

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045355**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.17

(21) Номер заявки
202092516

(22) Дата подачи заявки
2018.04.20

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61K 31/502 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

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

(31) 1706231.6; 1706230.8; 1706229.0;
1706228.2; 1706227.4; 1706226.6;
1706225.8; 1706224.1; 1706223.3

(32) 2017.04.20

(33) GB

(43) 2021.06.21

(86) PCT/EP2018/060209

(87) WO 2018/193102 2018.10.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АДС ТЕРАПЬЮТИКС СА (CH);
МЕДИМЬЮН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Ван Беркель Патрисиус Хендрикус
Корнелис, Вюртнер Йенс (CH),
Хартли Джон (GB), Заммарчи
Франческа (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2016166302
WO-A1-2016053107

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

B1**045355****045355****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании GB 1706231.6, GB1706230.8, GB 1706229.0, GB 1706228.2, GB 1706227.4, GB 1706226.6, GB 1706225.8 и GB 1706224.1, GB 1706223.3, все из которых поданы 20 апреля 2017 года.

Область техники

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

Уровень техники

Терапия антителами.

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

Axl.

Axl является членом подсемейства рецепторных тирозинкиназ. Хотя белок Axl схож с другими рецепторными тирозинкиназами, он демонстрирует уникальную структуру внеклеточной области, которая объединяет повторы IgL и FNIII, и содержит внутриклеточную область, содержащую внутриклеточный домен, часть которого представляет собой киназный домен. Axl передает сигналы из внеклеточного матрикса в цитоплазму путем связывания факторов роста, таких как ген 6 блокировки роста (Gas6) витамин-К-зависимых белков. Внеклеточный домен Axl может расщепляться, и может высвобождаться растворимый внеклеточный домен массой 65 кДа. Расщепление увеличивает оборот рецепторов и формирует частично активированную киназу (O'Bryan JP, et al/ (1995) *J Bioi Chem.* 270 (2): 551-557).

Информация о структуре, относящаяся к гену Axl человека и его генному продукту, описана в WO 2003/068983. Следующие публикации патентов также относятся к Axl или другим тирозинкиназным рецепторам: US 5468634; US 6087144; US 5538861; US 5968508; US 6211142; US 6235769; WO 1999/49894; WO 2000/76309; WO 2001/16181 и WO 2001/32926.

Axl вовлечен в стимуляцию пролиферации клеток. В частности, Axl представляет собой связанный с хроническим миелоидным лейкозом онкоген, который также связан с раком толстой кишки и меланомой. Он находится вблизи онкогена bcl3, который расположен в 19q13.1-q13.2. Ген Axl эволюционно консервативен среди позвоночных и экспрессируется в мезенхиме во время развития.

После взаимодействия с лигандом Gas6 Axl аутофосфорилируется, и происходит каскад явлений передачи сигнала. Известно, что в этот каскад вовлечен каждый из: PI3K, AKT, src, Bad, 14-3-3, PLC, ERK, S6K (митоген-регулируемая киназа) и STAT. Gas6 содержит область с высоким содержанием у-карбоксиглутаминовой кислоты (GLA-домен), которая обеспечивает Ca⁺⁺-зависимое связывание с фосфолипидами мембраны. Gas6 является слабым митогеном и оказывает антиапоптотическое действие в фибробластах NIH3T3, подверженных стрессу вследствие TNF-индуцированной цитотоксичности или удаления фактора роста. В NIH3T3 связывание Gas6 с Axl приводит к активации PI3K, AKT, src и Bad.

Исследования показали, что Axl выполняет ряд различных функций в образовании опухоли. Axl является ключевым регулятором ангиогенных реакций, включая миграцию, пролиферацию эндотелиальных клеток и образование трубочек. Axl также необходим клеткам карциномы молочной железы человека для образования опухоли *in vivo*, что указывает на то, что Axl регулирует процессы, которые жизненно необходимы как для неоваскуляризации, так и для онкогенеза (Holland S. et al/ *Cancer Res* 2005; 65 (20), Oct 15, 2005).

Активность рецепторной тирозинкиназы Axl положительно коррелирует с метастазированием опухолей. В частности, исследования показали, что Axl усиливает экспрессию MMP-9, который необходим для Axl-опосредованной инвазии. Axl способствует инвазии клеток путем индуцирования активности MMP-9 путем активации NF- κ B и Brg-1 (Tai, K-Y et al/ *Oncogene* (2008), 27, 4044-4055). Axl сверхэкспрессируется в клетках глиомы человека и может быть использован для определения неблагоприятного прогноза у пациентов с мультиформной глиобластомой (МГБ) (Vajkoczy P. et al/ *PNAS*, April 11, 2006, val 103, no. 15, 5799-5804; Hutterer M. et al/ *Clinical Cancer Res* 2008; 14 (1) Jan 1, 2008;). Также происходит относительная сверхэкспрессия Axl в высокоинвазивных линиях клеток рака легкого по сравнению с

минимально инвазивными линиями (Shieh, Y-S et al., Neoplasia, vol 7, no. 12, Dec 2005, 1058-1064). Соответственно, полагают, что Axl играет важную роль в инвазии и прогрессировании опухолей.

Подобным образом, Axl экспрессируется в высокоинвазивных клетках рака молочной железы, но не в клетках рака молочной железы с низкой инвазивностью. В частности, ингибирование передачи сигнала Axl (доминантно-негативным мутантом Axl, антителом к внеклеточному домену Axl или путем нокдауна Axl с помощью короткой шпилечной РНК) уменьшало подвижность и инвазивность высокоинвазивных клеток рака молочной железы. Низкомолекулярные ингибиторы Axl нарушали подвижность и инвазивность клеток рака молочной железы. Таким образом, очевидно, что Axl является критическим элементом в сети передачи сигнала, который определяет подвижность/инвазивность клеток рака молочной железы (Zhang, Y-X et al., Cancer Res 2008; 68 (6), March 15, 2008).

Обнаружено, что в мезангиальных клетках Gas6 оказывает митогенное действие, что указывает на возможную роль в прогрессировании гломерулосклероза. Данные позволили предположить, что путь Gas6/Axl также играет роль при гломерулонефрите (Yanagita M. et al., The Journal of Clinical Investigation; 2002, 110 (2) 239-246). Дополнительные исследования показали, что Gas6 способствует выживанию эндотелиальных клеток в модели повреждения артерий. Было показано, что ангиотензин II через его AT1-рецептор повышает уровни мРНК и белкового рецептора Axl в гладкомышечных клетках сосудов (Melaragno M. G. et al., Circ Res., 1998, 83 (7): 697- 704). Также было показано, что Axl вовлечен в клеточную адгезию, пролиферацию клеток и регуляцию гомеостаза в иммунной системе (Lu Q., 2001) Science 293 (5528): 306 311). После активации Axl наблюдали следующие явления: ингибирование апоптоза, увеличение выживаемости "нормальных" (нетрансформированных) клеток фибробластов и эндотелиальных клеток, миграцию гладкомышечных клеток сосудов (ГМКС) (инактивация киназы Axl блокирует миграцию), ускорение образования неointимы в стенке кровеносных сосудов (Melaragno M.G. et al., Trends Cardiovasc Med., 1999, (Review) 9 (8): 250-253) и вовлеченность в формирование повреждения и прогрессирование атеросклероза.

Варианты терапевтического применения конъюгатов анти-Axl-ADC.

Была определена эффективность конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего антитело анти-Axl (анти-Axl-ADC), в лечении, например, рака - см., например, WO 2016/166297, WO 2016/166302, GB 1702029.8, GB 1719906.8 и PCT/EP 2018/053163.

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

Краткое описание изобретения

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

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

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак. Рак включает метастатический рак и метастатические раковые клетки, такие как циркулирующие клетки опухоли, которые, как можно обнаружить, циркулируют в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. Рак, представляющий особый интерес, включает, но не ограничивается ими, рак молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, поджелудочной железы, матки, печени, мочевого пузыря, эндометрия и предстательной железы, а также лимфомы (например, неходжкинскую лимфому, НХЛ) и лейкоз (в частности, острый миелоидный лейкоз, ОМЛ).

Другие нарушения, представляющие интерес, включают любое состояние, при котором Axl сверхэкспрессируется или в случае которого антагонизм Axl обеспечит полезный клинический эффект. Эти нарушения включают иммунные нарушения, сердечнососудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения, связанные с иммунными контрольными точками, или фиброзные нарушения (фиброз), такие как косоглазие, склеродермия, келоид, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), кистозный фиброз (КФ), системный склероз, фиброз сердца, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), другие виды фиброза печени, первичный билиарный цирроз, фиброз почек, рак и атеросклероз.

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

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

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

В настоящем описании термин "солидная опухоль" включает солидные гематологические раковые опухоли, такие как лимфомы (лимфома Ходжкина или неходжкинская лимфома), которые более подроб-

но рассмотрены в настоящем описании.

Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, содержащие или состоящие из AXL+ неопластических клеток. Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, инфильтрированные AXL+ клетками, такими как Axl+ иммуносупрессивные дендритные клетки, клетки-естественные киллеры (NK-клетки) или макрофаги; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия AXL (т.е. они могут содержать или состоять из AXL- неопластических клеток).

Например, солидная опухоль может представлять собой опухоль с высокими уровнями инфильтрирующих AXL+ клеток, таких как инфильтрирующие дендритные клетки, NK-клетки или макрофаги (Paolino, M., et al., *Cancers* 2016, 8, 97; doi:10.3390/cancers8100097). Соответственно, солидная опухоль может представлять собой рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка и пищевода, лейкоз и лимфому, меланому, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, печеночно-клеточную карциному, почечно-клеточную карциному и рак головы и шеи.

ADC может представлять собой анти-AXL-ADC, такой как ADCxAXL, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист G1TR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, гипометилирующий агент, ингибитор PARP (PARPi), агент, повышающий экспрессию HER2, ингибитор AXL (AXLi), ингибитор BRAF (BRAFi) или ингибитор MEK (MEKi).

Индивидуум может представлять собой человека. У индивидуума может быть рак или у него может быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки.

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

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

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

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

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак. Рак включает метастатический рак и метастатические раковые клетки, такие как циркулирующие клетки опухоли, которые, как можно обнаружить, циркулируют в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. Рак, представляющий особый интерес, включает, но не ограничивается ими, рак молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, поджелудочной железы, матки, печени, мочевого пузыря, эндометрия и предстательной железы, а также лимфомы (например, неходжкинскую лимфому, НХЛ) и лейкоз (в частности, острый миелоидный лейкоз, ОМЛ).

Другие нарушения, представляющие интерес, включают любое состояние, при котором Axl сверхэкспрессируется или в случае которого антагонизм Axl обеспечит полезный клинический эффект. Эти нарушения включают иммунные нарушения, сердечнососудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения, связанные с иммунными контрольными точками, или фиброзные нарушения (фиброз), такие как косоглазие, склеродермия, келоид, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), кистозный фиброз (КФ), системный склероз, фиброз сердца, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), другие виды фиброза печени, первичный билиарный цирроз, фиброз почек, рак и атеросклероз.

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

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

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

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

Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, содержащие или состоящие из AXL+ неопластических клеток. Солидные опухоли могут представлять собой новообразования, включая негематологические раковые опухоли, инфильтрированные AXL+ клетками, такими как AXL+ иммуносупрессивные дендритные клетки, NK-клетки или макро-

фаги; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия AXL (т.е. они могут содержать или состоять из AXL- неопластических клеток).

ADC может представлять собой анти-AXL-ADC, такой как ADCxAXL, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, гипометилирующий агент, ингибитор PARP (PARPi), агент, повышающий экспрессию HER2, ингибитор AXL (AXLi), ингибитор BRAF (BRAFi) или ингибитор MEK (MEKi).

Индивидуум может представлять собой человека. У индивидуума может быть рак или у него может быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки.

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

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

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

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

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак. Рак включает метастатический рак и метастатические раковые клетки, такие как циркулирующие клетки опухоли, которые, как можно обнаружить, циркулируют в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. Рак, представляющий особый интерес, включает, но не ограничивается ими, рак молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, поджелудочной железы, матки, печени, мочевого пузыря, эндометрия и предстательной железы, а также лимфомы (например, неходжкинскую лимфому, НХЛ) и лейкоз (в частности, острый миелоидный лейкоз, ОМЛ).

Другие нарушения, представляющие интерес, включают любое состояние, при котором Axl сверх-экспрессируется или в случае которого антагонизм Axl обеспечит полезный клинический эффект. Эти нарушения включают иммунные нарушения, сердечнососудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения, связанные с иммунными контрольными точками, или фиброзные нарушения (фиброз), такие как косоглазие, склеродермия, келоид, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), кистозный фиброз (КФ), системный склероз, фиброз сердца, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), другие виды фиброза печени, первичный билиарный цирроз, фиброз почек, рак и атеросклероз.

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

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

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

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

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

ADC может представлять собой анти-AXL-ADC, такой как ADCxAXL, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, гипометилирующий агент, ингибитор PARP (PARPi), агент, повышающий экспрессию HER2, ингибитор AXL (AXLi), ингибитор BRAF (BRAFi) или ингибитор MEK (MEKi).

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

быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки.

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

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

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

первое лекарственное средство, содержащее ADC;

второе лекарственное средство, содержащее вторичный агент; и

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

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

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

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак. Рак включает метастатический рак и метастатические раковые клетки, такие как циркулирующие клетки опухоли, которые, как можно обнаружить, циркулируют в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. Рак, представляющий особый интерес, включает, но не ограничивается ими, рак молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, поджелудочной железы, матки, печени, мочевого пузыря, эндометрия и предстательной железы, а также лимфомы (например, неходжкинскую лимфому, НХЛ) и лейкозы (в частности, острый миелоидный лейкоз, ОМЛ).

Другие нарушения, представляющие интерес, включают любое состояние, при котором Axl сверхэкспрессируется или в случае которого антагонизм Axl обеспечит полезный клинический эффект. Эти нарушения включают иммунные нарушения, сердечнососудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения, связанные с иммунными контрольными точками, или фиброзные нарушения (фиброз), такие как косоглазие, склеродермия, келоид, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), кистозный фиброз (КФ), системный склероз, фиброз сердца, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), другие виды фиброза печени, первичный билиарный цирроз, фиброз почек, рак и атеросклероз.

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

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

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

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

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

ADC может представлять собой анти-AXL-ADC, такой как ADCxAXL, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, гипометилирующий агент, ингибитор PARP (PARPi), агент, повышающий экспрессию HER2, ингибитор Axl (AXLi), ингибитор BRAF (BRAFi) или ингибитор MEK (MEKi).

Индивидуум может представлять собой человека. У индивидуума может быть рак или у него может быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки.

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

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

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

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

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

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

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

Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак. Рак включает метастатический рак и метастатические раковые клетки, такие как циркулирующие клетки опухоли, которые, как можно обнаружить, циркулируют в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. Рак, представляющий особый интерес, включает, но не ограничивается ими, рак молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, поджелудочной железы, матки, печени, мочевого пузыря, эндометрия и предстательной железы, а также лимфомы (например, неходжкинскую лимфому, НХЛ) и лейкоз (в частности, острый миелоидный лейкоз, ОМЛ).

Другие нарушения, представляющие интерес, включают любое состояние, при котором Axl сверхэкспрессируется или в случае которого антагонизм Axl обеспечит полезный клинический эффект. Эти нарушения включают иммунные нарушения, сердечнососудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения, связанные с иммунными контрольными точками, или фиброзные нарушения (фиброз), такие как косоглазие, склеродермия, келоид, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), кистозный фиброз (КФ), системный склероз, фиброз сердца, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), другие виды фиброза печени, первичный билиарный цирроз, фиброз почек, рак и атеросклероз.

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

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

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

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

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

ADC может представлять собой анти-AXL-ADC, такой как ADCxAXL, описанный в настоящем документе.

Вторичный агент может представлять собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR, агонист OX40, антагонист CTLA-4, флударабин или цитарабин, гипометилирующий агент, ингибитор PARP (PARPi), агент, повышающий экспрессию HER2, ингибитор AXL (AXLi), ингибитор BRAF (BRAFi) или ингибитор MEK (MEKi).

Индивидуум может представлять собой человека. У индивидуума может быть рак или у него может быть определен рак. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки. У индивидуума может быть или у него может быть определен AXL+ рак или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки.

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

Лечение может включать введение индивидууму дополнительного химиотерапевтического агента.

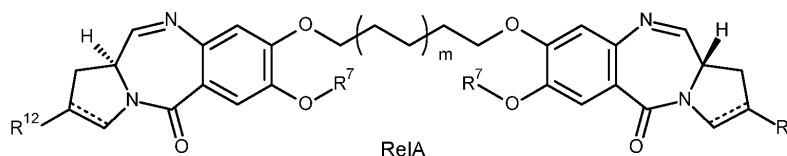
Подробное описание изобретения

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC).

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

ADC согласно настоящему изобретению обеспечивает димер PBD с линкером, соединенным по положению N10 на одном из PBD-компонентов, конъюгированный с антителом, как определено ниже.

Настоящее изобретение подходит для применения для доставки PBD-соединения в предпочтительный участок у субъекта. Конъюгат обеспечивает высвобождение активного PBD-соединения, которое не сохраняет никакую часть линкера. Не присутствует остаток, который мог бы отрицательно влиять на реакционную способность PBD-соединения. Таким образом, конъюгат формулы (I) будет высвобождать соединение RelA:



Указанная связь между димером PBD и антителом в настоящем изобретении предпочтительно стабильна вне клетки. До транспортировки или доставки в клетку конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) предпочтительно стабилен и остается интактным, т.е. антитело остается связанным с компонентом, представляющим собой лекарственное средство. Линкеры стабильны вне клетки-мишени и могут расщепляться с эффективной скоростью внутри клетки. Эффективный линкер будет: (i) сохранять свойства антитела по специфическому связыванию; (ii) обеспечивать внутриклеточную доставку конъюгата или компонента, представляющего собой лекарственное средство; (iii) оставаться стабильным и интактным, т.е. не расщепляться, пока конъюгат не будет доставлен или транспортирован в участок-мишень; и (iv) сохранять цитотоксическое, направленное на уничтожение клеток действие или цитостатическое действие компонента, представляющего собой лекарственное средство PBD. Стабильность ADC может быть измерена стандартными аналитическими методами, такими как масс-спектропия, ВЭЖХ и метод разделения/анализа ЖХ/МС.

Доставка соединений формул RelA обеспечивается в желаемом участке активации конъюгата формулы (I) под действием фермента, такого как катепсин, на связывающую группу и, в частности, на дипептидный фрагмент валин-аланин.

Настоящее изобретение также, в частности, относится к лечению анти-AXL-ADC, описанным в GB 1702029.8, GB 1719906.8, PCT/EP 2018/053163 и описанным в настоящем документе.

Конъюгаты анти-AXL-ADC.

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

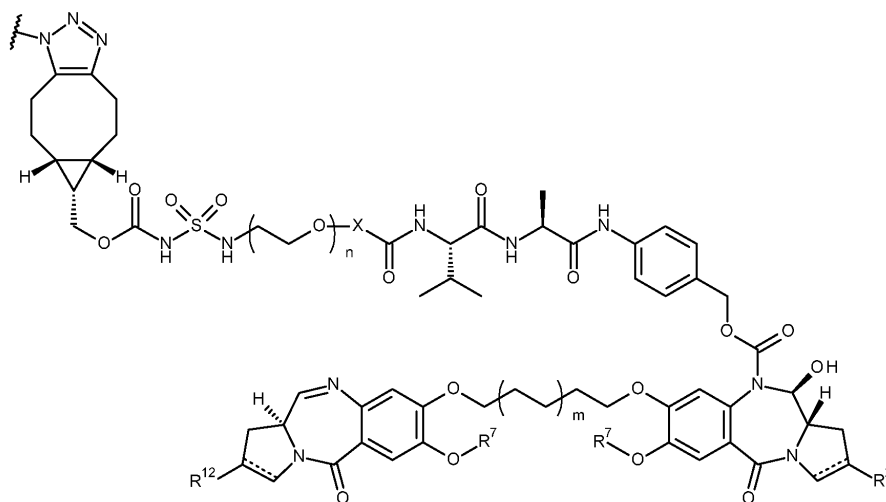
ADC может включать конъюгат формулы (I):



где:

Ab представляет собой антитело, связывающееся с AXL;

DL представляет собой



где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, $-\text{CH}_2-$ и $-\text{C}_2\text{H}_4-$;

и равен от 1 до 8;

m равен 0 или 1;

R^7 представляет собой либо метил, либо фенил;

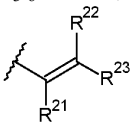
в случае, когда присутствует двойная связь между C2 и C3, R² выбран из группы, состоящей из:

(ia) C₅₋₁₀ арильной группы, необязательно содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир,

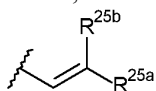
С₁₋₇ алкил, С₃₋₇ гетероциклил и бис-окси-С₁₋₃ алкилен;

(ib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;

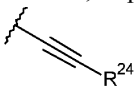
(ic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;



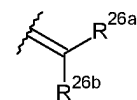
(id) R^{21} , где каждый из R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;



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



(if) R^{24} , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, при этом указанный фенил необязательно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;



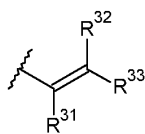
в случае, когда присутствует одинарная связь между C2 и C3, R² представляет собой R^{26a}, где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, при этом алкильная и алкенильная группы необязательно содержат в качестве заместителей группу, выбранную из C₁₋₄ алкиламида и C₁₋₄ алкилового сложного эфира;

или, когда один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

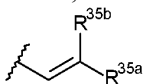
в случае, когда присутствует двойная связь между C2' и C3', R¹² выбран из группы, состоящей из:

(ia) C₅₋₁₀ арильной группы, необязательно содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇ гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;

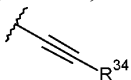
(ib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила; (ic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;



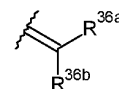
(id) , где каждый из R^{31} , R^{32} и R^{33} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, при этом указанный фенил необязательно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, при этом указанный фенил необязательно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила;



в случае, когда присутствует одинарная связь между $C2'$ и $C3'$, R^{12} представляет собой , где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группы необязательно содержат в качестве заместителей группу, выбранную из C_{1-4} алкиламида и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира; и r равен от 1 до 8.

Ранее было показано, что такие ADC подходят для лечения раковых опухолей, экспрессирующих AXL (см., например, GB 1702029.8, GB 1719906.8 и PCT/EP 2018/053163, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки).

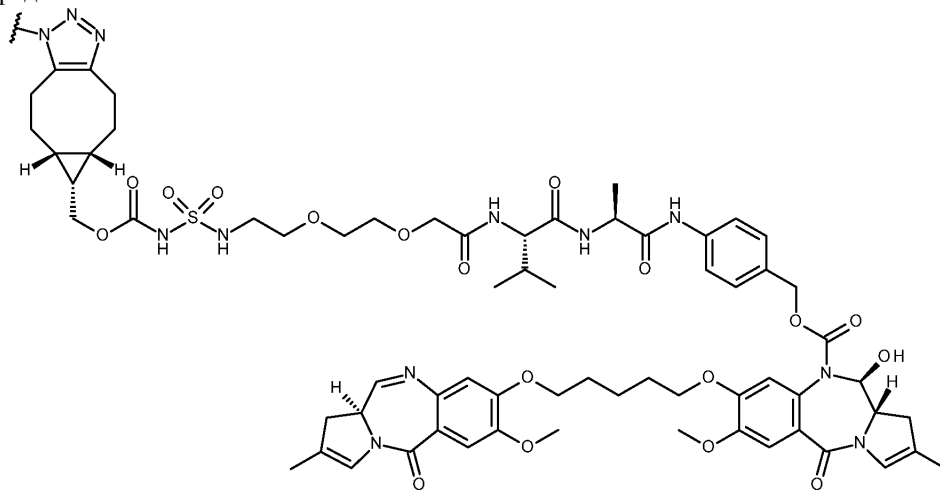
Термин "анти-AXL-ADC" может включать любой вариант реализации, описанный в GB 1702029.8. В частности, в предпочтительных вариантах реализации ADC может иметь химическую структуру:

Ab-(DL)_p (I),

где:

Ab представляет собой антитело, связывающееся с AXL;

DL представляет собой:



где Ab представляет собой антитело анти-Axl.

DL может быть конъюгирован с антителом через боковую цепь остатка аспарагина антитела, например, Asn297 в соответствии с системой нумерации KAbat. Структура связи с антителом может представлять собой N-[сахар]-DL, где N представляет собой остаток аспарагина, и [сахар] представляет собой остаток сахара, такой как остаток GlcNAc. p может быть равен от 1 до 4, предпочтительно 2.

В некоторых вариантах реализации Ab представляет собой антитело, связывающееся с AXL, при этом указанное антитело содержит:

(a) тяжелую цепь, имеющую последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 3; где DL конъюгирован с антителом через аспарагин в положении 302 последовательности SEQ ID NO.3; и

(b) легкую цепь, имеющую последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 4.

Варианты DL.

X.

В некоторых вариантах реализации X представляет собой одинарную связь.

В других вариантах реализации X представляет собой $-\text{CH}_2-$.

В других вариантах реализации X представляет собой $-\text{C}_2\text{H}_4-$.

В некоторых вариантах реализации n равен от 1 до 4.

В некоторых из этих вариантов реализации n равен 1.

В других из этих вариантов реализации n равен 2.

В других из этих вариантов реализации n равен 4.

R^7 .

В одном из вариантов реализации R^7 представляет собой метил.

В другом варианте реализации R^7 представляет собой фенил.

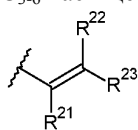
R^2 .

В случае, когда присутствует двойная связь между C2 и C3, R^2 выбран из группы, состоящей из:

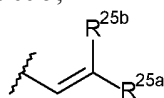
(a) C_{5-10} арильной группы, необязательно содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(b) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

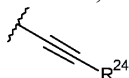
(c) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;



(d) , где каждый из R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5;



(e) , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, при этом указанный фенил необязательно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(f) , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, при этом указанный фенил необязательно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила.

Когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может представлять собой C_{5-7} арильную группу. C_{5-7} арильная группа может представлять собой фенильную группу или C_{5-7} гетероарильную группу, например, фуранил, тиофенил и пиридил. В некоторых вариантах реализации R^2 предпочтительно представляет собой фенил. В других вариантах реализации R^{12} предпочтительно представляет собой тиофенил, например, тиофен-2-ил и тиофен-3-ил.

Когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может представлять собой C_{8-10} арил, например, хинолинильную или изохинолинильную группу. Указанная хинолинильная или изохинолинильная группа может быть связана с PBD-ядром по любому доступному положению кольца. Например, хинолинил может представлять собой хинолин-2-ил, хинолин-3-ил, хинолин-4-ил, хинолин-5-ил, хинолин-6-ил, хинолин-7-ил и хинолин-8-ил. Из них могут быть предпочтительны хинолин-3-ил и хинолин-6-ил. Изохинолинил может представлять собой изохинолин-1-ил, изохинолин-3-ил, изохинолин-4-ил, изохинолин-5-ил, изохинолин-6-ил, изохинолин-7-ил и изохинолин-8-ил. Из них могут быть предпочтительны изохинолин-3-ил и изохинолин-6-ил.

Когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может содержать любое количество групп-заместителей. Он предпочтительно содержит от 1 до 3 групп-заместителей, при этом 1 и 2 более предпочтительны, и содержащие один заместитель группы наиболее предпочтительны. Заместители могут находиться в любом положении.

Когда R^2 представляет собой C_{5-7} арильную группу, один заместитель предпочтительно находится на атоме кольца, который не примыкает к связи с остальной частью соединения, т.е. он является предпочтительно β или γ относительно связи с остальной частью соединения. Соответственно, когда C_{5-7} арильная группа представляет собой фенил, заместитель предпочтительно находится в мета- или пара-положениях и более предпочтительно находится в пара-положении.

Когда R^2 представляет собой C_{8-10} арильную группу, например, хинолинил или изохинолинил, он может содержать любое количество заместителей в любом положении хинолинового или изохинолинового кольца. В некоторых вариантах реализации он содержит один, два или три заместителя, и они могут находиться либо в проксимальном и дистальном кольцах, либо в обоих (в случае более одного замести-

теля). Заместители R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой галоген, он представляет собой предпочтительно F или Cl, более предпочтительно Cl.

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой эфир, в некоторых вариантах реализации он может представлять собой алкоксигруппу, например, C_{1-7} алкоксигруппу (например, метокси, этокси), или в некоторых вариантах реализации он может представлять собой C_{5-7} арилоксигруппу (например, фенокси, пиридилокси, фуранилокси). Сама алкоксигруппа может дополнительно содержать заместители, например, аминогруппу (например, диметиламино).

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{1-7} алкил, он может предпочтительно представлять собой C_{1-4} алкильную группу (например, метил, этил, пропил, бутил).

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{3-7} гетероцикл, он может в некоторых вариантах реализации представлять собой C_6 азотсодержащую гетероциклическую группу, например морфолино, тиоморфолино, пиперидинил, пиперазинил. Эти группы могут дополнительно содержать заместители, например, C_{1-4} алкильные группы. Если C_6 азотсодержащая гетероциклическая группа представляет собой пиперазинил, указанный дополнительный заместитель может находиться на втором атоме кольца азота.

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой бис-окси- C_{1-3} алкилен, он предпочтительно представляет собой бис-оксиметилен или бис-оксиэтилен.

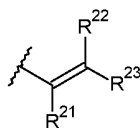
Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой сложный эфир, он предпочтительно представляет собой сложный метиловый эфир или сложный этиловый эфир.

Наиболее предпочтительные заместители, когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают метокси, этокси, фтор, хлор, циано, бис-оксиметилен, метилпиперазинил, морфолино и метилтиофенил. Другие наиболее предпочтительные заместители для R^2 представляют собой диметиламинопропилокси и карбокси.

Наиболее предпочтительные содержащие заместители группы R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают, но не ограничиваются ими, 4-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-этоксифенил, 3-этоксифенил, 4-фторфенил, 4-хлорфенил, 3,4-бисоксиметиленфенил, 4-метилтиофенил, 4-цианофенил, 4-феноксифенил, хинолин-3-ил и хинолин-6-ил, изохинолин-3-ил и изохинолин-6-ил, 2-тиенил, 2-фурил, метоксинафтил и нафтил. Другая необязательно содержащая заместители группа R^2 представляет собой 4-нитрофенил. Группы R^2 , представляющие особый интерес, включают 4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил и 3,4-бисоксиметиленфенил.

Когда R^2 представляет собой C_{1-5} насыщенный алифатический алкил, он может представлять собой метил, этил, пропил, бутил или пентил. В некоторых вариантах реализации он может представлять собой метил, этил или пропил (н-пентил или изопропил). В некоторых из этих вариантов реализации он может представлять собой метил. В других вариантах реализации он может представлять собой бутил или пентил, который может быть линейным или разветвленным.

Когда R^2 представляет собой C_{3-6} насыщенный циклоалкил, он может представлять собой циклопропил, циклобутил, цикlopентил или циклогексил. В некоторых вариантах реализации он может представлять собой циклопропил.



Когда R^2 представляет собой , каждый из R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5. В некоторых вариантах реализации общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 4 или не более 3.

В некоторых вариантах реализации один из R^{21} , R^{22} и R^{23} представляет собой H, и другие две группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

В других вариантах реализации два из R^{21} , R^{22} и R^{23} представляют собой H, и другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

В некоторых вариантах реализации группы, которые не представляют собой H, выбраны из метила и этила. В некоторых из этих вариантов реализации группы, которые не представляют собой H, представляют собой метил.

В некоторых вариантах реализации R^{21} представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации R^{22} представляет собой H.

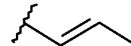
В некоторых вариантах реализации R^{23} представляет собой H.

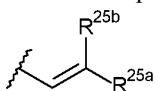
В некоторых вариантах реализации R^{21} и R^{22} представляют собой H.

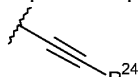
В некоторых вариантах реализации R^{21} и R^{23} представляют собой H.

В некоторых вариантах реализации R^{22} и R^{23} представляют собой H.

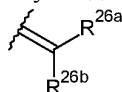
Группа R^2 , представляющая особый интерес, представляет собой:

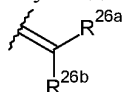


Когда R^2 представляет собой , один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, при этом указанный фенил необязательно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиафенила. В некоторых вариантах реализации группа, которая не представляет собой H, представляет собой необязательно содержащий заместители фенил. Если возможный заместитель в фениле представляет собой галоген, он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа не содержит заместителей.

Когда R^2 представляет собой , R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, при этом указанный фенил необязательно содержит в качестве заместителей группу, выбранную из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиафенила. Если возможный заместитель в фениле представляет собой галоген, он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа не содержит заместителей. В некоторых вариантах реализации R^{24} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила. В некоторых из этих вариантов реализации R^{24} выбран из H и метила.

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



R^2 представляет собой , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группы необязательно содержат в качестве заместителей группу, выбранную из C_{1-4} алкиламида и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира.

