

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202290992 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.06.27(22) Дата подачи заявки  
2020.09.18

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 31/475 (2006.01)  
A61K 31/573 (2006.01)  
A61K 31/704 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 43/00 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОР ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ПРИ ОБИНУТУЗУМАБРЕЗИСТЕНТНОМ CD20-ПОЗИТИВНОМ РАКЕ И ЛЕКАРСТВЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, ПОЛУЧЕНИЕ, СПОСОБ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК, ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ СПОСОБ, АНТИТЕЛО-CD20 ТИПА II, СОЕДИНЕНИЯ, ИХ КОМБИНАЦИЯ, УСИЛИТЕЛЬ И ИНДУКТОР, КАЖДЫЙ ОТНОСЯЩИЙСЯ К ЭТОМУ

(31) 2019-184149

(32) 2019.10.04

(33) JP

(86) PCT/JP2020/035457

(87) WO 2021/065568 2021.04.08

(71) Заявитель:

ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ  
КАЙСЯ (JP)

(72) Изобретатель:

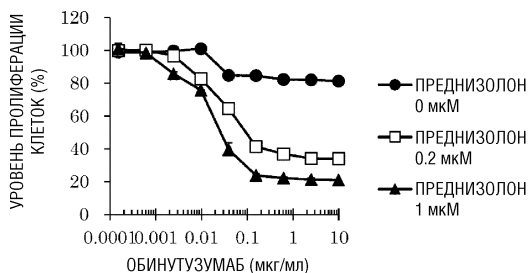
Фудзимура Такааки, Касима Йорико,  
Ока Нацуми (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Среди CD20-позитивных типов рака в некоторых случаях развивается резистентность к обинутузумабу, и некоторые типы рака вновь рецидивируют после лечения с использованием обинутузумаба. Согласно настоящему изобретению для обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака или CD20-позитивного рака, который вновь рецидивировал после лечения с использованием обинутузумаба, используется анти-CD20 антитело типа II в комбинации с одним или более соединениями, выбранными из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристин и их солей и пролекарств. Среди этих соединений могут быть выбраны преднизолон, доксорубицин и их соли и пролекарства. Кроме того, среди этих соединений может быть выбран преднизолон либо его соли или пролекарства.

1A2



A1

202290992

202290992

A1

**ИНГИБИТОР ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК ПРИ ОБИНУТУЗУМАБ-РЕЗИСТЕНТНОМ CD20-ПОЗИТИВНОМ РАКЕ И ЛЕКАРСТВЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, ПОЛУЧЕНИЕ, СПОСОБ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК, ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ СПОСОБ, АНТИТЕЛО-CD20 ТИПА II, СОЕДИНЕНИЯ, ИХ КОМБИНАЦИЯ, УСИЛИТЕЛЬ И ИНДУКТОР, КАЖДЫЙ ОТНОСЯЩИЙСЯ К ЭТОМУ**

**Область техники**

[0001] Настоящее изобретение относится к агентам для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, а также к фармацевтическим композициям, лекарственным средствам, способам подавления пролиферации клеток, способам лечения, анти-CD20 антителам типа II, соединениям, их комбинациям, а также усиливающим агентам и индуцирующим агентам, относящимся к ним.

**Уровень техники**

[0002] В патентном документе 1 раскрывается комбинированное применение анти-CD20 антитела типа II, обладающего повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC), и одного или более химиотерапевтических препаратов, выбранных из группы, состоящей из циклофосфида, винкристина и доксорубина, в лечении CD20-позитивного рака.

[0003] Патентный документ 1: WO 2009/118142 A.

**Сущность изобретения**

[0004] Имеют место случаи CD20-позитивного рака, когда рак является резистентным к обинутузумабу, и случаи, когда рак рецидивирует после лечения, включающего обинутузумаб.

Авторы настоящего изобретения исследовали средства для повышения эффективности лечения, с использованием анти-CD20 антитела типа II, в частности, обинутузумаба, CD20-позитивного рака, который является резистентным к обинутузумабу, или CD20-позитивного рака, который рецидивировал после лечения, включающего обинутузумаб.

[0005] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что при комбинированном применении одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, эффективность лечения с использованием анти-CD20 антител типа II, в частности, обинутузумаба, повышается в отношении обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, или CD20-позитивного рака, который рецидивировал после лечения, включающего обинутузумаб. Среди этих соединений могут быть выбраны преднизолон, доксорубин, и их соли и пролекарства. Кроме того, среди этих соединений может быть выбран преднизолон, или его соль или пролекарство.

Настоящее изобретение обеспечивается на основе следующих указанных идей.

[0006] (1) Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где указанный агент включает анти-CD20 антитело типа II и используется в комбинации с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств.

(2) Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств, где агент включает анти-CD20 антитело типа II.

(3) Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где агент включает одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств, и используется в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(4) Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II, где агент включает одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкрестина и их солей и пролекарств.

(5) Лекарственное средство для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где анти-CD20 антитело типа II и одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств, вводят в комбинации одновременно, по отдельности или последовательно.

(6) Агент по любому из пп.(1)-(4), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(7) Лекарственное средство по п.(5), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(8) Агент по любому из пп.(1)-(4) и (6), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(9) Лекарственное средство по пп.(5) или (7), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(10) Агент по любому из пп.(1)-(4), (6) и (8), где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, их солей и пролекарств.

(11) Лекарственное средство по любому из пп.(5), (7) и (9), где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, их солей и пролекарств.

(12) Агент по любому из пп.(1)-(4), (6), (8) и (10), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(13) Лекарственное средство по любому из пп.(5), (7), (9) и (11), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(14) Агент по любому из пп.(1)-(4), (6), (8), (10) и (12), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(15) Лекарственное средство по любому из пп.(5), (7), (9), (11) и (13), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[0007] (16) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где фармацевтическая композиция содержит анти-CD20 антитело типа II и применяется в комбинации с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств.

(17) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, где фармацевтическая композиция содержит анти-CD20 антитело типа II.

(18) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где фармацевтическая композиция содержит одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, и применяется в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(19) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II, где фармацевтическая композиция содержит одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств.

(20) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где анти-CD20 антитело типа II и одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, вводят в комбинации одновременно, по отдельности или последовательно.

(21) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(16)-(20), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(22) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(16)-(21), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(23) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(16)-(22), где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, их солей и пролекарств.

(24) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(16)-(23), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(25) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(16)-(24), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[8] (26) Применение анти-CD20 антитела типа II в производстве агента для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств.

(27) Применение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств, в производстве агента для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(28) Применение анти-CD20 антитела типа II в производстве фармацевтической композиции для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств.

(29) Применение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств, в производстве фармацевтической композиции для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(30) Применение анти-CD20 антитела типа II и одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств, в производстве фармацевтической композиции для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака.

(31) Применение по любому из пп.(26)-(30), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(32) Применение по любому из пп.(26)-(31), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(33) Применение по любому из пп.(26)-(32), где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, и их солей и

пролекарств.

(34) Применение по любому из пп.(26)-(33), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(35) Применение по любому из пп.(26)-(34), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(36) Анти-CD20 антитело типа II для применения в подавлении пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств.

(37) Одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, для применения в подавлении пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(38) Комбинация анти-CD20 антитела типа II и одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, для применения в подавлении пролиферации клеток обинутузумаб-устойчивого CD20-позитивного рака.

(39) Анти-CD20 антитело типа II для применения в лечении обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств.

(40) Одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, для применения в лечении обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(41) Комбинация анти-CD20 антитела типа II и одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, или их комбинации, для применения в лечении обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака.

(42) Анти-CD20 антитело типа II по пп.(36) или (39), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(43) Одно или более соединений по пп.(37) или (40), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(44) Комбинация по пп.(38) или (41), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(45) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(36), (39) и (42), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(46) Одно или более соединений по любому из пп.(37), (40) и (43), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(47) Комбинация по любому из пп.(38), (41) и (44), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(48) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(36), (39), (42) и (45), где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, и их солей и пролекарств.

(49) Одно или более соединений по любому из пп.(37), (40), (43) и (46), где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, их солей и пролекарств.

(50) Комбинация по любому из пп.(38), (41), (44) и (47), где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, и их солей и пролекарств.

(51) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп. (36), (39), (42), (45) и (48), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(52) Одно или более соединений по любому из пп.(37), (40), (43), (46) и (49), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(53) Комбинация по любому из пп.(38), (41), (44), (47) и (50), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(54) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(36), (39), (42), (45), (48) и (51), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(55) Одно или более соединений по любому из пп.(37), (40), (43), (46), (49) и (52), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[0009] (56) Способ подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, включающий:

- i) введение анти-CD20 антитела типа II; и
- ii) введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств; в обинутузумаб-резистентную CD20-позитивную раковую клетку.

(57) Способ по п.(56), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(58) Способ по пп.(56) или (57), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(59) Способ по любому из пп.(56)-(58), где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, и их солей и пролекарств.

(60) Способ по любому из пп.(56)-(59), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(61) Способ по любому из пп.(56)-(60), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(62) Способ по любому из пп.(56)-(61), где способ представляет собой способ *in vitro* или способ *in vivo*, не относящийся к человеку.

[0010] (63) Способ лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, включающий:

- i) введение анти-CD20 антитела типа II; и
- ii) введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств; в организм, имеющий обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак.

(64) Способ лечения по п.(63), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(65) Способ лечения по пп.(63) или (64), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(66) Способ лечения по любому из пп.(63)-(65), где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, их солей и пролекарств.

(67) Способ лечения по любому из пп.(63)-(66), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(68) Способ лечения по любому из пп.(63)-(67), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[0011] (69) Усиливающий агент для остановки клеточного цикла или клеточной гибели под действием анти-CD20 антитела типа II в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, где усиливающий агент включает преднизолон или его соль, или пролекарство.

(70) Усиливающий агент для повышения остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, где усиливающий агент включает преднизолон или его соль, или пролекарство, и его вводят посредством комбинированного применения с анти-CD20 антителом типа II,



где комбинированное применение повышает остановку клеточного цикла или клеточную гибель в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

(71) Усиливающий агент для повышения индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, где усиливающий агент включает преднизолон или его соль, или пролекарство, и используется в комбинации с анти-CD20 антителом типа II.

(72) Индуцирующий агент для остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, для повышения индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, где индуцирующий агент включает анти-CD20 антитело типа II, и его вводят посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение преднизолона, или его соли или пролекарства, и комбинированное применение усиливает индукцию остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

(73) Индуцирующий агент для повышения индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, где индуцирующий агент включает анти-CD20 антитело типа II и используется в комбинации с химиотерапией, включающей введение преднизолона или его соли, или пролекарства.

(74) Усиливающий агент для повышения индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, где анти-CD20 антитело типа II и преднизолон или его соль, или пролекарство, вводят в комбинации одновременно, по отдельности или последовательно.

(75) Агент по любому из пп.(69)-(74), где пролекарство представляет собой преднизон, и анти-CD20 антитело типа II и преднизон вводят в организм.

(76) Агент по любому из пп.(69)-(75), где остановка клеточного цикла представляет собой остановку в G0/G1-фазе.

(77) Агент по любому из пп.(69)-(76), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(78) Агент по любому из пп.(69)-(77), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(79) Агент по любому из пп.(69)-(78), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(80) Агент по любому из пп.(69)-(79), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[0012] (81) Применение преднизолона, или его соли или пролекарства, в

производстве усиливающего агента для остановки клеточного цикла или клеточной гибели под действием анти-CD20 антитела типа II в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

(82) Применение анти-CD20 антитела типа II в производстве индуцирующего агента для остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, для повышения индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, где индуцирующий агент вводят посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение преднизолона, или его соли или пролекарства, и комбинированное применение повышает индукцию остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

(83) Применение анти-CD20 антитела типа II и преднизолона, или его соли или пролекарства, в производстве усиливающего агента для повышения индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

(84) Применение по любому из пп.(81)-(83), где пролекарство представляет собой преднизон, и анти-CD20 антитело типа II и преднизон вводят в организм.

(85) Применение по любому из пп.(81)-(84), где остановка клеточного цикла представляет собой остановку в G0/G1-фазе.

(86) Применение по любому из пп.(81)-(85), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(87) Применение по любому из пп.(81)-(86), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(88) Применение по любому из пп.(81)-(87), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(89) Применение по любому из пп.(81)-(88), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(90) Преднизолон, или его соль или пролекарство, для применения в повышении остановки клеточного цикла или клеточной гибели под действием анти-CD20 антитела типа II в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

(91) Анти-CD20 антитело типа II для применения в повышении индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение преднизолона, его соли или пролекарства.

(92) Комбинация анти-CD20 антитела типа II и преднизолона, или его соли или

пролекарства, для применения в повышении индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутизумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

(93) Преднизолон, или его соль или пролекарство, по п.(90), где пролекарство представляет собой преднизон, и анти-CD20 антитело типа II и преднизон вводят в организм.

(94) Анти-CD20 антитело типа II по п.(91), где пролекарство представляет собой преднизон, и анти-CD20 антитело типа II и преднизон вводят в организм.

(95) Комбинация по п.(92), где пролекарство представляет собой преднизон, и анти-CD20 антитело типа II и преднизон вводят в организм.

(96) Преднизолон, или его соль или пролекарство, по пп.(90) или (93), где остановка клеточного цикла представляет собой остановку в G0/G1-фазе.

(97) Анти-CD20 антитело типа II по пп.(91) или (94), где остановка клеточного цикла представляет собой остановку в G0/G1-фазе.

(98) Комбинация по пп.(92) или (95), где остановка клеточного цикла представляет собой остановку в G0/G1-фазе.

(99) Преднизолон, или его соль или пролекарство, по любому из пп.(90), (93) и (96), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(100) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(91), (94) и (97), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(101) Комбинация по любому из пп.(92), (95) и (98), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(102) Преднизолон, или его соль или пролекарство, по любому из пп.(90), (93), (96) и (99), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутизумаб.

(103) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(91), (94), (97) и (100), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутизумаб.

(104) Комбинация по любому из пп.(92), (95), (98) и (101), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутизумаб.

(105) Преднизолон, или его соль или пролекарство, по любому из пп.(90), (93), (96), (99) и (102), где обинутизумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутизумабом.

(106) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(91), (94), (97), (100) и (103), где обинутизумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутизумабом.

(107) Комбинация по любому из пп.(92), (95), (98), (101) и (104), где обинутизумаб-резистентный CD20-позитивный рак, представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутизумабом.

(108) Преднизолон, или его соль или пролекарство, по любому из пп.(90), (93), (96), (99), (102) и (105), где обинутизумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при котором

обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(109) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(91), (94), (97), (100), (103) и (106), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(110) Комбинация по любому из пп.(92), (95), (98), (101), (104) и (107), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[0013] (111) Способ повышения остановки клеточного цикла или клеточной гибели под действием анти-CD20-антитела типа II в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, включающий введение преднизолонa, или его соли или пролекарства.

(112) Способ индуцирования остановки клеточного цикла или клеточной гибели клеток в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, включающий введение анти-CD20 антитела типа II в комбинации с химиотерапией, включающей введение преднизолонa, или его соли или пролекарства, где комбинированное применение повышает остановку клеточного цикла или клеточную гибель в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

(113) Способ по пп.(111) или (112), где пролекарство представляет собой преднизон, и анти-CD20 антитело типа II и преднизон вводят в организм.

