(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290677 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.19

(22) Дата подачи заявки
2020.10.09

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CCR7 В КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ С ИНГИБИТОРОМ BTK И/ИЛИ ИНГИБИТОРОМ BCL2 ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

(31) **19382883.7**
(32) **2019.10.09**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2020/078359**
(87) **WO 2021/069632 2021.04.15**

(71) Заявитель:
КАТАПУЛЬТ ТЕРАПЬЮТИКС Б.В. (NL); ИММУНОЛОГИКАЛЬ ЭНД МЕДИСИНАЛЬ ПРОДАКТС, СЛ (ES)

(72) Изобретатель:
Куэста Матеос Карлос, Матеу Альберо Тамара, Муньос Кальеха Сесилия, Террон Фернандес Фернандо (ES)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В соответствии с изобретением предложено новое применение и способы, включающие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с рецептором CCR7, для применения в качестве новой комбинированной терапии с ингибитором BTK и/или ингибитором Bcl-2 для лечения гиперпролиферативных злокачественных новообразований крови, предпочтительно В-клеточных лимфом, таких как ХЛЛ. Комбинацию можно применять в качестве терапии первой линии или у пациентов, которых ранее не лечили ингибитором BTK и/или ингибитором Bcl-2, или у пациентов с заболеванием, рефрактерным к/рецидивировавшим после ингибитора BTK и/или ингибитора Bcl-2. Указанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты способны селективно уменьшать ex vivo или in vitro количество злокачественных клеток, экспрессирующих CCR7, и способны нарушать/блокировать миграцию указанных опухолевых клеток в направлении лигандов CCR7. Эти эффекты не связаны с предшествующим или текущим лечением ингибитором BTK и/или ингибитором Bcl-2. Аналогично, эффективность антител не нарушена у пациентов с рецидивировавшим/рефрактерным заболеванием. Предложено применение указанных антител в виде монотерапии или в виде комбинации с ингибитором BTK и/или ингибитором Bcl-2 для удаления, киллинга и нарушения/блокирования миграции и активации опухолевых клеток, экспрессирующих CCR7, таким образом обеспечивая альтернативную терапию для лечения гиперпролиферативного рака крови.

202290677 A1

202290677 A1

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CCR7 В КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ С ИНГИБИТОРОМ BTK И/ИЛИ ИНГИБИТОРОМ BCL2 ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится в целом к областям медицины и фармацевтики, в частности, к области онкологии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Эффективное лечение гиперпролиферативных расстройств является постоянной задачей в области онкологии. Как правило, рак является результатом нарушения регуляции нормальных процессов, которые контролируют деление, дифференцировку и апоптотическую гибель клеток, и характеризуется пролиферацией злокачественных клеток, которые обладают способностью к неограниченному росту, локальному размножению и системному метастазированию в результате такого нарушения регуляции, которое может включать аномалии в путях передачи сигнала.

Тирозинкиназа Брутона (BTK), представитель семейства цитоплазматических тирозинкиназ Tec, непосредственно участвует во множестве путей передачи сигналов, регулирующих выживаемость, активацию, пролиферацию и дифференцировку лимфоидных клеток B-клеточной линии дифференцировки. BTK является вышележащим активатором множества антиапоптотических сигнальных молекул и сетей, включая белок-переносчик сигнала и активатор транскрипции 5 (STAT5), путь фосфатидилинозитол (PI) 3-киназы/AKT/мишени рапамицина млекопитающих (mTOR) и ядерный фактор каппа B (NF-κB). Кроме того, BTK связывается с рецептором смерти Fas через его киназный и гомологичный плекстрину (PH) домены и предотвращает взаимодействие Fas с Fas-ассоциированным белком с доменом смерти (FADD), которое необходимо для привлечения и активации каспазы-8/FLICE посредством Fas во время апоптотического сигнала. Это нарушение посредством BTK предотвращает сборку проапоптотического сигнального комплекса, индуцирующего гибель клетки (DISC), после связывания Fas.

BTK в большом количестве экспрессируется в злокачественных клетках от пациентов с острым лимфобластным лейкозом из предшественников B-клеток (BCP) (ОЛЛ, наиболее распространенная форма рака у детей и подростков), хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) и неходжкинской лимфомой (НХЛ). Следовательно, BTK стала важной молекулярной мишенью при лечении лейкозов и лимфом B-клеточной линии дифференцировки.

В клинике используют ряд ингибиторов BTK. Первой одобренной молекулой является ибрутиниб (1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он, описанный в WO2008/039218). В настоящее время ибрутиниб используют для лечения B-клеточных видов рака, таких как лимфома из клеток мантийной зоны, хронический лимфоцитарный лейкоз и макроглобулинемия Вальденстрема. Ибрутиниб применяют в качестве терапии первой линии у пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), которые нуждаются в лечении, и которым был поставлен диагноз впервые, а также может применяться при рецидиве ХЛЛ. Ибрутиниб также используют для лечения макроглобулинемии Вальденстрема и в качестве терапии второй линии для лимфомы из клеток мантийной зоны (ЛКМ), лимфомы из клеток маргинальной зоны и хронической реакции «трансплантат против хозяина». Недавно акалабрутиниб был одобрен FDA для лечения лимфомы из клеток мантийной зоны (www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-treatment-adults-mantle-cell-lymphoma).

Сообщали как о первичной (врожденной), так и о вторичной (приобретенной) устойчивости к ибрутинибу при различных лимфомах, включая ХЛЛ и ЛКМ (Kaur, 2017, Ann Hematol. doi:10.1007/s00277-017-2973-2). Поэтому в различных публикациях патентных документов было предложено использовать ибрутиниб в качестве части комбинированной терапии с другими способами лечения (см., например, US2017239351, WO 2017/023815 A1, US 2018/0153892 A1, US 2017360796, US 2015105409, US 2017354655, US 2017224819 и US 2016/0303130).

Белок B-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2) является антиапоптотическим белком, локализованным на внешней мембране митохондрий, где он играет важную роль в способствовании выживаемости клеток и ингибировании действия проапоптотических белков. Этот белок относится к семейству Bcl-2 - семейству, состоящему из двух групп высоко консервативных белков (антиапоптотических и проапоптотических белков). Гомеостатический баланс между этими двумя группами белков необходим для того, чтобы клетки регулировали свою гибель и выживаемость (Scheffold et al., Recent Results Cancer Res. 2018; 212:215-242. doi: 10.1007/978-3-319-91439-8_11; Moia et al., Expert Rev Hematol. 2018 May;11(5):391-402. doi: 10.1080/17474086.2018.1456332).

Повышение экспрессии белка Bcl-2 при множестве гематологических злокачественных новообразований подтверждено многочисленными документами. Например, у пациентов с ХЛЛ повышенные уровни белка Bcl-2 могут быть следствием эпигенетического нарушения регуляции промотора гена Bcl-2 или, преимущественно,

результатом делеций в локусе 13q14. Эта область делеции содержит два репрессора Bcl-2 - микроРНК 15a и 16-1, - которые связываются с мРНК гена и ингибируют трансляцию белка Bcl-2 (Scheffold et al., 2018, выше; Moia et al., 2018, выше).

В последние годы были разработаны новые терапевтические средства, нацеленные на антиапоптотические белки Bcl-2. Венетоклакс (ABT-199) был одобрен FDA в качестве терапии второй линии для ХЛЛ с делецией 17p (Deeks, 2016, Drugs. doi: 10.1007/s40265-016-0596-x). Несмотря на многообещающие результаты, полученные у пациентов с ХЛЛ, получавших лечение венетоклаксом (Moia et al., 2018, выше), в некоторых исследованиях сообщается о развитии, в конечном счете, устойчивости к венетоклаксу. Zhao et al. (Cancer Cell. 2019; 35(5): 752-766.e9. doi: 10.1016/j.ccell.2019.04.005) обнаружили, что во время лечения венетоклаксом некоторые популяции клеток утрачивают область хромосомы 18, которая содержит ген Bcl-2, что влияет на выживаемость этой популяции клеток. Tahir et al. (BMC Cancer. 2017; 17(1):399. doi: 10.1186/s12885-017-3383-5) и Chiron et al. (Oncotarget. 2015; 6(11): 8750-9) независимо обнаружили в нескольких клеточных линиях другой механизм устойчивости к венетоклаксу, основанный на повышении экспрессии антиапоптотических белков MCL-1 и BCL-XL, и снижении экспрессии антиапоптотических белков BAX, BIM и NOXA. В случаях ЛКМ устойчивость к венетоклаксу дополнительно возникала вследствие повышения апоптотического порога. Наконец, Chiron et al. (2015; выше) также сообщили, что взаимодействие CD40 - CD40L между патологическими клетками и стромой также может обходить активность венетоклакса посредством сильной активации как классического, так и альтернативного путей NF-kB, которые опосредуют повышение экспрессии BCL-XL.

Рецептор с C-C-мотивом 7 человека (здесь и далее называют «CCR7») представляет собой рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR), с трансмембранным доменом, семь раз проходящим через мембрану, который, как изначально было обнаружено, экспрессируется лимфоцит-специфичным образом при инфекции вирусом Эпштейна-Барр (EBV) (Birkenbach et al., 1993, J.Virol. 67: 2209-2220). CCR7 селективно связывает два хемокина, называемых CCL19 и CCL21. При гомеостазе и воспалении CCR7 экспрессируется на наивных Т- и В-лимфоцитах, Т-клетках центральной памяти (TCM), некоторых субпопуляциях естественных клеток-киллеров (NK-клеток), полузрелых и зрелых ДК и плазмацитоидных ДК (Forster R, et al. Cell 1999; 99: 23–33.; Comerford I, et al. Cytokine Growth Factor Rev. 2013 Jun; 24(3):269-83). В этих подгруппах лейкоцитов CCR7 контролирует миграцию, организацию и активацию.

Alfonso-Pérez et al. (J Leukoc Biol. 2006 Jun;79(6): 1157-65) описали, что антитело против CCR7 человека опосредовало сильную комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) против клеток ХЛЛ, сохраняя при этом нормальные Т-лимфоциты у тех же пациентов, и что указанное антитело блокировало миграцию клеток ХЛЛ *in vitro* в ответ на физиологические лиганды CCR7. Следовательно, в WO 2007/003426 описано применение антител против CCR7 человека для лечения опухолей, экспрессирующих рецептор CCR7, включая гематологические опухоли, такие как ХЛЛ и ЛКМ.

Patrussi et al. (Cancer Res. 2015 Oct 1;75(19): 4153-63) сообщили, что лечение ибрутинибом клеток ХЛЛ привело к значительному снижению экспрессии CCR7 на поверхности клеток, на основании чего не ожидают, что комбинирование антитела против CCR7 с ибрутинибом улучшит его терапевтическую эффективность.

Кроме того, De Rooij et al. (Blood, 2012;119(11): 2590-4) сообщали, что лечение ибрутинибом первичных клеток ХЛЛ нарушало опосредованную интегрином адгезию и/или миграцию, опосредованную активацией CCR7. Поэтому можно предположить, что ибрутиниб уменьшит хоуминг клеток ХЛЛ и В-клеточной лимфомы во вторичные лимфоидные органы (ВЛО), где продуцируются его лиганды. Тем не менее, не ожидают, что комбинация антител, нацеленных на CCR7, с ибрутинибом улучшит терапевтическое ингибирование миграции злокачественных клеток во ВЛО. Кроме того, вследствие утраты CCR7 на поверхности клеток-мишеней, уничтожение клеток-мишеней, вызванное антителами, маловероятно.

В дополнение к ингибиторам BTK, В-клеточные злокачественные новообразования (и, в частности, ХЛЛ) можно лечить ингибиторами белка В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2) - онкогенного белка, который, как известно, ингибирует апоптоз (Gentile et al., Expert Opin Investig Drugs. 2017; 26(11):1307-1316). Давно признано, что при раке CCR7 играет роль в защите Т-клеток от апоптоза (Kim et al., Clin Cancer Res. 2005; 11(21):7901-10). Кроме того, в этом исследовании оценка с помощью многоцветной проточной цитометрии показала значительную корреляцию более высоких уровней Bcl-2 с более высокой экспрессией CCR7 в этих клетках, и активация CCR7 приводила к фосфорилированию P3K/Akt и последующему повышению экспрессии Bcl-2. Таким образом, можно было предположить, что при лечении пациентов ингибиторами Bcl-2 будет снижаться вызванный CCR7 антиапоптотический эффект, что не позволит комбинировать данные соединения с антителами против CCR7.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, задачей настоящего изобретения является обеспечение медикаментов и терапевтических подходов, которые преодолевают недостатки известных из уровня техники подходов к предотвращению и лечению гематологических злокачественных новообразований, в частности, В-клеточных злокачественных новообразований, таких как ХЛЛ. В частности, задачей настоящего изобретения является улучшение уровня выживаемости при таких В-клеточных злокачественных новообразованиях.

В первом аспекте настоящего изобретения предложено антитело против CCR7 для применения для лечения гиперпролиферативного гематологического заболевания, причем указанное заболевание представляет собой по меньшей мере одно из: a) заболевание, которое лечат по меньшей мере одним из ингибитора тирозинкиназы Брутона (BTK) и ингибитора белка В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2); b) заболевание, которое рецидивировало после лечения по меньшей мере одним из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2; и c) заболевание, которое рефрактерно к (не поддается) лечению по меньшей мере одним из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2. При лечении антитело против CCR7 можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с по меньшей мере одним из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2. Гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно представляет собой заболевание, при котором гиперпролиферирующие клетки представляют собой клетки В-клеточной линии дифференцировки, причем более предпочтительно заболевание представляет собой В-клеточное гематологическое злокачественное новообразование, наиболее предпочтительно лимфому или лейкоз. Предпочтительно гематологическое злокачественное новообразование, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой гематологическое злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), острого моноцитарного лейкоза (ОМоЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), ХЛЛ высокого риска, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ), МЛЛ высокого риска, множественной миеломы (ММ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы из клеток мантийной зоны (ЛКМ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), макроглобулинемии Вальденстрема (МВ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), лимфомы из клеток маргинальной зоны (ЛМЗ), лимфомы Беркитта (ЛБ), волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), трансформации Рихтера и Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза (Т-ПЛЛ).

IC_{50} антитела против CCR7 для применения для лечения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно составляет не более 100 нМ для ингибирования по меньшей мере одной из CCR7-зависимой внутриклеточной передачи сигнала и интернализации рецептора CCR7 посредством по меньшей мере одного лиганда CCR7, выбранного из CCL19 и CCL21. Антитело против CCR7 дополнительно предпочтительно ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала без существенного агонистического действия. K_d предпочтительного антитела против CCR7 для применения для лечения в соответствии с настоящим изобретением от N-концевого внеклеточного домена CCR7 человека не более чем в 20 раз выше, чем K_d референсного антитела против CCR7, при этом референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, в котором последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи (HVR) представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2. Антитело против CCR7 предпочтительно представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело. Предпочтительное химерное, гуманизированное или человеческое антитело против CCR7 для применения для лечения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, содержащее области HVR антитела против CCR7 человека, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2.

Предпочтительным ингибитором BTK для применения для лечения в соответствии с настоящим изобретением является ибрутиниб, занабрутиниб или акалабрутиниб, и предпочтительным ингибитором Bcl-2 для применения для лечения в соответствии с настоящим изобретением является венетоклакс или навитоклакс.

Гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно представляет собой заболевание у пациента, ранее не получавшего лечения, более предпочтительно, гиперпролиферативное гематологическое заболевание представляет собой заболевание у пациента, который ранее не получал лечения по меньшей мере одним из ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7.

В одном из вариантов реализации гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой гиперпролиферативное гематологическое заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения химиотерапевтическим

агентом, отличным от ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7, причем указанный химиотерапевтический агент предпочтительно представляет собой одно или более из флударабина, циклофосфамида, иделализиба, антитела против CD20, где предпочтительно антитело против CD20 представляет собой ритуксимаб, обинитузумаб, окрелизумаб, велтузумаб или офатумумаб, или антитело против CD52, где предпочтительно антитело против CD52 представляет собой алемузумаб.

В другом варианте реализации гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой гиперпролиферативное гематологическое заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения по меньшей мере одним из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Если не указано иное, технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют те же значения, которые понимает средний специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Специалисту в данной области техники будут понятны многие способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, которые могут быть использованы для осуществления настоящего изобретения. Действительно, настоящее изобретение никоим образом не ограничивается описанными способами и материалами.

Для целей настоящего изобретения ниже приведены определения следующих терминов.

В настоящей заявке формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, способ введения лекарственного средства или агента включает введение множества молекул (например, 10, 100, 1000, 10-ков тысяч, 100-ен тысяч, миллионов или более молекул), а также множества лекарственных средств или агентов.

Используемый в настоящей заявке термин «и/или» указывает на то, что может происходить один или более из указанных случаев, отдельно или в комбинации с по меньшей мере одним из указанных случаев вплоть до всех указанных случаев.

В настоящей заявке используемый термин «по меньшей мере» определенное значение означает это конкретное значение или более. Например, "по меньшей мере 2"

понимают как то же самое, что и "2 или более", то есть, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ..., и т.д.

Используемые в настоящей заявке термины «рак» и «раковый» относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток, или описывают его. Рак также называют злокачественным новообразованием.

В контексте настоящей заявки термин «в комбинации с» предназначен для обозначения всех форм введения, которые предоставляют первое лекарственное средство вместе с дополнительным (вторым, третьим) лекарственным средством. Указанные лекарственные средства можно вводить одновременно, раздельно или последовательно и в любом порядке, если не указано иное. Лекарственные средства, которые вводят в комбинации, обладают совместной биологической активностью в организме субъекта, которому доставляются указанные лекарственные средства.

В данном контексте "одновременное" введение относится к введению более чем одного лекарственного средства одновременно, но не обязательно одним и тем же путем введения, или в виде одного комбинированного состава. Например, одно лекарственное средство может быть введено перорально, тогда как другое лекарственное средство может быть введено внутривенно во время визита пациента в больницу. Отдельное введение включает введение лекарственных средств в отдельных формах и/или в отдельные моменты времени, но опять же, необязательно одним и тем же путем введения. Последовательно указывает на то, что за введением первого лекарственного средства следует, незамедлительно или своевременно, введение второго лекарственного средства.

В настоящей заявке термин «включать (содержать)» и его спряжения используют в неограничивающем смысле для обозначения того, что объекты, следующие за этим термином, включены, но при этом объекты, конкретно не упомянутые, не исключены. В его объем также входит более ограничительный термин "состоять из".

В данном контексте "композиции", "продукты" или "комбинации", пригодные в способах в соответствии с настоящим изобретением, включают таковые, подходящие для различных путей введения, включая, но не ограничиваясь внутривенным, подкожным, внутрикожным, субдермальным, внутриузловым, внутриопухолевым, внутримышечным, интраперитонеальным, пероральным, назальным, топическим (включая буккальное и сублингвальное), ректальным, вагинальным, аэрозольным и/или парентеральным введением или нанесением на слизистую оболочку. Композиции, составы и продукты в

соответствии с настоящим описанием или изобретением обычно содержат лекарственные средства (отдельно или в комбинации) и одно или более подходящих фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

Используемый в настоящей заявке термин "эффективное количество" означает количество агента, необходимое для облегчения симптомов заболевания по сравнению с пациентом, не получавшим лечения. Эффективное количество активного(-ых) агента(-ов), используемого(-ых) для осуществления настоящего изобретения для терапевтического лечения рака, варьируется в зависимости от способа введения, возраста, массы тела и общего состояния здоровья субъекта. В конечном итоге, лечащий врач или ветеринар определит подходящее количество и режим введения доз. Такое количество называют "эффективным" количеством. Таким образом, применительно к введению лекарственного средства, которое в контексте настоящего изобретения «эффективно против» заболевания или состояния, данный термин указывает на то, что введение клинически приемлемым образом приводит к благоприятному эффекту у по меньшей мере статистически значимой доли пациентов, такому как улучшение симптомов, излечение, уменьшение по меньшей мере одного признака или симптома заболевания, продление жизни, улучшение качества жизни или другой эффект, обычно расцениваемый как положительный врачами, знакомыми с лечением данного конкретного типа заболевания или состояния.

Термин «антитело» используют в наиболее широком смысле и, в частности, в его объем входят, например, отдельные моноклональные антитела против CCR7, включая антагонистические, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела, композиции антител против CCR7 с полиэпитопной специфичностью, поликлональные антитела, поливалентные антитела, одноцепочечные антитела против CCR7 и фрагменты антител против CCR7 (см. ниже), включая фрагменты Fab, Fab', F(ab')2 и Fv, диатела, однодоменные антитела (sdAb), при условии, что они проявляют желательную биологическую и/или иммунологическую активность. В настоящей заявке термин «иммуноглобулин» (Ig) используют взаимозаменяемо с термином антитело. Антитело может быть человеческим и/или гуманизированным.

Термин «антитело против CCR7» или «антитело, которое связывается с CCR7», относится к антителу, которое способно связывать CCR7 с достаточной аффинностью, так что указанное антитело подходит для применения в качестве диагностического и/или терапевтического агента для нацеливания на CCR7. Предпочтительно, степень связывания антитела против CCR7 с неродственным отличным от CCR7 белком меньше приблизительно 10% связывания указанного антитела с CCR7, при измерениях, например,

с помощью радиоиммунного анализа (РИА) или твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В некоторых вариантах реализации константа диссоциации антитела, которое связывается с CCR7 (K_d), составляет ≤ 1 мМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или ≤ 0,1 нМ. В некоторых вариантах реализации антитело против CCR7 связывается с эпитопом CCR7, который консервативен среди CCR7 из разных видов. Кроме того, в соответствии с настоящей заявкой понятно, что термин «антитело против CCR7», используемый в настоящей заявке, включает фрагменты антитела, которые связываются с CCR7.

«Выделенное антитело» представляет собой такое антитело, которое было идентифицировано и отделено от и/или извлечено из компонента его природного окружения.

Основная 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей (антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц и дополнительного полипептида, названного J-цепью, и, следовательно, содержит 10 антигенсвязывающих сайтов, тогда как секретируемые антитела IgA могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов, содержащих 2–5 основных 4-цепочечных единиц наряду с J-цепью). В случае IgG 4-цепочечная единица, как правило, имеет молекулярную массу приблизительно 150 000 дальтон. Каждая L-цепь соединена с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, а две H-цепи соединены между собой одной или более дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также содержит равномерно распределенные межцепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь содержит на N-конце вариабельный домен (V_H), за которым следуют три константных домена (C_H) для каждой из α- и γ-цепей и четыре CH домена для изотипов μ и ε. Каждая L-цепь содержит на N-конце вариабельный домен (V_L), за которым следует константный домен (C_L) на другом его конце. V_L расположен по одной линии с V_H и C_L расположен по одной линии с первым константным доменом тяжелой цепи (C_H1). Полагают, что определенные остатки аминокислот образуют поверхность контакта между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. При спаривании V_H и V_L друг с другом образуется одна антигенсвязывающая область. Описание структуры и свойств различных классов антител, см., например, в источнике «Основная и клиническая иммунология», стр. 71 и глава 6 (Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P.Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994).

L-цепь любого вида позвоночного можно отнести к одному из двух явно различных типов, называемых каппа и лямбда, на основании последовательностей аминокислот их

константных доменов. В зависимости от последовательности аминокислот константного домена тяжелых цепей (C_H) иммуноглобулины можно отнести к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, содержащих тяжелые цепи, обозначенные α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Классы γ и α дополнительно подразделяют на подклассы на основании относительно небольших различий в последовательности и функции C_H, например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

«Вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельный домен тяжелой цепи может обозначаться «VH». Вариабельный домен легкой цепи может обозначаться «V_L». Эти домены, как правило, являются наиболее вариабельными частями антитела и содержат антигенсвязывающие области.

Термин «вариабельный» относится к тому факту, что некоторые фрагменты вариабельных доменов в значительной степени отличаются по последовательности среди антител. V-домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела в отношении конкретного антигена. Тем не менее, вариабельность не распределена равномерно по последовательности вариабельных доменов длиной 110 аминокислот. Наоборот, V области состоят из относительно неизменных участков, названных каркасными областями (FR), из 15 - 33 аминокислот, разделенных более короткими участками с очень сильной вариабельностью, названными «гипервариабельными участками» (HVR), длина которых составляет 7 - 25 аминокислот. Каждый вариабельный домен нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, по большей части в β-складчатой конфигурации, соединенных тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли, соединяющие и, в некоторых случаях, образующие часть β-складчатой структуры. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости с помощью FR и, вместе с гипервариабельными участками из другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ое изд., Public Health Service, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд (1991)). Константные домены непосредственно не вовлечены в связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) и антителозависимом клеточном фагоцитозе (АЗКФ).

«Интактное» антитело представляет собой антитело, которое содержит антигенсвязывающий сайт, а также CL и по меньшей мере константные домены тяжелой цепи, C_H1, C_H2 и C_H3. Указанные константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (например, константные домены нативной последовательности человека) или вариант их последовательности аминокислот. Предпочтительно, интактное антитело проявляет одну или более эффекторных функций.

«Голое антитело» в контексте настоящей заявки представляет собой антитело, которое не конъюгировано с цитотоксической молекулой или радиоактивной меткой.

В объем термина «фрагменты антитела» входит часть интактного антитела, предпочтительно, антигенсвязывающая или вариабельная область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')2 и Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5,641,870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062[1995]); одноцепочечные молекулы антител; и мультиспецифичные антитела, образованные фрагментами антител. В одном варианте реализации фрагмент антитела содержит антигенсвязывающий сайт интактного антитела и, следовательно, сохраняет способность связывать антиген.

Fc-фрагмент содержит карбоксиконцевые части обеих H-цепей, удерживаемые вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в Fc-области, также представляющей собой часть, распознаваемую Fc-рецепторами (FcR), обнаруживаемыми на некоторых типах клеток.

Термин «моноклональное антитело» в настоящей заявке относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного антигенного сайта, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов). Моноклональные антитела обладают тем преимуществом, что они могут быть синтезированы без примесей других антител. Модифицирующее обстоятельство «моноклональное» не должно быть истолковано как подразумевающее получение антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, пригодные в соответствии с настоящим изобретением, можно получить с помощью гибридомного метода, впервые описанного в источнике Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), или можно получить с применением методов

рекомбинантной ДНК в клетках бактерий, эукариотических клетках животных или растений (см., например, патент США № 4,816,567). «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с применением методик, описанных, например, в источниках: Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

Моноклональные антитела в настоящей заявке включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из конкретных видов или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из других видов или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность (см. патент США № 4,816,567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес в настоящей заявке, включают «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельного домена, происходящие от примата, не являющегося человеком (например, мартышковых, человекообразных обезьян и т.д.), и человеческие последовательности константной области.

«Гуманизированные» формы антител, происходящих не от человека (например, антител грызунов), представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из антитела, не являющего человеческим. По большей части, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены на остатки из гипервариабельной области антител, происходящих из видов, не являющихся человеком (донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, имеющих желательную специфичность, аффинность и функциональные возможности. В некоторых случаях несколько остатков в каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменены на соответствующие остатки иммуноглобулина, отличные от человеческих. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаруживаются в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации осуществляют, чтобы дополнительно улучшить функционирование антитела. В общем случае гуманизированное антитело обычно содержит два вариабельных домена, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют таким петлям из иммуноглобулина, отличного от

человеческого, и все или по существу все FR представляют собой FR из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также содержит по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно константной области иммуноглобулина человека. Более подробную информацию можно найти в источниках: Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). См. также следующие обзорные статьи и источники, цитируемые в настоящей заявке: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma and Immunol., 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions, 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech., 5:428-433 (1994).

Термин «гипервариабельная область», «HVR» в настоящей заявке относится к областям вариабельного домена антитела, имеющим гипервариабельную последовательность и/или образующим петли с определенной структурой, которые отвечают за связывание антигена. Как правило, антитела содержат шесть гипервариабельных участков: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Используется ряд установленных границ гипервариабельных областей, и они входят в объем настоящего изобретения. Гипервариабельные участки, как правило, содержат остатки аминокислот из «определяющей комплементарность области» или «CDR» (например, приблизительно в районе остатков 24 – 34 (L1), 50 – 56 (L2) и 89 – 97 (L3) в VL и приблизительно в районе остатков 31 – 35 (H1), 50 – 65 (H2) и 95 – 102 (H3) в VH при нумерации в соответствии с системой нумерации по Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); и/или остатки из «гипервариабельной петли» (например, остатки 24 – 34 (L1), 50 – 56 (L2) и 89 – 97 (L3) в VL, и 26 – 32 (H1), 52 – 56 (H2) и 95 – 101 (H3) в VH при нумерации в соответствии с системой нумерации по Chothia (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))); и/или остатки из «гипервариабельной петли»/CDR (например, остатки 27 – 38 (L1), 56 – 65 (L2) и 105 – 120 (L3) в VL, и 27 – 38 (H1), 56 – 65 (H2) и 105 – 120 (H3) в VH при нумерации в соответствии с системой нумерации IMGT; Lefranc, M.P. et al. Nucl. Acids Res. 27:209-212 (1999), Ruiz, M. et al. Nucl. Acids Res. 28:219-221 (2000)). Необязательно антитело содержит симметричные инсерции в одном или более из следующих положений 28, 36 (L1), 63, 74 – 75 (L2) и 123 (L3) в VL, и 28, 36 (H1), 63, 74 – 75 (H2) и 123 (H3) в VH при нумерации в соответствии с Honneger, A. и Plunkthun, A. J. (Mol. Biol. 309:657-670 (2001)). Гипервариабельные участки/CDR антител в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно определяют и нумеруют в соответствии с системой нумерации IMGT.

«Каркасные» или «FR» остатки представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельной области, соответствующих определению в настоящей заявке.

«Блокирующее» антитело или «антагонистическое» антитело представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, который оно связывает. Предпочтительные блокирующие антитела или антагонистические антитела по существу или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

«Агонистическое антитело» в настоящей заявке представляет собой антитело, которое имитирует по меньшей мере один из видов функциональной активности представляющего интерес полипептида.

«Аффинность связывания» в общем случае относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в настоящей заявке «аффинность связывания» относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между представителями связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y, как правило, может быть выражена константой диссоциации (K_d). Аффинность можно измерить с помощью обычных способов, известных в данной области техники, включая способы, описанные в настоящей заявке. Низкоаффинные антитела, как правило, связывают антиген медленно и имеют тенденцию легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела, как правило, связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными дольше. В данной области техники известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых можно применять для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные варианты реализации описаны ниже.

«K_d» или «значение K_d» можно измерить с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с применением BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, Нью-Джерси), при 25°C на чипах CM5 с иммобилизованным антигеном на уровне ~10 – 50 единиц ответа (RU). Вкратце, биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIAcore Inc.) активируют N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлоридом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антиген разбавляют 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед введением при

скорости потока 5 мкл/минуту, для получения приблизительно 10 единиц ответа (RU) от связанного белка. После введения антигена вводят 1 М этаноламина для блокирования непрореагировавших групп. Для измерений кинетики вводят двукратные серийные разведения антитела или Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) в ФСБ с 0,05% Твин 20 (ФСБ-Т) при 25°С при скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости связывания (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают, используя простую модель связывания Лэнгмюра 1:1 (программное обеспечение BIAcore Evaluation, версия 3.2), одновременно аппроксимируя сенсограммы связывания и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on}. См., например, Chen, Y., et al., (1999) J.Mol Biol 293:865-881. Если скорость связывания превышает 10^6 M^{-1} c^{-1} в анализе методом поверхностного плазмонного резонанса, описанном выше, то скорость связывания можно определить, используя методику гашения флуоресценции, которая позволяет измерить повышение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нм; испускание = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°С для 20 нМ антитела против антигена (в форме Fab) в ФСБ, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, которое измеряют на спектрометре, таком как спектрофотометр с возможностью остановки потока (Aviv Instruments) или спектрофотометр серии 8000 SLM-Aminco (ThermoSpectronic) с функцией перемешивания в кювете.

«Скорость связывания», или «скорость ассоциации», или «k_{on}» в соответствии с настоящим изобретением также можно определить с помощью той же методики поверхностного плазмонного резонанса, описанной выше, применяя BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, Нью-Джерси), как описано выше.

Антитело, «которое связывает» представляющий интерес антиген, например, целевой антиген полипептид CCR7, представляет собой антитело, которое связывает антиген с аффинностью, достаточной для того, чтобы антитело подходило для применения в качестве терапевтического агента для нацеливания на клетку или ткань, экспрессирующую антиген, и не вступает на значительном уровне в перекрестные реакции с другими белками. В таких вариантах реализации степень связывания антитела с «нецелевым» белком составляет менее чем приблизительно 10% от связывания указанного антитела с конкретным целевым белком, что определяют с помощью анализа методом сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) или радиоиммунопреципитации (РИА). В отношении связывания антитела с целевой молекулой термин «специфичное связывание», или «специфично связывается с», или «специфичный» в отношении конкретного полипептида или эпитопа на конкретной полипептидной мишени

означает связывание, которое измеримо отличается от неспецифичного взаимодействия. Специфичное связывание можно измерить, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая, как правило, представляет собой молекулу с аналогичной структурой, которая не проявляет связывающей активности. Например, специфичное связывание можно определить по конкуренции с контрольной молекулой, которая сходна с мишенью, например, с избытком немеченой мишени. В этом случае говорят о специфичном связывании, если связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. Термин «специфичное связывание» или «специфично связывается с» или «специфичен» в отношении конкретного полипептида или эпитопа на конкретной полипептидной мишени в настоящей заявке может относиться, например, к молекуле, имеющей K_d в отношении мишени (которую можно определить, как описано выше), равную по меньшей мере приблизительно 10^{-4} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-5} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-6} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-7} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-8} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-9} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-10} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-11} М, как вариант, по меньшей мере приблизительно 10^{-12} М или более. В одном варианте реализации термин «специфичное связывание» относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде и по существу не связывается с каким-либо другим полипептидом или эпитопом полипептида.

