

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292545 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.12

(51) Int. Cl. A61K 31/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.05

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ИНГИБИТОРЫ AXL/MER И PD-1/PD-L1

(31) 62/986,482

(32) 2020.03.06

(33) US

(86) PCT/US2021/021053

(87) WO 2021/178779 2021.09.10

(71) Заявитель:
ИНСАЙТ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Риос-Дориа Джонатан, Коблиш
Холли К. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам лечения рака путем введения соединения, которое представляет собой ингибитор киназы AXL/MER в комбинации с антителом или фрагментом антитела, которое связывается с PD-1.

A1

202292545

202292545

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575563EA/061

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ИНГИБИТОРЫ AXL/MER И PD-1/PD-L1

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к способам лечения рака путем введения соединения, которое представляет собой ингибитор киназы AXL/MER в комбинации с антителом или фрагментом антитела, которое связывается с PD-1.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рецепторные тирозинкиназы (RTK) представляют собой белки клеточной поверхности, которые передают сигналы из внеклеточной среды в цитоплазму и ядро клетки для регуляции клеточных процессов, таких как выживание, рост, пролиферация, дифференцировка, адгезия и миграция.

Подсемейство TAM состоит из трех RTK, включая Tyro3, AXL и Mer (Graham et al., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger et al., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83). Киназы TAM характеризуются внеклеточным лиганд-связывающим доменом, состоящим из двух иммуноглобулиноподобных доменов и двух доменов фибронектина III типа. Для киназ TAM было идентифицировано два лиганда, специфичный белок блокировки роста 6 (GAS6) и белок S (PROS1). GAS6 может связываться со всеми тремя киназами TAM и активировать их, в то время как PROS1 является лигандом для Mer и Tyro3 (Graham et al., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785).

AXL (также известный как UFO, ARK, JTK11 и TYRO7) был первоначально идентифицирован как трансформирующий ген из ДНК пациентов с хроническим миелогенным лейкозом (O'Bryan et al., 1991, Mol Cell Biol 11, 5016-5031; Graham et al., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger et al., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83). GAS6 связывается с AXL и вызывает последующее автофосфорилирование и активацию тирозинкиназы AXL. AXL активирует несколько нисходящих сигнальных путей, включая PI3K-Akt, Raf-MAPK, PLC-PKC (Feneyrolles et al., 2014, Molecular Cancer Therapeutics 13, 2141-2148; Linger et al., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83).

MER (также известный как MERTK, EYK, RYK, RP38, NYK и TYRO12) изначально был идентифицирован как фосфопротеин из библиотеки экспрессии лимфобластных клеток (Graham et al., 1995, Oncogene 10, 2349-2359; Graham et al., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger et al., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83). Как GAS6, так и PROS1 могут связываться с Mer и индуцировать фосфорилирование и активацию Mer киназы (Lew et al., 2014). Подобно AXL, активация MER также запускает нисходящие сигнальные пути, включая PI3K-Akt и Raf-MAPK (Linger et al., 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83).

TYRO3 (также известный как DTK, SKY, RSE, BRT, TIF, ETK2) был первоначально идентифицирован с помощью клонирования на основе ПЦР (Lai et al., Neuron 6, 691-70, 1991; Graham et al., 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger et al.,

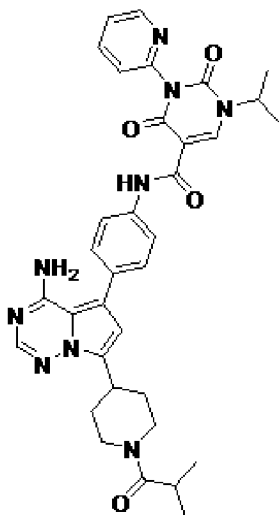
2008, *Advances in Cancer Research* 100, 35-83). Оба лиганда, GAS6 и PROS1, могут связываться с TYRO3 и активировать его. Хотя сигнальные пути, расположенные ниже активации TYRO3, являются наименее изученными среди РТК TAM, похоже, что задействованы оба пути: как PI3K-Akt, так и Raf-MAPK (Linger et al., 2008, *Advances in Cancer Research* 100, 35-83). Обнаружено, что AXL, MER и TYRO3 сверхэкспрессируются в раковых клетках.

Остается потребность в новых схемах лечения рака с применением модуляторов AXL/MER киназы в комбинации с антителом или фрагментом антитела, которое связывается с PD-1. Эта заявка направлена на эту и другие потребности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящей заявке, *среди прочего*, предлагаются способы лечения рака у пациента, включающие введение указанному пациенту:

(i) Соединения 1, имеющего структуру:



Соединение 1;

или его фармацевтически приемлемой соли; и

(ii) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека, при этом указанное антитело содержит (ii-1) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и VH CDR3; и (ii-2) домен переменной области легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL; при этом:

(a) CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);

(b) CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO:7);

(c) CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO:8);

(d) CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO:9);

(e) CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO:10); и

(f) CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (**SEQ ID NO:11**).

В настоящей заявке также предлагаются способы лечения рака у пациента, включающие введение пациенту Соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли и ретифанлимаба.

В настоящей заявке также предлагается применение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли и антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, для приготовления лекарственного средства для лечения рака.

В настоящей заявке дополнительно предлагается применение соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли и антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, для применения в любом из описанных в данном документе способов.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 представляет собой график значений IC_{50} Соединения 1 для киназы MER в зависимости от концентрации АТР.

Фиг. 2 представляет собой график процентного ингибирования фосфор-AXL (pAXL) для Соединения 1 в клетках H1299.

Фиг. 3 представляет собой график процентного ингибирования фосфор-MER (pMER) для Соединения 1 в клетках меланомы G361.

Фиг. 4 представляет собой вестерн-блоттинг pMER и общего MER в первичных макрофагах, дифференцированных *in vitro* из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), предварительно обработанных в течение 2 часов Соединением 1 с последующей стимуляцией MER-специфическим агонистическим антителом MAB8912.

Фиг. 5A представляет собой график пролиферации Т-клеток в первичных макрофагах, дифференцированных *in vitro* из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC), предварительно обработанных Соединением 1.

Фиг. 5B представляет собой график продукции IFN- γ в первичных макрофагах, дифференцированных *in vitro* из PBMC, предварительно обработанных Соединением 1.

Фиг. 6A представляет собой тепловую карту, демонстрирующую *in vitro* индукцию интерлейкина (IL)-2 посредством Соединения 1 и/или ретифанлимаба в PBMC.

Фиг. 6B представляет собой тепловую карту, демонстрирующую *in vitro* индукцию интерферона (IFN)- γ посредством Соединения 1 и/или ретифанлимаба в PBMC.

Фиг. 6C представляет собой тепловую карту, демонстрирующую *in vitro* индукцию фактора некроза опухоли (TNF)- α посредством Соединения 1 и/или ретифанлимаба в PBMC.

Фиг. 6D представляет собой тепловую карту, демонстрирующую *in vitro* индукцию гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) посредством Соединения 1 и/или ретифанлимаба в PBMC.

Фиг. 6E представляет собой тепловую карту, демонстрирующую *in vitro* индукцию

IL-12 p70 посредством Соединения 1 и/или ретифанлимаба в РВМС.

Фиг. 7А представляет собой график объема опухоли MBT-2 после обработки Соединением 1, демонстрирующий эффективность ингибирования роста опухоли Соединением 1 в модели опухоли MBT-2 у мышей СЗН.

Фиг. 7В представляет собой график объема опухоли 4Т1 после обработки Соединением 1, демонстрирующий эффективность ингибирования роста опухоли Соединением 1 в модели опухоли 4Т1 у мышей BALB/c.

Фиг. 7С представляет собой график объема опухоли 4Т1 после обработки Соединением 1, демонстрирующий эффективность ингибирования роста опухоли Соединением 1 в модели опухоли 4Т1 у бестимусных «голых» мышей.

Фиг. 7D представляет собой график соотношения M1/M2-подобных макрофагов у мышей с опухолями 4Т1, получавших Соединение 1.

Фиг. 8А представляет собой график объема опухоли MC38 у мышей C57BL/6, которым перорально вводили Соединение 1, лиганд 1 против белка программируемой гибели клеток (PD-L1) или их комбинацию.

Фиг. 8В представляет собой график процентного содержания CD4⁺Ki67⁺ клеток у мышей с опухолями MC38 после лечения Соединением 1, анти-PD-L1 или их комбинацией.

Фиг. 8С представляет собой график процентного содержания CD8⁺Ki67⁺ клеток у мышей с опухолями MC38 после лечения Соединением 1, анти-PD-L1 или их комбинацией.

Фиг. 8D представляет собой график концентрации интерферона (IFN)- γ в опухолевых экстрактах мышей с опухолью MC38 после лечения соединением 1, анти-PD-L1 или их комбинацией.

Фиг. 9А представляет собой график объема опухоли CTG-2041 у бестимусных «голых» мышей после лечения Соединением 1.

Фиг. 9В представляет собой график объема опухоли CTG-1302 у бестимусных «голых» мышей после лечения Соединением 1.

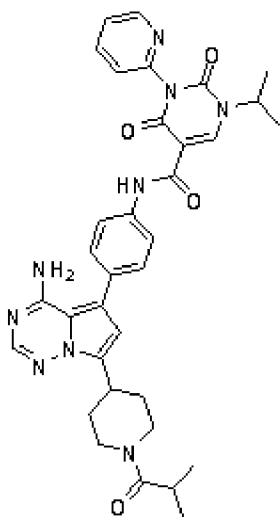
Фиг. 9С представляет собой график объема опухоли CTG-1339 у бестимусных «голых» мышей после лечения Соединением 1.

Фиг. 9D демонстрирует вестерн-блоттинг pAXL, AXL, pMER, MER, GAS6, pAKT, AKT и β -актина опухолей CTG-2041 или CTG-1339 у мышей, получавших Соединение 1 или носитель.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящей заявке, *среди прочего*, предлагается способ лечения рака у пациента, включающий введение указанному пациенту:

(i) Соединения 1, имеющего структуру:



Соединение 1;

или его фармацевтически приемлемой соли; и

(ii) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с PD-1 человека (например, ретифанлимаб).

Исследования *in vitro* продемонстрировали индукцию провоспалительных цитокинов при монотерапии Соединением 1 и монотерапии ретифанлимабом, однако комбинация Соединения 1 с антителом к PD-1 ретифанлимабом приводила к гораздо большей индукции цитокинов (Пример G).

Аминокислотная последовательность белка PD-1 человека (номер доступа Genbank NP_005009):

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN
TSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN
DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAGQFQTLVVG VVG
LLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTP
EPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID
NO:1).

Ретифанлимаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1 человека (см. публикацию US 2019/0127467, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки). Аминокислотные последовательности зрелых тяжелых и легких цепей ретифанлимаба описаны ниже.

Определяющие комплементарность области (CDR) 1, 2 и 3 переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL) приведены в указанном порядке от N до C-конца зрелых последовательностей VL и VH, подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Антитело, состоящее из зрелой тяжелой цепи (SEQ ID NO:2) и зрелой легкой цепи (SEQ ID NO:3), приведенных ниже, называется ретифанлимаб.

Зрелая тяжелая цепь ретифанлимаба (HC)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**SYWMN**WVRQAPGQGLEWIG**VIIH**
PSDSETWLDQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE**EHYGTSPFAYW**
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP

APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 2)

Зрелая легкая цепь ретифанлимаба (LC)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGMSFMNWFQQKPGQPPKLLIHA
ASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYFCQQSKEVPYTFGGGKVEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3)

Вариабельный домен тяжелой цепи (VH) ретифанлимаба имеет следующую
 аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGVIH
PSDSETWLDQKFKDRVITITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREEHYGTSPFAYW
 GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 4)

Вариабельный домен легкой цепи (VL) ретифанлимаба имеет следующую
 аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGMSFMNWFQQKPGQPPKLLIHA
ASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYFCQQSKEVPYTFGGGKVEIK
 (SEQ ID NO: 5)

Аминокислотные последовательности VH CDR ретифанлимаба приведены ниже:

VH CDR1: SYWMN (SEQ ID NO: 6);

VH CDR2: VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7);

VH CDR3: EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8)

Аминокислотные последовательности VL CDR ретифанлимаба приведены ниже:

VL CDR1: RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

VL CDR2: AASNQGS (SEQ ID NO: 10); а также

VL CDR3: QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11).

Соответственно, в настоящем изобретении предлагается способ лечения рака у
 пациента, включающий введение указанному пациенту:

(i) Соединения 1, имеющего структуру:

или его фармацевтически приемлемой соли; и

(a) CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (**SEQ ID NO:6**);

(c) CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO:8);

(e) CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (**SEQ ID NO:10**); и

(f) CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 4**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 5**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 4**, а домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 5**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит вариант Fc-области, который содержит:

(А) одну или большее количество аминокислотных модификаций, которые снижают аффинность варианта Fc-области к FcγR, при этом одна или большее количество

модификаций, которые снижают аффинность варианта Fc-области к FcγR, включает замену L234A; L235A; или L234A и L235A, и при этом нумерация соответствует индексу ЕС, как в Kabat; и/или

(b) одну или большее количество аминокислотных модификаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке варианта Fc-области, при этом одна или большее количество модификаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке варианта Fc-области, содержат замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E; или K288D и H435K, и при этом нумерация соответствует индексу ЕС, как в Kabat.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит Fc-область, при этом указанная Fc-область относится к изотипу IgG4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит Fc-область изотипа IgG4 и шарнирный домен IgG4, который содержит стабилизирующую мутацию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит Fc-область изотипа IgG4 и шарнирный домен IgG4, который содержит замену S228P (*см., например, SEQ ID NO: 12* : ESKYGPPCPPCP, (Lu et al, (2008) "The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of IgG4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation," J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969) для уменьшения частоты обмена цепями. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения (a) антитело содержит Fc-область и шарнирный домен; (b) Fc-область и шарнирный домен относятся к типу IgG4; и (c) шарнирный домен содержит стабилизирующую мутацию.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 2**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 5**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит легкую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 3**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 4**, а домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 5**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 2**, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 3**.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит Fc-область типа IgG1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит Fc-область типа IgG1, содержащую вариантный домен CH2-CH3 (содержащий замену

L234A/L235A (AA)), но без С-концевого остатка лизина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит Fc-область типа IgG1, при этом зрелые последовательности тяжелой цепи и легкой цепи представляют собой **SEQ ID NO: 13** и **SEQ ID NO: 3**.

Зрелая тяжелая цепь (HC)

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVIT TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG (**SEQ ID NO:13**)

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и ретифанлимаб вводят пациенту одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и ретифанлимаб вводят пациенту одновременно. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль и ретифанлимаб вводят пациенту последовательно.

Соединение 1 и его фармацевтически приемлемые соли можно вводить субъекту, например, нуждающемуся в этом субъекту, например, человеку, различными способами. Для многих применений путь введения является пероральным. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде фармацевтической композиции.

Составы (например, твердые пероральные лекарственные формы) Соединения 1 описаны в публикации патента США № 2020/0000812 A1, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 составлено в виде твердой лекарственной формы для перорального применения, содержащей:

- (a) Соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль (например, малеат Соединения 1), сольват или гидрат;
- (b) органическую кислоту; и
- (c) поверхностно-активное вещество.

Термин «органическая кислота» относится к органическому соединению с кислотными свойствами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения

органическая кислота представляет собой C_{1-6} алкил, C_{2-6} алкенил или 5-6-членный гетероциклоалкил, каждый из которых замещенный одной или несколькими кислотными группами (например, 1, 2 или 3 группами карбоновой кислоты, спирта или сульфоновой кислоты), причем 5-6-членный гетероциклоалкил необязательно замещен C_{1-6} алкильной группой, которая необязательно замещена одной или несколькими кислотными группами (например, 1, 2, 3 или 4 группами карбоновой кислоты, спирта или сульфоновой кислоты). Органическая кислота представляет собой C_{1-6} алкил или C_{2-6} алкенил, замещенный одной или большим количеством кислотных групп (например, 1, 2, 3 или 4 группами карбоновой кислоты, спирта или сульфоновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения органическая кислота представляет собой C_{1-6} алкил или C_{2-6} алкенил, замещенный 1, 2 или 3 группами карбоновых кислот и замещенный 0, 1 или 2 группами спирта. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения органическая кислота представляет собой 5-6-членный гетероциклоалкил, замещенный одной или большим количеством кислотных групп (например, 1, 2 или 3 группами карбоновой кислоты, спирта или сульфоновой кислоты), и необязательно замещен C_{1-6} алкилом, при этом C_{1-6} алкил необязательно замещен одной или большим количеством кислотных групп (например, 1, 2 или 3 группами карбоновой кислоты, спирта или сульфоновой кислоты). Примеры органических кислот включают, помимо прочего, лимонную кислоту, аскорбиновую кислоту, фумаровую кислоту, яблочную кислоту, сорбиновую кислоту, винную кислоту и их гидраты или сольваты. Органическая кислота в составе может составлять от около 1 мас.% до около 50 мас.%. Органическая кислота в составе может составлять от около 5 мас.% до около 40 мас.%. Органическая кислота в составе может составлять от около 5 мас.% до около 30 мас.%. Органическая кислота в составе может составлять от около 5 мас.% до около 20 мас.%. Органическая кислота в составе может составлять от около 10 мас.% до около 20 мас.%. Например, органическая кислота в составе может составлять около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% по массе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения органическая кислота в составе составляет около 10 мас.%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения органическая кислота в составе составляет около 20 мас.%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения органическая кислота представляет собой лимонную кислоту. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лимонная кислота представляет собой моногидрат лимонной кислоты. Лимонная кислота в составе может составлять от около 1 мас.% до около 50 мас.%. Лимонная кислота в составе может составлять от около 5 мас.% до около 40 мас.%. Лимонная кислота в составе может составлять от около 5 мас.% до около 30 мас.%. Лимонная кислота в составе может составлять от около 5 мас.% до около 20 мас.%. Лимонная кислота в составе может составлять от около 10 мас.% до около 20 мас.%. Например, лимонная кислота в составе может составлять от около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% по массе. В некоторых вариантах осуществления

настоящего изобретения лимонная кислота в составе составляет около 10 мас.%. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лимонная кислота в составе составляет около 20 мас.%.

Поверхностно-активное вещество может способствовать повышению биодоступности Соединения 1 или его фармацевтически приемлемой соли (например, малеата Соединения 1), сольвата или гидрата. Термин «поверхностно-активные вещества» относится к соединениям, которые снижают поверхностное натяжение между двумя жидкостями или между жидкостью и твердым телом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения поверхностно-активные вещества также могут выполнять другие функции, например, функции детергентов, смачивающих агентов, эмульгаторов, пенообразователей и диспергаторов. Примеры поверхностно-активных веществ включают, помимо прочего, полочсамеры. Примерами полочсамеров являются полочсамер 407, полочсамер 338, полочсамер 237 и полочсамер 188. В одном варианте осуществления настоящего изобретения полочсамер представляет собой полочсамер 188. В одном варианте осуществления настоящего изобретения полочсамер представляет собой полочсамер 407. Полочсамер представляет собой сополимер полиэтилен-пропиленгликоля (известные торговые названия Supronic, Pluronic или Tetronic), который обладает термообратимыми свойствами и свойством перехода к золь-гель, что может способствовать высвобождению лекарственного средства. Например, полочсамер находится в состоянии золя при температуре ниже комнатной и переходит в гелеобразное состояние при температуре тела (37,2 °C), что может изменять характеристики высвобождения лекарственного средства (D. Ramya Devi et al, J. Pharm. Sci. & Res. Vol.5(8), 2013, 159-165; Y. Mao et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 35 (2004) 1127-1142).

Антитело анти-PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить субъекту, например, нуждающемуся в этом субъекту, например, субъекту-человеку, различными способами. Для многих применений способ введения является одним из следующих: внутривенная инъекция или инфузия (IV), подкожная инъекция (SC), внутрибрюшинная (IP) или внутримышечная инъекция. Кроме того, можно применять внутрисуставное введение. Также можно применять другие способы парентерального введения. Примерами таких способов являются: внутриартериальная, интратекальная, интракапсулярная, внутриорбитальная, внутрисердечная, внутрикожная, транстрахеальная, субкутикулярная, внутрисуставная, субкапсулярная, субарахноидальная, интраспинальная, эпидуральная и интрастернальная инъекции. В некоторых случаях введение можно осуществлять перорально.

Антитело анти-PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить субъекту, например, нуждающемуся в этом субъекту, например, субъекту-человеку, различными способами. Для многих применений способ введения является одним из следующих: внутривенная инъекция или инфузия (IV), подкожная инъекция (SC), внутрибрюшинная (IP) или внутримышечная инъекция. Кроме того, можно применять

внутрисуставное введение. Также можно применять другие способы парентерального введения. Примерами таких способов являются: внутриаартериальная, интратекальная, интракапсулярная, внутриорбитальная, внутрисердечная, внутрикожная, транстрахеальная, субкутикулярная, внутрисуставная, субкапсулярная, субарахноидальная, интраспинальная, эпидуральная и интрастеральная инъекции. В некоторых случаях введение можно осуществлять перорально.

Путь и/или способ введения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента также можно подобрать для каждого отдельного случая, например, путем наблюдения за субъектом, например, с помощью томографической визуализации, например, для визуализации опухоли.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть введен в виде фиксированной дозы, или в дозе мг/кг. Доза также может быть выбрана для уменьшения или предотвращения выработки антител против антитела анти-PD-1. Схему введения можно корректировать для обеспечения желаемого ответа, например, терапевтического ответа или комбинаторного терапевтического эффекта. Как правило, дозы антитела анти-PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента (и в некоторых случаях другого агента) применяются для обеспечения субъекта агентом в биологически доступных количествах. Например, могут быть введены дозы в диапазоне 0,1-100 мг/кг, 0,5-100 мг/кг, 1 мг/кг - 100 мг/кг, 0,5-20 мг/кг, 0,1-10 мг/кг или 1-10 мг/кг. Также можно применять другие дозы. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения субъекту, нуждающемуся в лечении антителом анти-PD-1, вводят указанное антитело в дозе 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 35 мг/кг или 40 мг/кг.

Композиция может содержать от около 1 мг/мл до 100 мг/мл или от около 10 мг/мл до 100 мг/мл, или от около 50 до 250 мг/мл, или от около 100 до 150 мг/мл или от около 100 до 250 мг/мл антитела анти-PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В контексте данного документа стандартная лекарственная форма или «фиксированная доза» или «постоянная доза» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем и, необязательно, в сочетании с другим агентом. Можно вводить одну или множество доз. В альтернативном или в дополнительном варианте антитело можно вводить посредством непрерывной инфузии. Примеры фиксированных доз включают 375 мг, 500 мг и 750 мг.

Дозу антитела анти-PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента можно вводить, например, периодически в течение определенного промежутка времени (курс лечения) в достаточном количестве для того, чтобы охватить по меньшей мере, 2 дозы, 3 дозы, 5 доз, 10 доз, или более, например, один или два раза в день, или от около одного до четырех раз в неделю, или предпочтительно еженедельно, раз в две недели (каждые две недели), каждые три недели, ежемесячно, например, в течение от около 1 до 12 недель,

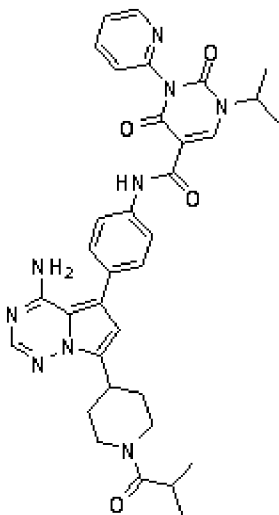
предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно от около 3 до 7 недель и еще более предпочтительно в течение около 4, 5 или 6 недель. Факторы, которые могут оказывать влияние на дозу и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, включают, например, тяжесть заболевания или нарушения, технологию изготовления, путь поступления в организм, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта, а также наличие других сопутствующих заболеваний. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством соединения может включать в себя один или, предпочтительно, несколько курсов лечения.

Типовая схема введения включает введение антитела анти-PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в фиксированной дозе 375 мг один раз каждые 3 недели. Другая типовая схема введения включает введение антитела анти-PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в фиксированной дозе 500 мг один раз каждые 4 недели. Еще одна типовая схема введения включает введение антитела анти-PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента в фиксированной дозе 750 мг один раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термин «около» означает плюс или минус 10% значения. Специалисту в данной области техники должно быть известно, что представленные в данном документе значения могут варьироваться в зависимости от условий экспериментов, таких как изменчивость сбора данных или приборов.

Соединение 1

Соединение 1 (N-(4-(4-амино-7-(1-изобутирилпиперидин-4-ил) пирроло [1,2-f][1,2,4] триазин-5-ил) фенил)-1- изопропил-2,4-диоксо-3- (пиридин-2-ил) -1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоксамид) имеет следующую структуру:



Соединение 1 можно синтезировать, как описано в патенте США № 9 981 975 и публикации США № 2019/112313, которые в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

Настоящее изобретение также включает фармацевтически приемлемые соли Соединения 1, описанные в данном документе.

Кристаллические солевые формы Соединения 1 описаны в публикации США №

2019/112313, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 и их соли по существу являются выделенными. Под термином «по существу выделенное» подразумевается, что соединение по меньшей мере частично или в значительной степени отделено от окружающей среды, в которой оно было образовано или обнаружено. Частичное разделение может включать, например, композицию, обогащенную Соединением 1. Существенное разделение может включать композиции, содержащие по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97% или по меньшей мере около 99% по массе Соединения 1 или его соли. Способы выделения соединений и их солей представляют собой широко применяемые способы в данной области техники.

Соединение 1 может существовать в различных твердых формах. В контексте данного документа термин «твердая форма» относится к твердому веществу, характеризующемуся одним или большим количеством свойств, такими как, например, точка плавления, растворимость, стабильность, кристалличность, гигроскопичность, содержание воды, характеристики TGA, характеристики DSC, характеристики DVS, характеристики XRPD и т. д. Твердые формы, например, могут быть аморфными, кристаллическими или их смесями.

Различные кристаллические твердые формы обычно имеют разные кристаллические решетки (например, элементарные ячейки) и, как правило, в результате имеют разные физические свойства. В некоторых случаях разные кристаллические твердые формы имеют разное содержание воды или растворителя. Различные кристаллические решетки могут быть идентифицированы методами определения характеристик твердого тела, такими как рентгеновская порошковая дифрактометрия (XRPD). Другие способы характеристики такие как дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC), термогравиметрический анализ (TGA), динамическая сорбция паров (DVS) и т.п., дополнительно помогают идентифицировать твердую форму, а также помогают определить стабильность и содержание растворителя/воды.

Картина XRPD отражений (пиков) обычно считается характерным признаком определенной кристаллической формы. Хорошо известно, что относительные интенсивности пиков XRPD могут широко варьироваться в зависимости, среди прочего, от методики подготовки образца, распределения кристаллов по размерам, используемых различных фильтров, процедуры установки образца и конкретного используемого прибора. В некоторых случаях могут наблюдаться новые пики или могут исчезать существующие пики, в зависимости от типа прибора или настроек. В контексте настоящего документа термин «пик» относится к отражению, имеющему относительную высоту/интенсивность, по меньшей мере составляющую около 4% от максимальной высоты/интенсивности пика. Более того, вариации прибора и другие факторы могут повлиять на значения 2-тета. Таким образом, распределения пиков, такие как указанные в

данном документе, могут варьироваться на плюс или минус около $0,2^\circ$ (2-тета), а термин «по существу», применяемый в данном документе в контексте XRPD, предназначен для охвата вышеупомянутых вариантов.