(114) Способ по любому из пп.(111)-(113), где остановка клеточного цикла представляет собой остановку в G0/G1-фазе.

(115) Способ по любому из пп.(111)-(114), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(116) Способ по любому из пп.(111)-(115), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(117) Способ по любому из пп.(111)-(116), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(118) Способ по любому из пп.(111)-(117), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(119) Способ по любому из пп.(111)-(118), где способ представляет собой способ *in vitro* или способ *in vivo*, не относящийся к человеку.

[0015] (120) Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где указанный агент включает анти-CD20

антитело типа II и используется в комбинации с химиотерапией, включающей введение агента, активирующего каспазы.

(121) Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение агента, активирующего каспазы, где агент включает анти-CD20 антитело типа II.

(122) Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где указанный агент включает агент, активирующий каспазы, и применяется в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(123) Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II, где агент включает агент, активирующий каспазы.

(124) Лекарственное средство для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где анти-CD20 антитело типа II и агент, активирующий каспазы, вводят в комбинации одновременно, по отдельности или последовательно.

(125) Агент по любому из пп.(120)-(123), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(126) Лекарственное средство по п.(124), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(127) Агент по любому из пп.(120)-(123) и (125), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(128) Лекарственное средство по пп.(124) или (126), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(129) Агент по любому из пп.(120)-(123), (125) и (127), где агент, активирующий каспазы, представляет собой доксорубицин или его соль.

(130) Лекарственное средство по любому из пп.(124), (126) и (128), где агент, активирующий каспазы, представляет собой доксорубицин или его соль.

(131) Агент по любому из пп.(120)-(123), (125), (127) и (129), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(132) Лекарственное средство по любому из пп.(124), (126), (128) и (130), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(133) Агент по любому из пп.(120)-(123), (125), (127), (129) и (131), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(134) Лекарственное средство по любому из пп.(124), (126), (128), (130) и (132), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который

рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[0015] (135) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где фармацевтическая композиция содержит анти-CD20 антитело типа II и применяется в комбинации с химиотерапией, включающей введение агента, активирующего каспазы.

(136) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение агента, активирующего каспазы, где фармацевтическая композиция содержит анти-CD20 антитело типа II.

(137) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где фармацевтическая композиция содержит агент, активирующий каспазы, и применяется в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(138) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II, где фармацевтическая композиция содержит агент, активирующий каспазы.

(139) Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где анти-CD20 антитело типа II и агент, активирующий каспазы, вводят в комбинации одновременно, по отдельности или последовательно.

(140) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(135)-(139), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(141) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(135)-(140), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(142) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(135)-(141), где агент, активирующий каспазы, представляет собой доксорубин или его соль.

(143) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(135)-(142), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(144) Фармацевтическая композиция по любому из пп.(135)-(143), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[0016] (145) Применение анти-CD20 антитела типа II в производстве агента для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение агента, активирующего каспазы.

(146) Применение агента, активирующего каспазы, в производстве агента для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака

посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(147) Применение анти-CD20 антитела типа II в производстве фармацевтической композиции для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение агента, активирующего каспазы.

(148) Применение агента, активирующего каспазы, в производстве фармацевтической композиции для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(149) Применение анти-CD20 антитела типа II и агента, активирующего каспазы, в производстве фармацевтической композиции для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака.

(150) Применение по любому из пп.(145)-(149), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(151) Применение по любому из пп.(145)-(150), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(152) Применение по любому из пп.(145)-(151), где агент, активирующий каспазы, представляет собой доксорубицин или его соль.

(153) Применение по любому из пп.(145)-(152), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(154) Применение по любому из пп.(145)-(153), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(155) Анти-CD20 антитело типа II для применения в подавлении пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение агента, активирующего каспазы.

(156) Агент, активирующий каспазы, для применения в подавлении пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(157) Анти-CD20 антитело типа II для применения в лечении обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение агента, активирующего каспазы.

(158) Агент, активирующий каспазы, для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака посредством комбинированного применения с лечением анти-CD20 антителом типа II.

(159) Комбинация анти-CD20 антитела типа II и агента, активирующего каспазы, для применения в лечении обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака.

(160) Анти-CD20 антитело типа II по пп.(155) или (157), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(161) Агент, активирующий каспазы, по пп.(156) или (158), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(162) Комбинация по п.(159), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(163) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(155), (157) и (160), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(164) Агент, активирующий каспазы, по любому из пп.(156), (158) и (161), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(165) Комбинация по пп.(159) или (162), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(166) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(155), (157), (160) и (163), где агент, активирующий каспазы, представляет собой доксорубицин или его соль.

(167) Агент, активирующий каспазы, по любому из пп.(156), (158), (161) и (164), где агент, активирующий каспазы, представляет собой доксорубицин или его соль.

(168) Комбинация по любому из пп.(159), (162) и (165), где агент, активирующий каспазы, представляет собой доксорубицин или его соль.

(169) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(155), (157), (160), (163) и (166), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(170) Агент, активирующий каспазы, по любому из пп.(156), (158), (161), (164) и (167), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(171) Комбинация по любому из пп.(159), (162), (165) и (168), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(172) Анти-CD20 антитело типа II по любому из пп.(155), (157), (160), (163), (166) и (169), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(173) Агент, активирующий каспазы, по любому из пп.(156), (158), (161), (164), (167) и (170), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(174) Комбинация по любому из пп.(159), (162), (165), (168) и (171), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят



один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[0017] (175) Способ подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, включающий:

i) введение анти-CD20 антитела типа II; и

ii) введение агента, активирующего каспазы;

в обинутузумаб-резистентную CD20-позитивную раковую клетку.

(176) Способ по п.(175), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(177) Способ по пп.(175) или (176), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(178) Способ по любому из пп.(175)-(177), где агент, активирующий каспазы, представляет собой доксорубицин или его соль.

(179) Способ по любому из пп.(175)-(178), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(180) Способ по любому из пп.(175)-(179), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

(181) Способ по любому из пп.(175)-(180), где способ представляет собой способ *in vitro* или способ *in vivo*, не относящийся к человеку.

[0018] (182) Способ лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, включающий:

i) введение анти-CD20 антитела типа II; и

ii) введение агента, активирующего каспазы;

в организм, имеющий обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак.

(183) Способ лечения по п.(182), где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

(184) Способ лечения по пп.(182) или (183), где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

(185) Способ лечения по любому из (182)-(184), где агент, активирующий каспазы, представляет собой доксорубицин или его соль.

(186) Способ лечения по любому из пп.(182)-(185), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

(187) Способ лечения по любому из пп.(182)-(186), где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

### **Преимущественные эффекты изобретения**

[0019] В соответствии с настоящим изобретением эффекты лечения с использованием анти-CD20 антител типа II, в частности, обинутузумаба, повышаются в отношении обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, или CD20-позитивного рака, который рецидивировал после лечения, включающего обинутузумаб, посредством комбинированного применения с одним или более соединениями, выбранными из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств. Среди этих соединений могут быть выбраны преднизолон, доксорубин, и их соли и пролекарства. Кроме того, среди этих соединений может быть выбран преднизолон или его соль или пролекарство.

#### **Краткое описание фигур**

[0020] На фиг. 1 показан уровень пролиферации клеток по сравнению с отсутствием добавления обинутузумаба при каждой концентрации добавленного преднизолона, когда обеспечивали воздействие обинутузумаба одного или обинутузумаба и преднизолона в комбинации на клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели IA2.

На фиг. 2 приведены результаты исследования, полученные с окрашиванием DAPI, показывающие соотношение фаз клеточного цикла после того, как обеспечивали воздействие обинутузумаба одного, преднизолона одного или обинутузумаба и преднизолона в комбинации на клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели IA2. «Комбинация» относится к комбинированному применению обинутузумаба и преднизолона.

На фиг. 3 приведены результаты исследования с использованием вестерн-блоттинга уровней экспрессии внутриклеточных белков Rb, Skp2 и p27, а также фосфорилирование белка Rb, при обеспечении воздействия обинутузумаба одного, преднизолона одного или комбинации обинутузумаба и преднизолона на клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели IA2.

На фиг. 4 приведены результаты исследования с помощью FACS-анализа при оценке фрагментации ДНК методом TUNEL при обеспечении воздействия обинутузумаба одного, преднизолона одного или комбинации обинутузумаба и преднизолона на клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели IA2. «Комбинация» относится к комбинированному применению обинутузумаба и преднизолона.

На фиг. 5 показан уровень пролиферации клеток по сравнению с отсутствием добавления обинутузумаба для каждой концентрации добавленного доксорубина, когда обеспечивали воздействие обинутузумаба одного или обинутузумаба и доксорубина в комбинации на клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели IA2.

На фиг. 6 приведены результаты исследования активности каспаз 3/7, когда обеспечивали воздействие обинутузумаба одного, доксорубина одного или обинутузумаба и доксорубина в комбинации на клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели IA2, по сравнению с отсутствием добавления двух агентов.

На фиг. 7 приведены результаты исследования с помощью FACS-анализа при оценке фрагментации ДНК методом TUNEL при обеспечении воздействия обинутузумаба одного, доксорубицина одного или комбинации обинутузумаба и доксорубицина на клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели IA2, в случаях, когда панингингатор каспаз был добавлен и где его не добавляли. «Комбинация» относится к комбинированному применению обинутузумаба и доксорубицина.

На фиг. 8 показан уровень пролиферации клеток по сравнению с отсутствием добавления обинутузумаба, когда обеспечивали воздействие обинутузумаба одного или обинутузумаба и доксорубицина в комбинации на клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели IA2 в присутствии или в отсутствии панингингатора каспаз.

На фиг. 9 показана чувствительность к ADCC, когда обеспечивали воздействие обинутузумаба на исходную клеточную линию RL и резистентные к ADCC клеточные линии RL-E300-1, RL-E300-2, RL-E300-8 и RL-E300-22.

На фиг. 10 показана экспрессия CD20 в группе, обработанной преднизолоном, и в группе, не обработанной преднизолоном, исходной клеточной линии RL и резистентных к ADCC клеточных линий RL-E300-1, RL-E300-2, RL-E300-8 и RL-E300-22.

На фиг. 11 показана чувствительность к ADCC, когда обеспечивали воздействие обинутузумаба на исходную клеточную линию RL и резистентные к ADCC клеточные линии RL-E300-1 и RL-E300-2 после обработки преднизолоном, и когда обеспечивали воздействие обинутузумаба без обработки преднизолоном.

На фиг. 12 показан объем опухолей у мышей, которым прививали ADCC-резистентную клеточную линию RL-E300-1, когда мышам вводили IgG (30 мг/кг) + носитель (группа IgG+Dw), обинутузумаб (30 мг/кг) + носитель (группа OBI+Dw), IgG (30 мг/кг) + преднизолон (4 мг/кг) (группа IgG+PSL) или обинутузумаб (30 мг/кг) + преднизолон (4 мг/кг) (группа OBI+PSL).

### **Описание вариантов осуществления изобретения**

[0021] А. Агент или лекарственное средство для подавления пролиферации клеток

(a1) Первый вариант осуществления

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к агенту или лекарственному средству для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака.

В первом примере варианта осуществления агент включает анти-CD20 антитело типа II. Агент используется в комбинации с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств.

Во втором примере варианта осуществления агент включает одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств. Агент используется в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

В третьем примере варианта осуществления лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, где анти-CD20 антитело типа II и одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств, вводят в комбинации одновременно, по отдельности или последовательно.

[0022] В варианте осуществления В-клеточная лимфома приводится в качестве примера CD20-позитивного рака. В варианте осуществления В-клеточная неходжкинская лимфома приведена в качестве примера В-клеточной лимфомы. В варианте осуществления CD20-позитивный рак предпочтительно представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

В соответствии с классификацией ВОЗ, примеры В-клеточной неходжкинской лимфомы включают В-лимфобластный лейкоз/лимфому из предшественников В-клеток, представляющих собой новообразования из клеток-предшественников; В-клеточный хронический лимфолейкоз/лимфому из малых лимфоцитов, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазмочитарную лимфому, В-клеточную лимфому маргинальной зоны селезенки ( $\pm$  «ворсинчатые» лимфоциты), волосатоклеточный лейкоз, плазмоклеточную миелому/плазмочитому, экстранодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны MALT-типа, нодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны ( $\pm$  моноцитоподобные В-клетки), фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (включая медиастинальную В-крупноклеточную лимфому и первичную эффузионную лимфому) и лимфому Беркитта со зрелым В-клеточным новообразованием, представляющим клетки-предшественники. Среди лимфом в варианте осуществления В-клеточная неходжкинская лимфома предпочтительно представляет собой фолликулярную лимфому.

Неходжкинские лимфомы классифицируют на основе степени их злокачественности, подразделяя на лимфомы низкой степени злокачественности, лимфомы средней степени злокачественности и лимфомы высокой степени злокачественности. Примеры согласно более детальной классификации В-клеточных неходжкинских лимфом включают фолликулярную лимфому 1 или 2 степени, и MALT-лимфому в качестве лимфом низкой степени злокачественности, фолликулярную лимфому 3 степени, мантийноклеточную лимфому и диффузную В-крупноклеточную лимфому в качестве лимфом средней степени злокачественности, и лимфому Беркитта в качестве лимфомы высокой степени злокачественности. По степени злокачественности В-клеточная неходжкинская лимфома включает фолликулярную лимфому и, таким образом, предпочтительно представляет собой лимфому низкой или средней степени злокачественности.

[0023] В варианте осуществления CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом, приведен в качестве примера обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака. Термин «резистентность к обинутузумабу» взаимозаменяем с термином «устойчивость к обинутузумабу». CD20-позитивный рак, который рецидивировал после

проведения лечения, включающего обинутузумаб, входит в понятие термина CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом. В варианте осуществления обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный, предпочтительно представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом. Обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак более предпочтительно представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому, которую ранее лечили обинутузумабом.

В рамках настоящего изобретения, термин «резистентность» не ограничивается, при условии, что он относится к состоянию, при котором клетка или субъект не отвечают (также относится к отсутствию чувствительности) на лечение или терапию заболевания и/или обладают сниженной способностью индукции значительного ответа (например, частичного ответа и/или полного ответа). Например, обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который либо совсем не отвечает на лечение, либо не показывает значительного ответа, такого как частичный ответ или полный ответ, на лечение с использованием обинутузумаба. Если агент вводят при раке с наличием «резистентности» к нему, то не только не будут получены желаемые эффекты, но в некоторых случаях рак может даже дальше прогрессировать или превратиться в рак с более высокой степенью злокачественности. Кроме того, «резистентность» может представлять собой «присущую резистентность» или «приобретенную резистентность». В частности, приобретенная резистентность к агентам, лекарственным средствам и т.д. по настоящему изобретению может быть резистентностью, которая развилась после обычного лечения обинутузумабом. Например, когда лечение, даже если оно было эффективным в начале, продолжают повторять, то рак может со временем приобрести резистентность к лечению, и в некоторых случаях рак не регрессирует или даже прогрессирует в присутствии обинутузумаба. Кроме того, как поясняется в разделе G, выражение «резистентность к обинутузумабу» взаимозаменяемо с выражением «резистентность к анти-CD20 антителу типа II». Как указано ниже, кроме антител, обозначенных как «обинутузумаб (Genetical Combination)» с Японским принятым названием (JAN), обинутузумаб может также включать его биоаналоги и биобеттеры (улучшенные варианты), а также анти-CD20 антитела типа II, которые представляют собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, аминокислотные последовательности которых, по меньшей мере, на 80%, 85%, 90%, 98% или 99% идентичны аминокислотной последовательности обинутузумаба. Таким образом, выражение «резистентность к обинутузумабу» может также включать резистентность к «обинутузумабу (Genetical Combination)», биоаналогам и биобеттерам, а также к вышеуказанным анти-CD20 антителам типа II.