«Эффекторные функции» антитела относятся к видам биологической активности, которые обусловлены Fc-областью (Fc-областью с нативной последовательностью или вариантом последовательности аминокислот Fc-области) антитела и изменяются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ); снижение экспрессии рецепторов на поверхности клеток (например, В-клеточного рецептора) и активацию В-клеток.

Термин «Fc-область» в настоящей заявке используют для обозначения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-областей. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как простирающуюся от остатка аминокислоты в положении Cys226, или от

Pro230, до ее карбоксильного конца. С-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации EU) Fc-области можно удалить, например, в ходе получения или очищения антитела, или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, в состав интактных антител могут входить популяции антител с полностью удаленными остатками K447, популяции антител без какого-либо удаления остатков K447 и популяции антител, содержащие смесь антител с остатками K447 и без них.

«Функциональная Fc-область» обладает «эффекторной функцией» нативной последовательности Fc-области. Примеры «эффекторных функций» включают связывание C1q; КЗЦ; связывание с Fc-рецептором; АЗКЦ; фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов на поверхности клеток (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т.д. Для таких эффекторных функций, как правило, требуется, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела), и их можно оценить, применяя различные способы анализа, описанные, например, в определениях в настоящей заявке.

«Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «АЗКЦ» относится к форме цитотоксичности, при которой секретированный Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, естественных клетках-киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфично связываться с несущей антиген целевой клеткой и впоследствии убивать целевую клетку с помощью цитотоксинов. Антитела «вооружают» цитотоксические клетки и абсолютно необходимы для такого киллинга. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, – NK-клетки – экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопоэтических клетках в общих чертах описана в Таблице 3 на странице 464 источника: Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Чтобы оценить АЗКЦ-активность представляющей интерес молекулы, можно провести анализ АЗКЦ in vitro, такой как описанный в патенте США № 5,500,362 или № 5,821,337. Подходящие для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве дополнения или альтернативы, активность АЗКЦ интересующей молекулы можно оценить *in vivo*, например, в модели на животном, такой как описанная в источнике: Clynes et al. (USA) 95:652-656 (1998). В WO 2000/42072 (Presta) описаны варианты антител с улучшенным или ослабленным связыванием с FcR. См. также, например, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001).

«Эффекторные клетки человека» представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно, указанные клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и осуществляют эффекторную функцию АЗКЦ. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют АЗКЦ, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; причем МКПК и NK-клетки предпочтительны. Эффекторные клетки можно выделить из природного источника, например, из крови.

«Комплементзависимая цитотоксичность», или «КЗЦ» относится к лизису целевой клетки в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента начинается после связывания первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (подходящего подкласса), которые связаны с распознаваемым антигеном. Чтобы оценить активацию комплемента, можно провести анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al. (1996, J. Immunol. Methods 202:163). Варианты антител с измененными последовательностями аминокислот Fc-области (антитела с вариантами Fc-области) и повышенной или сниженной способностью связывания C1q описаны, например, в патенте США № 6,194,551 B1 и WO 1999/51642. См. также, например, Idusogie et al. (2000, J. Immunol. 164: 4178-4184). Одной такой заменой, которая повышает связывание C1q и таким образом повышает активность КЗЦ, является замена E333A, которую можно успешно применять в антителах в соответствии с настоящим изобретением.

«Идентичность последовательностей» в настоящей заявке определяют как взаимосвязь между двумя или более последовательностями аминокислот (полипептида или белка) или двумя или более последовательностями нуклеиновых кислот (полинуклеотидов), которую определяют путем сравнения последовательностей. В данной области техники «идентичность» также означает степень родства между последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот, соответственно, которую определяют по совпадению между строками таких последовательностей. «Сходство» между двумя последовательностями аминокислот определяют путем сравнения последовательности аминокислот одного полипептида и ее вариантов с консервативными заменами аминокислот с последовательностью второго полипептида. «Идентичность» и «сходство» можно легко рассчитать с помощью известных способов. Термины «идентичность последовательностей» или «сходство последовательностей» означают, что у двух последовательностей (поли)пептида или двух последовательностей нуклеотидов, после оптимального выравнивания, предпочтительно по всей длине (по меньшей мере

самой короткой последовательности в сравнении), максимизации числа совпадений и минимизации количества гэпов, например, с помощью программ ClustalW (1.83), GAP или BESTFIT, используя параметры по умолчанию, наблюдается по меньшей мере некоторый процент идентичности последовательностей, согласно определениям в тексте настоящей заявки. В GAP используют алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей по всей длине, максимизирующего количество совпадений и минимизирующего количество пропусков. Как правило, в GAP используют параметры по умолчанию, причем штраф за введение гэпа = 50 (для нуклеотидов)/8 (для белков) и штраф за продление гэпа = 3 (для нуклеотидов)/2 (для белков). Для нуклеотидов используемая по умолчанию матрица замен представляет собой nwsgapdna, а для белков используемая по умолчанию матрица замен представляет собой Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Предпочтительная программа для множественного выравнивания для выравнивания белковых последовательностей в соответствии с настоящим изобретением представляет собой ClustalW (1.83) при использовании матрицы blosum и параметров, установленных по умолчанию (штраф за введение гэпа: 10; штраф за продление гэпа: 0,05). Выравнивания последовательностей и баллы за проценты идентичности последовательностей можно получить, применяя компьютерные программы, такие как пакет GCG Wisconsin Package, версии 10.3, доступный от Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, Сан-Диего, Калифорния, 92121-3752, США, или применяя программное обеспечение с открытым исходным кодом, такое как программа «needle» (использующая алгоритм глобального выравнивания Нидлмана-Вунша) или «water» (использующая алгоритм локального выравнивания Смита-Уотермана) в EmbossWIN версии 2.10.0, используя те же параметры, что и для GAP выше, или используя установочные параметры по умолчанию (как для «needle», так и для «water», для выравнивания как белков, так и ДНК, штраф за введение гэпа по умолчанию составляет 10,0, и штраф за продление гэпа по умолчанию составляет 0,5; матрицы замен по умолчанию представляют собой Blossum62 для белков и DNAFull для ДНК). Если последовательности существенно отличаются общей длиной, то предпочтительны локальные выравнивания, такие как выравнивания с применением алгоритма Смита-Уотермана. В качестве альтернативы, процент сходства или идентичности можно определить путем поиска в общедоступных базах данных с применением таких алгоритмов, как FASTA, BLAST и т.д.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В основе настоящего изобретения лежит неожиданное обнаружение того, что, в противоположность предыдущим сообщениям о том, что ингибиторы BTK, такие как

ибрутиниб, могут снижать экспрессию или вызывать полную утрату рецептора CCR7 в клетках хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ) (таким образом, не позволяя применение антител против CCR7 у этих пациентов), авторы настоящего изобретения, изучая большую когорту образцов ХЛЛ, не обнаружили различий (или обнаружили лишь незначительные различия) в уровнях экспрессии CCR7 между пациентами с ХЛЛ, получавшими и не получавшими лечение ибрутинибом. Кроме того, уровни экспрессии CCR7 у пациентов с рефрактерными/рецидивирующими опухолями были аналогичными или даже более высокими по сравнению с контрольными пациентами, не получавшими лечение. Кроме того, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что ингибиторы BTK приводили лишь к незначительному снижению опосредованной CCR7 миграции клеток ХЛЛ, тогда как антитела против CCR7 полностью блокировали этот процесс. Наконец, они обнаружили, что применение антител против CCR7 эффективно убивало клетки ХЛЛ, полученные от пациентов, получающих лечение ингибиторами BTK, и от пациентов с рецидивирующим/рефрактерным к лечению ингибиторами BTK заболеванием.

В той же когорте пациентов с ХЛЛ авторы настоящего изобретения наблюдали, что экспрессия CCR7 сохраняется у пациентов с ХЛЛ после лечения ингибиторами Bcl-2, такими как венетоклакс, и подтвердили, что направленная против CCR7 *in vitro* терапия этих пациентов приводила к ингибированию функционирования CCR7 и вызывала уничтожение клеток-мишеней.

Это открывает возможность применения моноклональных антител (МАТ) против CCR7, т.е., антител, которые распознают эпитоп на рецепторе CCR7 и которые предпочтительно способны ингибировать CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала и способны уничтожать и/или блокировать миграцию, активацию, пролиферацию и/или распространение CCR7+ опухолевых клеток *in vivo*, для лечения ХЛЛ и других гиперпролиферативных гематологических расстройств в комбинации по меньшей мере с одним из ингибиторов BTK и Bcl-2, а также для лечения таких расстройств, которые рецидивировали после лечения по меньшей мере одним из ингибиторов BTK и Bcl-2 или которые стали рефрактерными к такому лечению.

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, следовательно, предложено антитело против CCR7 для применения для лечения гиперпролиферативного гематологического заболевания. Гиперпролиферативное гематологическое заболевание предпочтительно представляет собой по меньшей мере одно из: a) заболевания, которое лечат ингибитором тирозинкиназы Брутона (BTK); b) заболевания, которое лечат

ингибитором В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2); c) заболевания, которое лечат комбинацией ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2; d) заболевания, которое рецидивировало после лечения ингибитором BTK; e) заболевания, которое рецидивировало после лечения ингибитором BTK; f) заболевания, которое рецидивировало после лечения комбинацией ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2; g) заболевания, которое рефрактерно к лечению ингибитором BTK; h) заболевания, которое рефрактерно к лечению ингибитором Bcl-2; и i) заболевания, которое рефрактерно к лечению комбинацией ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2.

Таким образом, в одном варианте реализации гиперпролиферативное гематологическое заболевание лечат комбинацией ингибитора BTK и антитела против CCR7. В другом варианте реализации гиперпролиферативное гематологическое заболевание лечат комбинацией ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7. В другом варианте реализации гиперпролиферативное гематологическое заболевание лечат комбинацией ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7. При указанном лечении антитело против CCR7 можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с ингибитором BTK и/или ингибитором Bcl-2.

Гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой заболевание у «субъекта» или «пациента», причем данные термины относятся ко всем животным, которых классифицируют как млекопитающих, и включают приматов и людей, но не ограничены ими. Субъект, которого нужно лечить, предпочтительно представляет собой человека мужского или женского пола и может быть любого возраста или расы. Лечение субъекта или пациента включает лечение первой линии, или второй линии, или третьей линии.

Термин «комбинация», используемый в данной заявке, относится к комбинированной терапии (в отличие от монотерапии), причем лечение включает применение или введение антитела против CCR7 и применение или введение по меньшей мере одного из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2. Таким образом, в комбинированной терапии в соответствии с настоящим изобретением компоненты комбинации могут быть введены одновременно, отдельно или последовательно. Следовательно, компоненты комбинации могут входить в состав одной композиции, или компоненты могут входить в по меньшей мере два отдельных состава. Комбинация может представлять собой один продукт, содержащий одну композицию или содержащий компоненты, входящие в по меньшей мере два отдельных состава. В качестве альтернативы, комбинация может

представлять собой по меньшей мере два различных продукта, которые могут быть получены от одного или более чем одного поставщика.

В некотором варианте реализации гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно комбинацией антитела против CCR7 и по меньшей мере одного из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2, представляет собой заболевание у пациента, ранее не получавшего лечения, например, пациента, не получавшего предшествующего лечения или по меньшей мере предшествующего химиотерапевтического лечения, причем термин «химиотерапевтическое лечение» имеет широкое значение, согласно определению ниже. Более предпочтительно, пациент, ранее не получавший лечения, представляет собой пациента, не получавшего предшествующего лечения ингибитором Bcl-2, в случае, если антитело против CCR7 вводят в комбинации с ингибитором BTK, или пациента, не получавшего предшествующего лечения ингибитором BTK, в случае, если антитело против CCR7 вводят в комбинации с ингибитором Bcl-2. Таким образом, «не получавший предшествующего лечения» в настоящей заявке следует понимать как обозначающий, что индивид не получал лечения соответствующим ингибитором до начала соответствующей комбинированной терапии. Комбинированное лечение пациентов, ранее не получавших лечения, с помощью антитела против CCR7 и по меньшей мере одного из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2 снижает риск того, что пациент станет рефрактерным к одному из компонентов лечения и что у него произойдет рецидив.

В некотором варианте реализации гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно комбинацией антитела против CCR7 и по меньшей мере одного из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2, представляет собой заболевание у пациента, который по меньшей мере ранее не получал лечения по меньшей мере одним из ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7. Пациент, который по меньшей мере ранее не получал лечения по меньшей мере одним из ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7, может, тем не менее, быть пациентом, который остался рефрактерным и/или у которого возник рецидив после лечения химиотерапевтическим агентом, отличным от по меньшей мере одного из ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7.

Таким образом, в некотором варианте реализации пациент остался рефрактерным и/или у него возник рецидив после лечения химиотерапевтическим агентом, отличным от по меньшей мере одного из ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7. Следует понимать, что в настоящей заявке термин «другой химиотерапевтический агент»

имеет широкое значение, которое включает биологические терапевтические агенты, такие как антитела и другие белки, антисмысловые молекулы, генотерапевтические векторы и клеточные терапевтические средства.

В некоторых вариантах реализации «другой химиотерапевтический агент» выбран из группы, состоящей из ингибиторов митоза, алкилирующих агентов, антиметаболитов, антрациклинов, алкалоидов барвинка, растительных алкалоидов, азотных иприто в, ингибиторов протеасом, интеркалирующих антибиотиков, ингибиторов факторов роста, ингибиторов клеточного цикла, модификаторов биологического ответа, антигормонов, ингибиторов ангиогенеза, антиандрогенов, взаимодействующих с ДНК агентов, аналогов пурина, ингибиторов топоизомеразы I, ингибиторов топоизомеразы II, взаимодействующих с тубулином агентов, гормональных агентов, ингибиторов тимидилатсинтазы, ингибиторов тирозинкиназ, отличных от BTK, ингибиторов тирозинкиназы P13K-дельта, ингибиторов EGF, ингибиторов VEGF, ингибиторов CDK, ингибиторов SRC, ингибиторов c-Kit, ингибиторов Her1/2, ингибиторов myc, противоопухолевых антител, моноклональных антител, направленных против рецепторов факторов роста, модуляторов протеинкиназ, радиоактивных изотопов, иммунотерапевтических средств, глюкокортикоидов, и их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации «другой химиотерапевтический агент» представляет собой противораковый агент, выбранный из группы, состоящей из взаимодействующих с ДНК агентов, таких как цисплатин или доксорубицин; ингибиторов топоизомеразы II, таких как этопозид; ингибиторов топоизомеразы I, таких как CPT-11 или топотекан; взаимодействующих с тубулином агентов, таких как паклитаксел, доцетаксел или эпотилоны (например, иксабепилон), либо встречающихся в природе, либо синтетических; гормональных агентов, таких как тамоксифен; ингибиторов тимидилатсинтазы, таких как 5-фторурацил; и антиметаболитов, таких как метотрексат; других ингибиторов тирозинкиназ, таких как иресса и OSI-774; ингибиторов ангиогенеза, ингибиторов EGF; ингибиторов VEGF; ингибиторов CDK; ингибиторов SRC; ингибиторов c-Kit; ингибиторов Her1/2 и моноклональных антител, направленных против рецепторов факторов роста, таких как эрбитукс (EGF) и герцептин (Her2); других модуляторов протеинкиназ, и их комбинаций. Другие противораковые агенты, которые могут применяться в способах в соответствии с настоящим изобретением, будут известны специалистам в области онкологии.

В некоторых вариантах реализации «другие химиотерапевтические агенты» выбраны из группы, состоящей из ингибитора протеасом, бортезомиба (Велкейд®),

карфилзомиба (PR-171), PR-047, дисульфирама, лактацистина, PS-519, эпонемицина, эпоксомицина, аклациномицина, CEP-1612, MG-132, CVT-63417, (-)-7-метиломуралида, (+/-)-7-метиломуралида, PS-341, ингибиторов винилсульфонного трипептида, ритоавира, PI-083, леналидомида и их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации "другой химиотерапевтический агент" представляет собой комбинацию химиотерапевтических средств, таких как, например, "CHOP" (комбинация, содержащая (i) циклофосфамид, такой как цитоксан,(ii) доксорубицин или другие ингибиторы топоизомеразы II, такие как адриамицин, (iii) винкристин или другие алкалоиды барвинка, такие как онковин; и (iv) стероид, такой как гидрокортизон или преднизолон); "R-CHOP" (комбинация, содержащая ритуксан, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин и преднизон); "ICE" (комбинация, содержащая ифосфамид, карбоплатин и этопозид); "R-ICE" (комбинация, содержащая ритуксан, ифосфамид, карбоплатин и этопозид); "R-ACVBP" (комбинация ритуксимаба, доксорубицина, циклофосфамида, виндезина, блеомицина и преднизона); "DA-EPOCH-R" (комбинация индивидуально подобранных доз этопозида, доксорубицина, циклофосфамида, винкристина, преднизона и ритуксимаба); "R-бендамустин" (комбинация бендамустина и ритуксимаба); "GemOx или R-GemOx" (комбинация семцитабина и оксалиплатина с ритуксимабом или без него); и "DHAP" (комбинация, содержащая дексаметазон, цитарабин и цисплатин).

В предпочтительном варианте реализации «другой химиотерапевтический агент» представляет собой флударабин, циклофосфамид, иделализиб, антитело против CD20, где предпочтительно антитело против CD20 представляет собой ритуксимаб, обинитузумаб, окрелизумаб, велтузумаб или офатумумаб, или антитело против CD52, где предпочтительно антитело против CD52 представляет собой алемтузумаб, или их комбинации.

В другом варианте реализации настоящего изобретения гиперпролиферативное гематологическое заболевание осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения ингибитором BTK, при этом предпочтительно ингибитор BTK такой, как описан ниже в данной заявке. В соответствии с приведенным в данной заявке примером, гиперпролиферативное гематологическое заболевание может оставаться рефрактерным и/или рецидивировать после лечения ингибиторами BTK, такими как ибрутиниб, акалабрутиниб и занабрутиниб. Гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения

ингибитором BTK, когда ингибитор применяли в качестве единственного агента для лечения указанного заболевания (т.е., применяли в виде монотерапии). В качестве альтернативы, гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой заболевание, которое осталось рефрактерным к ингибитору BTK и/или рецидивировало после лечения ингибитором BTK при применении ингибитора в комбинации с другим химиотерапевтическим агентом (т.е., при применении в виде комбинированной терапии). Другой химиотерапевтический агент может представлять собой «другой химиотерапевтический агент», в соответствии с определением выше. В предпочтительном варианте реализации «другой химиотерапевтический агент» представляет собой один или более из флударабина, циклофосфамида, иделалисиба, антитела против CD20, где предпочтительно антитело против CD20 представляет собой ритуксимаб, обинитузумаб, окрелизумаб, велтузумаб или офатумумаб, или антитело против CD52, где предпочтительно антитело против CD52 представляет собой алемтузумаб. В другом варианте реализации изобретения гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после последовательности лечений, где каждое лечение осуществлялось отличным химиотерапевтическим агентом или их комбинацией, и где одно из лечений включало применение ингибитора BTK (в виде монотерапии или комбинированной терапии). В данном варианте реализации указанный отличный химиотерапевтический агент или их комбинация могут представлять собой «другой химиотерапевтический агент», в соответствии с определением выше в настоящей заявке.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения гиперпролиферативное гематологическое заболевание осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения ингибитором Bcl-2, при этом предпочтительно ингибитор Bcl-2 является таким, как описано ниже в настоящей заявке. В соответствии с приведенным в данной заявке примером, гиперпролиферативное гематологическое заболевание может остаться рефрактерным и/или рецидивировать после лечения ингибитором Bcl-2, таким как венетоклакс. Гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения ингибитором Bcl-2, когда ингибитор применяли в качестве единственного агента для лечения указанного заболевания (т.е., применяли в виде монотерапии). В качестве альтернативы, гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим

изобретением, может представлять собой заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения ингибитором Bcl-2, когда ингибитор применяли в комбинации с другим химиотерапевтическим агентом (т.е., применяли в виде комбинированной терапии). Указанный другой химиотерапевтический агент может представлять собой «другой химиотерапевтический агент», в соответствии с определением выше. В предпочтительном варианте реализации «другой химиотерапевтический агент» представляет собой одно или более из флударабина, циклофосфамида, ибрутиниба, иделалисиба, антитела против CD20, где предпочтительно антитело против CD20 представляет собой ритуксимаб, обинитузумаб, окрелизумаб, велтузумаб или офатумумаб, или антитело против CD52, где предпочтительно антитело против CD52 представляет собой алемтузумаб. В другом варианте реализации изобретения гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после последовательности лечений, где каждое лечение осуществлялось отличным химиотерапевтическим агентом или их комбинацией, и где одно из лечений включало применение ингибитора Bcl-2 (в виде монотерапии или комбинированной терапии). В данном варианте реализации указанный отличный химиотерапевтический агент или их комбинация может представлять собой «другой химиотерапевтический агент», в соответствии с определением выше в настоящей заявке.

В другом варианте реализации настоящего изобретения гиперпролиферативное гематологическое заболевание осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения комбинацией ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2, при этом предпочтительно ингибитор BTK и ингибитор Bcl-2 являются такими, как описано ниже в настоящей заявке. В соответствии с приведенным в данной заявке примером, гиперпролиферативное гематологическое заболевание может остаться рефрактерным и/или рецидивировать после лечения комбинацией ингибиторов BTK, таких как ибрутиниб, акалабрутиниб и занабрутиниб, и ингибитора Bcl-2, такого как венетоклакс. Гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения комбинацией ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2, когда комбинация этих ингибиторов применялась в качестве единственной комбинации для лечения указанного заболевания (т.е., в терапии не применялись дополнительные агенты). В качестве альтернативы, гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после лечения

комбинацией ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2, когда ингибитор применяли в комбинации с другим химиотерапевтическим агентом (т.е., применяли в виде комбинированной терапии). Указанный другой химиотерапевтический агент может представлять собой «другой химиотерапевтический агент», в соответствии с определением выше. В предпочтительном варианте реализации «другой химиотерапевтический агент» представляет собой одно или более из флударабина, циклофосфамида, иделалисиба, антитела против CD20, где предпочтительно антитело против CD20 представляет собой ритуксимаб, обинитузумаб, окрелизумаб, велтузумаб или офатумумаб, или антитело против CD52, где предпочтительно антитело против CD52 представляет собой алемтузумаб. В другом варианте реализации гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой заболевание, которое осталось рефрактерным и/или рецидивировало после последовательности лечений, где каждое лечение осуществлялось отличным химиотерапевтическим агентом или их комбинацией, и где одно из лечений включало применение комбинации ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2 (как такового или в комбинации с другим химиотерапевтическим агентом). В данном варианте реализации указанный отличный химиотерапевтический агент или их комбинация может представлять собой «другой химиотерапевтический агент», в соответствии с определением выше в настоящей заявке.

Гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой заболевание, при котором гиперпролиферирующие клетки предпочтительно экспрессируют рецептор CCR7. В частности, когда антитело против CCR7 вводят одновременно, отдельно или последовательно с по меньшей мере некоторым ингибитором BTK, гиперпролиферирующие клетки предпочтительно экспрессируют тирозинкиназу Брутона. В частности, когда антитело против CCR7 вводят одновременно, отдельно или последовательно с по меньшей мере некоторым ингибитором Bcl-2, гиперпролиферирующие клетки предпочтительно экспрессируют белок В-клеточной лимфомы 2. В некоторых вариантах реализации гиперпролиферирующие клетки экспрессируют или сверхэкспрессируют по меньшей мере один из CD20 и CD52. В другом варианте реализации гиперпролиферирующие клетки утратили экспрессию или в них снизилась экспрессия по меньшей мере CD20, поскольку у некоторых пациентов экспрессия CD20 на гиперпролиферирующих клетках снижается после лечения BTK, тогда как CCR7 все еще экспрессируется.

В одном варианте реализации гиперпролиферативное гематологическое заболевание, подлежащее лечению в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой заболевание, при котором гиперпролиферирующие клетки представляют собой клетки В-клеточной линии дифференцировки. В некоторых вариантах реализации заболевание, связанное с чрезмерной пролиферацией В-клеток, представляет собой рак. В некоторых вариантах реализации заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой В-клеточное гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах реализации В-клеточное гематологическое злокачественное новообразование представляет собой лимфому или лейкоз.

В некоторых вариантах реализации гематологическое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), острого моноцитарного лейкоза (ОМоЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), ХЛЛ высокого риска, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ), МЛЛ высокого риска, множественной миеломы (ММ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы из клеток мантийной зоны (ЛКМ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), макроглобулинемии Вальденстрема (МВ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), лимфомы из клеток маргинальной зоны (ЛМЗ), лимфомы Беркитта (ЛБ), волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), трансформации Рихтера и Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза (Т-ПЛЛ).

В некоторых вариантах реализации указанное гематологическое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы из клеток мантийной зоны (ЛКМ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ) и Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза (Т-ПЛЛ).

В некоторых вариантах реализации указанное гематологическое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из лимфомы Беркитта, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности не Беркитта, первичной медиастинальной В-клеточной лимфомы (ПМВЛ), иммунобластной крупноклеточной лимфомы, В-лимфобластной лимфомы из клеток-предшественников, В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфоплазмоцитарной лимфомы, плазмоцитарной миеломы, плазмоцитомы, медиастинальной (тимусной) В-крупноклеточной лимфомы, внутрисосудистой В-

крупноклеточной лимфомы, первичной выпотной лимфомы, лимфомы Ходжкина и лимфоматоидного гранулематоза.

Антитело против CCR7

Антитело против CCR7 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой любой антигенсвязывающий белок, который специфично связывается с CCR7. Антигенсвязывающий белок в соответствии с настоящим изобретением, который связывается с CCR7, предпочтительно представляет собой антитело против CCR7 в наиболее широком смысле, согласно определению выше в настоящей заявке, включая, например, антитела против CCR7, фрагменты антител, производные антител, мутеины антител и варианты антител. Антитело против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой выделенное антитело. Предпочтительно, антитело против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением связывается с CCR7 примата, более предпочтительно – с CCR7 человека. Референсные последовательности аминокислот CCR7 человека представляют собой, например, NP_001288643, NP_001288645, NP_001288646, NP_001288647, NP_001829, NP_001288642 и NP_031745. Аминокислоты 1 – 24 этой последовательности содержат сигнальный пептид для транслокации через мембрану, который отщепляется во время экспрессии. Аминокислоты 25 – 59 CCR7 человека составляют N-концевой внеклеточный домен, указанный домен содержит сульфатированные остатки тирозина в положениях Y_{32} и Y_{41}. Известны различные аллельные варианты CCR7 человека с одной или более заменами аминокислот по сравнению с указанными выше референсными последовательностями. «CCR7 человека» в соответствии с настоящим изобретением включает эти аллельные варианты, по меньшей мере если указанные варианты содержат внеклеточный домен и проявляют функцию CCR7. Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно специфично связывается с N-концевым внеклеточным доменом CCR7, предпочтительно CCR7 человека.

Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой нейтрализующее антитело, которое ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала, CCR7-зависимые функции и/или интернализацию рецептора CCR7 посредством по меньшей мере одного лиганда CCR7, выбранного из CCL19 и CCL21. IC_{50} антитела против CCR7 предпочтительно не превышает 150, 100, 80, 50, 30, 25, 20, 15, 10, 5 или 3 нМ для ингибирования CCR7-зависимой внутриклеточной передачи сигнала и/или интернализации рецептора CCR7 по меньшей

мере одним лигандом CCR7, выбранным из CCL19 и CCL21, что можно, например, определить в анализе, описанном в разделе «Примеры» в данной заявке. В качестве альтернативы, максимальную IC_{50} антитела определяют исходя из IC_{50} референсного антитела против CCR7 при тестировании в том же анализе. Таким образом, предпочтительно IC_{50} антитела против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением не более чем в 10, 5, 2, 1,5, 1,2, 1,1 или 1,05 раз выше IC_{50} референсного антитела против CCR7, при этом референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 2.

Антитело против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала CCR7, как описано выше, не оказывая значительного агонистического действия, более предпочтительно не оказывая детектируемого агонистического действия, что можно, например, определить в анализе, описанном в разделе «Примеры» в данной заявке.

Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно проявляет минимальную аффинность в отношении N-концевого внеклеточного домена CCR7, предпочтительно, CCR7 человека. Минимальную аффинность антитела в настоящей заявке предпочтительно определяют исходя из K_d референсного антитела против CCR7, определенной в том же анализе. Таким образом, предпочтительно K_d антитела против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением от N-концевого внеклеточного домена CCR7 человека не более чем в 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1,5, 1,2, 1,1 или 1,05 раз выше, чем K_d референсного антитела против CCR7 от N-концевого внеклеточного домена CCR7 человека, при этом референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 2. Согласно настоящей заявке подразумевается, что антитело с K_d, не более чем в 10 раз превышающей K_d референсного антитела, представляет собой антитело, аффинность которого не менее чем в 10 раз ниже, чем аффинность референсного антитела. Таким образом, если K_d референсного антитела составляет 1×10^{-9} М, то у рассматриваемого антитела K_d составляет 1×10^{-8} М или менее.

Примеры антител против CCR7, обладающих одним или более из указанных выше свойств и подходящих для применения в соответствии с настоящим изобретением,

включают, например, моноклональные антитела, описанные в US 8,865,170, WO 2009/139853, US 20150344580 (WO2013184200), US 2016031997, US 2017342155 (WO 2014/151834) и US 2018237529 (WO 2017/025569), все из которых включены в данную заявку посредством ссылки.

Предпочтительное антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, которое специфично связывается с эпитопом, содержащим последовательность или состоящим из последовательности аминокислот «ZxLFE», где Z представляет собой сульфатированный тирозин, x может представлять собой любую аминокислоту, а F может быть заменена на гидрофобную аминокислоту. Антитело в соответствии с настоящим изобретением, таким образом, предпочтительно специфично связывается с эпитопом, содержащим последовательность или состоящим из последовательности аминокислот «ZTLFE» в положениях 41 – 45 в N-концевом внеклеточном домене CCR7 человека. Антитело предпочтительно является специфичным в отношении CCR7 человека. Такое предпочтительное антитело против CCR7 предпочтительно проявляет по меньшей мере минимальную аффинность в отношении CCR7 человека или в отношении синтетического антигена, содержащего эпитоп «ZTLFE», предпочтительно в отношении синтетического антигена SYM1899, как описано в разделе «Примеры» в данной заявке. Таким образом, предпочтительно K_d антитела против CCR7 составляет 1 x 10^{-8} M, 5 x 10^{-9} M, 2 x 10^{-9} M, 1,8 x 10^{-9} M, 1 x 10^{-9} M, 1 x 10^{-10} M или 1 x 10^{-11} M или менее, предпочтительно в отношении синтетического антигена SYM1899. В качестве альтернативы, минимальную аффинность антитела определяют относительно Kd референсного антитела против CCR7 при исследовании в одном и том же анализе. Таким образом, предпочтительно Kd антитела против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением от CCR7 человека или от синтетического антигена, содержащего эпитоп «ZTLFE» (предпочтительно, синтетического антигена SYM1899, как описано в разделе «Примеры» в настоящей заявке), не более чем в 10, 5, 2, 1,5, 1,2, 1,1 или 1,05 раз выше, чем K_d референсного антитела против CCR7 от указанного антигена, при этом референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 2. В соответствии с настоящей заявкой подразумевается, что антитело с K_d, не более чем в 10 раз превышающей K_d референсного антитела, представляет собой антитело, аффинность которого не менее чем в 10 раз ниже, чем аффинность референсного антитела. Таким образом, если K_d

референсного антитела составляет 1 x 10^{-9} M, то у рассматриваемого антитела K_d составляет 1 x 10^{-8} M или менее.

Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно связывается с CCR7 человека или с синтетическим антигеном, содержащим эпитоп «ZTLFE» (предпочтительно, с синтетическим антигеном SYM1899, как описано в разделе «Примеры» в настоящей заявке; SEQ ID NO: 3), с константой скорости диссоциации k_{off}, которая имеет максимальный верхний предел. Соответственно, предпочтительно константа скорости диссоциации k_{off} антитела против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением составляет 1 x 10^{-3}, 1 x 10^{-4} или 1 x 10^{-5} c^{-1} или менее. В качестве альтернативы, максимальную константу скорости диссоциации k_{off} антитела определяют относительно константы скорости диссоциации k_{off} референсного антитела против CCR7, при тестировании в том же анализе. Таким образом, предпочтительно, антитело против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением связывается с CCR7 человека или с синтетическим антигеном, содержащим эпитоп «ZTLFE» (предпочтительно, с синтетическим антигеном SYM1899, как описано в разделе «Примеры» в настоящей заявке), с k_{off} не более чем в 10, 5, 2, 1,5, 1,2, 1,1 или 1,05 раз выше, чем константа скорости диссоциации k_{off} референсного антитела против CCR7 для указанного антигена, при этом референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 2.