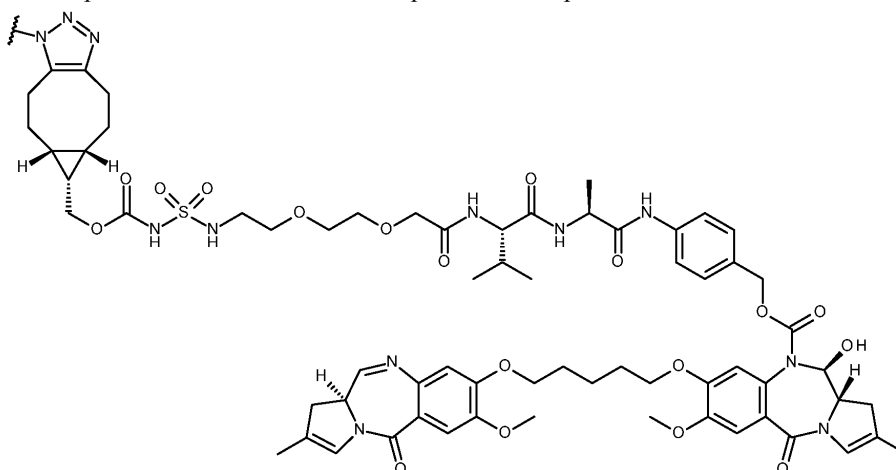
В некоторых вариантах реализации предпочтительно, чтобы R^{26a} и R^{26b} оба представляли собой H.

В других вариантах реализации предпочтительно, чтобы R^{26a} и R^{26b} оба представляли собой метил.

В других вариантах реализации предпочтительно, чтобы один из R^{26a} и R^{26b} представлял собой H, а другой был выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группы необязательно содержат заместители. В этом дополнительном варианте реализации может быть также предпочтительно, чтобы группа, которая не представляет собой H, была выбрана из метила и этила.

R^{12} .

Вышеприведенные предпочтения для R^2 в равной степени применимы к R^{12} . В одном из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения DL представляет собой



Вышеуказанный DL может предпочтительно содержаться в ADC, имеющем формулу Ab - (DL)_p, где Ab представляет собой антитело, которое связывается с AXL. DL может быть конъюгирован с антителом через боковую цепь остатка аспарагина антитела, например, Asn297 в соответствии с системой нумерации KAbat. Структура связи с антителом может представлять собой N-[сахар]-DL, где N представляет собой остаток аспарагина, и [сахар] представляет собой остаток сахара, такой как остаток GlcNAc. p может быть равен от 1 до 4, например 2.

Например, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложен конъюгат, имею-

щий формулу:



где:

Ab представляет собой антитело, содержащее:

(а) две тяжелые цепи, каждая из которых имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 3; и

(б) две легкие цепи, каждая из которых имеет последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 4;

[N] представляет собой боковую цепь аспарагина в положении 302 каждой SEQ ID NO.3;

[GlcNAc] представляет собой остаток N-ацетилглюкозамина; и

DL представляет собой соединение лекарственное средство-линкер, описанное непосредственно выше.

Компонент анти-AXL-ADC, представляющий собой антитело.

В соответствии с одним из аспектов антитело представляет собой антитело, связывающееся с AXL. 1H12.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 3 (CDR3) VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 7. В некоторых вариантах реализации указанный VH-домен также содержит VH CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 6 и/или VH CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 5. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, содержащий VH CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 5, VH CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 6 и VH CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 7. В предпочтительных вариантах реализации антитело содержит VH-домен, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 1.

Антитело может также содержать VL-домен. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VL-домен, содержащий VL CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 10. В некоторых вариантах реализации указанный VL-домен также содержит VL CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 9 и/или VL CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 8. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VL-домен, содержащий VL CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 8, VL CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 9 и VL CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 10. В предпочтительных вариантах реализации антитело содержит VL-домен, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 2.

В предпочтительных вариантах реализации антитело содержит VH-домен и VL-домен. Предпочтительно, VH содержит последовательность SEQ ID NO. 1, и VL-домен содержит последовательность SEQ ID NO. 2.

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

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

В некоторых вариантах реализации антитело содержит тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO. 3, спаренную с легкой цепью, имеющей последовательность SEQ ID NO.4. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO. 3, каждая из которых спарена с легкой цепью, имеющей последовательность SEQ ID NO. 4.

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

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

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

Наиболее предпочтительный анти-AXL-ADC для применения в соответствии с аспектами настоящего изобретения представляет собой ADCxAXL, описанный ниже.

5F11.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, содержащий VH CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 15. В некоторых вариантах реализации указанный VH-домен также содержит VH CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 14 и/или VH CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 13. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, содержащий VH CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 13, VH CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 14 и VH CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 15.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 11. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 19. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 20. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 21.

Антитело может также содержать VL-домен. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VL-домен, содержащий VL CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 18. В некоторых вариантах реализации указанный VL-домен также содержит VL CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 17 и/или VL CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 16. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VL-домен, содержащий VL CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 16, VL CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 17 и VL CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 18.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит VL-домен, имеющий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 22.

В предпочтительных вариантах реализации антитело содержит VH-домен и VL-домен. В некоторых вариантах реализации VH содержит VH CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 13, VH CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 14 и VH CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 15; и VL-домен содержит VL CDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 16, VL CDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 17 и VL CDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 18.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO. 19, и VL-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO. 22. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO. 20, и VL-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO. 22. В некоторых вариантах реализации антитело содержит VH-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO. 21, и VL-домен, имеющий последовательность SEQ ID NO. 22.

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

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

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

Модификация антител.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы. Например, для того, чтобы сделать их менее иммуногенными для субъекта, представляющего собой человека. Это можно осуществлять с применением любого из ряда методов, известных специалисту в данной области техники. Некоторые из этих методов более подробно описаны ниже.

Гуманизация.

Методы снижения иммуногенности антитела или фрагмента антитела нечеловеческого происхождения *in vivo* включают те, которые называются "гуманизацией".

Термин "гуманизированное антитело" относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере часть модифицированной вариабельной области антитела человека, при этом часть указанной вариабельной области, предпочтительно часть, которая по существу меньше интактного вариабельного домена человека, была заменена соответствующей последовательностью вида, не относящегося к человеку, и при этом указанная модифицированная вариабельная область связана по меньшей мере с другой частью другого белка, предпочтительно константной областью антитела человека. Термин "гуманизированные антитела" включает антитела человека, в которых один или более аминокислотных остатков определяющей комплементарности области ("CDR") и/или один или более аминокислотных остатков каркасной области ("FW" или "FR") заменены аминокислотными остатками из аналогичных сайтов в антителах грызуна или других антителах нечеловеческого происхождения. Термин "гуманизированное антитело" также включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или его фрагмент, который содержит FR, имеющую по существу аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и CDR, имеющую по существу аминокислотную последовательность иммуноглобулина нечеловеческого происхождения.

"Гуманизированные" формы антител нечеловеческого происхождения (например, мыши) представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Или, с другой стороны, гуманизированное антитело представляет собой антитело человека, которое также содержит выбранные последовательности из антител нечеловеческого происхождения (например, мыши) вместо последовательностей человека.

Гуманизированное антитело может содержать консервативные замены аминокислот или неприродные остатки от одного и того же или разных видов, которые не изменяют в значительной степени его активность связывания и/или биологическую активность. Такие антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулинов нечеловеческого происхождения.

Существует ряд методов гуманизации, включая "привитие CDR (CDR grafting)", "управляемый отбор", "деиммунизацию", "изменение поверхности" (также известное как "венирование"), "составные антитела", "оптимизацию содержания участков последовательности человека" и "перетасовку" каркасных областей (framework shuffling).

Привитие CDR.

Согласно этому методу гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиентного антитела заменены остатками из CDR вида, не относящегося к человеку (донорское антитело), такого как мышь, крыса, верблюд, бык, коза или кролик, обладающими желаемыми свойствами (в действительности CDR нечеловеческого происхождения "привиты" в каркасную область человека). В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками нечеловеческого происхождения (это может происходить, когда, например, конкретный остаток в FR оказывает значительное влияние на связывание антигена).

Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, не встречающиеся ни в реципиентном антителе, ни в вводимых последовательностях CDR или каркасных последовательностях. Эти модификации осуществляют для дополнительного улучшения и максимального повышения эффективности антитела. Таким образом, в целом, гуманизированное антитело будет содержать все из по меньшей мере одного и, в соответствии с одним из аспектов, двух переменных доменов, в которых все или все из гиперпеременных петель соответствуют таковым из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все FR-области представляют собой каркасные области последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина или иммуноглобулина человека.

Управляемый отбор.

Метод заключается в объединении V_H - или V_L -домена конкретного антитела нечеловеческого происхождения, специфичного в отношении конкретного эпитопа, с библиотекой V_H или V_L человека; и отбирают специфичные V-домены человека против представляющего интерес антигена. Затем это отобранный V_H человека объединяют с библиотекой V_L с получением комбинации $V_H \times V_L$ полностью человеческого происхождения. Этот метод описан в Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899-903.

Составные антитела.

Согласно этому методу два или более сегментов аминокислотной последовательности антитела человека объединяют в конечную молекулу антитела. Их конструируют путем объединения нескольких сегментов последовательности V_H и V_L человека в комбинациях, которые ограничивают или исключают эпитопы Т-клеток человека в V-областях конечного составного антитела. При необходимости эпитопы Т-клеток ограничивают или исключают путем замены сегментов V-области, вносящих вклад или кодирующих эпитоп Т-клеток, альтернативными сегментами, которые исключают эпитопы Т-клеток. Этот метод описан в US 2008/0206239 A1.

Деиммунизация.

Этот метод включает удаление эпитопов Т-клеток человека (или другого второго вида) из V-областей терапевтического антитела (или другой молекулы). Последовательность V-области терапевтического антитела анализируют на присутствие мотивов, связывающих главный комплекс гистосовместимости (МНС) класса II, например, путем сравнения с базами данных МНС-связывающих мотивов (такими как база данных "мотивов", размещенная на www.who.edu.au). В качестве альтернативы, мотивы, связывающие МНС класса II, могут быть идентифицированы с использованием компьютерных методов "протягивания", таких как те, которые разработаны Altuvia et al. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); в этих методах тестируют последовательные перекрывающиеся пептиды из последовательностей V-области на предмет энергии связывания с белками МНС класса II. Затем эти данные могут быть объединены с информацией о других признаках последовательности, которые относятся к успешно представленным пептидам, таких как амфипатичность, мотивы Ротбарда и сайты расщепления для катепсина В и других процессирующих ферментов.

После идентификации потенциальных эпитопов Т-клеток второго вида (например, человека) их исключают путем изменения одной или более аминокислот. Модифицированные аминокислоты обычно находятся в пределах самого эпитопа Т-клетки, но могут также примыкать к эпитопу в рамках первичной или вторичной структуры белка (и, следовательно, могут не примыкать в первичной структуре). Как правило, изменение осуществляют путем замены, но в некоторых случаях более подходящим является присоединение или делеция аминокислоты.

Все изменения можно осуществлять методом рекомбинантных ДНК, так что конечная молекула может быть получена путем экспрессии из рекомбинантного хозяина с применением хорошо известных

методов, таких как сайт-направленный мутагенез. Однако также возможно применение химии белков или любых других способов изменения молекулы.

Изменение поверхности.

Этот метод включает:

(а) определение конформационной структуры вариабельной области антитела (или его фрагмента) нечеловеческого происхождения (например, грызуна) путем построения трехмерной модели вариабельной области антитела нечеловеческого происхождения;

(b) осуществление выравниваний последовательностей с использованием относительного распределения доступности из рентгеновских кристаллографических структур достаточного количества тяжелых и легких цепей вариабельной области антитела нечеловеческого происхождения и антитела человека с получением набора положений каркасных областей тяжелой и легкой цепи, при этом положения выравнивания идентичны в 98% достаточного количества тяжелых и легких цепей антитела нечеловеческого происхождения;

(с) определение для гуманизируемого антитела нечеловеческого происхождения набора экспонированных на поверхности аминокислотных остатков тяжелой и легкой цепи с использованием набора положений каркасной области, полученного на этапе (b);

(d) выявление из аминокислотных последовательностей антитела человека набора экспонированных на поверхности аминокислотных остатков тяжелой и легкой цепи, который наиболее идентичен набору экспонированных на поверхности аминокислотных остатков, определенному на этапе (с), при этом тяжелая и легкая цепи антитела человека являются или не являются естественным образом спаренными;

(е) замену в аминокислотной последовательности гуманизируемого антитела нечеловеческого происхождения набора экспонированных на поверхности аминокислотных остатков тяжелой и легкой цепи, определенного на этапе (с), на набор экспонированных на поверхности аминокислотных остатков тяжелой и легкой цепи, определенный на этапе (d);

(f) построение трехмерной модели вариабельной области антитела нечеловеческого происхождения, полученной в результате замены, указанной на этапе (е);

(g) идентификацию путем сравнения трехмерных моделей, построенных на этапах (а) и (f), любых аминокислотных остатков из наборов, определенных на этапах (с) или (d), которые находятся в пределах 5 ангстрем от любого атома любого остатка определяющих комплементарность областей гуманизируемого антитела нечеловеческого происхождения; и

(h) замену любых остатков, идентифицированных на этапе (g), от человека на исходный аминокислотный остаток нечеловеческого происхождения с определением таким образом набора экспонированных на поверхности аминокислотных остатков, гуманизирующего антитело нечеловеческого происхождения; при условии, что этап (а) не обязательно должен быть проведен первым, но должен быть проведен до этапа (g).

Супергуманизация.

Этот метод позволяет сравнить последовательность нечеловеческого происхождения с функциональным репертуаром генов зародышевой линии человека. Отбирают те гены человека, которые кодируют канонические структуры, идентичные или близкородственные последовательностям нечеловеческого происхождения. Эти отобранные гены человека с самой высокой гомологией в пределах CDR выбирают в качестве доноров FR. Наконец, CDR нечеловеческого происхождения "прививают" в эти FR человека. Этот метод описан в патенте WO 2005/079479 A2.

Оптимизация содержания участков последовательности человека.

Этот метод позволяет сравнить последовательность нечеловеческого происхождения (например, мыши) с репертуаром генов зародышевой линии человека, и различия оценивают как содержание участков последовательности человека (HSC), которое количественно определяет последовательность на уровне потенциальных эпитопов МНС/Т-клеток. Затем последовательность-мишень гуманизируют путем максимального увеличения HSC вместо использования меры общей идентичности с получением множества разнообразных гуманизированных вариантов (описано в *Molecular Immunology*, 44, (2007) 1986-1998).

"Перетасовка" каркасных областей.

CDR-области антитела нечеловеческого происхождения подвергают слиянию внутри рамки с каркасными областями из пулов кДНК, содержащих все известные человеческие гены тяжелых и легких цепей зародышевой линии. Затем отбирают гуманизированные антитела, например, путем э́ннинга библиотеки антител фагового дисплея. Это описано в *Methods* 36, 43-60 (2005).

Модификация антитела азидом.

Антитело может быть подготовлено для конъюгации с соединением лекарственное средство-линкер трехэтапным способом.

(1) Экспрессия антитела (Ab), несущего коровый N-гликан, в подходящей системе экспрессии (например, линии клеток CHO). Указанный коровый N-гликан, как правило, конъюгирован с Asn-297 тяжелой цепи в соответствии с системой нумерации KAbat.

(2) "Отсечение" всех изоформ гликана (комплексных, гибридных, с высоким содержанием маннозы) эндогликозидазой, в результате которого остается коровый GlcNAc.

(3) Ферментативный перенос в коровый GlcNAc остатка N-ацетилгалактозы, содержащего азидную группу, для конъюгации с соединением лекарственное средство-линкер.

Обзор вышеуказанного способа представлен в van Geel, R., et al., Bioconjugate Chemistry, 2015, 26, 2233-2242; DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00224. В качестве альтернативы можно использовать однореакторный способ - см.

Примеры

ADCxAXL.

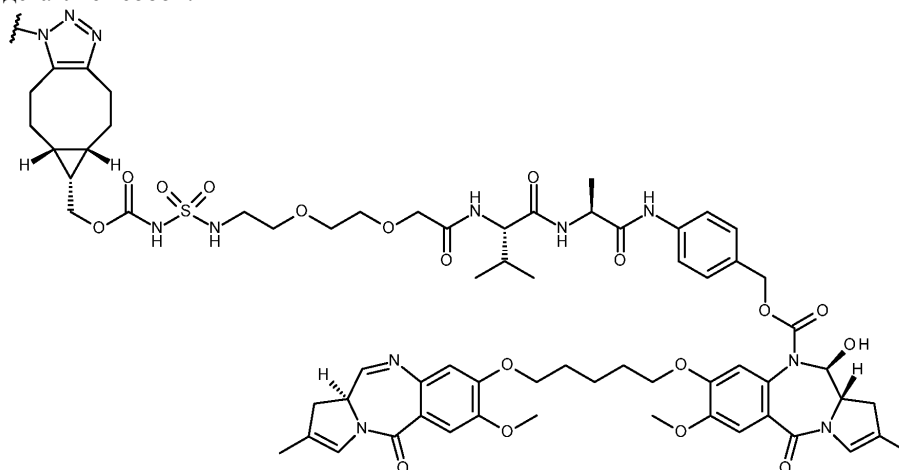
ADCxAXL представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из гуманизированного антитела к AXL человека, присоединенного к пирролобензодиазепиновой (PBD) активной группе через расщепляемый линкер. Механизм действия ADCxAXL зависит от связывания AXL. AXL-специфичное антитело направляет конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) к клеткам, экспрессирующим AXL. После связывания ADC интернализуется и переносится в лизосому, где чувствительный к протеазе линкер расщепляется, и внутри клетки-мишени высвобождается свободный димер PBD. Высвобожденный димер PBD ингибирует транскрипцию селективным в отношении последовательности образом в результате либо прямого ингибирования РНК-полимеразы, либо ингибирования взаимодействия связанных факторов транскрипции. Димер PBD образует ковалентные перекрестные связи, которые не деформируют двойную спираль ДНК и которые не распознаются факторами эксцизионной репарации нуклеотидов, что обеспечивает более длительный эффективный период (Hartley 2011).

Он имеет химическую структуру:

Ab-(DL)_p,

где:

DL представляет собой:



Ab представляет собой антитело, связывающееся с AXL, при этом указанное антитело содержит:

(a) тяжелую цепь, имеющую последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 3;

(b) легкую цепь, имеющую последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 4. Следует отметить, что термин "имеющий последовательность" имеет то же значение, что и термин "содержащий последовательность"; в частности, в некоторых вариантах реализации тяжелая цепь ADCxAXL экспрессирована с дополнительным концевым остатком "К" (таким образом, заканчиваясь ... SPGK), при этом указанный концевой К необязательно удаляют посттрансляционно для улучшения гомогенности конечного терапевтического продукта ADC.

DL может быть конъюгирован с антителом через боковую цепь аспарагина в положении 302 последовательности SEQ ID NO.3. Структура связи с антителом может представлять собой N-[GlcNAc]-DL, где N представляет собой остаток аспарагина, и [GlcNAc] представляет собой остаток GlcNAc. p может быть до 2 и, как правило, он больше 1,9.

Определения.

Связывание AXL.

В настоящем описании "первый белок-мишень" (FTP) может представлять собой AXL.

В настоящем описании термин "связывает AXL" означает, что антитело связывает AXL с более высокой аффинностью, чем неспецифичный партнер, такой как бычий сывороточный альбумин (BSA, номер доступа Genbank CAA76847, номер версии CAA76847.1 GL3336842, дата обновления записи: 7 января 2011 г., 02:30 PM). В некоторых вариантах реализации антитело связывает Axl с константой ассоциации (K_d), которая по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10^4 , 10^5 или 10^6 раз выше константы ассоциации указанного антитела для BSA, при измерении в физиологических условиях. Антитела согласно настоящему изобретению могут связывать AXL с высокой аффинностью. Например, в некоторых вариантах реализации антитело может связывать AXL с K_D , равной или меньше примерно 10^{-6} М, такой как 1×10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} или 10^{-14} .

В настоящем описании термин "связывает AXL" означает, что антитело связывает AXL с более высокой аффинностью, чем неспецифичный партнер, такой как бычий сывороточный альбумин (BSA, номер доступа Genbank CAA76847, номер версии CAA76847.1 GL3336842, дата обновления записи: 7 января 2011 г., 02:30 PM). В некоторых вариантах реализации антитело связывает AXL с константой ассоциации (K_a), которая по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10^4 , 10^5 или 10^6 раз выше константы ассоциации указанного антитела для BSA, при измерении в физиологических условиях. Антитела согласно настоящему изобретению могут связывать Axl с высокой аффинностью. Например, в некоторых вариантах реализации антитело может связывать AXL с K_D , равной или меньше примерно 10^{-6} М, такой как 1×10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} или 10^{-14} .

AXL является членом ТАМ-семейства рецепторных тирозинкиназ человека. В некоторых вариантах реализации полипептид Axl соответствует номеру доступа Genbank AAN32229, номер версии AAN32229.1 GL21619004, дата обновления записи: 6 марта 2012 г., 01:18 PM (SEQ ID NO.9). В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид Axl, соответствует номеру доступа Genbank M76125, номер версии M76125.1 GL292869, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 08:53 AM. В некоторых вариантах реализации полипептид AXL имеет последовательность SEQ ID NO. 23.

Заместители.

В настоящем описании термин "необязательно содержащий заместители" относится к исходной группе, которая может не содержать заместителей или которая может содержать заместители.

Если не указано иное, в настоящем описании термин "содержащий заместители" относится к исходной группе, которая содержит один или более заместителей. В настоящем описании термин "заместитель" употребляется в традиционном значении и относится к химической группе, которая ковалентно присоединена или, если применимо, конденсирована с исходной группой. Хорошо известен широкий спектр заместителей, а также хорошо известны способы их образования и введения в различные исходные группы.

Некоторые из заместителей более подробно описаны ниже.

C_{1-12} алкил.

В настоящем описании термин " C_{1-12} алкил" относится к одновалентной группе, полученной путем удаления атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до 12 атомов углерода, которая может быть алифатической или алициклической, и которая может быть насыщенной или ненасыщенной (например, частично ненасыщенной, полностью ненасыщенной). В настоящем описании термин " C_{1-4} алкил" относится к одновалентной группе, полученной путем удаления атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до 4 атомов углерода, которая может быть алифатической или алициклической, и которая может быть насыщенной или ненасыщенной (например, частично ненасыщенной, полностью ненасыщенной). Таким образом, термин "алкил" включает подклассы: алкенил, алкинил, циклоалкил и т.д., рассмотренные ниже.

Примеры насыщенных алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, метил (C_1), этил (C_2), пропил (C_3), бутил (C_4), пентил (C_5), гексил (C_6) и гептил (C_7).

Примеры насыщенных линейных алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, метил (C_1), этил (C_2), н-пропил (C_3), н-бутил (C_4), н-пентил (амил) (C_5), н-гексил (C_6) и н-гептил (C_7).

Примеры насыщенных разветвленных алкильных групп включают изопропил (C_3), изобутил (C_4), втор-бутил (C_4), трет-бутил (C_4), изопентил (C_5) и неопентил (C_5).

C_{2-12} алкенил.

В настоящем описании термин " C_{2-12} алкенил" относится к алкильной группе, содержащей одну или более двойных углерод-углеродных связей.

Примеры ненасыщенных алкенильных групп включают, но не ограничиваются ими, этенил (винил, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 1-пропенил ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$), 2-пропенил (аллил, $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$), изопропенил (1-метилвинил, $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$), бутенил (C_4), пентенил (C_5) и гексенил (C_6).

C_{2-12} алкинил: В настоящем описании термин " C_{2-12} алкинил" относится к алкильной группе, содержащей одну или более тройных углерод-углеродных связей.

Примеры ненасыщенных алкинильных групп включают, но не ограничиваются ими, этинил ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) и 2-пропинил (пропаргил, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$).

C_{3-12} циклоалкил.

В настоящем описании термин " C_{3-12} циклоалкил" относится к алкильной группе, которая является также циклильной группой; т.е. одновалентной группе, полученной путем удаления атома водорода от атома алициклического кольца циклического углеводородного (карбоциклического) соединения, при этом указанная группа содержит от 3 до 7 атомов углерода, в том числе от 3 до 7 атомов кольца.

Примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, полученные из: насыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропана (C_3), циклобутана (C_4), цикlopentана (C_5), циклогексана (C_6), циклогептана (C_7), метилциклопропана (C_4), диметилциклопропана (C_5), метилциклобутана (C_5), диметилциклобутана (C_6), метилциклопентана (C_6), диметилциклопентана (C_7) и метилциклогексана (C_7);

ненасыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропена (C_3), циклобутена (C_4), циклопентена (C_5), циклогексена (C_6), метилциклопропена (C_4), диметилциклопропена (C_4), метилциклобутена (C_5), диметилциклобутена (C_6), метилциклопентена (C_6), диметилциклопентена (C_7) и метилциклогексена (C_7); и

насыщенных полициклических углеводородных соединений:

норкарана (C_7), норпинана (C_7), норборнана (C_7).

C_{3-20} гетероцикл: В настоящем описании термин " C_{3-20} гетероцикл" относится к одновалентной группе, полученной путем удаления атома водорода от атома кольца гетероциклического соединения, при этом указанная группа содержит от 3 до 20 атомов кольца, от 1 до 10 из которых представляют собой гетероатомы кольца. Предпочтительно, каждое кольцо содержит от 3 до 7 атомов кольца, от 1 до 4 из которых представляют собой гетероатомы кольца.

В этом контексте приставки (например, C_{3-20} , C_{3-7} , C_{5-6} и т.д.) обозначают число атомов кольца или диапазон числа атомов кольца - как атомов углерода, так и гетероатомов. Например, в настоящем описании термин " C_{5-6} гетероцикл" относится к гетероциклической группе, содержащей 5 или 6 атомов кольца.

Примеры моноциклических гетероциклических групп включают, но не ограничиваются ими, группы, полученные из:

N_1 : азиридина (C_3), азетидина (C_4), пирролидина (тетрагидропиррола) (C_5), пирролина (например, 3-пирролина, 2,5-дигидропиррола) (C_5), 2Н-пиррола или 3Н-пиррола (изопиррола, изоазола) (C_5), пиперидина (C_6), дигидропиридина (C_6), тетрагидропиридина (C_6), азапина (C_7);

O_1 : оксирана (C_3), оксетана (C_4), оксолана (тетрагидрофурана) (C_5), оксола (дигидрофурана) (C_5), оксана (тетрагидропирана) (C_6), дигидропирана (C_6), пирана (C_6), оксепина (C_7);

S_1 : тирана (C_3), тьетана (C_4), тиолана (тетрагидротиюфена) (C_5), тиана (тетрагидротиюпирана) (C_6), тиепана (C_7);

O_2 : диоксолана (C_5), диоксана (C_6) и диоксепана (C_7);

O_3 : триоксана (C_6);

N_2 : имидазолидина (C_5), пиазолидина (диазолидина) (C_5), имидазолина (C_5), пиазолина (дигидропиазола) (C_5), пиперазина (C_6);

N_1O_1 : тетрагидрооксазола (C_5), дигидрооксазола (C_5), тетрагидроизоксазола (C_5), дигидроизоксазола (C_5), морфолина (C_6), тетрагидрооксазина (C_6), дигидрооксазина (C_6), оксазина (C_6);

N_1S_1 : тиазолина (C_5), тиазолидина (C_5), тиоморфолина (C_6);

N_2O_1 : оксадиазина (C_6);

O_1S_1 : оксатиола (C_5) и оксатиана (тиоксана) (C_6); и

$N_1O_1S_1$: оксатиазина (C_6).

Примеры содержащих заместители моноциклических гетероциклических групп включают группы, полученные из сахаридов, в циклической форме, например, фураноз (C_5), таких как арабинофураноза, ликсофураноза, рибофураноза и ксилофураноза, и пираноз (C_6), таких как аллопираноза, альтропираноза, глюкотираноза, маннопираноза, гулопираноза, идопираноза, галактопираноза и талопираноза.

C_{5-20} арил: В настоящем описании термин " C_{5-20} арил" относится к одновалентной группе, полученной путем удаления атома водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения, при этом указанная группа содержит от 3 до 20 атомов кольца. В настоящем описании термин " C_{5-7} арил" относится к одновалентной группе, полученной путем удаления атома водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения, при этом указанная группа содержит от 5 до 7 атомов кольца, и термин " C_{5-10} арил" в настоящем описании относится к одновалентной группе, полученной путем удаления атома водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения, при этом указанная группа содержит от 5 до 10 атомов кольца. Предпочтительно, каждое кольцо содержит от 5 до 7 атомов кольца.

В этом контексте приставки (например, C_{3-20} , C_{5-7} , C_{5-6} , C_{5-10} и т.д.) обозначают число атомов кольца или диапазон числа атомов кольца - как атомов углерода, так и гетероатомов.

Например, в настоящем описании термин " C_{5-6} арил" относится к арильной группе, содержащей 5 или 6 атомов кольца.

Все атомы кольца могут представлять собой атомы углерода, как в "карбоарильных группах".

Примеры карбоарильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, полученные из бензола (т.е. фенил) (C_6), нафталина (C_{10}), азулена (C_{10}), антрацена (C_{14}), фенантрена (C_{14}), нафтацена (C_{18}) и пирена (C_{16}).

Примеры арильных групп, которые содержат конденсированные кольца, по меньшей мере одно из которых представляет собой ароматическое кольцо, включают, но не ограничиваются ими, группы, полученные из индана (например, 2,3-дигидро-1Н-индана) (C_9), индана (C_9), изоиндана (C_9), тетралина (1,2,3,4-тетрагидронафталина) (C_{10}), аценафтена (C_{12}), флуорена (C_{13}), феналена (C_{13}), ацефенантрена (C_{15}) и ацеантрена (C_{16}).

В качестве альтернативы, атомы кольца могут включать один или более гетероатомов, как в "гетероарильных группах". Примеры моноциклических гетероарильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, полученные из: N_1 : пиррола (азола) (C_5), пиридина (азина) (C_6); O_1 : фурана (оксола) (C_5); S_1 : тиюфена (тиола) (C_5);

N_1O_1 : оксазола (C_5), изоксазола (C_5), изоксазина (C_6); N_2O_1 : оксадиазола (фуразана) (C_5); N_3O_1 : оксатриазола (C_5); N_1S_1 : тиазола (C_5), изотиазола (C_5);

N_2 : имидазола (1,3-диазола) (C_5), пиразола (1,2-диазола) (C_5), пиридазина (1,2-диазина) (C_6), пиримидина (1,3-диазина) (C_6) (например, цитозина, тимина, урацила), пиразина (1,4-диазина) (C_6);

N_3 : триазола (C_5), триазина (C_6); и N_4 : тетразола (C_5).

Примеры гетероарильных групп, содержащих конденсированные кольца, включают, но не ограничиваются ими:

C_9 (с 2 конденсированными кольцами), полученные из бензофурана (O_1), изобензофурана (O_1), индола (N_1), изоиндола (N_1), индолизина (N_1), индолина (N_1), изоиндолина (N_1), пурина (N_4) (например, аденина, гуанина), бензимидазола (N_2), индазола (N_2), бензоксазола (N_1O_1), бензизоксазола (N_1O_1), бензодиоксола (O_2), бензофуразана (N_2O_1), бензотриазола (N_3), бензотиофурана (S_1), бензотиазола (N_1S_1), бензотиадиазола (N_2S);

C_{10} (с 2 конденсированными кольцами), полученные из хромена (O_1), изохромена (O_1), хромана (O_1), изохромана (O_1), бензодиоксана (O_2), хинолина (N_1), изохинолина (N_1), хинолизина (N_1), бензоксазина (N_1O_1), бензодиазина (N_2), пиридопиридина (N_2), хиноксалина (N_2), хиназолина (N_2), циннолина (N_2), фталазина (N_2), нафтиридина (N_2), птеридина (N_4);

C_{11} (с 2 конденсированными кольцами), полученные из бензодиазепина (N_2);

C_{13} (с 3 конденсированными кольцами), полученные из карбазола (N_1), дибензофурана (O_1), дибензотиофена (S_1), карболина (N_2), перимидина (N_2), пиридоиндола (N_2); и

C_{14} (с 3 конденсированными кольцами), полученные из акридина (N_1), ксантена (O_1), тиоксантена (S_1), оксатрена (O_2), феноксатина (O_1S_1), феназина (N_2), феноксазина (N_1O_1), фенотиазина (N_1S_1), тиантрена (S_2), фенантридина (N_1), фенантролина (N_2), феназина (N_2).

Вышеописанные группы отдельно или как часть другого заместителя могут сами содержать в качестве заместителей одну или более групп, выбранных из них самих и дополнительных заместителей, перечисленных ниже.

Галоген: -F, -Cl, -Br и -I.

Гидроксигруппа: -OH.

Эфир: -OR, где R представляет собой заместитель эфира, например, C_{1-7} алкильную группу (также называемую C_{1-7} алкоксигруппой, описанной ниже), C_{3-20} гетероциклическую группу (также называемую C_{3-20} гетероциклическоксигруппой) или C_{5-20} арильную группу (также называемую C_{5-20} арилоксигруппой), предпочтительно C_{1-7} алкильную группу.

Алкокси: -OR, где R представляет собой алкильную группу, например, C_{1-7} алкильную группу. Примеры C_{1-7} алкоксигрупп включают, но не ограничиваются ими, -OMe (метокси), -OEt (этокси), -O(nPr) (н-пропокси), -O(iPr) (изопропокси), -O(nBu) (н-бутокси), -O(sBu) (втор-бутокси), -O(tBu) (изобутокси) и -O(tBu) (трет-бутокси).

Карбокси (карбоновая кислота): -C(=O)OH.

Сложный эфир (карбоксилат, сложный эфир карбоновой кислоты, оксикарбонил): -C(=O)OR, где R представляет собой заместитель сложного эфира, например, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются ими, -C(=O)OCH₃, -C(=O)OCH₂CH₃, -C(=O)OC(CH₃)₃ и -C(=O)OPh.

