных средств до снижения до <math>\leq 1</math> степени или исходного уровня. Для снижения можно пропустить до 1 дозы одного или обоих лекарственных средств. Если снижение до <math>\leq 1</math> степени или исходного уровня происходит в течение 21 дня после последней плановой (но пропущенной) дозы одного или обоих лекарственных средств, продолжают введение одного или обоих лекарственных средств на исходном назначенном уровне дозы в последующих циклах лечения.</p> <p>Если снижение до <math>\leq 1</math> степени или исходного уровня не происходит в течение 21 дня после последней плановой (но пропущенной) дозы, окончательно отменяют одно или оба лекарственных средства.</p> <p><u>Второе возникновение:</u></p> <p>Приостанавливают введение одного или обоих лекарственных средства до снижения до <math>\leq 1</math> степени или исходного уровня. Для разрешения можно пропустить до 1 дозы одного или обоих лекарственных средств. Если снижение до <math>\leq 1</math> степени или исходного уровня происходит в течение 21 дня после последней плановой (но пропущенной) дозы, продолжают введение одного или обоих лекарственных средств на уровне дозы, который на 1 уровень ниже исходной назначенной дозы, в последующих циклах лечения.</p> <p>Если снижение до <math>\leq 1</math> степени или исходного уровня не происходит в течение 21 дня после последней плановой (но пропущенной) дозы, окончательно отменяют одно или оба лекарственных средства.</p> <p><u>Третье возникновение:</u></p> <p>Окончательно отменяют одно или оба лекарственных средства.</p>

3	<p><u>Первое возникновение:</u></p> <p>Приостанавливают введение одного или обоих лекарственных средства до снижения до <math>\leq 1</math> степени или исходного уровня. Для снижения можно пропустить до 1 дозы одного или обоих лекарственных средств, затем продолжить на уровне дозы, который на 1 уровень ниже исходной назначенной дозы, в последующих циклах лечения.</p> <p><u>Второе возникновение:</u></p> <p>Окончательно отменяют одно или оба лекарственных средства.</p>
4	<p>Окончательно отменяют одно или оба лекарственных средства.</p>

#### Пример 4

Исследование эффективности суррогата-301 *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей с использованием клеток рака толстой кишки мыши MC38

#### Введение

MC38 представляет собой модель рака толстой кишки мыши, используемую доклинически в исследованиях иммунотерапии, которая, как известно, демонстрирует инфильтрацию Treg-клетками и Teff-клетками.

В Arce Vargas et al., 2017, Immunity 46, 1–10, April 18, 2017 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.013>) продемонстрировано селективное истощение Treg-клеток, инфильтрирующих опухоль, в модели MC38 с использованием Fc-усиленного варианта PC61, антитела крысы, направленного против CD25 мыши, и описана синергия с PD1. PC61 дикого типа конъюгировали с PBD-димером SG3249 и обозначали суррогат-ADCx25. Эффективность конъюгата суррогат-ADCx25 исследовали в качестве монотерапии или в комбинации с анти-PD1 (анти-PD1, клон RPM1-14, BioXcell № кат BE0146) в модели сингенной опухоли у мышей MC38.

#### Дизайн исследования

Суррогат-ADCx25 вводили в виде однократной дозы (0,1, 0,5 и 1 мг/кг) в 1 день либо отдельно, либо в комбинации с анти-PD1 антителом (вводимым в стандартном режиме дозирования, т.е. 5 мг/кг во 2, 5 и 8 день). В качестве контроля ADC (B12-SG3249), представляющий собой изотипический контроль, вводили в виде однократной дозы (1 мг/кг) в 1 день либо отдельно, либо в комбинации с анти-PD1 антителом (вводимым в стандартном режиме дозирования), тогда как анти-PD1 антитело вводили отдельно в стандартном режиме дозирования.

#### Результаты

Суррогат-ADCx25 демонстрировал высокую и дозозависимую противоопухолевую активность *per se* в модели сингенной опухоли MC38. ADC, представляющий собой изотипический контроль, обладал значительно более низкой активностью, чем суррогат-ADCx25 в дозе 1 мг/кг. (Фиг.2). Наблюдали сильную синергию при комбинировании однократной низкой дозы конъюгата суррогат-ADCx25 с анти-PD1 антителом (фиг.3). Высокая эффективность более высоких доз конъюгата суррогат-ADCx25 в настоящей модели не позволяла оценить синергию в более высоких дозах.

### Пример 5

Для демонстрации того, что ADCx25 действует синергетически с цитарабином панель линий CD25(+) клеток, включая, но не ограничиваясь ими, Карпас и SUDHL1, совместно обрабатывали диапазоном концентраций как ADCx25, так и цитарабина. В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток совместно обрабатывали диапазоном концентраций цитарабина и не направленного контрольного ADC или диапазоном концентраций ADC и носителя.

После инкубации измеряли два параметра: количество поверхностного CD25 (определяемое путем проточной цитометрии) и цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов CellTiter-Glo® или MTS). Цитотоксическую синергию рассчитывали путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса (таблица 1) с использованием программы анализа CalcuSyn.

Значение комбинаторного индекса (CI)		Синергия/антагонизм
<0,1	+++++	Очень сильная синергия
0,1–0,3	++++	Сильная синергия
0,3–0,7	+++	Синергия
0,7–0,85	++	Умеренная синергия
0,85–0,9	+	Слабая синергия
0,9–1,1		Близкая к аддитивной
1,1–1,2	–	Слабый антагонизм
1,2–1,45	---	Умеренный антагонизм
1,45–3,3	----	Антагонизм
3,3–10	-----	Сильный антагонизм

>10	-----	Очень сильный антагонизм
-----	-------	--------------------------

**Таблица 1**

На фиг.4 представлены данные цитотоксичности *in vitro* в отношении линии клеток Кагрas299 для цитарабина отдельно (левый график) или в комбинации с ADCx25 (правый график). Анализ посредством Calcsyn (таблица 2) показал очевидную синергию, особенно при более высоких концентрациях ADC.

<b>СИ для экспериментальных значений</b>			
<b>ADCx25 (нг/мл)</b>	<b>Децитабин (нМ)</b>	<b>Пораженная фракция (Fa)</b>	<b>СИ</b>
0,1	30	0,016	2,846
0,4	30	0,019	4,966
1,2	30	0,156	0,928
3,7	30	0,358	0,747
11,1	30	0,662	0,522
33,3	30	0,821	0,589
100	30	0,836	1,563
0,1	100	0,145	0,505
0,4	100	0,172	0,580
1,2	100	0,313	0,433
3,7	100	0,437	0,568
11,1	100	0,669	0,522
33,3	100	0,823	0,587
100	100	0,832	1,622

**Таблица 2**

На фиг.5 представлены данные цитотоксичности *in vitro* в отношении линии клеток KG-1 для цитарабина отдельно (левый график) или в комбинации с ADCx25 (правый график). Анализ посредством Calcsyn (таблица 3) показал очевидную синергию, особенно в случае 10 нМ цитарабина.

<b>СИ для экспериментальных значений</b>

ADCx25 (нг/мл)	Децитабин (нм)	Fa	CI
0,005	1	0,078	1,296
0,05	1	0,022	15,593
0,5	1	0,120	3,690
5	1	0,393	1,596
50	1	0,883	0,136
0,05	10	0,044	27,002
0,5	10	0,205	4,241
5	10	0,597	0,747
50	10	0,906	0,131

**Таблица 3**

KG-1 экспрессируют низкие уровни CD25. На фиг.6 показано, что синергию цитарабина и ADCx25 в отношении линии клеток KG-1 можно объяснить повышением уровня поверхностного CD25, поскольку инкубация CD25(+) клеток KG-1 совместно с цитарабином приводила к двукратному повышению уровней поверхностного CD25 (определяемому путем анализа FACS). Повышения уровня поверхностного CD25 не наблюдали, когда линию клеток Каграс299 с высоким содержанием CD25 инкубировали совместно с цитарабином.