Таким же образом, показания температуры в связи с DSC, TGA или другими тепловыми исследованиями могут варьироваться на около $\pm 3^\circ\text{C}$ в зависимости от прибора, конкретных настроек, подготовки образца и т. д.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается N-(4-(4-Амино-7-(1-изобутирилпиперидин-4-ил)пирроло[1,2-f][1,2,4]триазин-5-ил)фенил)-1-изопропил-2,4-диоксо-3-(пиридин-2-ил)-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоксамидная соль малеиновой кислоты (также называемая в данном документе «малеиновая соль Соединения 1», «Соединение 1, малеиновая соль» или любым их вариантом).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанная соль представляет собой стехиометрическое соотношение 1:1 N-(4-(4-амино-7-(1-изобутирилпиперидин-4-ил)пирроло[1,2-f][1,2,4] триазин-5-ил) фенил)-1-изопропил-2,4-диоксо-3-(пиридин-2-ил)-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-карбоксамида к малеиновой кислоте.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагаемая соль малеиновой кислоты Соединения 1 является кристаллической. В контексте данного документа термин «кристаллическая» или «кристаллическая форма» предназначен для обозначения определенной конфигурации решетки кристаллического вещества. Различные кристаллические формы одного и того же вещества обычно имеют разные кристаллические решетки (например, элементарные ячейки), связанные с их разными физическими свойствами, характерными для каждой из кристаллических форм. В некоторых случаях разные конфигурации решетки имеют разное содержание воды или растворителя.

Соль малеиновой кислоты соединения 1 может быть получена в различных кристаллических формах, включая, например, форму I, форму II, форму III, форму IV или форму V, как описано в публикации США № 2019/112313, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Соль малеиновой кислоты Соединения 1, форма I:

В настоящем изобретении предлагается кристаллическая форма Соединения 1, именуемая формой I, которая описана ниже в Примере 5.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соль малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере один пик XRPD, выраженный в единицах 2-тета, выбранных из около $4,3^\circ$, около $8,4^\circ$, около $12,6^\circ$, около $13,2^\circ$ и около $18,5^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соль малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере два пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около $4,3^\circ$, около $8,4^\circ$, около $12,6^\circ$, около $13,2^\circ$ и около $18,5^\circ$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соль малеиновой

кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере три пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 4,3°, около 8,4°, около 12,6°, около 13,2° и около 18,5°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соль малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере четыре пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 4,3°, около 8,4°, около 12,6°, около 13,2° и около 18,5°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соль малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: около 4,3°, около 8,4°, около 12,6°, около 13,2° и около 18,5°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соль малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: около 4,3°, около 8,4° и около 13,2°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соль малеиновой кислоты Соединения 1 имеет термограмму DSC с эндотермическим пиком при около 211 °С.

Соль малеиновой кислоты Соединения 1, форма II:

В настоящем изобретении предлагается кристаллическая форма Соединения 1, именуемая формой II, которая описана ниже в Примерах 6 и 7.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма II соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере один пик XRPD, выраженный в единицах 2-тета, выбранных из около 3,8°, около 7,8°, около 23,5° и около 26,0°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма II соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере два пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 3,8°, около 7,8°, около 23,5° и около 26,0°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма II соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере три пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 3,8°, около 7,8°, около 23,5° и около 26,0°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма II соли малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: около 3,8°, около 7,8°, около 23,5° и около 26,0°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма II соли малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: около 3,8°, около 7,8° и около 23,5°.

Соль малеиновой кислоты Соединения 1, форма III:

В настоящем изобретении предлагается кристаллическая форма Соединения 1, именуемая формой III, которая описана ниже в Примерах 6 и 8.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма III соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере один пик XRPD, выраженный в единицах 2-тета, выбранных из около 3,8°, около 7,7°, около 12,1°, около 18,9° и около 20,6°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма III соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере два пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 3,8°, около 7,7°, около 12,1°, около 18,9° и около 20,6°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма III соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере три пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 3,8°, около 7,7°, около 12,1°, около 18,9° и около 20,6°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма III соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере четыре пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 3,8°, около 7,7°, около 12,1°, около 18,9° и около 20,6°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма III соли малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: 3,8°, около 7,7°, около 12,1°, около 18,9° и около 20,6°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма III соли малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: около 3,8°, около 7,7°, около 12,1° и около 18,9°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма III соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет термограмму DSC с эндотермическим пиком при около 165,4 °C и около 195,4 °C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма III соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет термограмму DSC с эндотермическим пиком при около 165,4 °C. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма III соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет термограмму DSC с эндотермическим пиком при около 195,4 °C.

Соль малеиновой кислоты Соединения 1, форма IV:

В настоящем изобретении предлагается кристаллическая форма Соединения 1, именуемая формой IV, которая описана ниже в Примерах 6 и 9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма IV соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере один пик XRPD, выраженный в единицах 2-тета, выбранных из около 3,9°, около 4,6°, около 7,8°, около 9,1° и около 22,8°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма IV соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере два пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 3,9°, около 4,6°, около 7,8°, около 9,1° и около 22,8°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма IV соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере три пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 3,9°, около 4,6°, около 7,8°, около 9,1° и около 22,8°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма IV соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере четыре пика XRPD,

выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 3,9°, около 4,6°, около 7,8°, около 9,1° и около 22,8°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма IV соли малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: около 3,9°, около 4,6°, около 7,8°, около 9,1° и около 22,8°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма IV соли малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: около 3,9°, около 4,6°, около 7,8° и около 9,1°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма IV соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет термограмму DSC с эндотермическим пиком при около 152,1 °С и 202,6 °С. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма IV соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет термограмму DSC с эндотермическим пиком при около 152,1 °С. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма IV соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет термограмму DSC с эндотермическим пиком при около 202,6 °С.

Соль малеиновой кислоты Соединения 1, форма V:

В настоящем изобретении предлагается кристаллическая форма Соединения 1, именуемая формой V, которая описана ниже в Примерах 6 и 10.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма V соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере один пик XRPD, выраженный в единицах 2-тета, выбранных из около 4,1°, около 8,3°, около 8,8°, около 18,0° и около 27,3°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма V соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере два пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 4,1°, около 8,3°, около 8,8°, около 18,0° и около 27,3°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма V соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере три пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 4,1°, около 8,3°, около 8,8°, около 18,0° и около 27,3°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма V соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет по меньшей мере четыре пика XRPD, выраженные в единицах 2-тета, выбранных из около 4,1°, около 8,3°, около 8,8°, около 18,0° и около 27,3°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма V соли малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: около 4,1°, около 8,3°, около 8,8°, около 18,0° и около 27,3°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма V соли малеиновой кислоты Соединения 1 содержит следующие пики XRPD, выраженные в единицах 2-тета: около 4,1°, около 8,3°, около 8,8° и около 27,3°.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения форма V соли малеиновой кислоты Соединения 1 имеет термограмму DSC с эндотермическим пиком при около 200,1 °C.

Получение антител и фармацевтических композиций антител

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела, которые связываются с PD-1 человека, включают константные области тяжелой и легкой цепи человека. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения константная область содержит домен СН1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константная область содержит домен СН3. Если константная область тяжелой цепи включает замены, такие замены модифицируют свойства антитела (например, увеличивают или уменьшают одно или большее количество из следующих свойств: связывание рецептора Fc, гликозилирование антитела, количество остатков цистеина, функцию эффекторной клетки или функцию комплемента). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения указанное антитело представляет собой антитело IgG. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения указанное антитело выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Антитела, такие как ретифанлимаб, могут быть изготовлены, например, путем получения и экспрессии синтетических генов, которые кодируют перечисленные аминокислотные последовательности, или путем мутации генов человеческой зародышевой линии с получением гена, который кодирует указанные аминокислотные последовательности. Кроме того, это антитело и другие антитела, которые связываются с PD-1 человека, можно получить, например, с помощью одного или большего количества из следующих способов.

Гуманизированные антитела могут быть получены путем замены последовательностей вариабельной области Fv, которые непосредственно не участвуют в связывании антигена, на эквивалентные последовательности из вариабельных областей Fv человека. Широко применяемые способы получения гуманизированных антител описаны в публикации Morrison, S. L., Science, 229:1202-1207 (1985), by Oi et al., BioTechniques, 4:214 (1986), и в публикациях US 5 585 089; US 5 693 761; US 5 693 762; US 5 859 205; а также US 6 407 213. Данные способы включают выделение, обработку и экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют все или часть вариабельных областей Fv иммуноглобулина по меньшей мере из одной тяжелой или легкой цепи. Источники такой нуклеиновой кислоты хорошо известны специалистам в данной области техники и, например, могут быть получены из гибридомы, продуцирующей антитело против заданной мишени, как описано выше, из генов иммуноглобулина зародышевой линии или из синтетических конструкций. Рекомбинантную ДНК, кодирующую гуманизированное антитело, можно затем клонировать в соответствующий вектор экспрессии.

Последовательности зародышевой линии человека, например, описаны в

публикациях Tomlinson, I.A. et al., *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992); Cook, G. P. et al., *Immunol. Today*, 16: 237-242 (1995); Chothia, D. et al., *J. Mol. Bio.* 227:799-817 (1992); и Tomlinson et al., *EMBO J.*, 14:4628-4638 (1995). Каталог V BASE содержит исчерпывающий каталог последовательностей вариабельных областей иммуноглобулинов человека (составленный Tomlinson, I.A. et al. Центр исследований белков MRC, Кембридж, Великобритания). Такие последовательности можно применять в качестве источника последовательности человека, например, для каркасных областей и CDR. Также можно применять консенсусные каркасные области человека, например, как описано в патенте США № 6 300 064.

Также можно применять и другие способы гуманизации антител. Например, другие способы могут учитывать трехмерную структуру антитела, положения каркаса, которые находятся в трехмерной близости к детерминантам связывания, и иммуногенные пептидные последовательности. См., например, WO 90/07861; патенты США №№ 5 693 762; 5 693 761; 5 585 089; 5 530 101; и 6 407 213; Tempest et al. (1991) *Biotechnology* 9:266-271. Еще один способ называется «гуманизация» и описан, например, в US 2005-008625.

Антитело может включать Fc-область человека, например, Fc-область дикого типа или Fc-область, которая включает одно или большее количество изменений. В одном варианте осуществления настоящего изобретения константная область является измененной, например, мутированной, для модификации свойств антитела (например, для увеличения или уменьшения одной или большего количества из следующих свойств: связывание рецептора Fc, гликозилирование антитела, количество остатков цистеина, функцию эффекторной клетки или функцию комплемента). Например, константная область IgG1 человека может быть мутирована на одном или большем количестве остатков, например, на одном или большем количестве остатков 234 и 237 (на основании нумерации Kabat). Антитела могут иметь мутации в области CH2 тяжелой цепи, которые уменьшают или изменяют эффекторную функцию, например, связывание рецептора Fc и активацию комплемента. Например, антитела могут иметь мутации, такие как описанные в патентах США № 5 624 821 и 5 648 260. Антитела также могут иметь мутации, которые стабилизируют дисульфидную связь между двумя тяжелыми цепями иммуноглобулина, такие как мутации в шарнирной области IgG4, как описано в данной области техники (например, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-08). См. также, например, публикацию U.S. 2005-0037000.

Антитела, которые связываются с PD-1 человека или PD-L1 человека, могут быть в форме полноразмерных антител или в форме низкомолекулярных форм (например, биологически активных фрагментов антител или минител) антител, которые связываются с PD-1 человека или PD-L1 человека, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb, scFv, и sc(Fv)₂. Другие антитела, охватываемые данным изобретением, включают однодоменное антитело (sdAb), содержащее одну вариабельную цепь, такую как, VH или VL, или ее биологически активный фрагмент. См., например, публикации Moller et al., *J. Biol. Chem.*, 285(49): 38348-38361 (2010); Harmsen et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77(1):13-22 (2007);

U.S. 2005/0079574 и Davies et al. (1996) Protein Eng., 9(6):531-7. Как и целое антитело, sdAb способно избирательно связываться со специфическим антигеном. С молекулярной массой всего 12-15 кДа, sdAb гораздо меньше, чем обычное антитело и даже меньше, чем фрагменты Fab и одноцепочечные переменные фрагменты.

В настоящем изобретении предлагаются композиции, содержащие смесь антитела, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающего фрагмента, и один или большее количество его кислотных вариантов, например, при этом количество кислотных вариантов составляет менее чем около 80%, 70%, 60%, 60%, 50%, 40%, 30%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1%. Также предлагаются композиции, содержащие антитело, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее по меньшей мере один сайт дезамидирования, при этом рН композиции составляет от около 5,0 до около 6,5, так что, например, по меньшей мере около 90% антител являются не дезамидированными (т.е. менее чем около 10% антител являются дезамидированными). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения менее чем около 5%, 3%, 2% или 1% антител являются дезамидированными. Значение рН может составлять от 5,0 до 6,0, например, 5,5 или 6,0. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значение рН составляет 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5.

«Кислотный вариант» представляет собой вариант представляющего интерес полипептида, который является более кислотным (например, как определено катионообменной хроматографией), чем представляющий интерес полипептид. Примером кислотного варианта является дезамидированный вариант.

«Дезамидированный» вариант полипептидной молекулы представляет собой полипептид, в котором один или большее количество остатков аспарагина исходного полипептида были преобразованы в аспартат, т.е. нейтральный амид боковой цепи был преобразован в остаток с общим кислотным свойством.

Термин «смесь» в контексте данного документа применяется в отношении композиции, содержащей антитело, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, и означает присутствие желаемого антитела, которое связывается с PD-1 человека, или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающего фрагмента, и одного или большего количества его кислотных вариантов. Кислотные варианты могут включать преимущественно дезамидированное антитело, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, с небольшими количествами других кислотных вариантов.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения аффинность связывания (K_D), скорость ассоциации (K_D on) и/или скорость диссоциации (K_D off) антитела, которое было мутировано для устранения дезамидирования, аналогичны таковым для антитела дикого типа, например, с разницей менее чем около 5 раз, 2 раза, 1 раз (100%), 50%, 30%, 20%, 10%, 5%, 3%, 2% или 1%.

Фрагменты антител

Фрагменты антител (например, Fab, Fab', F(ab')₂, F_{ab} и F_v) можно получить путем протеолитического расщепления интактных антител. Например, фрагменты антител можно получить путем обработки всего антитела ферментом, таким как папаин, пепсин или плазмин. В результате расщепления целых антител папаином получают фрагменты F(ab)₂ или Fab; в результате расщепления целых антител пепсином получают F(ab')₂ или Fab'; и в результате расщепления целых антител плазмином получают фрагменты F_{ab}.

В альтернативном варианте, фрагменты антител могут быть получены рекомбинантным путем. Например, можно сконструировать нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющие интерес фрагменты антител, ввести их в вектор экспрессии и экспрессировать в подходящих клетках-хозяевах. См., например, публикации Co, M.S. et al., J. Immunol., 152:2968-2976 (1994); Better, M. и Horwitz, A.H., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Plueckthun, A. и Skerra, A., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 121:652-663 (1989); Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology, (1989) 121:663-669 (1989); а также Bird, R.E. et al., TIBTECH, 9:132-137 (1991)). Фрагменты антител могут экспрессироваться и секретироваться из E. coli, что позволяет легко получать большие количества этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител. В альтернативном варианте, фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из E. coli и химически связывать с образованием фрагментов F(ab)₂ (Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')₂ можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с продленным временем полужизни in vivo, содержащие остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны, например, в патенте США № 5 869 046.

Минитела

ММинитела антител, которые связываются с PD-1 человека или PD-L1 человека, включают диатела, одноцепочечные (scFv) и одноцепочечные (Fv)₂ (sc(Fv)₂).

«Диатело» представляет собой двухвалентное минитело, сконструированное путем слияния генов (см., например, публикацию Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90:6444-6448 (1993); EP 404,097; WO 93/11161). Диатела представляют собой димеры, состоящие из двух полипептидных цепей. VL и VH домен каждой полипептидной цепи диатела связаны посредством линкера. Число аминокислотных остатков, которые образуют собой линкер, может составлять от 2 до 12 остатков (например, 3-10 остатков или пять, или около пяти остатков). Линкеры полипептидов в диателах, как правило, слишком коротки, чтобы позволить VL и VH связываться друг с другом. Таким образом, VL и VH, кодируемые в одной и той же полипептидной цепи, не могут образовывать одноцепочечный фрагмент варибельной области, а вместо этого образуют димер с другим одноцепочечным фрагментом варибельной области. В итоге, диатело имеет два антигенсвязывающих сайта.

scFv представляет собой одноцепочечное полипептидное антитело, полученное путем связывания VH и VL посредством линкера (см., например, публикацию Huston et

al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85:5879-5883 (1988); и Plickthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol.113, Ed Resenbarg and Moore, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994)). Порядок связывания VH и VL конкретно не ограничивается, и они могут располагаться в любом порядке. Примеры расположений включают: [VH] линкер [VL]; или [VL] линкер [VH]. V-область H-цепи и V-область L-цепи в scFv могут быть получены из любого антитела, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе.

sc(Fv)₂ представляет собой минитело, в котором два VH и два VL связаны посредством линкера с образованием одной цепи (Hudson, et al., J. Immunol. Methods, (1999) 231: 177-189 (1999)). sc(Fv)₂, например, может быть получен путем связывания scFv с помощью линкера. sc(Fv)₂ по настоящему изобретению включают антитела, предпочтительно, в которых две VH и две VL расположены в следующем порядке: VH, VL, VH и VL ([VH] линкер [VL] линкер [VH] линкер [VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида; однако порядок двух VH и двух VL не ограничивается указанным выше расположением, и они могут располагаться в любом порядке.

Биспецифические антитела

Биспецифический антитела представляют собой антитела, обладающие специфичностью связывания по меньшей мере с двумя разными эпитопами. Типовые биспецифические антитела могут связывать два различных эпитопа белка PD-1. Другие такие антитела могут комбинировать сайт связывания PD-1 с сайтом связывания для другого белка. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или их форм с низкой молекулярной массой (например, биспецифические антитела F(ab')₂, биспецифические антитела sc(Fv)₂, биспецифические антитела диатела).

Традиционная продукция полноразмерных биспецифических антител основана на совместной экспрессии двух пар тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, при этом две цепи обладают различной специфичностью (Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Согласно другому подходу варьируемые домены антител с желаемой специфичностью связывания сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, если желательно, легкой цепи иммуноглобулина, вставляют в отдельные векторы экспрессии и котрансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это обеспечивает большую гибкость в регулировке соотношений трех полипептидных фрагментов. Однако возможно вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам.

Согласно другому подходу, описанному в патенте США No. № 5 731 168, граница взаимодействия между парой молекул антител может быть сконструирована так, чтобы максимально увеличить процент гетеродимеров, извлекаемых из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная граница взаимодействия содержит по меньшей мере часть домена C_H3. В этом способе одна или большее количество небольших

боковых цепей аминокислот от границы взаимодействия первой молекулы антитела заменяются более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие «впадины» идентичного или сходного размера с большой боковой цепью (цепями) создаются на границе взаимодействия второй молекулы антитела путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают сшитые или «гетероконъюгированные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое - с биотином. Гетероконъюгированные антитела можно получить с помощью любых удобных способов сшивания.

Технология "диатела" обеспечивает альтернативный механизм получения биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат VH, соединенный с VL посредством линкера, который слишком короткий, чтобы сделать возможным спаривание между двумя доменами в одной цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены соединяться с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, тем самым образуя два сайта связывания антигена.

Поливалентные антитела

Поливалентное антитело может быть интернализировано (и/или катаболизировано) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела, быстрее, чем бивалентное антитело. Антитела, описанные в данном документе, могут быть мультивалентными антителами с тремя или большим количеством антигенсвязывающих сайтов (например, четырехвалентными антителами), которые можно легко получить путем рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Мультивалентное антитело может содержать домен димеризации и три или большее количество антигенсвязывающих сайтов. Типовой домен димеризации содержит (или состоит из) Fc-область или шарнирную область. Мультивалентное антитело может содержать (или состоять из) от трех до около восьми (например, четырех) антигенсвязывающих сайтов. Мультивалентное антитело необязательно содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (например, по меньшей мере две полипептидные цепи), при этом полипептидная цепь содержит два или большее количество переменных доменов. Например, полипептидная цепь(и) могут содержать $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой полипептидную цепь Fc-области, X1 и X2 представляют собой аминокислотный или пептидный спейсер, и n равно 0 или 1.

Конъюгированные антитела

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированными антителами, которые связаны с различными молекулами, включая высокомолекулярные вещества, такие как полимеры (например, полиэтиленгликоль (PEG), полиэтиленмин (PEI), модифицированный посредством PEG (PEI-PEG), полиглутаминовая кислота (PGA)

(сополимеры N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HPMA)), гиалуроновая кислота, радиоактивные материалы (например, ^{90}Y , ^{131}I) флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, гаптены, ферменты, хелаты металлов, лекарственные средства и токсины (например, кальхеамицин, экзотоксин A *Pseudomonas*, рицин (например, дегликозилированная цепь A рицина)).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения для улучшения цитотоксического действия антител, которые связываются с PD-1 человека или PD-L1 человека, и, следовательно, их терапевтической эффективности, антитела конъюгируют с высокотоксичными веществами, включая радиоизотопы и цитотоксические агенты. Эти конъюгаты могут избирательно доставлять токсическую нагрузку к целевому участку (т.е. к клеткам, экспрессирующим антиген, распознаваемый антителом), в то время как клетки, которые не распознаются антителом, сохраняются. Чтобы свести к минимуму токсичность, конъюгаты обычно разрабатывают на основе молекул с коротким периодом полужизни в сыворотке (таким образом, используют мышиные последовательности и изотипы IgG3 или IgG4).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, антитело, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, является модифицированным посредством фрагмента, который улучшает его стабилизацию и/или удержание в системе циркуляции, например, в крови, сыворотке или других тканях, например, по меньшей мере, в 1,5, 2, 5, 10 или 50 раз. Например, антитело, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть связано (например, конъюгировано с) с полимером, например, по существу неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. Подходящие полимеры будут значительно варьировать в зависимости от веса. Можно применять полимеры, имеющие средний молекулярный вес начиная от около 200 до 35 000 дальтон (или от около 1 000 до около 15 000, и от 2 000 до около 12 500). Например, антитело, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть конъюгировано с водорастворимым полимером, например, гидрофильным поливиниловым полимером, например, поливиниловым спиртом или поливинилпирролидоном. Примеры таких полимеров включают гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль (PEG) или полипропиленгликоли, полиоксиэтиленированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры, при условии, что водорастворимость блок-сополимеров сохраняется. Дополнительные пригодные полимеры включают полиоксиалкилены, такие как полиоксиэтилен, полиоксипропилен и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена; полиметакрилаты; карбомеры; и разветвленные или неразветвленные полисахариды.

Вышеописанные конъюгированные антитела могут быть получены путем проведения химических модификаций антител или их форм с более низкой молекулярной массой, описанных в данном документе. Способы модификации антител хорошо известны

в данной области техники (см., например, US 5057313 и US 5156840).

Способы получения антител

Антитела могут продуцироваться в бактериальных или эукариотических клетках. Некоторые антитела, например, Fab', могут продуцироваться в бактериальных клетках, например, в клетках *E. coli*. Антитела также могут продуцироваться в эукариотических клетках, таких как трансформированные клеточные линии (*например*, CHO, 293E, COS). Кроме того, антитела (например, scFv') могут быть экспрессированы в дрожжевых клетках, таких как *Pichia* (см., например, публикацию Powers et al., *J Immunol Methods*. 251:123-35 (2001)), *Hansenula* или *Saccharomyces*. Для получения интересующего антитела, конструируют полинуклеотид, кодирующий антитело, вводят его в вектор экспрессии и затем экспрессируют его в подходящих клетках-хозяевах. Для получения рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения антитела применяются стандартные методы молекулярной биологии.

Если антитело должно быть экспрессировано в бактериальных клетках (например, *E. coli*), вектор экспрессии должен иметь характеристики, позволяющие осуществлять амплификацию вектора в бактериальных клетках. Кроме того, если такую *E. coli*, как JM109, DH5 α , HB101 или XL1-Blue, применяют в качестве хозяина, вектор должен иметь промотор, например промотор *lacZ* (Ward et al., 341:544-546 (1989), промотор *araB* (Better et al., *Science*, 240:1041-1043 (1988)) или промотор T7, который может обеспечить эффективную экспрессию в *E. coli*. Примеры подобных векторов включают, например, векторы серий M13, векторы серий pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), «систему QIAexpress» (QIAGEN), pEGFP и pET (когда применяют этот вектор экспрессии, хозяин предпочтительно, экспрессирует BL21 РНК-полимеразу T7). Для экспрессии антител вектор экспрессии может содержать сигнальную последовательность. Для продуцирования в периплазму *E.coli*, сигнальную последовательность *pelB* (Lei et al., *J. Bacteriol.*, 169:4379 (1987)) можно применять в качестве сигнальной последовательности для секреции антител. Для бактериальной экспрессии можно применять способы с использованием хлорида кальция или способы электропорации для введения вектора экспрессии в бактериальную клетку.

Если антитело должно экспрессироваться в клетках животных, таких как клетки CHO, COS и NIH3T3, вектор экспрессии включает промотор, необходимый для экспрессии в этих клетках, например, промотор SV40 (Mulligan et al., *Nature*, 277:108 (1979)), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 α (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990)), или промотор CMV. В дополнение к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин или его домен, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации), и селективируемые маркерные гены. Ген селективируемого маркера облегчает отбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см.,

например, патенты США №№ 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017). Например, селектируемый маркерный ген обычно придает устойчивость по отношению к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую был введен вектор. Примеры векторов с селектируемыми маркерами включают pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV и pOP13.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитела вырабатываются в клетках млекопитающих. Примеры клеток-хозяев млекопитающих для экспрессии антитела включают яичник китайского хомячка (клетки CHO) (включая клетки dhfr⁻ CHO, описанные в Urlaub и Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, применяемые с DHFR селектируемым маркером, например, как описано в Kaufman и Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), эмбриональные клетки 293 почки человека (например, 293, 293E, 293T), клетки COS, клетки NIH3T3, лимфоцитарные клеточные линии, например клетки миеломы NS0 и клетки SP2, и клетку от трансгенного животного, например, трансгенного млекопитающего. Например, клетка может представлять собой эпителиальную клетку молочной железы.