Другие примеры обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака включают рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба. Индукционная терапия представляет собой терапию, направленную на достижение, по меньшей мере, частичного ответа или ответа, при котором не наблюдается

прогрессирования заболевания, с использованием надежного лечения посредством комбинированного применения обинутумаба и другой химиотерапии. Противоопухолевые эффекты, включая частичный ответ или прогрессирование заболевания, оцениваются на основе «Критериев оценки ответа на лечение злокачественной лимфомы (пересмотренных)» Международной рабочей группы (IWG). Индукционную терапию обычно проводят в течение 24 недель. Для индукционной терапии с комбинированным применением обинутумаба и СНОР-терапии или СVP-терапии, три недели введения обинутумаба составляют один цикл, и введение проводят в течение восьми циклов. Для индукционной терапии при комбинированном применении с бендамустином, четыре недели введения обинутумаба составляют один цикл, и введение проводят в течение шести циклов. В первом цикле индукционной терапии обинутумаб вводят на день 1, 8 и 15. Во втором и последующих циклах обинутумаб вводят на день 1. В тех случаях, когда другую химиотерапию прекращают во время индукционной терапии по причинам, таким как токсичность, то можно продолжить введение одного обинутумаба. Между тем, поддерживающая терапия представляет собой монотерапию обинутумабом, которую продолжают в течение максимум двух лет после индукционной терапии для пациентов, достигших ответа, по меньшей мере, частичного ответа, на индукционную терапию. При поддерживающей терапии обинутумаб вводят один раз в два месяца. При индукционной терапии и поддерживающей терапии обинутумаб вводят 1 раз в день по 1000 мг каждый раз. Несмотря на то, что способ введения особым образом не ограничивается, введение предпочтительно осуществляется внутривенной инфузией.

В дополнение к вышеуказанному раку, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой вводят обинутумаб один после индукционной терапии с использованием обинутумаба, другим примером обинутумаб-резистентного CD20-позитивного рака является CD20-позитивный рак, который стал резистентным к обинутумабу в случае, когда другая химиотерапия была прекращена, и введение одного обинутумаба было продолжено в рамках вышеуказанной индукционной терапии.

Во всех этих вариантах осуществления карцинома при обинутумаб-резистентном CD20-позитивном раке предпочтительно представляет собой фолликулярную лимфому.

[0024] В варианте осуществления анти-CD20 антитело типа II соответствующим образом выбрано из числа известных на время производства агента. В варианте осуществления обинутумаб приводится в качестве примера анти-CD20 антитела типа II. В варианте осуществления анти-CD20 антитело типа II предпочтительно представляет собой обинутумаб.

[0025] В рамках настоящего изобретения, термин «анти-CD20 антитело» относится к антителу, которое специфически связывается с CD20. На основании связывающей и биологической активности анти-CD20 антител для антигена CD20, анти-CD20-антитела разделяются на два типа (анти-CD20 антитела типа I и типа II) согласно Cragg M.S. et al., Blood, 103 (2004) 2738-2743 и Cragg M.S. et al., Blood, 101 (2003) 1045-1052. См. таблицу

1.

[0026]

Таблица 1

Свойства анти-CD20 антител типа I и типа II

| Анти-CD20 антитела типа I                                   | Анти-CD20 антитела типа II                                             |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Эпитоп CD20 типа I                                          | Эпитоп CD20 типа II                                                    |
| Локализуют CD20 на липидных рафтах                          | Не локализуют CD20 на липидных рафтах                                  |
| Повышенная CDC (в случае изотипа IgG1)                      | Пониженная CDC (в случае изотипа IgG1)                                 |
| Активность ADCC (в случае изотипа IgG1)                     | Активность ADCC (в случае изотипа IgG1)                                |
| Полная связывающая способность                              | Пониженная связывающая способность                                     |
| Гомотипическая агрегация                                    | Высокая гомотипическая агрегация                                       |
| Индукция апоптоза после перекрестного сшивания с рецептором | Индукция высокой гибели клеток без перекрестного сшивания с рецептором |

[0027] Одним из существенных свойств анти-CD20 антител типа I и типа II является способ их связывания. Таким образом, анти-CD20 антитела типа I и типа II классифицируются по соотношению связывающих активностей антитела с CD20 на клетках Raji (ATCC № CCL-86) по отношению к ритуксимабу.

[0028] Анти-CD20 антитела типа II имеют соотношение связывающих активностей анти-CD20 антитела с CD20 на клетках Raji (ATCC № CCL-86) по отношению к ритуксимабу, составляющее 0,3-0,6, предпочтительно 0,35-0,55, и более предпочтительно 0,4-0,5. Примеры таких анти-CD20 антител типа II включают, например, тозитумаб (B1IgG2a), гуманизированное IgG1 антитело B-Ly1 (химерное гуманизированное IgG1 антитело, раскрытое в WO 2005/044859 A), 11B8IgG1 (раскрытое в WO 2004/035607 A) и AT80IgG1. Анти-CD20 антитело типа II предпочтительно представляет собой моноклональное антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и гуманизированное антитело B-Ly1 (раскрытое в WO 2005/044859 A).

[0029] В отличие от анти-CD20 антител типа II, анти-CD20 антитела типа I имеют соотношение связывающих активностей анти-CD20-антитела с CD20 на клетках Raji (ATCC № CCL-86) по отношению к ритуксимабу, составляющее 0,8-1,2, предпочтительно 0,9-1,1. Примеры таких анти-CD20 антител типа I включают, например, ритуксимаб, 1F5IgG2a (ECACC, гибридома; Press O.W. et al., Blood, 69/2 (1987) 584-591), H147IgG3 (ECACC, гибридома), 2C6IgG1 (раскрытое в WO 2005/103081 A), 2F2IgG1 (раскрытое в WO 2004/035607 A и WO 2005/103081 A) и 2H7IgG1 (раскрытое в WO 2004/056312 A).

[0030] «Соотношение связывающих активностей с CD20 анти-CD20 антитела на клетках Raji (ATCC № CCL-86) по отношению к ритуксимабу» измеряют с помощью прямой иммунофлуоресценции (измеренная средняя интенсивность флуоресценции

(MFI)) с использованием анти-CD20 антитела, конъюгированного с Cy5, и ритуксимаба, конъюгированного с Cy5, на клеточном сортере FACS (Becton Dickinson) с клетками Raji (ATCC № CCL-86), описанными в примере 2, и рассчитывают следующим образом.

[0031][формула 1]

Соотношение связывающих активностей с CD20 на клетках Raji (ATCC № CCL-86)

$$\frac{\text{MFI (Cy5-анти-CD20 антитело)}}{\text{MFI (Cy5-ритуксимаб)}} \times \frac{\text{Соотношение мечения Cy5 (Cy5-ритуксимаб) (Cy5-ритуксимаб)}}{\text{Уровень мечения Cy5 (Cy5-анти-CD20 антитело)}}$$

[0032] MFI представляет собой среднюю интенсивность флуоресценции. В рамках настоящего изобретения, «уровень мечения Cy5» относится к числу молекул метки Cy5 в расчете на молекулу антитела. Как правило, анти-CD20 антитело типа II имеет соотношение связывающей активности с CD20 на клетках Raji (ATCC No. CCL-86), анти-CD20 антитела типа II по отношению к ритуксимабу, составляющее 0,3-0,6, предпочтительно 0,35-0,55 и более предпочтительно 0,4-0,5. В рамках настоящего изобретения, анти-CD20 антитело типа II обладают повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). «Антитело с повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC)» или «антитело с повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC)», как здесь определено, имеет повышенную ADCC, что определяется любым подходящим методом, известным специалистам в данной области. Один из известных анализов ADCC in vitro является следующим:

1) в вышеуказанном анализе используются клетки-мишени, о которых известно, что они экспрессируют антиген-мишень, распознаваемый антигенсвязывающим участком антитела;

2) в вышеуказанном анализе в качестве эффекторных клеток используются моноклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), выделенные из крови произвольно выбранного здорового донора;

3) вышеуказанный анализ проводят в соответствии со следующим протоколом:

i) PBMC выделяют с использованием стандартного центрифугирования в градиенте плотности и суспендируют при титре  $5 \times 10^6$  клеток/мл в среде для культивирования клеток RPMI;

ii) клетки-мишени выращивают стандартным методом культивирования тканей, собирают в экспоненциальной фазе роста с жизнеспособностью выше 90%, промывают в среде для культивирования клеток RPMI, вводят метку в виде 100 мКи  $^{51}\text{Cr}$ , дважды промывают средой для культивирования клеток; и ресуспендируют в культуральной среде с титром  $10^5$  клеток/мл;

iii) 100 мкл вышеуказанной конечной суспензии клеток-мишеней переносят в каждую лунку 96-луночного планшета для микротитрования;

iv) готовят серийные разведения антитела в диапазоне от 4000 нг/мл до 0,04 нг/мл в



среде для культивирования клеток, 50 мкл полученных растворов антител добавляют к клеткам-мишеням в 96-луночном планшете для микротитрования, и различные концентрации антител, охватывающие весь вышеуказанный диапазон концентраций, тестируют в трех повторах;

v) для получения контролей максимального высвобождения (MR) вместо растворов антител (iv выше) добавляют 50 мкл 2% (VN) водного раствора неионогенного поверхностно-активного вещества (Nonidet, Sigma, St. Louis) в три дополнительные лунки в планшете, содержащие меченые клетки-мишени;

vi) для получения контролей спонтанного высвобождения (SR) вместо растворов антител (iv выше) добавляют 50 мкл среды для культивирования клеток RPMI в три дополнительные лунки в планшете, содержащие меченые клетки-мишени;

vii) затем 96-луночный планшет для микротитрования центрифугируют при  $50 \times g$  в течение 1 мин и инкубируют при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч;

viii) 50 мкл суспензии РВМС (i выше) добавляют в каждую лунку для достижения соотношения эффекторные клетки:клетки-мишени 25:1, и планшет помещают в инкубатор в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  при  $37^{\circ}\text{C}$  на 4 ч;

ix) из каждой лунки отбирают бесклеточный супернатант и количественно определяют выделенную в процессе эксперимента радиоактивность (ER) с использованием гамма-счетчика;

x) процент специфического лизиса рассчитывают для каждой концентрации антитела по формуле  $(ER - MR)/(MR - SR) \times 100$ , где ER представляет собой среднее значение измеренной радиоактивности (см. ix выше) для данной концентрации антител, MR представляет собой среднее значение измеренной радиоактивности (см. ix выше) для MR-контролей (см. v выше), и SR представляет собой среднее значение измеренной радиоактивности (см. ix выше) для SR-контролей (см. vi выше);

4) «повышенную ADCC» определяют либо как увеличение максимального процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона концентраций антитела, и/или как снижение концентрации антитела, необходимой для достижения половины максимального процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона концентраций антитела. Повышение ADCC оценивают относительно ADCC с использованием вышеуказанного аналогичного анализа, опосредованной одним и тем же антителом, полученным в одном и том же типе клеток-хозяев, с использованием одних и тех же стандартных методов получения, очистки, формуляции и хранения, которые хорошо известны специалистам в данной области, но которое не продуцировалось клеткой-хозяином, сконструированной для сверхэкспрессии GnTIII.

[0033] «Повышенную ADCC» можно получить с использованием гликоинженерии антител. Это означает естественные клеточно-опосредованные эффекторные функции моноклональных антител посредством инженерии их олигосахаридных компонентов, как описано в публикации Umana P. et al. *Nature Biotechnol.*, 17 (1999) 176-180 и патенте США

№ 6602684.

[0034] Термин «комплементзависимая цитотоксичность (CDC)» относится к лизису опухолевых клеток-мишеней человека антителом по настоящему изобретению в присутствии комплемента. CDC предпочтительно измеряют обработкой препарата CD20-экспрессирующих клеток анти-CD20 антителом по настоящему изобретению в присутствии комплемента. Если антитело в концентрации 100 нМ индуцирует лизис (гибель клеток) 20% или более опухолевых клеток через 4 ч, то наблюдают CDC. В этом анализе предпочтительно используются опухолевые клетки, меченные  $^{51}\text{Cr}$  или Eu, и измеряют высвобожденные  $^{51}\text{Cr}$  или Eu. Контроль включает инкубацию опухолевых клеток-мишеней с комплементом, и без антитела.

[0035] Как правило, анти-CD20 антитела типа II изотипа IgG1 демонстрируют характерную CDC-активность. Анти-CD20 антитела типа II имеют пониженную CDC-активность (для изотипа IgG1) по сравнению с анти-CD20 антителами типа I изотипа IgG1. Анти-CD20 антитела типа I предпочтительно представляют собой антитела изотипа IgG1.

[0036] Антитело «ритуксимаб» (референсное антитело; пример анти-CD20 антитела типа I) представляет собой генетически сконструированное химерное мышинное моноклональное антитело, направленное против антигена CD20 человека, антитело, содержащее константные домены гамма 1 человека. Данное химерное антитело обозначено как «C2B8» в патенте США № 5736137 (Andersen K.C. et. al.), IDEC Pharmaceuticals Corporation, выданном 17 апреля 1998 г. Ритуксимаб одобрен для лечения пациентов с рецидивирующей, рефрактерной, фолликулярной CD20-позитивной В-клеточной неходжкинской лимфомой с низкой степенью злокачественности. Исследования механизма действия *in vitro* показали, что ритуксимаб проявляет комплементзависимую цитотоксичность для опухолей человека (CDC) (Reff M.E. et. al., Blood, 83 (2) (1994) 435-445). Кроме того, он проявляет значительную активность в анализах, в которых оценивают антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

[0037] Вышеуказанный олигосахаридный компонент может оказывать существенное влияние на свойства, касающиеся эффективности гликопротеина, включая физическую стабильность, устойчивость к воздействию протеаз, взаимодействия с иммунной системой, фармакокинетические характеристики и специфическую биологическую активность. Такие свойства могут зависеть не только от присутствия или отсутствия олигосахаридов, но также и от их конкретных структур. Можно сделать некоторые общие выводы о связи структуры олигосахаридов и функцией гликопротеина. Например, некоторые олигосахаридные структуры опосредуют быстрый клиренс гликопротеина из кровотока в результате взаимодействий со специфическими углеводсвязывающими белками, в то время как другие могут быть связаны антителами и «запускать» нежелательные иммунные ответы (Jenkins et al., Nature Biotechnol., 14 (1996) 975-981).