### **Пример 6**

Для демонстрации того, что ADCx25 действует синергетически с децитабином панель линий CD25(+) клеток совместно обрабатывали диапазоном концентраций как ADCx25, так и децитабина. В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток обрабатывали диапазоном концентраций децитабина или диапазоном концентраций ADCx25 и носителя.

После инкубации измеряли два параметра: количество поверхностного CD25 (определяемое путем проточной цитометрии) и цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов MTS). Для определения цитотоксичности жизнеспособность клеток измеряли путем добавления MTS в каждую лунку и инкубации в течение 4 часов при 37°C. Процент жизнеспособности клеток рассчитывали по сравнению с необработанным контролем. Цитотоксическую синергию рассчитывали путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса (таблица 3) с использованием программы анализа CalcuSyn.

Значение CI		Синергия/антагонизм
<0,1	+++++	Очень сильная синергия
0,1–0,3	++++	Сильная синергия
0,3–0,7	+++	Синергия
0,7–0,85	++	Умеренная синергия
0,85–0,9	+	Слабая синергия
0,9–1,1		Близкая к аддитивной
1,1–1,2	–	Слабый антагонизм
1,2–1,45	---	Умеренный антагонизм
1,45–3,3	----	Антагонизм
3,3–10	-----	Сильный антагонизм
>10	-----	Очень сильный антагонизм

**Таблица 3**

На фиг.7 представлены данные цитотоксичности *in vitro* в отношении линии клеток Каrpaс299 для децитабина отдельно или в комбинации с ADCx25 (анализ посредством CalcuSyn). В таблице 4 продемонстрирована очевидная синергия, особенно при более низких концентрациях ADC. Не наблюдали различия в количестве CD25 на клетках в присутствии 30 нМ децитабина (см. фиг.8).

СІ для экспериментальных значений			
ADCx25 (нг/мл)	Децитабин (нм)	Fa	СІ
0,1	30	0,183	0,265
0,4	30	0,171	0,514
1,2	30	0,264	0,426
3,7	30	0,377	0,658
11,1	30	0,645	0,559
33,3	30	0,712	1,182
100	30	0,836	1,560
0,1	100	0,311	0,095
0,4	100	0,290	0,207
1,2	100	0,374	0,2472
3,7	100	0,468	0,433
11,1	100	0,682	0,463
33,3	100	0,731	1,062
100	100	0,824	1,718

**Таблица 4**

**Пример 7**

Для оценки цитотоксической синергии между ADCx25 и вторичными агентами, цитарабином и децитабином, в линии клеток Кагрas299 с высоким уровнем экспрессии CD25,  $1 \times 10^4$  клеток Кагрas 299 высевали по 50 мкл в каждую лунку 96-луночного планшета с плоским дном совместно с либо 30, либо 100 нМ цитарабином/децитабином. Через 24 часа готовили серию серийных разведений ADCx25 в отдельном планшете и к клеткам Кагрas 299 добавляли 50 мкл ADC, и инкубировали в течение 96 часов наряду с необработанными контролями с обеспечением по меньшей мере 3 удвоений клеток.

Через 120 часов в каждую лунку добавляли 20 мкл MTS и инкубировали в течение 2-3 часов в нормальных условиях культивирования клеток. Измеряли ОП при 492 нм с использованием планшет-ридера и рассчитывали % роста по сравнению с необработанными контрольными клетками.

Кривые роста строили с применением GraphPad Prism с использованием уравнения: сигмоидальная 4PL, X представляет собой log (концентрация) (sigmoidal, 4PL, X is log (concentration)). Определяли значения IC50 (доза лекарственного средства, которая ингибирует рост на 50%). Переводили процент выживаемости клеток в пораженную

фракцию (Fa) и рассчитывали комбинаторный индекс (CI) для каждой дозы с использованием CalcuSyn v2.11.

Результаты представлены на фиг.9А (цитарабин) и 9В (децитабин), где (\*) означает умеренную синергию, и (\*\*) означает сильную синергию, определенную посредством CalcuSyn.

### **Пример 8**

Для оценки цитотоксической синергии между ADCx25 и вторичными агентами, цитарабином и децитабином, в линии клеток KG-1 с низким уровнем экспрессии CD25 следовали протоколу из Примера 7 с использованием клеток KG-1 вместо клеток Karpas299 из Примера 7.

Результаты представлены на фиг.10А (цитарабин) и 10В (децитабин), где (\*) означает умеренную синергию, и (\*\*) означает сильную синергию, определенную посредством CalcuSyn.

### **Пример 9**

#### Измерение уровня экспрессии CD25 – мРНК

Перед выделением и обратной транскрипцией мРНК клетки Karpas-299, EOL-1 или KG-1 инкубировали совместно с 30 нМ цитарабином в течение 24 часов. кДНК исследовали на предмет IL2Ralpha (CD25) путем количественной ПЦР в реальном времени TaqMan. Среднее кратное изменение экспрессии по сравнению с необработанным контролем рассчитывали с использованием метода ddCT с использованием эталонного гена abl-1. Динамику изменения экспрессии в течение 3-4 дней также измеряли в клетках Karpas-299 (высокий уровень экспрессии CD25) и KG-1 (низкий уровень экспрессии CD25) в тех же условиях только с увеличением времени инкубации совместно с цитарабином.

**Результаты:** Обнаруживали, что инкубация совместно с 30 нМ цитарабином слабо влияла на мРНК-экспрессию CD25 в клетках Karpas299 на протяжении 72-часового периода анализа. Клетки KG-1, напротив, демонстрировали 2-кратное увеличение мРНК-экспрессии CD25 после 24-часовой инкубации совместно с цитарабином с ростом до 4-кратного увеличения экспрессии CD25 после 48-часовой инкубации, а затем с постепенным возвращением к 3-кратному увеличению после 96-часовой инкубации.

#### Измерение уровня экспрессии CD25 – поверхностного белка

Клетки Karpas-299 и KG-1 собирали после обработки 30 нМ цитарабином в течение 24 часов, затем блокировали и окрашивали напрямую меченым mAb анти-CD25-PE в течение 1 часа. Затем клетки промывали и анализировали на проточном цитометре Fortessa X20. Рассчитывали среднее количество связанных антител к CD25 на клетку с

использованием эталонных гранул QuantiBRITE-PE от BD с использованием напрямую меченого моноклонального антитела (Ab) мыши к CD25-PE человека от BD (№ кат 555432).

**Результаты:** Обнаруживали, что инкубация совместно с 30 нМ цитарабином слабо влияла на экспрессию поверхностного белка CD25 в клетках Karpas299 на протяжении 24-часового периода анализа, при этом среднее арифметическое связывания составляло ~60000 антител на клетку как для необработанных, так и для обработанных клеток Karpas299. Обнаруживали, что клетки KG-1, инкубированные совместно с 30 нМ цитарабином, напротив, демонстрировали значительно повышенные уровни экспрессии CD25 на поверхности, при этом для необработанных клеток KG-1 среднее арифметическое связывания составляло ~200 антител на клетку по сравнению со средним арифметическим ~400 антител на клетку для связывания обработанными клетками KG-1.

**ПРИМЕР 10: синергия в отношении CD25+ неопластических клеток между ADCx25 и каждым из иммуноонкологических (ИО) вторичных агентов: антагонистов PD1, антагонистов PDL1, антагонистов CTLA4, агонистов OX40 и агонистов GITR**

#### Антагонисты PD1

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с антагонистом PD1, аддитивный или синергетический эффект, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей (модели, потенциально подходящие для CD25, включают YAC1, MC38, B16F10, CT26). Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с антагонистом PD1 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, экспрессирующей CD25. ADC вводили до антагониста PD1, одновременно с антагонистом PD1 или после антагониста PD1 по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как антагонист PD1 вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или антагонист PD1. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухолевой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним антагонистом PD1.