Одно такое предпочтительное антитело для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, содержащее HVR референсного антитела мыши против CCR7 человека, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, а последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 2, причем указанные HVR описаны в US 2018237529, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Антитело против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой химерное антитело, например, антитело мыши/человека. Тем не менее, предпочтительно указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека.

Гуманизированное антитело для применения в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно вызывает незначительный иммуногенный ответ или не вызывает иммуногенного ответа против антитела у субъекта, которому вводят указанное антитело. Например, гуманизированное антитело для применения в соответствии с настоящим изобретением вызывает и/или предположительно будет вызывать ответ против антител мыши у человека (HAMA) на значительно сниженном уровне по сравнению с исходным антителом мыши, например, содержащим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 и 2, у субъекта-хозяина. Предпочтительно, гуманизированное антитело вызывает, и/или предположительно будет вызывать минимальный ответ, или не вызывает ответа против антител мыши у человека (HAMA). Наиболее предпочтительно, антитело в соответствии с настоящим изобретением вызывает ответ против антитела мыши, который находится на клинически приемлемом уровне или ниже.

Гуманизация может быть выполнена по существу согласно способу Winter с коллегами (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), путем замены последовательностей гипервариабельной области на соответствующие последовательности антитела человека. На практике гуманизированные антитела обычно представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и необязательно некоторые остатки каркасной области (FR) заменены на остатки из аналогичных сайтов антител грызунов. Выбор вариабельных доменов человека, как из легких, так и из тяжелых цепей, для применения при получении гуманизированных антител, очень важен для снижения иммуногенности при сохранении специфичности и аффинности к антигену. Согласно так называемому способу «наилучшего соответствия» проводили скрининг последовательности вариабельного домена антитела грызуна, сравнивая со всей библиотекой известных последовательностей вариабельных доменов человека. Последовательность человека, наиболее близкую последовательности грызуна, затем используют в качестве каркасной области (FR) человека для гуманизированного антитела (Suns et al., J.Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol, 196:901 (1987)). В другом способе используют конкретную каркасную область, которая происходит из консенсусной последовательности всех антител человека из конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркас можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Кроме того, важно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности к антигену и других полезных биологических свойств. Для достижения этой задачи, в соответствии с предпочтительным способом, гуманизированные антитела получают с помощью процесса анализа исходных последовательностей и различных теоретических гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели исходной и гуманизированных последовательностей. Гуманизированное антитело против CCR7 в соответствии с любым из описанных выше вариантов реализации настоящего изобретения предпочтительно содержит константную область тяжелой цепи, которая представляет собой область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Гуманизированное антитело против CCR7 в соответствии с любым из описанных выше вариантов реализации настоящего изобретения предпочтительно содержит функциональную Fc-область, осуществляющую по меньшей мере одну эффекторную функцию, выбранную из группы, состоящей из: связывания C1q, комплементзависимой цитотоксичности; связывания Fc-области, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и фагоцитоза.

Предпочтительное гуманизированное антитело для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 4, а последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 5, как описано, например, в US 2018237529. Более предпочтительное гуманизированное антитело для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 4, последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 5, а последовательность аминокислот константной области тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 10, как описано, например, в US 2018237529, и которое обозначено в данной заявке «CAP-100».

В качестве альтернативы, вместо гуманизации можно получать антитела человека. Под «антителом человека» («человеческим антителом») подразумевают антитело, содержащее полностью человеческие легкие и тяжелые цепи, а также константные области, полученные с помощью любого из известных стандартных способов. Например, доступны трансгенные животные (например, мыши), способные после иммунизации продуцировать весь репертуар антител человека в отсутствие продукции эндогенных иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена PH J-области тяжелой цепи антитела у химерных мышей и мышей с мутацией зародышевой линии приводила к

полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос набора генов зародышевой линии иммуноглобулинов человека таким мышам с мутацией зародышевой линии приведет к продуцированию антител человека после иммунизации. См., например, Jakobovits et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 90:255 1 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993). В качестве альтернативы, можно применять технологию фагового дисплея (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) для получения антител человека и фрагментов антител человека *in vitro* из репертуаров генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов от доноров. В соответствии с указанной методикой гены V доменов антител клонируют в одной рамке считывания в ген либо мажорного, либо минорного белка оболочки филаментного бактериофага, такого как M13 или fd, и они экспонируются как функциональные фрагменты антител на поверхности частицы фага. Так как частица филаментного фага содержит копию одноцепочечной ДНК генома фага, отбор на основе функциональных свойств антитела также приводит к отбору гена, кодирующего антитело, проявляющее такие свойства. Таким образом, фаг имитирует некоторые свойства B-клеток. Фаговый дисплей может проводиться в разнообразных форматах; обзорную информацию можно найти, например, в источнике: Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-57 1 (1993). Антитела человека также можно получить с помощью активированных *in vitro* B-клеток или мышей SCID, клетки иммунной системы которых заменены клетками человека. После получения антитела человека, кодирующие его последовательности ДНК можно выделить, клонировать и внедрить в подходящую систему экспрессии, т.е., линию клеток, предпочтительно, от млекопитающего, которая впоследствии экспрессирует и высвобождает его в культуральную среду, из которой можно выделить указанное антитело.

Предпочтительное антитело человека для применения в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 6, а последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 7 или 8, как, например, описано в US 2016031997 (WO 2014/151834), или любое из антител человека против CCR7, описанных в US 20150344580 (WO2013/184200), такое как антитело R707, последовательность аминокислот тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 11, а последовательность аминокислот легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 12. Другие предпочтительные антитела человека для применения в соответствии с настоящим изобретением представляют собой антитела человека, которые содержат все области VH антител против CCR7, описанных в US2013195869 (WO2012043533) и WO2018142322.

Функциональные фрагменты антител, которые связываются с рецептором CCR7, предусмотренные для применения в соответствии с настоящим изобретением, сохраняют по меньшей мере одну связывающую функцию и/или модулирующую функцию полноразмерного антитела, из которого они происходят. Предпочтительные функциональные фрагменты сохраняют антигенсвязывающую функцию соответствующего полноразмерного антитела (например, способность связывать рецептор CCR7 млекопитающего). В частности, предпочтительные функциональные фрагменты сохраняют способность ингибировать одну или более функций, свойственных рецептору CCR7 млекопитающего, таких как активность связывания, и/или блокирование активности передачи сигнала, и/или стимуляция клеточного ответа. Например, в одном варианте реализации функциональный фрагмент может ингибировать взаимодействие CCR7 с одним или более его лигандами и/или может ингибировать одну или более опосредованных рецептором функций.

В некоторых вариантах реализации антитело против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением содержит константную область легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела. Можно применять любые константные области антитела, известные в данной области. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи типа каппа или лямбда, например, константную область легкой цепи человека типа каппа или лямбда. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи типа альфа, дельта, эпсилон, гамма или мю, например, константную область тяжелой цепи человека типа альфа, дельта, эпсилон, гамма или мю. Антитело против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением, следовательно, может содержать константные области любого изотипа, т.е., в том числе константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, а также константные области IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном варианте реализации константная область легкой или тяжелой цепи представляет собой фрагмент, производное, вариант или мутеин встречающейся в природе константной области. Известны методики получения антитела из подкласса или изотипа, отличающегося от подкласса или изотипа интересующего антитела, т.е., переключения подклассов. Таким образом, антитела IgG могут происходить, например, из антитела IgM, и наоборот. Такие методики позволяют получать новые антитела, которые проявляют антигенсвязывающие свойства данного антитела (исходного антитела), но также проявляют биологические свойства, связанные с изотипом или подклассом антитела, отличающимся от подкласса или изотипа исходного антитела. Можно применять технологию рекомбинантной ДНК. В таких процедурах можно использовать клонированную ДНК, кодирующую определенные полипептиды антитела, например, ДНК,

кодирующую константный домен антитела нужного изотипа. См. также Lantto et al. (2002, Methods Mol. Biol,178:303-16). Соответственно, антитела против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением включают такие антитела, которые содержат, например, одну или более последовательностей вариабельного домена, описанных в настоящей заявке и имеющих нужный изотип (например, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE и IgD), а также их Fab- или F(ab')2- фрагменты. Более того, если нужен IgG4, то также может потребоваться введение точечной мутации (CPSCP -> CPPCP) в шарнирную область, как описано у Bloom et al. (1997, Protein Science 6:407), чтобы уменьшить склонность к образованию внутри H-цепей дисульфидных связей, что может приводить к гетерогенности антител IgG4.

Антитело против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит функциональную Fc-область, обладающую по меньшей мере одной эффекторной функцией, выбранной из группы, состоящей из: связывания C1q, комплементзависимой цитотоксичности; связывания с Fc-рецептором, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности и фагоцитоза.

Антитело против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением можно модифицировать для улучшения эффекторной функции, например, чтобы усилить АЗКЦ и/или КЗЦ антитела. Этого можно добиться путем введения одной или более замен аминокислот в Fc-область антитела. Предпочтительная замена в Fc-области антитела в соответствии с настоящим изобретением представляет собой замену, которая повышает связывание C1q и тем самым повышает активность КЗЦ, как, например, описано в источнике: Idusogie et al. (2000, J. Immunol. 164: 4178-4184). Предпочтительная замена в Fc-области, которая повышает связывание C1q, представляет собой замену E333A.

Гликозильные группы, добавленные в аминокислотный остов гликопротеинов, например, антител, образованы несколькими моносахаридами или производными моносахаридов, и приводят к тому, что состав одного и того же антитела, полученного в клетке от разных млекопитающих или из разных тканей, может различаться. Кроме того, было показано, что разный состав гликозильных групп может влиять на эффективность опосредования антигензависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) антитела. Следовательно, можно улучшить эти свойства, путем исследования паттерна гликозилирования антител из различных источников. Пример такого подхода описан в источнике: Niwa et al. (2004, Cancer Res, 64(6):2127-33).

В качестве дополнения или альтернативы, остаток(-ки) цистеина могут быть введены в Fc-область, позволяя образование межцепочечных дисульфидных связей в этой области. Гомодимерное антитело, полученное таким образом, может обладать улучшенной способностью к интернализации и/или к повышенному опосредованному комплементом киллингу клеток и повышенной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). См. Caron et al. (1992, J. Exp Med. 176:1191-1195) и Shopes (1992, Immunol. 148:2918-2922). Также можно получить гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью, применяя гетеробифункциональные перекрестносвязывающие линкеры, описанные в источнике Wolff et al. (1993, Cancer Research 53:2560-2565). В качестве альтернативы, можно сконструировать антитело, которое содержит двойные Fc-области и благодаря этому может обладать повышенной способностью вызывать опосредованный комплементом лизис и АЗКЦ. См. Stevenson et al. (1989, Anti-Cancer Drug Design, 3:2, 19-230). Чтобы увеличить время полужизни антитела в сыворотке, можно встроить в антитело (в частности, во фрагмент антитела) эпитоп связывания рецептора реутилизации, как описано, например, в US 5,739,277. В настоящей заявке термин «эпитоп связывания рецептора реутилизации» относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), который отвечает за увеличение времени полужизни в сыворотке молекулы IgG *in vivo*.

Предпочтительное антитело против CCR7 в соответствии с настоящим изобретением содержит константную область тяжелой цепи аллотипа G1m17,1 человека (см. источник: Jefferis and Lefranc (2009) MAbs Vol.1 Issue 4, pp 1-7), причем указанная константная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 9. Более предпочтительно константная область тяжелой цепи аллотипа G1m17,1 человека в антителе в соответствии с настоящим изобретением содержит замену E333A, причем указанная константная область тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO: 10.

Антитела против CCR7 для применения в соответствии с настоящим изобретением можно получить с помощью любой из множества обычных методик. Обычно их получают в рекомбинантных экспрессионных системах, применяя любую методику, известную в данной области техники. См., например, Shukla and Thömmes (2010, “Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins”, Trends in Biotechnol. 28(5):253–261), Harlow and Lane (1988) “Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; и Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, NY. Любую экспрессионную систему, известную в данной области, можно применять для получения рекомбинантных полипептидов в соответствии с настоящим изобретением. Обычно клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным экспрессионным вектором, который содержит ДНК, кодирующую желательный полипептид.

Ингибитор BTK

В соответствии с настоящим изобретением предложены новые комбинации, содержащие ингибиторы тирозинкиназы Брутона (BTK), называемые ингибиторами BTK. Такие ингибиторы широко известны в данной области техники и доступны для приобретения для лечения B-клеточного рака, такого как лимфома из клеток мантийной зоны, хронический лимфоцитарный лейкоз и макроглобулинемия Вальденстрема. Примером доступного для приобретения ингибитора BTK является ибрутиниб, также известный как Имбрувика (торговое наименование), который представляет собой 1-[(3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он.

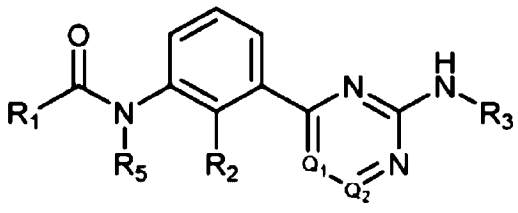
Активность ингибиторов BTK можно измерить, применяя метод иммобилизованных ионов металла для анализа фосфохимических веществ (IMAP). IMAP представляет собой гомогенный анализ поляризации флуоресценции (FP), основанный на аффинном захвате фосфорилированных пептидных субстратов. В IMAP используются меченые флуоресцеином пептидные субстраты, которые при фосфорилировании протеинкиназой связываются с так называемыми наночастицами IMAP, которые дериватизированы комплексами трехвалентных металлов. Связывание вызывает изменение скорости молекулярного движения пептида и приводит к увеличению значения FP, наблюдаемого для флуоресцеиновой метки, присоединенной к субстратному пептиду.

Ингибирование BTK также можно определить в линиях B-клеток, таких как клетки Ramos, или при анализе первичных клеток, например, МКПК или цельной крови млекопитающих, таких как человек, обезьяна, крыса или мышь; или выделенных спленоцитов обезьяны, крысы или мыши. Ингибирование активности BTK можно исследовать путем измерения продукции MIP1 β, вызванной антителами против IgM (Ramos, МКПК, спленоциты), фосфорилирования BTK и PLCv2, вызванного H2O2 (клетки Ramos), или пролиферации B-клеток, вызванной антителами против IgM, или экспрессии CD86 на первичных B-клетках (МКПК и спленоциты). Регуляцию активности BTK также можно определить на тучных клетках человека, обезьяны, крысы или мыши после активации вызванной FCER дегрануляции, продукции цитокинов и вызванной CD63

экспрессии на поверхности клетки. Кроме того, регуляцию активности BTK можно определить на CD14+ моноцитах, дифференцированных после обработки M-CSF в остеокласты и активированных RANKL. Активность ингибиторов BTK можно исследовать в спленоцитах мыши после введения *in vivo*. В типичном эксперименте мышей можно умертвить через 3 часа после введения соединения. Селезенки можно извлечь из получивших соединения мышей для выделения спленоцитов. Спленоциты можно высеять в 96-луночные культуральные планшеты и стимулировать антителом против IgM, без дополнительного добавления соединений. Вызванную антителом против IgM стимуляцию B-клеток и ее ингибирование ингибиторами BTK можно измерить по пролиферации B-клеток, продукции MIP1 β или экспрессии CD86 на CD19+ B-клетках спленоцитов. Специалисту в данной области техники известны дополнительные способы анализа, такие как использование модели вызванного коллагеном артрита у мышей, описанной в WO2013010869, или использование модели OVX на крысах, описанной в WO2013010869.

Предпочтительные ингибиторы BTK селективны в отношении BTK или по существу селективны в отношении BTK. Более предпочтительно, ингибиторы BTK селективны в отношении киназ семейства Src или селективны в отношении BTK и киназ, содержащих остаток цистеина в положении последовательности аминокислот тирозинкиназы, которое гомологично положению в последовательности аминокислот цистеина 481 в BTK. Ингибиторы BTK могут образовывать ковалентную связь с этим цистеином или иным образом взаимодействовать с ним.

Ингибиторы BTK, как правило, содержат кольцевую систему, содержащую два или более атомов азота, вдобавок к дополнительным аффинным элементам. В предпочтительных вариантах реализации ингибитор BTK отвечает общей формуле (1)



(1),

где

Q_1 и Q_2 каждый независимо представляет собой N или C-R_4, где предпочтительно один из Q_1 и Q_2 представляет собой N или CH, а другой представляет собой C-R_4,

R_1 представляет собой содержащую заместители или не содержащую заместителей арильную группу, содержащее заместители или не содержащее заместителей гетероциклическое кольцо, содержащее заместители или не содержащее заместителей

гетероциклическое конденсированное кольцо или содержащую заместители или не содержащую заместителей алкинильную группу,

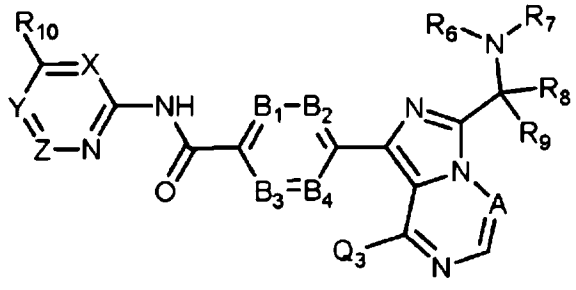
R_2 представляет собой атом водорода, атом галогена, содержащую заместители или не содержащую заместителей группу низшего алкила или содержащую заместители или не содержащую заместителей алкоксигруппу,

R_3 представляет собой содержащую заместители или не содержащую заместителей арильную группу, содержащее заместители или не содержащее заместителей гетероциклическое кольцо или содержащее заместители или не содержащее заместителей гетероциклическое конденсированное кольцо,

R_4 представляет собой атом водорода, содержащую заместители или не содержащую заместителей группу низшего алкила, содержащую заместители или не содержащую заместителей алкоксигруппу, содержащую заместители или не содержащую заместителей аминогруппу или атом галогена, и

R_5 представляет собой атом водорода, содержащую заместители или не содержащую заместителей группу низшего алкила, или R_1 и R_5 могут быть объединены с образованием насыщенного или ненасыщенного 5-6-членного кольца, тем самым образуя многократно конденсированное кольцо,

или ингибитор BTK отвечает общей формуле (2)



(2),

где

Q_3 представляет собой аминогруппу или группу низшего алкила, предпочтительно аминогруппу или метил,

X представляет собой CH, N, O или S;

Y представляет собой $C(R_{11})$, N, O или S;

Z представляет собой CH, N или связь;

A представляет собой CH или N;

B_1 представляет собой N или $C(R_{12})$;

B_2 представляет собой N или $C(R_{13})$;

B_3 представляет собой N или $C(R_{14})$;

B_4 представляет собой N или $C(R_{15})$;

R_6 представляет собой $C(=O)R_{16}$, $S(=O)R_{17}$, $S(=O)2R_{18}$ или (C_{1-6})алкил, необязательно содержащий в качестве заместителя R_{19};

R_7 представляет собой H, (C_{1-3})алкил или (C_{3-7})циклоалкил;

R_8 представляет собой H, (C_{1-6})алкил или (C_{3-7})циклоалкил); или R_7 и R_8 образуют вместе с атомами N и C, к которым они присоединены, (C_{3-7})гетероциклоалкил, необязательно содержащий в качестве заместителя один или более атомов фтора, гидроксилов, (C_{1-3})алкилов, (C_{1-3})алкокси или оксо;

R_9 представляет собой H или (C_{1-3})алкил;

R_{10} представляет собой H, галоген, циано, (C_{1-4})алкил, (C_{1-3})алкокси, (C_{3-6})циклоалкил, любая алкильная группа которого необязательно содержит в качестве заместителей один или более атомов галогена; или R_{10} представляет собой (C_{6-10})арил или (C_{2-6}) гетероциклоалкил;

R_{11} представляет собой H или (C_{1-3})алкил; или R_{10} и R_{11} вместе могут образовывать (C_{3-7})циклоалкенил или (C_{2-6})гетероциклоалкенил, каждый из которых необязательно содержит в качестве заместителей (C_{1-3})алкил или один или более атомов галогена;

R_{12} представляет собой H, галоген, CF3, (C_{1-3})алкил или (C_{1-3})алкокси;

R_{13} представляет собой H, галоген, CF_3, (C_{1-3})алкил или (C_{1-3})алкокси; или R_{12} и R_{13} вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют (C_{6-10})арил или (C_{1-9}) гетероарил;

R_{14} представляет собой H, галоген, (C_{1-3})алкил или (C_{1-3})алкокси;

R_{15} представляет собой H, галоген, (C_{1-3})алкил или (C_{1-3})алкокси;

R_{16} независимо выбран из группы, состоящей из (C_{1-6})алкила, (C_{2-6})алкенила и (C_{2-6})алкинила, где каждый алкил, алкенил или алкинил необязательно содержит один или более заместителей, выбранных из группы, состоящей из гидроксила, (C_{1-4})алкила, (C_{3-7})циклоалкила, [(C_{1-4})алкил]амино, ди[(C_{1-4})алкил]амино, (C_{1-3})алкокси, (C_{3-7})циклоалкокси, (C_{6-10})арила и (C_{3-7})гетероциклоалкила; или R_{16} представляет собой (C_{1-3})алкил-C(O)-S-$(C_{1-}$

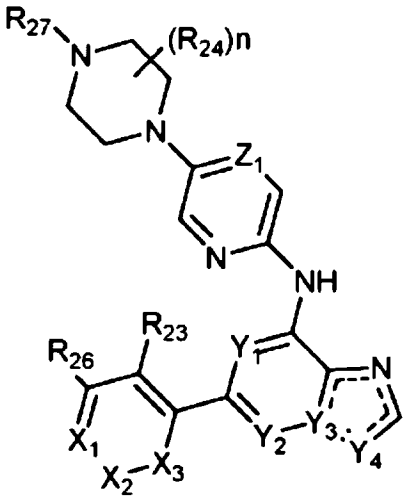
$_3$)алкил; или R_{16} представляет собой (C_{1-5})гетероарил, необязательно содержащий один или более заместителей, выбранных из группы, состоящей из галогена и циано;

R_{17} и R_{18} независимо выбраны из группы, состоящей из (C_{2-6})алкенила и (C_{2-6}) алкинила, оба необязательно содержат один или более заместителей, выбранных из группы, состоящей из гидроксила, (C_{1-4})алкила, (C_{3-7})циклоалкила, [(C_{1-4})алкил]амино, ди[(C_{1-4})алкил]амино, (C_{1-3})алкокси, (C_{3-7})циклоалкокси, (C6-10)арила и (C_{3-7})гетероциклоалкила; или (C_{1-5})гетероарила, необязательно содержащего один или более заместителей, выбранных из группы, состоящей из галогена и циано; и

R_{19} независимо выбран из группы, состоящей из галогена, циано, (C_{2-6})алкенила и ($C_{2\ 6}$)алкинила, оба необязательно содержат один или более заместителей, выбранных из группы, состоящей из гидроксила, (C_{1-4})алкила, (C_{3-7})циклоалкила, (C_{1-4})алкиламино, ди[(C_{1-4})алкил]амино, (C_{1-3})алкокси, (C_{3-7})циклоалкокси, (C_{6-10})арила, (C_{1-5})гетероарила и (C_{3-7})гетероциклоалкила; при условии, что:

от 0 до 2 атомов X, Y, Z могут одновременно представлять собой гетероатом; когда один атом, выбранный из X, Y, представляет собой O или S, тогда Z представляет собой связь, а другой атом, выбранный из X, Y, не может представлять собой O или S; когда Z представляет собой C или N, тогда Y представляет собой C(R_{11}) или N и X представляет собой C или N; от 0 до 2 атомов B_1, B_2, B_3 и B_4 представляют собой N;

или ингибитор BTK отвечает общей формуле (3)



(3),

где

сплошная/пунктирная линия обозначает одинарную или двойную связь;

X_1 представляет собой CR_{20} или N;

X_2 представляет собой CR_{21} или N;

X_3 представляет собой CR_{22} или N; где ни один, один или два из X_1, X_2 и X_3 представляют собой N;

Y_1 и Y_2 независимо выбраны из CH и N;

Y_3 представляет собой C или N;

Y_4 представляет собой CR_{25}, N или NH; где один или два из Y_1, Y_2, Y_3 и Y_4 представляют собой N;

R_{20}, R_{21} и R_{22} независимо выбраны из H, F, CI, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, -OH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-OCH_2CH_2OH$ и C_{1-3} алкила, необязательно содержащего в качестве заместителей F, CI, CN, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, -OH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$ и $-OCH_2CH_2OH$;

R_{23} выбран из H, F, CI, CN, $-CH_2OH$, $-CH(CH_3)OH$, $-C(CH_3)_2OH$, $-CH(CF_3)OH$, $-CH_2F$, -CHF2, $-CH_2CHF_2$, $-CF_3$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHCH_3$, $-C(O)N(CH_3)_2$, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-NHC(O)CH_3$, -OH, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-OCH_2CH_2OH$, циклопропила, циклопропилметила, 1-гидроксициклопропила, имидазолила, пиразолила, 3-гидроксиоксетан-3-ила, оксетан-3-ила и азетидин-l-ила;

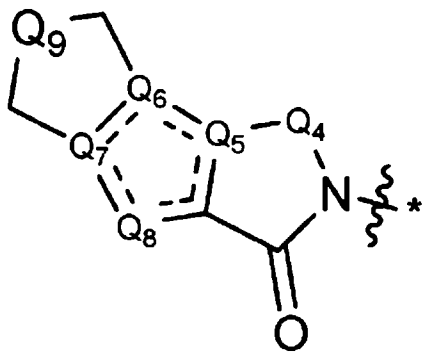
R_{24} выбран из C_{1-2}алкила, $-CH_2OH$, $-CH_2F$, $-CHF_2$, $-CF_3$, -CN и - CH_2CH_2OH; или две группы R_{24} образуют 3-, 4-, 5- или 6-членное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо;

или группа R_{24} и группа R_{27} образуют 3-, 4-, 5- или 6-членное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо;

n представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4;

R_{25} выбран из H, CI, C_{1-2}алкила, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2F$, $-CHF_2$, $-CF_3$, - NH_2, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, -OH, C_{1-2}алкокси и $-OCH_2CH_2OH$;

R_{26} представляет собой группу, отвечающую общей формуле (3_{26})



(3_{26}),

где

сплошная/пунктирная линия обозначает одинарную или двойную связь;

Q_4 представляет собой $–CH_2$-, $-CH_2CH_2$-, -CH=CH-,–CH=N- или –NH-,

каждый из Q_5, Q_6 и Q_7 независимо представляет собой C или N;

Q_8 представляет собой C, S, N или C(галоген);

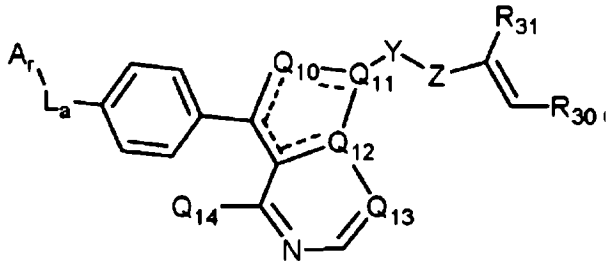
Q_9 представляет собой $–CH_2$-, $-CH_2CH_2$-, $-C(CH_3)_2$-, $-C(галоген)_2CH_2$- или C_4-$_6$циклоалкил, такой как циклопентил, присоединенный к двум несмежным атомам углерода, предпочтительно в положениях 1 и 3;

R_{27} выбран из H, $-CH_3$, $-S(O)_2CH_3$, циклопропила, азетидин-3-ила, оксетан-3-ила и морфолин-4-ила;

Z представляет собой CR_{28} или N; и

R_{28} выбран из H, F, CI, C_{1-2}алкила, $-CH_2CH_2OH$, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-N(CH_3)_2$, -OH, C_{1-2}алкокси и $-OCH_2CH_2OH$;

или ингибитор BTK отвечает общей формуле (4)



(4)

где

сплошная/пунктирная линия обозначает одинарную или двойную связь;

каждый из Q_{10}, Q_{11}, Q_{12} и Q_{13} независимо представляет собой N или NH в зависимости от валентности или C или CH в зависимости от валентности, где по меньшей мере один из Q_{10}, Q_{11}, Q_{12} и Q_{13} представляет собой N или NH и по меньшей мере один представляет собой C или CH;

Q_{14} представляет собой NH_2 или CH_3;

L_a представляет собой CH_2, O, NH или S;

A_r представляет собой содержащий заместители или не содержащий заместителей арил или содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероарил;

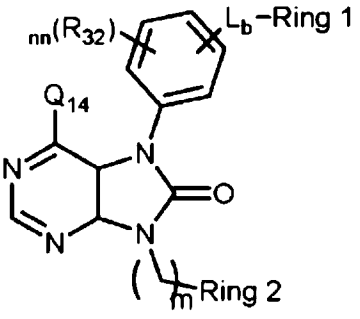
Y представляет собой необязательно содержащую заместители группу, выбранную из группы, состоящей из алкила, гетероалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила;

Z представляет собой C(=O), OC(=O), $NR_{29}C(=O)$, C(=S), $S(=O)_x$, $OS(=O)_x$ или $NR_{29}S(=O)_x$, где x равно 1 или 2;

R_{29} представляет собой H или $(C_{1\text{-}6})$алкил; и

каждый из R_{30} и R_{31} независимо представляет собой H; или R_{30} и R_{31} вместе образуют связь;

или ингибитор BTK отвечает общей формуле (5)



(5),

где

Q_{15} представляет собой NH_2 или CH_3;

L_b представляет собой O, S, SO, SO_2, NH, C(O), CH_2O, OCH_2, CH_2 или CH(OH);

R_{32} представляет собой галоген, $C_{1\text{-}4}$ алкил, $C_{1\text{-}4}$ алкокси, $C_{1\text{-}4}$ галогеналкил или $C_{1\text{-}4}$ галогеналкокси;

Кольцо 1 представляет собой 4 - 7-членную циклическую группу, которая может содержать от одного до пяти заместителей, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из галогена, C_{1-4} алкила, C_{1-4} алкокси, нитрила, C_{1-4} галогеналкила и C_{1-4} галогеналкокси, причем, когда два или более заместителей присутствуют в Кольце 1, эти заместители могут образовывать 4 - 7-членную циклическую группу вместе с атомами в Кольце 1, с которыми связаны эти заместители;

Кольцо 2 представляет собой 4 - 7-членный насыщенный гетероцикл, который может содержать в качестве заместителей от одного до трех KR_{33};

K представляет собой связь, C_{1-4} алкилен, C(O), $C(O)CH_2$, $CH_2C(O)$, C(O)O или SO_2;

R_{33} представляет собой C_{1-4} алкил, C_{2-4} алкенил или C_{2-4} алкинил, каждый из которых может содержать от одного до пяти заместителей, каждый из которых независимо выбран из группы, состоящей из $NR_{34}R_{35}$, галогена, $CONR_{36}R_{37}$, CO_2R_{38} и OR_{39};

каждый из R_{34} и R_{35} независимо представляет собой H, или C_{1-4} алкильную группу, которая может содержать заместители OR_{40} или $CONR_{41}R_{42}$; R_{34} и $_{35}$ вместе с атомом азота, с которым они связаны, могут образовывать 4 -7-членный азотистый насыщенный гетероцикл, который может содержать в качестве заместителей оксогруппу или OH;

R_{36} и R_{37} каждый независимо представляет собой H, C_{1-4} алкил или фенил;

каждый из R_{38}, R_{40}, R_{41} и R_{42} независимо представляет собой H или C_{1-4} алкил;

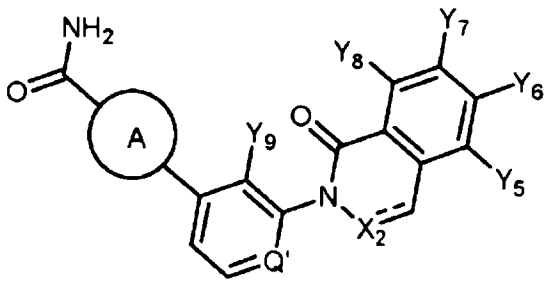
R_{39} представляет собой H, C_{1-4} алкил, фенил или бензотриазолильную группу;

nn представляет собой целое число от 0 до 4;

m представляет собой целое число от 0 до 2; и

когда n равно двум или более, любой R_{32} могут быть одинаковы друг с другом или могут отличаться друг от друга;

или ингибитор BTK отвечает общей формуле (6)



(6)

где

сплошная/пунктирная линия представляет собой либо одинарную, либо двойную связь;

Кольцо A представляет собой 5-членный гетероарил или 5, 6-членный бициклический гетероарил, где $CONH_2$ присоединен к указанному 5-членному гетероарилу, каждый из которых необязательно содержит в качестве заместителя один или более A';

A' представляет собой $–NHR_{40}$ или R_{44};

R_{40} представляет собой H, $-R_{41}$, $-R_{41}-R_{42}-R_{43}$, $-R_{41}-R_{43}$ или $R_{42}-R_{43}$;

R_{41} представляет собой арил, гетероарил, циклоалкил, гетероциклоалкил или гетероарил, конденсированный с гетероциклоалкилом, каждый из которых необязательно содержит в качестве заместителей один или более из $R^{1'}$ или $R^{1''}$;