[0038] Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для

производства имеющих терапевтическое значение гликопротеинов за счет их способности гликозилировать белки с получением форм, наиболее совместимых для применения у человека (Cumming et al., *Glycobiology*, 1 (1991) 115-130; Jenkins et al., *Nature Biotechnol.*, 14 (1996) 975-981). Бактерии очень редко гликозилируют белки и подобно другим типам обычно применяемых хозяев, таких как дрожжи, нитчатые, клетки насекомых и растений, продуцируют паттерны гликозилирования, приводящие к быстрому клиренсу из кровотока, нежелательным иммунным взаимодействиям и в некоторых конкретных случаях к пониженной биологической активности. Среди клеток млекопитающих в последние 20 лет наиболее часто используют клетки яичника китайского хомячка (СНО). Помимо заранее определенного пригодного паттерна гликозилирования эти клетки позволяют постоянно получать генетически стабильные высокопродуктивные клоны клеточных линий. Их можно культивировать при высоких концентрациях в простых биореакторах с использованием бессывороточных сред, позволяет разрабатывать безопасные и воспроизводимые биологические процессы. К другим обычно применяемым клеткам животных относятся клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки мышинной миеломы линий NS0 и SP2/0. В последние годы изучали методы получения с использованием трансгенных животных (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.*, 14 (1996) 975-981).

[0039] Все антитела содержат углеводные структуры в консервативных положениях в константных областях тяжелых цепей, где каждый изотип несет различный набор N-связанных углеводных структур, которые различным образом влияют на сборку белка, его секрецию или функциональную активность (Wright A. and Morrison S.L., *Trends Biotechn.*, 15 (1997) 26-32). Структура присоединенных N-связанных углеводов в значительной степени варьируется в зависимости от уровня процессинга, и они могут включать имеющие высокое содержание маннозы, полиразветвленные и биантенные комплексные олигосахариды (Wright A. и Morrison S.L., *Trends Biotechn.*, 15 (1997) 26-32). Как правило, имеет место гетерогенный процессинг коровых олигосахаридных структур, присоединенных в конкретном сайте гликозилирования, в результате чего даже моноклональные антитела находятся в многочисленных гликоформах. Аналогично этому было установлено, что основные различия в гликозилировании антител имеют место между клеточными линиями и даже для конкретной клеточной линии, выращенной в различных условиях культивирования, можно обнаружить небольшие различия (Lifely M.R. et al., *Glycobiology*, 5(8) (1995) 813-822).

[0040] Одним из путей достижения значительного повышения эффективности при сохранении простого процесса производства и возможности избежать значительных нежелательных побочных эффектов является усиление природных опосредуемых клеткой эффекторных функций моноклональных антител посредством конструирования их олигосахаридного компонента согласно методу, описанному в публикации Umana P. et al., *Nature Biotechnol.*, 17 (1999) 176-180 и в патенте США № 6602684. Антитела IgG1 типа, представляющие собой антитела, наиболее часто используемые в иммунотерапии рака,

являются гликопротеинами, которые имеют консервативный N-связанный сайт гликозилирования в положении Asn297 в каждом CH2-домене. Два комплексных биантенных олигосахарида, присоединенных к Asn297, находятся между CH2-доменами, образуя обширные контакты с каркасом полипептида и их наличие является существенным для способности антитела опосредовать эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) (Lifely M.R. et al., *Glycobiology*, 5 (1995) 813-822; Jefferis R. et al., *Immunol. Rev.*, 163 (1998) 59-76; Wright A. and Morrison S.L., *Trends Biotechnol.*, 15 (1997) 26-32).

[0041] Было показано, что сверхэкспрессия в клетках яичника китайского хомячка (CHO)  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III («GnTIII»), гликозилтрансферазы, катализирующей образование бисекционных олигосахаридов, существенно повышает ADCC-активность *in vitro* химерного моноклонального антитела против нейробластомы (chCE7), продуцированного сконструированными клетками CHO (Umafia P. et al., *Nature Biotechnol.*, 17 (1999) 176-180; и публикация международной заявки на патент WO 99/54342, полное содержание которых включено здесь посредством ссылки). Антитело chCE7 относится к большому классу неконъюгированных моноклональных антител, которые обладают высокой аффинностью и специфичностью в отношении опухолей, но которые невозможно использовать в клинике при их получении в стандартных клеточных линиях, в которых отсутствует фермент GnTIII (Umana P. et al., *Nature Biotechnol.*, 17 (1999) 176-180). Это исследование было первым, в котором установлено, что существенное повышение ADCC-активности можно достичь посредством конструирования продуцирующих антитело клеток, экспрессирующих GnTIII, что приводит также к увеличению содержания связанных с константной областью (Fc) бисекционных олигосахаридов, включая бисекционные нефукозилированные олигосахариды, по сравнению с уровнями, присутствующие во встречающихся в естественных условиях антителах.

[0042] Обинутузумаб, как правило, гликоинженерное, генетически рекомбинантное гуманизированное моноклональное анти-CD20 антитело, представляет собой гликопротеин, проявляющий свойства анти-CD20 антитела типа II, состоит из двух H-цепей, состоящих из 449 аминокислотных остатков, и двух L-цепей, содержащих 219 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу примерно 148000-150000. В H-цепи определяющий комплементарность участок 1 (сокращенно «CDR», то же самое в дальнейшем по тексту) представлен аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 1, CDR2 представлен аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 2, и CDR3 представлен аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 3. В L-цепи CDR1 представлен аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 4, CDR2 представлен аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 4. ID NO: 5, и CDR3 представлен аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 6. Варибельная область H-цепи (HV-область) представлена SEQ ID NO: 7. Варибельная область L-цепи (LV-область)

представлена SEQ ID NO: 8. Н-цепь представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 9, и L-цепь представляет собой полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления анти-CD20 антитело типа II может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере, с 80%, 85%, 90%, 98% или 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью обинутузумаба. В одном варианте осуществления анти-CD20 антитело типа II может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR, каждый из которых содержит аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью каждого CDR в тяжелой цепи и легкой цепи обинутузумаба. В одном варианте осуществления анти-CD20-антитело типа II может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HV-область и LV-область, имеющую, по меньшей мере, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью соответствующей HV-области и LV-области обинутузумаба.

В рамках настоящего изобретения, обинутузумаб включает антитела, обозначенные как «обинутузумаб (Genetical Combination)» с Японским принятым названием (JAN), а также их биоаналоги и биобеттеры. Обинутузумаб предпочтительно представляет собой «обинутузумаб (Genetical Recombination)» и его биоаналоги. В рамках настоящего изобретения, биоаналоги относятся к антителам, имеющим ту же аминокислотную последовательность, что и вышеуказанные Н-цепь и L-цепь, необязательно с углеводными цепями, отличными от таковых в «обинутузумабе (Genetical Recombination)», и обладающие биологической активностью, эквивалентной или превышающей активность «обинутузумаба» (Genetical Recombination)».

В рамках настоящего изобретения, биобеттеры относятся к антителам, имеющим сходство аминокислотной последовательности, по меньшей мере, на уровне 90% и менее 100% с вышеуказанными Н-цепью и L-цепью, необязательно с углеводными цепями, отличными от таковых в «обинутузумабе (Genetical Recombination)», и обладающие биологической активностью, эквивалентной или превышающей активность «обинутузумаба» (Genetical Recombination)».

Анти-CD20 антитело типа II классифицируются отдельно от типа I в соответствии с их связывающей и биологической активностью в отношении антигена CD20, и это подробно описано в WO 2009/118142 A.

[0043] Анти-CD20 антитело типа II после того, как оно было сформулировано с использованием методов, известных на время производства, вводят в организм субъекта. Способ введения анти-CD20-антитела типа II такой же, как в варианте осуществления, описанном в разделе «Е. Способы лечения» ниже.

[0044] Преднизон приведен в качестве примера пролекарства преднизолона.

Соли преднизолона, доксорубицина и винкристина могут быть выбраны, соответственно, из тех, которые, как известно, используются в лекарственных препаратах. Примером соли доксорубицина является его гидрохлорид. Примером соли винкристина является его сульфат.

[0045] Преднизолон, доксорубицин, винкристин и их соли после того, как они были формулированы с использованием методов, известных на время производства, вводят в организм субъекта. Способ введения этих агентов такой же, как и в варианте осуществления, описанном в разделе «Е. Способы лечения» ниже.

[0046] В варианте осуществления одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств, предпочтительно выбирают из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, их солей и пролекарств. Кроме того, предпочтительным является преднизолон, или его соль или пролекарство. Наиболее предпочтительным является преднизолон или преднизон.

[0047] (a2) Второй вариант осуществления

В еще одном варианте осуществления «одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств» в вышеуказанном первом варианте осуществления могут быть заменены агентом, активирующим каспазы. Примеры агентов, активирующих каспазы, описаны в WO 2004/002428 A и WO 2003/097806 A.

В этом другом варианте осуществления агенты, активирующие каспазы 3/7, приведены в качестве примеров агентов, активирующих каспазы. Доксорубицин или его соль приведены в качестве примера агента, активирующего каспазы 3/7. В дополнение к доксорубицину и его солям могут быть выбраны известные агенты, активирующие каспазы 3/7. Примеры известных агентов, активирующих каспазы 3/7, описаны в WO 2006/128173 A, WO 2006/074187 A, JP 2008-308455 A, JP 2008-189649 A и WO 2004/053144 A. Агент, активирующий каспазы, предпочтительно представляет собой доксорубицин или его соли. Другие конкретные конфигурации варианта осуществления являются такими же, как в первом варианте осуществления, описанном выше.

[0048] (a3) Третий вариант осуществления

В еще одном варианте осуществления «агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака» в вышеуказанном первом варианте осуществления может быть заменен усиливающим агентом для остановки клеточного цикла или клеточной гибели под действием анти-CD20 антитела типа II в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки. В варианте осуществления агент включает преднизолон, или его соль или пролекарство.

[0049] В еще одном варианте осуществления «агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака» в вышеуказанном первом варианте осуществления может быть заменен индуцирующим агентом для повышения

индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки. В варианте осуществления агент включает анти-CD20 антитело типа II.

В еще одном варианте осуществления «лекарственное средство для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака» в вышеуказанном первом варианте осуществления может быть заменено агентом для повышения индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, где анти-CD20 антитело типа II и преднизолон, или его соль или пролекарство, вводят в комбинации одновременно, по отдельности или последовательно.

[0050] В третьем варианте осуществления остановка клеточного цикла особым образом не ограничивается и выбрана из остановки в любой из G0/G1-фазы, S-фазы, G2-фазы и M-фазы. Среди этих фаз остановка клеточного цикла предпочтительно находится в G0/G1-фазе.

[0051] В третьем варианте осуществления, где преднизолон используется в качестве пролекарства преднизолона, в организм вводят анти-CD20 антитело типа II и преднизон. В этом случае преднизон превращается в преднизолон и функционирует вместе с анти-CD20 антителом типа II на обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак в организме.

В третьем варианте осуществления преднизолон или его соль или пролекарство предпочтительно представляют собой преднизолон или преднизон.

[0052] Другие конкретные конфигурации третьего варианта осуществления являются такими же, как в первом варианте осуществления, описанном выше.

[0053] (a4) Другие конфигурации в первом-третьем вариантах осуществления

В вышеприведенных первом-третьем вариантах осуществления, где агенты формулируются, составы готовят смешиванием антитела, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают, не ограничиваясь этим, следующие: буферы, такие как фосфатный, цитратный и на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 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 металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры фармацевтически приемлемых носителей в данном документе дополнительно включают диспергаторы лекарственных средств для интерстициального введения, такие как растворимый активный в нейтральных условиях гликопротеин гиалуронидазы (sHASEGP) (например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Конкретные примеры sHASEGP и способы их использования (включая rHuPH20) описаны в заявках на патент США 2005/0260186 А и 2006/0104968 А. В одном аспекте sHASEGP комбинируют с одной или более дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназа.

[0054] Примеры лиофилизированных составов антител описаны в патенте США № 6267958. Водные растворы составов антител включают растворы, описанные в патенте США № 6171586 и WO 2006/044908 А, где последний состав включает гистидин-ацетатный буфер.

[0055] Активные ингредиенты также можно включить в микрокапсулы, приготовленные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации (например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно), в коллоидные системы доставки лекарственных препаратов (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в виде макроэмульсий. Такие методики раскрыты в монографии Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980).

[0056] Можно приготовить составы с замедленным высвобождением. Подходящие примеры составов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, и матрицы имеют форму формованных изделий, например, пленок или микрокапсул.

[0057] Составы, используемые для введения *in vivo*, обычно должны быть стерильными. Стерилизацию можно легко провести, например, фильтрованием через стерилизующий фильтр.

[0058] Когда эти активные ингредиенты включаются по отдельности в два или более составов, то отдельные составы можно вводить одновременно или по отдельности или последовательно с установленным временным интервалом. Два или более составов также можно соответственно вводить с разной частотой в день. Агенты, лекарственные средства и фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально или парентерально, системно или местно. Когда эти активные ингредиенты включаются в два или более составов по отдельности, то отдельные составы также можно вводить разными путями.

[0059] В. Фармацевтическая композиция



В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака.

В первом примере варианта осуществления фармацевтическая композиция содержит анти-CD20 антитело типа II. Фармацевтическую композицию используют в комбинации с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств.

Во втором примере варианта осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств. Фармацевтическую композицию применяют в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

Во втором примере варианта осуществления фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию, в которой анти-CD20 антитело типа II и одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, вводят в комбинации одновременно, по отдельности или последовательно.

[0060] В варианте осуществления общие примеры и предпочтительные примеры «анти-CD20 антитела типа II», «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств», «обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака» и «состава» являются такими же, как описаны выше для «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток».

Вышеупомянутая замена и конкретная конфигурация «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств» на «агент, активирующий каспазу», указанный во втором варианте осуществления «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток», также может применяться к этому варианту осуществления.

«Другие конфигурации в первом-третьем вариантах осуществления», описанные выше, могут быть применены к другой конфигурации в данном варианте осуществления.

[0061] С. Способы производства

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к производству агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток. В варианте осуществления клетка представляет собой обинутузумаб-резистентную CD20-позитивную раковую клетку.

В первом примере варианта осуществления в производстве используют анти-CD20 антитело типа II. Агент используют в комбинации с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств.

Во втором примере варианта осуществления в производстве используют одно или

более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств. Агент используется в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

В третьем примере варианта осуществления в производстве лекарственного средства используют анти-CD20-антитело типа II и одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств.

[0062] В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к производству фармацевтической композиции для лечения рака. В варианте осуществления рак представляет собой обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак.

В первом примере варианта осуществления в производстве используют анти-CD20-антитело типа II. Фармацевтическую композицию применяют в комбинации с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств.

Во втором примере варианта осуществления в производстве используют одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств. Фармацевтическую композицию применяют в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

В третьем примере варианта осуществления в производстве используют анти-CD20-антитело типа II и одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств. Анти-CD20 антитело типа II и одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина и их солей и пролекарств, вводят в комбинации одновременно, по отдельности или последовательно.