#### Антагонисты PDL1

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с антагонистом PDL1, аддитивный или синергетический эффект,

комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с антагонистом PDL1 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, экспрессирующей CD25. ADC вводили до антагониста PDL1, одновременно с антагонистом PDL1 или после антагониста PDL1 по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как антагонист PD1 вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или один антагонист PDL1. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухолевой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним антагонистом PDL1.

#### Антагонисты CTLA4

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с антагонистом CTLA4, аддитивный или синергетический эффект, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с антагонистом CTLA4 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, экспрессирующей CD25. ADC вводили до антагониста CTLA4, одновременно с антагонистом CTLA4 или после антагониста CTLA4 по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как антагонист CLTA4 вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или один антагонист CTLA4. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухолевой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним антагонистом CTLA4.

### Агонисты OX40

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с агонистом OX40, аддитивный или синергетический эффект, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с агонистом OX40 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, экспрессирующей CD25. ADC вводили до агониста OX40, одновременно с агонистом OX40 или после агониста OX40 по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как агонист OX40 вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или агонист OX40. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухолевой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним агонистом OX40.

### Агонисты GITR

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с агонистом GITR, аддитивный или синергетический эффект, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с агонистом GITR мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, экспрессирующей CD25. ADC вводили до агониста GITR, одновременно с агонистом GITR или после агониста GITR по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как агонист GITR вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или один агонист GITR. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухолевой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним агонистом GITR.

**ПРИМЕР 11: синергия в отношении CD25- неопластических клеток между ADCx25 и каждым из иммуноонкологических (ИО) вторичных агентов: антагонистов PD1, антагонистов PDL1, антагонистов CTLA4, агонистов OX40 и агонистов GITR**

CD25 также экспрессируется на иммунных клетках, которые инфильтрируют локальное окружение опухоли и которые могут оказывать супрессивное действие на врожденный иммунный ответ на опухоль. Примерами таких клеток являются Т-клетки, такие как регуляторные Т-клетки. ADCxCD25 можно применять для направленного воздействия на эти иммунные клетки и он будет уничтожать иммуносупрессивные клетки, усиливая иммунный ответ.

В дополнение к этому эффекту «освобождения от иммуносупрессии» уничтожение иммунных клеток ADCxCD25 будет приводить к высвобождению PBD активной группы, которая будет уничтожать соседние неопластические клетки по механизму «эффект свидетеля».

Соответственно, по этим двум механизмам опухоли, не экспрессирующие CD25, могут быть уничтожены путем направленного воздействия на иммунные клетки в локальном окружении опухоли. Более того, CD25- клетки опухоли, уничтоженные PBD, высвобожденным из соседних иммунных клеток, будут индуцировать дополнительную иммуногенную гибель клеток, дополнительно усиливая противоопухолевый иммунный ответ.

Антагонист PD1

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с антагонистом PD1, аддитивный или синергетический эффект в отношении опухолей, не экспрессирующих CD25, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с антагонистом PD1 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, которая, как известно, содержит высокие уровни инфильтрирующих лимфоцитов, такой как, но не ограничиваясь ими, MC38 и CT26. ADC вводили до антагониста PD1, одновременно с антагонистом PD1 или после антагониста PD1 по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как антагонист PD1 вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или один антагонист PD1. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично

отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухоловой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним антагонистом PDL1.

#### Антагонисты PD-L1

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с антагонистом PDL1, аддитивный или синергетический эффект в отношении опухолей, не экспрессирующих CD25, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с антагонистом PDL1 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, которая, как известно, содержит высокие уровни инфильтрирующих лимфоцитов, такой как, но не ограничиваясь ими, MC38 и CT26. ADC вводили до антагониста PDL1, одновременно с антагонистом PDL1 или после антагониста PDL1 по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как антагонист PDL1 вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или один антагонист PDL1. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухоловой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним антагонистом PDL1.

#### Антагонисты CTLA4

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с антагонистом CTLA4, аддитивный или синергетический эффект в отношении опухолей, не экспрессирующих CD25, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с антагонистом CTLA4 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, которая, как известно, содержит высокие уровни инфильтрирующих лимфоцитов, такой как, но не ограничиваясь ими, MC38 и CT26. ADC вводили до

антагониста CTLA4, одновременно с антагонистом CTLA4 или после антагониста CTLA4 по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как антагонист CTLA4 вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или один антагонист CTLA4. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухоловой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним антагонистом CTLA4.

#### Агонисты OX40

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с агонистом OX40, аддитивный или синергетический эффект в отношении опухолей, не экспрессирующих CD25, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с агонистом OX40 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, которая, как известно, содержит высокие уровни инфильтрирующих лимфоцитов, такой как, но не ограничиваясь ими, MC38 и CT26. ADC вводили до агониста OX40, одновременно с агонистом OX40 или после агониста OX40 по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как агонист OX40 вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или один агонист OX40. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухоловой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним агонистом OX40.

#### Агонисты GITR

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против CD25, комбинированный с агонистом GITR, аддитивный или синергетический эффект в

отношении опухолей, не экспрессирующих CD25, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с CD25 мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с агонистом GITR мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, которая, как известно, содержит высокие уровни инфильтрирующих лимфоцитов, такой как, но не ограничиваясь ими, MC38 и CT26. ADC вводили до агониста GITR, одновременно с агонистом GITR или после агониста GITR по решению экспериментатора.

Как правило, ADC вводили в виде однократной дозы от 0,1 до 1 мг/кг, в то время как агонист GITR вводили один раз в 3 дня x 3 в дозах от 1 до 10 мг/кг. Контрольные группы включали один ADC или один агонист GITR. Затем объемы опухолей и массу тела измеряли до 60 дней для всех групп, и в каждой группе определяли количество частично отвечающих (PR), полностью отвечающих (CR) мышей, мышей с безопухоловой выживаемостью (TFS).

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним агонистом GITR.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение указанному индивидууму эффективного количества конъюгата анти-CD25 антитело-лекарственное средство (ADCX25) и вторичного агента.
2. Первая композиция, содержащая ADCX25, для применения в способе лечения рака у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей вторичный агент.
3. Первая композиция, содержащая вторичный агент, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей ADCX25.
4. Применение ADCX25 в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит ADCX25, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент.
5. Применение антагониста PD1 в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит вторичный агент, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADCX25.
6. Набор, содержащий:
  - первое лекарственное средство, содержащее ADCX25;
  - второе лекарственное средство, содержащее вторичный агент; и возможно
  - листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму первого лекарственного средства в комбинации со вторым лекарственным средством, для лечения рака.
7. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее ADCX25, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент, для лечения рака.

8. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее вторичный агент, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADCX25, для лечения рака.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая ADCX25 и вторичный агент.
10. Способ лечения рака у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества композиции по п. 9.
11. Композиция по п. 9 для применения в способе лечения рака у индивидуума.
12. Применение композиции по п. 9 в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума.
13. Набор, содержащий композицию по п. 9 и набор инструкций по введению индивидууму лекарственного средства, для лечения рака.
14. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение включает введение ADCX25 до вторичного агента, одновременно с вторичным агентом или после вторичного агента.
15. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение дополнительно включает введение химиотерапевтического агента.
16. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что индивидуум представляет собой человека.
17. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак.
18. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак,

характеризующийся присутствием новообразования, содержащего как CD25+, так и CD25- клетки.

19. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, характеризующийся присутствием новообразования, содержащего или состоящего из CD25- неопластических клеток.

20. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что рак или новообразование представляет собой всю или часть солидной опухоли.

21. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий CD25, или CD25+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки, такие как CD25+ инфильтрирующие Т-клетки.

22. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак с низким уровнем поверхностной экспрессии CD25.

23. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий второй белок-мишень.

24. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение:

- a) эффективно лечит более широкий спектр нарушений,
- b) эффективно лечит резистентные, не поддающиеся лечению или рецидивирующие нарушения,
- c) демонстрирует повышенную частоту ответов и/или
- d) демонстрирует увеличенную продолжительность ответа на лечение;

по сравнению с лечением либо одним ADCX25, либо одним вторичным агентом.

25. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что рак выбран из группы, включающей:

лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ), лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), хроническую лимфатическую лимфому (ХЛЛ), В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (ВКЛМЗ);

лейкозы, такие как волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), вариант волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ-в), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), такой как положительный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph+ОЛЛ) или отрицательный по филадельфийской хромосоме ОЛЛ (Ph-ОЛЛ);

рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

26. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист PD1.

27. Композиция, способ, применение или набор по п. 26, характеризующийся тем, что указанный антагонист PD1 выбран из пембролизумаба, ниволумаба, MEDI0680, PDR001 (спартализумаб), камрелизумаба, AUNP12, пидилизумаба, цемиплимаба (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (тислелизумаб) и BGB-108.

28. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТКi).

29. Композиция, способ, применение или набор по п. 28, характеризующийся тем, что указанный ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТКi) выбран из ибрутиниба (Имбрувика), акалабрутиниба/АСР-196, ОНО/GS-4059, спебрутиниба/AVL-292/СС-292, НМ71224 (поселтиниб) и BGB-3111 (занубрутиниб).

30. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист PD-L1.

31. Композиция, способ, применение или набор по п. 30, характеризующийся тем, что указанный антагонист PD-L1 выбран из атезолизумаба (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаба/MEDI4736 и MSB0010718C (авелумаб).
32. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка).
33. Композиция, способ, применение или набор по п. 32, характеризующийся тем, что указанный агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка) выбран из MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK 4166, BMS-986156 и INCAGN1876.
34. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист OX40.
35. Композиция, способ, применение или набор по п. 34, характеризующийся тем, что указанный агонист OX40 выбран из MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 и PF-04518600.
36. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист CTLA-4.
37. Композиция, способ, применение или набор по п. 36, характеризующийся тем, что указанный антагонист CTLA-4 выбран из ипилимумаба и тремелиумаба.
38. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой флударабин.
39. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой цитарабин.
40. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп. 1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой гипометилирующий агент.

41. Композиция, способ, применение или набор по п. 40, характеризующийся тем, что указанный гипометилирующий агент выбран из 5-азацитидина (азацитидин) и 5-аза-2'-дезоксцитидина (децитабин).

42. Композиция, способ, применение или набор по п. 40, характеризующийся тем, что указанный гипометилирующий агент представляет собой децитабин.

**ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ****SEQ ID NO. 1** (AB12 VH):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSRYIINWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGVEN  
YAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARKDWFYWGQGTLVTVSSAS  
TKGPSVFPLA

**SEQ ID NO. 2** (AB12 VL):

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD  
RFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP

**SEQ ID NO. 3** (VH CDR1):

RYIIN

**SEQ ID NO. 4** (VH CDR2):

RIIPILGVENYAQKFQG

**SEQ ID NO. 5** (VH CDR3):

KDWFYD

**SEQ ID NO. 6** (VL CDR1):

RASQSVSSYLA

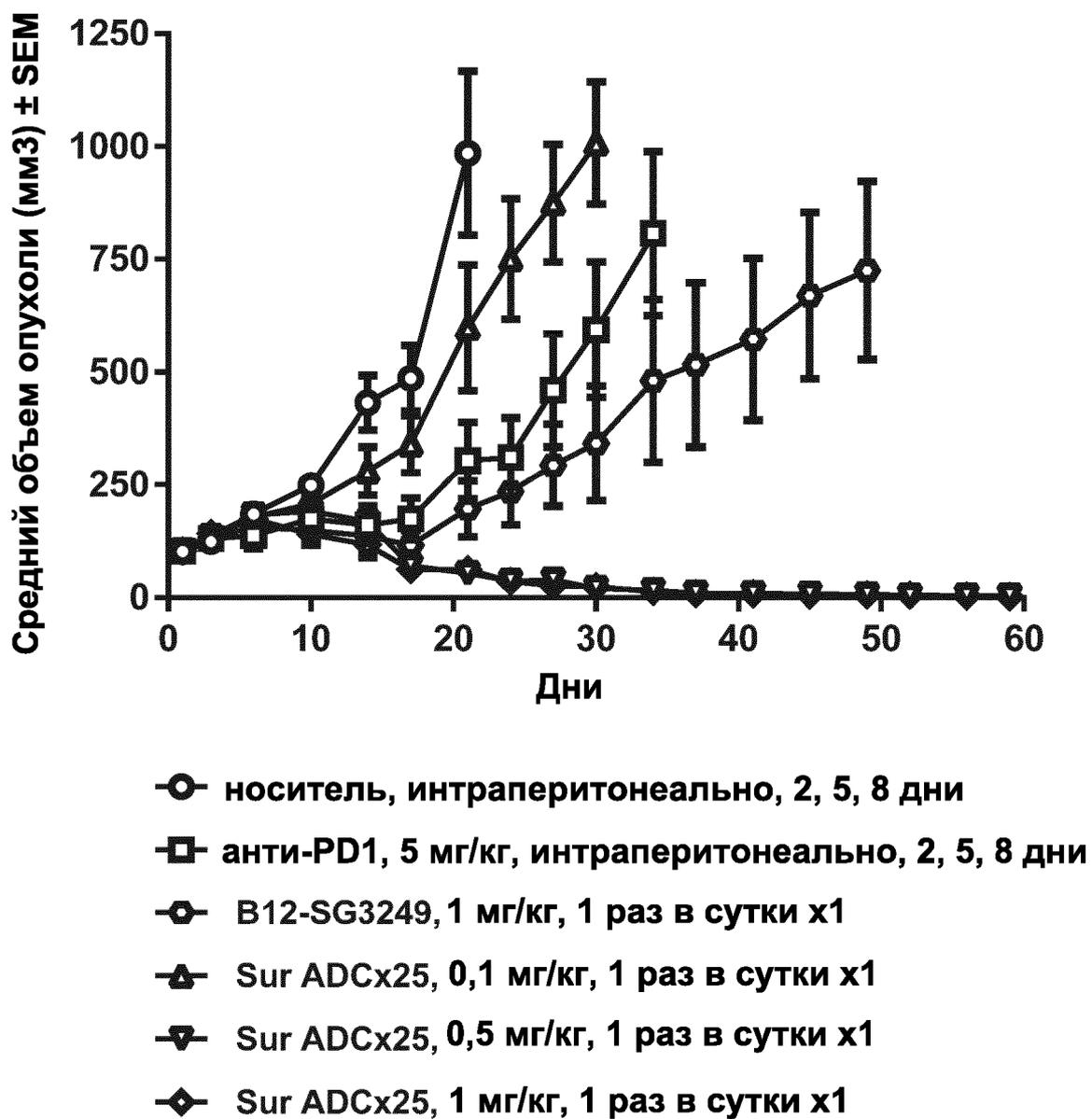
**SEQ ID NO. 7** (VL CDR2):