каждый $R^{1'}$ независимо представляет собой галоген, нитро, циано, низший алкилсульфонамидо, $S(O)_2$ или оксо;

каждый $R^{1''}$ независимо представляет собой низший алкил, циклоалкил, гетероциклоалкил, низший алкокси, амино или амидо, каждый из которых необязательно содержит в качестве заместителей один или более $R^{1'''}$;

каждый $R^{1'''}$ независимо представляет собой гидрокси, галоген, амино, алкиламино, диалкиламино или гетероциклоалкил;

R_{42} представляет собой $-C(=O)$, $-C(=O)O$, $-C(=O)NR^{2'}$, $-NHC(=O)O$, $-C(R^{2'})_2$, O, $-C(=NH)NR^{2}>$ или $-S(=O)_2$;

каждый $R^{2'}$ независимо представляет собой H или низший алкил;

R_{43} представляет собой H или R_{44};

R_{44} представляет собой низший алкил, низший галогеналкил, низший алкокси, амино, низший алкиламино, низший диалкиламино, арил, арилалкил, алкиларил, гетероарил, алкилгетероарил, гетероарилалкил, циклоалкил, алкилциклоалкил, циклоалкилалкил, гетероциклоалкил, алкилгетероциклоалкил, гетероциклоалкилалкил, бициклический циклоалкил, бициклический гетероциклоалкил, спироциклоалкил или спирогетероциклоалкил, каждый из которых необязательно содержит в качестве заместителей один или более низших алкилов, галогенов, низших алкиламино, низших

диалкиламино, гидрокси, гидрокси(низших алкилов), низших алкокси, галогенов, нитро, амино, амидо, ацилов, циано, оксо, гуанидино, гидроксиламино, карбокси, карбамоилов, карбаматов, галоген(низших алкокси) или галоген(низших алкилов), где две низшие алкильные группы вместе могут образовывать кольцо;

Q' представляет собой CH или N;

X_2 представляет собой CH, N или N(X_3);

X_3 представляет собой низший алкил;

Y_5 представляет собой H, галоген или низший алкил;

Y_6 представляет собой Y_{6a}, Y_{6b}, Y_{6c} или Y_{6d};

Y_{6a} представляет собой H или галоген;

Y_{6b} представляет собой низший алкил, необязательно содержащий один или более заместителей, выбранных из группы, состоящей из низшего галогеналкила, галогена, гидрокси, амино, циано и низшего алкокси;

Y_{6c} представляет собой низший циклоалкил, необязательно содержащий один или более заместителей, выбранных из группы, состоящей из низшего алкила, низшего галогеналкила, галогена, гидрокси, амино, циано и низшего алкокси;

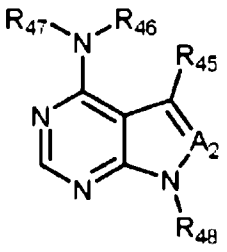
Y_{6d} представляет собой амино, необязательно содержащий в качестве заместителей один или более низших алкилов, алкокси(низших алкилов) или гидрокси(низших алкилов);

Y_7 представляет собой H, галоген или низший алкил;

Y_8 представляет собой H, галоген, низший алкил, низший галогеналкил, низший алкокси или низший гидроксиалкил; и

Y_9 представляет собой H, низший алкил или низший гидроксиалкил;

или ингибитор BTK отвечает общей формуле (7)



(7),

где

A_2 независимо выбран из N или CR_{49};

R_{45} представляет собой H, L_{2a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей алкил), L_{2a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей циклоалкил), L_{2a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей алкенил), L_{2a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей циклоалкенил), L_{2a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероцикл), L_{2a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероарил) или L_{2a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей арил), где L_{2a} представляет собой связь, O, S, S(=O), $S(=O)_2$, C(=O), содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{1-6} алкилен или содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{2-6} алкенилен);

R_{46} и R_{47} независимо выбраны из H, низшего алкила и содержащего заместители низшего алкила;

R_{48} представляет собой L_{3a}-X_a-L_{4a}-G, где

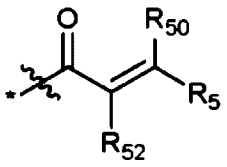
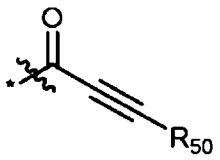
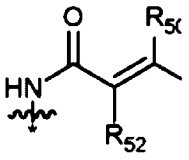
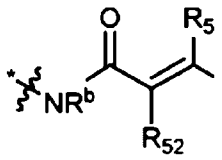
L_{3a} необязателен, и когда присутствует, он представляет собой связь или необязательно содержащую заместители группу, выбранную из алкилена, гетероалкилена, арилена, гетероарилена, алкиларилена, алкилгетероарилена или алкилгетероциклоалкилена;

X_a необязателен, и когда присутствует, он представляет собой связь, O, C(=O), S, S(=O), $S(=O)_2$, NH, NR_{53}, NHC(O), C(O)NH, $NR_{53}C(O)$, $C(O)NR_{53}$, $S(=O)_2NH$, $NHS(=O)_2$, $S(=O)_2NR_{53}$, $NR_{53}S(=O)_2$, OC(O)NH, NHC(O)O, $OC(O)NR_{53}$, $NR_{53}C(O)O$, C(H)=NO, ON=CH, $NR_{54}C(O)NR_{54}$, гетероарилен, арилен, $NR_{54}C(=NR_{55})NR_{54}$, $NR_{54}C(=NR_{55})$, $C(=NR_{55})NR_{54}$, $OC(=NR_{55})$ или $C(=NR_{55})O$;

L_{4a} необязателен, и когда присутствует, он представляет собой связь, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкилен, содержащий заместители или не содержащий заместителей циклоалкилен, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкенилен, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкинилен, содержащий заместители или не содержащий заместителей арилен, содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероарилен, содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероциклен;

или L_{3a}, X_a и L_{4a} вместе образуют азотсодержащее гетероциклическое кольцо или необязательно содержащую заместители группу, выбранную из алкила, гетероалкила, арила, гетероарила, алкиларила, алкилгетероарила или алкилгетероциклоалкила;

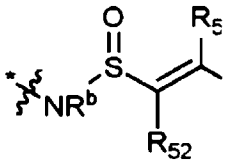
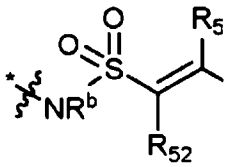
G выбран из группы, состоящей из

,

,

,

и

где R^b представляет собой H, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей циклоалкил; и любой из R_{51} и R_{52} представляет собой H;

R_{50} представляет собой H, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{1-4} алкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{1-4} гетероалкил, C_{1-8} алкиламиноалкил, C_{1-8} гидроксиалкиламиноалкил, C_{1-8} алкоксиалкиламиноалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{3-6} циклоалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{1-8} алкил-C_{3-6} циклоалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей арил, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{2-8} гетероциклоалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероарил, C_{1-4} алкил(арил), C_{1-4} алкил(гетероарил), C_{1-8} алкиловые эфиры, C_{1-8} алкиламиды или C_{1-4} алкил(C_{2-8} гетероциклоалкил);

или R_{50} и R_{52} представляют собой H;

R_{51} представляет собой H, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{1-4} алкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{1-4} гетероалкил, C_{1-8} алкиламиноалкил, C_{1-8} гидроксиалкиламиноалкил, C_{1-8} алкоксиалкиламиноалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{3-6} циклоалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{1-8} алкил-C_{3-6} циклоалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей арил, содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{2-8} гетероциклоалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероарил, C_{1-4} алкил(арил), C_{1-4} алкил(гетероарил), C_{1-8} алкиловые эфиры, C_{1-8} алкиламиды или C_{1-4} алкил(C_{2-8} гетероциклоалкил);

или R_{51} и R_{52} вместе образуют связь;

R_{49} представляет собой H, галоген, -L_{6a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{1-3} алкил), -L_{6a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей C_{2-4} алкенил), -L_{6a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероарил) или -L_{6a}-(содержащий заместители или не содержащий заместителей арил), где L_{6a} представляет собой связь, O, S, S(=O), $S(=O)_2$, NH, C(O), NHC(O)O, OC(O)NH, NHC(O) или C(O)NH;

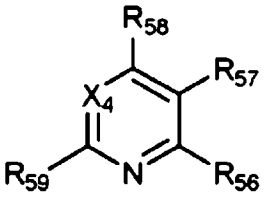
R_{53} выбран из H, содержащего заместители или не содержащего заместителей низшего алкила и содержащего заместители или не содержащего заместителей низшего циклоалкила;

каждый R_{54} независимо представляет собой H, содержащий заместители или не содержащий заместителей низший алкил или содержащий заместители или не содержащий заместителей низший циклоалкил; или две группы R_{54} вместе могут образовывать 5-, 6-, 7- или 8-членное гетероциклическое кольцо; или

R_{54} и R_{55} вместе могут образовывать 5-, 6-, 7- или 8-членное гетероциклическое кольцо; или

R_{55} выбран из H, $S(=O)_2R_{56}$, $S(=O)_2NH_2$, $C(O)R_{56}$, CN, NO_2, гетероарила или гетероалкила;

или ингибитор BTK отвечает общей формуле (8)



(8),

где

X_4 представляет собой CH или N,

R_{56} представляет собой NH_2, $CONH_2$ или H,

R_{57} представляет собой Hal, Ar_{1b} или Het_{1b},

R_{58} представляет собой $NR_{60}[C(R_{60})_2]_nHet_{2b}$, $NR_{60}[C(R_{60})_2]_{nnn}Cyc$, Het_{2b}, $O[C(R_{60})_2]_{nnn}Ar_{2b}$, $NR_{60}[C(R_{60})_2]_{nnn}Ar_{2b}$, $O[C(R_{60})_2]_{nnn}Het_{2b}$, $NR_{60}(CH_2)_pNR_{60}R_{61}$, $O(CH_2)_pNR_{60}R_{61}$ или $NR_{60}(CH_2)_pCR_{62}R_{63}NR_{60}R_{61}$,

R_{59} представляет собой H, CH_3 или NH_2,

R_{60} представляет собой H или алкил, содержащий 1, 2, 3 или 4 атома C,

R_{61} представляет собой $N(R_{60})_2CH_2CH=CHCONH$, $Het_{3b}CH_2CH=CHCONH$, $CH_2=CHCONH(CH_2)_{nnn}$, $Het_{4b}(CH_2)_{nnn}COHet_{3b}$-диил-$CH_2CH=CHCONH$, $HC\equiv CCO$, $CH_3C\equiv CCO$, $CH_2=CH\text{-}CO$, $CH_2=C(CH_3)CONH$, $CH_3CH=CHCONH(CH_2)_{nnn}$, $N\equiv CCR_{52}R_{53}CONH(CH_2)_{nnn}$, $Het_{4b}NH(CH_2)_pCOHet_{3b}$-диил-$CH_2CH=CHCONH$, $Het_{4b}(CH_2)_pCONH(CH_2CH_2O)_p(CH_2)_pCOHet_{3b}$-диил-$CH_2CH=CHCONH$, $CH_2=CHSO_2$, $A_bCH=CHCO$, $CH_3CH=CHCO$, $Het_{4b}(CH_2)_pCONH(CH_2)_pHet_{3b}$-диил-$CH_2CH=CHCONH$, $Ar_{3b}CH=CHSO_2$, $CH_2=CHSO_2NH$ или $N(R_{60})CH_2CH=CHCO$,

R_{62}, R_{63} вместе представляют собой алкилен, содержащий 2, 3, 4 или 5 атомов C,

Ar_{1b} представляет собой фенил или нафтил, каждый из которых не содержит заместителей или содержит один, два или три заместителя, выбранных из R_{61}, Hal, $(CH_2)_{nnn}NH_2$, $CONHAr_{3b}$, $(CH_2)_{nnn}NHCOA_b$, $O(CH_2)_{nnn}Ar_{3b}$, $OCyc_b$, A_b, $COHet_{3b}$, OA_b и/или $OHet_{3b}(CH_2)$,

Ar_{2b} представляет собой фенил, нафтил или пиридил, каждый из которых не содержит заместителей или содержит один, два или три заместителя, выбранных из R_{61}, Hal, OAr_{3b}, $(CH_2)_{nnn}NH_2$, $(CH_2)_{nnn}NHCOA_b$ и/или Het_{3b},

Ar_{3b} представляет собой фенил, который не содержит заместителей или содержит один, два или три заместителя, выбранных из OH, OA_b, Hal, CN и/или A_b,

Het_{1b} обозначает моно- или бициклический насыщенный, ненасыщенный или ароматический гетероцикл, содержащий от 1 до 4 атомов N, O и/или S, который может не содержать заместителей или содержать один, два или три заместителя, выбранных из R_{61}, $O(CH_2)_{nnn}Ar_{3b}$ и/или $(CH_2)_{nnn}Ar_{3b}$,

Het_{2b} представляет собой моно- или бициклический насыщенный гетероцикл, содержащий от 1 до 4 атомов N, O и/или S, который может не содержать заместителей или содержать один, два или три заместителя, выбранных из R_{61}, Het_{3b}, Cyc_bSO_2, OH, Hal, COOH, OA_b, COA_b, $COHet_{3b}$, Cyc_bCO, SO_2 и/или =O,

Het_{3b} представляет собой моноциклический ненасыщенный, насыщенный или ароматический гетероцикл, содержащий от 1 до 4 атомов N, O и/или S, который может не содержать заместителей или содержать один, два или три заместителя, выбранных из Hal, A и/или =O,

Het_{4b} представляет собой би- или трициклический ненасыщенный, насыщенный или ароматический гетероцикл, содержащий от 1 до 4 атомов N, O и/или S, который может не содержать заместителей или содержать один, два, три или четыре заместителя, выбранных из A_b, NO_2, Hal и/или =O,

Cyc_b представляет собой циклический алкил, содержащий 3, 4, 5 или 6 атомов C, который не содержит заместителей, содержит один заместитель или два заместителя, выбранных из R_{61} и/или OH, и который может содержать двойную связь,

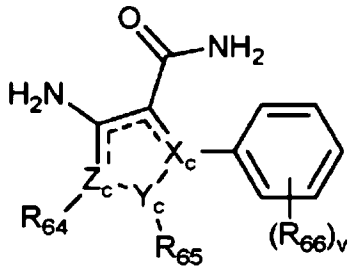
A_b представляет собой $C_{1\text{-}10}$алкил, в котором 1 - 7 атомы H могут быть заменены на F и/или CI и/или в котором одна или две несмежные группы CH_2 и/или CH могут быть заменены на O, NH и/или на N,

Hal представляет собой F, CI, Br или I,

nnn представляет собой 0, 1 , 2, 3 или 4,

p представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6,

или ингибитор BTK отвечает общей формуле (9)



(9),

где

сплошная/пунктирная линия представляет собой либо одинарную, либо двойную связь;

X_c—Y_c—Z_c представляет собой N—C—C и R_{65} присутствует, или C—N—N и R_{65} отсутствует;

R_{64} представляет собой 3 - 8-членное N-содержащее кольцо, где N не содержит заместителей или содержит в качестве заместителя R_{67};

R_{65} представляет собой H или низший алкил, в частности метил, этил, пропил или бутил; или

R_{64} и R_{65} вместе с атомами, к которым они присоединены, образуют 4-8-членное кольцо, предпочтительно 5-6-членное кольцо, выбранное из циклоалкильного,

насыщенного или ненасыщенного гетероциклического, арильного и гетероарильного колец, не содержащих заместителей или содержащих по меньшей мере один заместитель L_c-R_{67};

R_{66} в каждом случае независимо представляет собой галоген, алкил, S-алкил, CN или OR_{68};

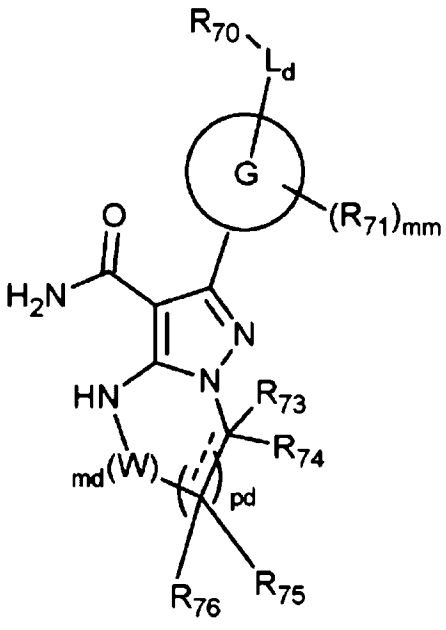
v представляет собой 1, 2, 3 или 4, предпочтительно 1 или 2;

L_c представляет собой связь, NH, гетероалкил или гетероциклил;

R_{67} представляет собой COR_{69}, CO_2R_{69} или SO_2R_{69}, где R_{69} представляет собой содержащий заместители или не содержащий заместителей алкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкенил, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкинил;

R_{68} представляет собой H или не содержащий заместителей или содержащий заместители гетероалкил, алкил, циклоалкил, насыщенный или ненасыщенный гетероциклил, арил или гетероарил,

или ингибитор BTK отвечает общей формуле (10)



(10)

где

Кольцо G представляет собой 5- или 6-членное ароматическое кольцо, содержащее 0 - 3 гетероатома N, S или O;

каждый W независимо представляет собой -(CH_2)- или -C(O)-;

L_d представляет собой связь, CH_2, NR_{81}, O или S;

сплошная/пунктирная линия представляет собой либо одинарную, либо двойную связь, и когда она представляет собой двойную связь, R_{74} и R_{76} отсутствуют;

md представляет собой 0 или целое число от 1 до 4;

mm представляет собой 0 или целое число от 1 до 4, причем когда mm больше 1, тогда каждый R_{71} может быть различным;

pd представляет собой 0 или целое число от 1 до 2, причем когда pd равен 0, тогда md не равен нулю, и когда pd больше 1, тогда каждый R_{75} и каждый R_{76} могут быть различными;

каждый из R_{70}, R_{73}, R_{74}, R_{75} и R_{76} независимо представляет собой H, галоген, гетероалкил, алкил, алкенил, циклоалкил, арил, насыщенный или ненасыщенный гетероциклил, гетероарил, алкинил, -CN, $-NR_{82}R_{83}$, OR_{82}, $-COR_{82}$, $-CO_2R_{82}$, $-CONR_{82}R_{83}$, $-C(=NR_{82})NR_{83}R_{84}$, $-NR_{82}COR_{83}$, $-NR_{82}CONR_{83}R_{84}$, $-NR_{82}CO_2R_{83}$, $-SO_2R_{82}$, $-NR_{82}SO_2NR_{83}R_{84}$ или $–NR_{82}SO_2R_{83}$, где указанные алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, гетероарил, арил и насыщенный или ненасыщенный гетероциклил необязательно содержат по меньшей мере один заместитель R_{85}, причем (R_{83} и R_{84}), или (R_{83} и R_{85}), или (R_{85} и R_{86}), или (R_{85} и R_{85}, когда pd равен 2), вместе с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать кольцо, выбранное из циклоалкильного, насыщенного или ненасыщенного гетероциклического, арильного и гетероарильного колец, необязательно содержащих по меньшей мере один заместитель R_{85};

R_{71} представляет собой галоген, алкил, -S-алкил, -CN, $-NR_{82}R_{83}$, $-OR_{82}$, $-COR_{82}$, $-CO_2R_{82}$, $-CONR_{82}R_{83}$, $-C(=NR_{82})NR_{83}R_{84}$, $-NR_{82}COR_{83}$, $-NR_{82}CONR_{83}R_{84}$, $-NR_{82}CO_2R_{83}$, $-SO_2R_{82}$, $-NR_{82}SO_2NR_{83}R_{84}$ или $–NR_{82}SO_2R_{83}$;

R_{81} представляет собой H или низший алкил;

каждый из R_{82}, R_{83} и R_{84} независимо представляет собой H, гетероалкил, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, насыщенный или ненасыщенный гетероциклил, арил или гетероарил; где каждый из (R_{82} и R_{83}) и/или (R_{83} и R_{84}) вместе с атомом(-ами), к которому(-ым) они присоединены, может образовывать кольцо, выбранное из циклоалкильного, насыщенного или ненасыщенного гетероциклического, арильного и гетероарильного колец, необязательно содержащих по меньшей мере один заместитель R_{85};

R_{85} представляет собой галоген, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкенил,

содержащий заместители или не содержащий заместителей алкинил, содержащий заместители или не содержащий заместителей циклоалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей арил, содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероарил, содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероциклил, оксо, -CN, -OR_{86}, -$NR_{86}R_{87}$, -COR_{86}, -CO_2R_{86}, -$CONR_{86}R_{87}$, -$C(=NR_{86})NR_{87}R_{88}$, -$NR_{86}COR_{87}$, -$NR_{86}CONR_{86}R_{87}$, -$NR_{86}CO_2R_{87}$, -SO_2R_{86}, -SO_2-арил, -$NR_{86}SO_2NR_{87}R_{88}$ или –$NR_{86}SO_2R_{87}$, где R_{86}, R_{87} и R_{88} независимо представляют собой водород, галоген, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкенил, содержащий заместители или не содержащий заместителей алкинил, содержащий заместители или не содержащий заместителей циклоалкил, содержащий заместители или не содержащий заместителей арил, содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероарил, содержащий заместители или не содержащий заместителей гетероциклил, где (R_{86} и R_{87}) и/или (R_{87} и R_{88}) вместе с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать кольцо, выбранное из циклоалкильного, насыщенного или ненасыщенного гетероциклического, арильного и гетероарильного колец,

или их стереоизомеры, таутомеры или фармацевтически приемлемые соли.

В предпочтительных вариантах реализации ингибитор BTK отвечает общей формуле (1), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительных вариантах реализации ингибитор BTK отвечает общей формуле (2), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительных вариантах реализации ингибитор BTK отвечает общей формуле (3), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительных вариантах реализации ингибитор BTK отвечает общей формуле (4), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль, более предпочтительно ибрутиниб.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения ингибитор BTK отвечает общей формуле (5), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения ингибитор BTK отвечает общей формуле (6), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения ингибитор BTK отвечает общей формуле (7), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения ингибитор BTK отвечает общей формуле (8), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения ингибитор BTK отвечает общей формуле (9), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения ингибитор BTK отвечает общей формуле (10), при этом изменяющиеся группы соответствуют описанным выше, или представляет собой ее стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль.

Из ингибиторов BTK можно получить широкий спектр фармацевтически приемлемых солей, включая: соли присоединения кислоты, полученные путем проведения реакции, например, ибрутиниба с органической кислотой, которая включает алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксилалкановые кислоты, алкандиовые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты, аминокислоты и т.д., и включает, например, уксусную кислоту, трифторуксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, салициловую кислоту и тому подобные кислоты; соли присоединения кислоты, полученные путем проведения реакции, например, ибрутиниба с неорганической кислотой, которая включает хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту, иодистоводородную кислоту, фтористоводородную кислоту, фосфорную кислоту и тому подобные кислоты. Предпочтительна соль присоединения HCl ингибитора BTK.

Предпочтительными галогенами являются фтор, хлор и бром, более предпочтительно фтор и бром, наиболее предпочтительно фтор. Компонент арильной группы содержащей заместители или не содержащей заместителей арильной группы предпочтительно представляет собой арильную группу, содержащую от 6 до 14 атомов углерода, и конкретные примеры включают фенил, нафтил и инденил. Компонент гетероциклического кольца содержащего заместители или не содержащего заместителей гетероциклического кольца предпочтительно представляет собой алициклическую гетероциклическую группу или ароматическую гетероциклическую группу. Алициклическая гетероциклическая группа включает, например, 3 - 8-членную гетероциклическую группу, содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из атома азота, атома серы и атома кислорода. Конкретные примеры включают пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил и тиоморфолинил. Ароматическая гетероциклическая группа содержит, например, 5- или 6-членную моноциклическую ароматическую гетероциклическую группу, содержащую по меньшей мере один гетероатом, выбранный из атома азота, атома серы и атома кислорода. Конкретные примеры включают имидазолил, пиразолил, тиенил, тиазолил и пиридил. Компонент гетероциклического конденсированного кольца содержащего заместители или не содержащего заместителей гетероциклического конденсированного кольца содержит, например, конденсированную гетероциклическую группу, которая представляет собой бициклическую группу, конденсированную с 3 - 8-членным кольцом, и содержит по меньшей мере один гетероатом, выбранный из атома азота, атома серы и атома кислорода. Конкретные его примеры включают тетрагидроизохинолил, бензотиофенил, бензимидазолил, бензооксазолил, бензотиазолил, индолил, изохинолил и фталимид. Компонент низшей алкильной группы содержащей заместители или не содержащей заместителей низшей алкильной группы может представлять собой любую из линейных, разветвленных и циклических алкильных групп, содержащих от 1 до 3 атомов углерода, и конкретные его примеры включают метильную группу, изопропильную группу и циклопропильную группу. Компонент алкоксигруппы содержащей заместители или не содержащей заместителей алкоксигруппы может представлять собой любую из линейной, разветвленной или циклической алкильной группы, содержащей от 1 до 3 атомов углерода, и его конкретные примеры включают метоксигруппу, этоксигруппу, изопропилоксигруппу и циклопропилоксигруппу. Содержащая заместители или не содержащая заместителей аминогруппа может, в частности, представлять собой любую из аминогрупп, содержащих линейную, разветвленную или циклическую алкильную группу, содержащую от 1 до 3 атомов углерода, и ее конкретные примеры включают аминогруппу, метиламиногруппу и

диметиламиногруппу. Предпочтительно она представляет собой аминогруппу. Компонент алкинильной группы содержащей заместители или не содержащей заместителей алкинильной группы может представлять собой любую линейную или разветвленную группу, содержащую от 2 до 6 атомов углерода, и конкретные примеры таких групп включают этинильную группу, пропаргильную группу, 2-бутинильную группу. Замещенный компонент содержащей заместители или не содержащей заместителей алкинильной группы может представлять собой любой из содержащего заместители или не содержащего заместителей арильного кольца, содержащего заместители или не содержащего заместителей гетероциклического кольца или содержащего заместители или не содержащего заместителей гетероциклического конденсированного кольца, и конкретные его примеры включают арильную группу.

В предпочтительных вариантах реализации ингибитор BTK содержит в качестве заместителя указанной содержащей заместители или не содержащей заместителей арильной группы, содержащего заместители или не содержащего заместителей гетероциклического кольца, содержащего заместители или не содержащего заместителей гетероциклического конденсированного кольца, содержащей заместители или не содержащей заместителей низшей алкильной группы, содержащей заместители или не содержащей заместителей алкоксигруппы или содержащей заместители или не содержащей заместителей аминогруппы, один, или два, или более заместителей любого вида в любом химически возможном положении. Когда указанная выше группа содержит два или более заместителей, соответствующие заместители могут быть одинаковыми или различными, и примеры заместителя включают атом галогена, содержащую заместители или не содержащую заместителей алкильную группу, содержащую заместители или не содержащую заместителей алкоксигруппу, содержащую заместители или не содержащую заместителей аминогруппу, нитрогруппу, цианогруппу, гидроксигруппу, содержащую заместители или не содержащую заместителей алкиламиногруппу, содержащую заместители или не содержащую заместителей карбамоильную группу, карбоксильную группу, формильную группу, ацетильную группу, бензоильную группу и содержащую заместители или не содержащую заместителей ациламиногруппу. Множество конденсированных колец, которое может образоваться путем объединения R_5 и R_1 с образованием насыщенного или ненасыщенного 5-6-членного кольца, содержит, например, гетероциклическую группу, конденсированную с 3-8-членным кольцом, содержащую гетероатомы, такие как атом азота, атом серы и атом кислорода. Конкретные примеры включают оксоизохинолил, оксодигидроизохинолил, оксофталазинил и оксотиенопирролил.

(C_{1-2})алкил означает алкильную группу, содержащую от 1 до 2 атомов углерода, представляющую собой метил или этил, (C_{1-3})алкил означает разветвленную или неразветвленную алкильную группу, содержащую 1 - 3 атома углерода, представляющую собой метил, этил, пропил или изопропил; (C_{1-4})алкил означает разветвленную или неразветвленную алкильную группу, содержащую 1 - 4 атома углерода, представляющую собой метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил, (C_{1-3})алкильные группы являются предпочтительными; (C_{1-5})алкил означает разветвленную или неразветвленную алкильную группу, содержащую 1 - 5 атомов углерода, например, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил, пентил и изопентил, (C_{1-4})алкильные группы являются предпочтительными. (C_{1-6})алкил означает разветвленную или неразветвленную алкильную группу, содержащую 1 - 6 атомов углерода, например, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, трет-бутил, н-пентил и н-гексил. (C_{1-5})алкильные группы являются предпочтительными, (C_{1-4})алкил является наиболее предпочтительным.

(C_{1-2})алкокси означает алкоксигруппу, содержащую 1 - 2 атома углерода, алкильный компонент имеет то же значение, как описано ранее; (C_{1-3})алкокси означает алкоксигруппу, содержащую 1 - 3 атома углерода, алкильный компонент имеет то же значение, как описано ранее; (C_{1-2})алкоксигруппы являются предпочтительными. (C_{1-4})алкокси означает алкоксигруппу, содержащую 1 - 4 атома углерода, причем алкильный компонент имеет такое же значение, как описано ранее. (C_{1-3})алкоксигруппы являются предпочтительными, (C_{1-2})алкоксигруппы являются наиболее предпочтительными.

(C_{2-4})алкенил означает разветвленную или неразветвленную алкенильную группу, содержащую 2 - 4 атома углерода, такую как этенил, 2-пропенил, изобутенил или 2-бутенил. (C_{2-6})алкенил означает разветвленную или неразветвленную алкенильную группу, содержащую 2 - 6 атомов углерода, такую как этенил, 2-бутенил и н-пентенил, причем (C_{2-4})алкенильные группы являются наиболее предпочтительными.

(C_{2-4})алкинил означает разветвленную или неразветвленную алкинильную группу, содержащую 2 - 4 атома углерода, такую как этинил, 2-пропинил или 2-бутинил; (C_{2-6})алкинил означает разветвленную или неразветвленную алкинильную группу, содержащую 2 - 6 атомов углерода, такую как этинил, пропинил, н-бутинил, н-пентинил, изопентинил, изогексинил или н-гексинил. (C_{2-4})алкинильные группы являются предпочтительными.

(C_{3-6})циклоалкил означает циклоалкильную группу, содержащую 3 - 6 атомов углерода, представляющую собой циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил; (C_{3-7})циклоалкил означает циклоалкильную группу, содержащую 3 - 7 атомов углерода, представляющую собой циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил или циклогептил; (C_{2-6})гетероциклоалкил означает гетероциклоалкильную группу, содержащую 2 - 6 атомов углерода, предпочтительно 3 - 5 атомов углерода, и один или два гетероатома, выбранных из N, O и/или S, которая может быть присоединена посредством гетероатома, если это возможно, или атома углерода; предпочтительные гетероатомы представляют собой N или O; также предпочтительны пиперидин, морфолин, пирролидин и пиперазин; причем наиболее предпочтительным (C_{2-6})гетероциклоалкилом является пирролидин; гетероциклоалкильная группа может быть присоединена посредством гетероатома, если это возможно; (C_{3-7})гетероциклоалкил означает гетероциклоалкильную группу, содержащую 3 - 7 атомов углерода, предпочтительно 3 - 5 атомов углерода, и один или два гетероатома, выбранных из N, O и/или S. Предпочтительные гетероатомы представляют собой N или O; предпочтительные (C_{3-7}) гетероциклоалкильные группы представляют собой азетидинил, пирролидинил, пиперидинил, гомопиперидинил или морфолинил; более предпочтительные (C_{3-7})гетероциклоалкильные группы представляют собой пиперидин, морфолин и пирролидин; и гетероциклоалкильная группа может быть присоединена посредством гетероатома, если это возможно;

(C_{3-7})циклоалкокси означает циклоалкильную группу, содержащую 3 - 7 атомов углерода, в том же значении, как описано ранее, присоединенную посредством атома углерода кольца к экзоциклическому атому кислорода;

(C_{6-10})арил означает ароматическую углеводородную группу, содержащую 6 - 10 атомов углерода, такую как фенил, нафтил, тетрагидронафтил или инденил; предпочтительная (C_{6-10})арильная группа представляет собой фенил;

(C_{1-5})гетероарил означает содержащую заместители или не содержащую заместителей ароматическую группу, содержащую 1 - 5 атомов углерода и 1 - 4 гетероатома, выбранных из N, O и/или S; (C_{1-5})гетероарил необязательно может содержать заместители; предпочтительные (C_{1-5})гетероарильные группы представляют собой тетразолил, имидазолил, тиадиазолил, пиридил, пиримидил, триазинил, тиенил или фурил, более предпочтительный (C_{1-5})гетероарил представляет собой пиримидил; (C_{1-9})гетероарил означает содержащую заместители или не содержащую заместителей ароматическую группу, содержащую 1 - 9 атомов углерода и 1 - 4 гетероатома, выбранных из N, O и/или S;

(C_{1-9})гетероарил необязательно может содержать заместители; предпочтительные (C_{1-9})гетероарильные группы представляют собой хинолин, изохинолин и индол;

[(C_{1-4})алкил]амино означает однозамещенную аминогруппу, содержащую в качестве заместителя алкильную группу, содержащую 1 - 4 атома углерода, имеющую такое же значение, как описано выше; предпочтительная [(C_{1-4})алкил]аминогруппа представляет собой метиламино; ди[(C_{1-4})алкил]амино означает двузамещенную аминогруппу, содержащую в качестве заместителей алкильную(-ые) группу(-ы), каждая из которых содержит 1 - 4 атома углерода и имеет такое же значение, как описанное выше; предпочтительная ди[(C_{1-4})алкил]аминогруппа представляет собой диметиламино; (C_{1-3})алкил-C(O)-S-(C_{1-3})алкил означает алкил-карбонил-тио-алкильную группу, причем каждая из алкильных групп содержит от 1 до 3 атомов углерода и имеет то же значение, как описанное выше; (C_{3-7})циклоалкенил означает циклоалкенильную группу, содержащую 3 - 7 атомов углерода, предпочтительно 5 - 7 атомов углерода; предпочтительные (C_{3-7})циклоалкенильные группы представляют собой циклопентенил или циклогексенил; циклогексенильные группы наиболее предпочтительны; (C_{2-6})гетероциклоалкенил означает гетероциклоалкенильную группу, содержащую 2 - 6 атомов углерода, предпочтительно 3 - 5 атомов углерода; и 1 гетероатом, выбранный из N, O и/или S; предпочтительные (C_{2-6})гетероциклоалкенильные группы представляют собой оксициклогексенильную и азациклогексенильную группу. Когда в определении заместителя указано, что «все алкильные группы» указанного заместителя необязательно содержат заместители, это также касается алкильного компонента алкоксигруппы.