Амино: -NR¹R², где R¹ и R² независимо представляют собой заместители аминогруппы, например, водород, C_{1-7} алкильную группу (также называемую C_{1-7} алкиламино или ди- C_{1-7} алкиламино), C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно H или C_{1-7} алкильную группу, или в случае "циклической" аминогруппы R¹ и R² вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 атомов кольца. Аминогруппы могут быть первичными (-NH₂), вторичными (-NHR¹) или третичными (-NHR¹R²) и в катионной форме могут быть четвертичными (-⁺NR¹R²R³). Примеры аминогрупп включают, но не ограничиваются ими, -NH₂, -NHCH₃, -NHC(CH₃)₂, -N(CH₃)₂, -N(CH₂CH₃)₂ и -NHPh. Примеры циклических аминогрупп включают, но не ограничиваются ими, азиридины, азетидины, пирролидины, пиперидины, пиперазины, морфолины и тиоморфолины.

Амидо (карбамоил, карбамил, аминокарбонил, карбоксамид): -C(=O)NR¹R², где R¹ и R² независимо представляют собой заместители аминогруппы, определенные для аминогрупп. Примеры амидогрупп включают, но не ограничиваются ими, -C(=O)NH₂, -C(=O)NHCH₃, -C(=O)N(CH₃)₂, -C(=O)NHCH₂CH₃ и -C(=O)N(CH₂CH₃)₂, а также амидогруппы, в которых R¹ и R² вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическую структуру, как, например, в пиперидинокарбониле, морфолинокарбониле, тиоморфолинокарбониле и пиперазинокарбониле.

Нитро: -NO₂.

Азидо: -N₃.

Циано (нитрил, карбонитрил): -CN.

Содержание лекарственного средства.

Содержание лекарственного средства представляет собой среднее количество PBD лекарственных средств на антитело, например, антитело.

Среднее количество лекарственных средств на антитело в препаратах ADC, полученных в результате реакций конъюгации, может быть определено стандартными способами, таким как УФ, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC), масс-спектрометрия, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и электрофорез. Также может быть определено количественное распределение ADC в показателях ρ . Путем ELISA может быть определено усредненное значение ρ в конкретном препарате ADC (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Однако распределение значений ρ (лекарственное средство) нельзя определить вследствие связывания антитело-антиген и предела детектирования ELISA. Кроме того, анализ ELISA для детектирования конъюгатов антитело-лекарственное средство не позволяет определить где компоненты, представляющие собой лекарственное средство, присоединены к антителу, например, фрагментам тяжелой цепи или легкой цепи, или конкретным аминокислотным остаткам. В некоторых случаях отделение, очистку и получение характеристик гомогенного ADC, где ρ имеет определенное значение, от ADC с другим содержанием лекарственного средства, можно осуществлять такими способами, как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез. Такие методы также применимы к другим видам конъюгатов.

Для конъюгатов антитело-лекарственное средство согласно изобретению ρ ограничивается количеством участков присоединения на антителе, т.е. количеством азидных групп. Например, антитело может содержать только одну или две азидные группы, к которым может быть присоединено лекарственное средство-линкер.

Как правило, во время реакции конъюгации с антителом конъюгируют число компонентов, представляющих собой лекарственное средство, которое меньше теоретического максимума. Содержание (соотношение лекарственное средство/антитело) в ADC можно контролировать несколькими различными способами, включая: (i) ограничение молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер (D-L) или линкерного реагента относительно антитела и (ii) ограничение времени или температуры реакции конъюгации.

Когда более одной нуклеофильной или электрофильной группы антитела реагирует с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом с последующим взаимодействием с реагентом, представляющим собой лекарственный компонент, то полученный продукт представляет собой смесь ADC-соединений с распределением компонентов, представляющих собой лекарственное средство, присоединенных к антителу, например 1, 2, 3 и т.д. Методы жидкостной хроматографии, такие как полимерная обращенно-фазовая (PLRP) хроматография и хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC), позволяют разделять соединения в смеси по значению содержания лекарственного средства. Могут быть выделены препараты ADC с одним значением содержания лекарственного средства (ρ), однако эти ADC с одним значением содержания могут все еще представлять собой гетерогенные смеси, поскольку компоненты, представляющие собой лекарственное средство, могут быть присоединены через линкер в различных участках антитела.

Таким образом, композиции конъюгата антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению включают смеси соединений, представляющих собой конъюгат антитело-лекарственное средство, в которых антитело содержит один или более компонентов, представляющих собой PBD лекарственное средство, и в которых компоненты, представляющие собой лекарственное средство, могут быть присоединены к антителу в различных аминокислотных остатках.

В одном из вариантов реализации среднее количество димерных пирролобензодиазепиновых групп на антитело находится в диапазоне от 1 до 8. В некоторых вариантах реализации указанный диапазон выбран из: от 1 до 4, от 1 до 4, от 2 до 4 и от 1 до 3.

В некоторых вариантах реализации на антитело приходится одна или две димерные пирролобензодиазепиновые группы.

Включает другие формы.

Если не указано иное, вышеприведенные заместители включают хорошо известные ионные формы, формы солей, сольватов и защищенные формы этих заместителей. Например, указание на карбоновую кислоту (-COOH) также включает ее анионную (карбоксилатную) форму (-COO⁻), соль или сольват, а также традиционные защищенные формы. Аналогичным образом, указание на аминогруппу включает протонированную форму (-N⁺HR¹R²), соль или сольват указанной аминогруппы, например, гидрохлоридную соль, а также традиционные защищенные формы аминогруппы. Аналогичным образом, указание на гидроксильную группу также включает ее анионную форму (-O⁻), соль или сольват, а также традиционные защищенные формы.

Соли.

Может быть удобным или желательным получение, очистка и/или применение соответствующей соли активного соединения, например, фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых солей рассмотрены в Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Например, если соединение является анионным или содержит функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может представлять собой -COO⁻), то соль может быть образована с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но не ограничиваются ими, ионы щелочных металлов, такие как Na⁺ и K⁺, катионы щелочноземельных металлов, та-

кие как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и другие катионы, такие как Al^{+3} . Примеры подходящих органических катионов включают, но не ограничиваются ими, ион аммония (т.е. NH_4^+) и содержащие заместители ионы аммония (например, NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+). Примерами некоторых подходящих содержащих заместители ионов аммония являются те, которые получены из: этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглума и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером типичного иона четвертичного аммония является $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$.

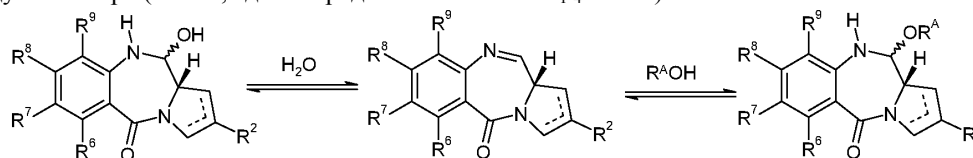
Если соединение является катионным или содержит функциональную группу, которая может быть катионной (например, $-\text{NH}_2$ может представлять собой $-\text{NH}_3^+$), то соль может быть образована с подходящим анионом. Примеры подходящих неорганических анионов включают, но не ограничиваются ими, анионы, полученные из следующих неорганических кислот: хлористоводородной, бромистоводородной, йодистоводородной, серной, сернистой, азотной, азотистой, фосфорной и фосфористой.

Примеры подходящих органических анионов включают, но не ограничиваются ими, анионы, полученные из следующих органических кислот: 2-ацетилоксибензойной, уксусной, аскорбиновой, аспарагиновой, бензойной, камфоросульфоновой, коричной, лимонной, этилендиаминтетрауксусной, этандисульфоновой, этансульфоновой, fumarовой, глюкогептоновой, глюконовой, глутаминовой, гликолевой, гидроксималеиновой, гидроксинафталинкарбоновой, изэтионовой, молочной, лактобионовой, лауриновой, малеиновой, яблочной, метансульфоновой, муциновой, олеиновой, щавелевой, пальмитиновой, палмовой, пантотеновой, фенилуксусной, фенилсульфоновой, пропионовой, пировиноградной, салициловой, стеариновой, янтарной, сульфаниловой, винной, толуолсульфоновой, трифторуксусной кислоты и валеариановой. Примеры подходящих полимерных органических анионов включают, но не ограничиваются ими, анионы, полученные из следующих полимерных кислот: дубильной кислоты, карбоксиметилцеллюлозы.

Сольваты.

Может быть удобным или желательным получение, очистка и/или применение соответствующего сольвата активного соединения. В настоящем описании термин "сольват" употребляется в традиционном значении и относится к комплексу растворенного вещества (например, активного соединения, соли активного соединения) и растворителя. Если растворитель представляет собой воду, сольват может для удобства называться гидратом, например, моногидратом, дигидратом, тригидратом и т.д.

Настоящее изобретение включает соединения, в которых растворитель присоединяется через иминную связь компонента, представляющего собой PBD, как показано ниже, где растворитель представляет собой воду или спирт (R^AOH , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил):



Эти формы могут называться карбиноламинными и карбиноламинэфирными формами PBD (как описано в разделе, относящемся к R^{10} , выше). Баланс этих равновесий зависит от условий, в которых соединения обнаруживают, а также природы самого компонента.

Эти конкретные соединения могут быть выделены в твердой форме, например, путем лиофилизации.

Изомеры.

Некоторые соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в одной или более конкретных геометрических, оптических, энантиомерных, диастереомерных, эпимерных, атропоизомерных, стереоизомерных, таутомерных, конформационных или аномерных формах, включая, но не ограничиваясь ими, цис- и транс-формы; E- и Z-формы; c-, t- и г-формы; эндо- и экзоформы; R-, S- и мезоформы; D- и L-формы; d- и l-формы; (+) и (-) формы; кето-, енольные и енолятные формы; син- и антиформы; синклиальные и антиклиальные формы; α - и β -формы; аксиальные и экваториальные формы; форму ванны, кресла, твист-форму, форму конверта и полукресла; и их комбинации, которые ниже обобщенно называются "изомерами" (или "изомерными формами").

Термин "хиральный" относится к молекулам, обладающим свойством не совпадать при наложении со своим зеркальным отображением, в то время как термин "ахиральный" относится к молекулам, которые при наложении совпадают со своим зеркальным отображением.

Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые имеют одинаковый химический состав, но различаются с точки зрения расположения атомов или групп в пространстве.

Термин "диастереомер" относится к стереоизомеру с двумя или более центрами хиральности, молекулы которого не являются зеркальными отображениями друг друга. Диастереомеры обладают разными физическими свойствами, например, температурами плавления, температурами кипения, спектральными свойствами и реакционной способностью. Смеси диастереомеров можно разделять с использованием методов анализа с высоким разрешением, таких как электрофорез и хроматография.

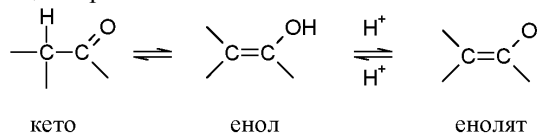
Термин "энантиомеры" относится к двум стереоизомерам соединения, которые представляют собой

несовпадающие при наложении зеркальные отображения друг друга.

Определения и обозначения стереохимических структур, используемые в настоящем описании, в целом, соответствуют S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. and Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Соединения согласно настоящему изобретению могут содержать асимметричные или хиральные центры и, следовательно, существовать в различных стереоизомерных формах. Предполагается, что все стереоизомерные формы соединений согласно настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, диастереомеры, энантиомеры и атропоизомеры, а также их смеси, такие как рацемические смеси, являются частью настоящего изобретения. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, т.е. они обладают способностью вращать плоскость плоскополяризованного света. При описании оптически активного соединения приставки D и L или R и S используют для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра (центров). Приставки d и l или (+) и (-) используют для обозначения знака направления вращения плоскополяризованного света соединением, при этом (-) или l означает, что соединение является левовращающим. Соединение с приставкой (+) или d является правовращающим. Для конкретной химической структуры эти стереоизомеры являются идентичными за исключением того, что они являются зеркальными отображениями друг друга. Конкретный стереоизомер может также называться "энантиомером", а смесь таких изомеров часто называют "энантиомерной смесью". Смесь энантиомеров в соотношении 50:50 называют "рацемической смесью" или "рацематом", который может образовываться, когда в химической реакции или процессе отсутствует стереоселекция или стереоспецифичность. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимольной смеси двух видов энантиомеров, не обладающей оптической активностью.

Следует отметить, что за исключением описанного ниже для таутомерных форм, из термина "изомеры" в настоящем описании специально исключены структурные (или конституциональные) изомеры (т.е. изомеры, который различаются связями между атомами, а не просто положением атомов в пространстве). Например, указание на метоксигруппу, $-\text{OCH}_3$, не следует рассматривать как указание на ее структурный изомер, гидроксиметильную группу, $-\text{CH}_2\text{OH}$. Аналогичным образом, указание на орто-хлорфенил не следует рассматривать как указание на его структурный изомер, мета-хлорфенил. Однако указание на класс структур может включать структурные изомерные формы, входящие в этот класс (например, C_{1-7} алкил включает n-пропил и изопропил; бутил включает n-, изо-, втор- и трет-бутил; метоксифенил включает орто-, мета- и пара-метоксифенил).

Вышеуказанное исключение не относится к таутомерным формам, например, кето-, енольным и енолятным формам, как, например, в следующих таутомерных парах: кето/енол (показана ниже), имин/енамин, амид/иминоспирт, амидин/амидин, нитрозо/оксим, тиокетон/ентиол, N-нитрозо/гидроксиназо и нитро/ацинитро.



Термин "таутомер" или "таутомерная форма" относится к структурным изомерам с разной энергией, которые подвергаются взаимным превращениям через низкий энергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают взаимопревращения за счет миграции протона, такие как кето-енольная и имин-енаминная изомеризация. Валентные таутомеры включают взаимопревращения путем перестройки некоторых связывающих электронов.

Следует отметить, что в термин "изомер", в частности, включены соединения с одним или более изотопными замещениями. Например, H может быть в любой изотопной форме, включая ^1H , ^2H (D) и ^3H (T); C может быть в любой изотопной форме, включая ^{12}C , ^{13}C и ^{14}C ; O может быть в любой изотопной форме, включая ^{16}O и ^{18}O ; и т.п.

Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения согласно настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как, но не ограничиваясь ими, ^2H (дейтерий, D), ^3H (тритий), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl и ^{125}I . Различные меченые изотопом соединения согласно настоящему изобретению, например, соединения, в которые введены радиоактивные изотопы, такие как ^3H , ^{13}C и ^{14}C . Такие меченые изотопом соединения могут подходить для применения в исследованиях метаболизма, исследованиях кинетики реакций, методах детектирования или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), включая анализы распределения лекарственного средства или субстрата в ткани, или в лечении пациентов радиоактивными веществами. Терапевтические соединения согласно настоящему изобретению, меченые дейтерием или содержащие в качестве заместителей дейтерий, могут обладать улучшенными свойствами DMPK (метаболизма и фармакокинетики лекарственного средства), относящимися к распределению, метаболизму и выведению (ADME). Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может обеспечивать определенные тера-

терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличение периода полувыведения *in vivo* или снижение необходимой дозы. ^{18}F -меченое соединение может подходить для ПЭТ- или ОФЭКТ-исследований. Меченые изотопами соединения согласно настоящему изобретению и их пролекарства могут быть, в целом, получены путем осуществления методик, описанных в схемах или в примерах и составах ниже, путем замены немеченого изотопом реагента легко доступным меченым изотопом реагентом. Более того, замещение более тяжелыми изотопами, в частности, дейтерием (т.е. ^2H или D) может обеспечивать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличение периода полувыведения *in vivo* или снижение необходимой дозы, или улучшение терапевтического индекса. Очевидно, что в этом контексте дейтерий рассматривается как заместитель. Концентрация такого более тяжелого изотопа, в частности дейтерия, может быть определена коэффициентом изотопного обогащения. Предполагается, что в соединениях согласно настоящему изобретению любой атом, специально не обозначенный как конкретный изотоп, представляет собой любой стабильный изотоп этого атома.

Если не указано иное, указание на конкретное соединение включает все такие изомерные формы, в том числе их (полностью или частично) рацемические и другие смеси. Способы получения (например, асимметричный синтез) и разделения (например, фракционная кристаллизация и хроматографические способы) таких изомерных форм либо известны в данной области техники, либо их легко получают известным образом путем адаптации способов, описанных в настоящем документе, или известных способов.

Вторичные агенты.

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

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

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

Иммуноонкологические (ИО) лекарственные средства, тип противораковой терапии с опорой на помощь иммунной системы организма в борьбе с раком, продемонстрировали увеличенную продолжительность противоопухолевого ответа. Существуют различные типы ИО, включая, но не ограничиваясь ими, ингибиторы PD1, ингибиторы PD-L1, ингибиторы CTLA4, агонисты GITR и агонисты OX40. Из-за значительной доли пациентов, которых не удается излечить путем иммунотерапии одним агентом и у которых в конечном итоге происходит рецидив, необходимы виды комбинированного лечения альтернативными ИО лекарственными средствами или другими терапевтическими средствами (см. KS Peggs et al. 2009, *Clinical and Experimental Immunology*, 157: 9-19 [doi: 10.1111/j. 1365-2249.2009.03912.x]; DM Pardoll 2012 [doi: 10.1038/nrc3239]).

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

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

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

Вторичный агент может представлять собой:

(а) антагонист PD1, такой как пембролизумаб, ниволумаб, MEDI0680, PDR001 (спартализумаб), камрелизумаб, AUNP12, пидилизумаб, цемиплимаб (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (тислелизумаб) или BGB-108;

(b) антагонист PD-L1, такой как атезолизумаб (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаб/MEDI4736 или MSB0010718C (авелумаб);

(c) агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), такой как MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK-4166, BMS-986156 или INCAGN1876;

(d) агонист OX40, такой как MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 или PF-04518600;

(e) антагонист CTLA-4, такой как ипилимумаб (торговое название Ервой) или тремелидумаб (первоначально разработанный Pfizer, в настоящее время Medimmune);

(f) флударабин или цитарабин;

(g) гипометилирующий агент, такой как аналоги цитидина, например, 5-азацитидин (азацитидин) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин); или

(h) ингибитор PARP (PARPi), такой как олапариб, CEP-9722, BMN-673/талазопариб, рукапариб, инипариб/SAR24-550/BSI-201, велипариб (ABT-888), нирапариб/MK-4827, BGB-290, 3-аминобензамид и E7016; (i) агент, повышающий экспрессию HER2, такой как гемцитабин и тамоксифен;

(j) ингибитор AXL-киназы (AXLi), такой как BGB324 (бемцентиниб), TP0903, гилтеритиниб (ASP2215), кабозантиниб (XL184), SGI7079, мерестиниб (Merestinib), амуватиниб (MP-470), босутиниб (SKI-606), MGCD265 и фореитиниб (GSK1363089/XL880);

(k) ингибитор BRAF (BRAFi), такой как вемурафениб, PLX4720, дабрафениб, сорафениб, энкорафениб и GDC0879; или (l) ингибитор MEK (MEKi), такой как траметиниб, кобиметиниб, биниметиниб, селуметиниб, PD-325901, CI-1040, PD035901, U0126 и TAK-733. Каждый из этих классов вторичного агента более подробно описан ниже.

Антагонисты PD1.

Рецептор запрограммированной гибели клеток 1 (PD1) представляет собой иммуноингибирующий рецептор, который экспрессируется главным образом на активированных Т- и В-клетках. Было показано, что взаимодействие с его лигандами ослабляет Т-клеточные ответы как *in vitro*, так и *in vivo*. Было показано, что блокада взаимодействия между PD1 и одним из его лигандов, PD-L1, усиливает опухолеспецифический CD8⁺ Т-клеточный иммунитет и, следовательно, может способствовать клиренсу клеток опухоли иммунной системой.

PD1 (кодируемый геном *Pdcd1*) является членом суперсемейства иммуноглобулинов, относящимся к CD28 и CTLA-4. Было показано, что PD1 отрицательно регулирует передачу сигнала антигенным рецептором после вовлечения его лигандов (PD-L1 и/или PD-L2). Была определена структура PD1 мыши, а также сокристаллическая структура PD1 мыши с PD-L1 человека (Zhang, X., et al., (2004) *Immunity* 20: 337-347; Lin, et al., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 301 1-6). PD1 и подобные члены семейства представляют собой трансмембранные гликопротеины I типа, содержащие домен Ig варибельного типа (V-типа), ответственный за связывание лигандов, и цитоплазматический концевой сегмент, ответственный за связывание сигнальных молекул. Цитоплазматический концевой сегмент PD1 содержит два сигнальных мотива на основе тирозина, ITIM (тирозинсодержащий ингибирующий мотив иммунорецептора) и ITSM (тирозинсодержащий переключающий мотив иммунорецептора).

У людей экспрессия PD1 (на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль) и/или PD-L1 (на клетках опухоли) была обнаружена в ряде образцов первичных опухолей, полученных путем биопсии, по оценке иммуногистохимическими методами. Такие ткани включают раковые опухоли легкого, печени, яичников, шейки матки, кожи, толстой кишки, глиому, рак мочевого пузыря, молочной железы, почки, пищевода, желудка, плоскоклеточный рак ротовой полости, уротелиальный рак и рак поджелудочной железы, а также опухоли головы и шеи (Brown, J. A., et al., (2003) *J Immunol.* 170: 1257-1266; Dong H., et al., (2002) *Nat. Med.* 8: 793-800; Wintterle, et al., (2003) *Cancer Res.* 63: 7462-7467; Strome, S. E., et al., (2003) *Cancer Res.* 63: 6501-6505; Thompson, R.H., et al., (2006) *Cancer Res.* 66: 3381-5; Thompson, et al., (2007) *Clin. Cancer Res.* 13: 1757-61; Nomi, T., et al., (2007) *Clin. Cancer Res.* 13: 2151-7). Удивительно, что экспрессия PD-лиганда на клетках опухоли коррелировала с неблагоприятным прогнозом у страдающих раком пациентов с различными типами опухолей (рассмотрено в Okazaki and Honjo, (2007) *Int. Immunol.* 19: 813-824).

На сегодняшний день множество исследований продемонстрировали, что взаимодействие PD1 с его лигандами (PD-L1 и PD-L2) приводит к ингибированию пролиферации лимфоцитов *in vitro* и *in vivo*. Блокада взаимодействия PD1/PD-L1 может приводить к усилению опухолеспецифического Т-клеточного иммунитета и, следовательно, способствовать клиренсу клеток опухоли иммунной системой. Для изучения этого вопроса проводили ряд исследований. Терапевтическую эффективность блокады PD1/PD-L1 продемонстрировали в модели агрессивного рака поджелудочной железы у мышей (Nomi, T., et al. (2007) *Clin. Cancer Res.* 13: 2151-2157). Введение либо PD1-, либо PD-L1-направленного антитела в значительной степени ингибировало рост опухоли. Блокада антителом эффективно способствовала инфильтрации опухолерективных CD8⁺ Т-клеток в опухоль, что приводило к повышающей регуляции противоопухолевых эффекторов, включая IFN-гамма, гранзим В и перфорин. Более того, авторы показали, что блокаду PD1 можно эффективно комбинировать с химиотерапией с обеспечением синергетического эффекта. В другом исследовании с применением модели плоскоклеточной карциномы у мышей PD1- или PD-L1-блокада антителом значительно ингибировала рост опухоли (Tsushima, F., et al., (2006) *Oral Oncol.* 12: 268-274).

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

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

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

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

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

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

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

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

- a) пембролизумаб (торговое название Китруда)
 - (i) номер CAS → 1374853-91-4 (см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
 - (ii) ссылка NCBI Pubchem → 254741536 (см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)
 - (iii) ссылка DrugBank → DB09037 (см. <https://www.drugbank.ca/>)
 - (iv) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → DPT003T46P (см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
- b) ниволумаб (торговое название Опдиво)
 - (i) номер CAS → 946414-94-4 (см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
 - (ii) ссылка DrugBank → DB09035 (см. <https://www.drugbank.ca/>)
 - c) MEDI0680 (ранее AMP-514) описанный в WO2014/055648, WO2015/042246, WO2016/127052, WO2017/004016, WO2012/145493, US8609089, WO2016/007235, WO2016/011160; Int. J. Mol. Sci. 2016 Jul;

17(7): 1151, doi: 10.3390/ijms17071151; и Drug Discov Today, 2015 Sep;20(9):1127-34. doi: 10.1016/j.drudis.2015.07.003; см. также клинические исследования NCT02271945 и NCT02013804 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

d) PDR001 (спартализумаб)

(i) номер CAS → 1935694-88-4

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → QOG25L6Z8Z

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

описанный в WO 2016/007235 и WO 2016/011160 код тезауруса NCI → C121625

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

e) камрелизумаб [INCSHR-1210] (Incyte)

(i) номер CAS → 1798286-48-2

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 73096E137E

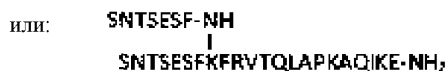
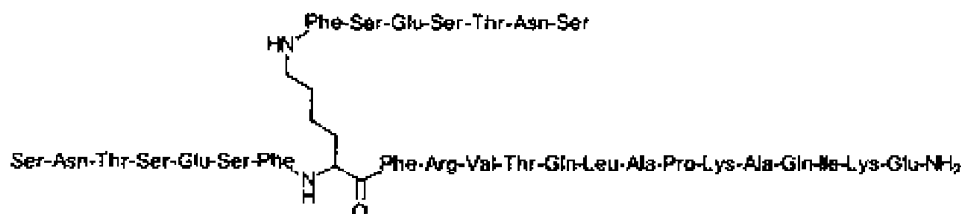
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)

f) AUNP12 (пептид) (Aurigene/PierreFabre)

(i) описанный в WO 2011/161699 как SEQ ID NO:49, также известный как "соединение 8", см. пример 2 на странице 77 публикации A2 WO 2011/161699

(ii) номер CAS → 1353563-85-5

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



g) пидилизумаб (CT-01 1)

(i) номер CAS → 1036730-42-3

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → B932PAQ1BQ

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

h) цемиплимаб (ранее REGN-2810, SAR-439684)

(i) номер CAS → 1801342-60-8

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 6QVL057INT

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

описанный в WO2016/007235

код тезауруса NCI → C121540

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

i) BGB-A317 (тислелизумаб)

(i) описанный в US 9834606 B2

(ii) см. клиническое исследование NCT03209973 (<https://clinicaltrials.gov/>)

iii. код тезауруса NCI C121775

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

j) BGB-108

см. WO2016/000619 и US8735553 k) AMP-224

см. клиническое исследование NCT02298946, <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

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

Антагонисты PD-L1.

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

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

Комбинирование ADC, который направлен на воздействие на лимфомы и лейкозы, положительные по первому белку-мишени (FTP), с ингибиторами PD-L1 является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать FTP-положительные клетки опухоли, в то время как, с другой стороны, ингибитор PD-L1 будет привлекать собственную иммунную систему пациента к уничтожению раковых клеток.

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

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

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

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

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

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

- a) атезолизумаб (MPDL3280A, торговое название Тецентрик)
 - i) номер CAS → 1380723-44-3
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
 - ii) ссылка DrugBank → DB11595
(см. <https://www.drugbank.ca/>)
 - iii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 52CMI0WC3Y
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)
- b) BMS-936559/MDX-1105

I. номер CAS → 1422185-22-5

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

II. см. клиническое исследование NCT02028403,

<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

III. см. в WO2007/005874 последовательности антител, в частности:

i) антитело, содержащее:

(a) VH CDR1 = DYGFS

(b) VH CDR2 = WITAYNGNTNYAQKLQG

(c) VH CDR3 = DYFYGMADV

(d) VL CDR1 = RASQSVSSYL

(e) VL CDR2 = DASNRAT

(f) VL CDR3 = QQRSNWPR

ii) антитело, содержащее:

(a) VH CDR1 = TYAIS

(b) VH CDR2 = GIPIFGKAHYAQKFQG

(c) VH CDR3 = KFHFVSGSPFGMDV

(d) VL CDR1 = RASQSVSSYLA

(e) VL CDR2 = DASNRAT

(f) VL CDR3 = QQRSNWPT

iii) антитело, содержащее:

(a) VH CDR1 = SYDVH

(b) VH CDR2 = WLHADTGITKFSQKFQG

(c) VH CDR3 = ERIQLWFDY

(d) VL CDR1 = RASQGISSWLA

(e) VL CDR2 = AASSLQS

(f) VL CDR3 = QQYNSYPYT

c) дурвалумаб/MEDI4736

i) номер CAS → 1428935-60-7

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

ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 28X28X9OKV

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

[UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm](http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm))

iii) VH-последовательность

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWV

ANIKQDQSEKYYVDVSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA

REGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSS

iv) VL-последовательность

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAQYQKPGQAPRLLIYD

ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLPWTFGGG

TKVEIK

d) авелумаб/MSB0010718C

i) номер CAS → 1537032-82-8

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

ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → KXG2PJ55II

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

[UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm](http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm))

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

Агонисты GITR.

В настоящем описании термин "глюкокортикоид-индуцированный рецептор TNF" (сокращенно обозначаемый в настоящем описании "GITR"), также известный как суперсемейство рецепторов TNF 18 (TNFRSF18, CD357), TEASR и 312C2, относится к члену семейства рецепторов фактора некроза опухоли/фактора роста нервов. GITR представляет собой трансмембранный белок I типа из 241 аминокислоты, характеризующийся тремя цистеиновыми псевдоповторами во внеклеточном домене, и специфично защищает от апоптоза, индуцируемого T-клеточными рецепторами, хотя он не защищает клетки от других апоптотических сигналов, включая запуск Fas, обработку дексаметазоном или УФ облучение (Nocentini, G.,

et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6216-622).

Активация GITR повышает резистентность к опухолям и вирусным инфекциям, вовлечена в ауто-иммунные/воспалительные процессы и регулирует экстравазацию лейкоцитов (Nocentini выше; Cuzzocrea, et al. (2004) J Leukoc. Biol. 76:933-940; Shevach, et al. (2006) Nat. Rev. Immunol. 6:613-618; Cuzzocrea, et al. (2006) J Immunol. 177:631-641; и Cuzzocrea, et al. (2007) FASEB J 21:II7-II29). В моделях опухолей у мышей антитело-агонист GITR, DTA-I, комбинировали с антителом-антагонистом CTLA-4 и оно демонстрировало синергетические эффекты в отношении полной регрессии опухоли в случае опухолей на поздней стадии у некоторых мышей тестируемой группы (Ko, et al. (2005) J Exp. Med. 7:885-891).

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

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

Для исследования степени повышения, например, активности GITR пробы или образцы, содержащие конкретный, например, белок, ген, клетку или организм, обрабатывают потенциальным активирующим или ингибирующим агентом и сравнивают с контрольными образцами, обработанными неактивной контрольной молекулой. Контрольным образцам присваивают относительное значение активности, равное 100%.

Ингибирования достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 90% или меньше, как правило 85% или меньше, обычно 80% или меньше, чаще 75% или меньше, как правило 70% или меньше, чаще 65% или меньше, чаще всего 60% или меньше, как правило 55% или меньше, обычно 50% или меньше, чаще 45% или меньше, чаще всего 40% или меньше, предпочтительно 35% или меньше, более предпочтительно 30% или меньше, еще более предпочтительно 25% или меньше и наиболее предпочтительно меньше 20%. Активации достигают, когда значение активности относительно контроля составляет примерно 110%, обычно по меньшей мере 120%, чаще по меньшей мере 140%, чаще по меньшей мере 160%, часто по меньшей мере 180%, чаще по меньшей мере в 2 раза выше, чаще всего по меньшей мере в 2,5 раза выше, обычно по меньшей мере в 5 раз выше, чаще по меньшей мере в 10 раз выше, предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз выше и наиболее предпочтительно более чем в 40 раз выше.

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

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

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

- a) MEDI1873, гибридный белок лиганда GITR, разработанный MedImmune см. WO 2016/196792, US 20160304607 код тезауруса NCI → C124651 (см. <https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser>) см. также клиническое исследование NCT023126110 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> см. Tigue NJ, Bamber L, Andrews J, et al. MEDI1873, a potent, stabilized hexameric agonist of human GITR with regulatory T-cell targeting potential. Oncoimmunology. 2017; 6(3):e1280645.doi:10.1080/2162402X.2017.1280645.
- b) INCAGN1876, представляет собой антитело-агонист, направленно действующее на глюкокортикоид-индуцированный TNFR-родственный белок или GITR. Открыт во время сотрудничества с Ludwig Cancer Research. INCAGN1876 разрабатывается совместно с Incyte, см. клинические исследования NCT02583165 и NCT03277352 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
- c) TRX518, гуманизированное агликозилированное (Fc "отключен") IgG1 mAb анти-GITR с иммуномодулирующей активностью, разработанное Leap Therapeutics

см. в WO 2006/105021 последовательности 58, 60-63; и в EP2175884 последовательности 1-7:
VL, содержащий последовательность (CDR подчеркнута):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTNVAWYQKPGQ

APRLLIYSASRYSGIPARFSGSGSTEFTLTISLQSEDF

VYYCQYNTDPLTFGGGKVEIK

VH, содержащий последовательность (CDR подчеркнута):

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPG

KALEWLAHIWWDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTN

MDPVDATYYCARTRRYFPFAYWGQGLVTVS

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPG

KALEWLAHIWWDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTN

MDPVDATYYCARTRRYFPFAYWGQGLVTVS

см. клинические исследования NCT01239134 и NCT02628574 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

код тезауруса NCI → C95023

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

d) GWN323, агонистическое моноклональное антитело анти-GITR, которое активирует GITR, обнаруживаемые на Т-клетках нескольких видов. GWN323 разработано Novartis

см. WO 2016/196792

код тезауруса NCI → C128028

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

см. клиническое исследование NCT02740270 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

e) МК-1248, гуманизированное агонистическое моноклональное антитело (MoAb) IgG4 к глюкокортикоид-индуцированному рецептору фактора некроза опухоли (GITR) человека со значительно сниженной эффекторной функцией

см. клиническое исследование NCT02553499 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

МК-1248 содержит такую же CDR, что и МК4166 (см. Sukumar et al., Cancer Res. 2017)

f) МК-4166, гуманизированное агонистическое моноклональное антитело (MoAb) IgG1 к глюкокортикоид-индуцированному рецептору фактора некроза опухоли (GITR) человека с потенциальной иммуномодулирующей активностью (см. Sukumar et al., Cancer Res. 2017)

см. клиническое исследование NCT02132754 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

см. Sukumar, et al., (2017), Cancer Research. 77. canres.1439.2016. 10.1158/0008-5472.CAN-16-1439.