В типовой системе для экспрессии антител, рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий как тяжелую цепь антитела, так и легкую цепь антитела, которое связывается с PD-1 человека или антителом PD-L1 человека, вводят в клетки dhfr⁻ CHO путем трансфекции, опосредованной фосфатом кальция. В пределах рекомбинантного вектора экспрессии каждый из генов тяжелой и легкой цепи антитела функционально связан с регуляторными элементами энхансера/промотора (например, полученными из SV40, CMV, аденовируса и подобного, такими как регуляторный элемент энхансера CMV/промотора AdMLP или регуляторный элемент энхансера SV40/промотора AdMLP) для управления высокими уровнями транскрипции генов. Рекомбинантный вектор экспрессии также несет ген DHFR, который делает возможным селекцию клеток CHO, которые были трансфицированы вектором с использованием селекции/амплификации с помощью метотрексата. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют, чтобы сделать возможной экспрессию тяжелой и легкой цепей антитела, и выделяют антитело из культуральной среды.

Антитела также могут продуцироваться в организме трансгенных животных. Например, в патенте США № 5 849 992 описывает способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, который содержит специфический по отношению к молоку промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, вырабатываемое самками таких трансгенных млекопитающих, содержит в себе представляющее интерес секретируемое антитело. Антитело может быть очищено от молока или использовано непосредственно для некоторых применений. Также предлагаются животные, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе.

Антитела по настоящему раскрытию могут выделяться внутрь или наружу

(например, в среде) клетки-хозяина и очищены до по существу чистых и гомогенных антител. Для выделения и очистки антител могут быть использованы способы выделения и очистки, обычно применяемые для очистки антител, и не ограниченные каким-либо конкретным способом. Антитела могут быть выделены и очищены посредством соответствующего выбора и комбинирования, например, колоночной хроматографии, фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, осаждения растворителями, экстракции растворителями, дистилляции, иммунопреципитации, электрофореза в SDS-полиакриламидном геле, изоэлектрического фокусирования, диализа и перекристаллизации. Хроматография включает, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию, обращенно-фазовую хроматографию и адсорбционную хроматографию (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Хроматография может быть проведена с использованием жидкофазной хроматографии, такой как ВЭЖХ и FPLC. Колонки, применяемые для аффинной хроматографии, включают колонку с белком А и колонку с белком G. Примеры колонок с использованием колонки с белком А включают Hyper D, POROS и Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). Настоящее изобретение также включает антитела, которые являются высокоочищенными с помощью указанных способов очистки.

Антитела с измененным гликолизированием

Различные гликоформы могут сильно влиять на свойства терапевтического агента, включая фармакокинетику, фармакодинамику, взаимодействие с рецепторами и тканеспецифическое воздействие (Graddis et al., 2002, Curr Pharm Biotechnol. 3: 285-297). В частности, для антител, структура олигосахаридов может влиять на свойства, связанные с устойчивостью к протеазам, период полужизни антитела в сыворотке, опосредованный рецептором FcRn, фагоцитоз и обратную связь антител, в дополнение к эффекторным функциям антитела (например, связывание с комплексом комплемента C1, который индуцирует CDC, и связывание с рецепторами FcγR, которые отвечают за модулирование пути ADCC) (Nose and Wigzell, 1983; Leatherbarrow and Dwek, 1983; Leatherbarrow et al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, PNAS, 89: 4285-4289).

Соответственно, еще один способ модуляции эффекторной функции антител включает изменение гликозилирования константной области антитела. Изменение гликозилирования включает, например, уменьшение или увеличение количества гликозилированных остатков, изменение в структуре и расположении гликозилированных остатков, а также изменение в структуре(ах) сахара. Олигосахариды, обнаруженные в IgG человека, влияют на степень их эффекторной функции (Raju, T.S. BioProcess International April 2003. 44-53); микрогетерогенность олигосахаридов IgG человека может влиять на биологические функции, такие как CDC и ADCC, связывание с различными рецепторами Fc и связывание с белком Clq (Wright A. & Morrison SL. TIBTECH 1997, 15 26-32; Shields et al. J Biol Chem. 2001 276(9):6591-604; Shields et al. J Biol Chem. 2002; 277(30):26733-40;

Shinkawa et al. J Biol Chem. 2003 278(5):3466-73; Umana et al. Nat Biotechnol. 1999 Feb; 17(2): 176-80). Например, способность IgG связывать C1q и активировать каскад реакций комплемента может зависеть от присутствия, отсутствия или модификации углеводного фрагмента, расположенного между двумя доменами CH2 (который обычно закреплен на Asn297) (Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995)).

Сайты гликозилирования в полипептиде содержащем Fc, например, в антителе, таком как антитело IgG, могут быть идентифицированы с помощью стандартных методик. Идентификация сайта гликозилирования может быть экспериментальной или основываться на анализе последовательности или данных моделирования. Были описаны консенсусные мотивы, которые являются аминокислотной последовательностью, распознаваемой различными гликозилтрансферазами. Например, консенсусный мотив для мотива N-связанного гликозилирования часто является NXT или NXS, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. Также были описаны несколько алгоритмов для обнаружения потенциального мотива гликозилирования. Соответственно, для идентификации потенциальных сайтов гликозилирования в пределах антитела или Fc-содержащего фрагмента, последовательность антитела изучается, например, с помощью общедоступных баз данных, таких как веб-сайт, предоставленный Center for Biological Sequence Analysis (см. сервисы NetNGlyc для прогнозирования сайтов N-связанного гликозилирования и сервисы NetOGlyc для прогнозирования сайтов O-связанного гликозилирования).

Исследования in vivo подтвердили снижение эффекторной функции агликозилированных антител. Например, агликозилированное антитело анти-CD8 не способно деплетировать клетки, несущие CD8, у мышей (Isaacs, 1992 J. Immunol. 148: 3062), а агликозилированное антитело анти-CD3 не индуцирует синдром высвобождения цитокинов у мышей или людей (Boyd, 1995 supra; Friend, 1999 Transplantation 68:1632). Агликозилированные формы антитела PD-1 также обладают сниженной эффекторной функцией.

Важно отметить, что в то время как удаление гликанов в домене CH2, по-видимому, оказывает существенное влияние на эффекторную функцию, другие функциональные и физические свойства антител остаются неизменными. В частности, было продемонстрировано, что удаление гликанов практически не влияет на время полужизни в сыворотке и связывание с антигеном (Nose, 1983 supra; Tao, 1989 supra; Dorai, 1991 *выше*; Hand, 1992 *выше*; Hobbs, 1992 Mol. Immunol. 29:949).

Антитела, которые связываются с PD-1 человека или PD-L1 человека по настоящему изобретению, могут быть модифицированы или изменены, чтобы вызвать усиление или снижение эффекторной функции (функций) (по сравнению со вторым PD-1-специфическим антителом). Способы изменения сайтов гликозилирования антител описаны, например, в US 6350861 и US 5714350, WO 05/18572 и WO 05/03175; эти способы можно применять для получения антител по настоящему изобретению с измененным, сниженным гликозилированием или без него.

Способы применения

Описанные в данном документе способы включают лечение раковых заболеваний. Примеры рака включают рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак тонкой кишки, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак заднего прохода, рак эндометрия, рак желудка, рак головы и шеи (например, рак гортани, гортаноглотки, носоглотки, ротоглотки, губ и рта), рак почек, рак печени (например, гепатоцеллюлярная карцинома, холангиоцеллюлярная карцинома), рак легких (например, аденокарцинома, мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточные карциномы легкого, мелкоклеточная и немелкоклеточная карцинома, бронхиальная карцинома, бронхиальная аденома, плевропульмональная бластома), рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак матки, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак поджелудочной железы (например, экзокринная карцинома поджелудочной железы), рак желудка, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак кожи (например, плоскоклеточный рак, саркома Капоши, рак кожи из клеток Меркеля) и рак головного мозга (например, астроцитомы, медуллобластома, эпендимомы, нейроэктодермальная опухоль, опухоли шишковидной железы).

Другие виды рака, которые можно лечить с помощью способов согласно настоящему изобретению, включают раковые новообразования костей, внутриглазные раковые новообразования, гинекологические раковые новообразования, рак эндокринной системы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, рак гипофиза, трижды негативный рак молочной железы (TNBC) и раковые новообразования, вызванные воздействием окружающей среды, в том числе вызванные асбестом.

Дополнительные примеры раковых заболеваний включают гемопоэтические злокачественные новообразования, такие как лейкоз или лимфома, множественная миелома, хроническая лимфоцитарная лимфома, Т-клеточный лейкоз взрослых, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома кожи, острый миелогенный лейкоз, лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома, миелопролиферативные новообразования (например, истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз), макроглобулинемия Вальденстрема, волосатоклеточная лимфома, хроническая миелогенная лимфома, острая лимфобластная лимфома, лимфомы, связанные со СПИДом, а также лимфома Беркитта.

Другие виды раковых заболеваний, которые можно лечить с помощью способа согласно данному изобретению, включают опухоли глаза, глиобластома, меланому, рабдосаркому, лимфосаркому и остеосаркому.

Способы по данному изобретению также применимы для лечения метастатических раковых заболеваний, особенно метастатических раковых заболеваний, которые экспрессируют PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заболевания и показания, которые поддаются лечению с помощью способов по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, гематологический рак, рак головы и шеи,

саркому, рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочевого тракта, рак печени, рак костей, рак нервной системы, гинекологический рак и рак кожи.

Примеры гематологических раковых заболеваний включают лимфомы и лейкозы, такие как острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоцитарный лейкоз (AML), острый промиелоцитарный лейкоз (APL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), малая лимфоцитарная лимфома (SLL), хронический миелоцитарный лейкоз (CML), диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), мантийноклеточная лимфома (MCL), лимфома маргинальной зоны (MZL), неходжкинская лимфома (включая рецидивирующую или резистентную НХЛ) фолликулярная лимфома (FL), лимфома Ходжкина, лимфобластная лимфома, миелопролиферативные заболевания (например, первичный миелофиброз (PMF), истинная полицитемия (PV), эссенциальный тромбоцитоз ET), синдром миелодисплазии (MDS), Т-клеточная острая лимфобластная лимфома (T-ALL), множественная миелома, Т-клеточная лимфома кожи, периферическая Т-клеточная лимфома, макроглобулинемия Вальденстрема, волосатоклеточная лимфома, хроническая миелогенная лимфома и лимфома Беркитта.

Примеры сарком включают хондросаркому, саркому Юинга, остеосаркому, рабдомиосаркому, ангиосаркому, фибросаркому, липосаркому, миксому, рабдомиому, рабдосаркому, фиброму, липому, гарматому и тератому.

Примеры раковых заболеваний легких включают немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого, бронхогенную карциному (плоскоклеточный, недифференцированный мелкоклеточный, недифференцированный крупноклеточный рак, аденокарциному), альвеолярную (бронхиолярную) карциному, бронхиальную аденому, хондроматозную гамартому и мезотелиому.

Примеры раковых заболеваний желудочно-кишечного тракта включают рак пищевода (плоскоклеточную карциному, аденокарциному, лейомиосаркому, лимфому), желудка (карциному, лимфому, лейомиосаркому), поджелудочной железы (протоковую аденокарциному, инсулиному, глюкагоному, гастриному, карциноидные опухоли, апудому), тонкой кишки (аденокарциному, лимфому, карциноидные опухоли, саркому Капоши, лейомиому, гемангиому, липому, нейрофибром, фиброму), толстой кишки (аденокарциному, тубулярную аденому, ворсинчатую аденому, гамартому, лейомиому), колоректальный рак и рак желчных протоков.

Примеры раковых заболеваний мочевого тракта включают рак почки (аденокарциному, опухоль Вильма [нефробластому], почечно-клеточную карциному), мочевого пузыря и уретры (плоскоклеточную карциному, переходно-клеточную карциному, аденокарциному, уротелиальную карциному), предстательной железы (аденокарциному, саркому) и яичка (семиному, тератому, тератокарциному, хориокарциному, саркому, интерстициально-клеточную карциному, фиброму, фиброаденому, аденоматоидные опухоли, липому).

Примеры раковых заболеваний печени включают гепатому (гепатоцеллюлярную карциному), холангиокарциному, гепатобластому, ангиосаркому, гепатоцеллюлярную

аденому и гемангиому.

Примеры раковых заболеваний костей включают, например, остеогенную саркому (остеосаркому), фибросаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную лимфому (ретикулум-клеточную саркому), множественную миелому, злокачественную гигантоклеточную хордому, остеохондрому (костно-хрящевой экзостоз), доброкачественную хондрому, хондробластому, хондромиксофибром, остеонидную остеому и гигантоклеточные опухоли.

Примеры раковых заболеваний нервной системы включают рак черепа (остеома, гемангиома, гранулема, ксантома, деформирующий остит), оболочек головного мозга (менингиома, менингиосаркома, глиоматоз), головного мозга (астроцитомы, медуллобластома, глиома, эпендимома, глиома, герминома (пинеалома), олигодендроглиома, невринома, ретинобластома, врожденные опухоли) и спинного мозга (нейрофиброма, менингиома, глиома, саркома), а также нейробластому, болезнь Лермитта-Дюкло, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС и опухоль оси позвоночника.

Примеры гинекологических раковых заболеваний включают различные виды рака матки (например, карциному эндометрия), шейки матки (карциному шейки матки, предопухолевую дисплазию шейки матки), яичников (карциному яичников (серозную цистаденокарциному, муцинозную цистаденокарциному, неклассифицированную карциному), гранулезно-текальноклеточные опухоли, опухоли из клеток Сертоли-Лейдига, дисгерминому, злокачественную тератому), наружных женских половых органов (плоскоклеточную карциному, внутриэпителиальную карциному, аденокарциному, фибросаркому, меланому), влагалища (светлоклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, ботрионидную саркому (эмбриональную рабдомиосаркому)) и фаллопиевых труб (карциному).

Примеры раковых заболеваний кожи включают меланому, базально-клеточную карциному, плоскоклеточную карциному, саркому Капоши, рак кожи из клеток Меркеля, родинки, диспластические невусы, липому, ангиому, дерматофибром и келоиды.

Примеры видов рака головы и шеи включают глиобластому, меланому, рабдосаркому, лимфосаркому, остеосаркому, плоскоклеточный рак, аденокарциному, рак ротовой полости, рак гортани, рак носоглотки, рак носа и околоносовых органов, рак щитовидной железы и паращитовидных желез.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения гепатоцеллюлярной карциномы у нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения рабдомиосаркомы, рака пищевода, рака молочной железы или рака головы или шеи у нуждающегося в этом пациента.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения рака, при этом рак выбирают из гепатоцеллюлярного рака, рака мочевого

пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, рака эндометрия, рака заднего прохода, карциномы из клеток Меркеля, рака желудка, рака головы и шеи, рака почек, рака печени, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, лейкоза, множественной миеломы, хронической лимфоцитарной лимфомы, Т-клеточного лейкоза взрослых, В-клеточной лимфомы, острого миелогенного лейкоза, лимфомы Ходжкина или неходжкинской лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, волосатоклеточной лимфомы, лимфомы Беркетта, меланобластомы и рабдосаркомы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения рака, при этом рак выбирают из гепатоцеллюлярного рака, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, меланомы, мезотелиомы, рака легких, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака яичек, рака щитовидной железы, плоскоклеточного рака, глиобластомы, нейробластомы, рака матки и рабдосаркомы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ лечения рака, при этом рак выбирают из саркомы, рака головы и шеи, меланомы и немелкоклеточного рака легкого. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой саркому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

Описанные в данном документе способы включают лечение раковых заболеваний, например, солидных опухолей.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения солидную опухоль выбирают из рака кожи, рака легкого, лимфомы, саркомы, рака мочевого пузыря, рака мочеочника, уретры и мочевого пузыря, рака желудка, рака шейки матки, рака печени, рака молочной железы, рака почки, плоскоклеточного рака, карциномы, колоректального рака, рака эндометрия, рака заднего прохода и опухоли с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H), заболевания с дефицитом репарации несоответствия (dMMR) и/или положительного по мутации экзонуклеазного домена ДНК-полимеразы ϵ .

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения солидную опухоль выбирают из холангиокарциномы, меланомы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, лимфомы Ходжкина, уротелиальной карциномы, рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы из клеток Меркеля, трижды негативного рака молочной железы, почечно-клеточной карциномы, плоскоклеточного рака головы и шеи и колоректального рака.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения солидную опухоль выбирают из саркомы, рака головы и шеи, меланомы и немелкоклеточного рака легкого. В

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения солидная опухоль представляет собой саркому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения солидная опухоль представляет собой рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения солидная опухоль представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения солидная опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

В контексте данного документа термин «клетка» предназначен для обозначения клетки, которая находится *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка *ex vivo* может быть частью образца ткани, вырезанного из организма, такого как млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка *in vitro* может представлять собой клетку в клеточной культуре. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка *in vivo* представляет собой клетку, живущую в организме, таком как млекопитающее.

В контексте данного документа термин «приведение в контакт» относится к объединению указанных фрагментов в *in vitro* системе или в *in vivo* системе. Например, «приведение в контакт» киназы ТАМ с Соединением 1 включает введение Соединения 1 индивидууму или пациенту, такому как человек, а также, например, введение Соединения 1 в образец, содержащий клеточный или очищенный препарат, содержащий киназу ТАМ.

В контексте данного документа термины «субъект», «индивидуум» или «пациент», применяемые как синонимы, относятся к любому животному, включая млекопитающих, предпочтительно мышей, крыс, других грызунов, кроликов, собак, кошек, свиней, крупного рогатого скота, овец, лошадей, или приматам и наиболее предпочтительно к людям.

В контексте данного документа термин «воздействие» или «лечение» относится к 1) ингибированию заболевания; например, ингибированию заболевания, патологического состояния или нарушения у субъекта, который испытывает или демонстрирует патологию или симптоматику заболевания, патологического состояния или нарушения (*т. е.*, прекращение дальнейшего развития патологии и/или симптоматики); или 2) облегчению заболевания; например, облегчению заболевания, патологического состояния или нарушения у субъекта, который испытывает или демонстрирует патологию или симптоматику заболевания, патологического состояния или нарушения (*т. е.*, обращение вспять патологии и/или симптоматики), такому как уменьшение тяжести заболевания.

В контексте данного документа термин «профилактика» или «предотвращение» относится к предотвращению заболевания, патологического состояния или нарушения у индивида, который может быть предрасположен к заболеванию, патологическому состоянию или нарушению, но который еще не испытывает или не демонстрирует патологию или симптоматику заболевания.

Комбинированная терапия

I. Лечение онкологического заболевания

На рост и выживание раковых клеток может влиять дисфункция нескольких сигнальных путей. Таким образом, для лечения таких состояний полезно комбинировать различные ингибиторы ферментов/белков/рецепторов, демонстрирующие разные предпочтения в отношении мишеней, активность которых они модулируют. Нацеливание на более чем один сигнальный путь (или более чем на одну биологическую молекулу, участвующую в данном сигнальном пути) может снизить вероятность возникновения лекарственной устойчивости в популяции клеток и/или снизить токсичность лечения.

Один или большее количество дополнительных фармацевтических агентов, таких как, например, химиотерапевтические, противовоспалительные агенты, стероиды, иммунодепрессанты, иммуноонкологические агенты, ингибиторы метаболических ферментов, ингибиторы хемокиновых рецепторов и ингибиторы фосфатазы, а также таргетные терапевтические агенты, такие как ингибиторы киназы Bcr-Abl, Flt-3, EGFR, HER2, JAK, c-MET, VEGFR, PDGFR, c-Kit, IGF-1R, RAF, FAK, CDK2 и CDK4/6, такие как, например, описанные в WO 2006/056399, могут применяться в комбинации со способами и схемами лечения по настоящему изобретению для лечения рака и солидных опухолей. Для лечения рака и солидных опухолей, в комбинации со способами и схемами лечения по настоящему изобретению, можно применять и другие агенты, такие как терапевтические антитела. Один или большее количество дополнительных фармацевтических агентов можно вводить пациенту одновременно или последовательно.

Способы лечения, описанные в данном документе, можно применять в комбинации с одним или большим количеством других терапевтических агентов - ингибиторов ферментов/белков/рецепторов для лечения заболеваний, таких как рак и других заболеваний или нарушений, описанных в данном документе. Например, способы и схемы лечения по настоящему изобретению можно комбинировать с одним или большим количеством ингибиторов следующих киназ для лечения рака: Akt1, Akt2, Akt3, BCL2, CDK2, CDK4/6, TGF- β R, PKA, PKG, PKC, CaM-киназа, киназа фосфорилазы, MEKK, ERK, MAPK, mTOR, EGFR, HER2, HER3, HER4, INS-R, IDH2, IGF-1R, IR-R, PDGF α R, PDGF β R, PI3K (альфа, бета, гамма, дельта, а также множественные или выборочные), CSF1R, KIT, FLK-II, KDR/FLK-1, FLK-4, flt-1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, c-Met, PARP, Ron, Sea, TRKA, TRKB, TRKC, TAM киназы (Axl, Mer, Tyro3), FLT3, VEGFR/Flt2, Flt4, EphA1, EphA2, EphA3, EphB2, EphB4, Tie2, Src, Fyn, Lck, Fgr, Btk, Fak, SYK, FRK, JAK, ABL, ALK и B-Raf. Неограничивающие примеры ингибиторов, которые можно комбинировать со способами и схемами лечения по настоящему изобретению для лечения рака, включают ингибитор FGFR (FGFR1, FGFR2, FGFR3 или FGFR4, например, пемигатиниб (INCY54828), INCB62079), ингибитор EGFR (также известный как Erb-1 или HER-1; например, эрлотиниб, гефитиниб, вандетаниб, орсимертиниб, цетуксимаб, нецитумумаб или панитумумаб), ингибитор или блокатор пути VEGFR (например, бевацизумаб, пазопаниб, сунитиниб, сорафениб, акситиниб, регорафениб), понатиниб, кабозантиниб, вандетаниб, рамуцирумаб, ленватиниб, зив-афлиберцепт), ингибитор PARP (например, олапариб, рукапариб, велипариб или нирапариб), ингибитор JAK (JAK1 и/или

JAK2, например, руксолитиниб, *барицитиниб*, *итацитиниб* (INCB39110), ингибитор LSD1 (например, INCB59872 и INCB60003), ингибитор TDO, ингибитор PI3K-дельта (например, INCB50465 и INCB50797), ингибитор PI3K-гамма, такой как селективный ингибитор PI3K-гамма, ингибитор Pim (например, INCB53914), ингибитор CSF1R, тирозинкиназы рецептора TAM (Tyro-3, Axl и Mer), антагонист рецептора аденозина (например, антагонист рецептора A2a/A2b), ингибитор HPK1, ингибитор хемокинового рецептора (например, ингибитор CCR2 или CCR5), SHP1/2 ингибитор фосфатазы, ингибитор гистондеацетилазы (HDAC), такой как ингибитор HDAC8, ингибитор ангиогенеза, ингибитор рецептора интерлейкина, ингибиторы бромо- и экстратерминальных представителей семейства (например, ингибиторы бромодомена или ингибиторы BET, такие как INCB54329 и INCB57643), ингибиторы c-MET (*например*, капматиниб), антитело анти-CD19 (*например*, тафаситамаб), ингибитор ALK2 (*например*, INCB00928); или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы лечения, описанные в данном документе, комбинируют с введением ингибитора PI3Kδ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы лечения, описанные в данном документе, комбинируют с введением ингибитора JAK. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы лечения, описанные в данном документе, комбинируют с введением ингибитора JAK1 или JAK2 (например, барицитиниба или руксолитиниба). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы лечения, описанные в данном документе, комбинируют с введением ингибитора JAK1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы лечения, описанные в данном документе, комбинируют с введением ингибитора JAK1, который является селективным по отношению к JAK2.

Примеры антител, которые можно вводить в составе комбинированной терапии, включают, помимо прочего, трастузумаб (*например*, анти-HER2), ранибизумаб (*например*, анти-VEGF-A), бевацизумаб (AVASTINTM, *например*, анти-VEGF), панитумумаб (*например*, анти-EGFR), цетуксимаб (*например*, анти-EGFR), ритуксан (*например*, анти-CD20) и антитела, направленные на c-MET.

Один или большее количество из следующих агентов можно вводить в комбинации со способами лечения по настоящему изобретению, которые представлены в виде неограничивающего перечня: цитостатический агент, цисплатин, доксорубицин, таксотер, таксол, этопозид, иринотекан, камптозар, топотекан, паклитаксел, доцетаксел, эпотилоны, тамоксифен, 5-фторурацил, метотрексат, темозоломид, циклофосфамид, SCH 66336, R115777, L778,123, BMS 214662, IRESSATM (гефитиниб), TARCEVATM, антитела к EGFR, интрон, ара-С, адриамицин, цитоксан, гемцитабин, урациловый иприт, хлорметин, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин фосфат, оксалиплатин, лейковирин, , ELOXATINTM (оксалиплатин), пентостатин, винбластин,

винкристин, виндезин, блеомицин, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, митрамицин, дезоксикоформицин, митомицин-С, L-аспарагиназа, тенипозид 17-альфа.-этинилэстрадиол, диэтилстильбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестолацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлоротрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклутетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, леупролид, флутамид, торемифен, гoserелин, карбоплатин, гидроксимочевина, амсакрин, прокарбазин, митотан, митоксантрон, левамизол, навельбен, анастразол, летразол, капецитабин, релоксафин, дроломоксафин, гексузаметилмеламин, авастин, HERCEPTINTM (трастузумаб), BEXXARTM (тозитумаб), VELCADETM (бортезомиб), ZEVALINTM (ибритумаб тиуксетан), TRISENOXTM (триоксид мышьяка), XELODATM (капецитабин), винорелбин, порфимер, ERBITUXTM (цетуксимаб), тиотепа, альтретамин, мелфалан, трастузумаб, лерозол, фульвестрант, эксеметастан, ифосфомид, ритуксимаб, C225 (цетуксимаб), кампас (алемтузумаб), клофарабин, кладрибин, афидиколон, ритуксан, сунитиниб, дазатиниб, тезацитабин, Sm11, флударабин, пентостатин, триапин, дидокс, тримидокс, амидокс, 3-AP и MDL-101731.