В зависимости от образованного кольца или группы, у указанных атомов сохраняется валентность; например, азот, если он присутствует в X или Y, может нести водород. Термин "содержащий заместители" ("замещенный") означает, что один или более атомов водорода на указанном(-ых) атоме/атомах заменены на группы, выбранные из предложенных вариантов, при условии, что нормальная валентность указанного атома в существующих обстоятельствах не будет превышена, и что замена приведет к образованию стабильного соединения. Комбинации заместителей и/или вариабельных групп допустимы только в том случае, если такие комбинации приводят к образованию стабильных соединений. "Стабильное соединение" или "стабильная структура" определены как соединение или структура, которые достаточно устойчивы, чтобы выдержать выделение до пригодной степени чистоты из реакционной смеси, и включение в состав лекарственного продукта, содержащего эффективный активный фармацевтический ингредиент. Термин

"необязательно содержащий заместители" означает необязательное замещение указанными группами, радикалами или компонентами.

Ингибиторы BTK общей формулы (1) и их синтез описаны в EP2824099, WO2013161848, US8450335, US8609679 и WO2013063401. Предпочтительные ингибиторы BTK общей формулы (1) выбраны из группы, состоящей из Соединения 1 из Таблицы 1, представленной ниже, Соединения 2 из Таблицы 1, представленной ниже, и соединений, описанных в Таблицах с 1-1 по 1-27 в EP2824099, более предпочтительно представляют собой Соединение 1 или 2 в Таблице 1, представленной ниже.

Ингибиторы BTK общей формулы (2) и их синтез описаны в WO2013010869, US2017136014 и US2017095471. Предпочтительными ингибиторами BTK общей формулы (2) являются Соединения 3, 4, 5 или 6 из Таблицы 1, представленной ниже, и соединения, описанные начиная со строки 9 стр. 9 и до строки 10 стр. 11 в WO2013010869, предпочтительно Соединения 3, 4 (акалабрутиниб), 5 или 6 из Таблицы 1.

Ингибиторы BTK общей формулы (3) и их синтез описаны в WO2013067260. Предпочтительные ингибиторы BTK общей формулы (3) содержат R_{26}, как указан для R^7 на странице 24 WO2013067260. Предпочтительными ингибиторами BTK общей формулы (3) являются Соединение 7 из Таблицы 1, представленной ниже, и соединения, описанные в Таблицах 1 и 2 из WO2013067260, предпочтительно Соединение 4 из Таблицы 1, представленной ниже.

Ингибиторы BTK общей формулы (4) и их синтез описаны в US2015352116. Предпочтительными ингибиторами BTK общей формулы (4) являются Соединение 8 из Таблицы 1, представленной ниже, (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он, 1-[(3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он, (S)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он, предпочтительно Соединение 8 из Таблицы 1, представленной ниже. Соединение 8 представляет собой ибрутиниб.

Ингибиторы BTK общей формулы (5) и их синтез описаны в US2015125446, WO2013/081016, WO2011/152351 и US2017136014. Предпочтительными ингибиторами BTK общей формулы (5) являются Соединение 9 из Таблицы 1, представленной ниже, и соединения, описанные в WO2013/081016, WO2011/152351, предпочтительно Соединение 9 из Таблицы 1.

Ингибиторы BTK общей формулы (6) и их синтез описаны в WO2012156334. Предпочтительными ингибиторами BTK общей формулы (6) являются Соединение 10 из Таблицы 1, представленной ниже, и соединения, описанные в пункте 8 формулы изобретения WO2012156334, предпочтительно Соединение 10 из Таблицы 1.

Ингибиторы BTK общей формулы (7) и их синтез описаны в US2016303130, US2017209462, US2016022684, WO2013191965 и WO2017023815. Предпочтительными ингибиторами BTK общей формулы (7) являются Соединения 8 или 11 из Таблицы 1, представленной ниже, (R)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он, 1-[(3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-он, (S)-1-(3-(4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он и соединения, описанные в варианте реализации L, начиная со страницы 43, в WO20131965, предпочтительно Соединения 8 или 11 из Таблицы 1.

Ингибиторы BTK общей формулы (8) и их синтез описаны в WO2012170976. Предпочтительными ингибиторами BTK общей формулы (8) являются Соединение 12 из Таблицы 1, представленной ниже, и соединения, описанные в пункте 9 WO2012170976, предпочтительно Соединение 12 из Таблицы 1, представленной ниже.

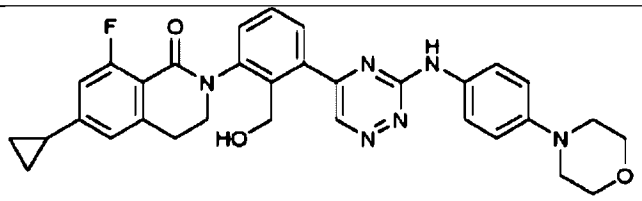
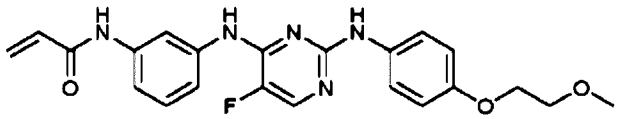
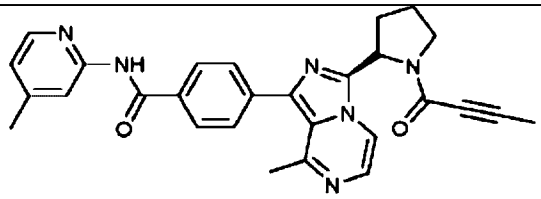
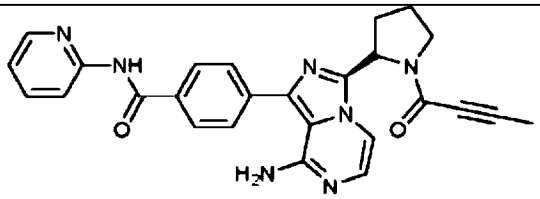
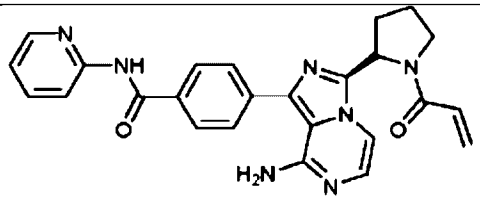
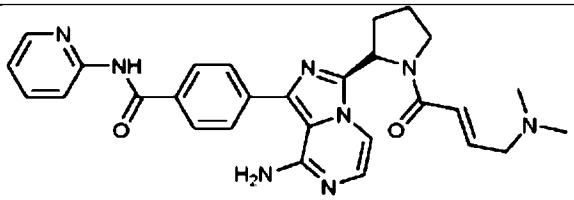
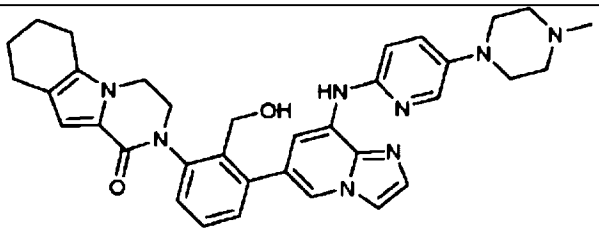
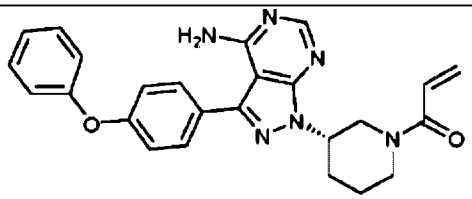
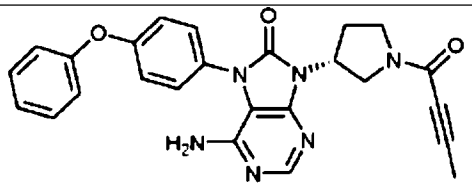
Ингибиторы BTK общей формулы (9) и их синтез описаны в US2017/0136014. Предпочтительным ингибитором BTK общей формулы (9) является Соединение 13 из Таблицы 1, представленной ниже.

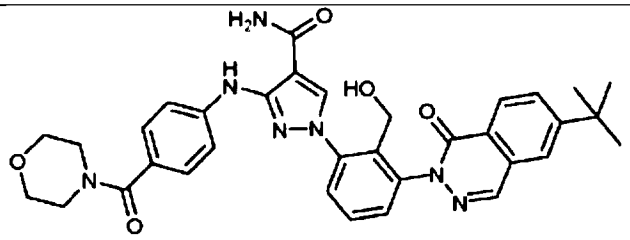
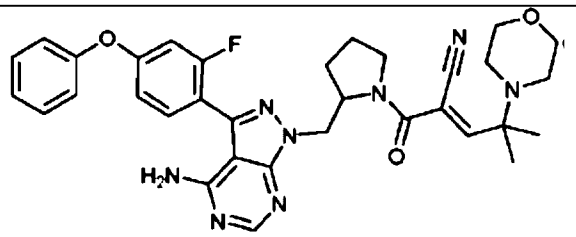
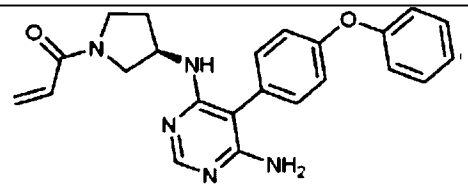
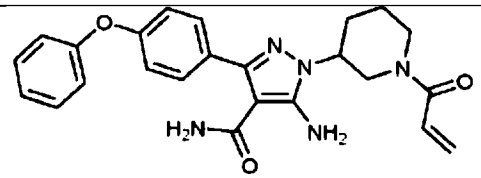
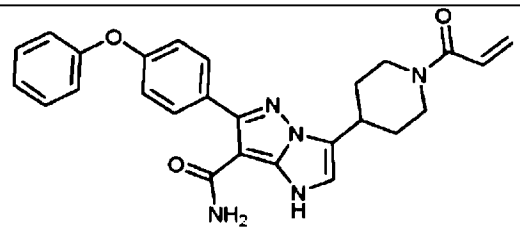
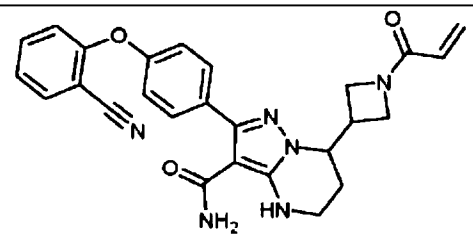
Ингибиторы BTK общей формулы (10) и их синтез описаны в WO2014173289. Предпочтительными ингибиторами BTK общей формулы (10) являются Соединения 14 и 15 из Таблицы 1, представленной ниже, и соединения, описанные в Таблице 3 в параграфе [0643] в WO2014173289, предпочтительно Соединения 14 и 15 из Таблицы 1, представленной ниже.

В предпочтительных вариантах реализации ингибитор BTK выбран из Таблицы 1.

Таблица 1. Предпочтительные ингибиторы BTK для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Номер соединения	**Структура**	**Источник**

1		WO2013161848
2		WO2013063401
3		WO2013010869
4		US2017136014
5		US2017136014
6		US2017136014
7		WO2013067260
8		US2015352116
9		US2015125446

10		WO2012156334
11		WO2013191965
12		WO2012170976
13		US2017/0136014
14		WO2014173289
15		WO2014173289

В некоторых вариантах реализации ингибитор BTK выбран из ибрутиниба, занабрутиниба (BGB-3111), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101/CC-101 (Avila Therapeutics/Celgene Corporation), AVL-263/CC-263 (Avila Therapeutics/Celgene Corporation), AVL-292/CC-292 (Avila Therapeutics/Celgene Corporation), AVL-291/CC-291 (Avila Therapeutics/Celgene Corporation), CNX 774 (Avila Therapeutics), BMS-488516 (Bristol-Myers Squibb), BMS-509744 (Bristol-Myers Squibb), CGI-1746 (CGI Pharma/Gilead Sciences), CGI-560 (CGI Pharma/Gilead Sciences), CTA-056, GDC-0834 (Genentech), HY-11066 (также CTK4I7891, HMS3265G21, HMS3265G22, HMS3265H21, HMS3265H22, 439574-61-5, AG-F-

54930), ONO-4059 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), ONO-WG37 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), PLS-123 (Пекинский университет), RN486 (Hoffmann-La Roche), HM71224 (Hanmi Pharmaceutical Company Limited) или LFM-A13. В предпочтительных вариантах реализации ингибитор BTK представляет собой ибрутиниб, занабрутиниб (BGB-3111) или акалабрутиниб (Соединение 4 из Таблицы 1), из которых наиболее предпочтительным является ибрутиниб.

Ингибитор Bcl-2

Термин «ингибитор Bcl-2», используемый в данной заявке, относится к соединению, которое селективно нацелено на по меньшей мере одну активность Bcl-2, снижает или ингибирует ее. Семейство белков В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2) являются ключевыми регуляторами митохондриального (также называемого «внутренним») пути апоптоза. См. Denial, N. N. and Korsmeyer, S. J. Cell (2004) 116, 205-219. Неправильная регуляция Bcl-2 вовлечена в широкий спектр видов рака, особенно гематологических видов рака, таких как фолликулярная лимфома, диффузная крупноклеточная лимфома и хронический лимфоцитарный лейкоз. Adams, J. M. and Cory, S. Science (1998) 281, 1322-1326. В данной заявке "Bcl-2" относится к белку В-клеточной лимфомы 2 - антиапоптотическому белку, который был вовлечен в многочисленные типы рака, включая хронический лимфоцитарный лейкоз, меланому, карциному молочной железы, предстательной железы и легких. Существуют направленные и селективные ингибиторы Bcl-2, и они включают облимерсен, навитоклакс и венетоклакс. В предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на Bcl-2, или малую молекулу (низкомолекулярное соединение). В более предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 представляет собой малую молекулу. В других более предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на Bcl-2. В предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 не является антителом.

Ингибитор Bcl-2 на основе антисмыслового олигонуклеотида

Антисмысловые олигонуклеотиды, которые нацелены на Bcl-2, могут снижать активность Bcl-2 и, таким образом, выполнять функцию ингибитора Bcl-2. Предпочтительными примерами являются облимерсен и PNT2258. В более предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 на основе антисмыслового олигонуклеотида представляет собой облимерсен. В других более предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 на основе антисмыслового олигонуклеотида

представляет собой PNT2258. В предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 на основе антисмыслового олигонуклеотида инкапсулируют в липосомальную композицию, более предпочтительно в смартиклы (smarticles, умные частицы), как описано в источнике Tolcher et al., 2013, DOI: 10.1007/s00280-013-2361-0.

Антисмысловая цепь ДНК или РНК является некодирующей и комплементарной кодирующей цепи (которая представляет собой матрицу для продукции РНК или белка, соответственно). Антисмысловое лекарственное средство представляет собой короткую последовательность РНК, которая гибридизуется с мРНК и инактивирует ее, предотвращая образование белка. Пролиферация клеток лимфомы человека (с транслокацией t(14;18)) ингибируется антисмысловой РНК, такой как облимерсен, нацеленной на область инициирующего кодона мРНК Bcl-2. Исследования *in vitro* привели к идентификации облимерсена (также известного как генасенс (Genasense)), который комплементарен первым 6 кодонам мРНК Bcl-2. Для антисмысловых олигонуклеотидов выявили положительные результаты в исследованиях I/II фазы для лечения лимфомы. Предпочтительные ингибиторы на основе антисмысловых олигонуклеотидов обсуждаются в Dias and Stein (2002, Eur. J. Pharm. Biopharm.) DOI: 10.1016/S0939-6411(02)00060-7. PNT2258 представляет собой липосомальный состав с ингибитором Bcl-2 на основе антисмыслового олигонуклеотида, который был разработан компанией ProNAi Therapeutics, Inc. (см., например, Ebrahim et al., 2016, DOI: 10.18632/oncotarget.9872 или Tolcher et al, цитируемый выше).

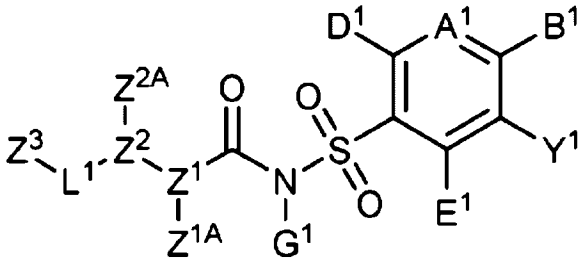
Низкомолекулярный ингибитор Bcl-2

Примерами малых молекул, которые ингибируют Bcl-2, являются ABT-737, навитоклакс (ABT-263) и венетоклакс (ABT-199). В Abbott Laboratories разработали ABT-737 и навитоклакс, которые входят в группу низкомолекулярных ингибиторов BH3-миметиков (SMI), которые нацелены на белки семейства Bcl-2, но не A1 или Mcl-1. Они превосходят ингибиторы Bcl-2 предшествующего уровня техники ввиду их более высокой аффинности к Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-w. Исследования *in vitro* показали, что первичные клетки пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями чувствительны к ABT-737, который является предпочтительным ингибитором Bcl-2. ABT-737 не вызывает апоптоз напрямую; он усиливает действие апоптотических сигналов и вызывает основанный на механизме единственного агента киллинг клеток в линиях мелкоклеточной карциномы легких и лимфомы. В моделях на животных он улучшает выживаемость, вызывает регрессию опухоли и излечивает высокий процент мышей. В доклинических

исследованиях с использованием ксенотрансплантатов пациентов для ABT-737 продемонстрировали эффективность лечения лимфомы и других видов рака крови.

В Abbvie разработали высокоселективный ингибитор венетоклакс (ABT-199), который ингибирует Bcl-2, но не Bcl-xL или Bcl-w. В клинических исследованиях изучали действие венетоклакса - лекарственного средства BH3-миметика, предназначенного для блокирования функции белка Bcl-2, - на пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) (Roberts et al., 2016, doi:10.1056/NEJMoa1513257). Сообщали о хороших ответах, и тромбоцитопения не наблюдалась, что делает венетоклакс высокопредпочтительным ингибитором Bcl-2. Он был одобрен FDA США в апреле 2016 года в качестве терапии второй линии для ХЛЛ, связанной с делецией 17p. В июне 2018 года FDA расширило одобрение для всех пациентов с ХЛЛ или с мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой, с делецией 17p или без нее, все еще в качестве терапии второй линии.

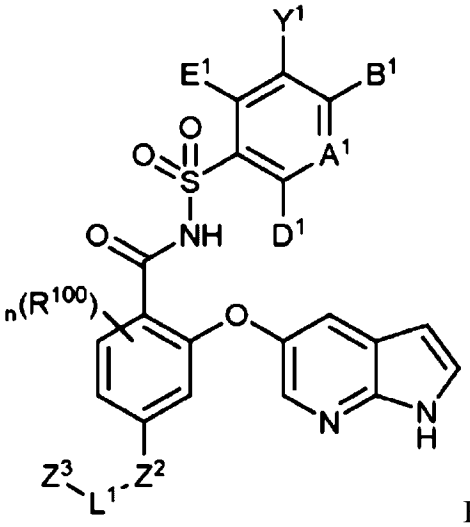
В предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 отвечает общей формуле B1.



B1

где определения изменяющихся групп (представленных буквами с числовыми и/или буквенными надстрочными знаками) приведены в пункте 1 формулы изобретения в WO2011149492. Эти соединения и их синтез известны из WO2011149492. Предпочтительные соединения общей формулы B1 содержат изменяющиеся группы, определения которых приведены в WO2011149492, со строки 19 стр. 76 по строку 26 стр. 85, более предпочтительно, со строки 28 стр. 84 по строку 2 стр. 93.

В предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 общей формулы B1 отвечает общей формуле B2.



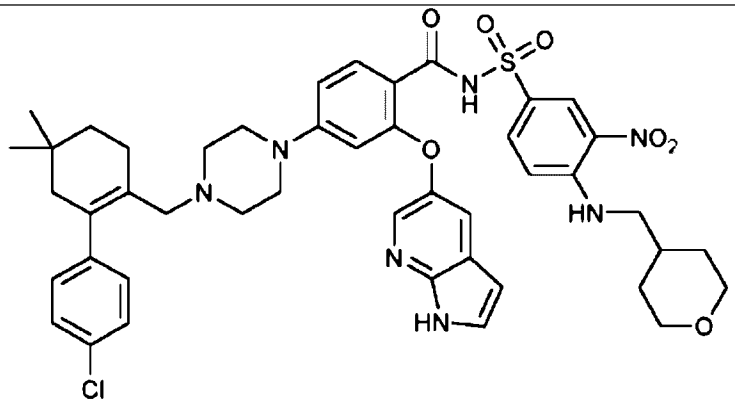
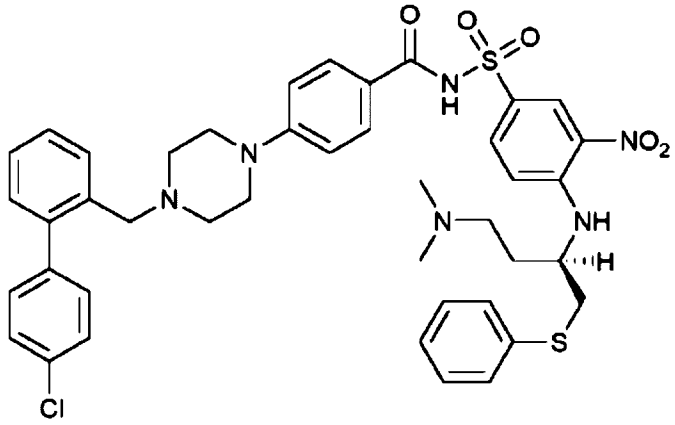
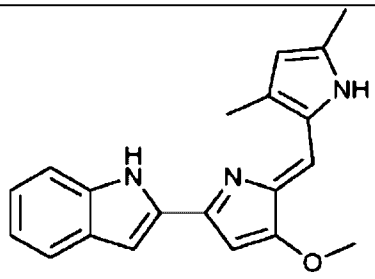
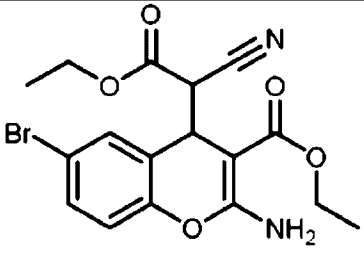
B2

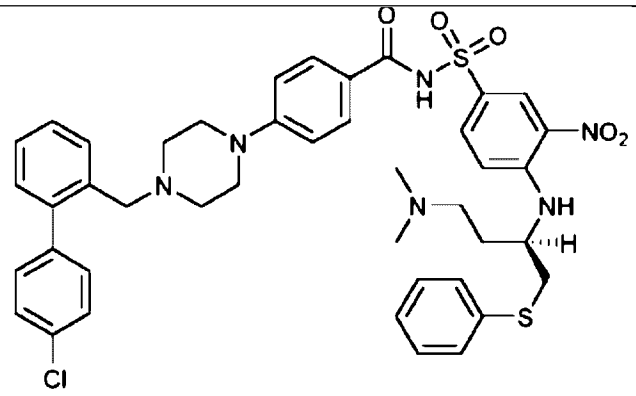
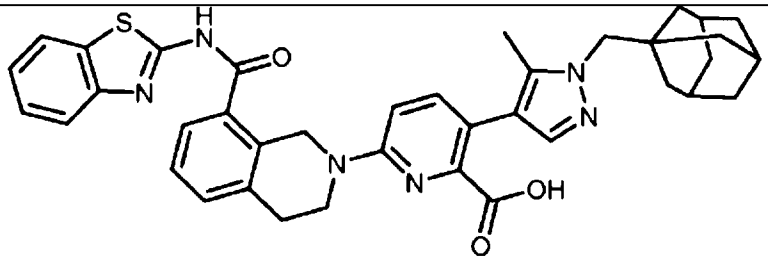
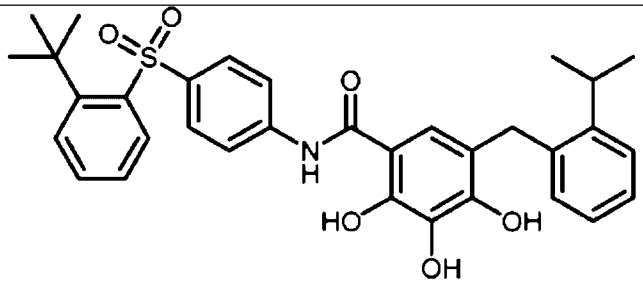
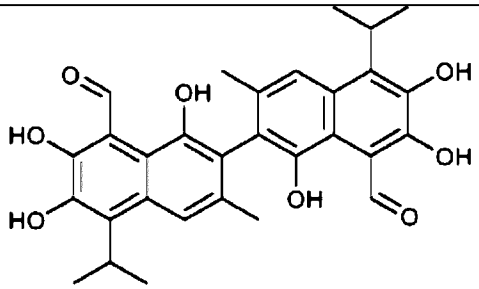
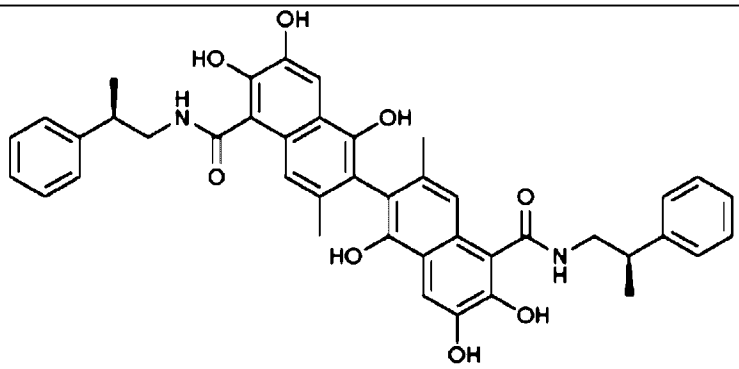
где определения изменяющихся групп (представленных буквами с числовыми и/или буквенными надстрочными знаками) приведены в [0007] EP2435432B1, более предпочтительно, они приведены в пункте 2 формулы изобретения в EP2435432B1. Такие ингибиторы Bcl-2 и их получение известны из EP2435432B1. Предпочтительными соединениями общей формулы B2 являются соединения, предложенные в [0008] EP2435432B1, или их фармацевтически приемлемые соли; более предпочтительными соединениями общей формулы B2 являются соединения, предложенные в [0009] - [0028] EP2435432B1, или их фармацевтически приемлемые соли; наиболее предпочтительными соединениями общей формулы B2 являются 4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-N-({3-нитро-4-[(тетрагидро-2H-пиран-4-илметил)амино]фенил}сульфонил)-2-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-илокси)бензамид или его терапевтически приемлемая соль и 4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-N-[(4-{[(транс-4-гидрокси-4-метилциклогексил)метил]амино}-3-нитрофенил)сульфонил]-2-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-илокси)бензамид или его терапевтически приемлемая соль. В предпочтительных вариантах реализации соединение общей формулы B2 представляет собой 4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-N-({3-нитро-4-[(тетрагидро-2H-пиран-4-илметил)амино]фенил}сульфонил)-2-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-илокси)бензамид или его терапевтически приемлемую соль. В предпочтительных вариантах реализации соединение общей формулы B2 представляет собой 4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-N-[(4-{[(транс-4-гидрокси-4-метилциклогексил)метил]амино}-3-нитрофенил)сульфонил]-2-(1H-пирроло[2,3-b]пиридин-5-илокси)бензамид или его терапевтически приемлемую соль.

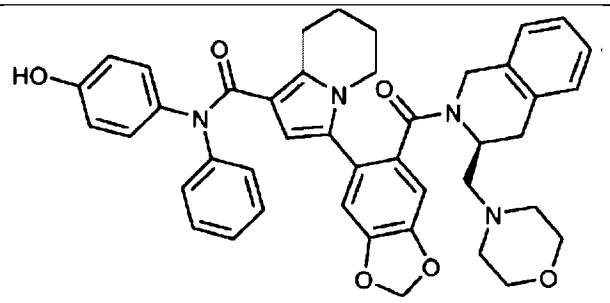
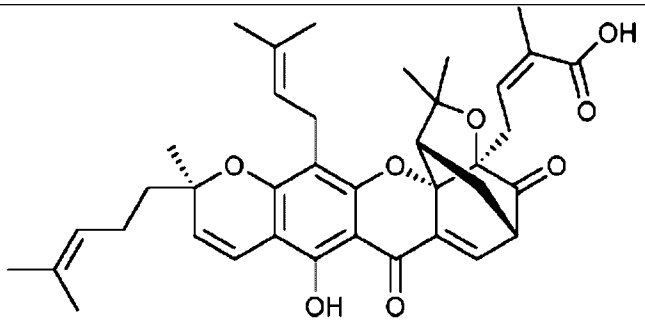
В предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 представляет собой ABT-199 (венетоклакс), ABT-737, ABT-263 (навитоклакс) или PNT2258. В более предпочтительном варианте реализации ингибитор Bcl-2 представляет собой венетоклакс или PNT2258. В других предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 выбран из группы, состоящей из 4-(4-{[2-(4-хлорфенил) -5,5-диметил-1-циклогексен-1-ил]метил}-1-пиперазинил)-N-[(4-{[(2R)-4-(4-морфолинил)-1-(фенилсульфанил)-2-бутанил]амино}-3-[(трифторметил)сульфонил]фенил)сульфонил]-бензамида (навитоклакса или ABT-263); тетрокарцина A; антимицина; госсипола (предпочтительно (-)-госсиполуксусной кислоты, известной как AT101); обатоклакса (предпочтительно обатоклакс представляет собой его мезилат); этил-2-амино-6-бром-4-(1-циано-2-этокси-2-оксоэтил)-4H-хромен-3-карбоксилата (HA 14-1); облимерсена; Bak BH3-пептида; 4-[4-[(4'-хлор[1,T-бифенил]-2-ил)метил]-1-пиперазинил]-A-[[4-[[(1R)-3-(диметиламино)-1-[(фенилтио)метил]пропил]амино]-3-нитрофенил]сульфонил]-бензамида (ABT-737); 2-((*1H*-пирроло[2,3-b]пиридин-5-ил)окси)-4-(4-((4'-хлор-5,5-диметил-3,4,5,6-тетрагидро-[1,T-бифенил]-2-ил)метил)пиперазин-1-ил)-N-((3-нитро-4-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)метил)амино)фенил)сульфонил)бензамида (венетоклакса); и S55746 (BCL201), или их фарамцевматически приемлемых солей. S55746 известен по клиническим исследованиям пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), B-клеточной неходжкинской лимфомой или множественной миеломой (см., например, clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02920697).

Структурная формула венетоклакса представляет собой $C_{45}H_{50}ClN_7O_7S$ (4-(4-{[2-(2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-*2H*-пирроло[2,3-b]пиридин-5-илокси)бензамид)). Венетоклакс связывается с двумя гидрофобными карманами Bcl-2 и создает водородную связь между азотом азаиндола венетоклакса и Asp103 и Arg107 BLC-2. Это электростатическое взаимодействие предотвращает ингибирующее действие Bcl-2 против BAK и BAX, поэтому эти белки могут инициировать внутренний путь апоптоза (Scheffold et al., 2018, выше; Moia et al., 2018, выше). Несмотря на то, что это лекарственное средство селективно связывается с высокой аффинностью с Bcl-2, оно также связывается с проапоптотическими BCL-XL и BCL-W со значительно более низкой аффинностью, в то время как сообщали об отсутствии активности в отношении проапоптотического белка MCL-1 (Scheffold et al., 2018, выше; Moia et al., 2018, выше).

Структуры предпочтительных Bcl-2 представлены ниже. Эти соединения известны в данной области техники.

Номер соединения	Название	Структура
1	Венетоклакс (ABT-199)	
2	Навитоклакс (ABT-263)	
3	Обатоклакс	
4	НА 14-1	

5	ABT-737	
6	A-1331852	
7	TW-37	
8	Госсипол	
9	Сабутоклакс	

10	S55746	
11	Гамбогиновая кислота	

В предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 выбран из Соединений 1 - 11 в Таблице выше, более предпочтительно он выбран из Соединений 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 и 10, еще более предпочтительно он выбран из Соединений 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 10, еще более предпочтительно он выбран из Соединений 1, 2, 3, 4 и 5, наиболее предпочтительно из Соединений 1, 2 и 5.