код тезауруса NCI C116065

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

g) BMS-986156, агонистическое моноклональное антитело к глюкокортикоид-индуцированному рецептору фактора некроза опухоли (GITR; член 18 супер семейства факторов некроза опухоли; TNFRSF18; CD357) человека

см. клиническое исследование NCT02598960 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

код тезауруса NCI C132267

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

Последовательности антител-агонистов анти-GITR представлены в WO 2011/028683 и WO 2006/105021.

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

Агонисты OX40.

OX40 (CD134; TNFRSF4) является членом суперсемейства TNFR и экспрессируется CD4 и CD8 Т-клетками во время антигенспецифического примирования. Экспрессия OX40 является в значительной степени временной после перекрестного сшивания TCR/CD3 и происходит в ответ на присутствие воспалительных цитокинов. В отсутствие активирующих сигналов относительно малое число субпопуляций зрелых Т-клеток экспрессируют OX40 на биологически значимых уровнях. Для вырабатывания оптимальных ответов "киллерных" CD8 Т-клеток необходима активация Т-клеточных рецепторов плюс ко-стимуляция, которая может быть обеспечена путем лигирования OX40 с применением агониста OX40. Этот активирующий механизм усиливает дифференцировку и цитолитическую функцию Т-клеток, что приводит к усилению противоопухолевого иммунитета. Соответственно, будет благоприятным направ-

ленно воздействовать на FTP(+) опухоль конъюгатом ADC, вызывая гибель антигенных клеток, в то время как агонист OX40 индуцирует более сильный продолжительный иммунный ответ.

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

В некоторых вариантах реализации агонист связывания OX40 представляет собой фрагмент агониста OX40L, содержащий один или более внеклеточных доменов OX40L. В некоторых вариантах реализации агонист связывания OX40 представляет собой антитело-агонист OX40, связывающее OX40 человека. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 истощает клетки, которые экспрессируют OX40 человека. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 истощает клетки, которые экспрессируют OX40 человека, *in vitro*. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой CD4+ эффекторные Т-клетки. В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой Трег-клетки. В некоторых вариантах реализации истощение происходит посредством антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) и/или фагоцитоза. В некоторых вариантах реализации истощение происходит посредством АЗКЦ. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 связывает OX40 с аффинностью меньше или равной примерно 1 нМ. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 усиливает пролиферацию CD4+ эффекторных Т-клеток и/или повышает выработку цитокинов CD4+ эффекторными Т-клетками по сравнению с пролиферацией и/или выработкой цитокинов до лечения антителом-агонистом OX40 человека. В некоторых вариантах реализации цитокин представляет собой гамма-интерферон. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 усиливает пролиферацию Т-клеток памяти и/или повышает выработку цитокинов Т-клеткой памяти. В некоторых вариантах реализации цитокин представляет собой гамма-интерферон. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 ингибирует функцию Трег. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 ингибирует Трег-супрессию функции эффекторных Т-клеток. В некоторых вариантах реализации функция эффекторных Т-клеток представляет собой пролиферацию эффекторных Т-клеток и/или выработку цитокинов. В некоторых вариантах реализации эффекторная Т-клетка представляет собой CD4+ эффекторную Т-клетку. В некоторых вариантах реализации антитело-агонист OX40 увеличивает передачу сигнала OX40 в клетке-мишени, экспрессирующей OX40. В некоторых вариантах реализации передачу сигнала OX40 детектируют путем мониторинга нисходящей передачи сигнала NFκB.

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

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

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

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

- а) MEDI0562 (также известный как таволиксизумаб, таволимаб)
- (а) номер CAS → 1635395-25-3
- (см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/fags>)

(b) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 4LU9B48U4D
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)

см. клиническое исследование NCT02318394 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
описанный в WO 2015/095423, WO 2015/153514, WO 2016/073380 и WO 2016/081384

код тезауруса NCI → C120041

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

Последовательность тяжелой цепи:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEIYIGY
ISYNGITYHNPSLKSRTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYD
YDGGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Последовательность легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYT
SKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFN RGEC

b) MEDI6383 (эфизонеримод альфа (Efizonerimod alfa))

(a) номер CAS → 1635395-27-5

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

(b) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 1MH7C2X8KE

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

см. клиническое исследование NCT02221960 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
описанный в WO 2015/095423, WO 2016/081384 и WO 2016/189124

код тезауруса NCI → C118282

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

Аминокислотная последовательность (Seq ID no.17 из WO2016/189124):

ESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLGLKDKQDKIEALSSKVQQLERSIGLKDAMADLEQ
KVLEMEASTQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVII
NCDGFYLLSLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKD
KVYVLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL

c) MOXR0916 (также известный как RG7888, погализумаб (PogalizumAb)), гуманизированное моноклональное антитело анти-OX40

a) номер CAS → 1638935-72-4

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

b) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → C78148TF1D

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

c) код тезауруса NCI → C121376

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

d) OX40mAb24(9B12)

a) OX40mAb24 представляет собой гуманизированный вариант 9B12. 9B12 представляет собой mAb

IgG1 анти-OX40 мыши, направленное против внеклеточного домена OX40 человека (CD134) (Weinberg, A.D., et al. J Immunother 29, 575-585 (2006)).

b) см. в WO2016/057667 Seq ID no.59 для VH-последовательности OX40mAb24, no.29 для VL-последовательности (no.32 представляет собой альтернативный VL):

VH-последовательность

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYIG
YISYNGITYHNPSLKSRLTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKY
DYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS

VL-последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYT
SKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGT
KVEIK

e) INCAGN1949

a) см. Gonzalez et al. 2016, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-3204

b) см. клиническое исследование NCT02923349 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

c) последовательности антител описаны в WO2016/179517 A1:

(i) в частности, антитело, содержащее последовательности:

VH CDR1 → GSAMH

VH CDR2 → RIRSKANSYATAYAASVKG VH CDR3 → GIYDSSGYDY VL CDR1 →
RSSQSLLHNSNGYNYLD VL CDR2 → LGSNRAS VL CDR3 → MQALQTPLT

(ii) например, антитело, содержащее последовательности:

VH →

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSGSAMHWVRQASGKG
LEWVGRIRSKANSYATAYAASVKGFRFTISRDDSKNTAYLQMNSLK
TEDTAVYYCTSGIYDSSGYDYWGQGLTVTVSS

VL →

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHNSNGYNYLDWYLQKPG
QSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY
CMQALQTPLTFGGGTKVEIK

g) GSK3174998, гуманизированное агонистическое IgG1 моноклональное антитело (mAb) анти-OX40
см. клиническое исследование NCT02528357 на <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

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

см. патент WO 2017/130076 A1

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

код тезауруса NCI → C121927

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

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

Антагонист CTLA.

CTLA4 (CD152) экспрессируется на активированных Т-клетках и служит в качестве коингибитора для контроля Т-клеточных ответов после CD28-опосредованной активации Т-клеток. Полагают, что CTLA4 регулирует амплитуду ранней активации наивных Т-клеток и Т-клеток памяти после вовлечения TCR и является частью центрального ингибиторного пути, который отрицательно влияет как на противоопухолевый иммунитет, так и на аутоиммунитет. CTLA4 экспрессируется исключительно на Т-клетках, и экспрессия его лигандов CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2) сильно ограничена антигенпредставляющими клетками, Т-клетками и другими опосредующими иммунитет клетками. Существуют данные о том, что антагонистические антитела анти-CTLA4, которые блокируют путь передачи сигнала CTLA4, усиливают активацию Т-клеток. Одно из таких антител, ипилимумаб, было одобрено FDA в 2011 году для лечения метастатической меланомы. Другое антитело анти-CTLA4, тремелимуаb, тестировали в исследованиях III фазы для лечения меланомы на поздней стадии, но оно значительно не увеличивало общую выживаемость пациентов по сравнению со стандартом лечения (темозоломид или дакарбазин) в то время.

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

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

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

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

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

a) ипилимумаб

(i) номер CAS → 477202-00-9

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

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

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

b) тремелиумаб

(i) номер CAS → 745013-59-6

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → QEN1X95CIX

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

(iii) VH-последовательность

GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSN

KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLY

YYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG

CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH [SEQ ID NO. 1]

(iv) VL-последовательность

PSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAAASSLQSGV

PSRFGSGSGTDFLTTISSLQPEDFATYYCQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTV

AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKV [SEQ ID NO. 2]

В некоторых вариантах реализации полипептид CTLA соответствует номеру доступа Genbank

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

Флударабин и цитарабин.

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

Флударабин.

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

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

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

Номер CAS → 21679-14-1

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

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 657237

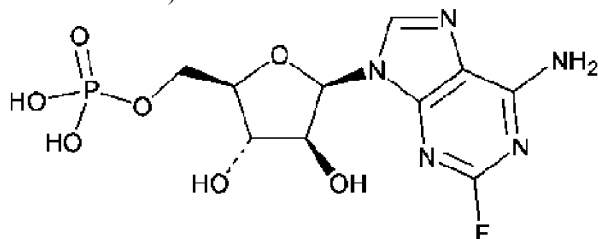
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

(iii) ссылка IUPHAR/BPS → 4802

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

(iv) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 1X9VK9O1SC

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



Формула I, флударабин: [(2R,3R,4S,5R)-5-(6-амино-2-фтор-пурин-9-ил)-3,4-дигидроксиоксолан-2-ил]метоксифосфоновая кислота.

Цитарабин.

Цитарабин или цитозинарабинозид (Цитозар-У или Депоцит) представляет собой антиметаболиче-

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

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

Для демонстрации того, что ADC действует синергетически с цитарабином панель линий FTP(+) клеток совместно обрабатывают диапазоном концентраций как ADC, так и цитарабина. В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток совместно обрабатывают диапазоном концентраций цитарабина и не направленного контрольного ADC или диапазоном концентраций ADC и носителя. После инкубации измеряют два параметра: количество поверхностного FTP (определяемое путем проточной цитометрии) и цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов CellTiter-Glo® или MTS). Цитотоксическую синергию рассчитывают путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса с использованием программы анализа CalcuSyn (см. пример 4).

Номер CAS → 147-94-4

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

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 6253

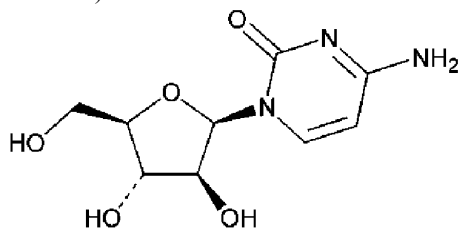
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

(iii) ссылка IUPHAR/BPS → 4827

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

(iv) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 04079A1RDZ

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



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

Гипометилирующий агент.

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

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

меньшей мере в 2,5 раза выше, обычно по меньшей мере в 5 раз выше, чаще по меньшей мере в 10 раз выше, предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз выше и наиболее предпочтительно более чем в 40 раз выше.

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

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

а) 5-азацитидин (азацитидин)

(i) номер CAS → 320-67-2

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

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 9444

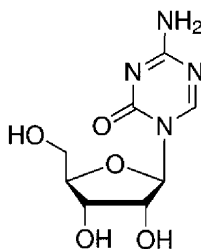
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

(iii) ссылка IUPHAR/BPS → 6796

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

(iv) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → M801H13NRU

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



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

б) 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин)

(i) номер CAS → 2353-33-5

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

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 451668

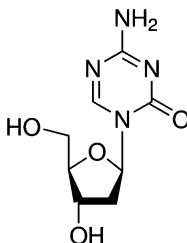
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

(iii) ссылка IUPHAR/BPS → 6805

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

(iv) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 776B62CQ27

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



Формула IV, б) 5-аза-2'-дезоксцитидин: 4-амино-1-(2-деокси-β-D-эритро-пентофуранозил)-1,3,5-триазин-2(1H)-он.

Ингибиторы PARP.

Поли(аденозиндифосфат [АДФ])рибоза-полимераза (PARP) представляет собой семейство ферментов, вовлеченных в широкий спектр клеточных функций, включая транскрипцию ДНК, ответ на повреждение ДНК, поддержание геномной стабильности, регуляцию клеточного цикла и гибель клеток. PARP-1 является наиболее распространенным и лучше всего описанным белком этой группы. Его неотъемлемая роль в репарации одноцепочечных разрывов ДНК (SSB) через путь эксцизионной репарации оснований (BER) была в центре повышенного внимания в онкологии и было разработано несколько ингибиторов PARP-1 (PARPi) (включая, но не ограничиваясь ими, олапариб, CEP-9722, талазопариб, рукапариб, ини-

париб, велипариб и нирапариб) и их тестируют клинически. В противораковой терапии PARPi действуют преимущественно путем предотвращения репарации повреждения ДНК, что в конечном счете вызывает гибель клеток.

PARP состоит из четырех представляющих интерес доменов: ДНК-связывающего домена, расщепляемого каспазой домена, домена аутомодификации и каталитического домена. ДНК-связывающий домен состоит из двух мотивов "цинковые пальцы". В присутствии поврежденной ДНК (с эксцизией пар оснований) ДНК-связывающий домен будет связывать ДНК и индуцировать конформационный сдвиг. Было показано, что это связывание происходит независимо от других доменов. Это является неотъемлемой частью модели запрограммированной гибели клеток, основанной на ингибировании PARP путем расщепления каспазой. Домен аутомодификации ответственен за освобождение белка от ДНК после катализа. Он также играет неотъемлемую роль в инактивации, индуцируемой расщеплением.

PARP находится в ядре клетки. Его главная роль заключается в обнаружении и иницировании немедленного клеточного ответа на метаболические, химические или индуцированные радиацией одноцепочечные разрывы ДНК (SSB) путем передачи сигнала ферментативному механизму, вовлеченному в репарацию SSB. Как только PARP обнаруживает SSB, она связывается с ДНК, претерпевает структурное изменение и начинает синтез цепи полимерной аденозиндифосфатрибозы (поли(АДФ-рибозы) или PAR), которая служит сигналом для других ферментов репарации ДНК. Ферменты-мишени включают ДНК-лигазу III (LigIII), ДНК-полимеразу бета ($\text{pol}\beta$) и каркасные белки, такие как рентгеновский кросс-комплементирующий ген 1 (XRCC1). После репарации цепи PAR распадаются под действием поли(АДФ-рибоза)гликогидролазы (PARG).

Для образования мономеров АДФ-рибозы необходим НАД⁺ в качестве субстрата. Полагали, что сверхактивация PARP может истощать запасы клеточного НАД⁺ и индуцировать прогрессирующее истощение АТФ и некротическую гибель клеток, поскольку ингибируется окисление глюкозы. Но недавно было высказано предположение, что ингибирование активности гексокиназы приводит к дефектам гликолиза. (см. AndrAbi, PNAS 2014). Следует отметить, что PARP инактивируется в результате расщепления каспазой-3 во время запрограммированной гибели клеток.

Ферменты PARP необходимы для ряда клеточных функций, включая экспрессию воспалительных генов: PARP1 необходим для индукции экспрессии гена ICAM-1 гладкомышечными клетками в ответ на TNF.

PBD представляют собой класс встречающихся в природе противоопухолевых антибиотиков, обнаруживаемых в *Streptomyces*. Димеры PBD проявляют свой цитотоксический механизм действия путем перекрестного сшивания двух цепей ДНК, что приводит к блокаде репликации и гибели клеток опухоли. Важно, что перекрестные связи, образуемые димерами PBD, относительно не деформируют структуру ДНК, что скрывает их от механизмов репарации ДНК, которые часто нарушены в опухолях человека в отличие от здоровых тканей.

Комбинирование ADC на основе PBD с PARPi (включая, но не ограничиваясь ими, олапариб, CEP-9722, талазопариб, рукапариб, инипариб, велипариб и нирапариб) является предпочтительным, поскольку ингибирование PARP блокирует репарацию ДНК, поврежденной димерами PBD, что таким образом приводит к накоплению повреждений ДНК, ведущих к гибели раковой клетки.

Для демонстрации того, что обработка линий клеток, полученных из солидных опухолей, конъюгатами ADC на основе PBD и PARPi оказывает аддитивный или синергетический противоопухолевый эффект, панель линий клеток, полученных из солидных опухолей, обрабатывают диапазоном концентраций каждого из ADC и PARPi. После инкубации измеряют цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов CellTiter-Glo® или MTS). Цитотоксическую синергию рассчитывают путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса с использованием программы анализа CalcuSyn.

Термин "ингибитор PARP" означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая снижает активность PARP.

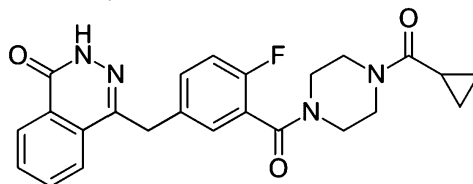
Для исследования степени ингибирования, например, активности PARP пробы или образцы, содержащие конкретный, например, белок, ген, клетку или организм, обрабатывают потенциальным активирующим или ингибирующим агентом и сравнивают с контрольными образцами, обработанными неактивной контрольной молекулой.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

Конкретные PARPi, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают:

а) олапариб

(i) номер CAS → 763113-22-0

(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
 (ii) ссылка NCBI Pubchem → 23725625
 (см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)
 (iii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → WOH1JD9AR8
 (см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)

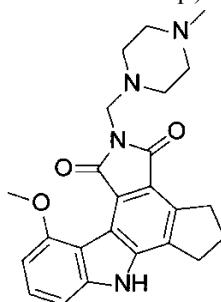


Формула V, олапариб: 4-[(3-[(4-циклопропилкарбонил)пиперазин-1-ил]карбонил)-4-фторфенил]метил(2H)фталазин-1-он.

b) CEP-9722.

(i) номер CAS → 916574-83-9

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



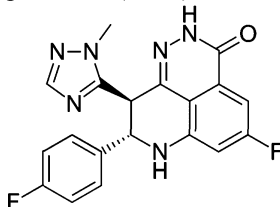
Формула VI, CEP-9722: 11-метокси-2-((4-метилпиперазин-1-ил)метил)-4,5,6,7-тетрагидро-1H-циклопента[а]пирроло[3,4-с]карбазол-1,3(2H)-дион.

c) BMN-673/талазопариб

(i) номер CAS → 1207456-01-6

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 9QHX048FRV



Формула VII, талазопариб: (8S,9R)-5-фтор-8-(4-фторфенил)-9-(1-метил-1H-1,2,4-триазол-5-ил)-2,7,8,9-тетрагидро-3H-пиrido[4,3,2-de]фталазин-3-он.

d) рукапариб

(i) номер CAS → 283173-50-2

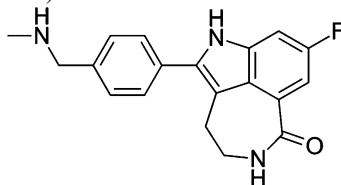
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 9931954

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

(iii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 8237F3U7EH

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



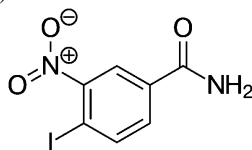
Формула VIII, рукапариб: 8-фтор-2-{4-[(метиламино)метил]фенил}-1,3,4,5-тетрагидро-6H-азепино[5,4,3-cd]индол-6-он.

e) инипариб/SAR24-550/BSI-201

(i) номер CAS → 160003-66-7

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

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 9796068
 (см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)
 (iii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 2ZW17KHK8F
 (см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)



Формула IX, инипариб: 4-йод-3-нитробензамид

f) велипариб (ABT-888)

(i) номер CAS → 912444-00-9

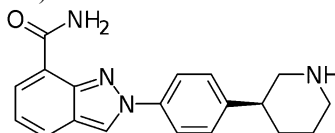
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 11960529

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

(iii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 01O4K0631N

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



Формула X, велипариб: 2-((R)-2-метилпирролидин-2-ил)-1H-бензимидазол-4-карбоксамид

g) нирапариб/МК-4827

(i) номер CAS → 1038915-60-4

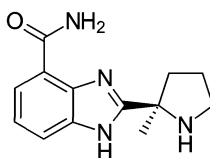
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 24958200

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

(iii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → HMC2H89N35

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



Формула XI, нирапариб: 2-[4-[(3S)-3-пиперидил]фенил]индазол-7-карбоксамид.

h) BGB-290

(i) номер CAS → 1820833-75-7

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

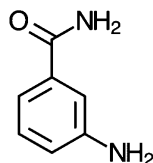
i) 3-аминобензамид

(i) номер CAS → 3544-24-9

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

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 1645

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

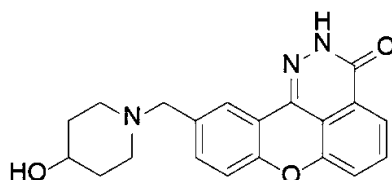


Формула XII: 3-аминобензамид.

j) E7016

(i) номер CAS → 902128-92-1

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



Формула XIII, E706: бензопирано(4,3,2-de)фталазин-3(2H)-он, 10-((4-гидрокси-1-пиперидинил)метил).

В некоторых вариантах реализации полипептид PARP представляет собой PARP1, который соответствует номеру доступа Genbank AAA60137, номер версии AAA60137.1, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 08:48 AM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид PARP1, соответствует номеру доступа Genbank M18112, номер версии M18112.1, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 08:48 AM. В некоторых вариантах реализации полипептид PARP1 соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot P09874.

Агенты, повышающие экспрессию HER2.

Термин "агент, повышающий экспрессию HER2" означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая увеличивает количество белка HER2 на поверхности клеток опухоли.

Для исследования степени увеличения пробы или образцы, содержащие конкретный, например, белок, ген, клетку или организм, обрабатывают потенциальным активирующим агентом и сравнивают с контрольными образцами, обработанными неактивной контрольной молекулой. Контрольным образцам присваивают относительное значение экспрессии, равное 100%. Активации достигают, когда значение экспрессии относительно контроля составляет примерно 110%, обычно по меньшей мере 120%, чаще по меньшей мере 140%, чаще по меньшей мере 160%, часто по меньшей мере 180%, чаще по меньшей мере в 2 раза выше, чаще всего по меньшей мере в 2,5 раза выше, обычно по меньшей мере в 5 раз выше, чаще по меньшей мере в 10 раз выше, предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 40 раз выше и наиболее предпочтительно более чем в 40 раз выше.

Конкретные агенты, повышающие экспрессию HER2, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

а) гемцитабин

(i) номер CAS → 95058-81-4

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

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 60750

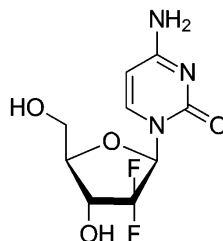
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

(iii) ссылка DrugBank → DB00441

(см. <https://www.drugbank.ca/>)

(iv) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → B76N6SBZ8R

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



Формула XIV, гемцитабин: 4-амино-1-(2-дезоксидифтор-β-D-эритро-пентофуранозил)пиримидин-2(1H)-он.

б) тамоксифен

(i) номер CAS → 10540-29-1

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

(ii) ссылка NCBI Pubchem → 2733526

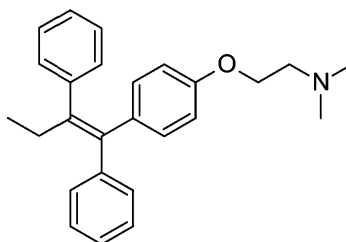
(см. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

(iii) ссылка DrugBank → DB00675

(см. <https://www.drugbank.ca/>)

(iv) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 094ZI81Y45

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



Формула XV, тамоксифен: (Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)фенокси]-N,N-диметилэтанамин.

Гемцитабин является предпочтительным агентом, который повышал экспрессию HER2.

AXLi.

Вторичный агент, описанный в настоящем документе, может представлять собой ингибитор AXL.

Термин "ингибитор AXL" означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая уменьшает передачу сигнала AXL.

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

Было показано, что ингибирование AXL, например, AXL-ингибиторами TP0903 и BGB324 снижает экспрессию генов репарации ДНК и снижает эффективность механизма репарации путем гомологичной рекомбинации. Следовательно, ингибирование AXL обуславливало состояние дефицита репарации путем гомологичной рекомбинации (HR) в клетках, что делало их чувствительными к агентам, повреждающим ДНК.

Комбинирование ADC с AXLi, включая, но не ограничиваясь ими, BGB324 и TP0903, является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет индуцировать повреждение ДНК в AXL-положительных линиях раковых клеток, в то время как, с другой стороны, лечение AXLi будет снижать эффективность механизма репарации путем гомологичной рекомбинации, что делает клетки более чувствительными к повреждению ДНК, индуцированному димерами PBD, что таким образом приводит к накоплению повреждений ДНК, ведущих к гибели раковых клеток.

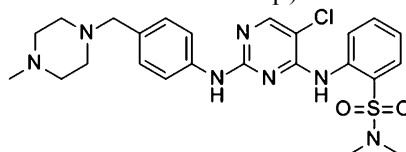
Для демонстрации того, что совместная обработка AXL-положительных линий раковых клеток конъюгатом ADC и AXLi (включая, но не ограничиваясь ими, BGB324 и TP0903) оказывает аддитивный или синергетический противоопухолевый эффект, панель линий клеток, включая, но не ограничиваясь ими, MDA-MB-157 и SKLU1, совместно обрабатывают диапазоном концентраций как ADC, так и AXLi, BGB324 или TP-093. После инкубации измеряют цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов CellTiter-Glo® или MTS).

Конкретные ингибиторы AXL, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

c) TP0903

(i) номер CAS → 1341200-45-0

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



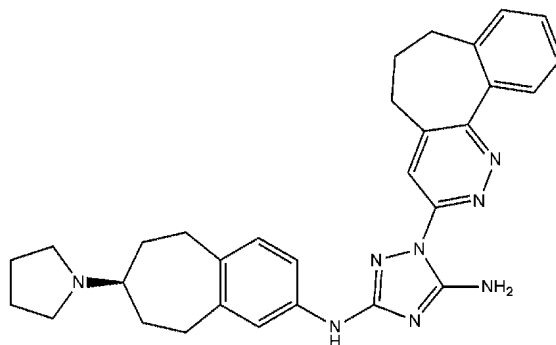
Формула XVI: 2-((5-хлор-2-((4-((4-метилпиперазин-1-ил)метил)фенил)амино)пиримидин-4-ил)амино)-N,N-диметилбензолсульфонамид [TP0903].

d) BGB324

(i) номер CAS → 1037624-75-1

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 0ICW2LX8AS
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)

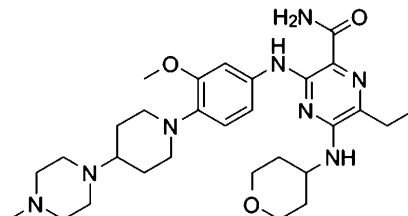


Формула XVII: 1-(6,7-дигидро-5Н-бензо[2,3]циклогепта[2,4-d]пиридазин-3-ил)-3-N-[(7S)-7-пирролидин-1-ил-6,7,8,9-тетрагидро-5Н-бензо[7]аннулен-3-ил]-1,2,4-триазол-3,5-диамин [BGB324].

е) гилтеритиниб (ASP2215)

(i) номер CAS → 1254053-43-4

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



Формула XVIII: 6-этил-3-((3-метокси-4-(4-(4-метилпиперазин-1-ил)пиперидин-1-ил)фенил)амино)-5-((тетрагидро-2Н-пиран-4-ил)амино)пиазин-2-карбоксамид [гилтеритиниб].

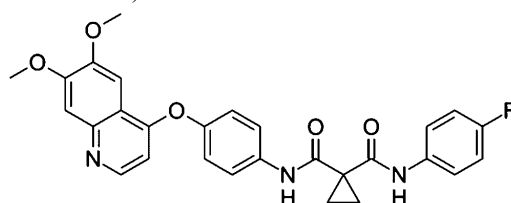
ф) кабозантиниб

(i) номер CAS → 849217-68-1

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 1C39JW444G

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

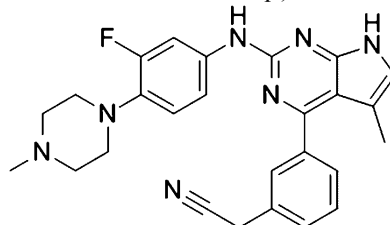


Формула XIX: N-(4-((6,7-диметоксихинолин-4-ил)окси)фенил)-N'-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксамид [кабозантиниб].

g) SGI7079

(i) номер CAS → 1239875-86-5

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

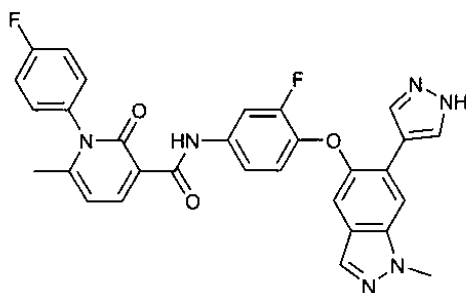


Формула XX: 2-(3-(2-((3-фтор-4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил)амино)-5-метил-7Н-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)фенил)ацетонитрил [SGI7079].

h) мерестиниб.

(i) номер CAS → 1206799-15-6

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



Формула XXI: N-(3-фтор-4-{[1-метил-6-(1H-пиразол-4-ил)-1H-индазол-5-ил]окси}фенил)-1-(4-фторфенил)-6-метил-2-оксо-1,2-дигидропиридин-3-карбоксамид [мерестиниб].

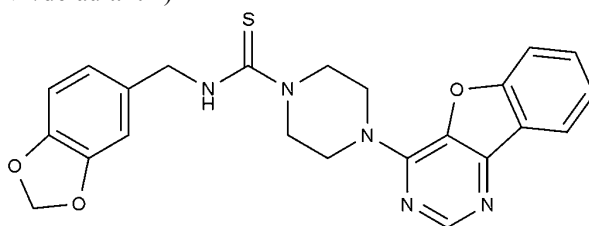
i) амуватиноб (MP-470)

(i) номер CAS → 850879-09-3

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → SO9S6QZB4R

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



Формула XXII: N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-4-([1]бензофуоро[3,2-d]пиримидин-4-ил)пиперазин-1-карботиоамид [амуватиноб].

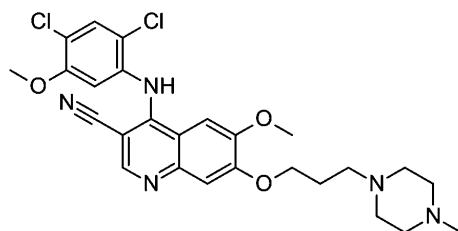
j) босутиниб (SKI-606)

(i) номер CAS → 380843-75-4

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 5018V4AEZ0

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



Формула XXIII: 4-[(2,4-дихлор-5-метоксифенил)амино]-6-метокси-7-[3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропокси]хинолин-3-карбонитрил [босутиниб].

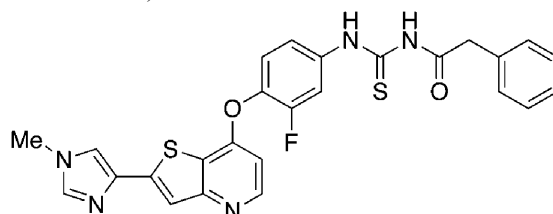
k) MGCD265

(i) номер CAS → 875337-44-3

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 93M6577H9D

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



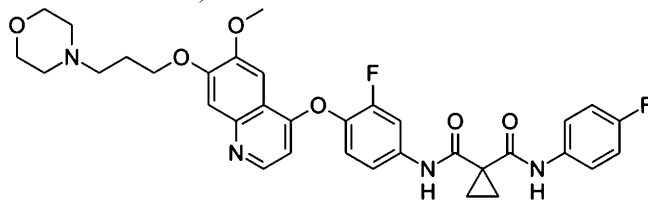
Формула XXIV: N-(3-фтор-4-(2-(1-метил-1H-имидазол-4-ил)тиено(3,2-b)пиридин-7-ил)окси)фенил-карбамотиоил-2-фенилацетамид [MGCD265].

l) форетиниб (GSK1363089/XL880)

(i) номер CAS → 849217-64-7

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 81FH7VK1C4
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)



Формула XXV: N1'-[3-фтор-4-[[6-метокси-7-(3-морфолинопропокси)-4-хинолил]окси]фенил]-N1-(4-фторфенил)циклопропан-1,1-дикарбоксимид [форетиниб].

BRAFⁱ.

Вторичный агент, описанный в настоящем документе, может представлять собой ингибитор BRAF.

Термин "ингибитор BRAF" означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая снижает активность BRAF.

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

B-Raf (BRAF) является членом семейства Raf-киназ протеинкиназ передачи сигнала роста. Этот белок играет роль в регуляции сигнального пути MAP-киназы/ERK, который влияет на деление, дифференцировку и секрецию клеток.