[0063] В этих вариантах осуществления обинутузумаб может быть получен специалистами в данной области в соответствии с известными способами, описанными в WO 2005/044859 А. Агенты и фармацевтические композиции могут быть получены смешиванием обинутузумаба с другими ингредиентами с использованием обычных технологий.

[0064] В этих вариантах осуществления общие примеры и предпочтительные примеры «анти-CD20 антитела типа II», «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств», и «обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака» такие же, как описаны выше для «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток».

Вышеупомянутая замена и конкретная конфигурация «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств» на «агент, активирующий каспазу», указанный во втором варианте осуществления «агента или лекарственного средства для подавления

пролиферации клеток», также может применяться к этому варианту осуществления.

[0065] Подобно третьему варианту осуществления «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток», описанному выше, в качестве первого примера вышеуказанного варианта осуществления «производства агента для подавления пролиферации клеток», агент может быть заменен на усиливающий агент для остановки клеточного цикла или клеточной гибели под действием анти-CD20-антитела типа II в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки. В производстве варианта осуществления после замены используют преднизолон, или его соль или пролекарство.

Кроме того, в качестве второго примера, агент может быть заменен индуцирующим агентом для остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки. В производстве варианта осуществления после замены используют анти-CD20-антитело типа II. Агент вводят посредством комбинированного применения с химиотерапией, включающей введение преднизолона, или его соли или пролекарства. При таком комбинированном применении повышается остановка клеточного цикла или клеточная гибель в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

В этих примерах остановка клеточного цикла особым образом не ограничивается и выбрана из остановки в любой из G0/G1-фазы, S-фазы, G2-фазы и M-фазы. Среди этих фаз остановка клеточного цикла предпочтительно находится в G0/G1-фазе.

Кроме того, когда преднизолон используется в качестве пролекарства преднизолона, то в организм вводят анти-CD20 антитело типа II и преднизон. В этом случае преднизон превращается в преднизолон и функционирует вместе с анти-CD20 антителом типа II на обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак в организме.

Другие конкретные конфигурации в любом из этих примеров являются такими же, как в варианте осуществления «производства агента для подавления пролиферации клеток» и в третьем варианте осуществления «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток», описанных выше.

[0066] D. Способ подавления пролиферации клеток

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам подавления пролиферации клеток. В варианте осуществления клетка представляет собой обинутузумаб-резистентную CD20-позитивную раковую клетку.

В одном варианте осуществления способ включает: i) введение анти-CD20 антитела типа II; и ii) введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств; в обинутузумаб-резистентную CD20-позитивную раковую клетку.

Способ в варианте осуществления представляет собой способ *in vitro* или *in vivo*. Способ в варианте осуществления предпочтительно представляет собой способ *in vitro* или способ *in vivo*, не относящийся к человеку.

[0067] В этом варианте осуществления общие примеры и предпочтительные

примеры «анти-CD20 антитела типа II», «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств», и «обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака» такие же, как описаны выше для «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток».

Вышеупомянутая замена «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств» на «агент, активирующий каспазы», который представляет собой альтернативный вариант осуществления, указанный в разделе «агент или лекарственное средство для подавления пролиферации клеток» выше, также может применяться к этому варианту осуществления.

[0068] Подобно третьему варианту осуществления «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток» выше, в качестве первого примера вышеуказанного варианта осуществления «способа подавления пролиферации клеток» способ может быть заменен на способ повышения остановки клеточного цикла или клеточной гибели под действием анти-CD20 антитела типа II в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки. Способ согласно варианту осуществления после замены включает введение преднизолона, или его соли или пролекарства.

Кроме того, в качестве второго примера способ может быть заменен на способ индуцирования остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки. Способ согласно варианту осуществления после замены включает введение анти-CD20 антитела типа II. Это введение осуществляется в комбинации с химиотерапией, включающей введение преднизолона, или его соли или пролекарства. При таком комбинированном применении повышается остановка клеточного цикла или клеточная гибель в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

В этих примерах остановка клеточного цикла особым образом не ограничивается и выбрана из остановки в любой из G0/G1-фазы, S-фазы, G2-фазы и M-фазы. Среди этих фаз остановка клеточного цикла предпочтительно находится в G0/G1-фазе.

Кроме того, когда преднизолон используется в виде пролекарства преднизолона, то в организм вводят анти-CD20 антитело типа II и преднизон. В этом случае преднизон превращается в преднизолон и функционирует вместе с анти-CD20 антителом типа II на обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак в организме.

Другие конкретные конфигурации в любом из этих примеров являются такими же, как в варианте осуществления «способа подавления пролиферации клеток» и в третьем варианте осуществления «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток», описанные выше.

[0069] Е. Способ лечения

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения CD20-позитивного рака. В варианте осуществления CD20-позитивный рак

представляет собой обинутизумаб-резистентный CD20-позитивный рак. Способ лечения включает: i) введение анти-CD20 антитела типа II; и ii) введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств, в организм, имеющий обинутизумаб-резистентную CD20-позитивную раковую клетку.

[0070] В отношении введения анти-CD20 антитела типа II в варианте осуществления, то его терапевтически эффективное количество можно вводить с помощью способа введения, известного специалистам в данной области. Примеры способа введения включают внутривенное введение и подкожное введение.

В отношении введения одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств, в варианте осуществления, то их терапевтически эффективное количество можно вводить способом введения, известным специалистам в данной области. Примеры способа введения включают внутривенное введение, подкожное введение и пероральное введение.

[0071] «Терапевтически эффективное количество» представляет собой минимальную концентрацию, необходимую, по меньшей мере, для получения измеримого эффекта в ослаблении или предупреждении определенного расстройства. В рамках настоящего изобретения, терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от факторов, например, болезненного состояния, возраста, пола и массы тела пациента, а также от способности антитела индуцировать желаемый ответ у субъекта. Кроме того, терапевтически эффективным количеством является такое количество, при котором терапевтически благоприятные эффекты превосходят любые токсические или неблагоприятные эффекты антитела.

[0072] В способе лечения по настоящему изобретению анти-CD20 антитело типа II и одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, предпочтительно вводят в комбинации, и их можно вводить одновременно, по отдельности или последовательно.

[0073] Анти-CD20 антитело типа II и преднизолон, доксорубин, винкрестин, а также их соли и пролекарства, можно вводить одновременно или по отдельности или последовательно с установленным временным интервалом в виде отдельных составов агентов, лекарственных средств, фармацевтических композиций и т.д., описанных здесь. Два или более состава можно соответственно вводить с разной частотой в день и соответственно можно вводить с разной частотой с интервалом в определенное количество дней. Каждый состав можно вводить одному субъекту по отдельным схемам введения, как показано ниже.

[0074] Анти-CD20 антитело типа II, например, можно вводить взрослому человеку внутривенной капельной инфузией в дозе примерно от 1 мг до примерно 10 г на введение, предпочтительно примерно от 10 мг до 10 г на введение, предпочтительно примерно от 100 мг до примерно 10 г на введение, и наиболее предпочтительно примерно 1000 мг на введение. Введение анти-CD20 антитела типа II предпочтительно проводят один раз в

день на день введения, но суточную дозу также можно разделить на две или более доз в сутки с учетом состояния пациента, терапевтических эффектов и т. д.

[0075] При условии, что достигаются желаемые эффекты, режим введения анти-CD20 антитела типа II не ограничивается и может быть определен, в зависимости от обстоятельств, специалистами в данной области, в зависимости от состояния пациента, анамнеза лечения и стадий лечения (индукционная терапия или поддерживающая терапия).

Продолжительность лечения с использованием анти-CD20 антитела типа II может продолжаться максимум два года в зависимости от состояния пациента и терапевтического эффекта.

[0076] Каждый цикл введения анти-CD20-антитела типа II может продолжаться примерно от одной до примерно восьми недель, предпочтительно примерно от двух до примерно четырех недель и наиболее предпочтительно примерно от трех до примерно четырех недель. Количество циклов лечения не ограничивается, при условии, что достигаются желаемые эффекты, но лечение можно проводить в течение примерно от 1 до примерно 20 циклов, предпочтительно примерно от 3 до 10 циклов и наиболее предпочтительно примерно от 5 до примерно 8 циклов. Кроме того, в течение периода, когда анти-CD20 антитело типа II вводят в комбинации с любым из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей или пролекарств, анти-CD20 антитело типа II предпочтительно вводят в течение 8 циклов, где каждый цикл составляет примерно три недели.

[0077] В циклах введения, составляющих лечение, анти-CD20-антитело типа II можно вводить с одинаковыми интервалами или с разными интервалами. Например, в первом цикле лечения антитело можно вводить один раз в день на дни 1, 8 и 15 после начала лечения и один раз в день на день 1 во втором и последующих циклах.

[0078] Кроме того, для анти-CD20 антитела типа II продолжительность каждого цикла и число циклов лечения могут различаться между индукционной и поддерживающей терапией. Например, при индукционной терапии можно проводить от шести до восьми циклов, где каждый цикл длится от трех до четырех недель, а при поддерживающей терапии введение может продолжаться в течение двух лет (примерно 12 циклов), где каждый цикл составляет примерно восемь недель (примерно два месяца).

[0079] Анти-CD20 антитело типа II, например, можно вводить в ходе индукционной терапии на дни 1, 8 и 15 в первом цикле после начала лечения и на день 1 в каждом из второго и последующих циклов, где каждый цикл составляет от трех до четырех недель. После этого поддерживающая терапия может продолжаться максимум два года, где каждый цикл составляет примерно восемь недель (примерно два месяца).

[0080] Преднизолон, или его соль или пролекарство, например, можно вводить взрослому человеку перорально в дозе примерно от 1 до примерно 200 мг в день в зависимости от состояния пациента и терапевтических эффектов, но предпочтительно вводят примерно от 5 до примерно 60 мг в сутки. Кроме того, хотя дозу можно вводить

один раз в день или в виде двух или более разделенных доз в день, дозу предпочтительно вводят один раз в день или в виде двух-четырёх разделенных доз в день.

[0081] В зависимости от состояния пациента и терапевтических эффектов доксорубицин, или его соль или пролекарство, например, можно вводить взрослому человеку внутривенной капельной инфузией в дозе примерно от 5 до примерно 100 мг в день, но предпочтительно вводить примерно от 20 (0,4 мг/кг массы тела) до примерно 30 мг (0,6 мг/кг массы тела) в день. Кроме того, доза при каждом введении и суточная доза могут быть соответствующим образом изменены в соответствии с режимом введения. Например, в случае внутривенного болюсного введения один раз в день в течение двух-трех дней с последующей отменой в течение от семи до десяти дней, предпочтительно вводить примерно 20 мг один раз в день и повторять этот цикл в течение двух-трех циклов. В качестве альтернативы, например, в случае внутривенного болюсного введения один раз в день в течение трех последовательных дней с последующим 18-дневным перерывом, предпочтительно, чтобы вводилось примерно от 20 до примерно 30 мг один раз в день, и этот цикл повторялся в течение двух-трех циклов. Кроме того, доксорубицин, или его соль или пролекарство, особенно при использовании в комбинации с другим противоопухолевым средством, можно вводить внутривенно один раз в день в дозе примерно от 25 до примерно 50 мг/м<sup>2</sup> (площадь поверхности тела) (при повторном применении следующее введение начинают с интервалом не менее двух недель) или вводят внутривенно в дозе примерно 40 мг/м<sup>2</sup> (площадь поверхности тела) на сутки 1, примерно 30 мг/м<sup>2</sup> (площадь поверхности тела) на сутки 8 с последующим 20-дневным перерывом. Такой цикл можно повторять.

[0082] В зависимости от состояния пациента и терапевтических эффектов винкристина, или его соль или пролекарство, например, можно вводить взрослому человеку внутривенной капельной инфузией в дозе примерно от 0,01 до примерно 0,1 мг/кг массы тела на введение, но предпочтительно вводить в дозе примерно от 0,02 до примерно 0,05 мг/кг массы тела на одно введение. С учетом побочных эффектов, предпочтительно, чтобы доза при каждом введении не превышала 2 мг. Кроме того, винкристина, или его соль или пролекарство, можно вводить с интервалом введения примерно 1-14 дней, но предпочтительно введение проводят примерно один раз в неделю.

[0083] В данном варианте осуществления субъект, которому проводится лечение, представляет собой организм с CD20-позитивным раком. Субъект особым образом не ограничивается, при условии, что субъект представляет собой организм, имеющий CD20-позитивный рак. В варианте осуществления млекопитающие, включая человека, приведены в качестве примеров организма. В варианте осуществления организм предпочтительно представляет собой млекопитающее, включая человека. В варианте осуществления в качестве примеров млекопитающих приведены грызуны и приматы, включая человека. В варианте осуществления в качестве примеров грызунов приведены мыши и крысы. В варианте осуществления люди и яванские макаки приведены в качестве примеров приматов, включая человека. В варианте осуществления млекопитающим

предпочтительно является примат, включая человека. В варианте осуществления примат, включая человека, предпочтительно представляет собой человека или яванского макака и более предпочтительно человека.

[0084] В этом варианте осуществления общие примеры и предпочтительные примеры «анти-CD20 антитела типа II», «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств», и «обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака» такие же, как описанные выше для «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток».

Вышеупомянутая замена «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств» на «агент, активирующий каспазы», который представляет собой альтернативный вариант осуществления, упомянутый для «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток», также может применяться к этому варианту осуществления.

[0085] F. Анти-CD20 антитело типа II, соединение и комбинация

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-CD20 антителам типа II, соединениям и их комбинациям для применения в подавлении пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, повышения индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки, или усиления остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

В первом примере варианта осуществления анти-CD20 антитело типа II по настоящему изобретению представляет собой анти-CD20 антитело типа II для применения в комбинации с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и его солей и пролекарств.

Во втором примере варианта осуществления анти-CD20 антитело типа II по настоящему изобретению представляет собой анти-CD20 антитело типа II для применения в комбинации с химиотерапией, включающей введение агента, активирующего каспазы.

В третьем примере варианта осуществления соединение по настоящему изобретению представляет собой одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств, для применения в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

В четвертом примере варианта осуществления соединение представляет собой агент, активирующий каспазы, для применения в комбинации с лечением анти-CD20-антителом типа II.

В пятом примере варианта осуществления комбинация представляет собой комбинацию анти-CD20 антитела типа II и одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и



пролекарств.

В шестом примере варианта осуществления комбинация представляет собой комбинацию анти-CD20-антитела типа II и агента, активирующего каспазы.

[0086] В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к преднизолону, или его соли или пролекарству, для применения для усиления остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к анти-CD20-антителу типа II и комбинации анти-CD20-антитела типа II и преднизолонa, или его соли или пролекарства, для применения в усилении индукции остановки клеточного цикла или клеточной гибели в отношении обинутузумаб-резистентной CD20-позитивной раковой клетки.

Остановка клеточного цикла здесь не ограничивается, пока индуцируется гибель клеток, и может быть остановкой в G0/G1-фазе.