Способы и схемы лечения по настоящему изобретению могут дополнительно применяться в комбинации с другими способами лечения раковых заболеваний, например, химиотерапией, лучевой терапией, направленной на опухоль терапией, адъювантной терапией, иммунотерапией или хирургическим вмешательством. Примеры иммунотерапии включают лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2), иммунотерапию CRS-207, противораковую вакцину, моноклональное антитело, биспецифическое или мультиспецифическое антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство, перенос адоптивных Т-клеток, агонисты рецептора Toll, агонисты RIG-I, онколитическую виротерапию и иммуномодулирующие малые молекулы, включая талидомид или ингибитор JAK1/2, ингибитор PI3Kδ и т.п. Соединения можно вводить в комбинации с одним или большим количеством противораковых лекарственных средств, таких как химиотерапевтический агент. Примеры химиотерапевтических агентов включают любой из следующих: абареликс, альдеслейкин, алемтузумаб, алитретиноин, аллопуринол, альтретамин, анастрозол, триоксид мышьяка, аспарагиназу, азациитидин, бевацизумаб, бексаротен, барицитиниб, блеомицин, бортезомиб, бусульфан внутривенно, бусульфан перорально, калустерон, капецитабин, карбоплатин, кармустин, цетуксимаб, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, хлорафабин, циклофосфамид, цитарабин, дакарбазин, дактиномицин, дальтепарин натрия, дазатиниб, даунорубицин, децитабин, денилейкин, денилейкин дифтитокс, дексразоксан, доцетаксел, доксорубицин, дромостанолон пропионат, экулизумаб, эпикадостат, эпирубицин, эрлотиниб, эстрамустин, этопозид фосфат, этопозид, экземестан, фентанилцитрат, филграстим, флоксуридин, флударабин, фторурацил, фульвестрант, гефитиниб, гемцитабин, гемтузумаб, озогамин, гозерелин ацетат, гистрелин ацетат, ибритумаб тиуксетан, идарубицин, ифосфамид, иматиниб мезилат, интерферон альфа 2a, иринотекан, лапатиниб, дитозилат,

леналидомид, летрозол, лейковорин, лейпролида ацетат, левамизол, ломустин, меклорэтамин, мегестрола ацетат, мелфалан, меркаптопурин, метотрексат, метоксален, митомицин С, митотан, митоксантрон, нандролонa фенопропионат, неларабин, нофетумомаб, оксалиплатин, паклитаксель, памидронат, панитимумаб, пегаспаргас, пегфилграстим, пеметрексед динатрий, пентостатин, пипоброман, пликамицин, прокарбазин, хинакрин, расбуриказу, ритуксимаб, руксолитиниб, сорафениб, стрептозоцин, сунитиниб, сунитиниб малеат, тамоксифен, темозоломид, тенипозид, тестолактон, талидомид, тиогуанин, тиотэпа, топотекан, торемифен, тозитумомаб, трастузумаб, третиноин, урациловый иприт, валрубицин, винбластин, винкрестин, винорелбин, вориностат и золедронат.

Дополнительные примеры химиотерапевтических агентов включают ингибиторы протеасом (например, бортезомиб), талидомид, ревлимид и агенты, повреждающие ДНК, такие как мелфалан, доксорубицин, циклофосфамид, винкрестин, этопозид, кармустин и тому подобное.

Примеры стероидов включают кортикостероиды, такие как дексаметазон или преднизон.

Примеры ингибиторов Bcr-Abl включают мезилат иматиниба (GLEEVEC™), нилотиниб, дазатиниб, босутиниб и понатиниб и фармацевтически приемлемые соли. Другие примеры подходящих ингибиторов Bcr-Abl включают соединения и их фармацевтически приемлемые соли, и их аналоги, описанные в патентах США № 5 521 184, WO 04/005281 и США № 60/578 491.

Примеры подходящих ингибиторов Flt-3 включают мидостаурин, лестуртиниб, линифаниб, сунитиниб, сунитиниб малеат, сорафениб, хизартиниб, креноланиб, пакритиниб, тандутиниб, PLX3397 и ASP2215 и их фармацевтически приемлемые соли. Другие примеры подходящих ингибиторов Flt-3 включают соединения и их фармацевтически приемлемые соли, как описано в WO 03/037347, WO 03/099771 и WO 04/046120,

Примеры подходящих ингибиторов RAF включают дабрафениб, сорафениб и вемурафениб, а также их фармацевтически приемлемые соли. Другие примеры подходящих ингибиторов RAF включают соединения и их фармацевтически приемлемые соли, как описано в WO 00/09495 и WO 05/028444,

Пример подходящих ингибиторов FAK включает в себя VS-4718, VS-5095, VS-6062, VS-6063, BI853520 и GSK2256098, и их фармацевтически приемлемые соли. Другие примеры подходящих ингибиторов FAK включают соединения и их фармацевтически приемлемые соли, как описано в WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595 и WO 01/014402.

Примеры подходящих ингибиторов CDK4/6 включают палбоциклиб, рибоциклиб, трилациклиб, лероциклиб и абемациклиб и их фармацевтически приемлемые соли. Другие примеры подходящих ингибиторов CDK4/6 включают соединения и их фармацевтически приемлемые соли, как описано в WO 09/085185, WO 12/129344, WO 11/101409, WO

03/062236, WO 10/075074 и WO 12/061156.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения по настоящему изобретению можно применять в комбинации с одним или большим количеством других ингибиторов киназ, включая иматиниб, в частности, для лечения пациентов, резистентных к иматинибу или другим ингибиторам киназ.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы лечения по настоящему изобретению можно применять в комбинации с химиотерапевтическим агентом при лечении ракового заболевания и они могут улучшить ответ на лечение по сравнению с ответом на один химиотерапевтический агент без усиления его токсических эффектов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы лечения по настоящему изобретению можно применять в комбинации с химиотерапевтическим агентом, предлагаемым в настоящем описании. Например, дополнительные фармацевтические агенты, применяемые при лечении множественной миеломы, могут включать, без ограничения, мелфалан, мелфалан плюс преднизон [MP], доксорубицин, дексаметазон и Velcade (бортезомиб). Другие дополнительные агенты, применяемые при лечении множественной миеломы, включают ингибиторы киназ Bcr-Abl, Flt-3, RAF и FAK. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанный агент представляет собой алкилирующий агент, ингибитор протеасом, кортикостероид или иммуномодулирующий агент. Примеры алкилирующего агента включают циклофосфамид (CY), мелфалан (MEL) и бендамустин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор протеасом представляет собой карфилзомиб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кортикостероид представляет собой дексаметазон (DEX). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иммуномодулирующий агент представляет собой леналидомид (LEN) или помалидомид (POM). Аддитивные или синергетические эффекты являются желательными результатами комбинирования способов лечения по настоящему изобретению с дополнительным агентом.

Агенты можно комбинировать с Соединением 1 и/или антителом, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающим фрагментом, в способах лечения по настоящему изобретению в лекарственной форме для разового или непрерывного приема, или агенты можно вводить одновременно или последовательно в виде отдельных лекарственных форм.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения кортикостероид, такой как дексаметазон, вводят пациенту в комбинации со способами лечения по настоящему изобретению, при этом дексаметазон вводят периодически, а не непрерывно.

Способы лечения, описанные в настоящем документе, можно комбинировать с другим иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки, а также клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины. Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно

применять, включают пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназа, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF.

Способы лечения, описанные в данном документе, можно применять в комбинации с протоколом вакцинации для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения опухолевые клетки трансдуцируются для экспрессии GM-CSF. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения противоопухолевые вакцины включают белки вирусов, вызывающих рак человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус герпетической саркомы Капоши (KHSV). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы и схемы лечения по настоящему изобретению можно применять в комбинации с опухолеспецифическим антигеном, таким как белки теплового шока, выделенные из самой опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способы лечения, описанные в данном документе, можно комбинировать с иммунизацией дендритных клеток для активации сильных противоопухолевых ответов.

Способы и схемы лечения по настоящему изобретению можно применять в комбинации с биспецифическими макроциклическими пептидами, которые нацеливают эффекторные клетки, экспрессирующие рецептор Fc альфа или Fc гамма, на опухолевые клетки. Способы и схемы лечения по настоящему изобретению также можно комбинировать с макроциклическими пептидами, которые активируют иммунный ответ хозяина.

В некоторых других вариантах осуществления настоящего изобретения способы лечения по настоящему изобретению комбинируют с введением других терапевтических агентов пациенту до, во время и/или после трансплантации костного мозга или трансплантации стволовых клеток. Способы и схемы лечения по настоящему изобретению можно применять в комбинации с трансплантацией костного мозга для лечения разнообразных опухолей гематопоетической природы.

Когда пациенту вводят более одного фармацевтического агента, как описано в любом из приведенных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, их можно вводить одновременно, по отдельности, последовательно или в комбинации (*например*, для более чем двух агентов).

Способы безопасного и эффективного введения большинства этих химиотерапевтических агентов известны специалистам в данной области техники. Кроме того, их применение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических агентов описано в публикации «Physicians' Desk Reference» (PDR, e.g., 1996 edition, Medical Economics Company, Монтвейл, штат Нью-Джерси), описание которой включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

II. Терапевтические средства, воздействующие на иммунные контрольные точки

Соединения по настоящему изобретению (Соединение 1 или его фармацевтически

приемлемую соль) можно применять в комбинации с одним или большим количеством ингибиторов иммунных контрольных точек для лечения заболеваний, таких как рак или инфекции. Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают ингибиторы против молекул иммунных контрольных точек, таких как CBL-B, CD20, CD28, CD40, CD70, CD122, CD96, CD73, CD47, CDK2, GITR, CSF1R, JAK, PI3K дельта, PI3K гамма, TAM, аргиназа, HPK1, CD137 (также известная как 4-1BB), ICOS, A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, LAG3, TIM3, TLR (TLR7/8), TIGIT, CD112R, VISTA, PD-1, PD-L1 и PD-L2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула иммунной контрольной точки представляет собой молекулу, стимулирующую контрольную точку, выбранную из CD27, CD28, CD40, ICOS, OX40, GITR и CD137. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула иммунной контрольной точки представляет собой молекулу, ингибирующую контрольную точку, выбранную из A2AR, B7-H3, B7-H4, BTLA, CTLA-4, IDO, KIR, LAG3, PD-1, TIM3, TIGIT и VISTA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения, описанные в данном документе, можно применять в комбинации с одним или большим количеством агентов, выбранных из ингибиторов KIR, ингибиторов TIGIT, ингибиторов LAIR1, ингибиторов CD160, ингибиторов 2B4 и ингибиторов TGF β .

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения, описанные в данном документе, можно применять в комбинации с одним или большим количеством агонистов молекул иммунных контрольных точек, например, OX40, CD27, GITR и CD137 (также известная как 4-1BB).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой антитело анти-PD1, антитело анти-PD-L1 или антитело анти-CTLA-4.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1 или PD-L1, например, моноклональное антитело анти-PD-1 или анти-PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 или анти-PD-L1 представляет собой ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, авелумаб, цемиплимаб, атезолизумаб, авелумаб, тислелизумаб, спартализумаб (PDR001), цетрелимуаb (JNJ-63723283), торипалимуаb (JS001), камрелизумаб (SHR-1210), синтилимаб (IBI308), AB122 (GLS-010), AMP-224, AMP-514/MEDI-0680, BMS936559, JTX-4014, BGB-108, SHR-1210, MEDI4736, FAZ053, BCD-100, KN035, CS1001, BAT1306, LZM009, AK105, HLX10, SHR-1316, CBT-502 (TQB2450), A167 (KL-A167), STI-A101 (ZKAB001), CK-301, BGB-A333, MSB-2311, HLX20, TSR-042 или LY3300054. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор PD-1 или PD-L1 представляет собой ингибитор, описанный в патентах США № 7 488 802, 7 943 743, 8 008 449, 8 168 757, 8 217 149 или 10 308 644; публикациях патентных заявок США 2017/0145025, 2017/0174671, 2017/0174679, 2017/0320875, 2017/0342060, 2017/0362253, 2018/0016260, 2018/0057486, 2018/0177784, 2018/0177870, 2018/0179179, 2018/0179201, 2018/0179202, 2018/0273519,

2019/0040082, 2019/0062345, 2019/0071439, 2019/0127467, 2019/0144439, 2019/0202824, 2019/0225601, 2019/0300524 или 2019/0345170; или публикациях PCT WO 03042402, WO 2008156712, WO 2010089411, WO 2010036959, WO 2011066342, WO 2011159877, WO 2011082400 или WO 2011161699, все из которых включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор PD-L1 представляет собой INCB086550.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой антитело анти-PD-1, например, моноклональное антитело анти-PD-1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой ниволумаб, пембролизумаб, цемиплимаб, спартализумаб, камрелизумаб, цетрелимаб, торипалимаб, синтилимаб, AB122, AMP-224, JTX-4014, BGB-108, BCD-100, BAT1306, LZM009, AK105, HLX10 или TSR-042. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой ниволумаб, пембролизумаб, цемиплимаб, спартализумаб, камрелизумаб, цетрелимаб, торипалимаб или синтилимаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой пембролизумаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой ниволумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-PD-1 представляет собой цемиплимаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой спартализумаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой камрелизумаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой цетрелимаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой торипалимаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой синтилимаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой AB122. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой AMP-224. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой JTX-4014. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой BGB-108. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой BCD-100. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой BAT1306. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой LZM009. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой AK105. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой HLX10. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 представляет собой TSR-042. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело анти-PD-1

представляет собой ниволумаб или пембролизумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-PD-1 представляет собой SHR-1210. Другие противораковые агенты включают терапевтические антитела, такие как 4-1BB (например, урелумаб, утомилумаб). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L1, например, моноклональное антитело анти-PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело анти-PD-L1 представляет собой атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, тислелизумаб, BMS-935559, MEDI4736, атезолизумаб (MPDL3280A; также известное как RG7446), авелумаб (MSB0010718C), FAZ053, KN035, CS1001, SHR-1316, CBT-502, A167, STI-A101, CK-301, BGB-A333, MSB-2311, HLX20 или LY3300054. В некоторых вариантах реализации, антитело анти-PD-L1 представляет собой атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб или тислелизумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-PD-L1 представляет собой атезолизумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-PD-L1 представляет собой авелумаб. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-PD-L1 представляет собой дурвалумаб. В некоторых вариантах реализации, антитело анти-PD-L1 представляет собой тислелизумаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой BMS-935559. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой MEDI4736. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой FAZ053. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой KN035. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой CS1001. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой SHR-1316. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой CBT-502. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой A167. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой STI-A101. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой CK-301. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой BGB-A333. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой MSB-2311. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой HLX20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-L1 представляет собой LY3300054.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой малую молекулу, которая связывается с PD-L1, или ее фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной

точки представляет собой малую молекулу, которая связывается и интернализует PD-L1, или ее фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой соединение, выбранное из соединений, описанных в публикациях US 2018/0179201, US 2018/0179197, US 2018/0179179, US 2018/0179202, US 2018/0177784, US 2018/0177870, US сер. № 16/369654 (подана 29 марта 2019 г.) и US сер. № 62/688164, или его фармацевтически приемлемую соль, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор KIR, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор представляет собой MCLA-145.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор CTLA-4, например, антитело анти-CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-CTLA-4 представляет собой ипилимумаб, тремелиумаб, AGEN1884 или CP-675,206.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор LAG3, например, антитело анти-LAG3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-LAG3 представляет собой BMS-986016, LAG525, INCAGN2385 или эфтилагимод альфа (IMP321).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор CD73. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор CD73 представляет собой олеклумаб.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор TIGIT. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор TIGIT представляет собой OMP-31M32.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор VISTA. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор VISTA представляет собой JNJ-61610588 или CA-170.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор B7-H3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор B7-H3 представляет собой эноблитузумаб, MGD009 или 8H9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор

молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор KIR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор KIR представляет собой лирилумаб или IPH4102.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор A2aR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор A2aR представляет собой CPI-444.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор TGF-бета представляет собой трабедерсен, галузертиниб или M7824.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PI3K-гамма. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор PI3K-гамма представляет собой IPI-549.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор CD47. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор CD47 представляет собой Hu5F9-G4 или TTI-621.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор CD73. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор CD73 представляет собой MEDI9447.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор CD70. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор CD70 представляет собой кусатузумаб или BMS-936561.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения изобретения молекула ингибитора иммунной контрольной точки является ингибитором TIM3, например, антитело анти-TIM3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-TIM3 представляет собой INCAGN2390, MBG453 или TSR-022.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор CD20, например, антитело анти-CD20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-CD20 представляет собой обинутузумаб или ритуксимаб.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист молекулы иммунной контрольной точки представляет собой агонист OX40, CD27, CD28, GITR, ICOS, CD40, TLR7/8 и CD137 (также известная как 4-1BB).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист CD137

представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист CD137 представляет собой утомилумаб.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист молекулы иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор GITR. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист GITR представляет собой TRX518, MK-4166, INCAGN1876, MK-1248, AMG228, BMS-986156, GWN323, MEDI1873 или MEDI6469. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист молекулы иммунной контрольной точки представляет собой агонист OX40, например, антитело-агонист OX40 или слитый белок OX40L. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-OX40 представляет собой INCAGN01949, MEDI0562 (таволимаб), MOXR-0916, PF-04518600, GSK3174998, BMS-986178 или 9B12. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения слитый белок OX40L представляет собой MEDI6383.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист молекулы иммунной контрольной точки является агонистом CD40. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист CD40 представляет собой CP-870893, ADC-1013, CDX-1140, SEA-CD40, RO7009789, JNJ-64457107, APX-005M или Chi Lob 7/4.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист молекулы иммунной контрольной точки представляет собой агонист ICOS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист ICOS представляет собой GSK-3359609, JTX-2011 или MEDI-570.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист молекулы иммунной контрольной точки представляет собой агонист CD28. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист CD28 представляет собой терализумаб.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист молекулы иммунной контрольной точки представляет собой агонист CD27. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист CD27 представляет собой варлиумаб.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист молекулы иммунной контрольной точки представляет собой агонист TLR7/8. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения агонист TLR7/8 представляет собой MEDI9197.

Соединения по настоящему изобретению можно применять в комбинации с биспецифическими антителами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения один из доменов биспецифического антитела нацелен на рецептор PD-1, PD-L1, CTLA-4, GITR, OX40, TIM3, LAG3, CD137, ICOS, CD3 или TGF β . В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело связывается с PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело, которое связывается с PD-1 и PD-L1, представляет собой MCLA-136. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело связывается с PD-L1 и CTLA-4. В некоторых

вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело, которое связывается с PD-L1 и CTLA-4, представляет собой АК104.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединения согласно настоящему описанию можно применять в комбинации с одним или большим количеством ингибиторов метаболических ферментов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ингибитор метаболического фермента представляет собой ингибитор IDO1, TDO или аргиназы. Примеры ингибиторов IDO1 включают эпакадостат, NLG919, BMS-986205, PF-06840003, IOM2983, RG-70099 и LY338196. Ингибиторы ингибиторов аргиназы включают INCB1158.

Как описано в данном документе, дополнительные соединения, ингибиторы, агенты и т.д. могут быть объединены с настоящим соединением в лекарственной форме для разового или непрерывного приема, или их можно вводить одновременно или последовательно в виде отдельных лекарственных форм.

Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 или его фармацевтически приемлемая соль могут быть включены в состав фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, может быть включено в состав фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции, содержащие соединение и антитело, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, могут быть составлены в виде фармацевтических композиций для введения субъекту, например, для лечения нарушения, описанного в данном документе. Как правило, фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемый носитель. В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Композиция может включать фармацевтически приемлемую соль, например, кислотно-аддитивную соль или щелочно-аддитивную соль (см, например, публикацию Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19).

Фармацевтический состав относится к хорошо известному уровню техники, который дополнительно описан, например, в публикациях Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); and Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

Фармацевтические композиции могут быть в различных формах. Эти формы включают в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или

суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Как правило, композиции для агентов, которые описаны в данном документе, существуют в форме инъекций или растворов для инфузий.

Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены путем включения агента, описанного в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В общем случае, дисперсии готовят путем включения агента, описанного в данном документе, в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, в результате которых получают порошок агента, описанного в данном документе, плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно простерилизованного фильтрованием. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Продленную абсорбцию инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело, которое связывается с PD-1 человека или PD-L1 человека, или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть приготовлено с носителем, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, таким как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы изготовления таких лекарственных средств запатентованы или общеизвестны. См., например, публикацию Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение входит в состав фармацевтической композиции, дополнительно содержащей по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения при приготовлении композиций, описанных в данном документе, соединение смешивают с вспомогательным веществом, разбавляют вспомогательным веществом или заключают в такой носитель в форму, например, капсулы, саше, бумаги или другого контейнера. Когда

вспомогательное вещество служит разбавителем, оно может быть твердым, полутвердым или жидким материалом, который служит несущей средой, носителем или средой для активного ингредиента. Таким образом, композиции могут находиться в форме таблеток, драже, порошков, пастилок, саше, крахмальных капсул, эликсиров, суспензий, эмульсий, растворов, сиропов, аэрозолей (твердых или в жидкой среде), мазей, содержащих, например, до 10% масс. активного соединения, мягких и твердых желатиновых капсул, суппозиториев, стерильных растворов для инъекций или стерильных упакованных порошков.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения описанные в данном документе фармацевтические композиции представлены в форме таблеток.

Для получения состава, соединение можно размалывать, чтобы обеспечить подходящий размер частиц, до объединения с другими ингредиентами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение можно измельчить до размера частиц частиц менее 200 меш. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения размер частиц можно регулировать измельчением для обеспечения по существу равномерного распределения в составе, например, около 40 меш.

Некоторые примеры подходящих вспомогательных веществ включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмалы, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп и метилцеллюлозу. Составы могут дополнительно содержать: смазывающие агенты, такие как тальк, стеарат магния и минеральное масло; смачивающие агенты; эмульгирующие и суспендирующие агенты; консерванты, такие как метил- и пропилгидроксibenзоат; подсластители; и ароматизаторы. Композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены так, чтобы обеспечить быстрое, пролонгированное или отсроченное высвобождение активного ингредиента после введения пациенту с использованием процедур, известных в данной области техники.

Композиции могут быть составлены в виде стандартной лекарственной формы. Термин «стандартные лекарственные формы» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для людей и других млекопитающих, каждая единица содержит заранее определенное количество соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта (например, желаемый профиль PK), в сочетании с подходящим фармацевтическим вспомогательным веществом.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения для приготовления твердых композиций, таких как таблетки, соединение смешивают с фармацевтическим вспомогательным веществом с образованием твердой композиции предварительного состава, содержащей гомогенную смесь соединения. Когда указывают, что эти предварительно составленные композиции гомогенные, понимают, что соединение, как правило, диспергировано равномерно по всей композиции, так что композицию легко можно разделить на равно эффективные стандартные лекарственные

формы, такие как таблетки, драже и капсулы. Этот твердый предварительный состав затем подразделяют на стандартные лекарственные формы.

Таблетки или драже по настоящему изобретению могут быть покрыты или модифицированы другим способом для получения лекарственной формы, обладающей преимуществом пролонгированного действия. Например, таблетка или драже может содержать внутренний компонент дозировки и внешний компонент дозировки, причем последний находится в форме оболочки для первого. Два компонента могут разделяться энтеросолюбильным слоем, который препятствует разложению в желудке и позволяет внутреннему компоненту в неизменном виде попасть в двенадцатиперстную кишку или высвободиться отсрочено. Для таких энтеросолюбильных слоев или покрытий можно применять различные материалы; такие материалы содержат ряд полимерных кислот и смеси полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Жидкие формы, в которые могут быть включены композиции, как описано в данном документе, для перорального введения включают в себя водные растворы, пригодным образом ароматизированные сиропы, водные или масляные суспензии и ароматизированные эмульсии с пищевыми маслами, такими как хлопковое масло, сезамовое масло, кокосовое масло или арахисовое масло, а также настои и подобные фармацевтические среды.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции, описанные в данном документе, стерилизуют обычными способами стерилизации или могут подвергаться стерилизации фильтрованием. Водные растворы могут быть упакованы для применения как есть или лиофилизированы, причем лиофилизированный состав объединяют со стерильным водным носителем перед введением. Значение pH составов соединений обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно, от 5 до 9 и, наиболее предпочтительно, от 7 до 8. Следует понимать, что применение некоторых из вышеупомянутых вспомогательных веществ, носителей или стабилизаторов приведет к образованию фармацевтических солей.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят перорально. В одном варианте осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в виде пероральной капсулы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят один раз в сутки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 5 мг до около 150 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 5 мг до около 120 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 5 мг до около 100 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 5 мг до около 80 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего

изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 5 мг до около 60 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 5 мг до около 40 мг. В некоторых вариантах реализации Соединение 1 вводят в суточной дозе от примерно 5 мг до примерно 20 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 5 мг до около 10 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 10 мг до около 150 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 10 мг до около 120 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 10 мг до около 100 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 10 мг до около 80 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 10 мг до около 60 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 10 мг до около 40 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе от около 10 мг до около 20 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят в суточной дозе около 5 мг, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 30 мг, около 45 мг, около 60 мг, около 90 мг или около 120 мг.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят один раз в день по схеме непрерывного введения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 вводят по 28-дневной схеме введения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ретифанлимаб вводят внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ретифанлимаб вводят один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ретифанлимаб вводят один раз в четыре недели.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ретифанлимаб вводят в дозе от около 250 мг до около 1000 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ретифанлимаб вводят в дозе от около 400 мг до около 600 мг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ретифанлимаб вводят в дозе около 500 мг.

Меченые соединения

Другой аспект настоящего изобретения относится к меченому Соединению 1 (радио-меченому, флуоресцентно-меченому, изотопно-меченому и т.д.), что может быть полезно не только в методах визуализации, но также и в анализах как *in vitro*, так и *in vivo*.

Настоящее изобретение дополнительно включает изотопно-меченое Соединение 1. «Изотопно-» или «радио-меченое» соединение представляет собой Соединение 1, в котором один или большее количество атомов заменены или замещены атомом, имеющим

атомную массу или массовое число, отличные от атомной массы или массового числа, обычно обнаруживаемых в природе (т. е. встречающихся в природе). Подходящие радионуклиды, которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению включают, помимо прочего, ^2H (также обозначаемый как D для дейтерия), ^3H (также обозначаемый как T для трития), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I и ^{131}I . Например, один или большее количество атомов водорода в соединении по настоящему изобретению могут быть заменены атомами дейтерия и могут быть необязательно замещены атомами дейтерия.

Один или большее количество составляющих атомов Соединения 1 могут быть заменены или замещены изотопами атомов в естественном или не встречающимся в природе количестве. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Соединение 1 включает по меньшей мере один атом дейтерия. Например, один или большее количество атомов водорода в соединении по настоящему изобретению можно заменять или замещать дейтерием. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанное соединение включает два или большее количество атомов дейтерия. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения указанное соединение включает 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 или 1-6 атомов дейтерия. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения все атомы водорода в соединении могут быть заменены или замещены атомами дейтерия.

Синтетические методы включения изотопов в органические соединения известны в данной области техники (Deuterium Labeling in Organic Chemistry by Alan F. Thomas (New York, N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1971; The Renaissance of H/D Exchange by Jens Atzrodt, Volker Derdau, Thorsten Fey and Jochen Zimmermann, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 7744-7765; The Organic Chemistry of Isotopic Labelling by James R. Hanson, Royal Society of Chemistry, 2011). Меченые изотопами соединения могут быть использованы в различных исследованиях, таких как ЯМР-спектроскопия, эксперименты по метаболизму и/или анализы.

Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может обеспечить определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличенным временем полужизни *in vivo* или сниженными требованиями к дозе, и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых обстоятельствах (см., *например*, публикацию A. Kerekes et al. J. Med. Chem. 2011, 54, 201-210; R. Xu et al. J. Label Compd. Radiopharm. 2015, 58, 308-312). В частности, замена в одном или большем количестве участках метаболизма может обеспечить одно или большее количество терапевтических преимуществ.

Понятно, что «радиоизотопно-меченое» или «меченое» соединение представляет собой соединение, которое содержит по меньшей мере один радионуклид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения радионуклид выбирают из группы, состоящей из ^3H и ^{14}C . В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения радионуклид выбирают из группы, состоящей из ^{11}C , ^{18}F , ^{75}Br , ^{76}Br и ^{77}Br .