B-Raf представляет собой серин/треонин-специфичную протеинкиназу. Соответственно, он катализирует фосфорилирование остатков серина и треонина в консенсусной последовательности на белках-мишенях с помощью АТФ с образованием АДФ и фосфорилированного белка в качестве продуктов. Поскольку он представляет собой высокорегулируемую киназу передачи сигнала, перед активацией в качестве фермента B-Raf должен сначала связать Ras-GTP. После активации B-Raf консервативный каталитический центр протеинкиназы фосфорилирует белковые субстраты, способствуя нуклеофильной атаке активированного атома гидроксильного кислорода серина или треонина в субстрате на у-фосфатную группу АТФ посредством бимолекулярного нуклеофильного замещения.

Мутации в BRAF были обнаружены в раковых опухолях, включая неходжкинскую лимфому, рак толстой и прямой кишки, злокачественную меланому, папиллярную карциному щитовидной железы, немелкоклеточную карциному легкого, аденокарциному легкого, опухоли головного мозга, в том числе глиобластому и пилоцитарные астроцитомы, а также воспалительные заболевания, такие как болезнь Эрдгейма-Честера. Мутация может приводить к неконтролируемому росту, особенно при меланоме. Например, известно, что мутация V600E в B-Raf управляет пролиферацией клеток в мутированном гене меланомы. Такие мутации делают мутантный ген BRAF конститутивно активным, управляющим пролиферацией меланомы. Путем ингибирования мутированного B-Raf блокируют пролиферацию клеток и индуцируют апоптоз (контролируемую гибель клеток).

Примерами таких потенциальных комбинаций являются ингибиторы BRAF, такие как вемурафениб и дабрафениб. Эти ингибиторы BRAF непосредственно ингибируют белок B-Raf.

Комбинирование ADC, который направленное воздействует на AXL-положительные опухоли, с BRAFⁱ является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать AXL-положительные клетки опухоли по механизмам, зависящим от перекрестного сшивания ДНК и приводящим к апоптозу, в то время как, с другой стороны, BRAFⁱ будет нарушать пролиферацию клеток путем ингибирования BRAF.

Для демонстрации того, что ADC действует синергетически с BRAFⁱ, панель AXL (+) линий клеток, включая, но не ограничиваясь ими, клетки MDA-MB231, NCI-H1299 и SNU12, совместно обрабатывают диапазоном концентраций как ADC, так и BRAFⁱ. В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток совместно обрабатывают диапазоном концентраций MEKⁱ или диапазоном концентраций

ADC и носителя. После инкубации измеряют цитотоксичность комбинаций *in vitro* путем анализа MTS. Для определения цитотоксичности жизнеспособность клеток измеряют путем добавления MTS в каждую лунку и инкубации в течение 4 часов при 37°C. Процент жизнеспособности клеток рассчитывают по сравнению с необработанным контролем. Цитотоксическую синергию рассчитывают путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса (табл. 1) с использованием программы анализа CalcuSyn.

Конкретные ингибиторы BRAF, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

а) вемурафениб

(i) номер CAS → 918504-65-1

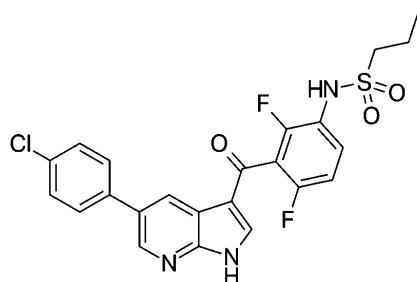
(см. <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

(ii) ссылка DrugBank → DB08881

(см. <https://www.drugbank.ca/>)

(iii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 207SMY3FQT

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



Формула XXVI: N-(3-{[5-(4-хлорфенил)-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-3-ил]карбонил}-2,4-дифторфенил)пропан-1-сульфонамид [вемурафениб].

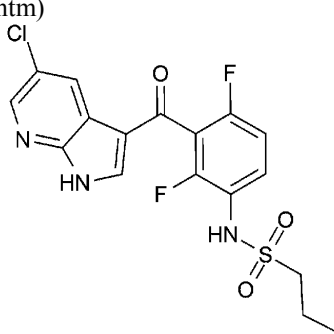
б) PLX4720

(i) номер CAS → 918505-84-7

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → EQY31RO8HA

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

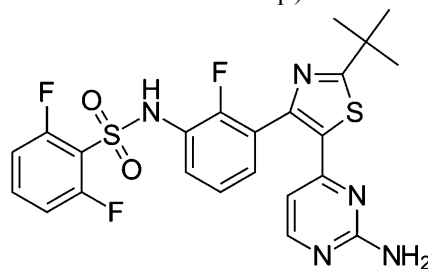


Формула XXVII: N-(3-(5-хлор-1H-пирроло[2,3-б]пиридин-3-карбонил)-2,4-дифторфенил)пропан-1-сульфонамид [PLX4720].

с) дабрафениб

(i) номер CAS → 1195765-45-7

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



Формула XXVIII: N-{3-[5-(2-аминопиридин-4-ил)-2-трет-бутил-1,3-тиазол-4-ил]-2-фторфенил}-2,6-дифторбензолсульфонамид [дабрафениб].

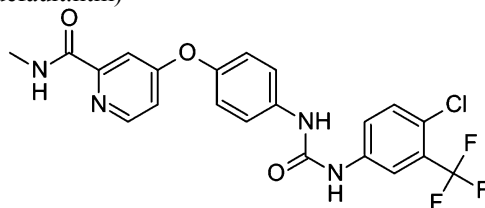
д) сорафениб

(i) номер CAS → 284461-73-0

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 9ZOQ3TZI87

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



Формула XXIX: 4-[4-[[4-хлор-3-(трифторметил)фенил]карбамоиламино]фенокси]-N-метилпиридин-2-карбоксамид [сорафениб].

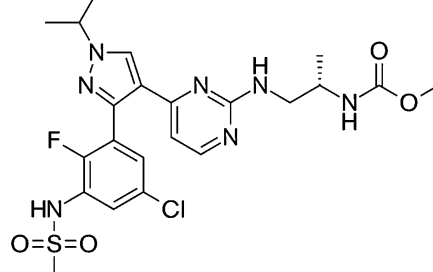
е) энкорафениб

(i) номер CAS → 1269440-17-6

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 8L7891MRB6

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

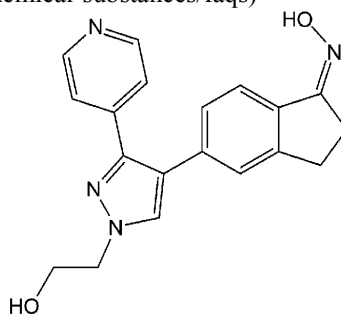


Формула XXX: Метил[(2S)-1-{[4-(3-{5-хлор-2-фтор-3-[(метилсульфонил)амино]фенил}-1-изопропил-1H-пирозол-4-ил)-2-пиримидинил]амино}-2-пропанил]карбамат [энкорафениб].

ф) GDC0879

(i) номер CAS → 905281-76-7

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



Формула XXXI: (E)-2,3-дигидро-5-[1-(2-гидроксиэтил)-3-(4-пиридинил)-1H-пирозол-4-ил]-1H-инден-1-он оксим [GDC0879].

МЕК1.

Вторичный агент, описанный в настоящем документе, может представлять собой ингибитор МЕК.

Термин "ингибитор МЕК" означает любое химическое соединение или биологическую молекулу, которая снижает активность МЕК1 и/или МЕК2.

У людей МЕК1 кодируется геном MAP2K1. МЕК1 является членом семейства протеинкиназ с двойной специфичностью, который выступает в качестве киназы митоген-активируемой протеин (МАР)-киназы. МАР-киназы, также известные как киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ЕРК), выступают в качестве точки интеграции для множества биохимических сигналов. Эта протеинкиназа находится выше (upstream) МАР-киназ и стимулирует ферментативную активность МАР-киназ после активации широким спектром вне- и внутриклеточных сигналов. Являясь важным компонентом пути передачи сигнала МАР-киназы, эта киназа вовлечена во многие клеточные процессы, такие как пролиферация, дифференцировка, регуляция транскрипции и развитие.

У людей МЕК2 кодируется геном MAP2K2. Белок, кодируемый этим геном, представляет собой протеинкиназу с двойной специфичностью, которая принадлежит семейству киназ МАР-киназы. Известно, что эта киназа играет критическую роль в передаче митогенного сигнала факторов роста. Она фосфорилирует и таким образом активирует MAPK1/ERK2 и MAPK3/ERK1.

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

Примерами подходящих ингибиторов MEK являются траметиниб, кобиметиниб, биниметиниб и селуметиниб. Ингибитор MEK ингибирует киназные ферменты митоген-активируемой протеинкиназы, MEK1 и/или MEK2. Дефекты в пути MAP/ERK могут приводить к неконтролируемому росту, особенно при меланоме.

Некоторые ингибиторы MEK, такие как траметиниб, ингибируют MEK1 и MEK2, и одобрены для лечения пациентов с метастатической меланомой с V600E-мутацией в BRAF. Как описано выше, мутация V600E делает мутантный ген BRAF конститутивно активным, управляющим пролиферацией меланомы. Путем ингибирования пути MAP/ERK блокируют пролиферацию клеток и индуцируют апоптоз (контролируемую гибель клеток). Комбинирование ADC, который направлен на воздействие на AXL-положительные опухоли, с MEKi является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADC будет непосредственно уничтожать AXL-положительные клетки опухоли по механизмам, зависящим от перекрестного сшивания ДНК и приводящим к апоптозу, в то время как, с другой стороны, MEKi будет нарушать пролиферацию клеток путем ингибирования пути передачи клеточного сигнала MAP/ERK.

Для демонстрации того, что ADC действует синергетически с MEKi, панель AXL (+) линий клеток, включая, но не ограничиваясь ими, клетки MDA-MB231, H1299 и SNU12C, совместно обрабатывают диапазоном концентраций как ADC, так и MEKi. В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток совместно обрабатывают диапазоном концентраций MEKi или диапазоном концентраций ADC и носителя. После инкубации измеряют цитотоксичность комбинаций *in vitro* путем анализа MTS. Для определения цитотоксичности жизнеспособность клеток измеряют путем добавления MTS в каждую лунку и инкубации в течение 4 часов при 37°C. Процент жизнеспособности клеток рассчитывают по сравнению с необработанным контролем. Цитотоксическую синергию рассчитывают путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса с использованием программы анализа CalcuSyn.

Конкретные ингибиторы MEK, подходящие для применения в качестве вторичных агентов в настоящем изобретении, включают:

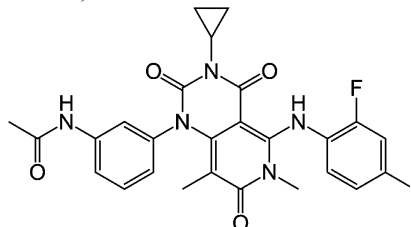
а) траметиниб

(i) номер CAS → 871700-17-3

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 33E86K87QN

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



Формула XXXII: N-(3-{3-циклопропил-5-[(2-фтор-4-йодфенил)амино]-6,8-диметил-2,4,7-триоксо-3,4,6,7-тетрагидропиридо[4,3-d]пиримидин-1(2H)-ил}фенил)ацетамид

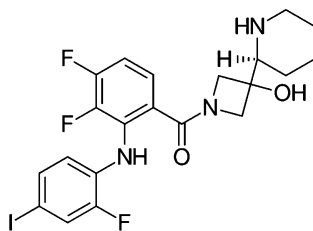
б) кобиметиниб

(i) номер CAS → 934660-93-2

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → ER29L26N1X

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



Формула XXXIII: (S)-[3,4-дифтор-2-(2-фтор-4-йодфениламино)фенил][3-гидрокси-3-(пиперидин-2-ил)азетидин-1-ил]метанон

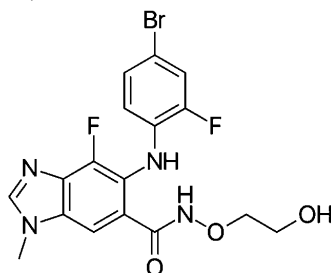
с) биниметиниб

(i) номер CAS → 606143-89-9

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 181R97MR71

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



Формула XXIV: 5-((4-бром-2-фторфенил)амино)-4-фтор-N-(2-гидроксиэтокс)-1-метил-1H-бензо[d]имидазол-6-карбоксамид

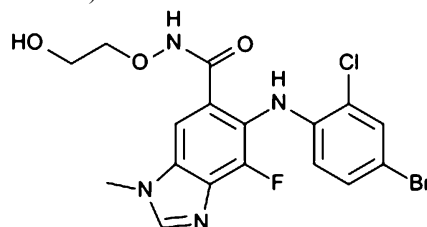
d) селуметиниб

(i) номер CAS → 606143-52-6

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 6UH91I579U

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



Формула XXXV: 6-(4-бром-2-хлоранилино)-7-фтор-N-(2-гидроксиэтокс)-3-метилбензимидазол-5-карбоксамид

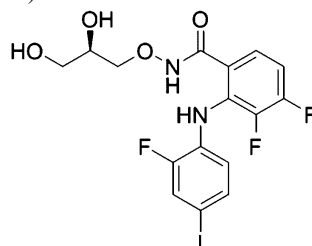
e) PD-325901

(i) номер CAS → 391210-10-9

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 86K0J5AK6M

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



Формула XXXVI: N-[(2R)-2,3-дигидроксипропокс]-3,4-дифтор-2-(2-фтор-4-йоданилино)бензамид

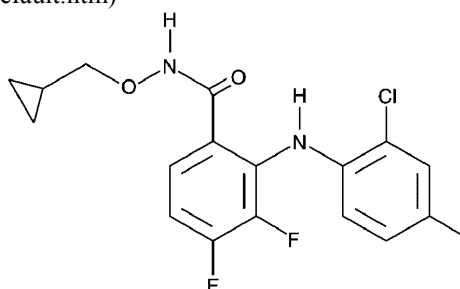
f) CI-1040

(i) номер CAS → 212631-79-3

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → R3K9Y00J04

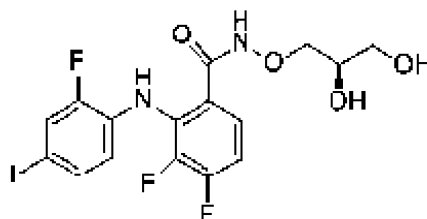
(см. <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)



Формула XXXVII: 2-[(2-хлор-4-йодфенил)амино]-N-(циклопропилметокси)-3,4-дифторбензамид
g) PD035901

(i) номер CAS → 391210-10-9

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



Формула XXXVIII: PD035901

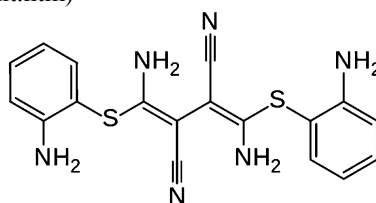
h) U0126

(i) номер CAS → 218601-62-8

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

(ii) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 8027P94HLL

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



Формула XXXIX: 1,4-диамино-2,3-дициано-1,4-бис(2-аминофенилтио)бутадие

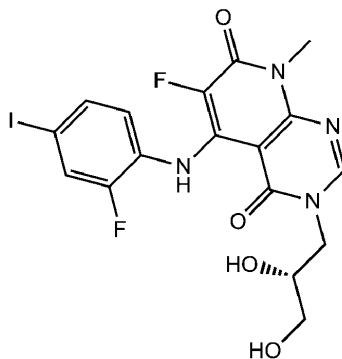
i) TAK-733

(iii) номер CAS → 1035555-63-5

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

(iv) уникальный идентификатор ингредиента (UNII) → 5J61HSP0QJ

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



Формула XL: 3-[(2R)-2,3-дигидроксипропил]-6-фтор-5-(2-фтор-4-йоданилино)-8-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-4,7-дион.

В некоторых вариантах реализации полипептид BRAF соответствует номеру доступа Genbank AAA35609, номер версии AAA35609.2, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 09:41 AM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид BRAF, соответствует номеру доступа Genbank M95712, номер версии M95712.2, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 09:41 AM. В

некоторых вариантах реализации полипептид BRAF соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot P15056.

В некоторых вариантах реализации полипептид MEK1 соответствует номеру доступа Genbank AAA36318, номер версии AAA36318.1, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 08:48 AM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид MEK1, соответствует номеру доступа Genbank L05624, номер версии L05624.1, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 08:48 AM. В некоторых вариантах реализации полипептид MEK1 соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot Q02750.

В некоторых вариантах реализации полипептид MEK2 соответствует номеру доступа Genbank AAN00471, номер версии AAN00471.1, дата обновления записи: 23 сентября 2014 г., 03:30 PM. В одном из вариантов реализации нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид MEK2, соответствует номеру доступа Genbank BC000471, номер версии BC000471.2, дата обновления записи: 23 сентября 2014 г., 03:30 PM. В некоторых вариантах реализации полипептид MEK2 соответствует номеру доступа Uniprot/Swiss-Prot P36507.

Предпочтительные свойства описанных комбинаций.

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

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

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

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

В настоящем описании термин "повышенная частота ответов на лечение" означает, что после лечения комбинацией наблюдают полный ответ у большей части индивидуумов, чем наблюдают после лечения либо ADC в форме монотерапии, либо вторичным агентом в форме монотерапии. В некоторых вариантах реализации полный ответ после лечения комбинацией ADC/вторичный агент наблюдают по меньшей мере у 10% получавших лечение индивидуумов. В некоторых вариантах реализации полный ответ после лечения комбинацией ADC/вторичный агент наблюдают по меньшей мере у 20%, по меньшей мере у 30%, по меньшей мере у 40%, по меньшей мере у 50%, по меньшей мере у 60%, по меньшей мере у 70%, по меньшей мере у 80%, по меньшей мере у 90%, по меньшей мере у 95%, по меньшей мере у 98% или по меньшей мере у 99% получавших лечение индивидуумов.

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

мере 10 лет, по меньшей мере 15 лет или по меньшей мере 20 лет.

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

Вылечиваемые нарушения.

Виды комбинированной терапии, описанные в настоящем документе, включают те, которые демонстрируют полезную противораковую активность. В частности, в соответствии с некоторыми аспектами указанные виды терапии включают антитело, конъюгированное, т.е. ковалентно присоединенное линкером к компоненту, представляющему собой лекарственное средство PBD, т.е. токсину. Когда лекарственное средство не конъюгировано с антителом, лекарственное средство PBD оказывает цитотоксическое действие. Таким образом, биологическую активность компонента, представляющего собой лекарственное средство PBD, модулируют путем конъюгации с антителом. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению селективно доставляют эффективную дозу цитотоксического агента в опухолевую ткань, благодаря чему может быть обеспечена более высокая селективность, т.е. более низкая эффективная доза.

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

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

Первый белок-мишень предпочтительно представляет собой Axl. Нарушение может представлять собой пролиферативное заболевание, например, рак, такой как рак молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, поджелудочной железы, матки, печени, мочевого пузыря, эндометрия и предстательной железы, а также лимфомы (например, неходжкинская лимфома, НХЛ) и лейкозы (в частности, острый миелоидный лейкоз, ОМЛ). Нарушение может представлять собой иммунное нарушение, сердечно-сосудистое нарушение, тромбоз, диабет, нарушение, связанное с иммунными контрольными точками, или фиброзное нарушение (фиброз), такое как косоглазие, склеродермия, келоид, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), кистозный фиброз (КФ), системный склероз, фиброз сердца, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), другие виды фиброза печени, первичный билиарный цирроз, фиброз почек, рак и атеросклероз. На этикетке может быть указано, что субъект страдает AXL+ раком.

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

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

Виды комбинированной терапии, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения пролиферативного заболевания. Термин "пролиферативное заболевание" относится к ненужной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или аномальных клеток, которая нежелательна, такой как неопластический или гиперпластический рост, будь то *in vitro* или *in vivo*.

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

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

Нарушения, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, рак, в том числе метастатический рак и метастатические раковые клетки, такие как циркулирующие клетки опухоли, которые, как можно обнаружить, циркулируют в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. Рак, представляющий особый интерес, включает рак молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, поджелудочной железы, матки, печени, мочевого пузыря, эндометрия и предстательной железы, а также лимфомы (например, неходжкинскую лимфому, НХЛ) и лейкозы (в частности, острый миелоидный лейкоз, ОМЛ).

Другие нарушения, представляющие интерес, включают любое состояние, при котором Axl сверхэкспрессируется или в случае которого антагонизм Axl обеспечит полезный клинический эффект. Указанные нарушения включают иммунные нарушения, сердечно-сосудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения, связанные с иммунными контрольными точками, фиброзные нарушения (фиброз) или пролиферативные заболевания, такие как рак, в частности, метастатический рак. Более того, известно, что Axl играет роль во многих раковых опухолях эпителиального происхождения.

Фиброзные нарушения, представляющие интерес, включают косоглазие, склеродермию, келоид, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), кистозный фиброз (КФ), системный склероз, фиброз сердца, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), другие виды фиброза печени, первичный билиарный цирроз, фиброз почек, рак и атеросклероз. При этих заболеваниях постоянное развитие фиброза в ткани приводит к заметным изменениям в структуре пораженных органов и впоследствии вызывает нарушение функции органа. В результате этого процесса длительного изнашивания органов многие заболевания, в которые вовлечен фиброз, часто являются прогрессирующими состояниями и имеют неблагоприятный отдаленный прогноз (см. Rockey, D.C., Bell, P.D. and Hill, J.A. (2015), N. Engl. Med., Vol. 372, pp. 1138-1149).

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

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

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

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

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

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

Как правило, заболевание или нарушение, которое лечат, представляет собой гиперпролиферативное заболевание, такое как рак. Примеры рака, который лечат согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваясь ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких раковых опухолей включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшной полости, печеночно-клеточный рак, гастриальный рак или рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак толстой и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки или почечный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, анальную карциному, карциному полового члена, а также рак головы и шеи.

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

В соответствии с некоторыми аспектами субъект страдает пролиферативным нарушением, выбранным из рака, такого как рак молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, поджелудочной железы, матки, печени, мочевого пузыря, эндометрия и предстательной железы, а также лимфомы (например, неходжкинская лимфома, НХЛ) и лейкоз (в частности, острый миелоидный лейкоз, ОМЛ). В соответствии с некоторыми аспектами субъект страдает нарушением, выбранным из иммунного нарушения, сердечно-сосудистого нарушения, тромбоза, диабета, нарушения, связанного с иммунными контрольными точками, или фиброзного нарушения (фиброза), такого как космоглия, склеродермия, келоид, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), кистозный фиброз (КФ), системный склероз, фиброз сердца, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), другие виды фиброза печени, первичный билиарный цирроз, фиброз почек, рак и атеросклероз. На этикетке может быть указано, что субъект страдает AXL+ раком. Рак молочной железы и ОМЛ представляют собой рак, представляющий особый интерес.

В соответствии с некоторыми аспектами субъект страдает пролиферативным заболеванием, которое может характеризоваться присутствием новообразования, содержащего как AXL+, так и AXL- клетки.

Указанное пролиферативное заболевание может характеризоваться присутствием новообразования, состоящего из AXL- неопластических клеток, при этом возможно указанные AXL- неопластические клетки ассоциированы с AXL+ неопластическими клетками.

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

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

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

Выбор пациентов.

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

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

ки, которые экспрессируют первый белок-мишень, такие как инфильтрирующие клетки, которые экспрессируют первый белок-мишень.

В соответствии с некоторыми аспектами индивидуумов выбирают на основе уровня или паттерна экспрессии первого белка-мишени. В соответствии с некоторыми аспектами выбор основан на экспрессии первого белка-мишени на поверхности клетки.

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

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

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

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

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

В соответствии с некоторыми аспектами присутствие первого белка-мишени и/или второго белка-мишени в клетках в образце указывает на то, что индивидуум подходит для лечения комбинацией, содержащей ADC и вторичный агент. В соответствии с другими аспектами уровень экспрессии первого белка-мишени и/или второго белка-мишени должен быть выше порогового уровня, чтобы указывать на то, что индивидуум подходит для лечения. В соответствии с некоторыми аспектами наблюдение изменения локализации первого белка-мишени и/или второго белка-мишени в образце по сравнению с контролем указывает на то, что индивидуум подходит для лечения.

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

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

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

Первый белок-мишень предпочтительно представляет собой Axl.

Второй белок-мишень может представлять собой PD1, PDL1, GITR, OX40, CTLA, PARPi, MEK1, MEK2 или BRAF. Второй белок-мишень предпочтительно представляет собой PD-L1.

Образцы.

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

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

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

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

В некоторых случаях образец представляет собой образец крови или полученный из крови образец. Полученный из крови образец может представлять собой выбранную фракцию крови индивидуума, на-

пример, выбранную фракцию, содержащую клетки, или фракцию плазмы или сыворотки.

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

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

Первый полипептид-мишень предпочтительно представляет собой Axl.

Статус индивидуума.

Индивидуум может представлять собой животное, млекопитающее, плацентарное млекопитающее, сумчатое (например, кенгуру, вомбата), однопроходное животное (например, утконоса), грызуна (например, морскую свинку, хомяка, крысу, мышь), относящееся к мышам животное (например, мышь), зайцеобразное (например, кролика), пернатое (например, птицу), относящееся к псовым животное (например, собаку), относящееся к кошачьим животное (например, кошку), относящееся к семейству лошадиных животное (например, лошадь), относящееся к свиньям животное (например, свинью), относящееся к овцам животное (например, овцу), крупный рогатый скот (например, корову), примата, обезьянообразное (например, обезьяну или человекообразную обезьяну), обезьяну (например, мартышку, павиана), человекообразную обезьяну (например, гориллу, шимпанзе, орангутана, гиббона) или человека.

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

В некоторых случаях индивидуум имеет, у него подозревают или ему поставлен диагноз пролиферативное заболевание, характеризующееся присутствием новообразования, содержащего как AXL⁺, так и AXL⁻ клетки. Новообразование может состоять из AXL⁻ неопластических клеток, при этом возможно указанные AXL⁻ неопластические клетки ассоциированы с AXL⁺ неопластическими клетками. Новообразование-мишень или неопластические клетки-мишени могут представлять собой всю или часть солидной опухоли. Сольдная опухоль может представлять собой новообразование, включая негематологический рак, содержащее или состоящее из AXL⁺ неопластических клеток. Сольдная опухоль может представлять собой новообразование, включая негематологический рак, инфильтрированное AXL⁺ клетками, такими как AXL⁺ иммуносупрессивные дендритные клетки, NK-клетки или макрофаги; в таких солидных опухолях может отсутствовать экспрессия AXL (т.е. они могут содержать или состоять из AXL⁻ неопластических клеток).

В соответствии с некоторыми аспектами, описанными в настоящем документе, индивидуум имеет или у него подозревают рак, или он был определен как подверженный риску возникновения рака. В соответствии с некоторыми аспектами, описанными в настоящем документе, индивидууму уже поставлен диагноз рак. Индивидууму может быть поставлен диагноз рак, такой как рак молочной железы, легкого, желудка, головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, поджелудочной железы, матки, печени, мочевого пузыря, эндометрия и предстательной железы, а также лимфомы (например, неходжкинская лимфома, НХЛ) и лейкоз (в частности, острый миелоидный лейкоз, ОМЛ). Рак молочной железы и ОМЛ представляют собой рак, представляющий особый интерес.

В соответствии с некоторыми аспектами, описанными в настоящем документе, индивидуум имеет или у него подозревают, или он был определен как подверженный риску возникновения, или ему поставлен диагноз иммунное нарушение, сердечно-сосудистое нарушение, тромбоз, диабет, нарушение, связанное с иммунными контрольными точками, или фиброзное нарушение (фиброз), такое как косоглазие, склеродермия, келоид, нефрогенный системный фиброз, фиброз легких, идиопатический фиброз легких (ИФЛ), кистозный фиброз (КФ), системный склероз, фиброз сердца, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), другие виды фиброза печени, первичный билиарный цирроз, фиброз почек, рак и атеросклероз.

В некоторых случаях индивидууму поставлен диагноз солидный рак, содержащий инфильтрирующие клетки, экспрессирующие AXL⁺.

Индивидуума могут подвергать или он мог быть подвергнут терапевтическому лечению этого рака. Субъект ранее мог получать или мог не получать ADCxAXL. В некоторых случаях рак представляет собой рак молочной железы или ОМЛ.

Контроли.

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

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

тате анализа эталонного образца.

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

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

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

В некоторых случаях контроль представляет собой образец культуры клеток.

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

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

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

Первый белок-мишень предпочтительно представляет собой AXL.

Второй белок-мишень может представлять собой PD1, PDL1, GITR, OX40, CTLA, PARPi, MEK1, MEK2 или BRAR. Второй белок-мишень предпочтительно представляет собой PD-L1.

Способы лечения.

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

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

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

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

ADC может содержать антитело анти-AXL. ADC может содержать лекарственное средство, которое представляет собой димер PBD. ADC может представлять собой анти-AXL-ADC и, в частности, AD-CxAXL. ADC может представлять собой ADC, описанный в GB 1702029.8, GB 1719906.8 или PCT/EP 2018/053163.

Вторичный агент может представлять собой:

(a) антагонист PD1, такой как пембролизумаб, ниволумаб, MEDI0680, PDR001 (спартализуамаб), камрелизуамаб, AUNP12, пидилизуамаб, цемиплимаб (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (тислелизуамаб) или BGB-108;

(b) антагонист PD-L1, такой как атезолизумаб (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаб/MEDI4736 или MSB0010718C (авелумаб);

(c) агонист G1TR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), такой как MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK-4166, BMS-986156 или INCAGN1876;

(d) агонист OX40, такой как MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 или PF-04518600;

(e) антагонист CTLA-4, такой как ипилимумаб (торговое название Ервой) или тремелидумаб (первоначально разработанный Pfizer, в настоящее время Medimmune);

(f) флударабин или цитарабин;

(g) гипометилирующий агент, такой как аналоги цитидина, например, 5-азацитидин (азацитидин) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин); или

(h) ингибитор PARP (PARPi), такой как олапариб, CEP-9722, BMN-673/талазопариб, рукапариб, инипариб/SAR24-550/BSI-201, велипариб (ABT-888), нирапариб/MK-4827, BGB-290, 3-аминобензамид и E7016;

(i) агент, повышающий экспрессию HER2, такой как гемцитабин и тамоксифен;

(j) ингибитор AXL-киназы (AXLi), такой как BGB324 (бемцентиниб), TP0903, гилтеритиниб (ASP2215), кабозантиниб (XL184), SGI7079, мерестиниб, амуватиниб (MP-470), босутиниб (SKI-606), MGCD265 и фореитиниб (GSK1363089/XL880);

(k) ингибитор BRAF (BRAFi), такой как вемурафениб, PLX4720, дабрафениб, сорафениб, энкорафениб и GDC0879; или

(l) ингибитор MEK (MEKi), такой как траметиниб, кобиметиниб, биниметиниб, селуметиниб, PD-325901, CI-1040, PD035901, U0126 и TAK-733.

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

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

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

Больше примеров химиотерапевтических агентов включают: оксалиплатин (ЭЛОКСАТИН®, Sanofi), бортезомиб (ВЕЛКЕЙД®, Millennium Pharm.), сутент (СУНИТИНИБ®, SU11248, Pfizer), летрозол (ФЕМАРА®, Novartis), иматиниба мезилат (ГЛИВЕК®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), РТК787/ЗК 222584 (Novartis), фулвестрант (ФАЗЛОДЕКС®, AstraZeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамицин (сиролимус, РАПАМУН®, Wyeth), лапатиниб (ТАЙКЕРБ®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (САРАСАР™, SCH 66336, Schering Plough), сорафениб (НЕКСАВАР®, BAY43-9006, Bayer Labs), гефитиниб (ИРЕССА®, AstraZeneca), иринотекан (КАМПТОСАР®, СРТ-11, Pfizer), типифарниб (ЗАРНЕСТРА™, Johnson & Johnson), АБРАКАСАН™ (не содержащий кремофор), альбумин-стабилизированную форму паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), вандетаниб (rINN, ZD6474, ЗАКТИМА®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen),

темсиролимус (ТОРИЗЕЛ®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (ТЕЛЦИТА®, Telik), тиотепу и циклофосфамид (ЦИТОКСАН®, НЕОСАР®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфат; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (особенно буллатин и буллатинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелизин); криптофицины (в частности, криптофицин I и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; хлорметины, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамид оксид гидрохлорид, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевина, такие как кармустицин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндиановые антибиотики (например, калихеамицин, калихеамицин гамма II, калихеамицин омега II (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); динемидин, динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамидин; а также неокарциностатин хромофор и хромофоры, родственные входящим в состав эндиановых антибиотиков - хромопротеидов), аклаиномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, катиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролидинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, неморубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, нугаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тигуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксурин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестостерон; средства, подавляющие функцию коры надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; добавку для восполнения фолиевой кислоты, такую как фолиевая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрин; эдотрексат; дефосфамин; демексолон; диазиксон; элфорнитин; эллиптинин ацетат; эпотилон; этоглютид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидайнин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и анзамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, Орегон); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазицион; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецины (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангиудин); уретан; виндизин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепу; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платиновые аналоги, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (НАВЕЛЬБИН®); новантрон; тенипозид; эдотрексат; дауномицин; аминоптерин; капецитабин (КСЕЛОДА®, Roche); ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеуказанных агентов. Можно применять комбинации агентов, такие как СНР (доксорубицин, преднизон, циклофосфамид) или СНОР (доксорубицин, преднизон, циклофосфамид, винкристин).

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

ингибиторы топоизомеразы 1, такие как ЛУРТОТЕКАН®; АБАРЕЛИКС® gmRH; (ix) антиангиогенные агенты, такие как бевацизумаб (АВАСТИН®, Genentech); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеуказанных средств.