В предпочтительных вариантах реализации ингибитор Bcl-2 или композицию, содержащую такой ингибитор Bcl-2, вводят в рамках по меньшей мере одного курса продолжительностью 5 дней; еще более предпочтительно такой ингибитор Bcl-2 представляет собой малую молекулу, наиболее предпочтительно венетоклакс.

Фармацевтическая композиция

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно из антитела против CCR7 (или его антигенсвязывающего фрагмента) согласно определению в настоящей заявке, ингибитора BTK согласно определению в настоящей заявке и ингибитора Bcl-2 согласно определению в настоящей заявке, для применения в соответствии с настоящим изобретением. Фармацевтическая композиция предпочтительно содержит по меньшей мере одно из ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7, или фармацевтическое производное или пролекарство этих активных ингредиентов, вместе с фармацевтически приемлемым носителем, адъювантом или основой, для введения субъекту. Указанную фармацевтическую композицию можно применять в способах лечения, описанных ниже в настоящей заявке, путем введения эффективного количества композиции нуждающемуся в

этом субъекту. Термин «субъект» в настоящей заявке используют взаимозаменяемо с термином «реципиент», и он в настоящей заявке относится ко всем животным, классифицируемым как млекопитающие, и включает приматов и людей, но не ограничен ими. Субъект предпочтительно представляет собой человека мужского или женского пола любого возраста или расы. Лечение пациента включает лечение первой линии, или второй линии, или третьей линии.

В настоящей заявке предполагается, что термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и антимикотические агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и т.п., совместимые с фармацевтическим введением (см., например, «Handbook of Pharmaceutical Excipients», Rowe et al., ред. 7ое издание, 2012 г., www.pharmpress.com). Применение таких сред и агентов с фармацевтически активными веществами хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или агент несовместимы с активным соединением, предусмотрено их применение в композициях. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензилхлорид аммония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем из приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Твин™, плюроники™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут входить в состав той же фармацевтической композиции, что и ингибитор BTK и ингибитор Bcl-2, или каждый из активных агентов может входить в состав отдельной фармацевтической композиции. От предпочтительного пути введения будет зависеть предпочтительный состав с каждым из активных агентов. Поскольку парентеральный способ введения является

предпочтительным для антитела, в то время как предпочтительным способом введения по меньшей мере некоторых ингибиторов BTK и Bcl-2 является пероральный путь, антитело предпочтительно включено в состав отдельной фармацевтической композиции, отличной от таковой для ингибиторов. Введение антитела и по меньшей мере одного из ингибиторов BTK и Bcl-2 может быть одновременным или последовательным и может оказывать эффект при любом порядке.

Дополнительные активные соединения также могут быть включены в состав фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Таким образом, в конкретном варианте реализации фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может также содержать более одного активного соединения, которое необходимо при конкретном подлежащем лечению показании, предпочтительно соединения с взаимодополняющими видами активности, которые не оказывают нежелательного влияния друг на друга. Например, может быть желательно дополнительно предоставить химиотерапевтический агент, цитокин, обезболивающий агент или иммуномодулирующий агент, например, иммуносупрессирующий агент или иммуностимулирующий агент. Эффективное количество таких других активных агентов зависит, помимо прочего, от количества антитела в соответствии с настоящим изобретением, присутствующего в фармацевтической композиции, типа заболевания или нарушения, или лечения, и т.д.

В одном варианте реализации антитело в соответствии с настоящим изобретением включают в состав с носителями, которые защищают указанное соединение от быстрой элиминации из организма, такой как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантируемые и микроинкапсулированные системы доставки, например, липосомы. Можно применять биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы получения таких составов очевидны для специалистов в данной области техники. Липосомальные суспензии, включая нацеленные липосомы, также можно применять в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, описанными в US 4,522,811 или US 2011305751, включенных в данную заявку посредством ссылки.

Путь введения антитела (или его фрагмента) в соответствии с настоящим изобретением может быть пероральным, парентеральным, ингаляционным или местным. Термин «парентеральный» в настоящей заявке включает внутривенное,

внутриартериальное, внутрилимфатическое, интраперитонеальное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Предпочтительны внутривенные формы парентерального введения. Под «системным введением» подразумевают пероральное, внутривенное, интраперитонеальное и внутримышечное введение. Разумеется, количество антитела, необходимое для терапевтического или профилактического действия, будет изменяться в зависимости от выбранного антитела, природы и тяжести состояния, которое лечат, и конкретного пациента. Кроме того, антитело можно подходящим образом вводить путем импульсной инфузии, например, с уменьшающимися дозами антитела. Предпочтительно, введение дозы осуществляют путем инъекций, наиболее предпочтительно, внутривенных или подкожных инъекций, отчасти в зависимости от того, будет введение кратковременным или длительным.

Таким образом, в конкретном варианте реализации фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может находиться в форме, подходящей для парентерального введения, такой как стерильные растворы, суспензии или лиофилизированные продукты в подходящей единичной лекарственной форме. Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (при условии их водорастворимости) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Подходящие носители для внутривенного введения включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, кремофор EM (BASF, Парсиппани, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). Во всех случаях композиция должна быть стерильна и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить через шприц. Она должна быть стабильна в условиях приготовления и хранения и предохраняться от загрязнения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащие, например, воду, этанол, фармацевтически приемлемый полиол, такой как глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и подходящие их смеси. Необходимую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и применения поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно добиться с помощью различных антибактериальных и антимикотических агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобных агентов. Во многих случаях предпочтительно добавление в композицию изотонических агентов, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорид натрия.

Пролонгированное всасывание инъецируемых композиций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций можно получить путем включения активного соединения (например, ингибитора BTK, и/или ингибитора Bcl-2, или антитела к CCR7) в необходимом количестве в подходящий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Как правило, дисперсии получают путем добавления активного соединения в стерильную основу, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъецируемых растворов предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофилизацию, в результате которых получают порошок активного ингредиента с любым дополнительным нужным ингредиентом из предварительно профильтрованного через стерильный фильтр их раствора.

В некотором варианте реализации указанную фармацевтическую композицию вводят внутривенным (в/в) или подкожным (п/к) путем. Можно применять подходящие вспомогательные вещества, такие как объемообразующие агенты, буферные вещества или поверхностно-активные вещества. Упомянутые составы получают с помощью стандартных способов получения композиций для парентерального введения, которые хорошо известны в данной области техники и более подробно описаны в различных источниках, включая, например, «Remington: The Science and Practice of Pharmacy» (ред. Allen, L. V., 22ое издание, 2012, www.pharmpress.com).

Особенно предпочтительно получение составов с фармацевтическими композициями, а именно, композициями для парентерального введения, в виде дозированных лекарственных форм для простоты введения и равномерности дозировок. Дозированная лекарственная форма в настоящей заявке относится к отдельным физическим единицам, подходящим для применения в качестве разовых доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения (антитела в соответствии с настоящим изобретением), рассчитанное для получения желательного терапевтического эффекта, вместе с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм в соответствии с настоящим изобретением обусловлена и напрямую зависит от уникальных свойств активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, которого

необходимо добиться, и ограничений, характерных для области техники составления лекарственных форм с таким активным соединением для лечения индивидуумов.

Как правило, вводимое эффективное количество антитела в соответствии с настоящим изобретением будет зависеть от относительной эффективности выбранного соединения, тяжести нарушения, которое лечат, и массы тела пациента. Тем не менее, активные соединения, как правило, вводят один или более раз в сутки, например, ежедневно 1, 2, 3 или 4 раза в сутки, при этом обычные суммарные суточные дозы находятся в диапазоне от 0,001 до 1000 мг/кг массы тела/сутки, предпочтительно, от приблизительно 0,01 до приблизительно 100 мг/кг массы тела/сутки, наиболее предпочтительно, от приблизительно 0,05 до 10 мг/кг массы тела/сутки. В частности, для применения в соответствии с настоящим изобретением, антитела против CCR7 предпочтительно, вводят в дозировке 1 – 1000, 2 – 500, 5 – 200, 10 – 100, 20 – 50 или 25 – 35 мг/кг массы тела/сутки, предпочтительно, вводят дозами каждые 1, 2, 4, 7, 14 или 28 дней.

Помимо введения антител пациенту, в настоящей заявке предположено введение антител путем генной терапии. В WO 96/07321 описано применение генной терапии для получения внутриклеточных антител.

Фармацевтические композиции можно поместить в контейнер, упаковку или диспенсер вместе с инструкциями по введению.

Антитела и фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением можно применять вместе с другими лекарственными средствами, чтобы предоставить комбинированную терапию. Указанные другие лекарственные средства могут входить в состав той же композиции или могут быть предоставлены в виде отдельной композиции для введения одновременно или в другое время.

В настоящей заявке и в формуле изобретения глагол «включать (содержать)» и его спряжения используют в неограничивающем смысле для обозначения того, что объекты, следующие за этим термином, включены, но при этом объекты, конкретно не упомянутые, не исключены. Кроме того, упоминание элемента в единственном числе не исключает возможность присутствия более чем одного элемента, если по контексту явным образом не требуется наличие одного и только одного элемента. Термины в единственном числе, следовательно, обычно означают «по меньшей мере один».

Термин «около» или «приблизительно», когда его используют вместе с численным значением (например, приблизительно 10), предпочтительно означает, что это значение

может представлять собой указанное значение (равное 10), увеличенное или уменьшенное на 5 или 10% относительно указанного значения.

Все цитируемые в настоящей заявке патенты и литературные источники полностью включены в него посредством ссылки.

Настоящее изобретение описано ниже на приведенных примерах, которые не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Экспрессия CCR7 сохранялась у пациентов, которых лечили ингибиторами BTK.

Экспрессия CCR7 незначительно снижалась (ибрутиниб) или оставалась неизменной (акалабрутиниб или занабрутиниб) у пациентов с ХЛЛ, которых лечили ингибиторами BTK. Экспрессию CCR7 и CD20 определяли в первичных клетках ХЛЛ из образцов периферической крови, полученных от пациентов, ранее не получавших лечения (n = 125), пациентов, получавших лечение ибрутинибом (OT, n = 44), пациентов с рецидивирующим/рефрактерным к лечению ибрутинибом заболеванием (RR, n = 16), пациентов, получавших лечение акалабрутинибом (ACALA, n = 5), или пациентов, получавших лечение занабрутинибом (ZANA, n = 4). A) Экспрессию CCR7 (или CD20) на поверхности клеток анализировали с точки зрения относительной средней интенсивности флуоресценции (RMIF, по сравнению с посторонним изотипическим контролем). B) Экспрессию CCR7 (или CD20) на поверхности клеток анализировали с точки зрения доли злокачественных клеток, экспрессирующих указанный рецептор.

Фигура 2. Экспрессия CCR7 в злокачественных клетках высока независимо от настоящего или предшествующего лечения.

A) На графиках показана экспрессия CCR7 у одного типичного пациента с ХЛЛ, ранее не получавшего лечения, одного типичного пациента с ХЛЛ, получавшего ибрутиниб (OT), одного типичного пациента с ХЛЛ, у которого лечение ибрутинибом оказалось неэффективным (RR), и одного типичного пациента с ХЛЛ, получавшего венетоклакс. Экспрессия CCR7 у каждого пациента представлена в виде частотных гистограмм по сравнению с соответствующим посторонним контролем. Области маркера были установлены на основании этих посторонних контролей. На каждой гистограмме показана интенсивность флуоресценции для клеток, меченных антителом против CCR7, конъюгированным с PE (анти--CCR7-PE). Также показана доля CCR7-положительных клеток (в пределах области маркера). B) Изменения экспрессии CCR7 и CD20 у четырех

пациентов с ХЛЛ, которые начали лечение ингибитором BTK ибрутинибом. Для каждого пациента показана экспрессия CCR7 (определенная по RMIF) до (N) и после введения (Y) ибрутиниба.

Фигура 3. Экспрессия CCR7 сохраняется у пациентов, которых лечили ингибиторами Bcl-2.

Экспрессия CCR7 сохраняется практически во всех клетках ХЛЛ от пациентов, которых лечили венетоклаксом. Экспрессию CCR7 и CD20 определяли в клетках ХЛЛ из образцов периферической крови, полученных от пациентов, ранее не получавших лечения (n = 125), или пациентов, которых лечили венетоклаксом (OT, n = 11). A) Экспрессию CCR7 (или CD20) на поверхности клеток анализировали с точки зрения относительной средней интенсивности флуоресценции (RMIF, по сравнению с посторонним изотипическим контролем). B) Экспрессию CCR7 и CD20 на поверхности клеток анализировали с точки зрения доли злокачественных клеток, экспрессирующих рецептор.

Фигура 4. Лечение (*in vivo*) ибрутинибом не устраняет миграцию клеток ХЛЛ, опосредованную CCR7.

A) Сравнительный анализ показателей миграции (% от исходного уровня) в клетках ХЛЛ, полученных от пациентов, ранее не получавших лечения (N, n = 7, черные столбики), по сравнению с клетками, полученными от пациентов с ХЛЛ, получавших ибрутиниб (OT, n = 10, серые столбики). Миграции добивались путем приведения клеток ХЛЛ в контакт с лигандами CCR7: CCL19 (1 мкг/мл) или CCL21 (1 мкг/мл). Миграцию тестировали с помощью анализа хемотаксиса, в котором клетки помещали в непокрытые камеры системы трансвелл (Transwell). Анализы проводили в течение 4 часов при 37°C. Спонтанную миграцию, не опосредованную хемотаксическим стимулом, рассматривали как базальную миграцию (на этом этапе хемокин не добавляли). B) Сравнительный анализ показателей миграции (% от исходного уровня) клеток ХЛЛ от ранее не получавших лечения пациентов (n = 7), которые в течение одного часа приводили в контакт с различными концентрациями ибрутиниба (в конечных концентрациях 0-среда/ДМСО; 0,01, 0,1, 1, 10 мкМ) перед приведением в контакт с лигандами CCR7: CCL19 (1 мкг/мл) или CCL21 (1 мкг/мл). Миграцию тестировали с помощью анализа хемотаксиса, в котором клетки помещали в непокрытые камеры системы трансвелл. Анализы проводили в течение 4 часов при температуре 37 °C (ибрутиниб присутствовал в течение всего времени миграции). Спонтанную миграцию, не опосредованную хемотаксическим стимулом, рассматривали как базальную миграцию (на этом этапе хемокин не добавляли). В качестве положительных

контролей использовали клетки, не приведенные в контакт с ибрутинибом (черные столбики). В A и B столбики представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка среднего (СО). н/з - незначимый; * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$.

Фигура 5. Обработка (*in vitro*) ибрутинибом в концентрации 0,1 мкМ в течение 24 ч не устраняет миграцию клеток ХЛЛ, опосредованную CCR7.

Сравнительный анализ показателей миграции (% от исходного уровня) клеток ХЛЛ, полученных от ранее не получавших лечения пациентов (n = 6), которые инкубировали в течение 24 часов с ибрутинибом в конечной концентрации 0 (растворитель/ДМСО) или 0,1 мкМ перед приведением в контакт с лигандами CCR7: CCL19 (1 мкг/мл) или CCL21 (1 мкг/мл). Миграцию тестировали с помощью анализа хемотаксиса, в котором клетки помещали в непокрытые камеры системы трансвелл. Анализы миграции проводили в течение 4 часов при 37°C. Спонтанную миграцию, не опосредованную хемотаксическим стимулом, рассматривали как базальную миграцию (на этом этапе хемокин не добавляли). В качестве положительных контролей использовали клетки, не приведенные в контакт с ибрутинибом (черные столбики). Столбики представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка среднего (СО). н/з - незначимый; * - $p<0,05$.

Фигура 6. Обработка антителом против CCR7 - CAP-100 - устраняет опосредованную CCR7 миграцию клеток ХЛЛ от пациентов, которых лечили ингибиторами BTK или ингибиторами Bcl-2.

Специфичное блокирование взаимодействий CCR7-лиганд, выраженное в виде снижения % мигрирующих введенных клеток, показано для клеток ХЛЛ, полученных от пациента, получающего венетоклакс (A), или для клеток ХЛЛ, полученных от пациента, получающего ибрутиниб (B). Клетки CLL инкубировали с антителом против CCR7 (CAP-100) в различных конечных концентрациях (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0 мкг/мл). Затем клетки помещали в камеры трансвелл и приводили в контакт с хемокинами CCL19 (белые столбики) и CCL21 (серые столбики) в концентрации 1 мкг/мл. Анализ миграции в непокрытых камерах системы трансвелл проводили в течение 4 часов при 37°C. Базальная миграция представляла собой спонтанную миграцию, не опосредованную хемотаксическим стимулом, – на этом этапе не добавляли ни хемокин, ни MAT. Максимальная миграция наблюдалась, когда хемокины были добавлены, но CAP-100 отсутствовало (точка 0).

Фигура 7. Влияние комбинации ибрутиниба с антителом против CCR7 - CAP-100 - на миграцию, вызванную лигандами CCR7.

Сравнительный анализ показателей миграции (% от исходного уровня) клеток ХЛЛ, полученных от ранее не получавших лечения пациентов (n = 5), которые инкубировали с антителом против CCR7 (CAP-100; 10 мкг/мл), с ибрутинибом (0,1 мкМ) или с комбинацией обоих соединений (CAP-100 в концентрации 10 мкг/мл; ибрутиниб в концентрации 0,1 мкМ), перед проведением анализов хемотаксиса в сторону лигандов CCR7 [CCL19 (1 мкг/мл) или CCL21 (1 мкг/мл); в непокрытых камерах системы трансвелл]. Спонтанную миграцию, не опосредованную хемотаксическим стимулом, рассматривали как базальную миграцию (на этом этапе хемокин не добавляли; белый столбик). В качестве положительных контролей использовали клетки без предварительной инкубации с антителом против CCR7 или ибрутинибом (черные столбики). Столбики представляют собой среднее значение ± стандартная ошибка среднего (СО). н/з - незначимый; * - $p<0,05$.

Фигура 8. Экспрессия CCR7 в клетках ХЛЛ от пациентов, получающих лечение ингибиторами BTK или Bcl-2, может эффективно вызывать гибель клеток при связывании с антителом против CCR7.

Активность АЗКЦ оценивали у одного пациента, получавшего лечение ибрутинибом (A), у одного пациента, получавшего лечение занабрутинибом (B), у одного пациента, получавшего венетоклакс (C), и у одного пациента с рецидивирующим/рефрактерным к лечению ибрутинибом заболеванием (D). Во всех случаях клетки ХЛЛ инкубировали в присутствии постороннего соответствующего изотипического контроля, или с антителом против CD20 (ритуксимабом, RTX), или с антителом против CCR7 (CAP-100). Антитела тестировали при различных конечных концентрациях (0, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 мкг/мл). Для проведения АЗКЦ в качестве эффекторных клеток использовали выделенные МКПК (мононуклеарные клетки периферической крови) при постоянном соотношении Э:М 10:1. Процент клеток ХЛЛ, убитых АЗКЦ, определяли с помощью проточной цитометрии на основании включения 7-амино-актиномицина D (7-AAD). Показана доля специфичного лизиса, вызванного антителами.

ПРИМЕРЫ

Введение

Рецептор хемокинов CCR7 контролирует миграцию некоторых субпопуляций иммунных клеток в лимфатические узлы (ЛУ), где, помимо этого, он способствует организации и активации иммунных клеток (Legler et al., Int J Biochem Cell Biol. 2014; 54:78-82). В соответствии с лимфоидным происхождением, несколько видов рака крови с поражением лимфатических узлов экспрессируют CCR7 (López-Giral et al., J Leukoc Biol.

2004; 76(2):462-71). При этих заболеваниях экспрессия CCR7 коррелирует с генерализованной лимфаденопатией, агрессивным течением заболевания и короткой выживаемостью (Legler et al., 2014; выше). В частности, при В-клеточных злокачественных новообразованиях экспрессия CCR7 способствует более длительному нахождению опухолевых клеток в ЛУ, а также направлению опухолевых клеток к нишам, в которых могут быть достигнуты проопухолевые стимулы (Rehm et al., Blood, 2011; 118(4):1020-33).

Недавно в некоторых сообщениях описывали, что обработка ибрутинибом клеток ХЛЛ приводила к снижению уровня экспрессии CCR7 на поверхности, что, кроме того, приводило к последующему нарушению опосредованной CCR7 миграции и опосредованной CCR7 адгезии (Patrussi et al., 2015; выше 75(19): 4153-63; de Rooij et al., 2012; выше). В результате этих работ предположили, что одним нецелевым эффектом, опосредованным ибрутинибом, было снижение миграции в лимфатические узлы, частично вызванное восстановлением уровня CCR7 на поверхности, повышенного в клетках ХЛЛ, до уровней, обычно экспрессируемых в В-клетках. Аналогичным образом, сообщали о положительной обратной связи для профилей экспрессии CCR7 и Bcl-2 (Kim et al., 2005; выше).

На основании описанных открытий не ожидается, что комбинация ингибитора BTK и/или ингибитора Bcl-2 с антителом против CCR7 улучшит терапевтическое ингибирование миграции злокачественных клеток в лимфатические узлы (или другие вторичные лимфоидные органы (ВЛО)). Кроме того, исходя из ранее описанной утраты экспрессии CCR7, терапевтический подход, направленный на нацеливание CCR7 на уничтожение опухолевых клеток, был бы исключен, и не ожидалось, что он улучшит отдельную терапевтическую эффективность ингибиторов BTK или Bcl-2.

Авторы настоящей заявки доказывают влияние ингибиторов BTK или Bcl-2 на экспрессию CCR7 у пациентов с ХЛЛ и осуществляют несколько подходов для исследования того, могут ли эти соединения отрицательно влиять на функции, запускаемые CCR7 (такие как миграция), а также могут ли эти соединения предотвращать эффективное уничтожение клеток-мишеней, опосредованное антителами против CCR7, в результате отсутствия экспрессии CCR7 на поверхности клеток-мишеней.

Материалы и методы

Образцы

Клетки лейкоза от пациентов выделяли из свежей донорской периферической крови, применяя центрифугирование в градиенте плотности фиколла (Ficoll-Paque Plus, Amersham

Biosciences). Выделенные клетки поддерживали в краткосрочных культурах в среде RPMI 1640, дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (ФБС), 2 мМ L-глутамином и 100 Ед/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина, при 37 °C в 5% CO2. Нормальные мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали из лейкоцитарных пленок крови взрослых доноров после разделения в градиенте фиколла и поддерживали в полной среде, как описано выше. Во всех случаях пациенты и здоровый донор подписывали информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией. Процедуры эксперимента были одобрены Экспертным советом больницы Hospital de la Princesa.

В это исследование были включены три типа образцов от пациентов (n = 196):

1) Пациенты, ранее не получавшие лечения (т. е., пациенты, ранее не получавшие лечения ингибитором BTK или ингибитором Bcl-2).
2) Пациенты, получавшие лечение ибрутинибом (или другим ингибитором BTK).
3) Пациенты с рецидивом/рефрактерные к лечению ибрутинибом (R/R).

Экспрессия CCR7

Анализ методом проточной цитометрии экспрессии CCR7 и CD20 в клетках ХЛЛ проводили с четырехцветной панелью моноклональных антител: CD19-APC-H7 (BD Biosciences), CD3-FITC (BD Biosciences), CD5-APC (BD Biosciences) и либо CCR7-PE (R&D Systems), либо CD20-PE (R&D Systems). Исследования проводили на популяции CD19+CD3-CD5+ ХЛЛ. Был включен соответствующий изотипически сходный контроль (ИК), конъюгированный с PE (R&D Systems). Для определения экспрессии рецептора 106 клеток (в ~50 мкл ФБ) инкубировали с антителами в течение 15 - 20 минут при комнатной температуре (КТ). Клетки лизировали лизирующим раствором BD FACSTM Lysing Solution (BD Biosciences) в течение 10 минут при КТ и центрифугировали при 1800 об/мин в течение 2 минут. Затем клетки промывали 2 мл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) Дульбекко (Lonza) и последний раз центрифугировали при 1800 об/мин в течение 2 минут. Сбор данных осуществляли на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (BD Biosciences). Минимум 10000 клеток ХЛЛ анализировали с использованием программного обеспечения BD FACSDIVA™. Результаты выражали как в процентах положительных по CCR7 и CD20 клеток [%рецептора - %контроля], так и в относительной средней интенсивности флуоресценции (RMFI) экспрессии CCR7 и CD20 по сравнению с ИК [MIF(рецептора)/MIF(контроля)].

Анализ хемотаксиса (миграции)

МКПК выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности раствора Biocoll Separating Solution (Merck Millipore). МКПК дважды промывали физиологическим раствором (Fresenius) и центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут. Клетки суспендировали в среде RPMI 1640 (GIBCO) с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в концентрации $5x10^6$ клеток/мл. В соответствующих случаях, и перед анализом хемотаксиса, клетки предварительно инкубировали со следующими реагентами: а) ибрутиниб, 1 час при КТ; при различных конечных концентрациях; б) ибрутиниб, 24 часа при 37°С; при различных конечных концентрациях; б) МАТ против CCR7, 0,5 часа при КТ. Анализ хемотаксиса проводили в камерах трансвелл (диаметр 6,5 мм, толщина 10 мкм, диаметр пор 5 мкм, Costar). В исследование были включены только образцы пациентов с >90% опухолевых клеток. В общей сложности $5x10^5$ клеток, суспендированных в RPMI-1640, 0,1% БСА, загружали в верхнюю камеру и хемокины CCL19 или CCL21 (1 мкг/мл, Peprotech) добавляли в нижнюю камеру. После 4 часов при 37°С, 5% CO, собирали клетки из нижней камеры и окрашивали антителом против CD3-PE (BD Biosciences) и антителом против CD5-APC (BD Biosciencies). Мигрировавшие клетки подсчитывали в течение 60 секунд в проточном цитометре BD FACSCanto™ II. Процент мигрировавших клеток (% от введенных клеток) рассчитывали по следующей формуле: 100 x (количество клеток в нижней камере/количество клеток, загруженных в верхнюю камеру). После вычисления % от введенных клеток оценивали % ингибирования с помощью следующей формулы: % ингибирования = [(% от введенных клеток без МАТ - % от введенных клеток с МАТ)x100]/[% от введенных клеток без МАТ]. Кроме того, результаты представлены в виде % от введенных клеток относительно максимального эффекта, опосредованного каждым хемокином (ХК), который был рассчитан в соответствии с формулой: % от введенных клеток относительно ХК = 100 x (% от введенных клеток/% от введенных клеток с ХК).

Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (АЗКЦ)

Анализ АЗКЦ проводили, как описано в SR-HPM-1026. Кратко: опухолевые клетки-мишени инкубировали только со средой (RPMI + 10% ФБР) или в присутствии антител ИК, ритуксимаба, алемтузумаба или CAP-100 при различных конечных концентрациях при 37°С в течение 30 мин. Несвязанное антитело вымывали (1800 об/мин, 2 минуты/ два раза) и клетки высевали при плотности 10^5 клеток/лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном p96. МКПК человека от здоровых доноров были получены с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла. Эффекторные клетки метили кальцеином, позволяющим отслеживать клетки в УФ (CellTracker, Invitrogen), в соответствии с протоколом производителя и стимулировали рекомбинантным IL-2

человека (500 Ед/мл, StemCell Technologies). Использовали различные соотношения эффектор:мишень (Э:М) [10:1 для анализа доза-ответ и (5:1, 25:1, 50:1) для анализа Э:М]. Через 6 часов клетки окрашивали 7AAD, CD3-PE и CD5-APC и анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент специфичного лизиса CellTracker-CD5+CD3- клеток ХЛЛ определяли по включению 7-AAD (BD Pharmingen) и рассчитывали по следующей формуле: % специфичного лизиса = 100 × (ER-SR)/ (MR-SR). ER, SR и MR обозначают экспериментальную, спонтанную и максимальную гибель клеток, соответственно.

Статистический анализ

Для статистического анализа осуществляли следующие этапы:

1) Гомогенность проверяли с помощью критериев нормальности Колмогорова-Смирнова, и/или Шапиро-Уилка, и/или Д'Агостино и Пирсона.
2) Критерий Бартлетта использовали для проверки однородности дисперсии.
3) Для параметрических переменных использовали дисперсионный анализ (однофакторный дисперсионный анализ с последующим критерием множественных сравнений Даннетта) или t-критерий для двух независимых выборок для сравнения групповых средних значений.
4) Для непараметрических переменных использовали критерий Краскела-Уоллиса (с последующим критерием множественного сравнения Данна) и U-критерий Манна-Уитни для двух независимых выборок для сравнения групповых медиан. При анализе парных образцов использовали критерии Уилкоксона или Фридмана.
5) Все данные анализировали с помощью Graph-Pad Prism 5 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния). Все критерии были двусторонними. $P < 0,05$ считали статистически значимым. Если не указано иное, для каждой группы приведены среднее значение и стандартная ошибка среднего (СО).

Для расчета значений EC50 использовали GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc). Для этого было выбрано глобальное уравнение нелинейной регрессии зависимости воздействия "доза-ответ" в режиме робастной аппроксимации (стандартный угловой коэффициент).

Результаты

Экспрессия CCR7 на поверхности сохраняется у пациентов с ХЛЛ, получающих лечение ингибиторами BTK или Bcl-2.

Поскольку в предыдущих работах сообщали о значительной утрате CCR7 на поверхности клеток ХЛЛ, обработанных ибрутинибом, первая задача настоящего исследования заключалась в проверке этих результатов в большей когорте пациентов с ХЛЛ. По этой причине авторы настоящего изобретения измеряли CCR7 на поверхности клеток в 125 образцах, полученных от пациентов, ранее не получавших лечения (никогда не получавших лечения ингибитором BTK или ингибитором Bcl-2), в 44 образцах, полученных от пациентов, которых лечили ибрутинибом на момент измерения, и в 16 образцах, полученных от пациентов, которые прекратили лечение ибрутинибом вследствие развития рецидивирующего/рефрактерного заболевания. Поразительно, но авторы настоящего изобретения наблюдали, что экспрессия CCR7 сохранялась во время лечения ингибиторами BTK. Как видно на Фигуре 1-A-B и Фигуре 2-A, авторы настоящего изобретения наблюдали, что у пациентов, получающих ибрутиниб в качестве текущей терапии, продолжали выявлять выраженную экспрессию CCR7 на поверхности клеток. В целом, небольшое, но значительное снижение наблюдалось у пациентов, получавших лечение ибрутинибом, тем не менее, приблизительно у 100% клеток ХЛЛ сохранялась экспрессия на поверхности клеток (что определяли как процент клеток, экспрессирующих CCR7), а также поддерживались высокие уровни на поверхности клеток (что определяли по RMIF). Действительно, уровни на поверхности клеток у получивших лечение пациентов все еще превышали 200 произвольных единиц. Другими словами, экспрессия все еще была в 200 раз выше, чем для отрицательного постороннего изотипического контроля. У пациентов, которых лечили другими ингибиторами BTK, такими как акалабрутиниб или занабрутиниб, не наблюдали изменений в экспрессии CCR7 на поверхности клеток. Наконец, в случае клеток ХЛЛ, R/R к ибрутинибу, уровни CCR7 на поверхности клеток были аналогичны (или даже выше) уровням у не получавших лечение пациентов (Фигура 1-A-B и Фигура 2-A).

Интересно, что в случае CD20, рецептора, который, как известно, экспрессируется на более низком уровне или утрачивается при лечении ибрутинибом, авторы настоящего изобретения подтвердили, что ингибиторы BTK приводили к существенному снижению экспрессии CD20 на поверхности клеток. Например, лечение приводило к полной утрате CD20 у некоторых пациентов, что определяли по уменьшению доли CD20-положительных клеток по сравнению с не получавшими лечение пациентами (Фигура 1-A-B). Соответственно, на Фигуре 2-B показано, как лечение ибрутинибом приводило к последовательному снижению уровня CD20 на поверхности клеток у четырех (4/4) пациентов по сравнению с моментом начала их лечения ибрутинибом (Y), в то время как в случае CCR7 общая картина оставалась по существу неизменной: наблюдали значительное

снижение уровня у одного пациента (1/4), незначительное снижение у другого пациента (1/4), но увеличение у двух других пациентов (2/4). Наконец, и сильно отлично от CCR7, экспрессия CD20 в клетках ХЛЛ, R/R к ибрутинибу, была даже ниже, чем у пациентов, получавших ибрутиниб (Фигуры 1A и 2B).

Экспрессия CCR7 на поверхности клеток сохраняется у пациентов с ХЛЛ, получающих лечение ингибиторами Bcl-2.

В клетках ХЛЛ, полученных от пациентов, которых лечили венетоклаксом, авторы настоящего изобретения наблюдали, что приблизительно у 100% клеток ХЛЛ сохранялась экспрессия на поверхности (что определяли по проценту клеток, экспрессирующих CCR7), а также поддерживались высокие уровни на поверхности (что определяли по RMIF). Как и в случае с ибрутинибом, уровни на поверхности клеток у пациентов, которых лечили венетоклаксом, все еще были примерно в 150 - 250 раз выше, чем для отрицательного постороннего изотипического контроля (Фигура 2-A и Фигура 3-A-B).