Наборы

Настоящее изобретение также включает фармацевтические наборы, применяемые, например, для лечения рака, упомянутого в данном документе, которые включают один или большее количество контейнеров, содержащих фармацевтическую композицию, описанную в данном документе. Такие наборы могут дополнительно содержать, если это желательно, один или большее количество разнообразных компонентов традиционно принятых фармацевтических наборов, таких как, например, контейнеры с одним или большим количеством фармацевтически приемлемых носителей, дополнительных контейнеров и т. д., что будет легко понятно специалистам в данной области техники. Инструкции, либо в виде вкладышей, либо в виде ярлыков с указанием количества вводимых компонентов, руководств по введению и/или руководств по смешиванию компонентов, также могут быть включены в набор.

ПРИМЕРЫ

Данное изобретение будет описано более подробно на конкретных примерах. Следующие ниже примеры предлагаются в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники легко распознают множество не критических параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу тех же результатов.

Общие способы

Клетки H1299 (RRID: CVCL_0060) поддерживались в RPMI-1640 (RPMI, ThermoFisher Scientific, Карлсбад, штат Калифорния; #11875-093), питательной среде с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS; GE Healthcare; #SH30071.03) и получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC; #CRL-5803). Клетки BAF3 получали из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ; Брауншвейг, Германия; #ACC 300) и выращивали в RPMI с добавлением 10% FBS плюс 4 нг/мл интерлейкина (IL)-3. Клетки G361 (RRID: CVCL_1220) получали от ATCC (#CRL-1424) и поддерживали в среде RPMI, содержащей 10% FBS. Все линии клеток человека были аутентифицированы с помощью профилирования коротких tandemных повторов в течение последних 3 лет. Все эксперименты проводились с клетками, не содержащими микоплазмы. Ретифанлимаб был предоставлен компанией Incyte и представлял собой антитело против белка программируемой гибели клеток человека (PD)-1. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) были получены в результате нормального лейкофереза двух здоровых доноров (Biological Specialties, Кольмар, штат Пенсильвания).

Пример А. Биохимический анализ

Биохимическую способность Соединения 1 ингибировать ферментативную активность представителей семейства TAM исследовали с помощью анализов TR-FRET с применением рекомбинантных фосфорилированных форм киназных доменов для AXL, MER и TYRO3.

Активность фосфо-AXL (pAXL), cMER и Tyro3 киназы измеряли с помощью

анализа переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET). Аутофосфорилирование AXL проводили путем инкубации рекомбинантного белка AXL (ThermoFisher Scientific; #PV4275) в буфере, содержащем 50 мМ Трис, pH 7,5, 0,2 мг/мл AXL, 5 мМ АТФ, 20 мМ MgCl₂ и 2 мМ дитиотреитола (DTT) при комнатной температуре в течение 1 часа. Буфер для анализа киназы содержал 50 мМ HEPES, pH 7,5, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 0,01% NP-40 и 2 мМ DTT. Растворы ферментов 0,69 нМ фосфо-AXL или 0,088 нМ cMER (Carna Biosciences, Кобе, Япония; #08-108) или 0,137 нМ TYRO3 (Life Technologies, PR7480A) готовили в буфере для анализа. 1 мМ исходный раствор пептидного субстрата биотин-EQEDEPEGDYFEWLE-амид (Quality Controlled Biochemicals, Хопкинтон, штат Массачусетс), растворенный в диметилсульфоксиде (DMSO), разбавляли до 1 мкМ в буфере для анализа, содержащем 2000 мкМ АТФ. Соединение 1 (15 нл) растворяли в DMSO и переносили из планшетов с соединениями в малообъемные белые 384-луночные планшеты для анализа (Perkin Elmer ProxiPlate, Уолтем, штат Массачусетс). Раствор фермента (6 мкл; или буфер для анализа ферментного холостого раствора) добавляли в соответствующие лунки каждого планшета и инкубировали в течение 30 минут. Затем добавляли 6 мкл/лунку раствора субстрата для инициации реакции. Планшет защищали от света и инкубировали при комнатной температуре (21 °C) в течение 60 минут (cMER и TYRO3) или 90 минут (AXL). Реакцию останавливали добавлением 6 мкл раствора для обнаружения, содержащего 50 мМ трис-HCl, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 0,05% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 45 мМ EDTA, 180 нМ SA-APC (Perkin Elmer; CR130-100).) и 3 нМ Eu-W1024 против фосфотирозина PY20 (Perkin Elmer; AD0067). Планшет инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре и измеряли гомогенный сигнал флуоресценции с временным разрешением (HTRF) на устройстве для считывания планшетов PheraStar FS (BMG Labtech, Ортенберг, Германия). Процент ингибирования рассчитывали для каждой концентрации, и значение половинной максимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) получали из подбора кривой с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (Сан-Диего, штат Калифорния).

Обратимость соединения определяли путем измерения восстановления ферментативной активности cMER после быстрого и большого разведения комплекса cMER-ингибитор. cMER, АТФ и биотин-меченый пептидный субстрат разводили в буфере для анализа киназ, содержащем 50 мМ HEPES, pH 7,5, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 0,01% NP-40 и 2 мМ DTT. Реагенты для обнаружения (240 нМ SA-APC [Perkin Elmer; CR130-100] и 4 нМ Eu-W1024 против фосфотирозина PY20 [Perkin Elmer; AD0067]) готовили в буфере для обнаружения, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7,8, 150 мМ NaCl, 0,05% BSA и 45 мМ EDTA. Для определения способа ингибирования соединений измеряли значения IC₅₀ при различных концентрациях АТФ (конечные концентрации 25, 100, 300 и 1000 мкМ в реакции). Соединение 1 инкубировали с АТФ и ферментом (66 пМ cMER) в 8 мкл буфера для анализа в течение продолжительного времени (2 часа). В этих условиях равновесие между соединениями, АТФ и ферментом достигалось до начала реакции добавлением 4

мкл 1,5 мкМ биотин-меченого пептида. Через 1 час инкубации реакцию останавливали с помощью 4 мкл реагента для обнаружения, содержащего 60 мМ EDTA, 240 нМ SA-APC (Perkin Elmer; CR130-100) и 4 нМ Eu-W1024 против фосфотирозина PY20 (Perkin Elmer; #AD0067). Планшеты для анализа считывали в режиме HTRF с помощью устройства для чтения планшетов PheraStar через 30 минут инкубации. Были построены кривые «доза-ответ», и значения IC_{50} были нанесены на график как функция концентраций АТР. Константу ингибирования (K_i) для Соединения 1 рассчитывали, подгоняя данные к уравнению конкурентного ингибирования ($IC_{50}=K_i (1+ [ATP]/K_m)$).

Средние значения IC_{50} для нескольких партий Соединения 1 в отношении AXL, MER и TYRO3 составляли $0,61 \pm 0,31$ нМ ($n=18$), $3,17 \pm 1,97$ нМ ($n=25$), и 101 ± 27 нМ ($n=25$), соответственно, демонстрируя примерно 30-кратную селективность по сравнению с TYRO3. Соединение 1 также оценивали при 200 нМ в комплексном исследовании киназ, которое включало 179 киназ. Соединение 1 было примерно в 60 раз селективнее в отношении AXL и MER по сравнению с с-Met и не ингибировало какие-либо другие киназы. Эти результаты демонстрируют, что Соединение 1 является мощным и высокоселективным ингибитором киназ AXL и MER. Способ ингибирования по отношению к концентрации АТР оценивали с помощью анализа киназы MER. Как продемонстрировано на Фиг. 1, значения IC_{50} Соединения 1 для киназы MER линейно увеличиваются с концентрацией АТР, указывая на АТР-конкурентный способ ингибирования.

Пример В. Анализы клеточной пролиферации

Для оценки клеточной активности и селективности в пределах семейства рецепторов TAM, были созданы клеточные линии BAF3 мыши со стабильной экспрессией AXL, MER или TYRO3.

Цитоплазматический домен AXL, MER или TYRO3, слитый с последовательностью димеризации и меткой HA, клонировали в вектор pMSCV (вирус стволовых клеток мышей) с маркером устойчивости к пуромицину для создания трех конструкций по отдельности путем электропорации в клетки BAF3. Отбирали и характеризовали отдельные клоны, которые являлись IL-3—независимыми и устойчивыми к пуромицину. Чтобы оценить влияние на пролиферацию клеток BAF3, 1000 клеток/лунку клеток BAF3, BAF3-AXL, BAF3 MER или BAF3-TYRO3 обрабатывали в присутствии или в отсутствие Соединения 1 в различных концентрациях (10 точек концентрации с трехкратным коэффициентом разведения от самой высокой концентрации 10 мкМ) разбавляли в RPMI-1640 с 2% FBS в течение 48 часов на 384-луночном планшете. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа АТР (CellTiter-Glo Assay, Promega, Мэдисон, штат Висконсин) в соответствии с процедурой, предложенной производителем. Данные преобразовывали в процент ингибирования относительно контроля DMSO и кривые IC_{50} аппроксимировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Обработка стабильных трансфектантов BAF3 Соединением 1 сильно ингибировала

пролиферацию клеток BAF3, экспрессирующих киназу AXL или MER, с концентрацией, необходимой для 50% ингибирования роста (GI_{50}), величинами 16 ± 11 нМ и $14 \pm 4,9$ нМ соответственно, но слабо ингибировала рост клеток BAF3, экспрессирующих TYRO3 ($IC_{50}=498 \pm 161$ нМ) и был неактивен в отношении родительских клеток BAF3 ($IC_{50} > 4000$ нМ). Эти клеточные данные согласуются с биохимическими данными и подтверждают, что Соединение 1 является мощным ингибитором AXL и MER и более чем в 30 раз селективнее в отношении TYRO3.

Пример С. Анализ ингибирования pAXL в клетках H1299

Способность Соединения 1 модулировать активность AXL оценивали на линиях опухолевых клеток, экспрессирующих высокие уровни эндогенного AXL. Было показано, что клеточная линия немелкоклеточного рака легкого H1299 демонстрирует заметно повышенную экспрессию белка AXL.

Клетки H1299 высевали (30000 клеток/лунку) в 96-луночные планшеты для культур тканей (Costar, Corning Incorporated, Корнинг, штат Нью-Йорк) и инкубировали в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. Добавляли Соединение 1 в соответствующей концентрации и инкубировали в течение 1 часа при 37°C с 5% CO₂. rhGAS6 (R&D Systems, Миннеаполис, штат Миннесота; #885-GSB) добавляли в количестве 1 мкг/мл в каждую лунку и планшеты инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 15 минут. Клетки собирали и лизировали в 110 мкл охлажденного льдом буфера для лизиса (Cell Signaling Technology, Дэнверс, штат Массачусетс; #9803) с ингибиторами протеазы и фосфатазы (ThermoFisher Scientific; #78446) в течение 1 час на льду и хранили при -80 °C для ELISA. Планшеты для ELISA готовили путем инкубации планшетов Greiner lumitrac с высоким связыванием с 8 мкг/мл антитела анти-AXL (R&D Systems; MAB154) в течение ночи при комнатной температуре. Планшеты промывали и блокировали фосфатно-солевым буфером (PBS) с 0,1% BSA. Клеточные лизаты наносили на планшеты для ELISA и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали и инкубировали с антителом LANCE Eu-W1024 против фосфотиروزина (Perkin Elmer; #AD0067) в буфере для анализа DELFIA (Perkin Elmer; #4002-0010) в течение 2 часов при комнатной температуре, промывали и добавляли усиливающий раствор DELFIA (Perkin Elmer; #4001-0010). Планшеты осторожно встряхивали в течение 15 минут при комнатной температуре и считывали на PheraStar (BMG Labtech). Данные преобразовывали в процент ингибирования относительно контроля DMSO и определение IC_{50} Соединения 1 выполняли путем подгонки кривой процентного ингибирования *по сравнению с* логарифмом концентрации ингибитора с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Обработка Соединением 1 клеток H1299 сильно ингибировала pAXL со значением IC_{50} $1,8 \pm 0,63$ нМ (N= 19), как продемонстрировано на Фиг. 2.

Пример D. Анализ ингибирования фосфо-MER в клетках G361

Активность Соединения 1 относительно блокирования аутофосфорилирования MER оценивали в клетках G361, линии клеток меланомы, экспрессирующих высокий

уровень киназы MER.

Свежеразмороженным клеткам G361 давали возможность восстановиться в течение трех пассажей перед применением, и в анализе применяли только клетки за 20 пассажей после размораживания. Клетки хранили в неконфлюэнтных условиях и использовали для роста в логарифмической фазе. Два мл 1×10^6 клеток/мл (2×10^6 клеток/лунку) клеток G361 добавляли в шестилуночные планшеты для тканевых культур (Corning Incorporated; #3961) на 2 дня. Во время анализа в каждую лунку добавляли по 1 мл среды. Для определения активности Соединения 1, исходный раствор 5 мМ Соединения 1 в DMSO применяли для трехкратного серийного разведения рабочих исходных растворов DMSO, которые затем разводили в культуральной среде, и в каждую лунку добавляли 100 мкл разбавленного соединения с конечными концентрациями в диапазоне от 0,2 нМ до 1 мкМ. В контрольные лунки в отсутствие Соединения 1 добавляли 100 мкл 0,22% DMSO для поддержания конечной концентрации DMSO 0,02% в каждом образце. Смеси клеток и соединения инкубировали в течение 1 часа при 37 °C во влажном инкубаторе с добавлением 5% CO₂, затем в каждую лунку, кроме нестимулированного образца, добавляли по 10 мкл 55,5 мкг/мл MER-активирующего антитела (R&D Systems; #MAB8912; конечная концентрация 500 нг/мл) в PBS, кроме нестимулированного образца, и инкубировали в течение 30 минут при 37 °C в увлажненном инкубаторе с добавлением 5% CO₂. После инкубации каждую лунку дважды промывали 2 мл холодного PBS. Буфер для лизиса (120 мкл; Cell Signaling Technology; #9803), содержащий 1 мМ PMSF, ингибиторы фосфатазы Halt (разведение 1:100; ThermoFisher Scientific; #78426) и ингибиторы протеазы (разведение 1:50; Cal Biochem® #535140; MilliporeSigma, Берлингтон, штат Массачусетс) добавляли к каждому образцу и инкубировали на льду в течение 30 минут. Экстракты клеток переносили на 96-луночный планшет с V-образным дном, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут при 4°C и хранили экстракты при 80°C до проведения анализа ELISA на фосфо-MER (pMer; R&D Systems; #DYC2579). Оптическую плотность планшета измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов Molecular Devices SpectraMax Plus (Molecular Devices, Сан-Хосе, штат Калифорния) при 450 нм с коррекцией длины волны при 540 нм. Значения абсорбции стандартов наносили на график *в зависимости* от концентрации для создания стандартной кривой с помощью программного обеспечения для подбора кривой с четырехпараметрическим алгоритмом (приложение SOFTmax PRO, Molecular Devices). Концентрации pMER для неизвестных образцов определяли путем экстраполяции из стандартной кривой. Значения IC₅₀ рассчитывали с помощью GraphPad Prism 7.0 с использованием сигмоидальной кривой доза-ответ нелинейной регрессии с переменным наклоном.

Как продемонстрировано на Фиг. 3, Соединение 1 эффективно блокирует фосфорилирование MER, индуцированное MAB8912, в клетках меланомы G361 со значением IC₅₀ $8,3 \pm 3,1$ нМ (N= 2).

Пример Е. Ингибирование активности киназы MER в первичных макрофагах

Оценивали способность Соединения 1 модулировать активность киназы MER в макрофагах.

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) отделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque, а любые оставшиеся эритроциты (эритр.) лизировали с применением $1\times$ эритр. лизирующего буфера (Cell Signaling Technology) в течение 5 минут при комнатной температуре. PBMC промывали PBS перед тем, как обогатить моноцитами с помощью разделения посредством положительной селекции с использованием CD14-микрогранул в соответствии с протоколом производителя, как указано (AutoMacs Pro, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Германия). CD14⁺ клетки первоначально высевали по $1,5 \times 10^6$ на лунку в шестилуночные планшеты в RPMI-1640+10% термоинактивированного FBS и 10% АВ сыворотки человека (Sigma-Aldrich Corp., Сент-Луис, штат Миссури), 100 ед/мл пенициллина+100 мкг/мл стрептомицина (Corning), дополненного 100 нг/мл макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF; R&D Systems; #216-MC) и культивировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 10 дней. Свежий M-CSF добавляли в среду каждые 3 дня до тех пор, пока макрофаги не прикреплялись. При подготовке к анализу среду удаляли, а клетки повторно подпитывали свежей средой без сыворотки человека. Исходные растворы Соединения 1 готовили при 1000 $\times$ в 100% DMSO и разбавляли сначала 67-кратно в среде, а затем еще 15-кратно при добавлении к макрофагам. Макрофаги обрабатывали Соединением 1 в течение 2 часов при 37 °C, 5% CO₂. К макрофагам добавляли 5 мкг/мл антитела анти-MER MAB8912 (R&D Systems) еще на 30 минут, после чего клетки промывали холодным PBS. Весь PBS осторожно отсасывали из лунок, а сухие планшеты замораживали при -20 °C.

Макрофагам давали оттаять на льду перед лизисом с помощью 250 мкл/лунку $1\times$ буфера для лизиса (Cell Signaling Technology; #9803) и ингибиторов протеазы и фосфатазы Halt (ThermoFisher Scientific) в течение 1 часа при 4 °C. Лизированные клетки соскребали и переносили во флакон Эппендорфа на лед. Лизаты центрифугировали при 12700 об/мин в течение 15 минут при 4 °C. Опухоли PDX взвешивали и гомогенизировали с буфером для лизиса, дополненным смесями ингибиторов протеаз и фосфатаз (Roche, Базель, Швейцария; #11836170001). Опухоли лизировали на льду в течение 30 минут с последующим центрифугированием при 13000 об/мин в течение 10 минут. Белковые лизаты количественно определяли с помощью набора для анализа белков BCA (Pierce, ThermoFisher Scientific; #23225). Лизаты переносили в новую пробирку вместе с буфером для образцов 6 $\times$ Laemmli SDS (Alfa Aesar, Хаверхилл, штат Массачусетс) и образцы нагревали в течение 6 минут при 95 °C. Приблизительно 50 мкг образца белка загружали в лунку с использованием мини-гелей Трис-глицин Novex™ 8-16% или 4-12% Трис-глицин Novex WedgeGels (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью системы сухого блоттинга iBlot (ThermoFisher Scientific). Мембраны блокировали 0,5% обезжиренным сухим молоком в промывочном буфере (100 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl, pH 8,0, 0,1% Tween 20) в течение 1 часа при

комнатной температуре. Первичное антитело, использованное для pMER, было получено от компании PhosphoSolutions (Aurora, CO; #p186-749). Остальные антитела были получены от компании Cell Signaling Technology: MER (#4319), pAXL (#5724), AXL, (#4566), GAS6 (#67202), pAKT (#4060), AKT (#9272) и β -актин (#4970). Первичные антитела добавляли в соотношении 1:500 и 1:1000, соответственно, в 0,5% молоко/промывочный буфер и встряхивали в течение ночи при 4 °C. Мембраны промывали три раза в промывочном буфере перед инкубацией со вторичным антителом (анти-кроличьи IgG1-HRP; Cell Signaling Technology) в соотношении 1:2500 в 0,5% молоко/промывочный буфер в течение 2 часов при комнатной температуре. Мембраны снова промывали перед обнаружением полос с помощью хемилюминесцентного субстрата SuperSignal West Dura Extended Duration (ThermoFisher Scientific) и визуализировали с помощью цифрового имидж-сканера Fluorochem M (Protein Simple, Сан-Хосе, штат Калифорния).

Соединение 1 было способно ингибировать pMER в первичных макрофагах в зависимости от концентрации с IC_{50} $1,6 \pm 0,4$ нМ (N=2), как продемонстрировано на Фиг. 4. Эти данные свидетельствуют о том, что Соединение 1 может ингибировать активность киназы MER как в опухолевых, так и в первичных иммунных клетках человека.

Пример F. Анализ подавления пролиферации Т-клеток макрофагами

Чтобы исследовать функциональную активность Соединения 1, оценивали эффекты на опосредованное макрофагами подавление пролиферации Т-клеток.

PBMC человека выделяли из периферической крови здоровых доноров центрифугированием в градиенте плотности на Ficoll-Нугауе (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс; #17-1440-02) с последующей очисткой с применением анти-CD14 микрогранул (Miltenyi Biotec; #130-050-201). Выделенные CD14⁺ моноциты/макрофаги инкубировали со 100 нг/мл M-CSF (R&D Systems; #216-MC) и 50 нг/мл TGF β 1 (R&D Systems; #240-B) при 37°C в течение 6 дней; 100 мкл/лунку CD14⁺ макрофагов высевали с плотностью $0,5 \times 10^6$ клеток/мл в 96-луночный круглодонный культуральный планшет (Costar; #3799) и обрабатывали Соединением 1 в течение ночи при 37 °C. CD4⁺CD25⁻ эффекторные Т-клетки (T_{eff}) выделяли с применением набора регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺ Dynabeads (Life Technologies; #11363D) и клетки T_{eff} метили сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE) с помощью набора для пролиферации клеток CellTrace CFSE (ThermoFisher Scientific; #C34554). Свежие CFSE-меченные клетки T_{eff} смешивали с Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific; #11132D) в соотношении 5:1, затем к CD14⁺ макрофагам, обработанным Соединением 1, добавляли 100 мкл/лунку смеси Т-клетки/гранулы в концентрации 1×10^6 клеток/мл и продолжали культивирование при 37°C в течение 5 дней. Клетки T_{eff} анализировали с помощью проточного цитометра (BD LSRFortessa X-20, BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния), а бесклеточный супернатант тестировали в анализе Luminex (Millipore; #HCYTOMAG-60K_38plex) для измерения концентрации различных цитокинов и хемокинов.

На Фиг. 5А продемонстрировано, что Соединение 1 частично обращало вспять опосредованное макрофагами подавление пролиферации Т-клеток. Это было связано с увеличением продукции IFN- γ , как продемонстрировано на Фиг. 5В.

Пример G. Анализ совместного культивирования клеток РВМС

Оценивали способность Соединения 1 взаимодействовать с блокадой контрольных точек для дополнительного усиления противоопухолевого ответа. Клетки рака легкого H1299 совместно культивировали со стимулированными РВМС человека, обработанными Соединением 1, антителом против белка программируемой гибели клеток человека (PD)-1, ретифанлимабом или их комбинацией, и оценивали продукцию провоспалительных цитокинов в двух разных экспериментах (Фиг. 6). Был проведен третий эксперимент, который подтвердил эти результаты (не приведены).

Клетки H1299 совместно культивировали с РВМС человека, в количестве 4 или 16×10^4 клеток/мл в среде RPMI, содержащей 10% FBS, 100 ЕД/мл пенициллин-стрептомицина (ThermoFisher Scientific; #15140-122) и 1 μ М бета-меркаптоэтанол (ThermoFisher Scientific; #21985-023). Соединение 1 или ретифанлимаб добавляли к клеткам в виде отдельных агентов или в комбинации. Анти-CD3 (BD Biosciences #555336), анти-CD28 (BD Biosciences #555725) или SEA (Toxin Technology, Сарасота, штат Флорида; #AT101red) добавляли в конечной концентрации 1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл или 100 нг/мл соответственно для стимуляции роста клеток. Культуры инкубировали при 37 °C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение 4 дней. Супернатант собирали для анализа цитокинов с помощью системы мультиплексного анализа (специальный набор ProcartaPlex Luminex для человека, ThermoFisher Scientific; #PPX-15-MXRWE6P).

Соединение 1, в качестве отдельного агента, индуцировало IFN- γ , фактор некроза опухоли- α , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и умеренно индуцировало IL-12 p70 (Фиг. 6В-6D). Хотя ретифанлимаб также индуцировал эти цитокины у части доноров, комбинация Соединения 1 и ретифанлимаба продемонстрировала заметное увеличение продукции цитокинов по сравнению с отдельными агентами (Фиг. 6), включая IL-2 (Фиг. 6А). Эти данные демонстрируют, что комбинация Соединения 1 с блокадой контрольных точек может индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов *in vitro*.

Пример H. Исследования эффективности *in vivo*

Для тестирования потенциальной иммуномодулирующей активности Соединения 1 *in vivo* были проведены исследования противоопухолевой эффективности на сингенных моделях опухолей.

Модели ксенотрансплантатов, полученных от пациентов (PDX), являются широко применяемой моделью опухоли у животных, с помощью которой можно оценить противоопухолевую эффективность противораковых препаратов (Jin K, Teng L, Shen Y, He K, Xu Z, Li G. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review, Clin Transl Oncol (2010) 12:473-80. doi: 10.1007/s12094-010-0540-6). Модель PDX создают путем имплантации свежей раковой ткани пациентов

непосредственно мышам с ослабленным иммунитетом. Эти модели отличаются от моделей ксенотрансплантатов на основе клеток тем, что модель PDX никогда не пассируют *in vitro*, тогда как ксенотрансплантаты на основе клеток создаются имплантированными клетками, выращенными в культуре ткани. Было продемонстрировано, что модели PDX сохраняют генетический состав и морфологию тканей первичных опухолей пациентов, что делает их ценными инструментами в доклинических разработках лекарственных средств (Izumchenko E, Paz K, Ciznadija D, Sloma I, Katz A, Vasquez-Dunddel D, et al. Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors. *Ann Oncol* (2017) 28:2595-605. doi: 10.1093/annonc/mdx416). Модели PDX применяли для оценки реакции противораковых препаратов на моделях опухолей при различных раковых состояниях (Gao H, Korn JM, Ferretti S, Monahan JE, Wang Y, Singh M, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat Med* (2015) 21:1318-25. doi: 10.1038/nm.3954). Эти исследования оказались полезными для идентификации моделей, которые отвечают на лечение, а также тех, которые не отвечают, что может наблюдаться среди опухолей с одним и тем же раковым состоянием.