[0087] В отношении анти-CD20-антител типа II, соединений и комбинаций по настоящему изобретению, CD20-позитивный рак может представлять собой В-клеточную неходжкинскую лимфому, анти-CD20-антитело типа II может представлять собой обинутузумаб, и соединение может быть выбрано из группы, состоящей из преднизолонa, доксорубина, и их солей и пролекарств. Кроме того, обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак, может представлять собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом, или рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

[0088] В отношении анти-CD20-антител типа II, соединений и комбинаций по настоящему изобретению, то общие примеры и предпочтительные примеры «анти-CD20-антитела типа II», «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолонa, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств», «преднизолонa, или его соли или пролекарства» и «обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака» являются такими же, как описано выше для «агента или лекарственного средства для подавления пролиферации клеток».

Вышеупомянутая замена «одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолонa, доксорубина, винкристина, их солей и пролекарств» на «агент, активирующий каспазы», который представляет собой альтернативный вариант осуществления, упомянутый в разделе «агент или лекарственное средство для подавления пролиферации клеток», также может применяться к этому варианту осуществления.

[0089] G. Обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак

В одном варианте осуществления «обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак» в вышеуказанных вариантах осуществления A-F может быть заменен на «резистентный к анти-CD20 антителу CD20-позитивный рак».

Анти-CD20 антитело типа II при «обинутузумаб-резистентном CD20-позитивном

раке» включает антитела, которые специфически связываются с CD20, как определено выше в разделе А. Анти-CD20 антитело включает анти-CD20 антитела типа I и типа II, как определено в таблице 1. Анти-CD20 антитело предпочтительно представляет собой анти-CD20 антитело типа II. Среди анти-CD20 антител типа II предпочтительным является обинутузумаб.

[0090] Даже среди CD20-позитивных типов рака клиническая проблема заключается в том, как продолжать использовать анти-CD20-антитела типа II, такие как обинутузумаб, при обинутузумаб-резистентных CD20-позитивных типах рака, или CD20-позитивных типах рака, которые рецидивировали после лечения обинутузумабом.

В качестве одного варианта осуществления в таких ситуациях настоящее изобретение обеспечивает средства для усиления эффектов лечения с использованием анти-CD20 антител типа II, в частности, обинутузумаба, посредством комбинированного применения с одним или более соединениями, выбранными из группы, состоящей из преднизолона, доксорубина, винкристина, и их солей и пролекарств, при обинутузумаб-резистентных CD20-позитивных типах рака, или CD20-позитивных типах рака, которые рецидивировали после лечения, включающего обинутузумаб. Среди них преднизолон, доксорубин, и их соли и пролекарства, легко проявляют их эффекты, и преднизолон, или его соль или пролекарство, особенно легко проявляют эффекты. Остановка клеточного цикла в G0/G1-фазе при комбинированном применении обинутузумаба и преднизолона рассматривается в качестве механизма, вовлеченного в проявление эффектов.

[0091] Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые здесь, полностью включены здесь посредством ссылки, для указания того, что каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент конкретно и индивидуально включается посредством ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая приведенные здесь определения, будет иметь преимущественную силу.

## **Примеры**

### **[0092] (Пример 1)**

Линию клеток диффузной В-крупноклеточной лимфомы человека с герминативным центром SU-DHL-4 обрабатывали N-этил-N-нитрозомочевинной в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 ч для случайного введения генных мутаций. После этого добавляли обинутузумаб в концентрации 200 мкг/мл и проводили культивирование при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> в течение трех недель. Клетки, которые пролиферировали, клонировали с использованием пикопипеток при визуальном осмотре под микроскопом, и клоны 1A2, 1D2 и 3A4 определяли как клоны клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, полученные из отдельных клеток. В результате четырехдневного теста оценки пролиферации клеток концентрация обинутузумаба, вызывающая 50% ингибирование пролиферации клеток, составила 0,037 мкг/мл в SU-DHL-4, но была равной, по меньшей мере, 200 мкг/мл для всех трех клонов клеток,

резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, указывая на то, что клоны клеток, резистентные к обинутузумаб-опосредованной гибели, обладают пониженной чувствительностью к обинутузумабу *in vitro*.

[0093] Клоны клеток, резистентные к обинутузумаб-опосредованной гибели, высевали из расчета  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в 96-луночные планшеты, обинутузумаб (1 мкг/мл) использовали в комбинации с противоопухолевым агентом, выбранным из 4-гидропероксициклофосфамида (100 нМ), который является активным метаболитом алкилирующего агента циклофосфамида, доксорубина (10 нМ), который представляет собой противоопухолевый антибиотик на основе антрацилина, винкристина (1 нМ), который представляет собой противоопухолевый агент на основе алкалоида барвинка, или преднизолона (1 мкМ), который представляет собой синтетический глюкокортикоид надпочечников. Через 4 суток культивирования при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> определяли количество жизнеспособных клеток с использованием набора для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo 3D (Promega). По уровням пролиферации клеток при добавлении каждого одного агента и при добавлении обоих агентов по сравнению с отсутствием добавления агента, количественно оценивали эффекты при комбинированном применении с использованием модели независимости Блисса, и результаты приведены в таблице 2. Эффекты комбинированного применения оценивали по полученным числовым значениям следующим образом:  $\log_{10}$  (уровень пролиферации клеток при добавлении обоих агентов) -  $\log_{10}$  (уровень пролиферации клеток при добавлении одного обинутузумаба) -  $\log_{10}$  (уровень пролиферации клеток при добавлении одного противоопухолевого агента). В данном случае для комбинированного применения числовое значение меньше 0 означает сверхаддитивный эффект, 0 означает аддитивный эффект, и больше 0 означает субаддитивный эффект (J. Biopharm. Stat., 2012; 22(3): 535-543).

[0094]

Таблица 2

| Агенты, использованные в комбинации | 1A2   | 1D2   | 3A4   |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|
| 4-гидропероксициклофосфамид         | -0,03 | 0,02  | 0,00  |
| доксорубин                          | -0,44 | -0,14 | -0,14 |
| винкристин                          | -0,35 | -0,10 | -0,13 |
| преднизолон                         | -0,43 | -0,10 | -0,05 |

[0095] Результаты показывают, что для всех клонов клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, при комбинированном применении обинутузумаба с доксорубином, преднизолоном или винкристином имели место сверхаддитивные эффекты. Между тем, комбинированное применение обинутузумаба с 4-гидропероксициклофосфамидом проявляло примерно аддитивные эффекты для всех клонов клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели.

[0096] (Пример 2)

Клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, 1A2 высевали из расчета  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в 96-луночные планшеты и добавляли обинутузумаб (0,00015-10 мкг/мл) и преднизолон (0,2, 1 мкМ). Через 4 суток культивирования при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> определяли количество жизнеспособных клеток с использованием набора для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo 3D (Promega). Уровень пролиферации клеток (среднее+стандартное отклонение) при добавлении преднизолона в каждой концентрации по отношению к количеству клеток без добавления обинутузумаба показан на фиг. 1.

[0097] Результаты свидетельствуют о том, что комбинированное применение с преднизолоном усиливало ингибирующее действие обинутузумаба на пролиферацию в клоне клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели.

### [0098] (Пример 3)

Клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, 1A2 высевали из расчета  $2 \times 10^5$  клеток на лунку в 6-луночные планшеты и добавляли обинутузумаб (1 мкг/мл) и преднизолон (1 мкМ). Через 48 ч культивирования при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> клетки окрашивали DAPI в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, и определяли флуоресценцию с использованием NC-3000 (chemometec). Клеточный цикл анализировали с помощью Flow Jo. версия 7.6.5. Результаты (среднее значение+стандартное отклонение) трех независимых тестов приведены на фиг. 2. Кроме того, «комбинация» на фиг. 2 указывает на добавление обоих агентов, обинутузумаба и преднизолона.

[0099] Результаты показывают, что при добавлении обоих агентов, обинутузумаба и преднизолона, наблюдали статистически значимое увеличение доли клеток в G0/G1-фазе по сравнению с добавлением каждого из агентов одного.

[0100] Клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, 1A2 высевали из расчета  $3 \times 10^6$  клеток на флакон для культивирования клеток емкостью 25 см<sup>2</sup> и добавляли обинутузумаб (1 мкг/мл) и преднизолон (1 мкМ). Через 48 ч культивирования при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> экстрагировали белки. Уровни экспрессии белков определяли с помощью вестерн-блоттинга, результаты которого приведены на фиг. 3. Кроме того, на фигуре «-» означает отсутствие добавления агентов, и «+» указывает на добавление агента(ов).

[0101] Результаты показывают, что при комбинированном применении обинутузумаба и преднизолона уровень белка p27-убиквитинлигазы Skp2 снижался, уровень белка-ингибитора циклин-зависимой киназы p27 повышался, и уровень фосфорилированного белка Rb снижался. Следовательно, увеличение числа клеток в G0/G1-фазе при добавлении обоих препаратов обинутузумаба и преднизолона, показанное на фиг. 2, предположительно связано с уменьшением фосфорилированного белка Rb и повышением белка p27, вызванным снижением Skp2. Вышеизложенное показало наличие более сильной индукции остановки в G1-фазе при комбинированном применении обинутузумаба и преднизолона по сравнению с каждым препаратом одним.

[0102] Клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, 1A2 высевали из расчета  $1 \times 10^6$  клеток на лунку в 6-луночные планшеты и добавляли обинутузумаб (1 мкг/мл) и преднизолон (1 мкМ). Через 72 ч культивирования при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> клетки окрашивали с использованием набора для анализа APO-BrdU TUNEL (Thermo Fisher). Флуоресценцию определяли с использованием FACS Fortessa (Becton Dickinson) и результаты анализировали с помощью Flow Jo. версия 10, они приведены на фиг. 4. Кроме того, «комбинация» на фиг. 4 указывает на добавление обоих препаратов обинутузумаба и преднизолона.

[0103] Результаты свидетельствуют о том, что комбинированное применение обинутузумаба и преднизолона усиливает фрагментацию ДНК по сравнению с применением каждого агента одного. Таким образом, комбинированное применение по настоящему изобретению демонстрирует большее усиление индукции клеточной гибели по сравнению с каждым агентом одним.

Исходя из вышеприведенных результатов, можно сделать вывод, что обинутузумаб и преднизолон проявляют более сильные эффекты при комбинированном применении, усиливая остановку в G1-фазе и вызывая гибель клеток.

#### [0104] (Пример 4)

Клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, 1A2 высевали из расчета  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в 96-луночные планшеты и добавляли обинутузумаб (0,00015-10 мкг/мл) и доксорубин (2,5-10 нМ). Через 4 суток культивирования при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> определяли количество жизнеспособных клеток с использованием набора для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo 3D (Promega). Уровень пролиферации клеток (среднее значение+стандартное отклонение) при добавлении обинутузумаба для каждой концентрации добавленного доксорубина, где уровень пролиферации клеток без добавления обинутузумаба составляет 100%, показан на фиг. 5.

[0105] Результаты свидетельствуют о том, что комбинированное применение с доксорубином усиливало ингибирующее действие обинутузумаба на клеточную пролиферацию клеток для клона клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели.

#### [0106] (Пример 5)

Клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, 1A2 высевали из расчета  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в 96-луночные планшеты и добавляли обинутузумаб (1 мкг/мл) и доксорубин (10 нМ). Через 48 ч культивирования при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> измеряли активность каспаз 3/7 с использованием аналитического набора CaspaseGlo 3/7 (Promega). Активность каспаз 3/7 (среднее+стандартное отклонение) по отношению к клеткам без добавления двух агентов показана на фиг. 6.

Результаты показывают статистически значимую более высокую активность каспаз 3/7 при комбинированном применении обинутузумаба и доксорубина по сравнению с каждым препаратом одним (P < 0,05).

[0107] Клон клеток, резистентных к обинутузумаб-опосредованной гибели, 1A2

высевали из расчета  $1 \times 10^6$  клеток на лунку в 6-луночные планшеты, и добавляли обинутизумаб (1 мкг/мл), доксорубицин (10 нМ) и пан-ингибитор каспаз Z-VAD-FMK (40 мкМ). Через 72 ч культивирования при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> клетки окрашивали с использованием набора для анализа APO-BrdU TUNEL (Thermo Fisher). Флуоресценцию определяли с использованием FACS Fortessa (Becton Dickinson) и результаты анализировали с помощью Flow Jo. версия 10, они приведены на фиг. 7. Кроме того, «комбинация» на фиг. 7 указывает на добавление обоих препаратов обинутизумаба и доксорубицина, в верхних панелях приведены результаты без добавления Z-VAD-FMK, и в нижних панелях приведены результаты с добавлением Z-VAD-FMK.

[0108] Результаты свидетельствуют о том, что комбинированное применение обинутизумаба и доксорубицина усиливает фрагментацию ДНК по сравнению с применением каждого агента одного. Таким образом, комбинированное применение по настоящему изобретению демонстрирует большее усиление индукции клеточной гибели по сравнению с каждым агентом одним. Кроме того, данная фрагментация ДНК подавлялась при добавлении Z-VAD-FMK. Таким образом, это предполагает, что усиленная гибель клеток при комбинированном применении обинутизумаба и доксорубицина индуцируется каспаза-зависимым образом.

[0109] Клон клеток, резистентных к обинутизумаб-опосредованной гибели, IA2 высевали из расчета  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в 96-луночные планшеты и добавляли обинутизумаб (0,1, 1 мкг/мл), доксорубицин (10 нМ) и пан-ингибитор каспаз Z-VAD-FMK (40 мкМ). Через 4 суток культивирования при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> определяли количество жизнеспособных клеток с использованием набора для определения жизнеспособности клеток CellTiter-Glo 3D (Promega). Уровень пролиферации клеток (среднее значение+стандартное отклонение) при добавлении каждого агента по отношению к количеству клеток без добавления обинутизумаба показан на фиг. 8.

Результаты свидетельствуют о том, что добавление Z-VAD-FMK подавляло усиленную доксорубицином ингибирующую активность обинутизумаба на пролиферацию клеток.

[0110] Приведенные выше результаты показывают, что обинутизумаб и доксорубицин индуцируют более сильные эффекты при комбинированном применении, повышая каспаза-зависимую гибель клеток.

#### [0111] (Пример 6)

Линию клеток неходжкинской лимфомы человека RL обрабатывали N-этил-N-нитрозомочевинной в концентрации 300 мкг/мл в течение 24 ч для случайного введения генных мутаций. Клетки CD16(158V)/NK-92 добавляли в качестве эффекторных клеток для достижения отношения эффекторные клетки:клетки-мишени (ЕТ) 20:1, и реакцию ADCC проводили при 37°C в течение ночи вместе с 0,1 мкг/мл обинутизумаба. Клетки, которые пролиферировали, подвергали отрицательной селекции с использованием анти-CD56 антитела (Biolegend) и положительной селекции с использованием анти-CD20 антитела (BD Biosciences) с помощью MACS.

[0112] После повторения вышеописанной ADCC-реакции и селекции с помощью MACS в общей сложности три раза, клетки, которые пролиферировали, клонировали для получения обинутузумаб-индуцированных ADCC-резистентных клеточных линий RL-E300-1, RL-E300-2, RL-E300-8 и RL-E300-22.