Лечение ингибиторами BTK не устраняло миграцию, опосредованную CCR7

После того, как определили, что ингибиторы BTK не вызывают значимую утрату CCR7 на поверхности клеток ХЛЛ, авторы настоящего изобретения задались целью подтвердить, что эти соединения могут оказывать отрицательное влияние на функции, опосредованные CCR7, посредством дополнительного механизма, который может нарушать миграцию, вызванную лигандами CCR7. Для этого авторы настоящего изобретения провели сравнительный анализ хемотаксического ответа *in vitro* клеток ХЛЛ, полученных от пациентов, ранее не получавших лечения (N), по сравнению с пациентами, получавшими лечение ибрутинибом (OT) (Фигура 4-A). В обеих группах пациентов показатели базальной миграции были аналогичными, и в обеих группах клетки ХЛЛ значительно мигрировали в направлении лигандов CCR7. Хотя наблюдалось небольшое снижение показателей миграции в группе OT, эти значения значимо не отличались от таковых в группе N, указывая на то, что ингибиторы BTK оказывали лишь незначительное влияние на вызванную CCR7 миграцию. Кроме того, показатели миграции в группе OT не достигли базальных уровней, что указывает на то, что лечение ингибиторами BTK не полностью устраняет миграцию, индуцированную CCR7.

Для того чтобы дополнительно подтвердить это, авторы настоящего изобретения провели анализ хемотаксиса *in vitro* в камерах трансвелл. В этих условиях клетки ХЛЛ из ранее не получавших лечения пациентов инкубировали в течение одного часа с возрастающими концентрациями ибрутиниба (0; 0,01; 0,1; 1; 10 мкМ) перед приведением в

контакт с лигандами CCR7 (черные столбики). На Фигуре 4-B видно, что показатели миграции при предварительной обработке ибрутинибом были сопоставимы с контрольными показателями миграции, вызванной лигандами CCR7. Только при введении в дозе 0,1 мкМ для ибрутиниба продемонстрировали умеренное (хотя и незначимое) влияние на миграцию в направлении CCL21.

Поскольку отсутствие ингибирования ибрутинибом может быть связано с коротким временем инкубации (1 час до анализа хемотаксиса + 4 дополнительных часа во время анализа хемотаксиса), авторы настоящего изобретения решили провести новые эксперименты, в которых ранее не контактировавшие с ним клетки ХЛЛ инкубировали с ибрутинибом в концентрации 0,1 мкМ в течение 24 часов перед тестированием хемотаксиса. Опять же, как показано на Фигуре 5, не наблюдали действия ибрутиниба на опосредованную CCR7 миграцию клеток ХЛЛ в направлении CCL19, и наблюдали незначительное, незначимое действие на индексы миграции в направлении CCL21.

В совокупности эти результаты показали, что предшествующее лечение ибрутинибом *in vivo* или *in vitro* не оказывало значимого действия на миграцию клеток ХЛЛ, вызванную CCR7. Другими словами, эффекты, опосредованные ингибиторами BTK, оказались недостаточными для подавления опосредованной CCR7 миграции, и необходимы агенты, блокирующие CCR7, для достижения полной нейтрализации опосредованной CCR7 миграции в ЛУ. Тем не менее, пригодность антитела против CCR7 в качестве блокирующего агента у пациентов, получавших ибрутиниб, оставалась неизученной. Кроме того, как видно на Фигуре 1-A, есть вероятность, что небольшое снижение уровня CCR7 на поверхности клеток может оказать отрицательное влияние на активность CAP-100 в этой группе пациентов, которых лечили ибрутинибом. По этим причинам авторы настоящего изобретения протестировали нейтрализующую активность CAP-100 в клетках ХЛЛ, полученных от 10 пациентов с ХЛЛ, которых лечили ибрутинибом. Как видно на **Фигуре 6**, для CAP-100 продемонстрировали явную дозозависимую ингибиторную активность на клетках ХЛЛ, полученных от одного пациента, получавшего лечение венетоклаксом (**Фигура 6-A**), или от одного пациента, у которого лечение ибрутинибом оказалось неэффективным (**Фигура 6-B**). В обоих случаях показатели миграции в направлении CCL19 или CCL21 достигали базальных уровней после обработки 10 или 100 мкг/мл антитела. Эти результаты подтвердили, что клетки ХЛЛ из этих групп пациентов по-прежнему отвечают на лиганды CCR7 и что терапия антителом против CCR7, вероятно, является наилучшим способом снижения миграции, вызванной CCR7.

Авторы изобретения дополнительно исследовали, может ли комбинация ибрутиниба с антителом против CCR7, таким как CAP-100, оказывать аддитивное или синергетическое нейтрализующее действие на миграцию клеток ХЛЛ, вызванную лигандами CCR7. С этой целью клетки ХЛЛ из ранее не получавших лечения пациентов инкубировали с ибрутинибом в качестве монотерапии (0,1 мкМ), с CAP-100 в качестве монотерапии (10 мкг/мл) и с комбинацией обоих соединений перед приведением в контакт с CCL19 или CCL21. Выбор концентраций соединений был основан на предыдущих результатах по ибрутинибу (**Фигура 4B**) и CAP-100 (**Фигура 6**) в качестве ингибиторов опосредованной CCR7 миграции. На **Фигуре 7** видно, что ибрутиниб в качестве монотерапии не оказывал влияния на миграцию, вызванную CCR7, тем самым подтверждая результаты, показанные на **Фигуре 4B** и **Фигуре 5**. Как и ожидалось, при лечении CAP-100 было достигнуто снижение миграции до базальных уровней, тем самым подтверждая, что CAP-100 является эффективным агентом для ингибирования миграции, вызванной лигандами CCR7. Когда в качестве лиганда использовали CCL21, для комбинации ибрутиниба с CAP-100 выявили умеренное, хотя и незначимое повышение нейтрализующей активности относительно полученной с помощью антитела против CCR7 в качестве монотерапии, что позволяет предположить, что может быть достигнут потенциальный синергетический эффект при комбинировании обоих соединений (**Фигура 7**). Хотя необходима дальнейшая проверка, этот эффект, по-видимому, был специфичным для CCL21, поскольку подобного результата не наблюдали, когда клетки ХЛЛ, обработанные такой комбинацией, приводили в контакт с CCL19.

Экспрессия CCR7 в клетках ХЛЛ от пациентов, получающих лечение ингибиторами BTK или Bcl-2, может эффективно вызывать гибель клеток при связывании антитела против CCR7.

В способах терапии на основе антител высокие уровни мишени на поверхности необходимы для достижения эффективной активности киллинга, опосредованной эффекторными иммунными механизмами, такими как АЗКЦ, АЗКФ или КЗЦ. Действительно, для успешного осуществления любого из перечисленных механизмов необходима близость двух антител, связанных с мишенью [12]. Полученные авторами настоящего изобретения результаты по экспрессии продемонстрировали, что уровни CCR7 на поверхности незначительно снижались после лечения ингибиторами BTK, хотя не наблюдалось снижения доли опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор. По этой причине авторы настоящего изобретения определили, может ли снижение RMIF, наблюдаемое у пациентов, которых лечили ингибиторами BTK, оказывать негативное

влияние на активность киллинга, опосредованную антителами против CCR7. С этой целью авторы настоящего изобретения провели ряд тестов АЗКЦ, в которых целевые клетки ХЛЛ от пациентов, которых лечили ибрутинибом (**Фигура 8A**), занабрутинибом (**Фигура 8B**), венетоклаксом (**Фигура 8C**), или от пациентов, R/R к ибрутинибу (**Фигура 8D**), инкубировали с возрастающими концентрациями CAP-100, ритуксимаба (используемого в качестве референсного терапевтического антитела) или ИК, а затем клетки инкубировали вместе с эффекторными иммунными клетками, полученными от здоровых доноров, при постоянном соотношении эффектор:мишень 10:1.

На **Фигуре 8** видно, что для CAP-100 продемонстрировали эффективную активность АЗКЦ во всех четырех группах пациентов. Примечательно, что CAP-100 превосходил ритуксимаб. Эти результаты подтверждают, что в данных условиях небольшое снижение уровней CCR7 на поверхности, наблюдаемое у пациентов, которых лечили ингибиторами BTK или Bcl-2, не оказывало отрицательного влияния на иммунный эффекторный механизм, опосредованный антителами, такой как АЗКЦ. Эти результаты дополнительно подтверждают пригодность комбинаций на основе ингибиторов BTK или ингибиторов Bcl-2 с антителами против CCR7, такими как CAP-100.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против CCR7 для применения при лечении гиперпролиферативного гематологического заболевания, причем указанное заболевание представляет собой по меньшей мере одно из:

a) заболевание, которое лечат по меньшей мере одним из ингибитора тирозинкиназы Брутона (BTK) и ингибитора белка B-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2);

b) заболевание, которое рецидивировало после лечения по меньшей мере одним из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2; и

c) заболевание, которое рефрактерно к лечению по меньшей мере одним из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2.

2. Антитело против CCR7 для применения по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело вводят одновременно, отдельно или последовательно с по меньшей мере одним из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2.

3. Антитело против CCR7 для применения по п. 1 или п. 2, отличающееся тем, что указанное гиперпролиферативное гематологическое заболевание представляет собой заболевание, при котором гиперпролиферирующие клетки представляют собой клетки B-клеточной линии дифференцировки, причем указанное заболевание предпочтительно представляет собой B-клеточное гематологическое злокачественное новообразование, более предпочтительно лимфому или лейкоз.

4. Антитело против CCR7 для применения по п. 3 отличающееся тем, что указанное гематологическое злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), острого моноцитарного лейкоза (ОМоЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), ХЛЛ высокого риска, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (МЛЛ), МЛЛ высокого риска, множественной миеломы (ММ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы из клеток мантийной зоны (ЛКМ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), макроглобулинемии Вальденстрема (МВ), диффузной B-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ), лимфомы из клеток маргинальной зоны (ЛМЗ), лимфомы Беркитта (ЛБ), волосатоклеточного лейкоза (ВКЛ), трансформации Рихтера и Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза (Т-ПЛЛ).

5. Антитело против CCR7 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что IC_{50} указанного антитела против CCR7 составляет не более 100 нМ в отношении ингибирования по меньшей мере одного из CCR7-зависимой внутриклеточной

передачи сигнала и интернализации рецептора CCR7 посредством по меньшей мере одного лиганда CCR7, выбранного из CCL19 и CCL21.

6. Антитело против CCR7 для применения по п. 5, отличающееся тем, что указанное антитело против CCR7 ингибирует CCR7-зависимую внутриклеточную передачу сигнала, не оказывая существенного агонистического действия.

7. Антитело против CCR7 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что K_d указанного антитела против CCR7 от N-концевого внеклеточного домена CCR7 человека не более чем в 20 раз выше, чем K_d референсного антитела против CCR7, где указанное референсное антитело против CCR7 представляет собой антитело мыши против CCR7, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, и последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 2.

8. Антитело против CCR7 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело против CCR7 представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека.

9. Антитело против CCR7 для применения по п. 8, отличающееся тем, что указанное антитело против CCR7 представляет собой антитело, содержащее области HVR антитела против CCR7 человека, последовательность аминокислот вариабельного домена тяжелой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 1, и последовательность аминокислот вариабельного домена легкой цепи которого представляет собой SEQ ID NO: 2.

10. Антитело против CCR7 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный ингибитор BTK представляет собой ибрутиниб, занабрутиниб или акалабрутиниб, и при этом указанный ингибитор Bcl-2 представляет собой венетоклакс или навитоклакс.

11. Антитело против CCR7 для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное гиперпролиферативное гематологическое заболевание представляет собой заболевание у пациента, ранее не получавшего лечения.

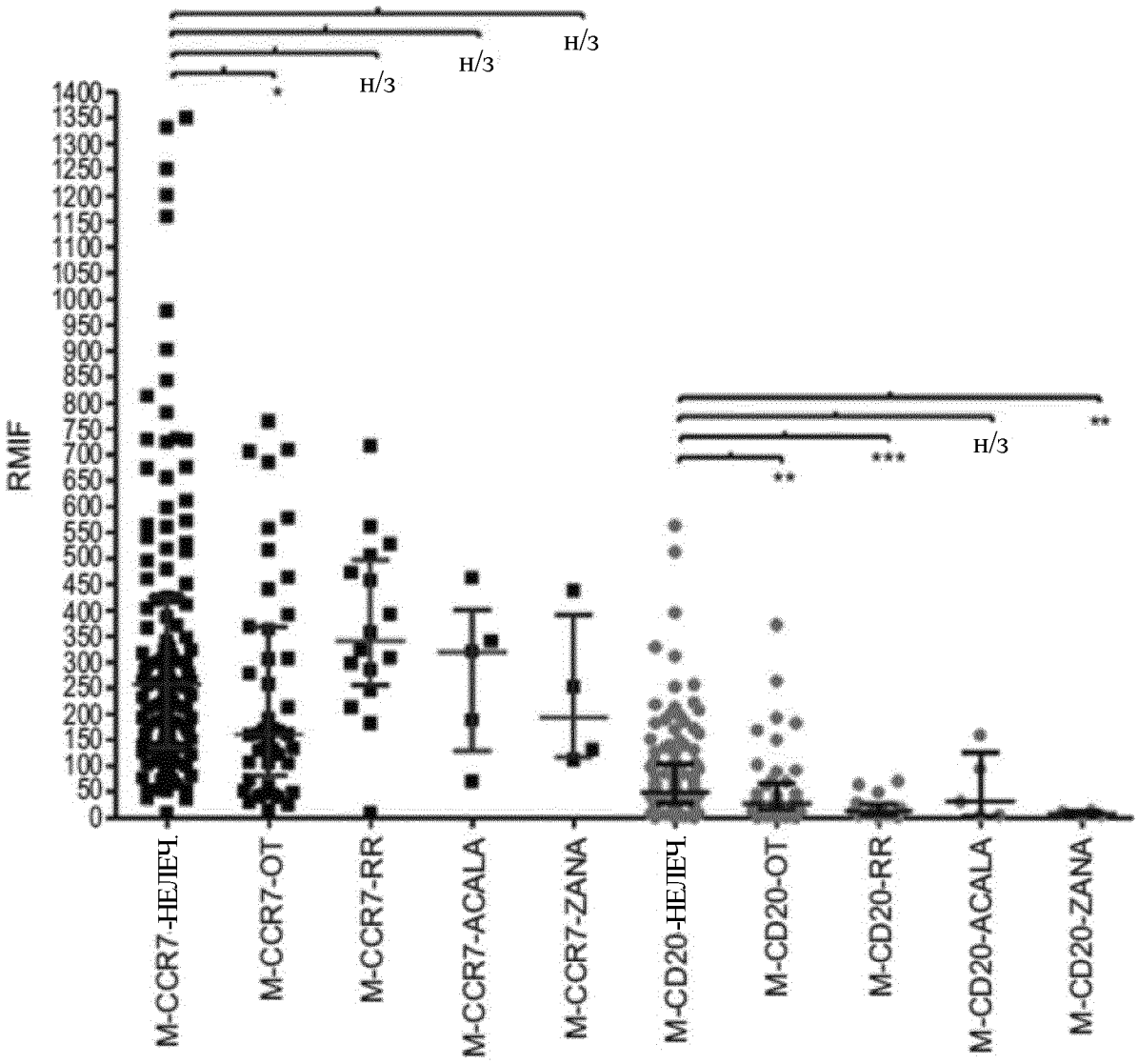
12. Антитело против CCR7 для применения по любому из пп. 1 - 10, отличающееся тем, что указанное гиперпролиферативное гематологическое заболевание представляет собой заболевание у пациента, который ранее не получал лечения по меньшей мере одним из ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7.

13. Антитело против CCR7 для применения по п. 12, отличающееся тем, что указанное гиперпролиферативное гематологическое заболевание является рефрактерным к химиотерапевтическому агенту, отличному от ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7, и/или рецидивировало после лечения химиотерапевтическим агентом, отличным от ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7.

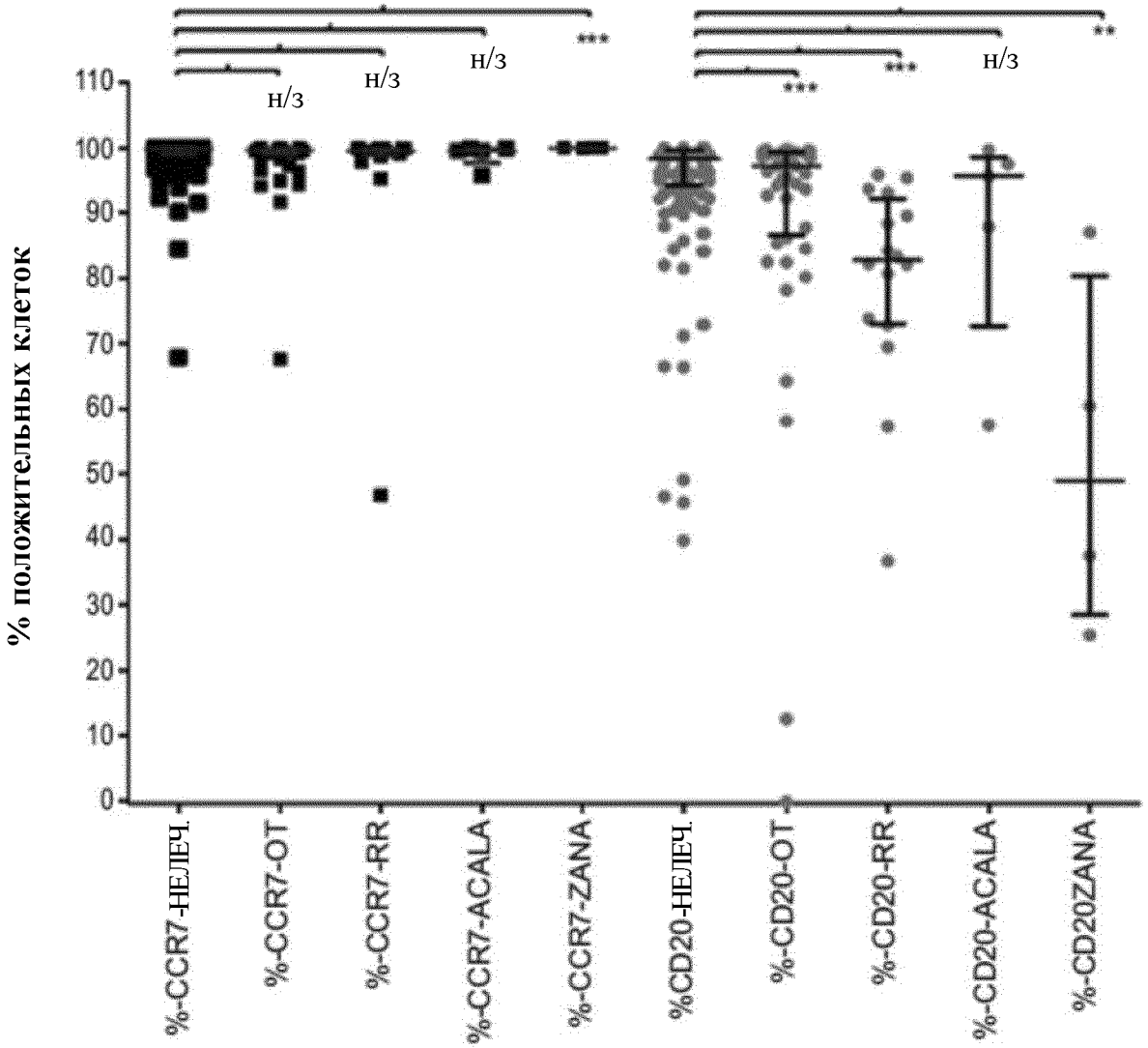
14. Антитело против CCR7 для применения по любому из пп. 1 - 10, отличающееся тем, что указанное гиперпролиферативное гематологическое заболевание является рефрактерным к по меньшей мере одному из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2, и химиотерапевтического агента, отличного от ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7, и/или рецидивировало после лечения по меньшей мере одним из ингибитора BTK и ингибитора Bcl-2, и химиотерапевтического агента, отличного от ингибитора BTK, ингибитора Bcl-2 и антитела против CCR7.

15. Антитело против CCR7 для применения по п. 13 или 14, отличающееся тем, что указанный химиотерапевтический агент представляет собой один или более из флударабина, циклофосфамида, иделализиба, антитела против CD20, причем указанное антитело против CD20 предпочтительно представляет собой ритуксимаб, обинитузумаб, окрелизумаб, велтузумаб или офатумумаб, или антитела против CD52, причем указанное антитело против CD52 предпочтительно представляет собой алемтузумаб.

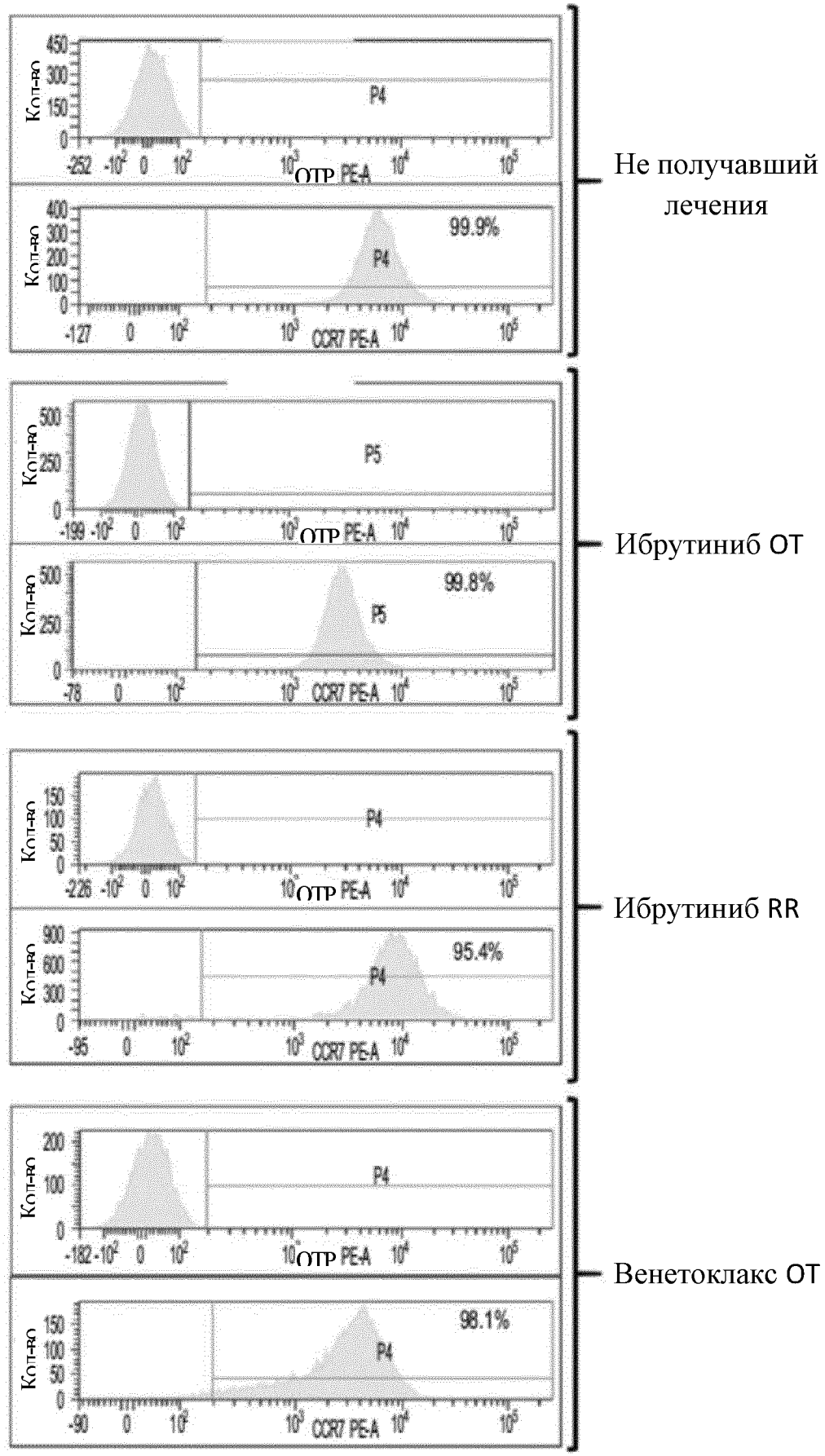
ФИГУРА 1А


RMIF
н/з
н/з
н/з
*
**
***
**
M-CCR7-НЕЛЕЧ.
M-CCR7-OT
M-CCR7-RR
M-CCR7-ACALA
M-CCR7-ZANA
M-CD20-НЕЛЕЧ.
M-CD20-OT
M-CD20-RR
M-CD20-ACALA
M-CD20-ZANA

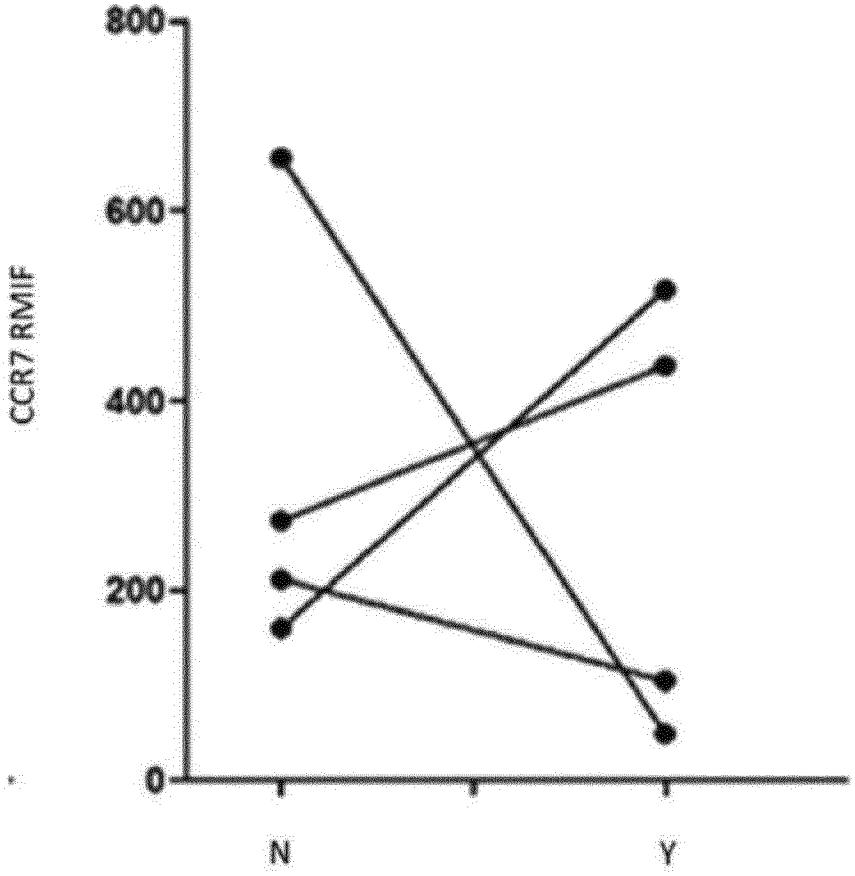
ФИГУРА 1B

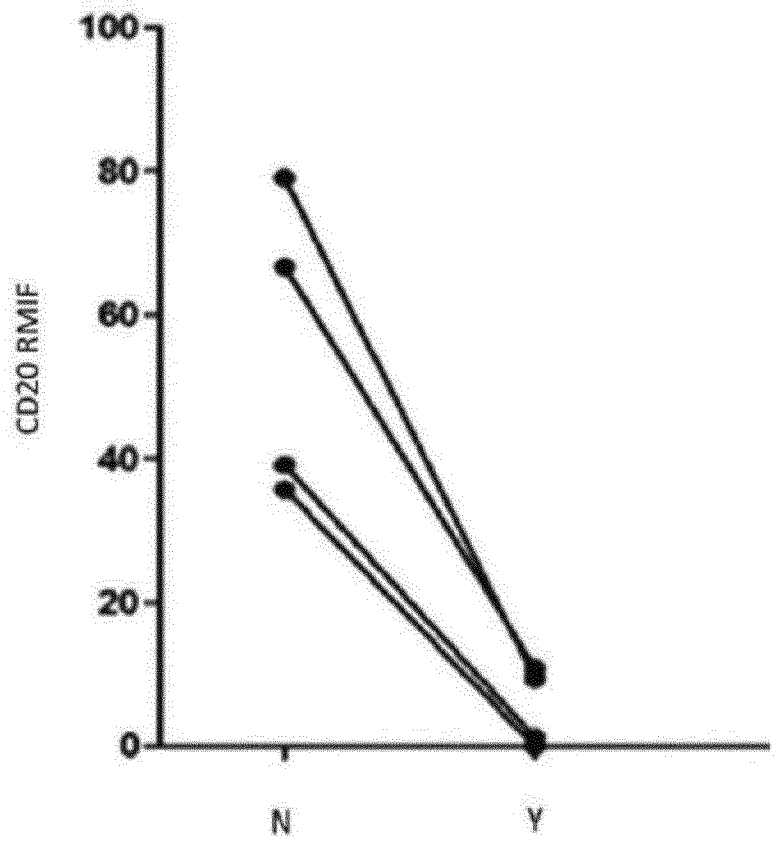

% положительных клеток
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
н/з
н/з
н/з
***
***
***
н/з
**
%-CCR7 -НЕЛЕЧ.
%-CCR7-OT
%-CCR7-RR
%-CCR7-ACALA
%-CCR7-ZANA
%CD20-НЕЛЕЧ.
%-CD20-OT
%-CD20-RR
%-CD20-ACALA
%-CD20ZANA

ФИГУРА 2А

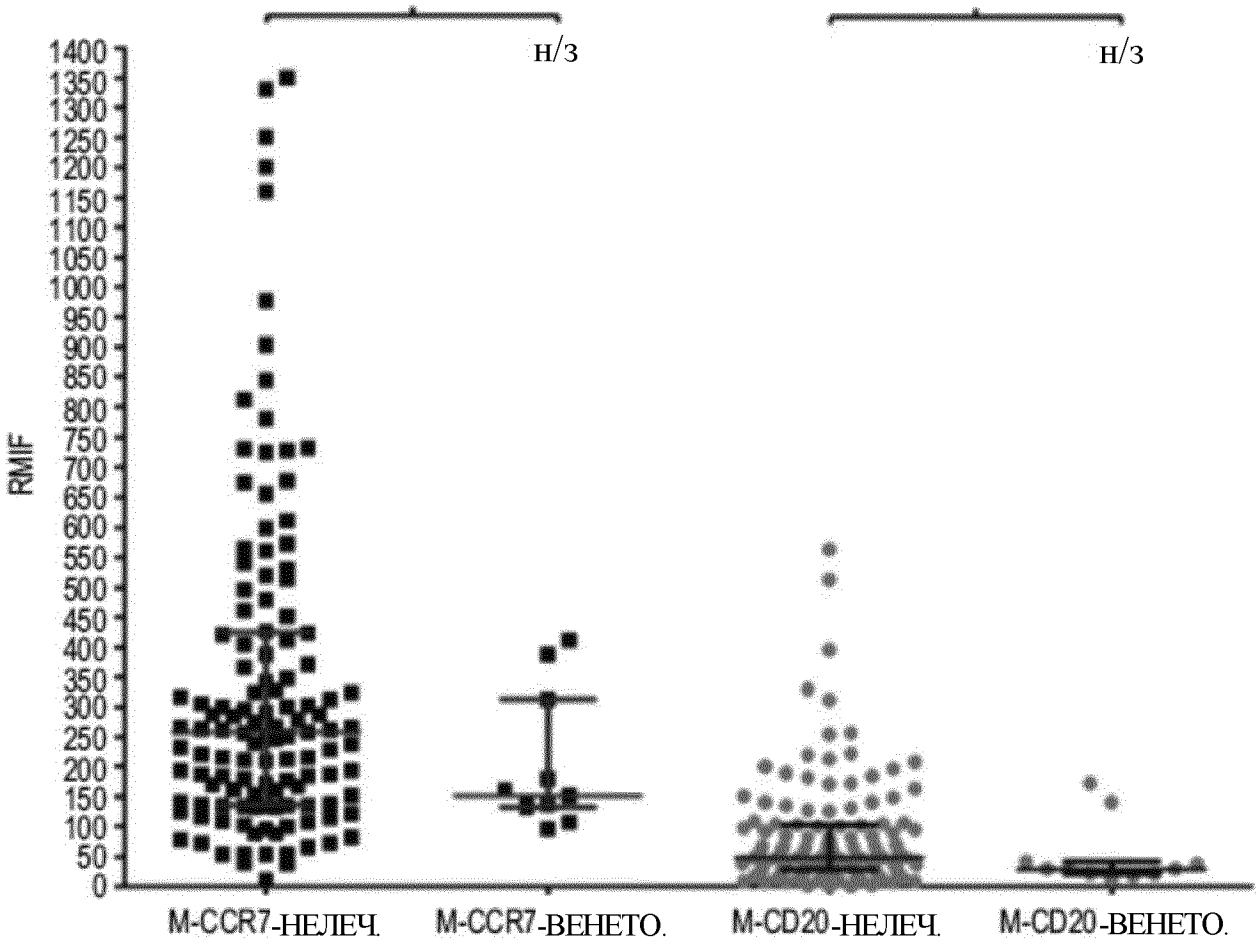

Кол-во
P4
99.9%
CCR7 PE-A
Не получавший лечения
P5
99.8%
Ибрутиниб ОТ
95.4%
Ибрутиниб RR
98.1%
Венетоклакс ОТ