Клетки MBT-2 получали из банка клеток Японской коллекции исследовательских биоресурсов и содержались в среде DMEM с добавлением 10% FBS. Клетки MC38 получали из NCI. Клетки 4T1 получали из ATCC и поддерживали в среде RPMI с добавлением 10% FBS. В экспериментах с MBT-2, 5×10^5 MBT-2 клеток инокулировали подкожно в правый задний бок 6-8-недельных мышей C3H или бестимусных «голых» мышей (Charles River Laboratories, Уилмингтон, штат Массачусетс). В исследованиях MC38, 12-недельным самкам мышей C57BL/6 инокулировали *brei* опухолей MC38 (пассаж 6 *in vivo*) в правый задний бок. В исследованиях 4T1, $7,5 \times 10^5$ 4T1 клеток инокулировали подкожно в правый задний бок 6-8-недельных самок мышей BALB/c или бестимусных «голых» мышей (Charles River Laboratories). Мышей рандомизировали по объему опухоли с $n=10-12$ особей на группу. Соединение 1 вводили перорально два раза в день (2 р/д) непрерывно от начала до конца исследования. В исследовании MC38, лиганд 1 против белка программируемой гибели клеток (PD-L1) (BE0101, Bio X Cell, Западный Ливан, штат Нью-Хэмпшир) вводили внутривентрально в дозе 15 мг/кг дважды в неделю. Группе, получавшей носитель, и группе, получавшей Соединение 1, два раза в неделю также вводили крысиное контрольное антитело IgG2b (BE0090, Bio X Cell), начиная с начала лечения. В исследовании 4T1, однократную дозу анти-PD-L1 вводили внутривентрально в дозе 15 мг/кг в начале исследования. В комбинированных исследованиях контрольной группе с носителем и мышам, получавшим анти-PD-L1, непрерывно вводили носитель 2 р/д до конца исследования. Носитель и Соединение 1 вводили перорально 2 р/д. В ходе эксперимента за мышами наблюдали на предмет роста опухоли и явной переносимости. Модели опухолей PDX были созданы в Champions Oncology (Хакенсак, штат Нью-Джерси). Опухоли PDX имплантировали бестимусным «голым» мышам-самкам в возрасте

от 6 до 8 недель. Когда объем опухоли составлял примерно 150-250 мм³, мышей рандомизировали по объему опухоли и вводили Соединение 1 в количестве 10, 30 или 100 мг/кг 2 р/д через желудочный зонд. Объем опухоли рассчитывали по формуле $(L \times W^2)/2$, где L и W означают размеры длины и ширины соответственно. Ингибирование роста опухоли (TGI) рассчитывали по формуле $(1 - (V_T/V_C)) \times 100$, где V_T - объем опухоли в группе лечения в последний день лечения, а V_C - объем опухоли в контрольной группе в последний день лечения. Двусторонний дисперсионный анализ (ANOVA) с критерием множественных сравнений Даннета использовали для определения статистических различий между группами лечения (GraphPad Prism). Животных помещали в барьерное помещение, полностью аккредитованное Международной ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными. Все процедуры проводились в соответствии с Политикой государственной службы США по уходу за людьми и использованием лабораторных животных, а также в соответствии с Руководством Комитета по уходу и использованию животных Incyte.

В конце исследования опухоли собирали через 4 часа после введения последней дозы Соединения 1 и помещали на лед. Образцы опухолей разрезали на фрагменты размером 2 мм и переносили в пробирки C (Miltenyi Biotec; #130-096-334). Диссоциацию опухоли проводили согласно протоколу производителя (Miltenyi Biotec; #130-096-730). Фильтр промывали холодным PBS и образцы осаждали. Эритроциты лизировали в Pharm Lyse (BD Biosciences; #555899). Клетки промывали PBS и ресуспендировали в PBS с красителем Live/Dead (LifeTech Scientific, Шэньчжэнь, Китай; #L34966) в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем клетки промывали в PBS и ресуспендировали в буфере для окрашивания (BD; #554657) и к образцам добавляли следующие антитела на 30 минут при 4 °C: CD3 (BD; #553062), CD45 (BD; #564279), CD8 (BD; #560182), CD4 (BD; #552775), CD11b (BD; #557657), F4/80 (eBiosciences, Сан-Диего, штат Калифорния; #12-4801-82), МНС класса II (BD; #562564) и CD206 (BioLegend; #141708). Клетки промывали, фиксировали и пермеабелизовали с применением буфера для фиксации/пермеабелизации (eBioscience 00-5523-00). Клетки ресуспендировали в буфере для пермеабелизации (eBioscience; 00-8333). Антитело Ki-67 (BioLegend, Сан-Диего, штат Калифорния; #652413) добавляли к образцам на 1 час при комнатной температуре. Затем клетки промывали и повторно суспендировали в буфере для окрашивания (BD; #554657) для сбора. Макрофаги M1 идентифицировали в популяции CD45⁺, CD11b⁺ F4/80⁺ как МНС класса II^{Hi}/CD206^{Lo}, а макрофаги M2 идентифицировали как МНС класса II^{Lo}/CD206^{Hi}. Данные получали на BD Fortessa и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Уровни интерферона (IFN)-γ в опухолях количественно определяли с помощью набора для мультиплексного обнаружения белков в соответствии с протоколом производителя (MesoScale Diagnostics, Роквилл, штат Мэриленд). Статистическую значимость определяли с помощью одностороннего анализа ANOVA с тестом множественных сравнений Даннета (GraphPad Prism).

Соединение 1 индуцировало дозозависимую эффективность в моделях опухолей

МВТ-2 и 4Т1 (Фиг. 7А и 7В). У иммунодефицитных мышей с такими же опухолями не отмечалось активности, что подтверждает тот факт, что противоопухолевая активность зависела от функциональной иммунной системы по меньшей мере в этих моделях (Фиг. 7С). В модели 4Т1, обработка Соединением 1 повышала соотношение М1-подобных и М2-подобных макрофагов дозозависимым образом (Фиг. 7D). На основании наблюдаемой повышенной активности *in vitro* с первичными РВМС человека Соединение 1 тестировали в комбинации с блокадой контрольных точек *in vivo*. В модели МС38, как Соединение 1, так и анти-PD-L1 обладали противоопухолевой активностью по отдельности, но значительно более высокой активностью в комбинации (Фиг. 8А). Оба препарата по отдельности индуцировали пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и, в большей степени, в комбинации (Фиг. 8В и 8С). Комбинированное лечение также приводило к повышению уровня IFN-γ в опухолях по сравнению с лечением одним агентом (Фиг. 8D). Эти данные демонстрируют, что Соединение 1 индуцирует поляризацию макрофагов, увеличивает функциональную активность CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и, в комбинации с блокадой контрольных точек, усиливает противоопухолевую активность *in vivo*.

Пример I. Модели саркомы PDX

Активность Соединения 1 в моделях саркомы PDX оценивали, как описано в примере Н для моделей PDX. Бестимусным «голым» мышам с опухолями (а) СТG-2041, (б) СТG-1302 или (с) СТG-1339 вводили перорально два раза в день Соединение 1 в дозах 10 мг/кг, 30 мг/кг и 100 мг/кг. Опухоли СТG-2041 или СТG-1339 от мышей, получавших Соединение 1 или носитель, лизировали и анализировали с помощью вестерн-блоттинга на pAXL, AXL, pMER, MER, GAS6, pAKT, AKT и β-актин. Анализировали по три мыши на группу. Данные вестерн-блоттинга получали из разных гелей. Эксперимент с опухолями СТG-2041 представляет собой модель ангиосаркомы. Эксперимент с опухолями СТG-1302 представляет собой модель лейомиосаркомы. Эксперимент с опухолями СТG-1339 представляет собой модель остеосаркомы.

Сильный противоопухолевый ответ наблюдался у СТG-2041 с эквивалентной активностью при дозе Соединения 1 10, 30 и 100 мг/кг 2 р/д и демонстрировал 95% TGI (Фиг. 9А). Устойчивый противоопухолевый ответ также наблюдался у СТG-1302 (Фиг. 9В). Напротив, СТG-1339 была устойчивой к обработке Соединением 1 (Фиг. 9С). Чтобы понять потенциальные механизмы, ответственные за различия, наблюдаемые у ответчиков по сравнению с неответчиками, оценивали влияние Соединения 1 на активацию AXL и MER, а также на нисходящую передачу сигналов в опухолях СТG-2401 и СТG-1339 (Фиг. 9D). В то время как Соединение 1 ингибировало pAXL и pMER в обеих моделях, СТG-2041 экспрессировала значительно более высокие уровни общего AXL и MER, особенно pAXL и pMER (Фиг. 9D). pAKT ингибировался только в СТG-2041, что коррелирует с противоопухолевой эффективностью Соединения 1. Лечение соединением 1 также повышало общие уровни MER в обеих моделях опухолей, а также уровни GAS6 в СТG-2041.

Далее эксперимент был проведен на бестимусных «голых» мышах с опухолями (а) CTG-2426 (миксофибросаркома) и (b) CTG-1861 (стромальная желудочно-кишечная опухоль). Результаты этих экспериментов приведены в таблице ниже.

Модель	Подтип	TGI (%)
CTG-2426	Миксофибросаркома	42
CTG-1861	Стромальная стромальная желудочно-кишечная опухоль	74

Пример J. Гуманизированная модель мыши

Животных помещали в барьерное помещение, полностью аккредитованное Международной ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными. Все процедуры проводились в соответствии с Политикой государственной службы США по уходу за людьми и использованием лабораторных животных, а также в соответствии с Руководством Комитета по уходу и использованию животных Incyte. Пять миллионов клеток H1299 (ATCC) были имплантированы подкожно в правый задний бок самкам реконструированных NSG мышей CD34⁺ в возрасте от 20 до 24 недель (The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн). Инокуляции клеток включали Matrigel (#354248; Корнинг, штат Нью-Йорк) в объемном соотношении 1:1 в фосфатно-солевом буфере (PBS). При усреднении объемов опухолей ~150 мм³, мышей рандомизировали как по объему опухоли, так и по донору (2-5 доноров на группу) на группы по 10 человек и вводили либо носитель, либо антитело изотипического контроля IgG1 человека, Соединение 1, ретифанлимаб или их комбинацию. Соединение 1 растворяли в 50 мМ цитратном буфере в 0,5% метилцеллюлозе и вводили перорально в дозе 30 мг/кг 2 р/д. Ретифанлимаб разводили в PBS и вводили каждые 5 дней внутривенно в дозе 5 мг/кг. Ингибирование роста опухоли (TGI) рассчитывали по формуле $(1-(V_T/V_C)) \cdot 100$, где V_T - объем опухоли в группе лечения в последний день лечения, а V_C - объем опухоли в контрольной группе в последний день лечения. Статистический анализ проводили с использованием двухстороннего дисперсионного анализа.

Пример K. Исследования фазы 1

В этом Примере описано открытое исследование фазы 1, разработанное для оценки безопасности и переносимости, фармакокинетики, фармакодинамики и предварительной эффективности монотерапии Соединением 1 (Часть 1) и Соединением 1 в комбинации с ретифанлимабом (Часть 2).

Как Часть 1, так и Часть 2 включают определение дозы и увеличение дозы. Части 1A и 1B включают участников с отдельными солидными опухолями; Часть 1C включает участников с AML. В Части 2A и 2B участвуют только участники с отдельными солидными опухолями. Исследуемое лечение продолжается до тех пор, пока не будет достигнуто прогрессирование заболевания, неприемлемая токсичность, смерть, отзыв согласия или любой другой критерий отмены лечения.

Часть 1: Однокомпонентное Соединение 1

Исследование начинается с Части 1A. Первоначально 3 участника в когорте с

начальным уровнем дозы получают однократную дозу Соединения 1, после чего следует рассчитанная по времени оценка фармакокинетики для подтверждения экспозиции примерно за 1 неделю до начала непрерывного введения. Уровень дозы для непрерывного введения для каждого участника определяется на основе экспозиции при этой оценке фармакокинетики в соответствии с рекомендациями по дозированию на основе экспозиции, перечисленными ниже:

Если $AUC_{0-24ч}$ по данным фармакокинетического анализа однократной дозы составляет от $> 1000 \text{ нМ} \cdot \text{ч}$, но $< 2000 \text{ нМ} \cdot \text{ч}$ и $C_{24 ч}$ составляет $\geq 15 \text{ нМ}$, начинают непрерывное введение с дозы однокомпонентного Соединения 1, равной 10 мг один раз в день (1 р/д).

Если $AUC_{0-24ч}$ по данным фармакокинетического анализа однократной дозы составляет $> 2000 \text{ нМ} \cdot \text{ч}$ и $C_{24 ч} > 15 \text{ нМ}$, начинают непрерывное введение с дозы 5 мг 1 р/д.

Если $AUC_{0-24ч}$ по данным фармакокинетического анализа однократной дозы составляет $< 1000 \text{ нМ} \cdot \text{ч}$ и $C_{24 ч} < 15 \text{ нМ}$, начинают непрерывное введение с дозы 15 мг 1 р/д.

Если $AUC_{0-24ч}$ по данным фармакокинетического анализа однократной дозы составляет $> 15\,000 \text{ нМ} \cdot \text{ч}$ или $C_{24 ч} > 50 \text{ нМ}$, медицинский монитор оценивает уровни экспозиции у участника, чтобы определить, можно ли безопасно лечить участника или участник прекратит прием исследуемого лечения.

Повышение дозы начинается с самой низкой дозы, введенной среди первых 3 участников. Например, если 1 из первых 3 участников получает 5 мг 1 р/д, когорты с назначенным начальным уровнем дозы будут тогда составлять 5 мг 1 р/д и оцениваться на безопасность и переносимость с использованием дизайна исследования 3+3+3. На основании этого сценария участники зачисляются в когорту 5 мг до тех пор, пока не будет достаточно участников и данных, чтобы объявить дозу 5 мг переносимой. Точно так же, если самая низкая доза среди первых 3 участников составляет 10 мг 1 р/д или 15 мг 1 р/д, то 10 мг 1 р/д или 15 мг 1 р/д соответственно будут назначенным начальным уровнем дозы, и участники будут зачисляться в когорту с наименьшим уровнем дозы до тех пор, пока этот уровень дозы в когорте не будет объявлен переносимым. Любой из первых 3 участников фармакокинетического анализа однократной дозы, который начинает с дозы, превышающей назначенную начальную дозу Соединения 1, остается на своей дозе, основанной на экспозиции, и включается в когортный анализ соответствующего уровня дозы.

В случае, если уровни у первых 3 участников в Цикле 1, День 1 ниже целевой экспозиции ($AUC_{0-24ч} 1000 \text{ нМ} \cdot \text{ч}$ ИЛИ $C_{24ч} \leq 15 \text{ нМ}$), следующее повышение уровня дозы может быть больше чем 50%, но не более чем 100%. Фармакокинетический анализ однократной дозы проводится у первых 3 участников в когорте с любым уровнем дозы, в которой доза увеличена более чем на 50%, и может быть проведен с дополнительными участниками или с любым другим уровнем дозы по усмотрению спонсора. Схема определения дозы для Соединения 1 приведена ниже:

Уровень дозы	Доза Соединения 1	Частота введения
Уровень 1 дозы	5 мг	1 р/д в 28-дневных циклах
Начальная доза/уровень дозы 1	10 мг	1 р/д в 28-дневных циклах
Уровень 2 дозы	15 мг	1 р/д в 28-дневных циклах
Уровень 3 дозы	20 мг	1 р/д в 28-дневных циклах
Уровень 4 дозы	30 мг	1 р/д в 28-дневных циклах
Уровень 5 дозы	45 мг	1 р/д в 28-дневных циклах
Уровень 6 дозы	60 мг	1 р/д в 28-дневных циклах
Уровень 7 дозы	90 мг	1 р/д в 28-дневных циклах
Уровень 8 дозы	120 мг	1 р/д в 28-дневных циклах

После выбора рекомендуемой дозы для увеличения («RDE») в Части 1А, начинается Часть 1В.

Часть 1В включает 4 независимые когорты увеличения дозы для конкретных опухолей (меланома, НМРЛ, SCCN и саркома мягких тканей), примерно по 12 участников в каждой, чтобы дополнительно охарактеризовать безопасность, переносимость, эффективность и фармакодинамические эффекты RDE Соединения 1. От всех участников Части 1В требуются парные биопсии опухолей (до лечения, а затем между Циклом 2, День 1 и Циклом 3, День 1). После того, как будут получены данные о безопасности в результате эскалации дозы комбинации Соединения 1 и ретифанлимаба в Части 2А и будет определено, что доза комбинации является безопасной и переносимой, субъекты, продолжающие участвовать в когортах с увеличением дозы в Части 1В после выполнения первичной биопсии во время лечения и визуализации опухоли, а также с одобрения спонсора, могут также получать ретифанлимаб. Участники Части 1В, которые начинают комбинированную терапию, должны повторить Циклы 1 и 2 для оценки безопасности и фармакокинетики и должны согласиться на повторную биопсию через 4-8 недель после начала комбинированного лечения. Доза Соединения 1 не превышает уровней дозы, протестированных и определенных как безопасные и переносимые в комбинации с ретифанлимабом в Части 2А.

Часть 1С исследования также может начинаться после выявления RDE в Части 1А и проводится параллельно с Частью 1В. Начало зачисления в эту когорту увеличения дозы зависит от решения спонсора. В этой части исследования участников с рецидивирующим и/или рефрактерным AML включают в 1 независимую когорту увеличения дозы и оценивают безопасность, переносимость и предварительную эффективность RDE Соединения 1 в этой популяции. В Части 1С используется двухэтапный дизайн Саймона (Simon) с правилом остановки, позволяющим досрочно прекратить участие в исследовании в конце Этапа 1, если не наблюдается никаких ответов. На Этапе 1 набирают 10 участников; если объективных ответов не наблюдается, дальнейший набор не проводится, чтобы свести к минимуму количество участников, получавших лечение без

признаков клинической эффективности. Если наблюдается хотя бы 1 объективный ответ, то в эту когорту можно набрать до 19 дополнительных участников, чтобы не более 29 участников были зачислены в Часть 1С.

Часть 2: Соединение 1 в комбинации с ретифанлимабом

Часть 2 включает Часть 2А и Часть 2В. Часть 2А представляет собой этап определения дозы, который выполняется с использованием дизайна 3+3+3 для оценки безопасности и переносимости Соединения 1 в комбинации с ретифанлимабом у участников с отдельными распространенными солидными опухолями.

Часть 2А начинается после того, как уровень дозы признан безопасным и переносимым в Части 1А, и может быть набор параллельно с Частью 1А, но на 1 уровень дозы ниже установленной в настоящее время переносимой дозы.

Схема определения дозы для Соединения 1 в комбинации с ретифанлимабом приведена ниже:

Уровень дозы	Доза Соединения 1	Введение Соединения 1	Доза ретифанлимаба	Введение ретифанлимаба
Уровень 1 дозы/начальная доза	На один уровень дозы ниже максимальной безопасной/переносимой дозы, установленной в Части 1А на момент начала применения комбинации.	1 р/д в 28-дневных циклах	500 мг	в/в один раз в четыре недели
Уровень дозы $\geq$ 2	Следующий уровень дозы, выбранный как переносимый, не должен превышать MTD и/или RDE в Части 1А.	1 р/д в 28-дневных циклах	500 мг	в/в один раз в четыре недели

Часть 2В представляет собой увеличение дозы для дальнейшей оценки безопасности, переносимости, эффективности и фармакодинамических эффектов при RDE Соединения 1 в комбинации с ретифанлимабом, определенной в Части 2А. Будут включены четыре независимые опухолеспецифические когорты (меланома, NSCLC, SCCN и саркома мягких тканей), примерно по 12 участников в каждой. От всех участников Части 2В требуются парные биопсии опухоли (до лечения, а затем между

Циклом 2, День 1 и Циклом 3, День 1).

Исследуемое лечение

Соединение 1 вводят в виде пероральной капсулы 1 р/д в каждом 28-дневном цикле. Ретифанлимаб вводят в/в в День 1 каждого 28-дневного цикла. Исследуемый препарат (препараты) продолжают принимать либо в качестве монотерапии, либо в комбинации до прогрессирования заболевания, возникновения нежелательного явления, требующего отмены препарата, или решения участника или врача. Участники продолжают лечение, если оно приносит пользу, на срок до 1 года; в это время исследователь и спонсор обсудят целесообразность продолжения лечения с клинической точки зрения.

Участники должны принимать Соединение 1 примерно в одно и то же время каждое утро. График введения может быть скорректирован на основании новых фармакокинетических наблюдений.

Критерии включения

Участники могут быть включенными в исследование, только если они соответствуют всем следующим критериям:

Во-первых, всем участникам должно быть не менее 18 лет.

Части 1А, 1В, 2А и 2В: Гистологические или цитологические признаки солидного новообразования, для которого недоступна стандартная терапия, или которое прогрессирует, несмотря на стандартную терапию, или при непереносимости стандартной терапии, которая может включать химиотерапию, таргетную терапию, биологическую терапию, и иммунотерапию, включая требования, специфические для когорты, изложенные ниже:

- Поддающиеся измерению поражения в соответствии с RECIST v1.1, которые считаются не поддающимися хирургическому вмешательству или другим лечебным методам лечения или процедурам, по меньшей мере с 1 целевым поражением, доступным для оценки. Опухолевые поражения, расположенные в ранее облученной области или в области, подвергшейся другой местной терапии, считаются измеримыми, если в поражении было продемонстрировано прогрессирование.

Только Часть 1А и Часть 2А: Распространенная или метастатическая аденокарцинома желудка или GEJ, HCC, меланома, NSCLC, RCC, саркома мягких тканей, SCCN (рецидивирующая или метастатическая), TNBC или уротелиальная карцинома. Дополнительные гистологические исследования опухолей, включая опухоли MSI-H, могут быть разрешены после одобрения медицинского монитора.

Только Части 1В и 2В:

Когорта 1: распространенная или метастатическая меланома

– Пациент должен получить лечение по доступному стандарту медицинской помощи, включая, помимо прочего, 1 PD-1/L1-содержащую схему (либо в качестве монотерапии агента, либо в комбинации), получить по меньшей мере 2 дозы агента анти-PD-1/L1, и иметь PD во время или после лечения.

- Известный статус BRAF (V600e и V600k).

- Исключена меланома глаза.

Когорта 2: распространенный или метастатический NSCLC

- Пациент должен получить лечение по доступному стандарту медицинской помощи, включая, помимо прочего, 1 PD-1/L1-содержащую схему (либо в качестве монотерапии агента, либо в комбинации), получить по меньшей мере 2 дозы агента анти-PD-1/L1, и иметь PD во время или после лечения.

- К участию допускаются участники с опухолями, содержащими известные драйверные мутации (EGFR, ALK, ROS1, BRAF), ранее получавшие лечение соответствующими таргетными агентами.

- Известный статус экспрессии PD-L1 и/или TPS

Когорта 3: рецидивирующий или метастатический SCC HN

- Пациент должен получить лечение по доступному стандарту медицинской помощи, включая, помимо прочего, 1 PD-1/L1-содержащую схему (либо в качестве монотерапии агента, либо в комбинации), получить по меньшей мере 2 дозы агента анти-PD-1/L1, и иметь PD во время или после лечения.

- Известный статус экспрессии PD-L1 и/или TPS

- Исключены карциномы носоглотки, щитовидной железы, слюнных желез или неплоскоклеточные опухоли.

Когорта 4: распространенная или метастатическая саркома мягких тканей

- Пациент должен получить лечение по доступному стандарту медицинской помощи

- Подходящие подтипы включают лейомиосаркому, низкодифференцированную/дифференцированную липосаркому, плеоморфную недифференцированную саркому высокой степени злокачественности/MFN, миксофибросаркому, злокачественную опухоль оболочки периферического нерва, эпителиоидную саркому, светлоклеточную саркому, синовиальную саркому, рабдомиосаркому, фибросаркому и ангиосаркому; пациенты с опухолями, имеющими другие гистологические характеристики могут быть включены с одобрения медицинского монитора.

- Пациент не должен был получать ранее анти-PD-1/L1 таргетную терапию.

Часть 1C: Исключены: рецидивирующий и/или первично-резистентный AML согласно критериям ВОЗ; острый промиелоцитарный лейкоз (M3), AML, связанный с терапией, и трансформированный MDS.

Критерии невключения

Пациентов не включают в исследование при соответствии любому из следующих критериев:

1. Участники, получающие мощные ингибиторы или индукторы CYP3A4.

- a. Для включения в исследование участника, получавшего ранее лечение мощными ингибиторами CYP3A4, требуется период вымывания ≥ 5 периодов полужизни до первой

дозы Соединения 1.

б. Для включения в исследование любого участника, получавшего индукторы СУРЗА4 требуется период вымывания ≥ 14 дней до первой дозы Соединения 1.

2. Не допускаются участники с дегенерацией желтого пятна, пролиферативной диабетической ретинопатией или диабетической ретинопатией с отеком желтого пятна, окклюзией вен сетчатки, увеитом, центральной серозной ретинопатией, лейкомической ретинопатией, наследственной дегенерацией сетчатки, известным семейным анамнезом наследственной дегенерации сетчатки и участники с риском развития закрытоугольной глаукомы из-за расширения зрачка. Не допускаются участники с другими клинически значимыми аномалиями, выявленными во время офтальмологических скрининговых обследований, которые могут затруднить офтальмологический мониторинг. Исследователи должны связаться с медицинским монитором, чтобы обсудить возможность участия пациента в исследовании, если во время офтальмологических скрининговых обследований будут выявлены аномалии.

3. Клинически значимое заболевание сердца, включая $LVEF < 40\%$, нестабильная стенокардия, острый инфаркт миокарда в пределах 6 месяцев до Цикла 1, День 1э застойная сердечная недостаточность класса III или IV по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации и аритмия, требующая лечения.

4. Наличие в анамнезе или в настоящее время данных ЭКГ, которые, по мнению исследователя, имеют клиническое значение. Скрининговый интервал $QTcF > 480$ миллисекунд является критерием невключения. В случае, если одиночный QTc составляет > 480 миллисекунд, участник может быть включен в исследование, если средний QTc для 3 ЭКГ составляет < 480 миллисекунд. Для участников с задержкой внутрижелудочковой проводимости (интервал $QRS > 120$ миллисекунд), интервал JTc может использоваться вместо QTc с одобрения спонсора. Если JTc используется вместо QTc , JTc должен быть ≤ 340 миллисекунд. В исследование не могут быть включены участники с блокадой левой ножки пучка Гиса.

5. Нелеченные метастазы в головной мозг или ЦНС или метастазы в головной мозг или ЦНС, которые прогрессировали (например, признаки новых или увеличивающихся метастазов в головной мозг или новые неврологические симптомы, связанные с метастазами в головной мозг или ЦНС). В исследование не могут быть включены участники, которые ранее получали лечение и имели клинически стабильные метастазы в головной мозг или ЦНС, и которые не принимали кортикостероиды в течение ≥ 2 недель.

6. Участники с активным или неактивным аутоиммунным заболеванием или синдромом либо независимо от предшествующей терапии, либо вызванные предшествующей терапией ингибиторами контрольных точек (например, ревматоидный артрит, умеренный или тяжелый псориаз, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника), которые требуют системного лечения в течение последних 2 лет или которые получают системную терапию аутоиммунного или воспалительного заболевания (например, с применением агентов, модифицирующих заболевание,

кортикостероидов или иммунодепрессантов).

7. Участники с предшествующими иммунозависимыми АЕ степени 3 или выше или любой офтальмологической токсичностью при предшествующей иммунотерапии. Допускаются следующие АЕ степени 3 или выше:

- а. Сыпь степени 3, которая исчезла при местной терапии.
- б. Бессимптомное повышение липазы, не требующее прерывания лечения.
- с. Аутоиммунные заболевания допускаются по критерию не включения #6 выше.