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

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

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

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблетки, капсулы, порошка или жидкой форме. Таблетка может содержать твердый носитель или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции, как правило, содержат жидкий носитель, такой как вода, нефть, масла животного или растительного происхождения, минеральное масло или синтетическое масло. Может быть включен физиологический раствор, раствор декстрозы или другого сахара, или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

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

Доза.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Первый белок-мишень предпочтительно представляет собой AXL. ADC может содержать антитело анти-AXL. ADC может содержать лекарственное средство, которое представляет собой димер PBD. ADC может представлять собой анти-AXL-ADC и, в частности, ADCxAXL. ADC может представлять собой ADC, описанный в GB 1702029.8, GB 1719906.8 и PCT/EP 2018/053163.

Вторичный агент может представлять собой антагонист PD1. Подходящие антагонисты PD1 включают пембролизумаб, ниволумаб, MEDI0680, PDR001, камрелизумаб, AUNP12, пидилизумаб REGN-2810 и BGB-108.

Антитела.

В настоящем описании термин "антитело" употребляется в самом широком смысле и, в частности,

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

Антитело представляет собой белок, вырабатываемый иммунной системой, который способен распознавать конкретный антиген и связываться с ним. (Janeway, C, Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Антиген-мишень, как правило, содержит несколько центров связывания, также называемых эпитопами, распознаваемых определяющими комплементарными областями (CDR) на различных антителах. Каждое антитело, которое специфично связывается с отличным от других эпитопом, имеет отличающуюся структуру. Таким образом, один антиген может иметь больше одного соответствующего антитела. Антитело может содержать полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т.е. молекулу, которая содержит антигенсвязывающий центр, который иммуноспецифично связывает антиген представляющей интерес мишени или его часть, при этом такие мишени включают, но не ограничиваются ими, раковую клетку или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, связанные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса, или аллотипа (например, человеческий G1m1, G1m2, G1m3, не-G1m1 [т.е. любой аллотип, отличный от G1m1], G1m17, G2m23, G3m21, G3m28, G3m11, G3m5, G3m13, G3m14, G3m10, G3m15, G3m16, G3m6, G3m24, G3m26, G3m27, A2m1, A2m2, Km1, Km2 и Km3) молекулы иммуноглобулина. Иммуноглобулины могут быть получены от любых видов, включая человека, мышь или кролика.

Термин "фрагменты антител" включает часть полноразмерного антитела, как правило, его антигенсвязывающую или варируемую область. Примеры фрагментов антител включают FAb-, FAb'-, F(Ab')₂- и scFv-фрагменты; диатела; линейные антитела; фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии FAb, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (определяющую комплементарную область) и эпитопсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленного, которые иммуноспецифично связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами; одноцепочечные молекулы антител; и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

В настоящем описании термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, будучи направленными против одной антигенной детерминанты. Более того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности, преимуществом моноклональных антител является то, что они могут быть синтезированы без примесей других антител. Определение "моноклональное" указывает на характер антитела как антитела, полученного по существу из однородной популяции антител, и его не следует рассматривать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения согласно настоящему изобретению могут быть получены способом на основе гибридом, впервые описанным Kohler et al (1975) *Nature* 256:495, или могут быть получены способами на основе рекомбинантных ДНК (см. US 4816567). Моноклональные антитела могут быть также выделены из фаговых библиотек антител с применением методик, например, описанных в Clackson et al (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, или из трансгенных мышей, несущих иммуноглобулиновую систему полностью человеческого происхождения (Lonberg (2008) *Curr. Opinion* 20(4):450-459).

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

"Интактное антитело" согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, содержащее VL- и VH-домены, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены с нативной последовательностью человека) или

вариант их аминокислотной последовательности. Интактное антитело может обладать одной или более "эффекторными функциями", которые относятся к тем видам биологической активности, которые присутствуют в Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области с вариантом аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; и понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности, таких как В-клеточный рецептор и BCR.

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

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

Краткое описание фигур

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

Фиг. 1. Последовательности.

Фиг. 2. Связывание конъюгата согласно настоящему изобретению с AXL.

Фиг. 3. Эффективность конъюгата согласно настоящему изобретению *in vivo*.

Фиг. 4. Синергия между ADCxAXL и цитарабином в клетках SN12C *in vitro*.

Фиг. 5. Синергия между ADCxAXL и флударабином в клетках SN12C *in vitro*.

Фиг. 6. Синергия между ADCxAXL и децитабином в клетках SN12C *in vitro*.

Фиг. 7. Синергия между ADCxAXL и олапарибом в клетках SN12C *in vitro*.

Фиг. 8. Синергия между ADCxAXL и гемцитабином в клетках SN12C *in vitro*.

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

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

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

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

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

Некоторые варианты реализации

Следующие пункты описывают некоторые конкретные варианты реализации настоящего изобретения.

1. Способ лечения рака у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества ADCxAXL и вторичного агента.

2. Первая композиция, содержащая ADCxAXL, для применения в способе лечения рака у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей вторичный агент.

3. Первая композиция, содержащая вторичный агент, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей ADCxAXL.

4. Применение ADCxAXL в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит ADCxAXL, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент.

5. Применение вторичного агента в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у ин-

дивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит вторичный агент, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADCxAXL.

6. Набор, содержащий:

первое лекарственное средство, содержащее ADCxAXL;

второе лекарственное средство, содержащее вторичный агент; и необязательно

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

7. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее ADCxAXL, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент, для лечения рака.

8. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее вторичный агент, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADCxAXL, для лечения рака.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая ADCxAXL и вторичный агент.

10. Способ лечения рака у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества композиции по п.9.

11. Композиция по п.9 для применения в способе лечения рака у индивидуума.

12. Применение композиции по п.9 в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у индивидуума.

13. Набор, содержащий композицию по п.9 и набор инструкций по введению индивидууму лекарственного средства, для лечения рака.

14. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение включает введение ADCxAXL до вторичного агента, одновременно с вторичным агентом или после вторичного агента.

15. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение дополнительно включает введение химиотерапевтического агента.

16. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что индивидуум представляет собой человека.

17. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть нарушение или определен рак.

18. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, характеризующийся присутствием новообразования, содержащего как AXL+, так и AXL-клетки.

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

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

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

22. Композиция, способ, применение или набор по п.21, характеризующийся тем, что AXL+ инфильтрирующие клетки представляют собой дендритные клетки, NK-клетки или макрофаги.

23. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий PD-L1.

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

а) эффективно лечит более широкий спектр нарушений,

б) эффективно лечит резистентные, не поддающиеся лечению или рецидивирующие нарушения,

с) демонстрирует повышенную частоту ответов и/или

д) демонстрирует увеличенную продолжительность ответа на лечение;

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

25. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что рак выбран из группы, включающей: рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, рак поджелудочной железы, рак матки, рак печени, рак мочевого пузыря, рак эндометрия, рак предстательной железы, неходжкинскую лимфому (НХЛ), ОМЛ, иммунное нарушение, сердечно-сосудистое нарушение, тромбоз, диабет, нарушение, связанное с иммунными контрольными точками, и фиброзное нарушение.

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

27. Композиция, способ, применение или набор по п.26, характеризующийся тем, что антагонист PD1 выбран из пембролизумаба, ниволумаба, MEDI0680, PDR001 (спартализумаб), камрелизумаба,

AUNP12, пидилизумаба, цемиплимаба (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (тислелизумаб) и BGB-108.

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

29. Композиция, способ, применение или набор по п.28, характеризующийся тем, что антагонист PD-L1 выбран из атезолизумаба (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаба/MEDI4736 и MSB0010718C (авелумаб).

30. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой агонист G1TR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка).

31. Композиция, способ, применение или набор по п.30, характеризующийся тем, что агонист G1TR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка) выбран из MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK 4166, BMS-986156 и INCAGN1876.

32. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой агонист OX40.

33. Композиция, способ, применение или набор по п.32, характеризующийся тем, что агонист OX40 выбран из MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 и PF-04518600.

34. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист CTLA-4.

35. Композиция, способ, применение или набор по п.34, характеризующийся тем, что антагонист CTLA-4 выбран из ипилимумаба и тремелиумаба.

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

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

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

39. Композиция, способ, применение или набор по п.38, характеризующийся тем, что гипометилирующий агент представляет собой азацитидин.

40. Композиция, способ, применение или набор по п.38, характеризующийся тем, что гипометилирующий агент представляет собой децитабин.

41. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор PARP (PARPi).

42. Композиция, способ, применение или набор по п.41, характеризующийся тем, что PARPi выбран из олапариба, CEP-9722, BMN-673/талазопариба, рукапариба, инипариба/SAR24-550/BSI-201, велипариба (ABT-888), нирапариба/MK-4827, BGB-290, 3-аминобензамида и E7016.

43. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет агент, повышающий экспрессию HER2.

44. Композиция, способ, применение или набор по п.41, характеризующийся тем, что агент, повышающий экспрессию HER2, выбран из гемцитабина и тамоксифена.

45. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор AXL-киназы (AXLi).

46. Композиция, способ, применение или набор по п.45, характеризующийся тем, что AXLi выбран из BGB324 (бемцентиниб), TP0903, гилтеритиниба (ASP2215), кабозантиниба (XL184), SGI7079, мерестиниба, амуватиниба (MP-470), босутиниба (SKI-606), MGCD265 и форетиниба (GSK1363089/XL880).

47. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор BRAF (BRAFi).

48. Композиция, способ, применение или набор по п.47, характеризующийся тем, что BRAFi выбран из вемурафениба, PLX4720, дабрафениба, сорафениба, энкорафениба и GDC0879.

49. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-25, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор MEK (MEKi).

50. Композиция, способ, применение или набор по п.49, характеризующийся тем, что AXLi выбран из траметиниба, кобиметиниба, биниметиниба, селуметиниба, PD-325901, CI-1040, PD035901, U0126 и TAK-733.

Притязания изобретения

1. Способ лечения нарушения у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества ADC и вторичного агента.

2. Первая композиция, содержащая ADC, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей вторичный агент.

3. Первая композиция, содержащая вторичный агент, для применения в способе лечения нарушения у индивидуума, при этом лечение включает введение указанной первой композиции в комбинации со

второй композицией, содержащей ADC.

4. Применение ADC в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит ADC, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент.

5. Применение вторичного агента в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения у индивидуума, при этом указанное лекарственное средство содержит вторичный агент, и указанное лечение включает введение лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADC.

6. Набор, содержащий:

первое лекарственное средство, содержащее ADC;

второе лекарственное средство, содержащее вторичный агент; и необязательно

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

7. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее ADC, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей вторичный агент, для лечения нарушения.

8. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее вторичный агент, и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму указанного лекарственного средства в комбинации с композицией, содержащей ADC, для лечения нарушения.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая ADC и вторичный агент.

10. Способ лечения нарушения у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества композиции по п.9.

11. Композиция по п.9 для применения в способе лечения нарушения у индивидуума.

12. Применение композиции по п.9 в изготовлении лекарственного средства для лечения нарушения у индивидуума.

13. Набор, содержащий композицию по п.9 и набор инструкций по введению индивидууму лекарственного средства для лечения нарушения.

14. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение включает введение ADC до вторичного агента, одновременно с вторичным агентом или после вторичного агента.

15. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что лечение дополнительно включает введение химиотерапевтического агента.

16. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что индивидуум представляет собой человека.

17. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть нарушение или у него определено нарушение.

18. Композиция, способ, применение или набор по п.17, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий первый белок-мишень (FTP), или FTP+ опухолассоциированные неопухолевые клетки, такие как FTP+ инфилтрирующие клетки.

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

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

а) эффективно лечит более широкий спектр нарушений,

б) эффективно лечит резистентные, не поддающиеся лечению или рецидивирующие нарушения,

с) демонстрирует повышенную частоту ответов и/или

д) демонстрирует увеличенную продолжительность ответа на лечение;

по сравнению с лечением либо ADC в форме монотерапии, либо вторичным агентом в форме монотерапии.

21. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что ADC представляет собой анти-AXL-ADC.

22. Композиция, способ, применение или набор по п.21, характеризующийся тем, что анти-AXL-ADC представляет собой ADCxAXL.

23. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что FTP представляет собой AXL.

24. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что нарушение представляет собой пролиферативное заболевание.

25. Композиция, способ, применение или набор по п.24, характеризующийся тем, что нарушение представляет собой рак.

26. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что у индивидуума есть или определен рак, характеризующийся присутствием новообразования, содержащего как AXL+, так и AXL-клетки.

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

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

29. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что нарушение выбрано из группы, включающей: рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, рак поджелудочной железы, рак матки, рак печени, рак мочевого пузыря, рак эндометрия, рак предстательной железы, неходжкинскую лимфому (НХЛ), ОМЛ, иммунное нарушение, сердечно-сосудистое нарушение, тромбоз, диабет, нарушение, связанное с иммунными контрольными точками, и фиброзное нарушение.

30. Композиция, способ, применение или набор по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что второй белок-мишень (STP) представляет собой PD-L1.

31. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист PD1.

32. Композиция, способ, применение или набор по п.31, характеризующийся тем, что антагонист PD1 выбран из пембролизумаба, ниволумаба, MEDI0680, PDR001 (спартализумаб), камрелизумаба, AUNP12, пидилизумаба, цемиплимаба (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (тиселизумаб) и BGB-108.

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

34. Композиция, способ, применение или набор по п.33, характеризующийся тем, что антагонист PD-L1 выбран из атезолизумаба (Тецентрик), BMS-936559/MDX-1105, дурвалумаба/MEDI4736 и MSB0010718C (авелумаб).

35. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой агонист G1TR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка).

36. Композиция, способ, применение или набор по п.35, характеризующийся тем, что агонист G1TR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка) выбран из MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK 4166, BMS-986156 и INCAGN1876.

37. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой агонист OX40.

38. Композиция, способ, применение или набор по п.37, характеризующийся тем, что агонист OX40 выбран из MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 и PF-04518600.

39. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой антагонист CTLA-4.

40. Композиция, способ, применение или набор по п.39, характеризующийся тем, что антагонист CTLA-4 выбран из ипилимумаба и тремелиумаба.

41. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой флударабин.

42. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой цитарабин.

43. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой гипометилирующий агент.

44. Композиция, способ, применение или набор по п.43, характеризующийся тем, что гипометилирующий агент представляет собой азацитидин.

45. Композиция, способ, применение или набор по п.43, характеризующийся тем, что гипометилирующий агент представляет собой децитабин.

46. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор PARP (PARPi).

47. Композиция, способ, применение или набор по п.46, характеризующийся тем, что PARPi выбран из олапариба, CEP-9722, BMN-673/талазопариба, рукапариба, инипариба/SAR24-550/BSI-201, велипариба (ABT-888), нирапариба/MK-4827, BGB-290, 3-аминобензамида и E7016.

48. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет агент, повышающий экспрессию HER2.

49. Композиция, способ, применение или набор по п.48, характеризующийся тем, что агент, повышающий экспрессию HER2, выбран из гемцитабина и тамоксифена.

50. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор AXL-киназы (AXLi).

51. Композиция, способ, применение или набор по п.50, характеризующийся тем, что AXLi выбран из BGB324 (бемцентиниб), TP0903, гилтеритиниба (ASP2215), кабозантиниба (XL184), SGI7079, мерестиниба, амуватиниба (MP-470), босутиниба (SKI-606), MGCD265 и форотиниба (GSK1363089/XL880).

52. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор BRAF (BRAFi).

53. Композиция, способ, применение или набор по п.52, характеризующийся тем, что BRAFi выбран из вемурафениба, PLX4720, дабрафениба, сорафениба, энкорафениба и GDC0879.

54. Композиция, способ, применение или набор по любому из пп.1-30, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой ингибитор MEK (MEKi).

55. Композиция, способ, применение или набор по п.54, характеризующийся тем, что AXLi выбран из траметиниба, кобиметиниба, биниметиниба, селуметиниба, PD-325901, CI-1040, PD035901, U0126 и TAK-733.

Примеры

В следующих примерах:

FTP предпочтительно представляет собой AXL.

Линии клеток, экспрессирующие AXL и подходящие для применения в примерах, включают MDA-MB231, NCI-H1299 и SN12C.

Заболевание А - рак толстой и прямой кишки.

Заболевание В - рак желудка.

Заболевание С - рак поджелудочной железы.

Пример 1.

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

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

Пример 2.

В отдельном эксперименте линии клеток, экспрессирующие FTP, инкубировали в течение 0, 6, 24 и 48 часов совместно с этопозидом (отрицательный контроль) и оксалиплатином (положительный контроль), 1 мкг/мл ADC (ADC, направленное воздействие на FTP, с активной группой димера PBD), 1 мкг/мл анти-FTP (антитело в ADC) и 1 мкг/мл B12-SG3249 (несвязывающий контрольный ADC с той же PBD-нагрузкой, что и у ADC).

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

Пример 3.

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

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

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

ADC (см., например, GB1702029.8, GB1719906.8 и PCT/EP2018/053163.);

Вторичный агент (см. KS Peggs et al.2009, Clinical and Experimental Immunology, 157: 9-19 [doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03912.x]).

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

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

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

Обоснование начальной дозы ADC.

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

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

Обоснование начальной дозы вторичного агента.

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

Цели и связанные с ними конечные точки.

Цель	Конечная точка
<i>Первичная цель</i> Получение характеристик безопасности и переносимости ADC в комбинации с вторичным агентом и определение рекомендуемой дозы и схем для будущих исследований	Частота и тяжесть возникших во время лечения нежелательных явлений (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (СНЯ) Изменения между исходными лабораторными показателями и основными жизненными показателями и этими показателями после исходного уровня Частота случаев дозолимитирующей токсичности (ДЛТ) во время первого цикла лечения (только повышение дозы) Частота приостановки лечения и снижения дозы
<i>Вторичные цели</i> Оценка клинической активности комбинации ADC со вторичным агентом Получение характеристик фармакокинетического (ФК) профиля для каждого из двух соединений ADC и вторичного агента Подтверждение иммуногенности и антител к лекарственному средству (ADA) - к ADC	Общая частота ответов (ORR), продолжительность ответа (DOR), выживаемость без прогрессирования (PFS), общая выживаемость (OS) ППК и C_{max} для каждого соединения Антитела к лекарственному средству (ADA) до, во время и после лечения ADC
<i>Поисковые цели</i> Исследование возможной корреляции ФК-профилей с безопасностью/переносимостью и эффективностью	Коэффициенты корреляции между ППК и/или C_{max} каждого соединения или показателя соединения и любой из переменных безопасности или

Получение характеристик изменений иммунного инфильтрата в опухолях	эффективности Иммуногистохимия биопсийных образцов опухолей до и во время лечения,
Получение характеристик изменений уровней циркулирующих цитокинов в плазме и маркеров активации в циркулирующих иммунных клетках	Измерения (например, путем ELISA) иммунологически значимых цитокинов в плазме или сыворотке; уровней окрашивания для маркеров активации циркулирующих иммунных клеток (например, FACS)

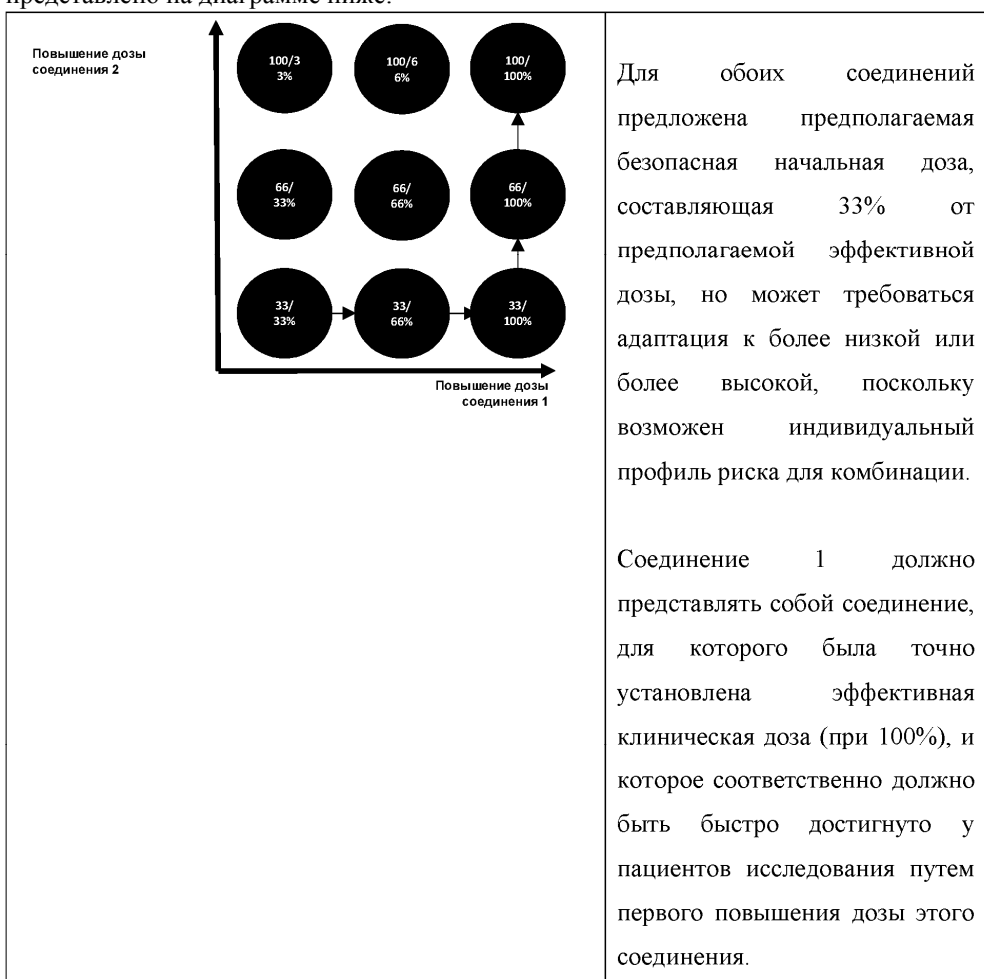
Дизайн исследования.

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

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

Повышение доз начинают с пониженных начальных доз (по сравнению с их соответствующими рекомендованными уровнями доз фазы 2 или разрешенными уровнями доз) как для ADC, так и для вторичного агента, для обеспечения безопасности пациентов. Начальные дозы составляют 33% (или 50%) от RDE для каждого соединения. Затем дозы сначала повышают для вторичного агента до достижения RDE или разрешенной дозы, или более низкой дозы при необходимости по причинам переносимости. Затем дозу ADC повышают до достижения RDE для комбинированного лечения.

Это представлено на диаграмме ниже:



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

Руководством для повышения дозы комбинации является байесовская логистическая регрессионная модель (BLRM) на основе любых значений дозолимитирующей токсичности (ДЛТ), наблюдаемых в первых (или первых двух, ТВС) циклах терапии. Использование BLRM является надежным методом оценки максимальной переносимой дозы (МТВ)/рекомендуемой дозы для расширения числа пациентов (RDE) у пациентов, страдающих раком. Руководством для адаптивной BLRM служит принцип повышения дозы с контролем передозировки (EWOC) для контроля риска ДЛТ у будущих пациентов в исследовании. Использование адаптивных байесовских моделей ответа для небольших наборов данных было принято FDA и EMEA ("Guideline on clinical trials in small populations", 1 февраля 2007 г.) и подтверждено многочисленными публикациями (BAbb et al. 1998, Neuenschwander et al. 2008).

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

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

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

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

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

Часть исследования с повышением дозы.

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

В каждой когорте повышения дозы лечат от двух до приблизительно 3 или 4 пациентов с заболеванием А, заболеванием В или заболеванием С до определения MTD-дозы (доз)/RDE-дозы (доз).

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

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

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

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

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

Повышение дозы прекращают после последовательного назначения 3 когортам (или по меньшей

мере 6 пациентам) одного и того же уровня дозы. Если не достигают MTD, определяют рекомендуемую дозу для расширения числа пациентов (RDE). Перед определением MTD/RDE минимум 6 пациентов должны получить лечение комбинацией.

Предполагается получение парных биопсийных образцов опухоли от пациентов во время повышения дозы. Анализ этих биопсийных образцов вносит вклад в улучшение понимания взаимосвязи между дозой и фармакодинамической активностью комбинации. Контроль Управляющего комитета по повышению дозы за безопасностью DESC, состоящий из терапевтов и исследователей ADC, непрерывно оценивает безопасность пациентов во время повышения дозы, чтобы определить требует ли модификации схема повышения дозы, назначенная mCRM. В дополнение к наблюдениям за безопасностью данные ФК и/или ФД могут также служить основой для принятия решений. Промежуточные дозы могут быть назначены после согласования между терапевтами и исследователями ADC. DESC может продолжать осуществлять контроль во время 2 части исследования. Не учитывают Независимый комитет по мониторингу данных безопасности (DSMB).

Часть исследования с расширением числа пациентов, получающих установленную дозу.

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

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

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

В каждой группе лечения разрешено лечение максимум приблизительно шести пациентов, которые получили предшествующее введение одного (т.е. не в комбинации) вторичного агента и у которых произошло прогрессирование на нем. Это количество может быть увеличено, если комбинация демонстрирует перспективу преодоления резистентности к предшествующему лечению одним вторичным агентом.

Популяция пациентов.

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

Критерии включения.

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

1. Информированное согласие в письменной форме должно быть получено до проведения любых процедур.

2. Возраст: 18 лет.

3. Пациенты с распространенным/метастатическим раком, с измеримыми проявлениями заболевания по данным RECIST, версия 1.1, у которых произошло прогрессирование несмотря на стандартную терапию или которые не переносят стандартную терапию, или для которых не существует стандартной терапии.

Пациенты должны попадать в одну из следующих групп:

Заболевание А

Заболевание В

Заболевание С

4. Общее состояние онкологического пациента по шкале ECOG (0 - 1) (или 2 TBC).

5. TBC: У пациента должен быть очаг заболевания, поддающийся биопсии, и пациент должен подходить для биопсии опухоли в соответствии с руководством лечебного учреждения. Пациент должен быть готов вновь пройти биопсию опухоли в начале исследования и снова во время терапии в этом исследовании.

6. Допустима предшествующая терапия вторичным агентом или родственными соединениями (т.е. тем же MOA).

Критерии исключения.

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

1. Тяжелые реакции гиперчувствительности на другие mAb в анамнезе (ИЛИ на то же mAb остова, что и в ADC, ИЛИ на то же mAb ИО, если применимо).

2. Известное положительное ADA человека в сыворотке к остоу mAb, что и в ADC, в анамнезе.

3. Только заболевание центральной нервной системы (ЦНС) (если применимо).

4. Симптоматические метастазы в ЦНС или признаки лептоменингеального заболевания (МРТ головного мозга или ранее документально зафиксированная цитология спинномозговой жидкости (СМЖ)).

Ранее подвернутое лечению бессимптомные метастазы в ЦНС допустимы при условии, что последнее лечение (системная противораковая терапия и/или местная лучевая терапия) было завершено за ≥ 8 недель до 1-го дня дозирования, за исключением того, что допускается использование низких доз стероидов с постепенным снижением).

Пациенты с отдельными метастазами в твердой мозговой оболочке подходят для участия.

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

Креатинин в сыворотке $\leq 1,5$ x верхней границы нормы (ВГН) Если креатинин в сыворотке $> 1,5$, клиренс креатинина (рассчитанный с использованием формулы Кокрофта-Голта или измеренный) должен быть > 60 мл/мин/1,73 м², чтобы пациент подходил для участия

Общий билирубин $> 1,5 \times$ ВГН, за исключением пациентов с синдромом Жильбера, которых исключают, если общий билирубин $> 3,0 \times$ ВГН или прямой билирубин $> 1,5 \times$ ВГН

Аланинаминотрансфераза (АЛТ) $> 3 \times$ ВГН, за исключением пациентов с опухолевым поражением печени, которых исключают, если АЛТ $5 \times$ ВГН

Аспартатаминотрансфераза (АСТ) $> 3 \times$ ВГН, за исключением пациентов с опухолевым поражением печени, которых исключают, если АСТ $5 \times$ ВГН

Абсолютное число нейтрофилов $< 1,0 \times 10^9/\text{л}$

Количество тромбоцитов $< 75 \times 10^9/\text{л}$

Гемоглобин (Hgb) < 8 г/дл

Нарушение уровня калия, магния, кальция или фосфата > 1 степени по СТСАЕ несмотря на соответствующую заместительную терапию

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

Клинически значимое и/или неконтролируемое заболевание сердца, такое как застойная сердечная недостаточность, требующая лечения (III или IV степень по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA)) или неконтролируемая гипертензия, определяемая систолическим артериальным давлением (САД) 160 мм рт.ст. и/или диастолическим артериальным давлением (ДАД) 100 мм рт.ст., с антигипертензивным препаратом или без него

Интервал QTcF > 470 мсек для женщин или > 450 мсек для мужчин на ЭКГ-скрининге с использованием коррекции по формуле Фридерича, врожденный синдром удлиненного интервала QT

Острый инфаркт миокарда или нестабильная стенокардия за < 3 месяца до включения в исследование
Клинически значимый порок клапанов сердца с документально зафиксированным нарушением функции сердца

Симптоматический перикардит

Кардиомиопатия в анамнезе или сохраняющаяся документально зафиксированная кардиомиопатия
Фракция выброса левого желудочка (ФВЛЖ) $< 40\%$ по данным эхокардиограммы (ЭХО-КГ) или мультигейтированной радионуклидной ангиографии (MUGA)

Наличие в анамнезе или присутствие каких-либо клинически значимых сердечных аритмий, например, желудочковой, наджелудочковой, узловых аритмий или нарушения проводимости (классификатор ТВС: ... требуется водитель ритма или не контролируется с помощью лекарственных средств)

Наличие нестабильной фибрилляции предсердий (частота желудочкового ответа > 100 ударов в минуту)

Примечание: Пациенты со стабильной фибрилляцией предсердий могут быть включены в исследование при условии, что они не соответствуют другим критериям исключения по сердцу

Полная блокада левой ножки предсердно-желудочкового пучка (LBBB), двухпучковая блокада

Любые клинически значимые отклонения ST-сегмента и/или Т-зубца от нормы

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Активная инфекция, требующая системной антибиотикотерапии.

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

16. Активный геморрагический диатез или пероральный прием антивитамина К (за исключением низких доз варфарина и аспирина или эквивалента, если международное нормализованное отношение (МНО) $\leq 2,0$).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ния с медицинским представителем эти пациенты могут войти в исследование.

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

Полное воздержание (когда это соответствует предпочтительному и обычному образу жизни пациента). Периодическое воздержание (например, календарный, овуляционный, симптотермальный, постовуляционный методы) и прерванный половой акт не являются приемлемыми методами контрацепции

Стерилизацию женщины (перенесла хирургическую двустороннюю овариэктомию с гистерэктомией или без нее), тотальную гистерэктомию или перевязку маточных труб по меньшей мере за 6 недель до исследуемого лечения. В случае одной овариэктомии, только когда репродуктивный статус женщины был подтвержден последующей оценкой уровня гормонов

Стерилизацию мужчины (по меньшей мере за 6 месяцев до скрининга). Для пациентов-женщин в исследовании партнер-мужчина, перенесший вазэктомию, должен быть единственным партнером для этого пациента

Использование пероральных (эстроген и прогестерон), инъекционных или имплантируемых комбинированных гормональных методов контрацепции или установку внутриматочного устройства (ВМУ) или внутриматочной системы (ВМС), или другие формы гормональной контрацепции, обладающие сопоставимой эффективностью (частота неэффективности <1%), например, гормонального вагинального кольца или трансдермальной гормональной контрацепции

В случае использования пероральной контрацепции женщины должны были стабильно принимать одни и те же пилюли в течение минимум 3 месяцев до начала исследуемого лечения.

Женщины считаются находящимися в постменопаузе и не способными к деторождению, если у них была на протяжении 12 месяцев естественная (спонтанная) аменорея с соответствующим клиническими характеристиками (например, соответствующий возраст, вазомоторные симптомы в анамнезе) или они перенесли хирургическую двустороннюю овариэктомию (с гистерэктомией или без нее) или перевязку маточных труб по меньшей мере 6 недель назад. В случае одной овариэктомии, только когда репродуктивный статус женщины был подтвержден последующей оценкой уровня гормонов, если она считается не способной к деторождению.

Дозолимитирующая токсичность и руководство по коррекции доз.

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

Определения ДЛТ.

Гематологическая ДЛТ определена как:

фебрильная нейтропения или нейтропеническая инфекция 3 или 4 степени нейтропения 4 степени длительностью >7 дней

тромбоцитопения 4 степени

тромбоцитопения 3 степени с клинически значимым кровотечением или тромбоцитопения 3 степени, требующая переливания тромбоцитов

анемия 3 степени, требующая переливания

анемия 4 степени

Негематологическая ДЛТ определена как:

Негематологическая токсичность 4 степени

Негематологическая токсичность 3 степени длительностью >3 дней несмотря на оптимальное поддерживающее лечение или медицинское вмешательство

Случай, соответствующий закону Хая (АСТ и/или АЛТ > 3х ВГН и билирубин > 2х ВГН, и без первоначальных признаков холестаза (активность щелочной фосфатазы в сыворотке (ALP) < 2х ВГН) и при отсутствии другой причины, которая могла бы объяснить комбинацию повышенных уровней трансаминаз и общего билирубина в сыворотке, такой как вирусный гепатит А, В или С, предшествующее или острое заболевание печени, или другое лекарственное средство, способное вызывать наблюдаемое поражение)

Реакция гиперчувствительности/инфузионная реакция 3 степени или выше (независимо от премедикации). Реакцию гиперчувствительности/инфузионную реакцию 3 степени, которая разрешается в течение 8 часов после начала при соответствующем клиническом ведении, не относят к ДЛТ.