GASSRAT

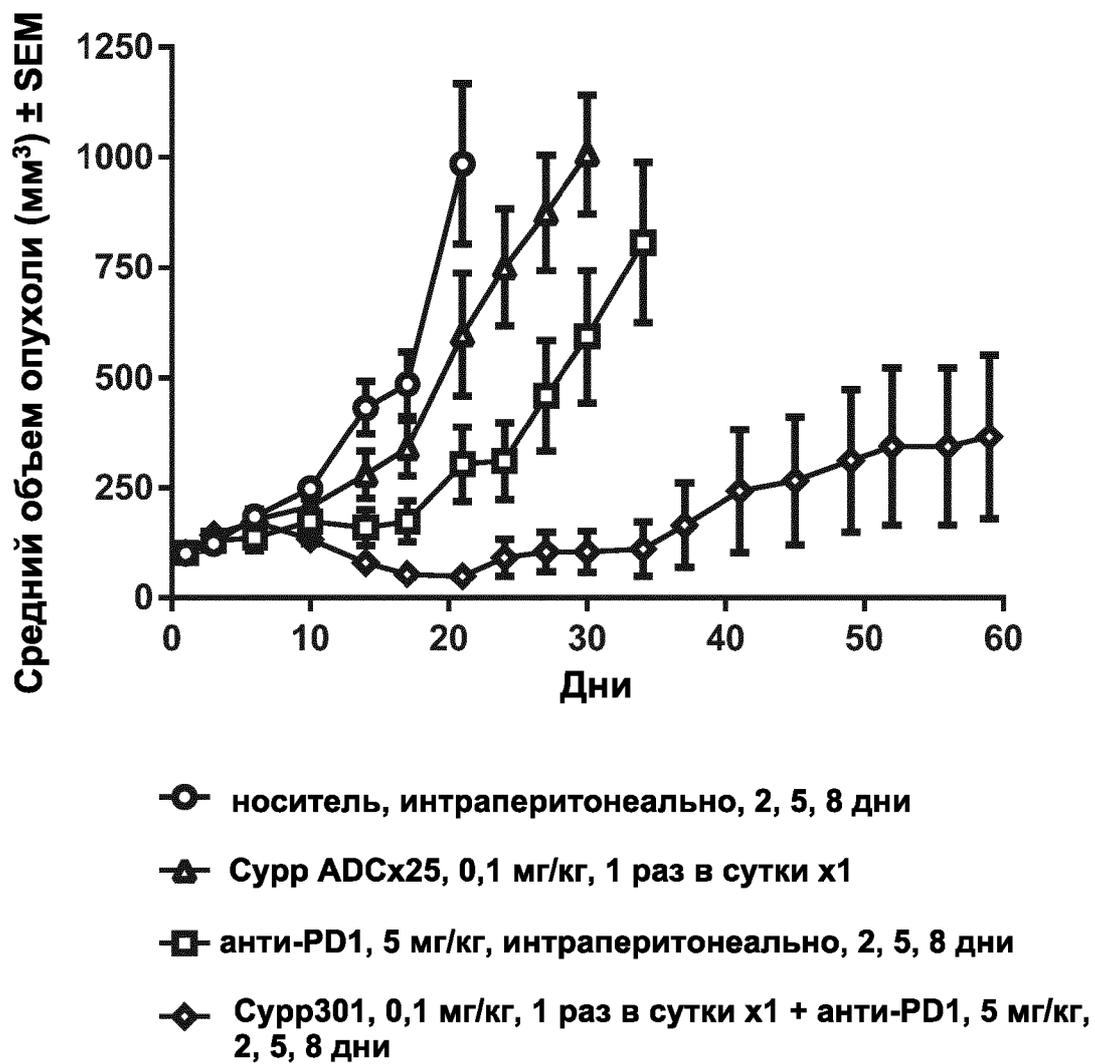
**SEQ ID NO. 8** (VL CDR3):