8. Лабораторные значения вне диапазона, определенного Протоколом. Если скрининговые биохимические и гематологические тесты, указанные ниже, были проведены за более чем 7 дней до начала лечения, то их следует повторить, а возможность участия должна быть подтверждена до введения исследуемого препарата в Цикл 1, День 1. Участники со следующими скрининговыми лабораторными показателями не могут быть включенными в исследование:

Лабораторный параметр	Часть 1А/1В и Часть 2 (солидные опухоли)	Часть 1С (AML)
а. Тромбоциты	$< 100 \times 10^9/\text{л}$	$< 50 \times 10^9/\text{л}$
б. Гемоглобин	$< 9 \text{ г/дл}$ или $< 5,6 \text{ ммоль/л}$	Н/Д
с. Абсолютное число нейтрофилов («ANC»)	$< 1,5 \times 10^9/\text{л}$	$< 0,5 \times 10^9/\text{л}$
Лабораторный параметр	Все участники	
д. Аспартатаминотрансфераза («AST») и аланинаминотрансфераза («ALT»)	$\geq 2,5 \times$ верхняя граница нормы («ВГН») (AST и/или ALT $\geq 5 \times$ ВГН у участников с метастазами в печень)	
е. Щелочная фосфатаза	$\geq 2,5 \times$ ВГН или щелочная фосфатаза $\geq 5 \times$ ВГН для участников с 1) метастазами в кости и 2) отсутствием паренхиматозных метастазов в печени при скрининговых рентгенологических исследованиях	
ф. Общий билирубин	$\geq 1,2 \times$ ВГН, за исключением случаев, когда конъюгированный билирубин $\leq$ ВГН (конъюгированный билирубин необходимо определять только в том случае, если общий билирубин превышает ВГН). Если нет установленной ВГН, то прямой билирубин должен составлять $< 40\%$ от общего билирубина.	

g. Сывороточный креатинин	> 1,5 × институциональная ВГН или клиренс креатинина < 50 мл/мин для участников с уровнем креатинина > 1,5 × институциональная ВГН
h. INR или PT	> 1,5 × ВГН
i. aPTT	> 1,5 × ВГН

9. В исследование не могут быть включены участники, получающие любые антагонисты витамина К, включая, помимо прочего, аценокумарол, флуиндион, фенпрокумон и варфарин.

10. Лечение противоопухолевыми препаратами или исследуемыми препаратами в течение следующих интервалов до первого введения исследуемого препарата:

a. По меньшей мере 14 дней для химиотерапии, таргетной низкомолекулярной терапии или лучевой терапии. У участника не должно быть радиационного пневмонита в результате лечения. 1-недельный период вымывания разрешен для паллиативного облучения при заболеваниях, не связанных с ЦНС, с одобрения спонсора.

b. По меньшей мере 28 дней для предшествующего применения моноклонального антитела с целью противоопухолевой терапии. Для других агентов с длительным периодом полужизни (например, > 5 дней), включение в исследование до пятого периода полужизни требует одобрения медицинского монитора.

11. Пациент не восстановился до ≤ степени 1 или исходного уровня от токсических эффектов предшествующей терапии (включая предшествующую иммунотерапию) и/или осложнений от предшествующего хирургического вмешательства до начала исследуемого лечения; допускается стабильная хроническая токсичность, от которой не ожидается разрешения, например, периферическая нейротоксичность, алопеция и утомляемость.

12. Не применялись системные кортикостероиды в пределах 7 дней до первой дозы исследуемого препарата.

13. Получение живой вакцины в пределах 3 дней до первой дозы исследуемого препарата.

14. Активная инфекция, требующая системной терапии. Для системных антибиотиков требуется 28-дневный период вымывания. Применение пробиотиков во время исследования и во время скрининга запрещено.

15. Проявления HBV- или HCV-инфекции или риск реактивации. ДНК вируса гепатита В и РНК ВГС не должны обнаруживаться. Участники не могут быть положительными на ДНК HBV, РНК HCV, поверхностный антиген вируса гепатита В или антитело против ядерного антигена вируса гепатита В.

16. Известное инфицирование ВИЧ (антитела к ВИЧ 1/2).

17. Известная гиперчувствительность или тяжелая реакция на любой компонент исследуемых препаратов или компонентов состава.

18. Беременность или кормление грудью, или ожидание зачатия, или отцовство

детей в течение прогнозируемой продолжительности исследования, начиная со скринингового визита и до 180 дней после введения последней дозы исследуемого препарата.

19. Любое состояние, которое, по мнению исследователя, может помешать полноценному участию в исследовании, включая назначение исследуемого лечения и осуществление необходимых визитов в рамках исследования; представляет значительный риск для участника; или препятствует интерпретации данных исследования.

20. Неспособность участника (или родителя, опекуна или законного представителя) понять ICF или нежелание подписывать ICF.

21. Участники с известной дисфагией, синдромом короткой кишки, гастропарезом или другими патологическими состояниями, которые ограничивают прием внутрь или желудочно-кишечную абсорбцию лекарственных средств, вводимых перорально.

22. Только Часть 1С: Участники, перенесшие HSCT в пределах 60 дней до первой дозы Соединения 1, или участники, получавшие иммуносупрессивную терапию после HSCT во время скрининга, или участники с клинически значимой GVHD. (Допускается применение стероидов для местного применения по поводу продолжающейся кожной GVHD).

23. Только Часть 1С: Участники с клиническими симптомами, свидетельствующими об активном лейкозе ЦНС, или участники с известным лейкозом ЦНС. Оценка спинномозговой жидкости требуется только в тех случаях, когда имеет место клиническое подозрение на поражение ЦНС лейкозом во время скрининга.

24. Признаки интерстициального заболевания легких, интерстициальное заболевание легких в анамнезе или активный неинфекционный пневмонит.

25. Трансплантация органов в анамнезе, включая аллогенную трансплантацию стволовых клеток (кроме Когорты 1С).

26. Иммунозависимая токсичность во время предшествующей терапии ингибиторами контрольных точек, из-за которой рекомендуется прекращение терапии на постоянной основе (в соответствии с этикеткой продукта или согласованными рекомендациями) ИЛИ любая иммунозависимая токсичность, требующая интенсивной или длительной иммуносупрессии (за исключением эндокринопатии, которая хорошо контролируется заместительной гормональной терапией).

27. Подтвержденный диагноз кожноглазного альбинизма.

Разнообразные модификации изобретения, в дополнение к описанным в настоящем документе, будут очевидны квалифицированным специалистам в данной области техники из предыдущего описания. Такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Каждая ссылка, включая все патенты, заявки на патенты и публикации, цитируемые в настоящей заявке, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 375 мг один раз каждые 3 недели.

7. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 500 мг один раз каждые 4 недели.

8. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе 750 мг один раз каждые 4 недели.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 4**.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 5**.

11. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 4**, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 5**.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что:

(a) антитело содержит Fc-область и шарнирный домен;

(b) Fc-область и шарнирный домен относятся к типу IgG4; и

(c) шарнирный домен содержит стабилизирующую мутацию.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, и при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 2**.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что указанное антитело содержит легкую цепь, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 3**.

15. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 2**, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 3**.

16. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что антитело содержит Fc-область типа IgG1.

17. Способ по любому из пп. 1-12 и 16, отличающийся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, и при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 13**.

18. Способ по любому из пп. 1-12 и 16, отличающийся тем, что указанное антитело содержит легкую цепь и тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 13**, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в **SEQ ID NO: 3**.

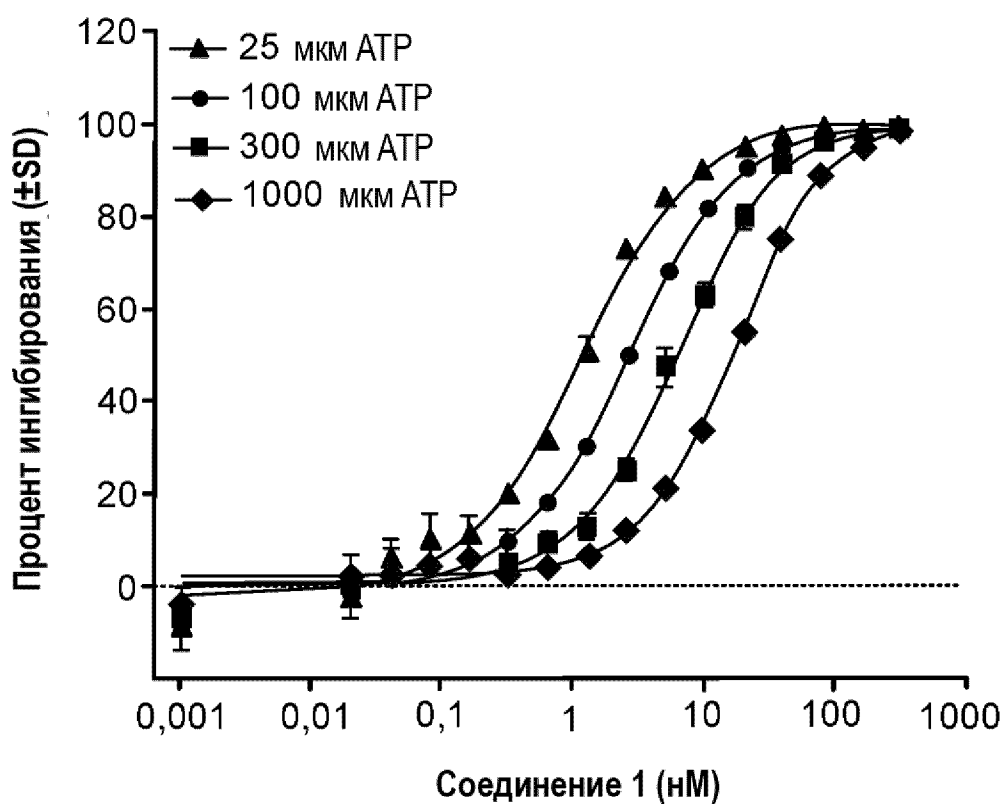
19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что антитело представляет собой гуманизированное антитело.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что рак выбирают из гепатоцеллюлярного рака, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, колоректального рака, рака эндометрия, рака заднего прохода, карциномы из

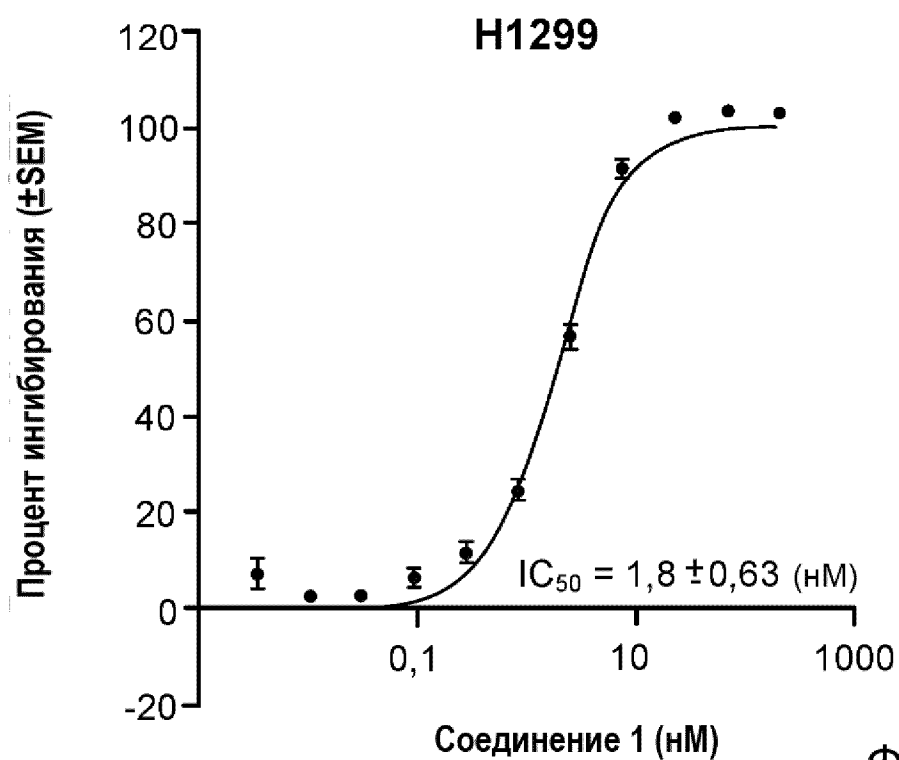
клеток Меркеля, рака желудка, рака головы и шеи, рака почек, рака печени, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака пищевода, рака желчного пузыря, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, лейкоза, множественной миеломы, хронической лимфоцитарной лимфомы, Т-клеточного лейкоза взрослых, В-клеточной лимфомы, острого миелогенного лейкоза, лимфомы Ходжкина или неходжкинской лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, волосатоклеточной лимфомы, лимфомы Беркетта, меланобластомы и рабдосаркомы.

21. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что рак выбирают из саркомы, рака головы и шеи, меланомы и немелкоклеточного рака легкого.

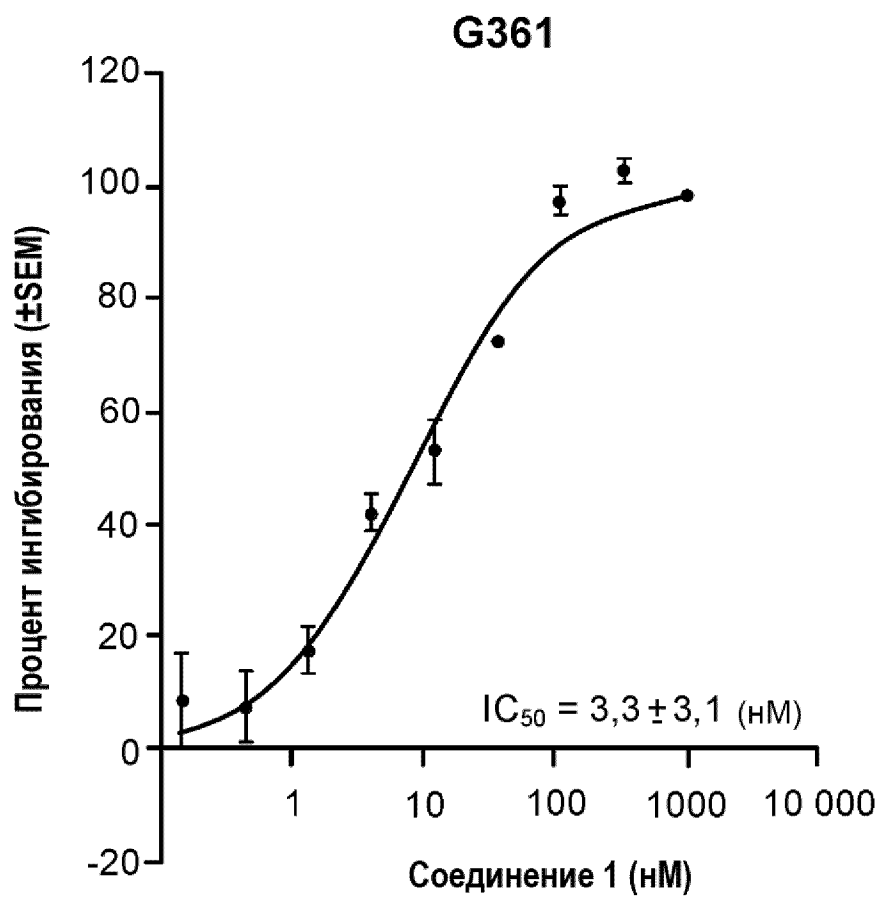
По доверенности



Фиг. 1

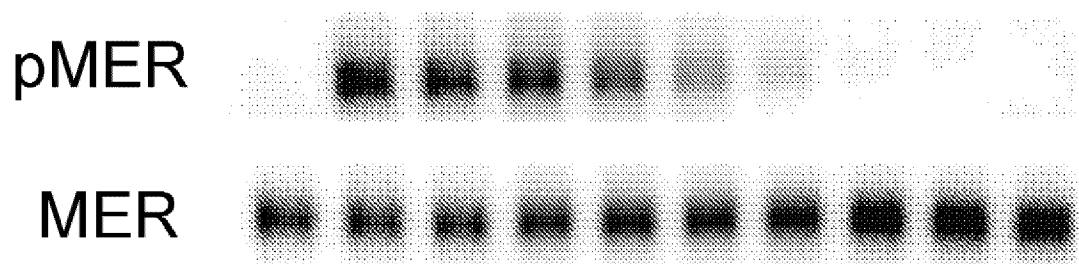


Фиг. 2

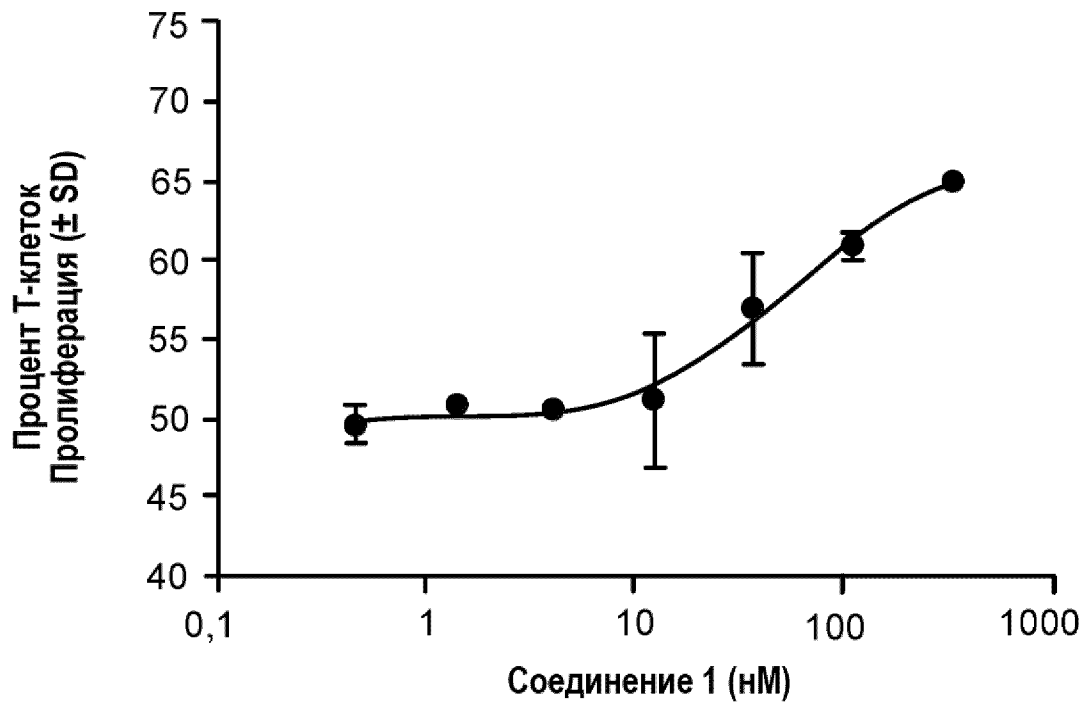


Фиг. 3

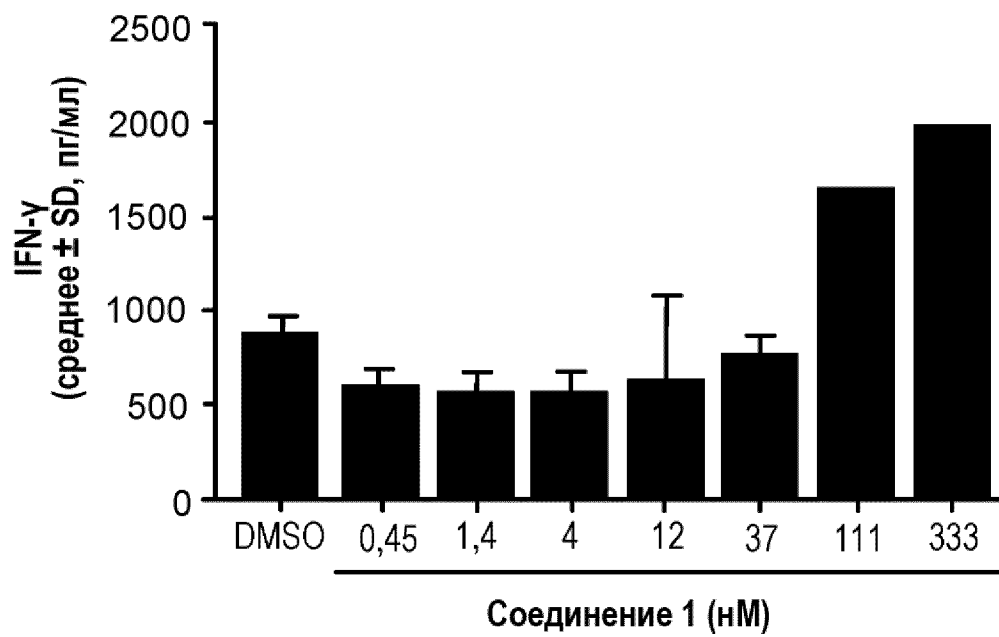
MAV8912	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Соединение 1 (нМ)	0	0	0,1	0,3	1	3	10	30	100	300



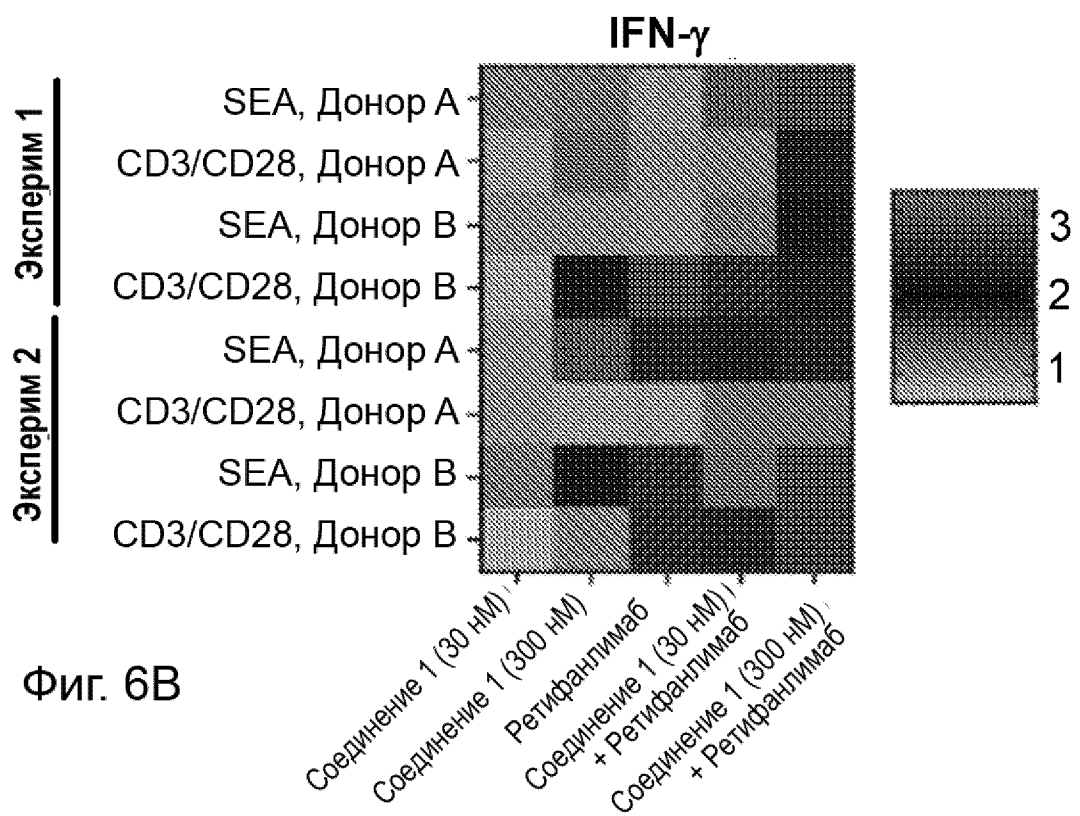
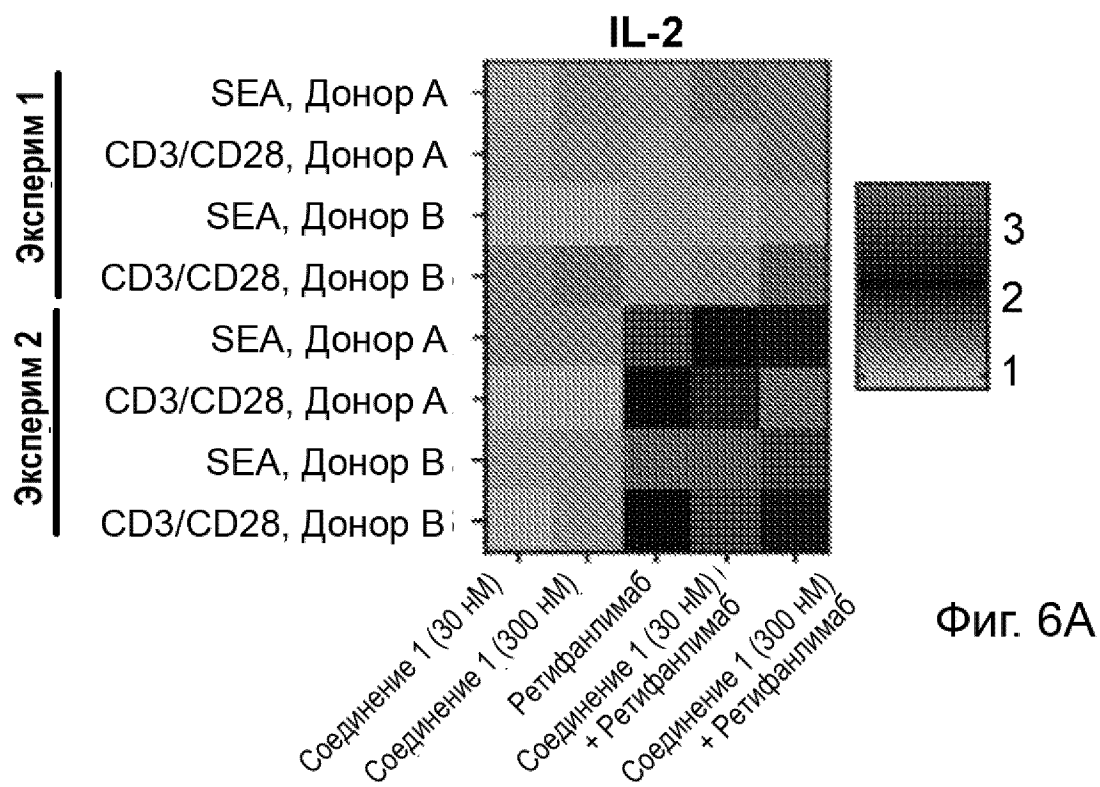
Фиг. 4