[0113] Исходную клеточную линию RL и резистентные клеточные линии подвергали окрашиванию для оценки жизнеспособных клеток с использованием Calcein-AM (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), и затем высевали из расчета  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в 96-луночные планшеты. Обинутузумаб добавляли в концентрации 0,0001-100 нг/мл. Клетки CD16(158V)/NK-92 добавляли в качестве эффекторных клеток для достижения соотношения ЕТ 1:1, и клетки инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Кроме того, для максимального лизиса добавляли 1% Тритон X-100. После центрифугирования планшетов и сбора супернатантов измеряли флуоресценцию кальцеина с использованием планшетного ридера. Чувствительность к ADCC оценивали по формуле (измерение - фон)/(максимальный лизис - фон)  $\times$  100 (%).

[0114] Результаты свидетельствуют о том, что по сравнению с исходной клеточной линией было подтверждено достоверное снижение чувствительности к ADCC для всех клеточных линий, резистентных к ADCC (фиг. 9).

#### [0115] (Пример 7)

Исходную клеточную линию RL и резистентные клеточные линии высевали из расчета  $4 \times 10^5$  клеток на планшет, добавляли преднизолон (10 мкМ) и клетки культивировали при 37°C в течение 72 ч. Клетки собирали и окрашивали контрольным IgG антителом или анти-CD20 антителом (BD Biosciences) и проводили анализ экспрессии CD20 с использованием FACS Fortessa (Becton Dickinson).

[0116] Из полученных результатов следует, что предварительная обработка преднизолоном (PSL) усиливает экспрессию CD20 в исходной клеточной линии и резистентных клеточных линиях (фиг. 10).

#### [0117] (Пример 8)

Исходную клеточную линию RL и резистентные клеточные линии прекультивировали с добавлением преднизолона (10 мкМ) при 37°C в течение 72 ч. Клетки собирали и подвергали окрашиванию для определения жизнеспособных клеток с использованием Calcein-AM (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), и затем высевали из расчета  $1 \times 10^4$  клеток на лунку в 96-луночные планшеты. Обинутузумаб добавляли в концентрации 1 нг/мл. Клетки CD16(158V)/NK-92 добавляли в качестве эффекторных клеток для достижения соотношения ЕТ 1:1, и клетки инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Кроме того, для максимального лизиса добавляли 1% Тритон X-100. После центрифугирования планшетов и сбора супернатантов измеряли флуоресценцию кальцеина с использованием планшетного ридера. Чувствительность к ADCC оценивали по формуле (измерение - фон)/(максимальный лизис - фон)  $\times$  100 (%).

[0118] Из полученных результатов следует, что предварительная обработка преднизолоном (PSL) повышает чувствительность к ADCC исходной клеточной линии и

резистентных клеточных линий (фиг. 11).

**[0119] (Пример 9)**

Резистентную клеточную линию RL-E300-1 подкожно прививали мышам CB-17/Icr-scid/scidJcl (CLEA Japan) из расчета  $5 \times 10^6$  клеток/мышь, и после приживления опухолевых клеток мышей разделяли на следующие группы (n=6 в каждой группе).

1. Группа с введением IgG (30 мг/кг) + носителя (группа IgG+Dw)
2. Группа с введением обинутузумаба (30 мг/кг) + носителя (группа OBI+Dw)
3. Группа с введением IgG (30 мг/кг) + преднизолона (4 мг/кг) (группа IgG+PSL)
4. Группа с введением обинутузумаба (30 мг/кг) + преднизолона (4 мг/кг) (группа OBI+PSL)

Введение проводили (обинутузумаба или IgG (человеческий IgG, CAPPEL, номер по каталогу 55908): на дни 1, 8, 15 (один раз в неделю (qw), внутривенной инфузией (в/в); преднизолона или носителя (Dw): на дни 1-5, пероральное введение (перорально)) и измеряли размер опухолей.

[0120] Результаты свидетельствуют о том, что при сравнении групп на день 18 значительный противоопухолевый эффект был подтвержден в группе с комбинированным введением (группа OBI+PSL) по сравнению с каждой контрольной группой (группы IgG+Dw, OBI+Dw или IgG+PSL) (фиг. 12).



### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где указанный агент включает анти-CD20 антитело типа II и используется в комбинации с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств.

2. Агент для подавления пролиферации клеток обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где агент содержит одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств, и используется в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

3. Агент по пп.1 или 2, где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

4. Агент по любому из пп.1-3, где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

5. Агент по любому из пп.1-4, где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, и их солей и пролекарств.

6. Агент по любому из пп.1-5, где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой CD20-позитивный рак, который ранее лечили обинутузумабом.

7. Агент по любому из пп.1-6, где обинутузумаб-резистентный CD20-позитивный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинутузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинутузумаба.

8. Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где фармацевтическая композиция содержит анти-CD20 антитело типа II и применяется в комбинации с химиотерапией, включающей введение одного или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, и их солей и пролекарств.

9. Фармацевтическая композиция для лечения обинутузумаб-резистентного CD20-позитивного рака, где фармацевтическая композиция содержит одно или более соединений, выбранных из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, винкристина, их солей и пролекарств, и применяется в комбинации с лечением анти-CD20 антителом типа II.

10. Фармацевтическая композиция по пп.8 или 9, где CD20-позитивный рак представляет собой В-клеточную неходжкинскую лимфому.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.8-10, где анти-CD20 антитело типа II представляет собой обинутузумаб.

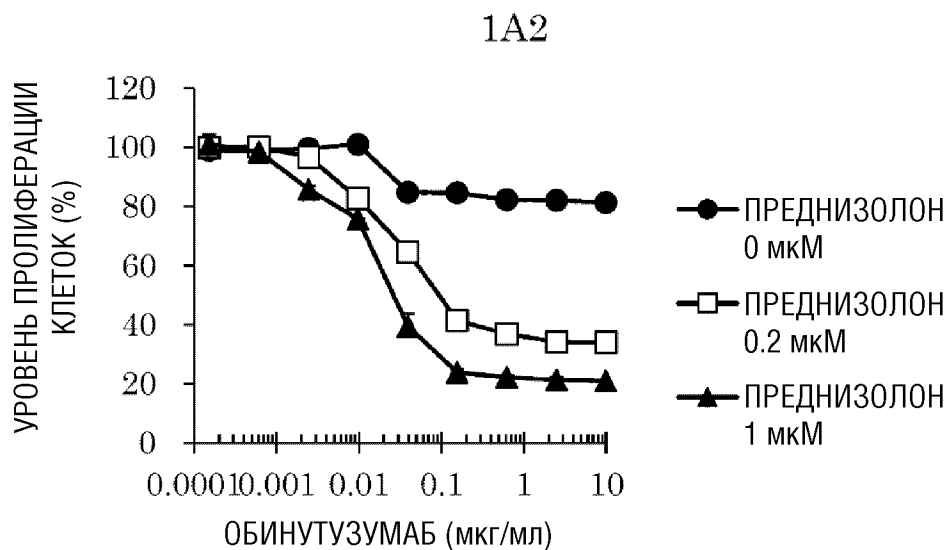
12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.8-11, где одно или более соединений выбраны из группы, состоящей из преднизолона, доксорубицина, и их солей и пролекарств.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.8-12, где обинутузумаб-

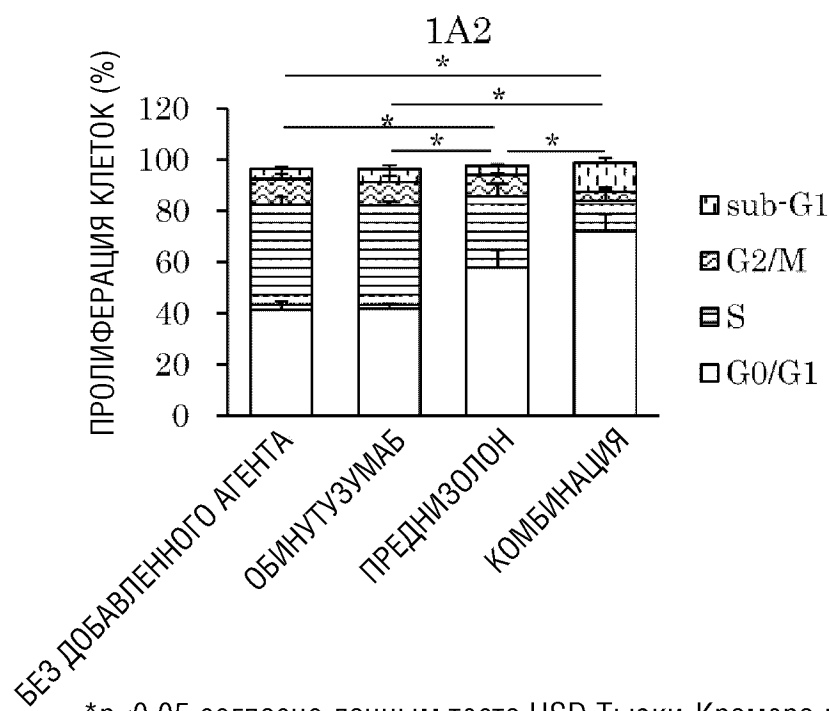
резистентный CD20-положительный рак представляет собой CD20-положительный рак, который ранее лечили обинтузумабом.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп.8-13, где обинтузумаб-резистентный CD20-положительный рак представляет собой рак, который рецидивировал после начала поддерживающей терапии, при которой обинтузумаб вводят один после индукционной терапии с использованием обинтузумаба.