Снижение ФВЛЖ до < 40% или снижение > 20% от исходного уровня

Синдром лизиса опухоли 4 степени (СЛО 3 степени не является ДЛТ, если он не приводит к необратимому ишемическому поражению органов)

Следующие состояния не считаются негематологической ДЛТ: Утомляемость 3 степени в течение ≤7 дней

Диарея, тошнота или рвота 3 степени при отсутствии премедикации, которая отвечает на терапию и уменьшается по меньшей мере на 1 степень в течение 3 дней для явлений 3 степени или до ≤ 1 степени в течение 7 дней.

Повышение уровня АСТ или АЛТ $\geq 5 \times \text{ВГН}$, но $\leq 8 \times \text{ВГН}$ без сопутствующего повышения уровня билирубина, который понижается до ≤ 2 степени в течение 5 дней после появления.

Липаза сыворотки или амилаза сыворотки 3 степени в течение ≤ 7 дней, если нет клинических признаков или симптомов панкреатита

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

Коррекция доз.

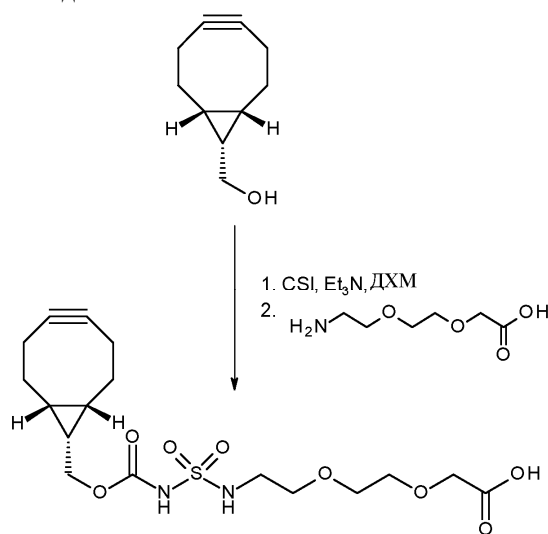
В таблице ниже приведено подробное руководство по управлению специфической токсичностью. Для управления явлениями, не указанными в таблицах, следующее может служить руководством для исследователей.

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

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

Пример 4.

Синтез промежуточного соединения 3.

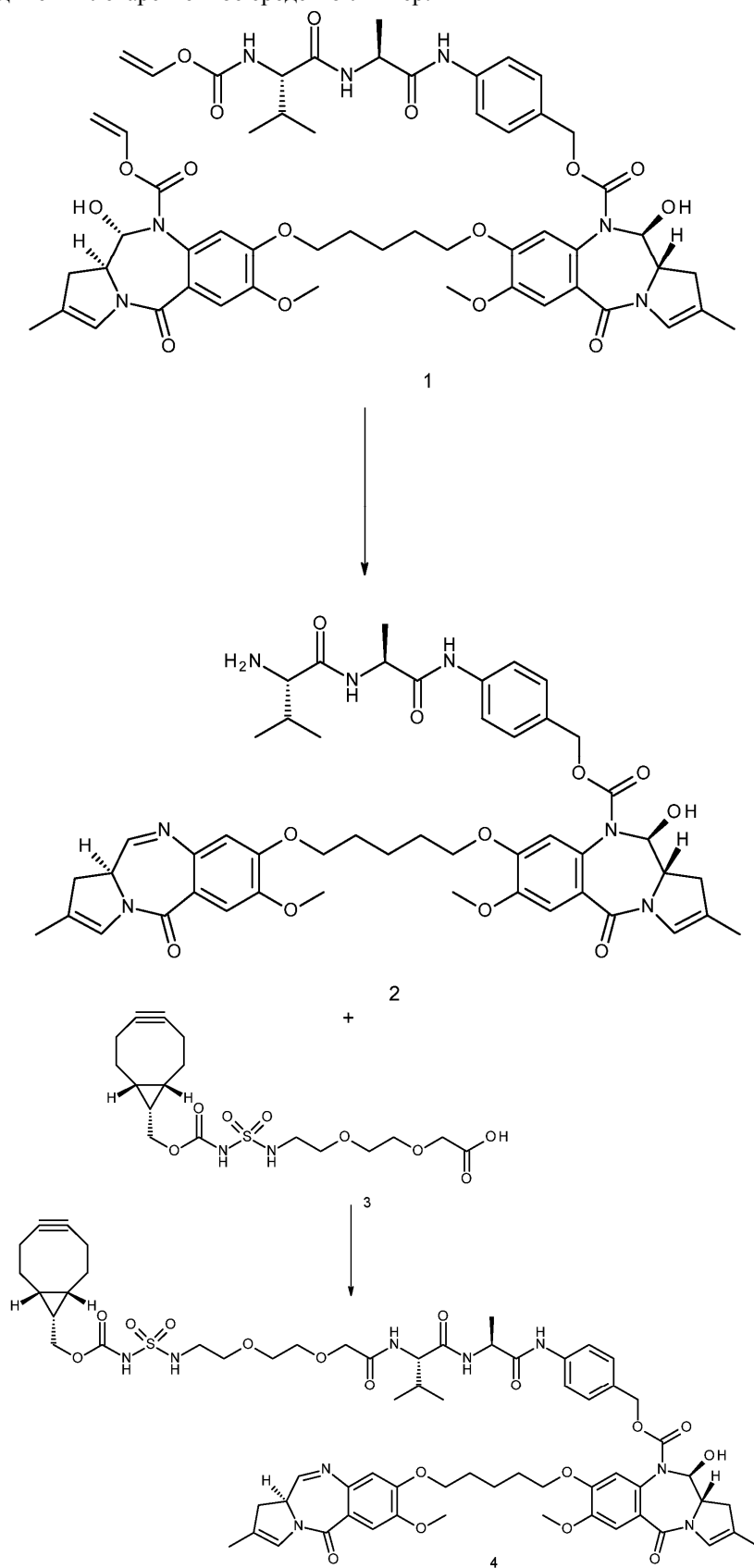


3

Раствор спирта BСN (0,384 г, 2,55 ммоль) в MeCN (25 мл) в атмосфере N₂ охлаждали до 0°C и по каплям добавляли хлорсульфонилоцианат (CSi) (0,255 мл, 415 мг, 2,93 ммоль, 1,15 экв.). После перемешивания в течение 15 минут по каплям добавляли Et₃N (1,42 мл, 1,03 г, 10,2 ммоль, 4 экв.) и продолжали перемешивать в течение еще 10 минут. Затем добавляли раствор 2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)уксусной кислоты (1,0 г, 6,1 ммоль, 2,4 экв.) в H₂O (5 мл) и реакционную смесь перемешивали до комнатной температуры в течение 2 часов. По прошествии этого времени добавляли CHCl₃ (50 мл) и H₂O (100 мл), и разделяли фазы. К водной фазе в делительной воронке добавляли CH₂Cl₂ (100 мл) и pH доводили до 4 с использованием 1N HCl перед разделением фаз. Водную фазу дважды экстрагировали CH₂Cl₂ (2×100 мл), органические фазы объединяли и сушили (Na₂SO₄), фильтровали и концентрировали. Остаток очищали путем колоночной флэш-хроматографии на силикагеле, элюируя CH₂Cl₂ до 20% MeOH в CH₂Cl₂. Получали 0,42 г (1,0 ммоль, 39%) соединения 3 в виде бесцветного липкого воска.

Пример 5.

Синтез соединения лекарственное средство-линкер.



Соединение 1 может быть синтезировано, как описано в WO2014/057074 - см. соединение 22.

(а) Взвешивали тетракистрифенилфосфинпалладий ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 4,8 мг, 4,15 мкмоль) и помещали в инертную атмосферу. Раствор пирролидина (5,0 мкл, 4,3 мг, 60 мкмоль) в ДХМ (1 мл) дегазировали путем барботирования раствора N_2 . Раствор соединения 1 (27 мг, 24 мкмоль) в ДХМ (6 мл) дегазировали

путем барботирования раствора N_2 . Продолжая барботировать раствор N_2 , добавляли дегазированный раствор пирролидина. Взвешенный $Pd(PPh_3)_4$ растворяли в ДХМ (1 мл) и добавляли 0,9 мл этого раствора. После барботирования N_2 в течение 50 минут добавляли ДХМ (25 мл) и смесь промывали водным насыщенным NH_4Cl (25 мл). После разделения водную фазу экстрагировали ДХМ (2×25 мл). Объединенные органические фазы сушили (Na_2SO_4) и концентрировали. Остаток очищали путем ОФ-ВЭЖХ (30-90% MeCN (0,1% муравьиная кислота) в H_2O (0,1% муравьиная кислота)). Объединенные фракции пропускали через колонки для твердофазной экстракции (ТФЭ) (HCO_3^-) и концентрировали. После добавления MeCN (50 мл) смесь снова концентрировали. Полученный остаток 2 использовали на следующем этапе.

Превращение реакционной смеси можно контролировать посредством анализа ЖХ-МС. Колонка: Колонка XBridge BEH C18 Intelligent Speed (IS), 130Å, 3,5 мкм (4,6 мм×20 мм). Подвижная фаза А: Вода (0,1% муравьиная кислота), подвижная фаза В (0,1% муравьиная кислота). Детектирование с помощью детектора с фотодиодной матрицей (PDA) и электрораспылительной ионизации (ESI +). Образцы могут быть получены путем разведения реакционной смеси MeCN.

(b) К раствору вышеуказанного остатка 2 в $CHCl_3$ (5 мл) добавляли раствор соединения 3 (15 мг, 36 мкмоль, молекулярная масса 418 г/моль) в $CHCl_3$ (0,8 мл). Полученную смесь добавляли к твердому EDC.HCl (4,7 мг, 25 мкмоль), добавляли $CHCl_3$ (5 мл) и смесь перемешивали в течение 30 минут. Добавляли ДХМ (30 мл) и полученную смесь промывали водой (30 мл). После разделения водную фазу экстрагировали ДХМ (30 мл). Объединенные органические фазы сушили (Na_2SO_4) и концентрировали. Остаток очищали путем ОФ-ВЭЖХ (30-90% MeCN (без кислоты) в H_2O (0,01% муравьиная кислота)). Пробирки ВЭЖХ для сбора заполняли 5% водным $(NH_4)HCO_3$ перед сбором. Объединенные ВЭЖХ-фракции экстрагировали ДХМ (3×20 мл). Объединенные органические фазы сушили (Na_2SO_4) и концентрировали. Получали продукт 4 в виде слегка желтого/белого масла (21 мг, 16 мкмоль, молекулярная масса 1323 г/моль, 67% за два этапа).

Превращение реакционной смеси можно контролировать посредством анализа ЖХ-МС. Колонка: Колонка XBridge BEH C18 Intelligent Speed (IS), 130Å, 3,5 мкм (4,6 мм×20 мм). Подвижная фаза А: Вода (0,1% муравьиная кислота), подвижная фаза В (0,1% муравьиная кислота). Детектирование с помощью PDA и ESI +.

Пример 6.

Модификация антитела.

Условия реакции.

Условия реакции для однореакторного ремоделирования гликана были следующими:

15 мг/мл антитела к AXL (~0,1 mM) 0,15 мг/мл EndoSH (1 мас.%) из *Streptococcus pyogenes*

1,13 мг/мл His-TnGalNAcT (7,5 мас.%) фермент галактозо-N-ацетилтрансфераза (GalNAcT)

2,5 mM 6-N₃GalNAc-UDP (25 экв. по сравнению с IgG)

10mM MnCl

25 mM Трис-HCl, pH 8,0

150 mM NaCl

Инкубация в течение 16 часов при 30°C

Методика.

Этот пример в 25 мг-масштабе, который может быть изменен при необходимости. Отдельные компоненты добавляли по порядку и смешивали:

106,5 мкл 25 mM Трис pH 8,0, 150 mM NaCl (с получением конечного объема 1667 мкл)

1 мл 25 мг/мл антитела к AXL в 25 mM Трис pH 8,0, 150 mM NaCl

71,4 мкл 3,5 мг/мл EndoSH в 25 mM Трис pH 8,0

389 мкл 4,82 мг/мл His-TnGalNAcT в 25 mM Трис pH 8,0

16,7 мкл 1M MnCl₂ в MQ

83,4 мкл 0,1 M 6-N₃GalNAc-UDP в MQ

Эта смесь в течение приблизительно 16 часов при 30°C. Оставшуюся часть модифицированного остатка галактозы можно оценить путем подвергания образца МС-анализу. После аффинной очистки с помощью белка А маленький образец продукта может быть восстановлен DTT, а затем подвергнут МС-анализу. Типичный масс-спектр успешной реакции переноса демонстрирует образование одного основного продукта (90% от общей тяжелой цепи), полученного в результате переноса модифицированной галактозы в Ab, содержащее в качестве заместителя коровый GlcNAc(Fuc), и побочного продукта (± 10% от общей тяжелой цепи), полученного в результате переноса модифицированной галактозы в Ab, содержащее в качестве заместителя коровый GlcNAc (без фукозы).

Методика очистки.

Буферы.

Связывающий/промывочный буфер (TBS, pH 7,5):

20 mM Трис-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

Промывочный буфер для удаления эндотоксина (TBS, pH 7,5 + Тритон-X100):

20 mM Трис-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

0,2% Тритон X-100 Элюирующий буфер:

0,1 M глицин, pH 2,7

CIP-буфер:

0,5 M NaOH

Методика.

1. Для очистки колонки перед введением образца промывали колонку MAbSelectSure 5 мл (5 мл/мин) следующими буферами:

Колонку промывали TBS pH 7,5 по меньшей мере 5 объемами колонки (ОК)

Колонку промывали 15 ОК 0,5 M NaOH Колонку промывали 5 ОК TBS pH 7,5

Колонку промывали 5 ОК глицином pH 2,7 Колонку промывали TBS pH 7,5 до получения естественного pH

2. Удаляли осадок из реакционной смеси путем центрифугирования (5 минут при 4000g) или путем фильтрации (0,22 или 0,45 мкм фильтр).

3. Загружали образец при 2 мл/мин и выполняли следующие этапы 5 мл/мин:

Промывали по меньшей мере 20 ОК TBS = 0,2% Тритон X-100

Промывали по меньшей мере 20 ОК TBS

Элюировали 0,1 M глицином pH 2,7

4. Фракции сразу же нейтрализовали путем добавления 1/5 объема 1 M Трис-HCl pH 8,0 и перемешивания.

5. Образец диализировали против $3 \times \geq 50$ объемов ФБР, pH 7,4, при 4°C ($3 \times \geq 1$ часа).

6. Образец концентрировали с использованием спинфильтров до ~20 мг/мл.

Пример 7.

Конъюгация соединения 4 с модифицированным антителом с получением КонъюгА.

Условия реакции:

15 мг/мл азидо-модифицированного антитела к AXL (0,1 M IgG)

0,5 mM соединения 4 (5 экв. относительно IgG = 2,5 экв. на азид)

10% ДМФА или 25% пропиленгликоль

ФБР, pH 7,4

Методика.

1. Добавляли 9 объемов 16,67 мг/мл азидо-модифицированного антител в ФБР, pH 7.

2. Добавляли 1 объем 5 mM соединения 4 в ДМФА и сразу же перемешивали.

3. Инкубировали в течение ночи.

4. Измеряли превращение путем ОФ-ВЭЖХ и МС.

Пример 8.

Очистка ADC.

Подготовка образца.

Перед загрузкой в колонку выполняли следующие требования:

Органический растворитель $\leq 5\%$

Общий объем образца $\leq 3\%$ от ОК (≤ 720 мкл для Superdex 200 10/300 GL и ≤ 10 мл для Superdex 200 HiLoad 26/600)

Отсутствие преципитирующих агентов

Вышеуказанные требования выполняли с использованием следующей методики.

1. Образец разводили ФБР, pH 7,4, до конечной концентрации органического растворителя $\leq 5\%$.

2. Если объем превышал 3% от ОК, образец концентрировали с использованием центрифужных фильтров Amicon Ultra (номинальное отсечение по молекулярной массе (MWCO) 10 кДа).

3. Возможный осадок удаляли путем центрифугирования (10 минут при 13000 об/мин в настольной центрифуге).

Очистка.

Очистку осуществляли с использованием колонки Superdex 200 10/300 GL (ОК = 23 мл, GE Healthcare) на Akta Purifier-10. Выполняли следующие этапы промывки со скоростью потока 0,5 мл/мин:

Колонку промывали 1 ОК воды

Колонку промывали 1 ОК 0,5 M NaOH

Уравновешивали колонку ФБР pH 7,4 (Sigma, D8537) до достижения нейтрального pH

Вводили образец с 0,5 мл/мин ФБР, pH 7,4 и собирали 1 мл фракций (общий прогон = 1,5 ОК)

Фракции мономеров объединяли в пул и диализировали при 4°C против 3×1 л буфера для приготовления состава (30 mM гистидин, 200 mM сорбитол, 0,02% (мас./об.) твин-20, pH 6,0).

Образцы стерилизовали путем фильтрации с использованием 0,22 мкм фильтра, мгновенно замораживали с использованием жидкого азота и хранили при -80°C.

Масс-спектральный анализ образца, расщепленного FAbicator, показал один основной продукт (наблюдаемая масса 25691 Да, приблизительно 90% от общего фрагмента Fc/2), соответствующий конъюгированному фрагменту Fc/2. Анализ восстановленного образца путем ОФ-ВЭЖХ показал среднее значение DAR, составляющее 1,98.

Пример 9.

Цитотоксичность *in vitro*.

Клетки H1299 получали от Американской коллекции типовых культур (ATCC) (ATCC-номер CRL-5803). Среда H1299 представляла собой модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM) с добавлением 10% FBS Gibco. Клетки выращивали при 37°C, 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе. Суспензии клеток вносили в 96-луночные планшеты с плоским дном (104 клетки на лунку). Готовили серию 8 × 10-кратных разведений исходного ADC в среде для культивирования клеток. Каждое разведение ADC (50 мкл на лунку) распределяли по 4 повторным лункам 96-луночного планшета, содержащим суспензию клеток. Контрольные лунки готовили путем добавления только такого же объема культуральной среды. После инкубации в течение 96 часов жизнеспособность клеток измеряли путем анализа с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолия (MTS) (Promega, номер по каталогу G5421) в соответствии с инструкциями производителя. Поглощение измеряли при 490 нм. Выживаемость клеток (%) рассчитывали из среднего значения поглощения в 4 обработанных ADC лунках по сравнению со средним значением поглощения в 4 контрольных лунках (100%). Получали кривые доза-ответ на основе средних данных трех повторных экспериментов, и определяли значения EC₅₀ путем подгонки данных к сигмоидальной кривой доза-ответ с изменяемым наклоном с использованием Prism (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния). Планки погрешностей показывают стандартное отклонение (SD).

Обнаруживали, что EC₅₀ для КонъюгА составляла 0,0554 мкг/мл.

Пример 10.

Анализ связывания антигена.

На планшеты Maxisorp наносили при +4°C антиген Axl человека на ночь (50 нг/лунка; партия в ФБР). Нерекреципируемые сайты блокировали буфером SuperBlock (в течение ночи при +4°C или комнатной температуре). Готовили серию 8 × 3-кратных или 5-кратных разведений исходного ADC в буфере для образца/ФБР/Твин20. Каждое разведение ADC (60 мкл/лунка) распределяли по 4 повторным лункам планшета с покрытием. Контрольные лунки готовили путем добавления такого же объема буфера для образца/ФБР/Твин20. Конъюгат антитела к каппа-IgG человека-пероксидаза хрена (HRP) использовали в качестве вторичного антитела (1:5000, 1 час при комнатной температуре). HRP детектировали с помощью раствора субстрата 1-Step Ultra TMB-ELISA (75 мкл/лунка; 5 минут при комнатной температуре). Реакцию субстрата останавливали с помощью 0,6 М HCl (75 мкл/лунка). Оптическую плотность измеряли при 450 нм на Envision с использованием программы для пероксидазы 450 нм. Получали кривые связывания антигена на основе средних данных 3 повторных экспериментов с использованием Prism (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния). На фиг. 2 представлены полученные результаты, где ▲ представляет собой КонъюгА. Планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего (SEM). КонъюгА связывался с высокой аффинностью с внеклеточным доменом AXL, нанесенного на планшеты.

Пример 11.

Исследование эффективности *in vivo*.

5×10⁶ клеток опухоли MDA-MB-231 подкожно имплантировали самкам бестимусных голых мышей. Дозирование ADC совместно с носителем или тестируемым соединением начинали, когда объемы опухоли достигали 88-172 мм³. КонъюгА вводили внутривенно (в/в) путем инъекции в хвостовую вену один раз на уровне дозы, составляющем 1 мг/кг. Объем дозирования составлял 10 мл/кг массы тела и его увеличивали до массы тела каждого отдельного животного. Животных подвергали эвтаназии, если объем опухоли у них достигал конечного объема 1500 мм³ или в конце исследования в зависимости от того, что происходило раньше. В течение периода исследования осуществляли мониторинг массы тела животных, признаков любых нежелательных побочных эффектов, связанных с лечением, и клинических признаков. Для расчета среднего объема опухоли в группе применяли следующее правило: когда животное выходило из исследования из-за размера опухоли, конечный объем опухоли, зафиксированный для указанного животного, включали в данные, используемые для расчета среднего объема в последующее временные точки. Значения объема опухоли и массы тела не использовали для расчета средних объемов опухоли в группе/массы тела, когда в исследовании оставалось менее 50% животных в группе. Prism (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния) использовали для графического представления и статистического анализа. На фиг. 3 представлены полученные результаты, где ▲ представляет собой КонъюгА, и ○ представляет собой один носитель. Планки погрешностей показывают SEM.

Однократная доза, составляющая 1 мг/кг КонъюгА, сильно ингибировала рост опухоли, при этом у 10/10 мышей не было опухоли через 60 дней после дозирования.

Пример 12.

Токсикологическое исследование у крыс.

Метод.

КонъюгА оценивали в исследовании переносимости однократной внутривенной дозы у крыс. Самцам крыс Sprague-Dawley (n=3/группа) вводили 3 и 6 мг/кг КонъюгА в 1 день, и проводили вскрытие в 21 день после дозирования. Часто контролировали массу тела и потребление пищи с прижизненным взятием образцов для определения клинической патологии (кровь в 8 и 21 дни) и повторяли взятие образцов для определения фармакокинетики. При вскрытии осуществляли макроскопические наблюдения и определяли массу выбранных органов, и сохраняли их для возможной гистопатологии.

КонъюгА клинически хорошо переносился в дозе 3 и 6 мг/кг. Прибавка массы тела снижалась на 11 и 21% в группах 3 и 6 мг/кг соответственно, что соответствовало уменьшению потребления пищи. На 8 день происходило снижение нескольких гематологических параметров, главным образом, в группе дозы 6 мг/кг (ретикулоциты (-76%), гемоглобин (-29%), лейкоциты (-66%) и тромбоциты (-37%)), с некоторым данными восстановления к 21 дню. При вскрытии у всех животных наблюдали уменьшение массы вилочковой железы. Соответственно, максимальная переносимая доза (MTD) для КонъюгА составляла 6 мг/кг.

Пример 13.

Синергия в клетках SN12C (с высоким уровнем экспрессии AXL) между ADCxAXL и каждым из: цитарабина, децитабина, гемцитабина, олапариба и флударабина.

Клетки высевали в 1 день в количестве 10000 клеток/лунка в 96-луночные планшеты, по три повторности на эксперимент и суммарное n равно 3. Во 2 день добавляли комбинированное лекарственное средство в различных дозах (см. фигуры) и инкубировали в течение 24 часов при 37°C, 5% CO₂. Одновременно добавляли контроль только лекарственным средством в следующем диапазоне доз, все в 10-кратном разведении.

В 3 день ADCxAXL добавляли к клеткам, содержащим лекарственное средство, или только среды в качестве контроля в диапазоне доз 0,001 nM - 100 nM в 10-кратном разведении и инкубировали в течение еще 5 дней (3 × время удвоения клеток). Поглощение анализировали при 492 nM на планшет-ридере Multiskan Ascent Thermo Labsystems с использованием анализа MTT.

Данные анализировали с использованием Graphpad Prism v5.02 и строили график синергии с использованием Calcsupn v2.11. Сильная синергия указывает на значение комбинаторного индекса (CI) <0,7 - умеренная синергия имеет значение CI > 0,7 и <1.

Результаты представлены на фиг. 4 (цитарабин), фиг. 5 (флударабин), фиг. 6 (децитабин), фиг. 7 (олапариб) и фиг. 8 (гемцитабин).

Пример 14.

Синергия между ADCxAXL и каждым из MEKi и BRAFi MEKi.

Примерами подходящих ингибиторов MEK являются такие ингибиторы, как траметиниб, кобиметиниб, биниметиниб, селуметиниб, U0126 или PD325901.

Ингибиторы MEK (MEKi) ингибируют ферменты митоген-активируемой протеинкиназы, MEK1 и/или MEK2. Их можно применять для воздействия на путь MAPK/ERK, который зачастую сверхактивен в некоторых раковых опухолях. Дефекты в пути MAP/ERK могут приводить к неконтролируемому росту, особенно при меланоме. Следовательно, ингибиторы MEK обладают активностью в отношении лечения некоторых видов рака, особенно BRAF-мутированной меланомы и KRAS/BRAF-мутированного рака толстой и прямой кишки (Wang et al., Biochim. Biophys. Acta 1773(8): 1248-1255 (2007)). Интересно, что согласно Miller et al (Cancer Discovery 6(4):382-399, 2016) инкубация клеток опухоли совместно с MEKi (U0126 или PD325901) индуцировала сильное накопление AXL на мембране клеток опухоли.

Траметиниб.

Траметиниб (торговое название Мекинист) представляет собой ингибитор MEK, ингибирующий MEK1 и MEK2. Он одобрен для лечения пациентов с метастатической меланомой с V600E-мутацией в BRAF. Указанная мутация V600E делает мутантный ген BRAF конститутивно активным, управляющим пролиферацией меланомы. Путем ингибирования пути MAP/ERK блокируют пролиферацию клеток и индуцируют апоптоз (контролируемую гибель клеток).

Комбинирование ADCxAXL, который направленно воздействует на AXL-положительные опухоли, с MEKi является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADCxAXL будет непосредственно уничтожать AXL-положительные клетки опухоли по механизмам, зависящим от перекрестного сшивания ДНК и приводящим к апоптозу, в то время как, с другой стороны, MEKi будет индуцировать апоптоз через нарушение пролиферации клеток путем ингибирования пути передачи клеточного сигнала MAP/ERK. Кроме того, комбинирование ADCxAXL с MEKi является предпочтительным, поскольку повышающая регуляция AXL MEKi-ингибитором будет увеличивать поглощение ADCxAXL клетками опухоли, что приводит к большему накоплению димера PBD и последующему повреждению ДНК, ведущему к большей гибели раковых клеток.

Для демонстрации того, что совместная обработка AXL-положительных линий раковых клеток конъюгатом ADCxAXL и MEKi оказывает аддитивный или синергетический противоопухолевый эффект, панель линий клеток, включая, но не ограничиваясь ими, MDA-MB231, SN12C, MDA-MB-157 и SKLU1, предварительно инкубировали с клетками с MEKi на протяжении до 24 часов (1 или 10 мкМ), а затем до-

бавляли серийные разведения ADCxAXL (или B12-PL1601 в качестве контроля). После инкубации измеряли цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов CellTiter-Glo® или MTS).

В качестве альтернативы, панель линий клеток, включая, но не ограничиваясь ими, MDA-MB231, SN12C, MDA-MB-157 и SKLU1, совместно обрабатывали диапазоном концентраций как ADCxAXL, так и MEK1.

В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток совместно обрабатывали диапазоном концентраций траметиниба или диапазоном концентраций ADCxAXL и носителя.

После инкубации измеряли цитотоксичность комбинаций *in vitro* (определяемую путем анализов CellTiter-Glo® или MTS). Процент жизнеспособности клеток рассчитывали по сравнению с необработанным контролем. Цитотоксическую синергию рассчитывали путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса с использованием программы анализа CalcuSyn.

BRAFⁱ.

Примерами подходящих ингибиторов BRAF являются такие ингибиторы, как вемурафениб и дабрафениб. Ингибитор BRAF непосредственно ингибирует (мутированный) белок B-RAF. Мутации в BRAF могут приводить к неконтролируемому росту, особенно при меланоме.

Вемурафениб.

Вемурафениб (торговое название Зелбораф) непосредственно ингибирует B-RAF. Он одобрен для лечения пациентов с меланомой на поздней стадии, управляемой геном B-RAF с V600E-мутацией. Мутации делают мутантный ген BRAF конститутивно активным, управляющим пролиферацией меланомы. Путем ингибирования мутированного B-RAF блокируют пролиферацию клеток и индуцируют апоптоз (контролируемую гибель клеток).

Комбинирование ADCxAXL, который направленно воздействует на AXL-положительные опухоли, с вемурафенибом является предпочтительным, поскольку, с одной стороны, ADCxAXL будет непосредственно уничтожать AXL-положительные клетки опухоли по механизмам, зависящим от перекрестного сшивания ДНК и приводящим к апоптозу, в то время как, с другой стороны, вемурафениб будет индуцировать апоптоз через нарушение пролиферации клеток путем ингибирования BRAF.

Для демонстрации того, что ADCxAXL действует синергетически с вемурафенибом, панель линий AXL (+) клеток, включая, но не ограничиваясь ими, клетки MDA-MB231, NCI-H1299 и SNU12, совместно обрабатывали диапазоном концентраций как ADCxAXL, так и вемурафениба.

В качестве отрицательных контролей эту же панель линий клеток совместно обрабатывали диапазоном концентраций траметиниба или диапазоном концентраций ADCxAXL и носителя.

После инкубации измеряли цитотоксичность комбинаций *in vitro* путем анализа MTS. Для определения цитотоксичности жизнеспособность клеток измеряли путем добавления MTS в каждую лунку и инкубации в течение 4 часов при 37°C. Процент жизнеспособности клеток рассчитывали по сравнению с необработанным контролем. Цитотоксическую синергию рассчитывали путем преобразования данных о жизнеспособности клеток в пораженную фракцию и расчета комбинаторного индекса с использованием программы анализа CalcuSyn.

Пример 15.

Синергия в отношении AXL+ неопластических клеток между ADCxAXL и каждым из иммуноонкологических (ИО) вторичных агентов: антагонистов PD1, антагонистов PDL1, антагонистов CTLA4, агонистов OX40 и агонистов GITR.

Антагонисты PD1.

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против AXL, комбинированный с антагонистом PD1, аддитивный или синергетический эффект, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей (модели, потенциально подходящие для AXL, включают 4T1, EMT-6, EMT-6-BRCA1 (-/-), EMT-6-BRCA1 (+/-), 4T1-BRCA1 (+/-), KLN 205, Lewis Lung, Madison109 Colon26, CT26, MC38, GL261, B16F10, CloudmanS91, Pan02, Rensa и MBT-2). Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с AXL мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с антагонистом PD1 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, экспрессирующей AXL. ADC вводили до антагониста PD1, одновременно с антагонистом PD1 или после антагониста PD1 по решению экспериментатора.

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

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

Антагонисты PDL1.

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против Axl, комбинированный с антагонистом PDL1, аддитивный или синергетический эффект, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с AXL мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с антагонистом PDL1 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, экспрессирующей AXL. ADC вводили до антагониста PDL1, одновременно с антагонистом PDL1 или после антагониста PDL1 по решению экспериментатора.

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

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

Антагонисты CTLA4.

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

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

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

Агонисты OX40.

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

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

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

Агонисты GITR.

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

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

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

Пример 16.

Синергия в отношении AXL- неопластических клеток между ADCxAXL и каждым из иммуноонкологических (ИО) вторичных агентов: антагонистов PD1, антагонистов PDL1, антагонистов CTLA4, агонистов OX40 и агонистов GITR.

AXL также экспрессируется на иммунных клетках, которые инфильтрируют локальное окружение опухоли и которые могут оказывать супрессивное действие на врожденный иммунный ответ на опухоль. Примерами таких клеток являются NK-клетки, дендритные клетки или макрофаги. ADCxAXL можно применять для направленного воздействия на эти иммунные клетки и он будет уничтожать иммуносупрессивные клетки, усиливая иммунный ответ.

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

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

Антагонисты PD1.

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

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

Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним антагонистом PD1. Антагонисты PD-L1

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

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

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

Антагонисты CTLA4.

Для тестирования того, демонстрирует ли ADC на основе PBD против AXL, комбинированный с антагонистом CTLA4, аддитивный или синергетический эффект в отношении опухолей, не экспрессирующих AXL, комбинацию тестировали *in vivo* в модели сингенной опухоли у иммунокомпетентных мышей. Для этой цели антитело, перекрестно реагирующее с Axl мыши, конъюгировали с PBD активной группой и этот ADC вводили совместно с антагонистом CTLA4 мышам с трансплантированной линией клеток опухоли мыши, которая, как известно, содержит высокие уровни инфильтрирующих клеток (например, дендритных клеток, NK-клеток или макрофагов), такой как, но не ограничиваясь ими, MC38 и CT26. ADC вводили до антагониста CTLA4, одновременно с антагонистом CTLA4 или после антагониста CTLA4 по решению экспериментатора.

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

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

Агонисты OX40.

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

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

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

Агонисты GITR.