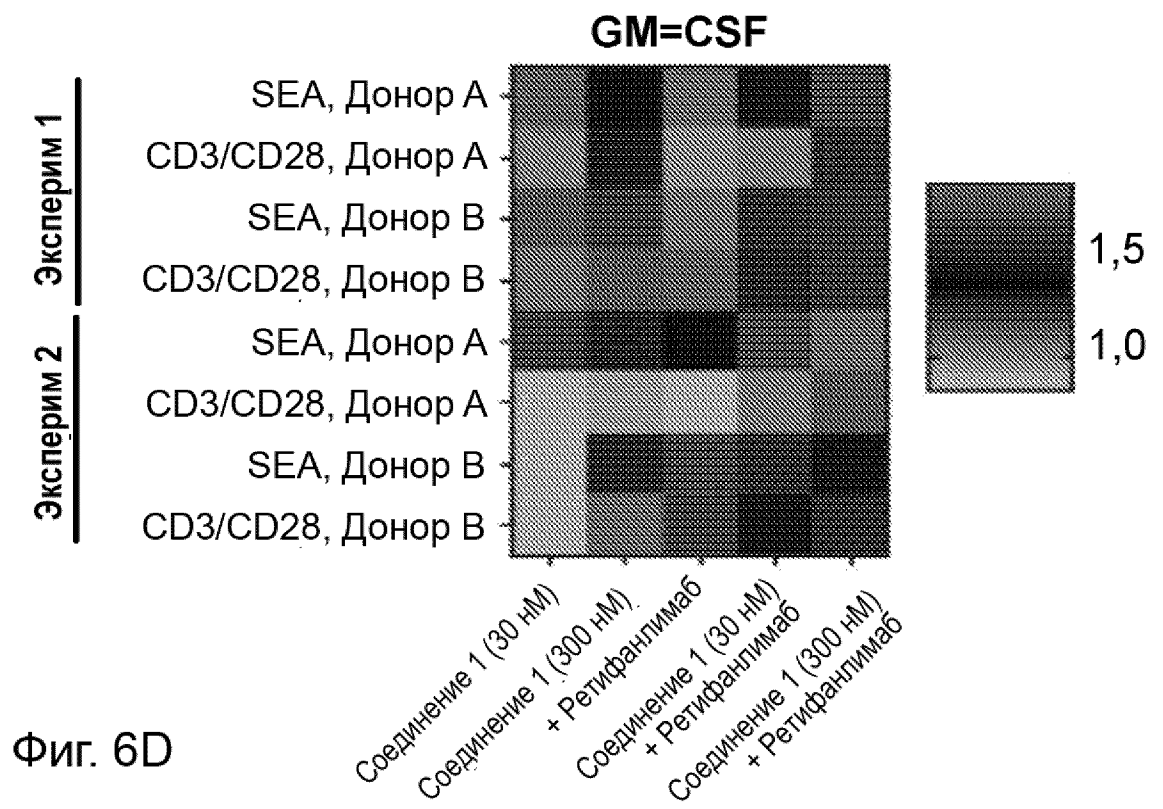
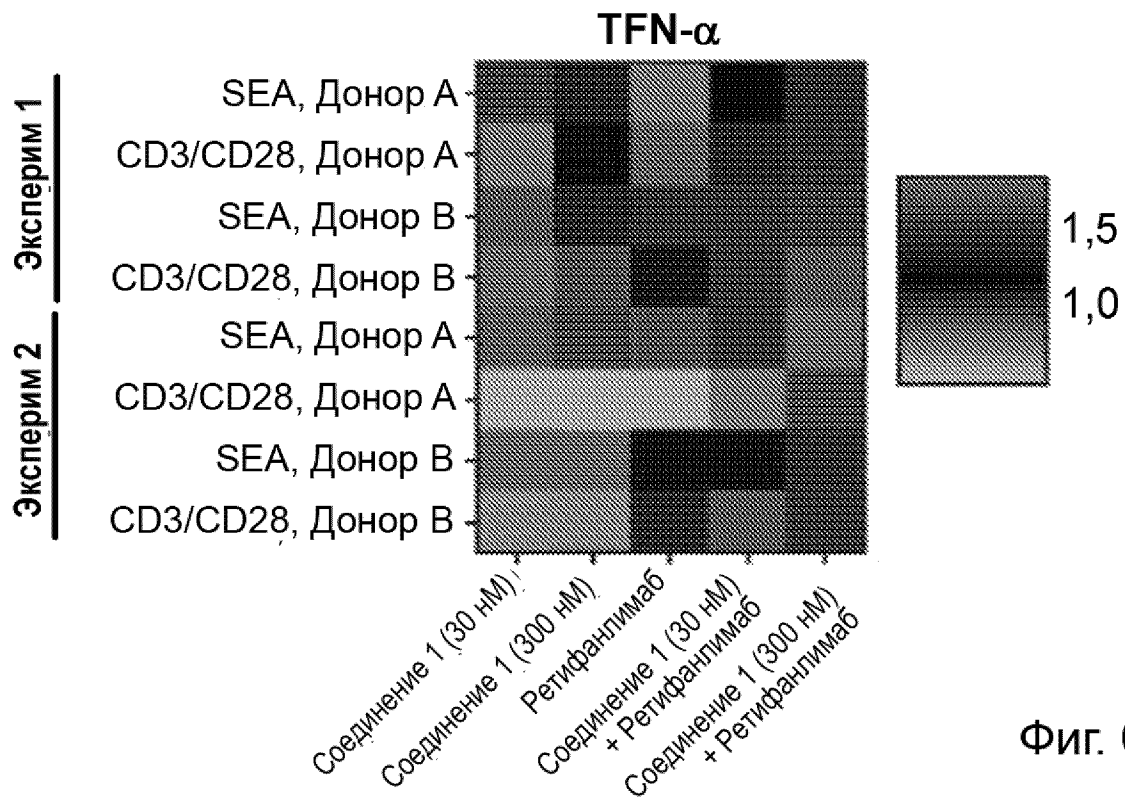


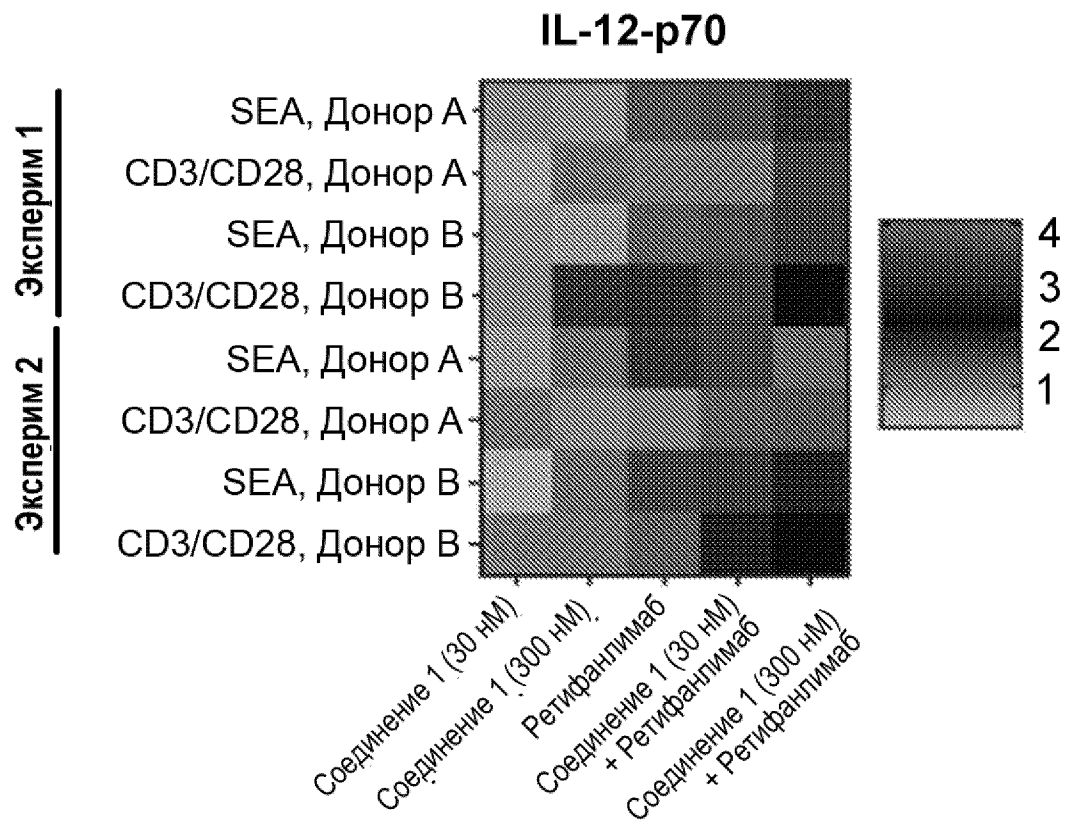
Фиг. 5А



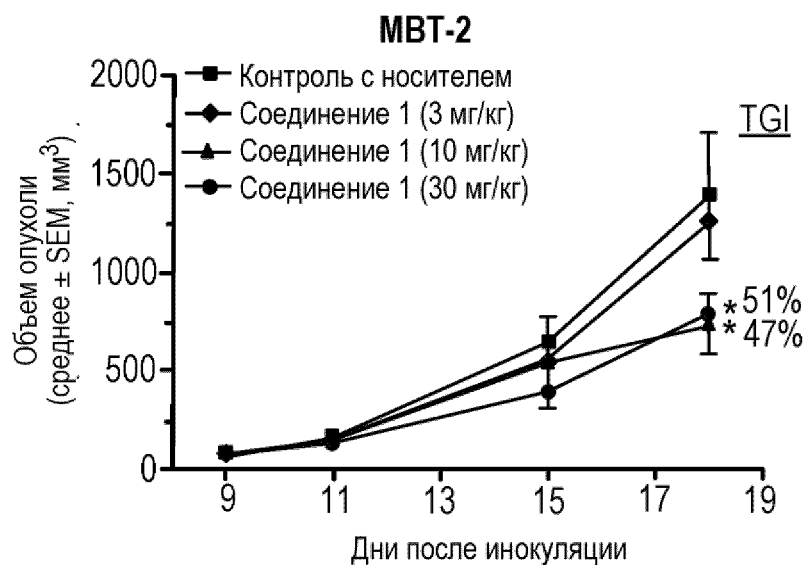
Фиг. 5В



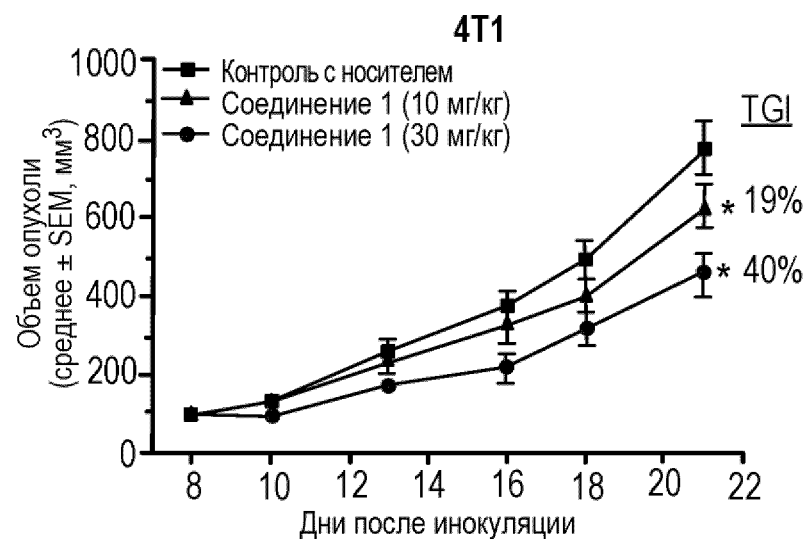




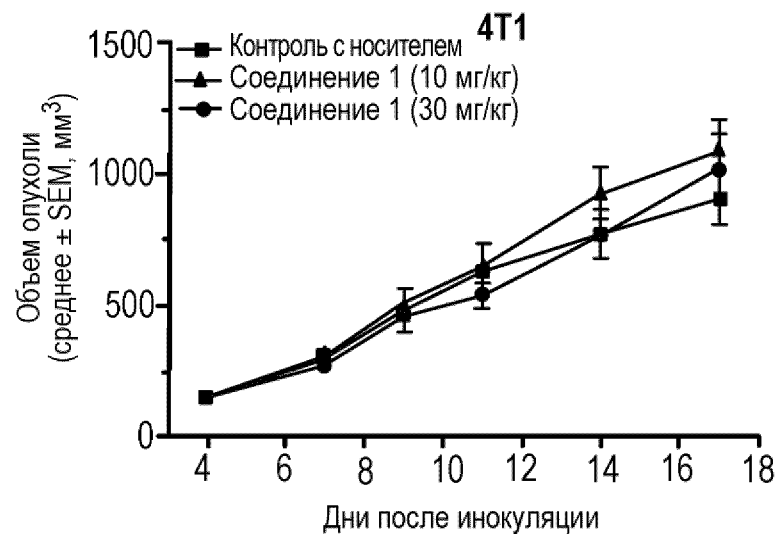
Фиг. 6Е



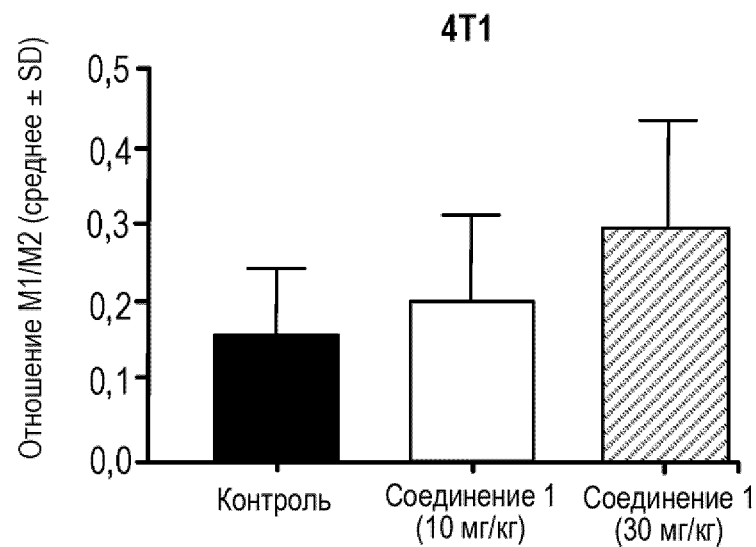
Фиг. 7А



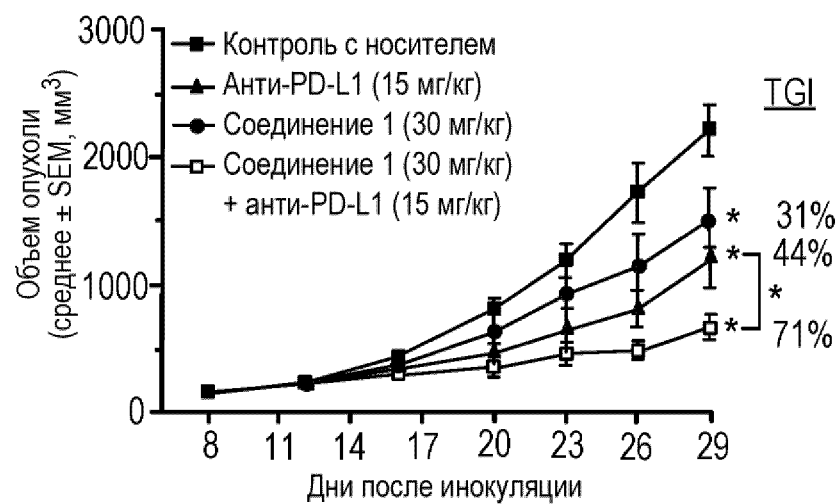
Фиг. 7В



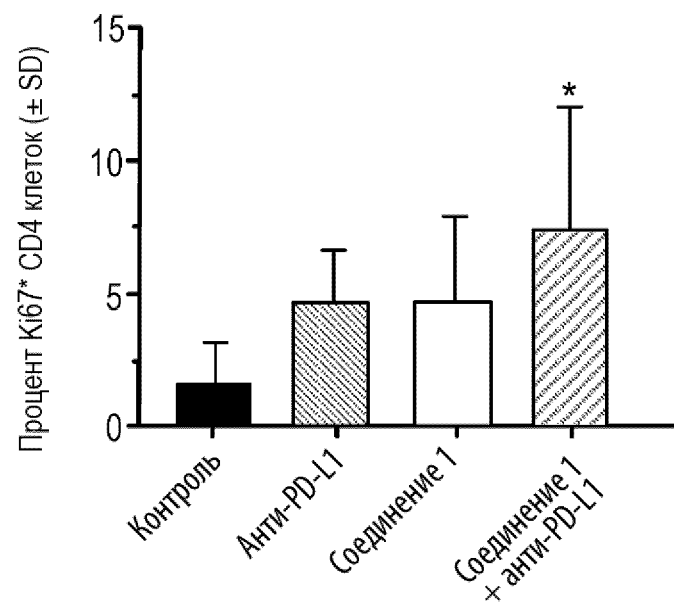
Фиг. 7С



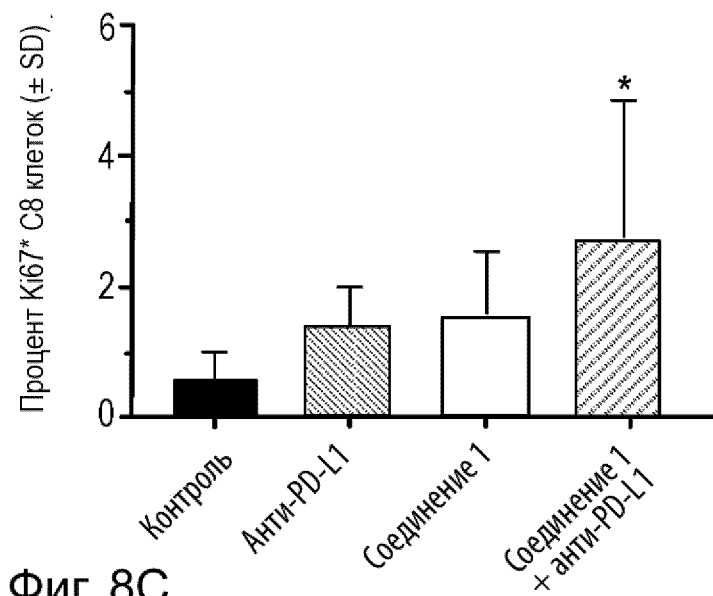
Фиг. 7D



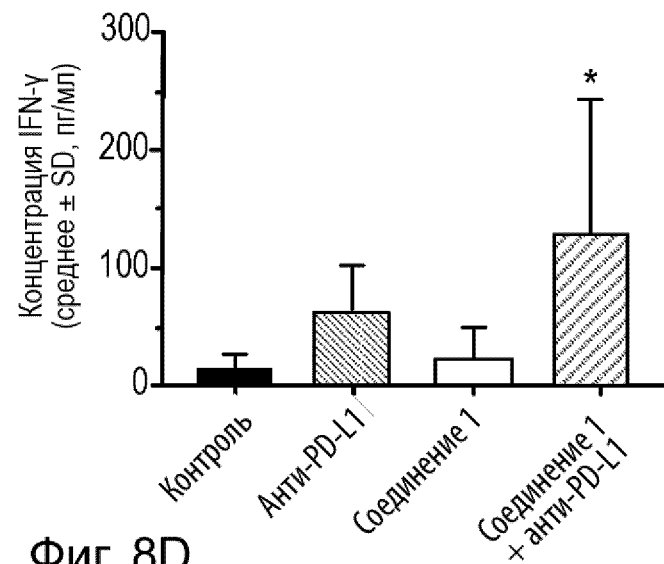
Фиг. 8А



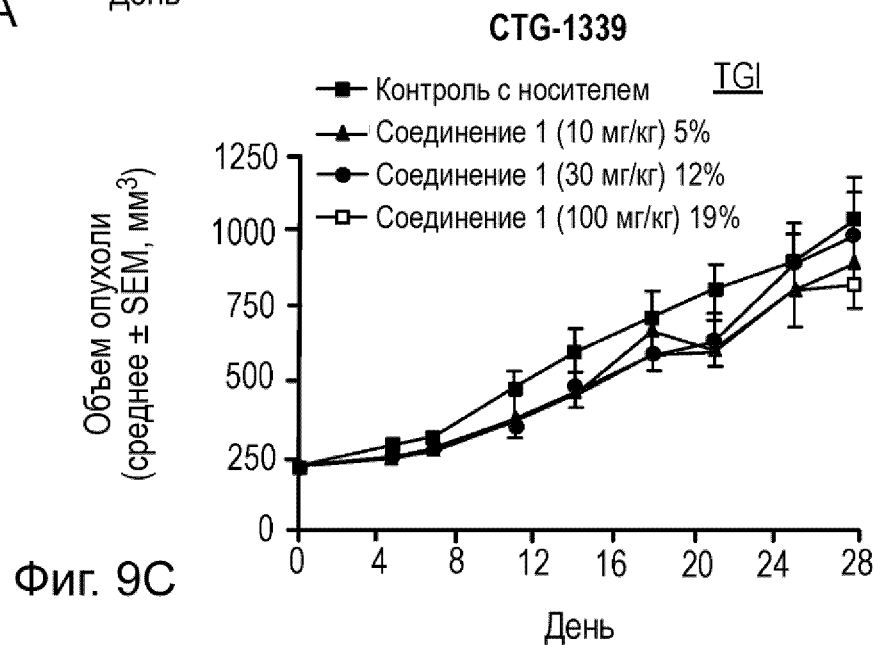
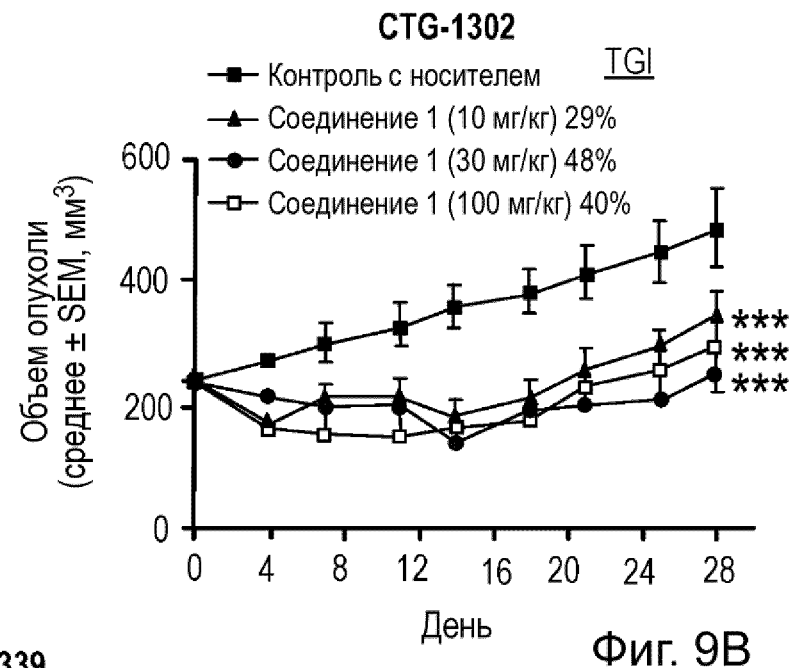
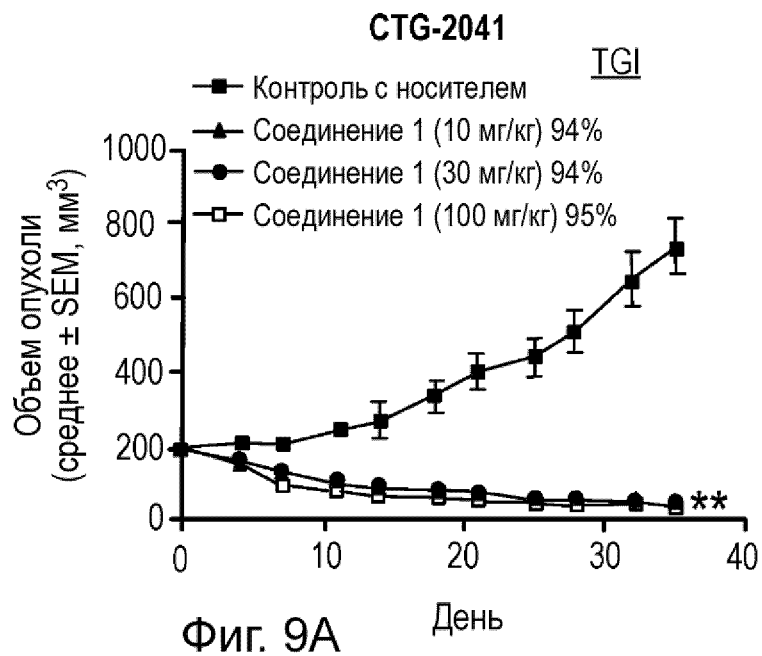
Фиг. 8В

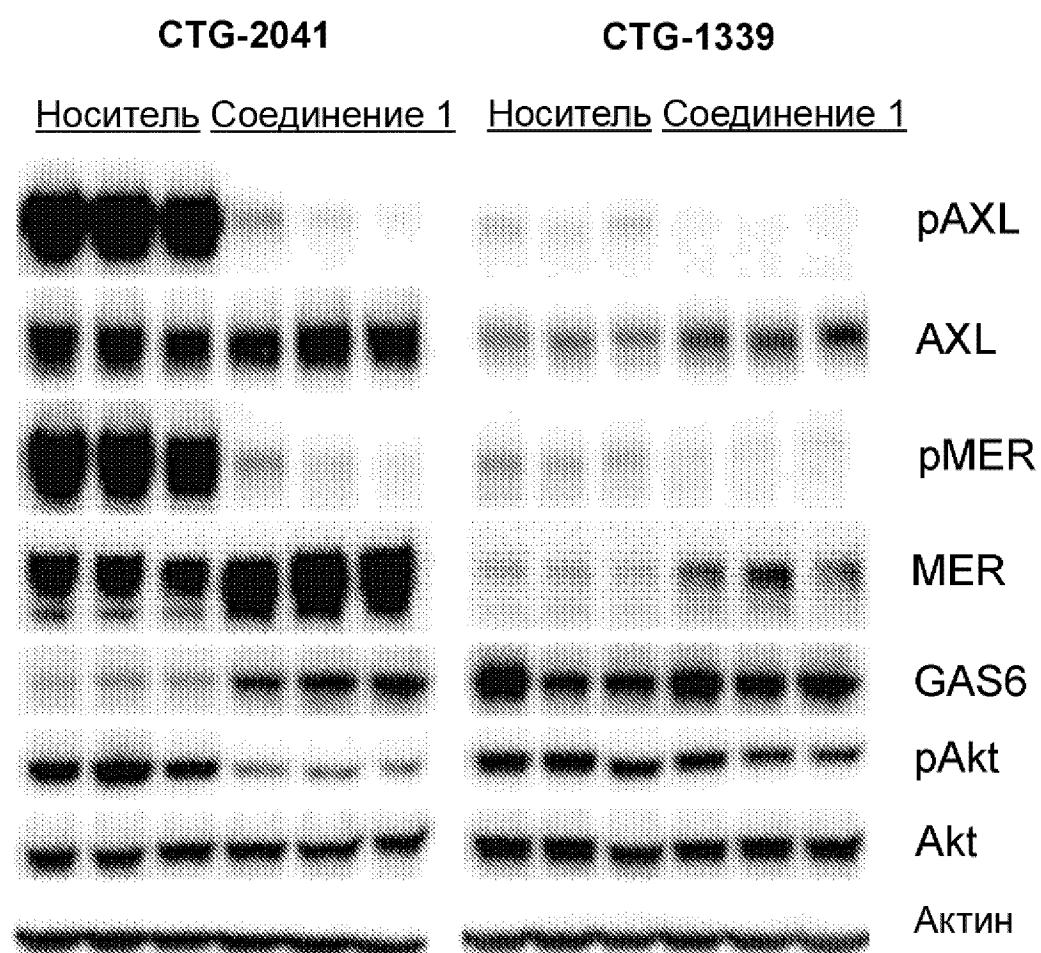


Фиг. 8С



Фиг. 8D





Фиг. 9D