ФИГУРА 2B

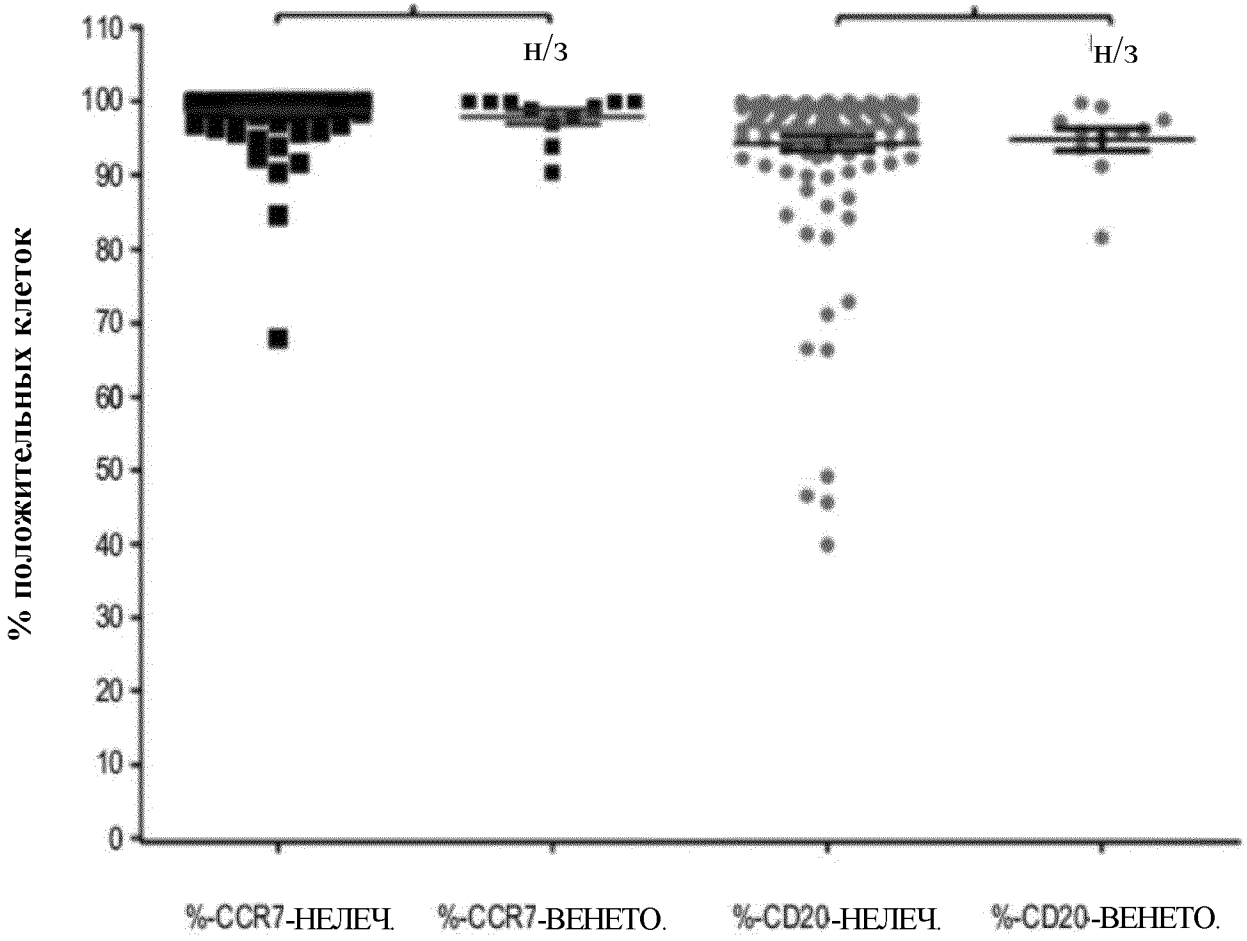




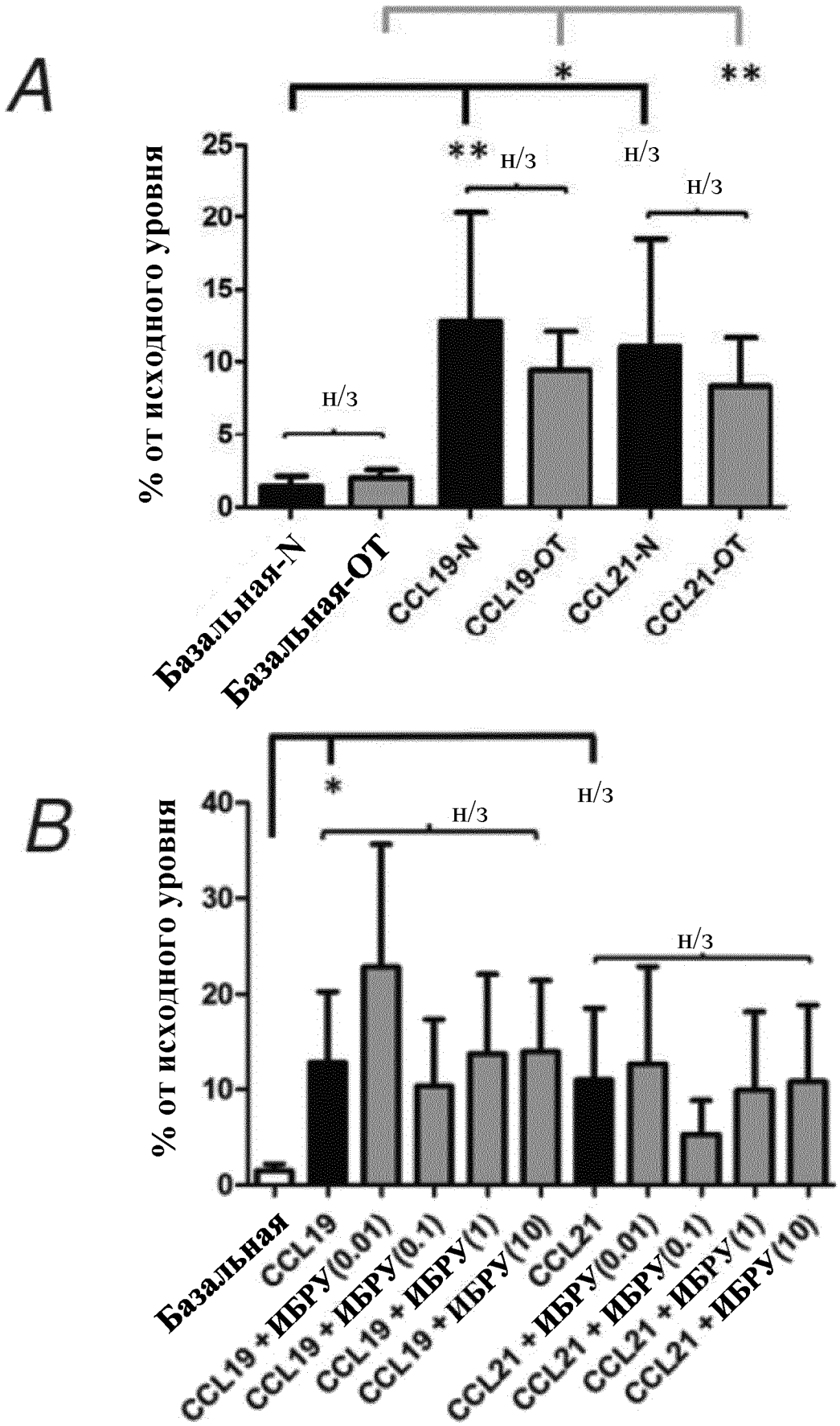
ФИГУРА 3А


н/з
н/з
RMIF
1400
1350
1300
1250
1200
1150
1100
1050
1000
950
900
850
800
750
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
M-CCR7-НЕЛЕЧ.
M-CCR7-ВЕНЕТО.
M-CD20-НЕЛЕЧ.
M-CD20-ВЕНЕТО.

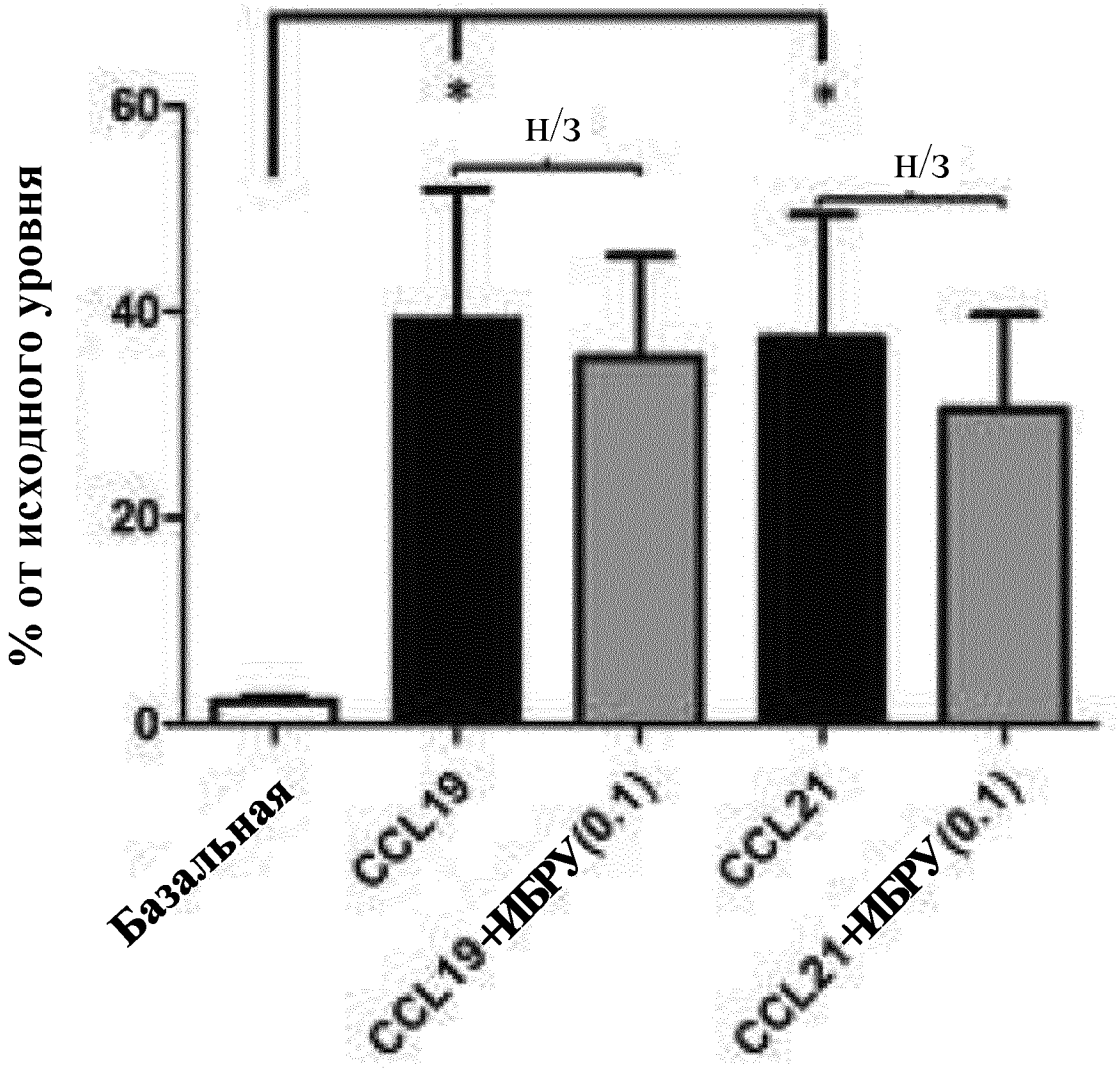
ФИГУРА 3B


н/з
н/з
% положительных клеток
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%-CCR7-НЕЛЕЧ.
%-CCR7-ВЕНЕТО.
%-CD20-НЕЛЕЧ.
%-CD20-ВЕНЕТО.

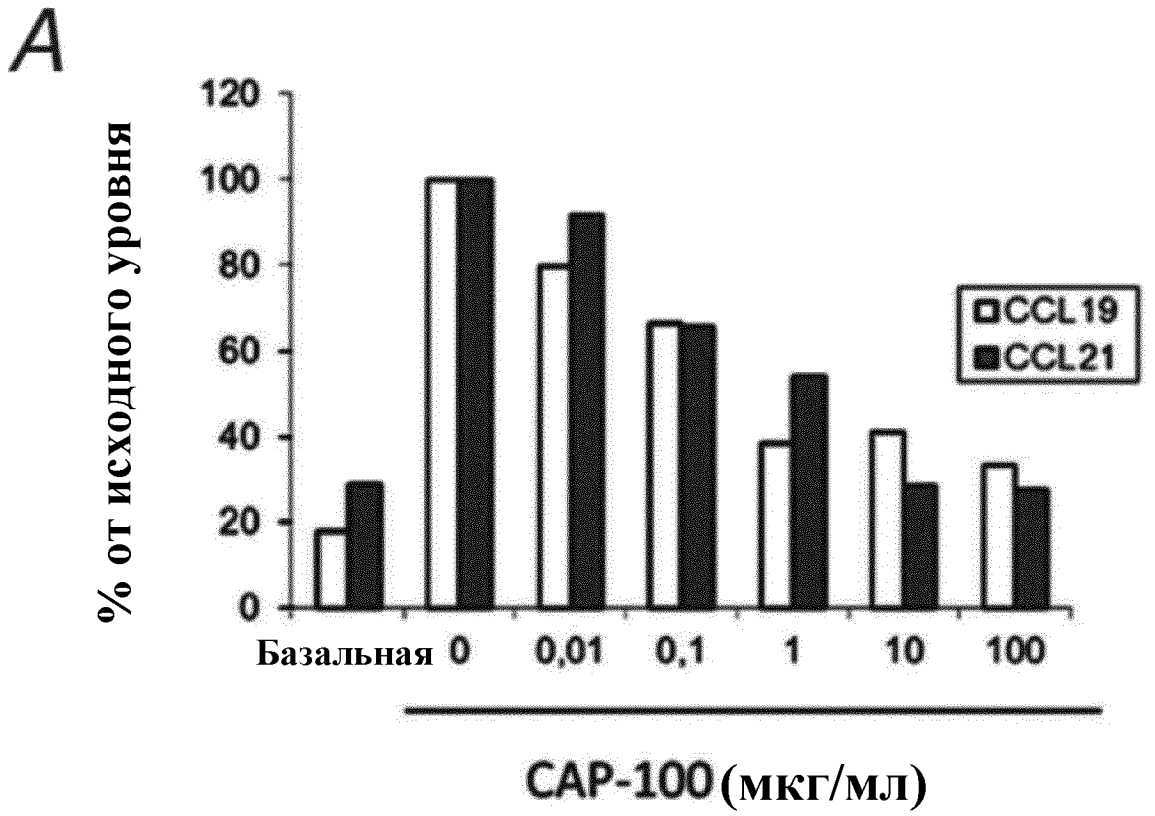
ФИГУРА 4

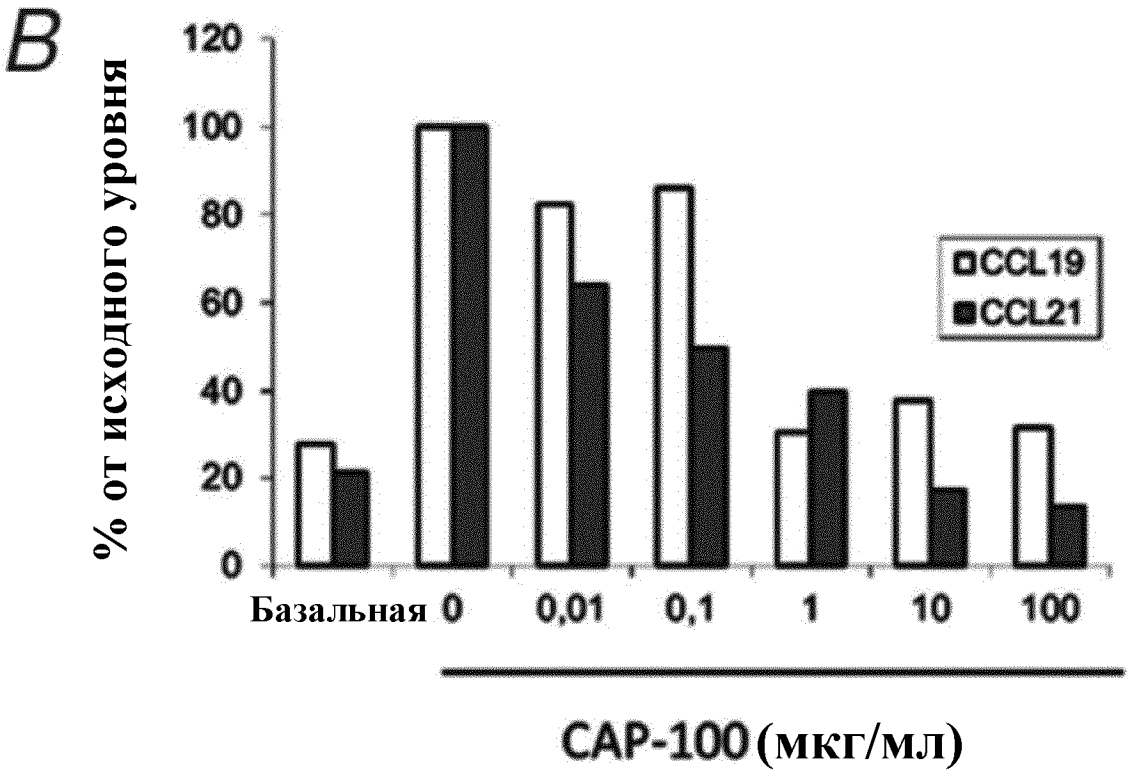

A
*
**
**
Н/З
Н/З
Н/З
Н/З
% от исходного уровня
25
20
15
10
5
0
Базальная-N
Базальная-ОТ
CCL19-N
CCL19-OT
CCL21-N
CCL21-OT
B
*
Н/З
Н/З
Н/З
% от исходного уровня
40
30
20
10
0
Базальная
CCL19
CCL19 + ИБРУ(0.01)
CCL19 + ИБРУ(0.1)
CCL19 + ИБРУ(1)
CCL19 + ИБРУ(10)
CCL21
CCL21 + ИБРУ(0.01)
CCL21 + ИБРУ(0.1)
CCL21 + ИБРУ(1)
CCL21 + ИБРУ(10)

ФИГУРА 5

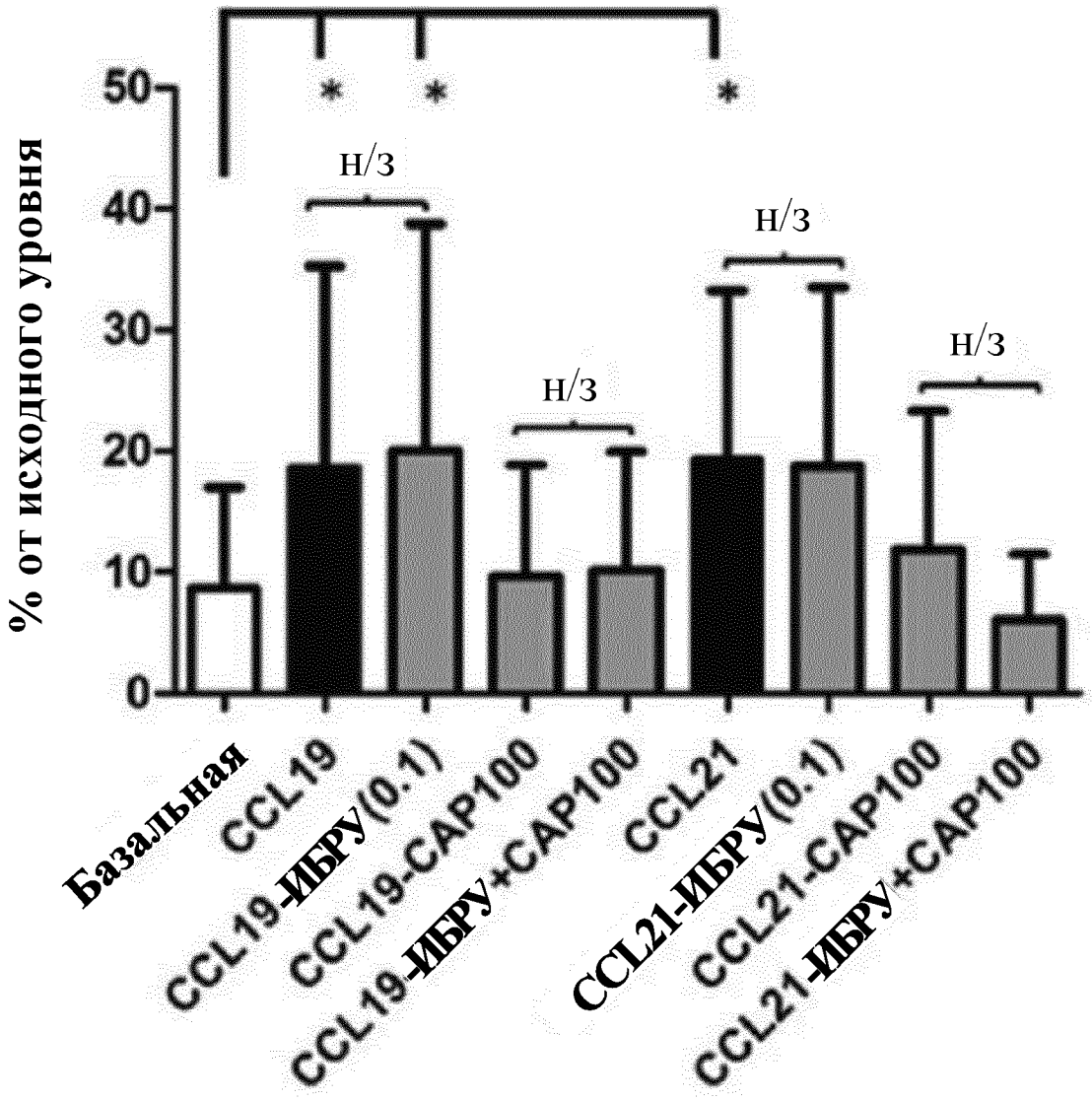

% от исходного уровня
60
40
20
0
*
*
Н/З
Н/З
Базальная
CCL19
CCL19+ИБРУ(0,1)
CCL21
CCL21+ИБРУ(0,1)

ФИГУРА 6


A
% от исходного уровня
120
100
80
60
40
20
0
CCL19
CCL21
Базальная
0
0,01
0,1
1
10
100
CAP-100 (мкг/мл)

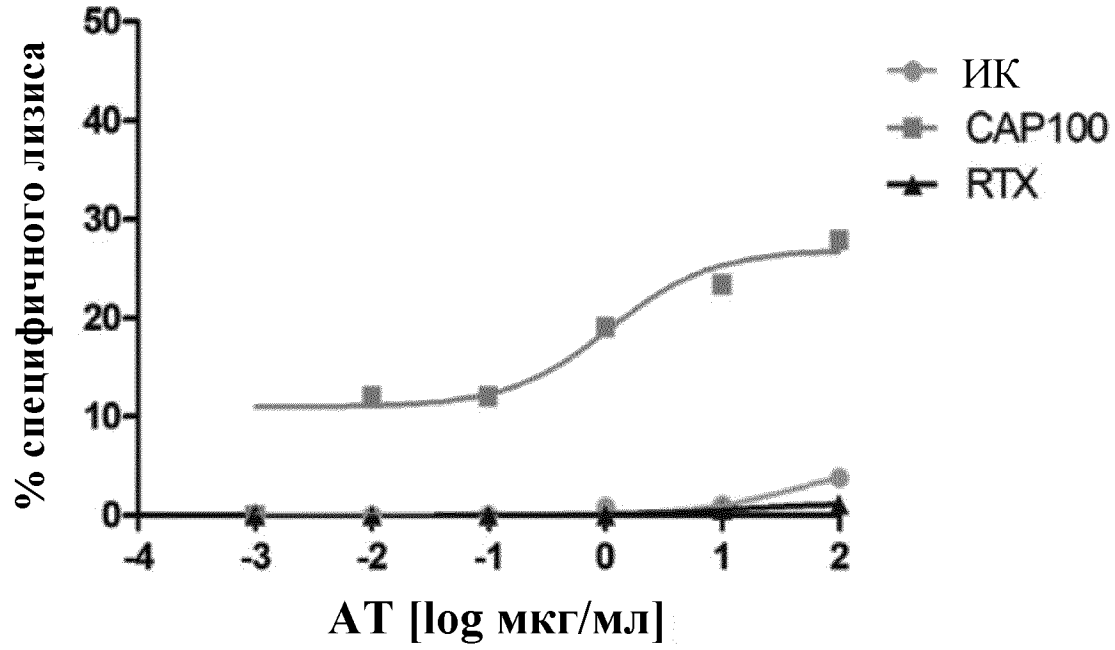

B
% от исходного уровня
120
100
80
60
40
20
0
CCL19
CCL21
Базальная
0
0,01
0,1
1
10
100
CAP-100 (мкг/мл)

ФИГУРА 7

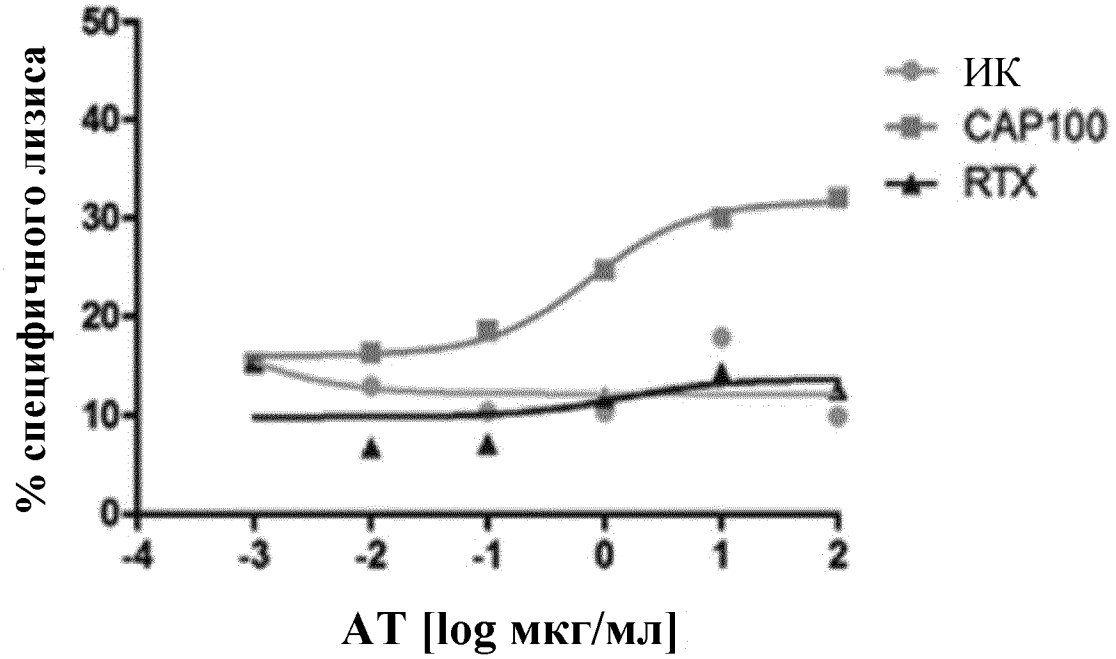

% от исходного уровня
50
40
30
20
10
0
*
*
*
Н/З
Н/З
Н/З
Н/З
Базальная
CCL19
CCL19-ИБРУ(0.1)
CCL19-CAP100
CCL19-ИБРУ+CAP100
CCL21
CCL21-ИБРУ(0.1)
CCL21-CAP100
CCL21-ИБРУ+CAP100

ФИГУРА 8

A

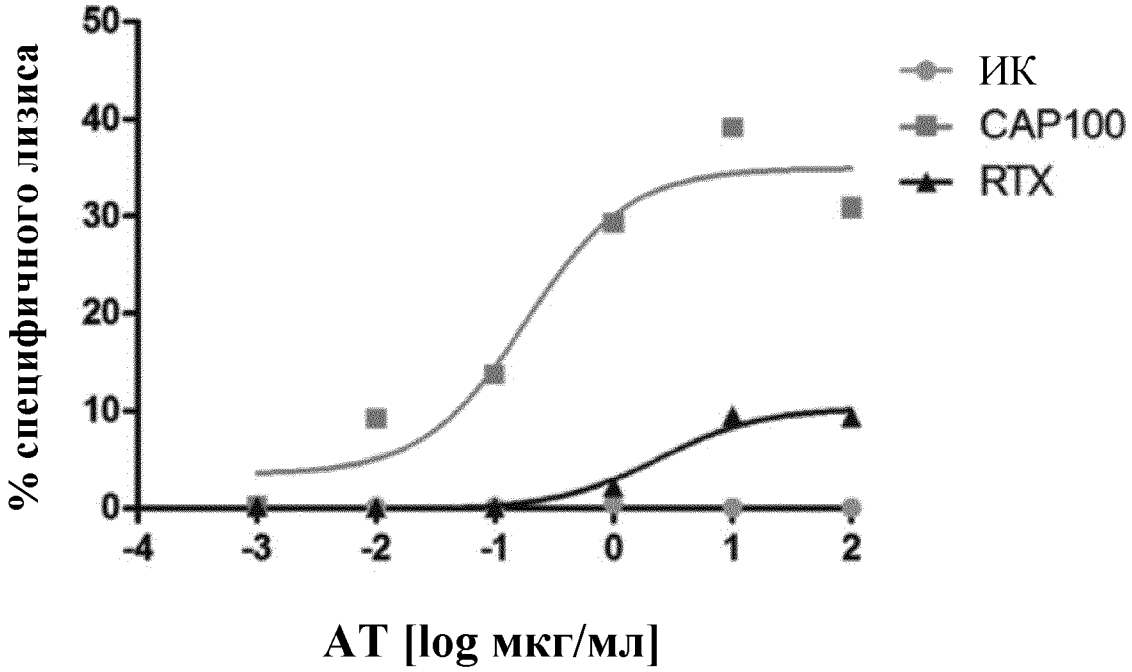

% специфичного лизиса
50
40
30
20
10
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
АТ [log мкг/мл]
ИК
CAP100
RTX

B

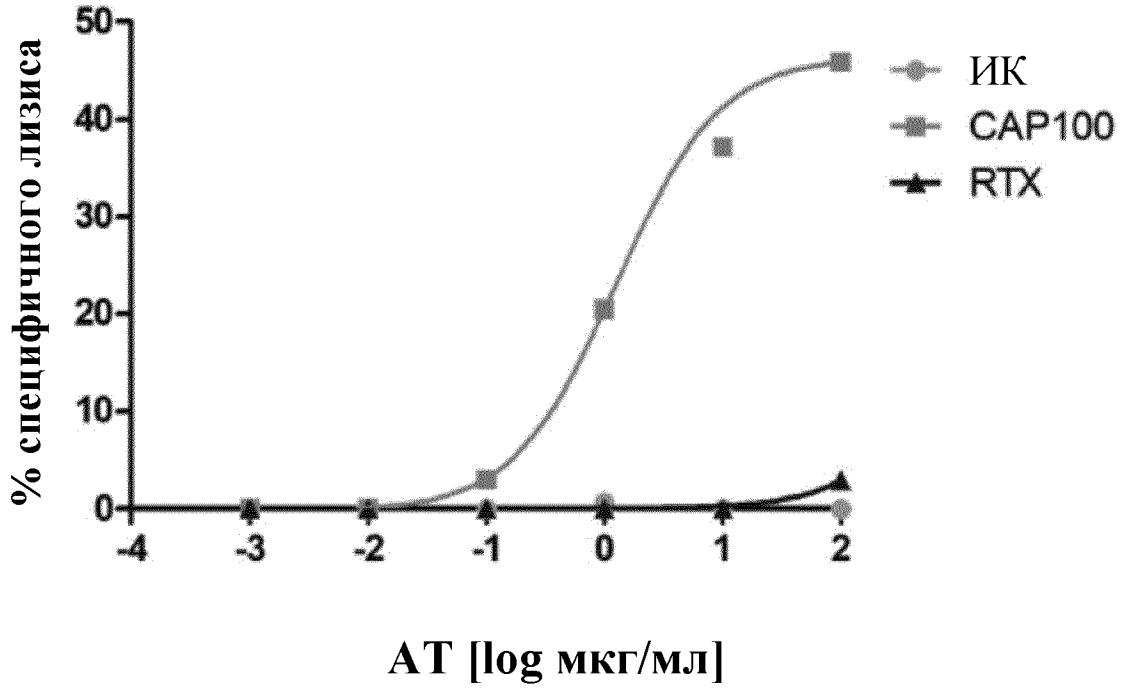

% специфичного лизиса
50
40
30
20
10
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
АТ [log мкг/мл]
ИК
CAP100
RTX

ФИГУРА 8

C


% специфичного лизиса
50
40
30
20
10
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
ИК
CAP100
RTX
АТ [log мкг/мл]

D


% специфичного лизиса
50
40
30
20
10
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
ИК
CAP100
RTX
АТ [log мкг/мл]