QQYGSSPLT

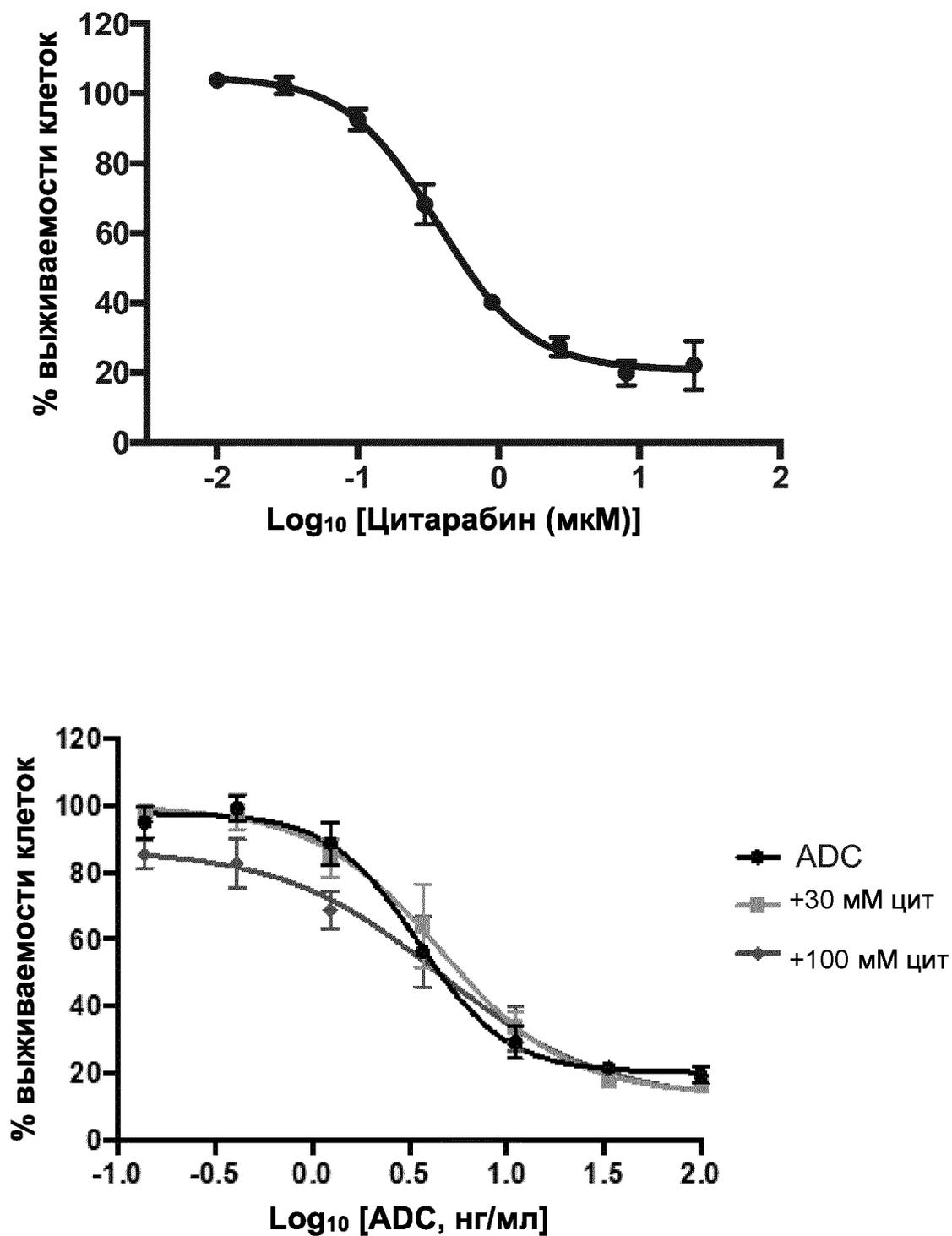
Фигура 1



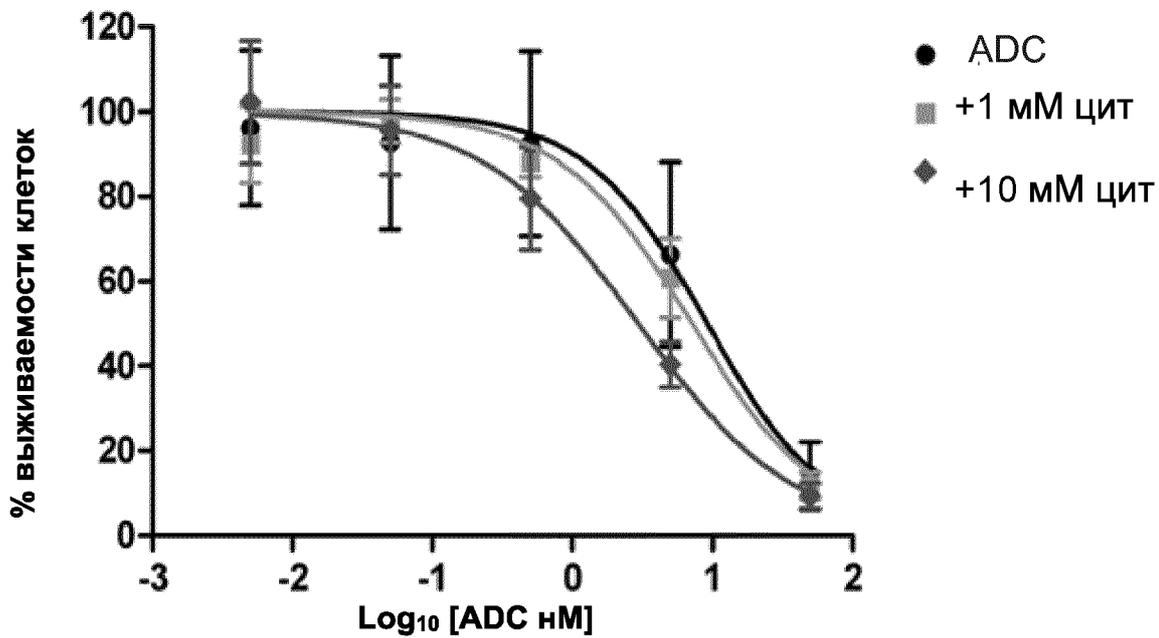
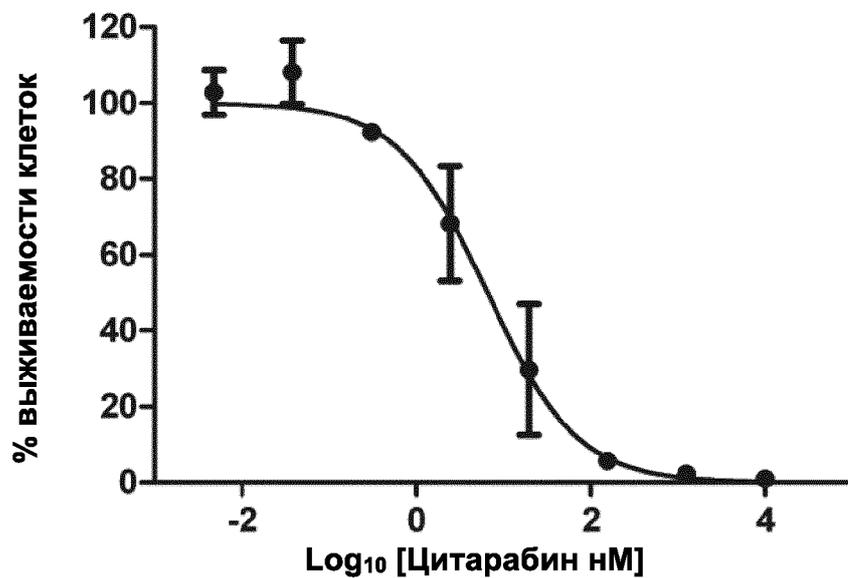
Фигура 2