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

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

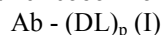
Проводили статистический анализ (как правило, лог-ранговый критерий) с определением того, показали ли мыши, которых лечили комбинацией, лучшие результаты по сравнению с мышами, которых лечили либо одним ADC, либо одним агонистом GITR.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у индивидуума, включающий введение первой композиции, содержащей конъюгат анти-AXL антитело - лекарственное средство (анти-AXL ADC), в комбинации со второй композицией, содержащей вторичный агент,

где вторичный агент представляет собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист GITR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), агонист OX40, ингибитор PARP (PARPi), ингибитор AXL-киназы (AXLi) или ингибитор BRAF (BRAFi); и

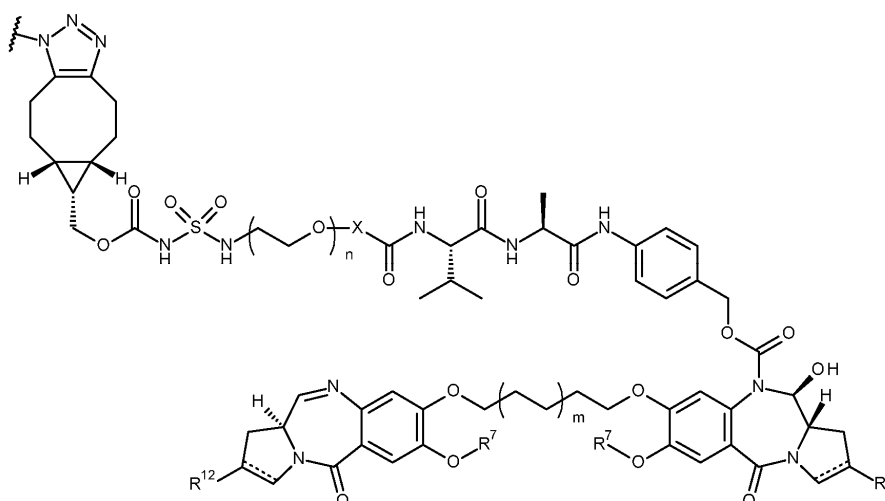
где указанный анти-AXL ADC представляет собой конъюгат формулы (I):



где:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с AXL;

DL представляет собой



где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, $-\text{CH}_2-$ и $-\text{C}_2\text{H}_4-$;

n равен от 1 до 8;

m представляет собой 0 или 1;

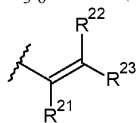
R^7 представляет собой либо метил, либо фенил;

в случае, если присутствует двойная связь между C2 и C3, R^2 выбран из группы, состоящей из:

(ia) C_{5-10} арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

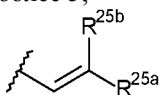
(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

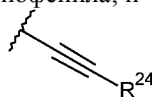


(id) , где каждый из R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила,

C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;

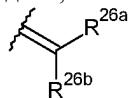


(ie) , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила;

циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; в случае, если присутствует одинарная связь между C2 и



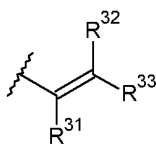
C3, R^2 представляет собой , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

в случае, если присутствует двойная связь между C2' и C3', R^{12} выбран из группы, состоящей из:

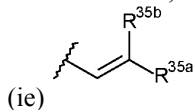
(ia) C_{5-10} арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;



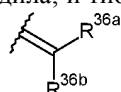
(id) , где каждый из R^{31} , R^{32} и R^{33} независимо выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R^{34} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; в случае, если присутствует одинарная связь между $C2'$ и



$C3'$, R^{12} представляет собой , где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и

C_{1-4} алкилового сложного эфира;

и p равен от 1 до 8.

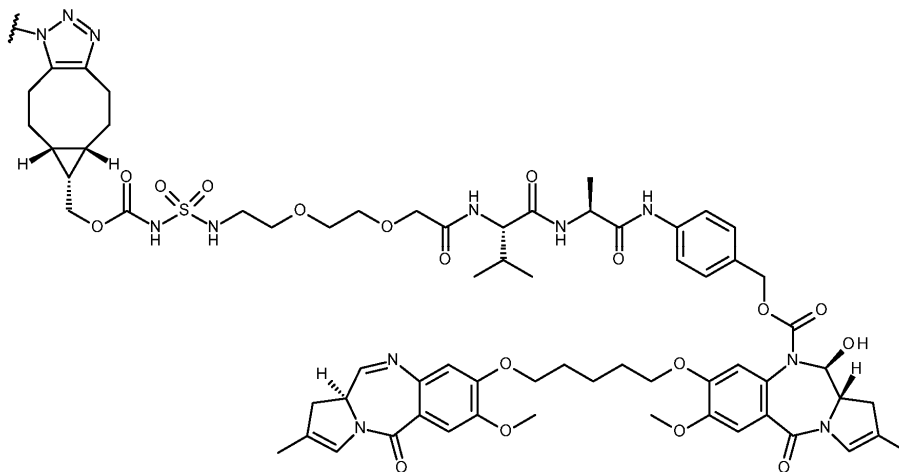
2. Способ по п.1, где указанный анти-AXL ADC имеет химическую структуру:

Ab - (DL)_p (I)

где:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с AXL; и

DL представляет собой:



3. Способ по п.1, где Ab представляет собой антитело, содержащее:

(a) тяжелую цепь, имеющую последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 3; и

(b) легкую цепь, имеющую последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 4.

4. Способ по п.1, характеризующийся тем, что лечение:

i) включает введение указанного анти-AXL ADC до вторичного агента, одновременно с вторичным агентом или после вторичного агента; и/или

ii) дополнительно включает введение химиотерапевтического агента.

5. Способ по п.1, характеризующийся тем, что:

i) указанный индивидуум представляет собой человека;

ii) у индивидуума есть нарушение или у него определен рак;

iii) у индивидуума есть или определен рак, характеризующийся присутствием новообразования, содержащего как AXL+, так и AXL- клетки;

iv) у индивидуума есть или определен рак, характеризующийся присутствием новообразования, содержащего или состоящего из AXL- неопластических клеток;

v) у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий AXL, или AXL+ опухолеассоциированные неопухолевые клетки, такие как AXL+ инфильтрирующие клетки, при этом необязательно AXL+ инфильтрирующие клетки представляют собой дендритные клетки, клетки-естественные киллеры (NK-клетки) или макрофаги; и/или

vi) у индивидуума есть или определен рак, экспрессирующий PD-L1.

6. Способ по п.1, где:

i) рак или новообразование представляет собой всю или часть солидной опухоли; и/или

ii) рак выбран из группы, включающей: рак молочной железы, рак легкого, рак желудка, рак головы и шеи, рак толстой и прямой кишки, рак почки, рак поджелудочной железы, рак матки, рак печени, рак мочевого пузыря, рак эндометрия, рак предстательной железы, неходжкинскую лимфому (НХЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), иммунное нарушение, сердечно-сосудистое нарушение, тромбоз, диабет, нарушение, связанное с иммунными контрольными точками, и фиброзное нарушение.

7. Способ по п.1, характеризующийся тем, что вторичный агент представляет собой:

i) антагонист PD1, выбранный из пембролизумаба, ниволумаба, MEDI0680, PDR001 (спартализу-маб), камрелизумаба, AUNP12, пидилизумаба, цемиплимаба (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (тисле-лизумаба) или BGB-108;

ii) антагонист PD-L1, выбранный из атезолизумаба (Тецентрик), BMS-936559/MDX 1105, дурвалу-маба/MEDI4736 или MSB0010718C (авелумаба);

iii) агонист G1TR, выбранный из MEDI1873, TRX518, GWN323, МК-1248, МК 4166, BMS-986156 и INCAGN1876;

iv) агонист OX40, выбранный из MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, IN- CAGN1949, GSK3174998 и PF-04518600;

v) PARPi, выбранный из олапариба, CEP-9722, BMN-673/галазопариба, рукапариба, инипари-ба/SAR24-550/BSI-201, велипариба (ABT-888), нирапариба/МК-4827, BGB-290, 3-аминобензамида и E7016;

vi) AXLi, выбранный из BGB324 (бемцентиниб), TP0903, гилтеритиниб (ASP2215), кабозантиниб (XL184), SGI7079, мерестиниб, амуватиниб (MP-470), босутиниб (SKI-606), MGCD265 и форетиниб (GSK1363089/XL880); или

vii) BRAFi, выбранный из вемурафениба, PLX4720, дабрафениба, сорафениба, энкорафениба и GDC0879.

8. Способ по п.1, в котором вторичный агент представляет собой олапариб.

9. Применение первой композиции, содержащей конъюгат анти-AXL антитело - лекарственное средство (анти-AXL ADC), для лечения рака у индивидуума, причем указанное лечение включает введение первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей вторичный агент,

где вторичный агент представляет собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист G1TR (глюко-кортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), агонист OX40, ингибитор PARP (PARPi), инги-битор AXL-киназы (AXLi) или ингибитор BRAF (BRAFi); и

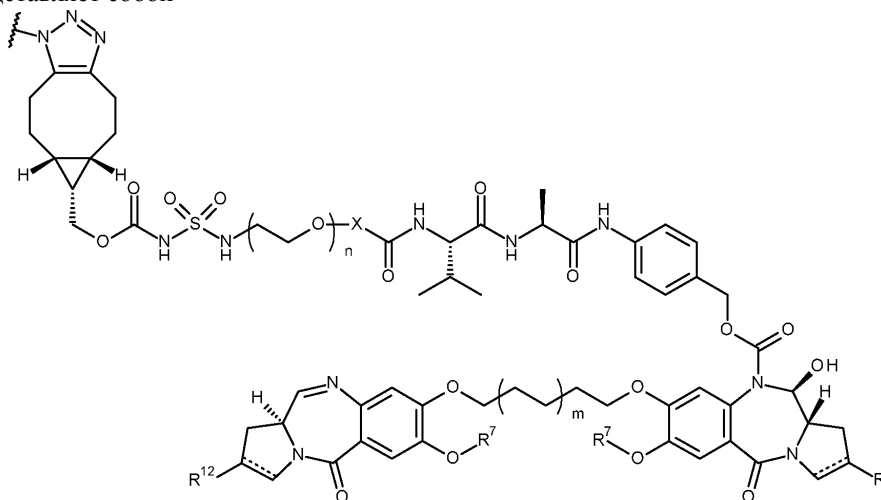
где указанный анти-AXL ADC представляет собой конъюгат формулы (I):



где:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с AXL;

DL представляет собой



где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, -CH₂- и -C₂H₄-;

p равен от 1 до 8;

m представляет собой 0 или 1;

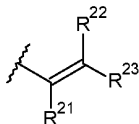
R⁷ представляет собой либо метил, либо фенил;

в случае, если присутствует двойная связь между C2 и C3, R² выбран из группы, состоящей из:

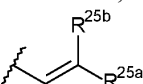
(ia) C₅₋₁₀ арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇ гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;

(ib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;

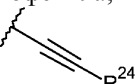
(ic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;



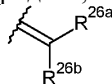
(id) , где каждый из R²¹, R²² и R²³ независимо выбраны из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R¹² составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R²⁴ выбран из: H; C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; в случае, если присутствует одинарная связь между C2 и C3, R²



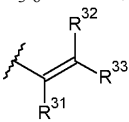
представляет собой , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C₁₋₄ алкиламида и C₁₋₄ алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C₁₋₄ алкилового сложного эфира;

в случае, если присутствует двойная связь между C2' и C3', R¹² выбран из группы, состоящей из:

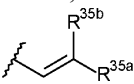
(ia) C₅₋₁₀ арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇ гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;

(ib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;

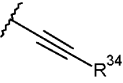
(ic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;



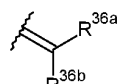
(id) , где каждый из R³¹, R³² и R³³ независимо выбраны из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R¹² составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R³⁴ выбран из: H; C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; в случае, если присутствует одинарная связь между C2' и C3',



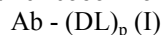
R¹² представляет собой , где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C₁₋₄ алкиламида и C₁₋₄ алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C₁₋₄ алкилового сложного эфира; и

p равен от 1 до 8.

10. Применение первой композиции, содержащей вторичный агент, для лечения рака у индивидуума, причем указанное лечение включает введение первой композиции в комбинации со второй композицией, содержащей конъюгат анти-AXL антитело - лекарственное средство (анти-AXL ADC),

где вторичный агент представляет собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист G1TR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), агонист OX40, ингибитор PARP (PARPi), ингибитор AXL-киназы (AXLi) или ингибитор BRAF (BRAFi); и

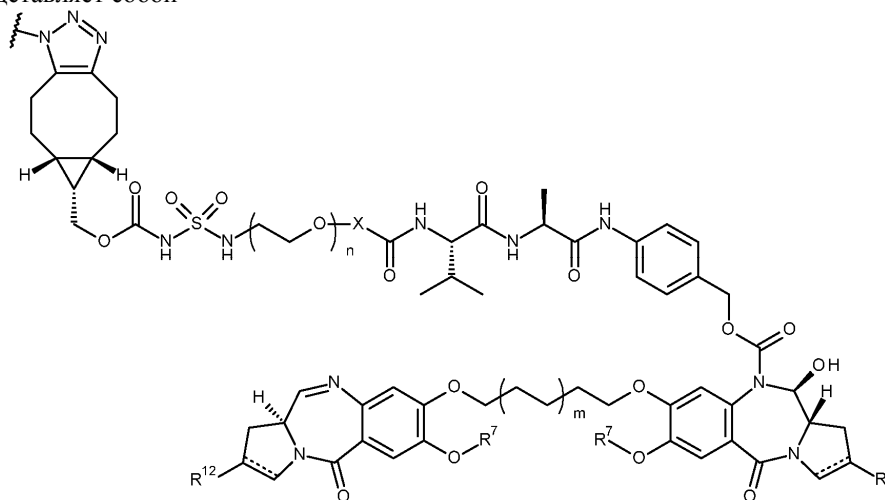
где указанный анти-AXL ADC представляет собой конъюгат формулы (I):



где:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с AXL;

DL представляет собой



где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, $-\text{CH}_2-$ и $-\text{C}_2\text{H}_4-$;

n равен от 1 до 8;

m представляет собой 0 или 1;

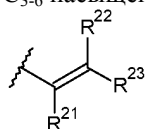
R^7 представляет собой либо метил, либо фенил;

в случае, если присутствует двойная связь между C2 и C3, R^2 выбран из группы, состоящей из:

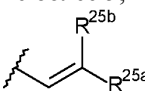
(ia) C_{5-10} арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

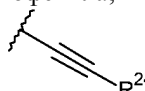
(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;



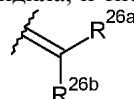
(id) , где каждый из R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиафенила; и



(if) , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиафенила; в случае, если присутствует одинарная связь между C2 и



C3, R^2 представляет собой , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного

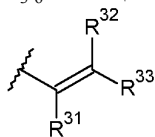
алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

в случае, если присутствует двойная связь между $C2'$ и $C3'$, R^{12} выбран из группы, состоящей из:

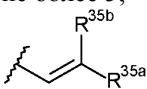
(ia) C_{5-10} арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

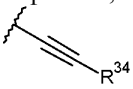
(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;



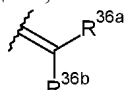
(id) , где каждый из R^{31} , R^{32} и R^{33} независимо выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R^{34} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила; и тиофенила; в случае, если присутствует одинарная связь между $C2'$ и $C3'$,



R^{12} представляет собой , где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира; и

r равен от 1 до 8.

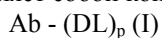
11. Набор для лечения рака у индивидуума, содержащий:

первое лекарственное средство, содержащее конъюгат анти-AXL антитело - лекарственное средство (анти-AXL ADC); и

второе лекарственное средство, содержащее вторичный агент;

где вторичный агент представляет собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист G1TR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), агонист OX40, ингибитор PARP (PARPi), ингибитор AXL-киназы (AXLi) или ингибитор BRAF (BRAFi); и

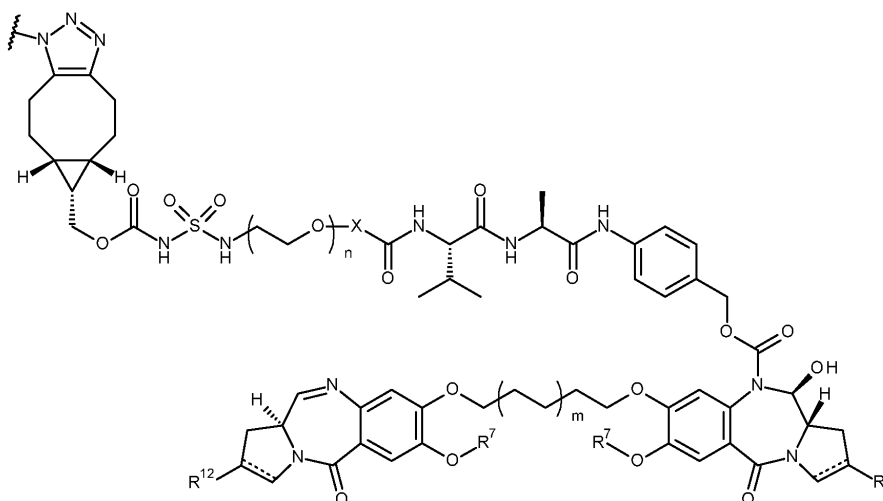
где указанный анти-AXL ADC представляет собой конъюгат формулы (I):



где:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с AXL;

DL представляет собой



где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, $-\text{CH}_2-$ и $-\text{C}_2\text{H}_4-$;

n равен от 1 до 8;

m представляет собой 0 или 1;

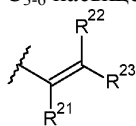
R^7 представляет собой либо метил, либо фенил;

в случае, если присутствует двойная связь между C2 и C3, R^2 выбран из группы, состоящей из:

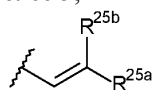
(ia) C_{5-10} арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

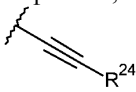
(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;



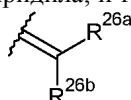
(id) , где каждый из R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; в случае, если присутствует одинарная связь между C2 и C3, R^2



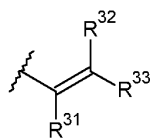
представляет собой , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

в случае, если присутствует двойная связь между C2' и C3', R^{12} выбран из группы, состоящей из:

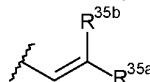
(ia) C_{5-10} арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

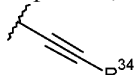
(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;



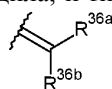
(id) , где каждый из R^{31} , R^{32} и R^{33} независимо выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R^{34} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; в случае, если присутствует одинарная связь между $C2'$ и $C3'$,



R^{12} представляет собой , где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира; и

p равен от 1 до 8.

12. Набор по п.11, дополнительно содержащий вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению индивидууму первого лекарственного средства в комбинации со вторым лекарственным средством для лечения рака.

13. Фармацевтическая композиция содержащая конъюгат анти-AXL антитело - лекарственное средство (анти-AXL ADC) и вторичный агент,

где вторичный агент представляет собой антагонист PD1, антагонист PD-L1, агонист G1TR (глюкокортикоид-индуцированного TNFR-родственного белка), агонист OX40, ингибитор PARP (PARPi), ингибитор AXL-киназы (AXLi) или ингибитор BRAF (BRAFi); и

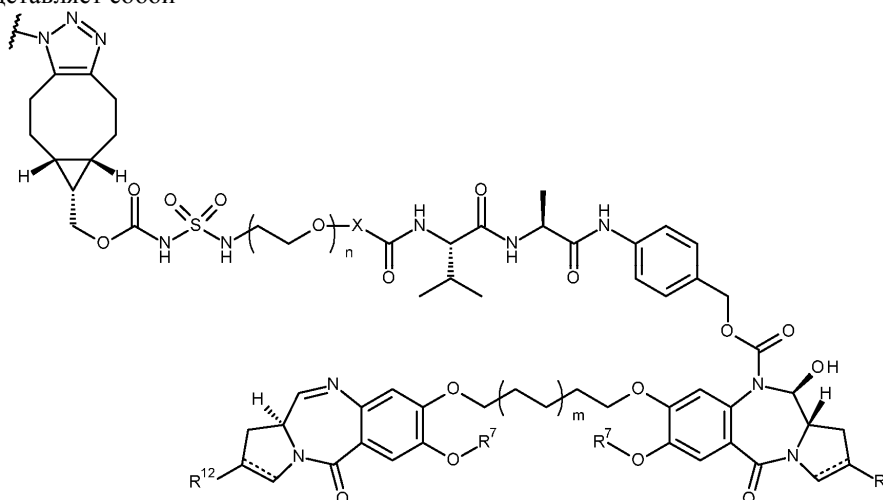
где указанный анти-AXL ADC представляет собой конъюгат формулы (I):

Ab - (DL)_p (I)

где:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с AXL;

DL представляет собой



где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, $-CH_2-$ и $-C_2H_4-$;

n равен от 1 до 8;

m представляет собой 0 или 1;

R^7 представляет собой либо метил, либо фенил;

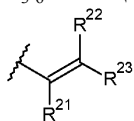
в случае, если присутствует двойная связь между $C2$ и $C3$, R^2 выбран из группы, состоящей из:

(ia) C_{5-10} арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбран-

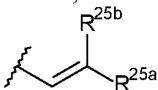
ных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇ гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;

(ib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;

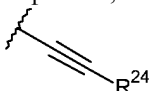
(ic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;



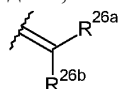
(id) , где каждый из R²¹, R²² и R²³ независимо выбраны из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R¹² составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R²⁴ выбран из: H; C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; в случае, если присутствует одинарная связь между C2 и



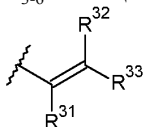
C3, R² представляет собой , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C₁₋₄ алкиламида и C₁₋₄ алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C₁₋₄ алкилового сложного эфира;

в случае, если присутствует двойная связь между C2' и C3', R¹² выбран из группы, состоящей из:

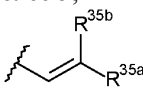
(ia) C₅₋₁₀ арильной группы, не замещенной или содержащей один или более заместителей, выбранных из группы, включающей: галоген, нитро, циано, эфир, карбокси, сложный эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇ гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;

(ib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;

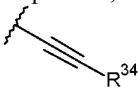
(ic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;



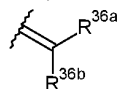
(id) , где каждый из R³¹, R³² и R³³ независимо выбраны из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R¹² составляет не более 5;



(ie) , где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и



(if) , где R³⁴ выбран из: H; C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; в случае, если присутствует одинарная связь между C2' и C3',



R¹² представляет собой , где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, при этом алкильная и алкенильная группа являются незамещенными или замещены группой, выбранной из C₁₋₄ алкиламида и C₁₋₄ алкилового сложного эфира; или, когда один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C₁₋₄ алкилового сложного эфира; и

r равен от 1 до 8.

14. Применение фармацевтической композиции по п.13 для лечения рака у индивидуума.

Последовательности.

SEQ ID NO.1 [1H12 VH, CDR подчеркнуты]
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSY
TYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARHPIYYTYDDTMDYWGQG
 TTVTVSS

SEQ ID NO.2 [1H12 VL, CDR подчеркнуты]
 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSASSSVSSGNFHWYQQKPGLAPRLLIRTSNLASGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSGYPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO.3 [1H12 Тяжелая цепь]
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVATISSGGSY
TYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYQMNSLRAEDTAVYYCARHPIYYTYDDTMDYWGQG
 TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

N* означает Asn297 (нумерация согласно Kabat)

SEQ ID NO.3 [1H12 Легкая цепь]
 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCSASSSVSSGNFHWYQQKPGLAPRLLIRTSNLASGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSGYPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
 TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.5 [1H12 VH CDR1]
 SYGMS

SEQ ID NO.6 [1H12 VH CDR2]
 TISSGGSYTYYPDSVKG

SEQ ID NO.7 [1H12 VH CDR3]
 HPIYYTYDDTMDY

SEQ ID NO.8 [1H12 VL CDR1]
 SASSSVSSGNFH

SEQ ID NO.9 [1H12 VL CDR2]
 RTSNLAS

Фиг. 1A

SEQ ID NO.10 [1H12 VL CDR3]
QQWSGYPWT

SEQ ID NO.11 [вариабельный домен тяжелой цепи мышиноного 5F11, CDR почеркнуты]
EVKLLSEGGGLVQPGGSLKLSAASGFD~~FSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTI~~
~~NYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCASPYYYGPFAYWGQGLTVTS~~
S

SEQ ID NO.12 [вариабельный домен легкой цепи мышиноного 5F11, CDR почеркнуты]
DIVLTQSPASLAVSLGQRAIISCKASQSVSFAGTSLMH~~WYQQKPGQPKLLIYRASNLEA~~
GFPTRFSGSGSRTDFTLNHPVEEEDAATYYC~~QQSREYPRTFGGGTKLEVK~~

SEQ ID NO.13 [5F11 VH CDR1]
RYWMS

SEQ ID NO.14 [5F11 VH CDR2]
EINPDSSTINYTPSLKD

SEQ ID NO.15 [5F11 VH CDR3]
PYYYGPFAY

SEQ ID NO.16 [5F11 VL CDR1]
KASQSVSFAGTSLMH

SEQ ID NO.17 [5F11 VL CDR2]
RASNLEA

SEQ ID NO.18 [5F11 VL CDR3]
QQSREYPRT

SEQ ID NO.19 [5F11 RHA]
QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAEINPDSST
INYTPSLKDRFAISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYYYGPFAYWGQGLTVT
S

SEQ ID NO.20 [5F11 RHB]
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAEINPDSSTI
NYTPSLKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYYYGPFAYWGQGLTVTS

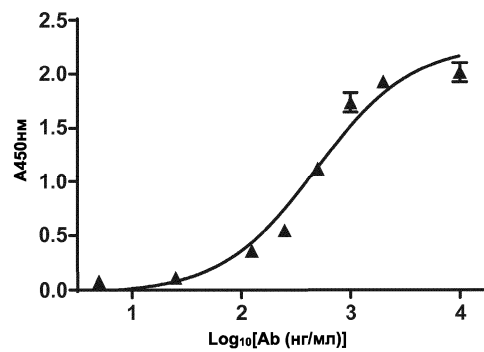
SEQ ID NO.21 [5F11 RHC]
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVSEINPDSSTI
NYTPSLKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYYYGPFAYWGQGLTVTS

Фиг. 1B

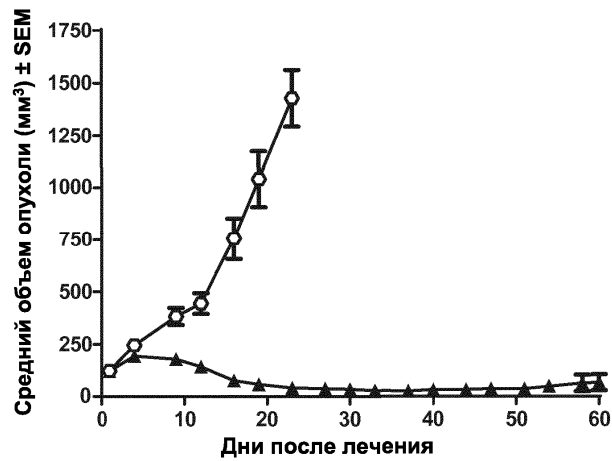
SEQ ID NO.22 [5F11 RKA]
EIVLTQSP~~LSLPVTGP~~EASISCKASQSVSFAGTSLMH~~WYLQKPGQSPQLLIYRASNLEA~~
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC~~QQSREYPRTFGQGTKVEIK~~

SEQ ID NO.23 [Axl человека]
MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTAEE~~SPFVGNPGNITGARGLTGTLRC~~
~~QLQVQGEPEVHWLRDQGILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQY~~
~~QCLVFLGHQTFVSPQGYVGLGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLW~~
~~LQDAVPLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSFSCSAHNAKGVTTSRTATITVLPQQPRNLH~~
~~LVSROPTTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPPPEELTSQASVPP~~
~~HQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAF~~
~~VHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEVTLLELQGDGVSNNLTVCVAA~~
~~YTAAGDGPWSPVPLEAWRPQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVL~~
~~ILALFLVHRRKKETRYGEVFPTVERGELVVRYRVRKYSRRTEATLNSLGISEELKEKL~~
~~RDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDDSIKLVAVKTMKIAICTRSEEDFLSE~~
~~AVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYL~~
~~PTQMLVKFMADIASGMEYLSTKRFIHRDLAARNCMLENMNSVCVADFGLSKKIYNGDYY~~
~~RQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFGVTMWEIATRGQTPYPGVENSEIYDYL~~
~~RRGNRLKQPADCLDGLYALMSRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILY~~
~~VNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQDPDKDSCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSSTTSPAQ~~
PADRGSPAAPGQEDGA

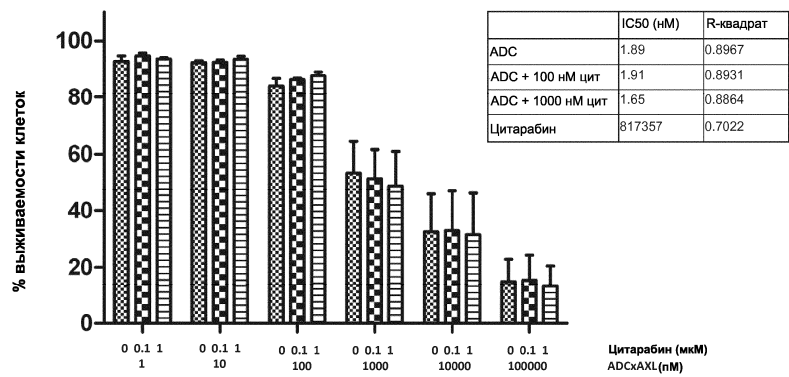
Фиг. 1C



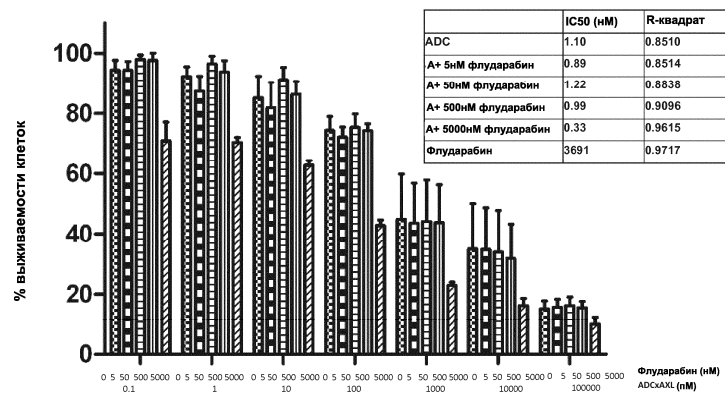
Фиг. 2



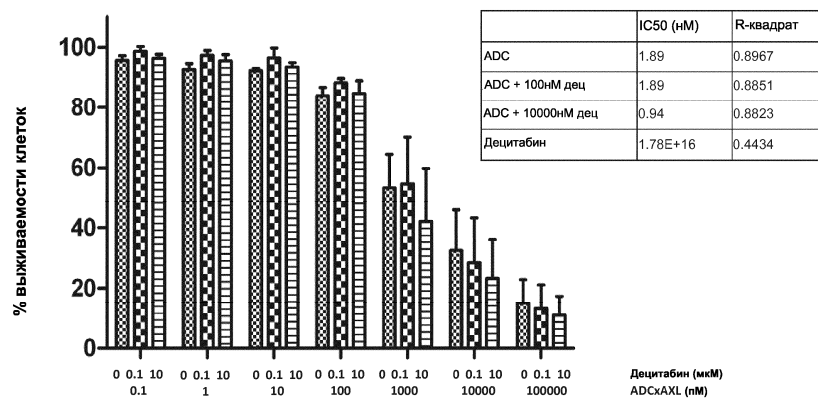
Фиг. 3



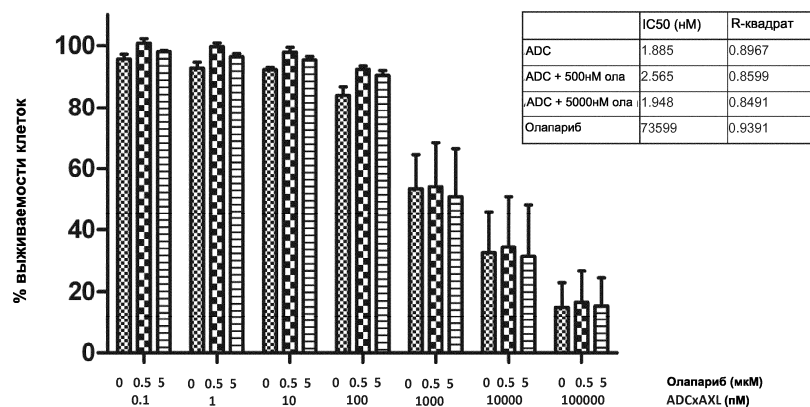
Фиг. 4



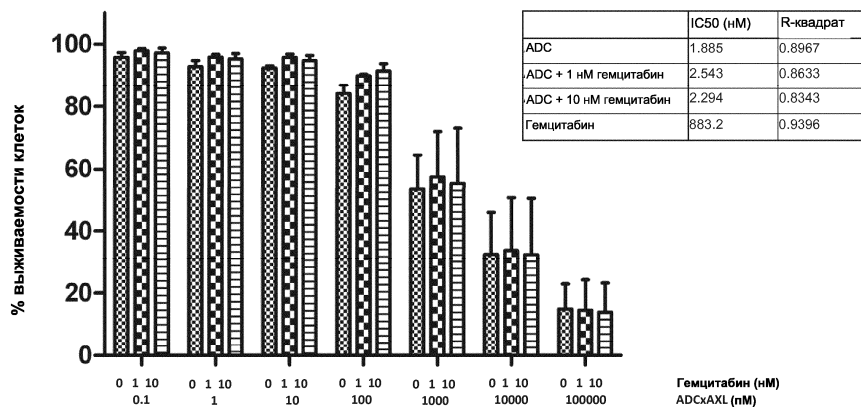
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2