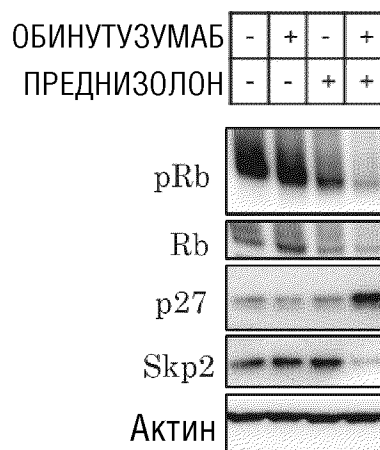
ФИГ.1



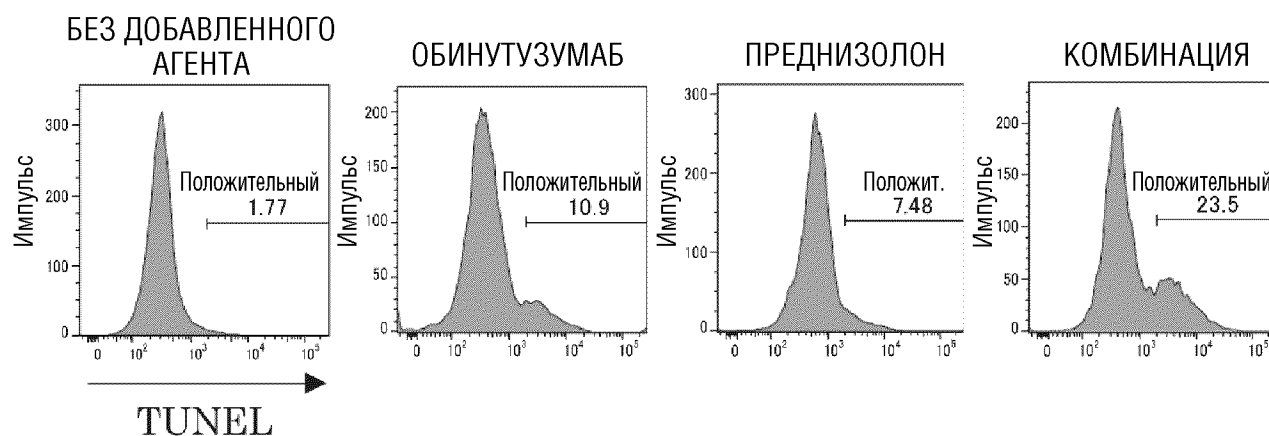
ФИГ.2



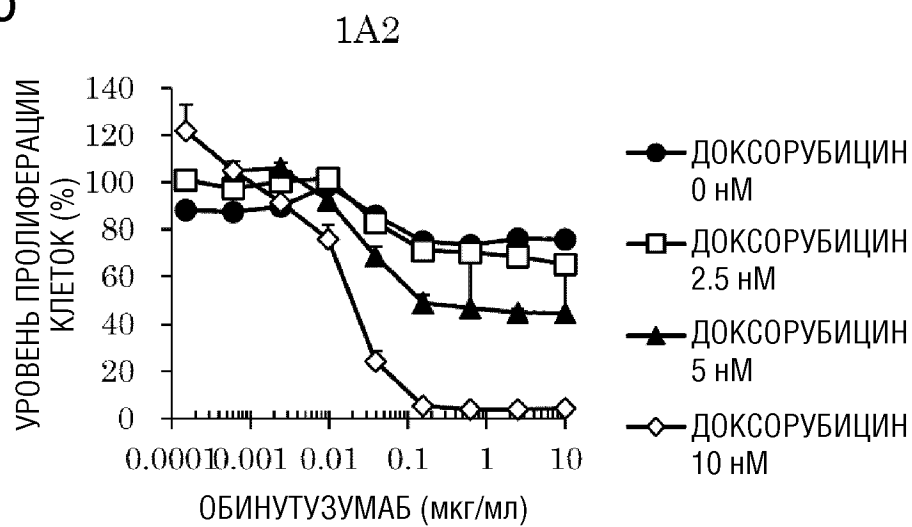
ФИГ.3



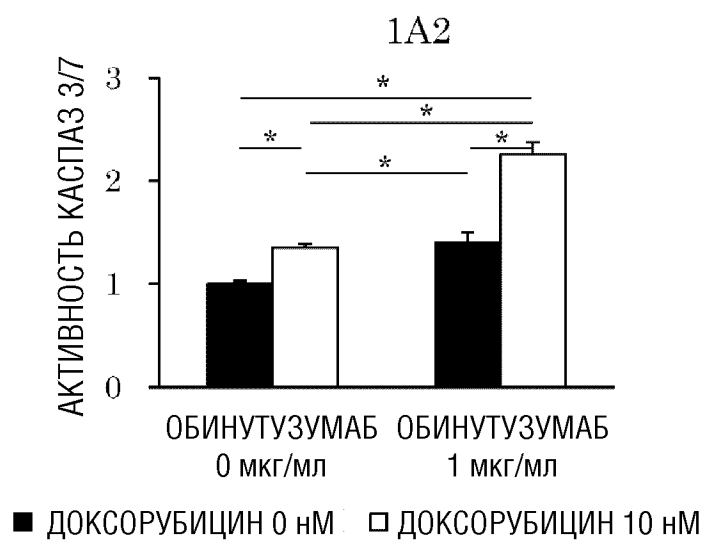
ФИГ.4



ФИГ.5

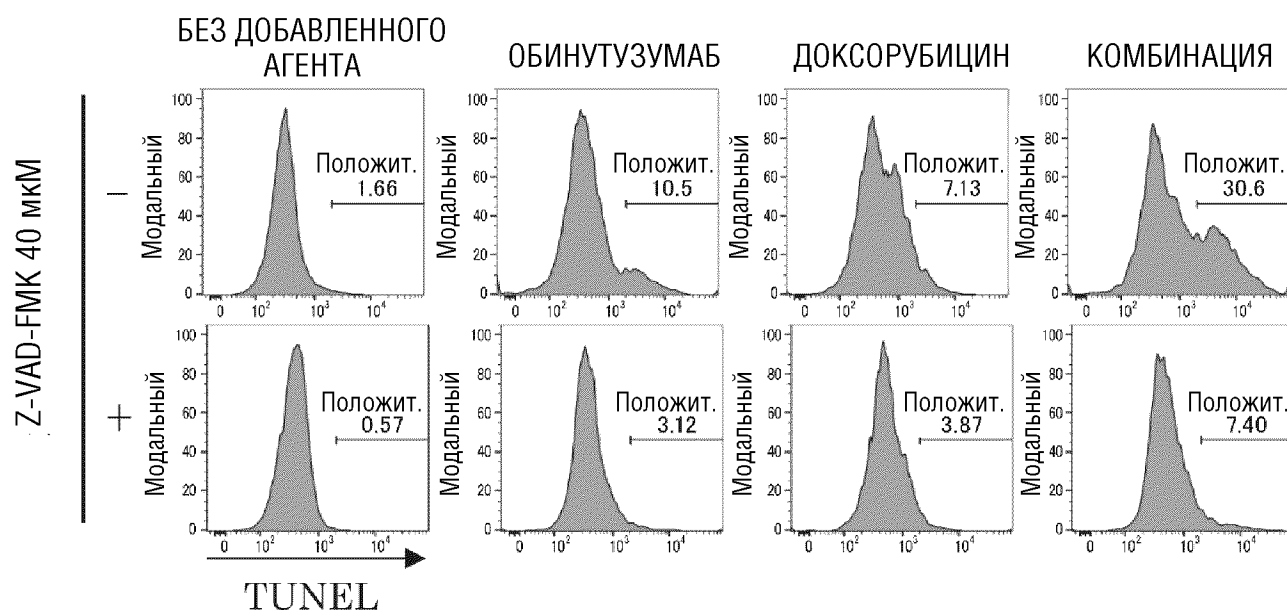


ФИГ.6

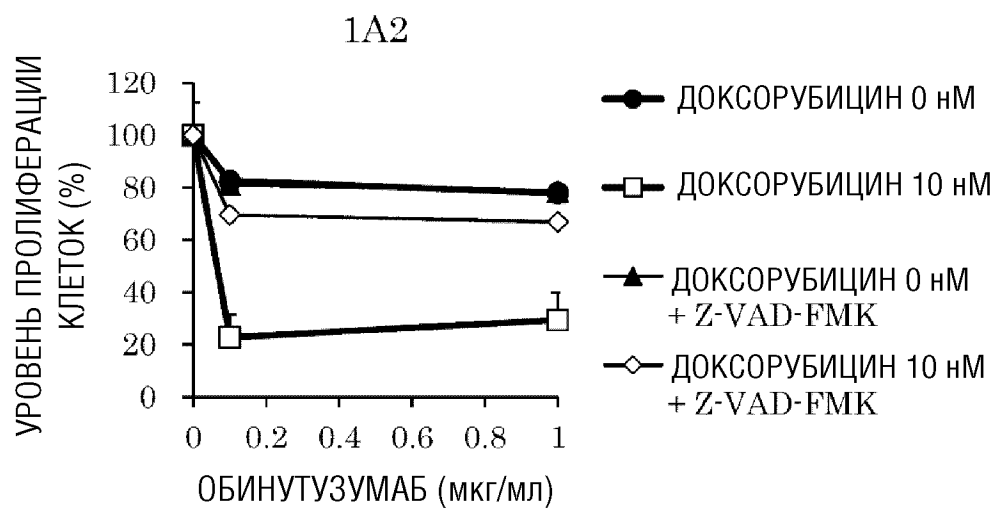


\* $p < 0,05$  согласно данным теста HSD Тьюки-Крамера

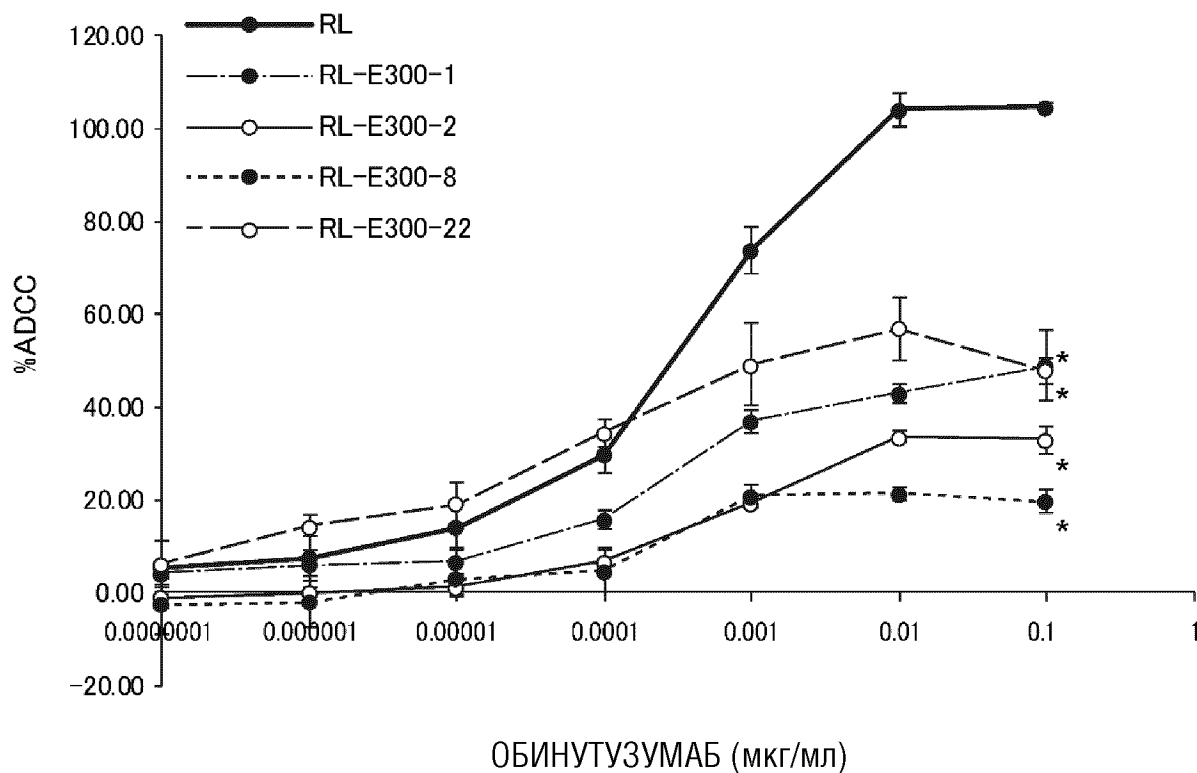
ФИГ.7



ФИГ.8

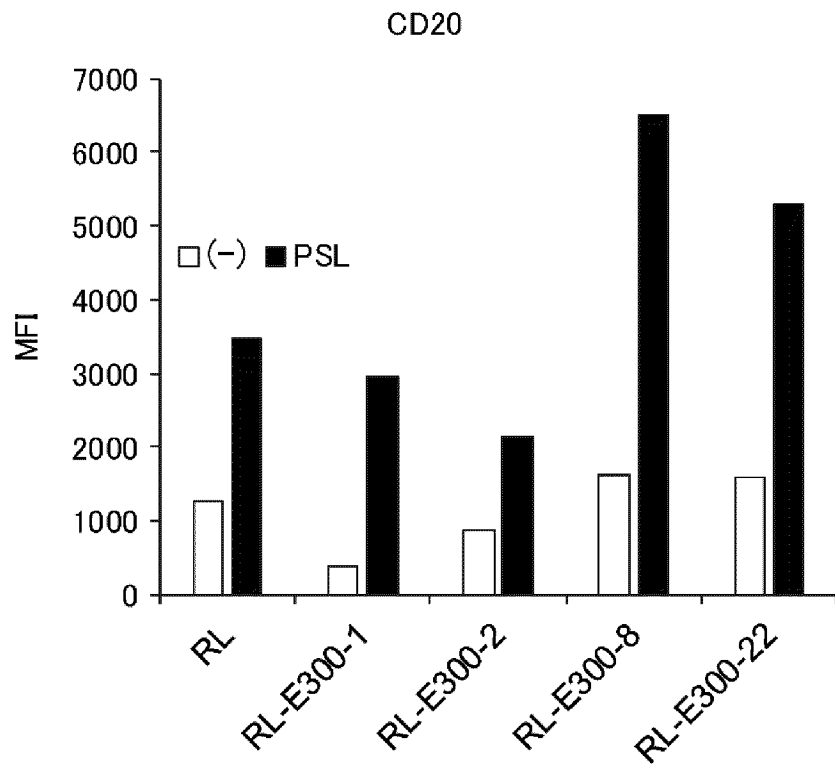


ФИГ.9

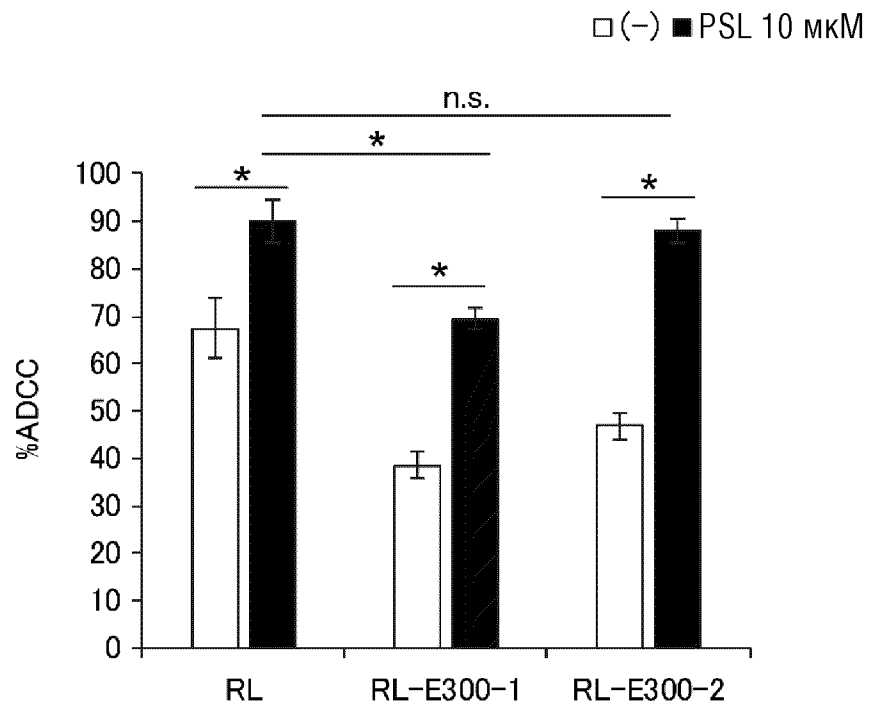


\*P<0,05 против RL согласно данным теста HSD  
Тьюки (ОВІ: 0,1 мкг/мл)

ФИГ.10

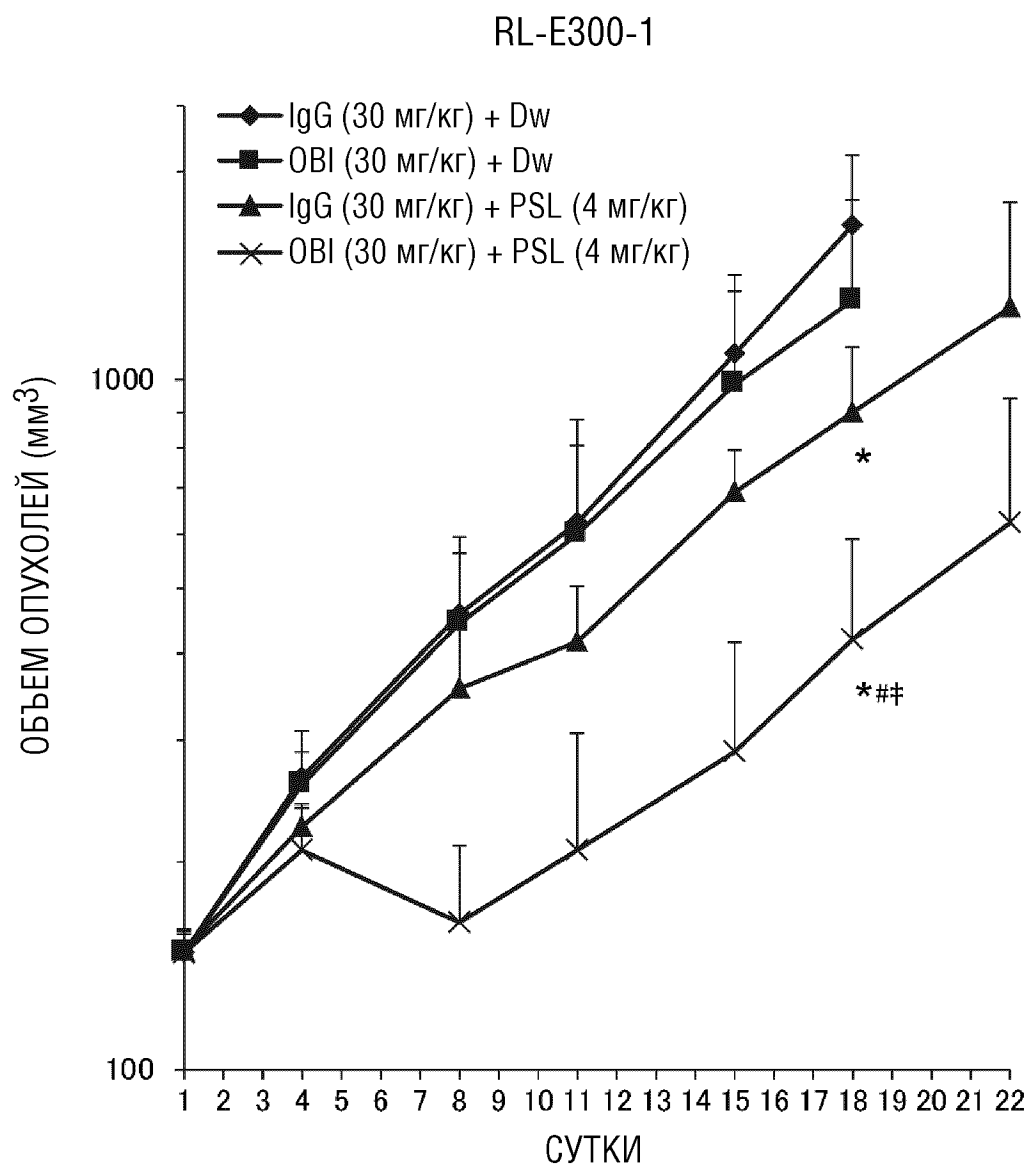


ФИГ.11



\* $P < 0,001$  согласно данным теста HSD Тьюки

ФИГ.12



Среднее значение + среднее отклонение, n=6/группу

Обинутузумаб (OBI) или HuIgG: раз в неделю, в/в

Преднизолон (PSL) или Dw: на дни 1-5, перорально

\*:  $P < 0,05$  против IgG+Dw, #:  $P < 0,05$  против OBI+Dw, ‡:  $P < 0,05$  против IgG+PSL  
согласно критерию Уилкоксона, применена поправка Холма-Бонферрони