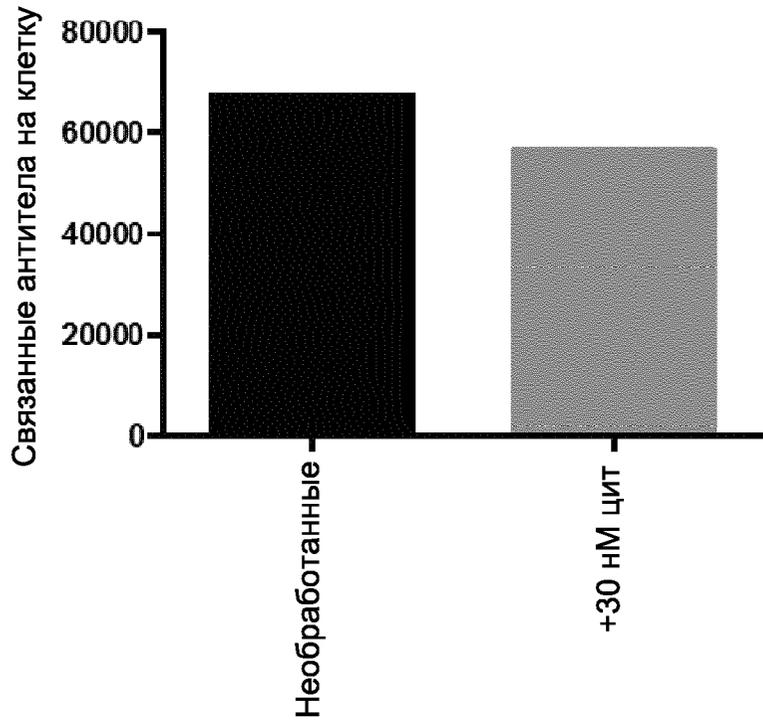
Фигура 3



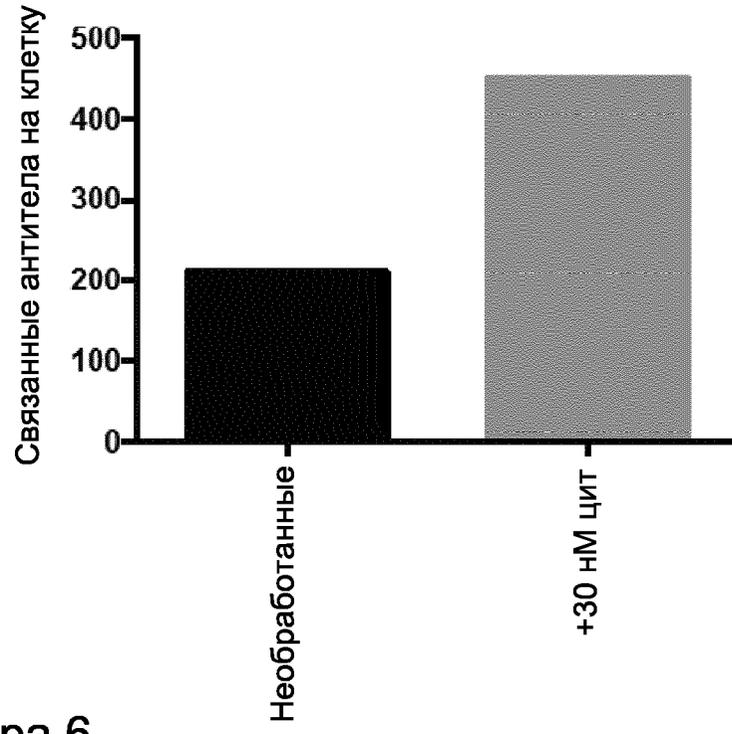
Фигура 4

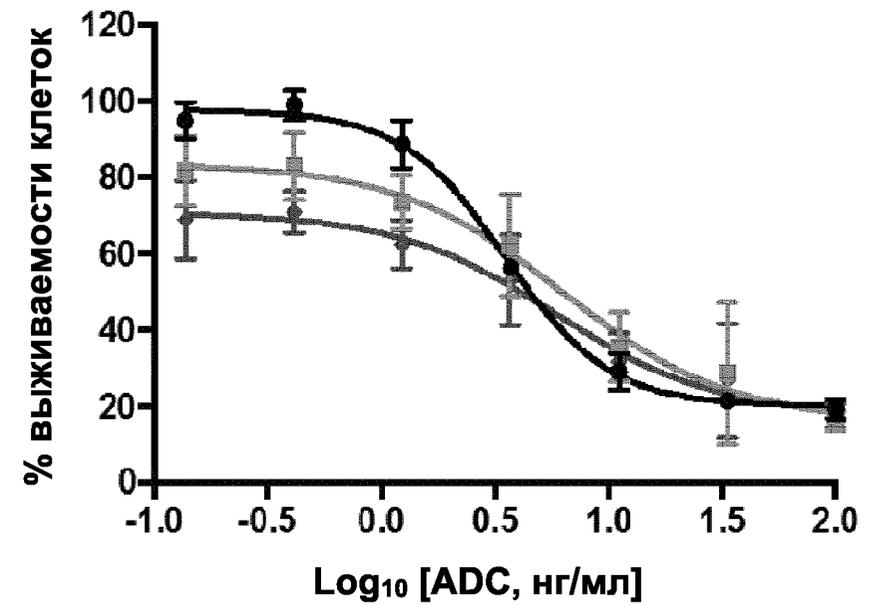
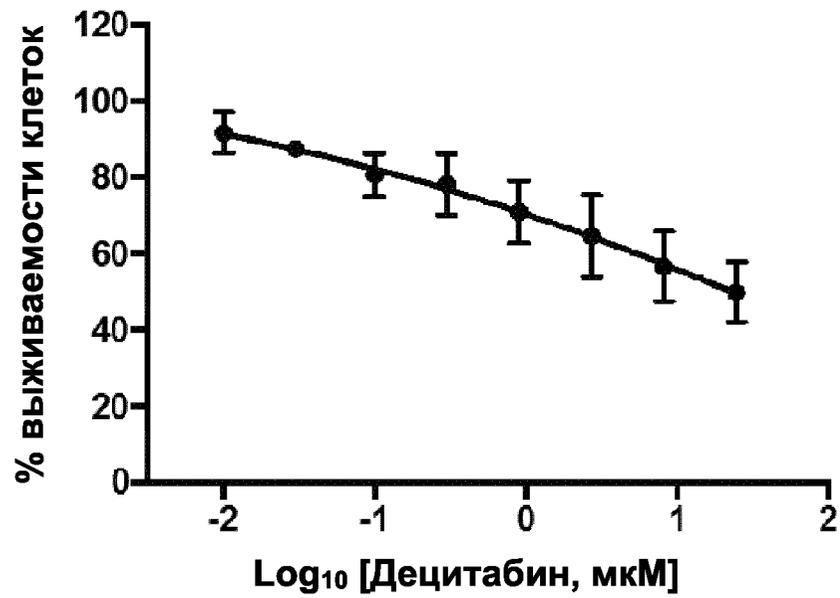


Фигура 5



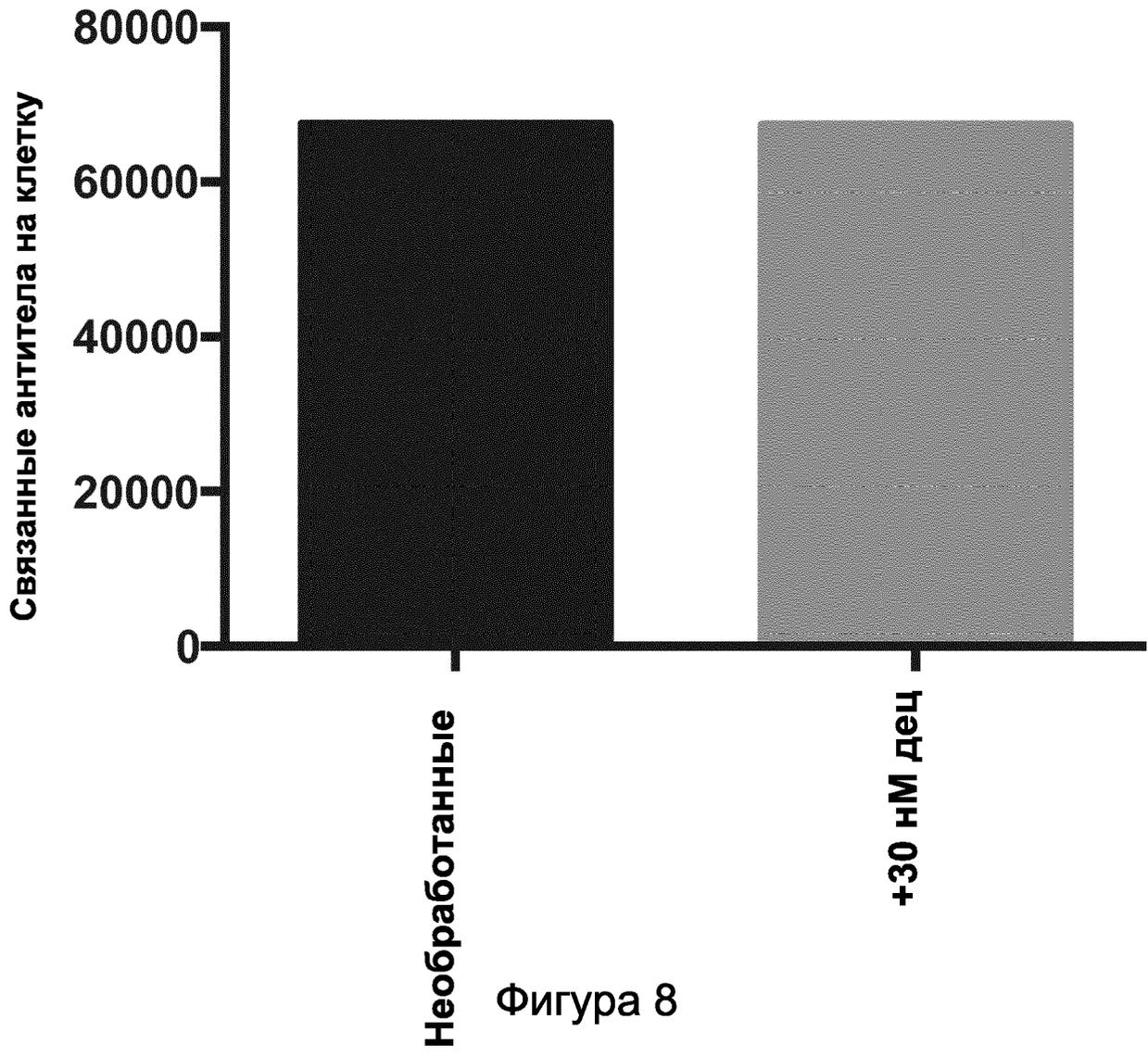
Фигура 6



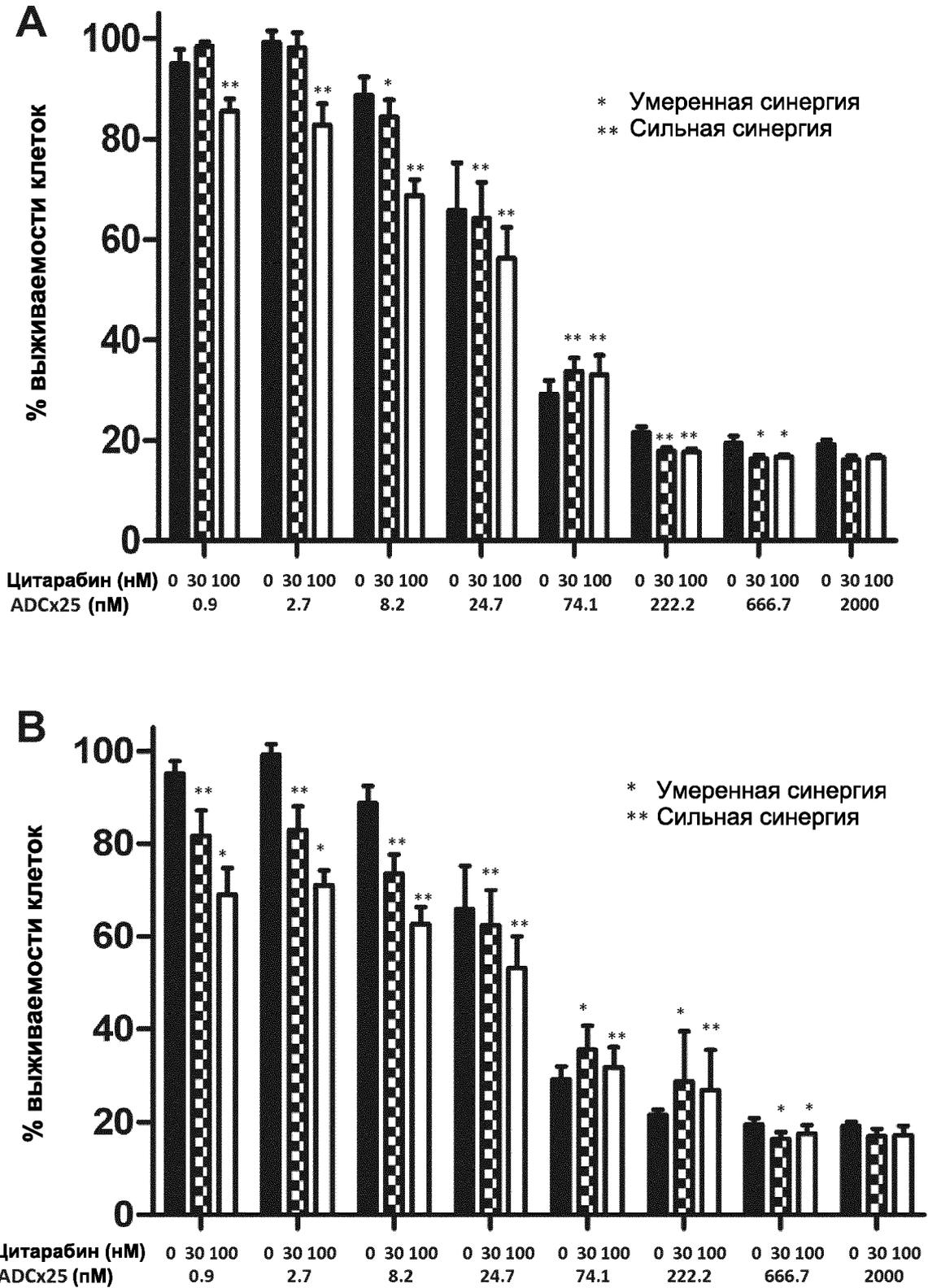


- один ADCT-301
- +30 нМ дец
- ◆ +100 нМ дец

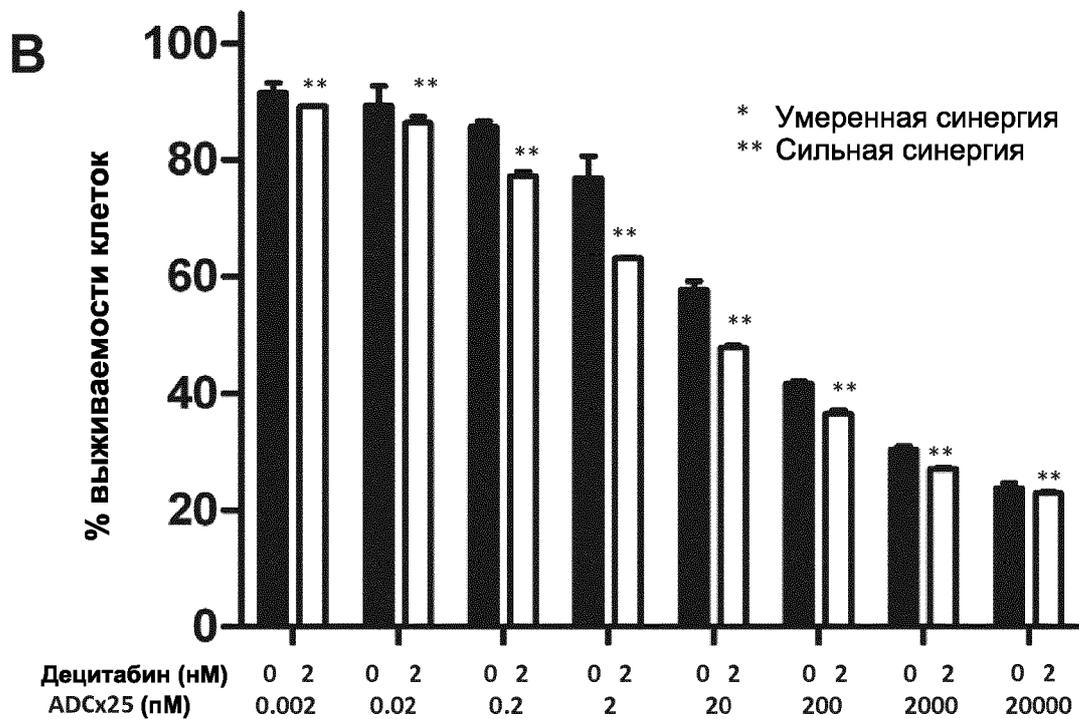
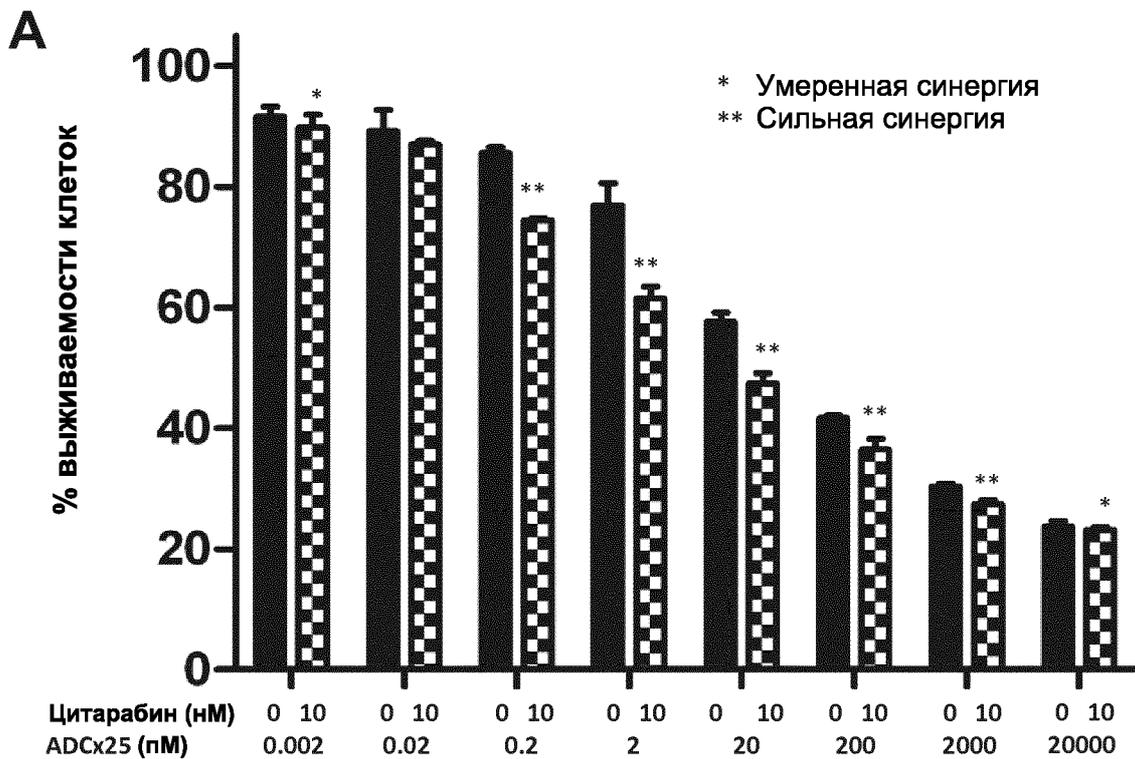
Фигура 7



Фигура 8



Фигура 9



Фигура 10