



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108832** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)

A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/416 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/5355 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2010 12163</p> <p>(22) Дата подання заявки: 10.03.2009</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.06.2015</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/037,410</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 18.03.2008</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.01.2011, Бюл.№ 2</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.06.2015, Бюл.№ 12</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2009/036608, 10.03.2009</p>	<p>(72) Винахідник(и): Беррі Лінн (US), Філіпс Гейл Льюїс (US), Сліковські Марк Кс. (US)</p> <p>(73) Власник(и): ДЖЕНЕНТЕК, ІНК., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2005/0276812 A1, 15.12.2005 US 7097840 B2, 29.08.2006</p>
---	--

(54) КОМБІНАЦІЇ КОН'ЮГАТА АНТИ-HER2-АНТИТІЛО-ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ І ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНИХ ЗАСОБІВ І СПОСОБИ ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування гіперпроліферативного порушення, що включає введення терапевтичної комбінації у вигляді комбінованої композиції або почергово ссавцю, де терапевтична комбінація містить трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичний засіб, вибраний з GDC-0941 і GNE-390.

UA 108832 C2

Релевантні заявки

За даною непередньою заявкою, поданою згідно з 37 CFR § 1.53(b) вимагається пріоритет згідно з 35 USC § 119(e) за попередньою заявкою на патент США № 61/037410, поданою 18 березня 2008 р., яка повністю включена в даний документ за допомогою посилання.

5 Галузь техніки, до якої належить винахід

Винахід головним чином стосується фармацевтичних комбінацій сполук, що мають активність відносно гіперпроліферативних порушень, таких як злоякісна пухлина. Також винахід стосується способів застосування комбінацій сполук для діагностики або лікування клітин ссавців в умовах *in vitro*, *in situ* і *in vivo*, або асоційованих патологічних станів.

10 Рівень техніки

HER2 (ErbB2) рецептор тирозинкінази є членом сімейства рецепторів епідермальних факторів росту (EGFR) трансмембранних рецепторів. Надекспресію HER2 відмічають приблизно в 20 % злоякісних пухлин молочної залози людини, і вона асоціюється з агресивним ростом і несприятливим прогнозом для пацієнток з даними пухлинами (Slamon et al., 1987, Science, 235:177-182).

15 Трастузумаб (номер по CAS 180288-69-1, ГЕРЦЕПТИН[®], huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech) являє собою варіант рекомбінантного, отриманого з ДНК, гуманізованого, IgG1 каппа, моноклонального антитіла мишачого антитіла до HER2, яке вибірково зв'язується з високою афінністю в клітинному тесті (Kd=5 нМ) з позаклітинним доменом білка рецептора 2 людського епідермального фактора росту, HER2 (ErbB2) (патент США № 5677171; патент США № 5821337; патент США № 6054297; патент США № 6165464; патент США № 6339142; патент США № 6407213; патент США № 6639055; патент США № 6719971; патент США № 6800738; патент США № 7074404; Coussens et al., 1985, Science, 230:1132-1139; Slamon et al., 1989, Science, 244:707-712; Slamon et al., 2001, New Engl. J. Med., 344:783-792). Трастузумаб містить людські касні області з областями, що визначають комплементарність мишачого антитіла (4D5), яке зв'язується з HER2. Трастузумаб зв'язується з антигеном HER2 і таким чином інгібує ріст пухлинних клітин. У тестах в умовах *in vitro* і на тваринах було показано, що трастузумаб інгібує проліферацію людських пухлинних клітин із надекспресією HER2 (Hudziak et al., 1989, Mol. Cell Biol., 9:1165-1172; Lewis et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother.: 37:255-63; Baselga et al., 1998, Cancer Res., 58:2825-2831). Трастузумаб є медіатором антитілозалежної клітинної цитотоксичності, ADCC (Lewis et al., 1993, Cancer Immunol. Immunother., 37(4):255-263; Hotaling et al., 1996, [abstract]. Proc. Annual Meeting Am. Assoc. Cancer Res., 37:471; Pegram M.D. et al., 1997, [abstract]. Proc. Annual Meeting Am. Assoc. Cancer Res., 38:602; Sliwkowski M. et al., 1999, Seminars in Oncology, 26(4), Suppl. 12:60-70; Yarden Y. and Sliwkowski M., 2001, Nature Reviews: Molecular Cell Biology, Macmillan Magazines, Ltd., Vol. 2:127-137).

35 Герцептин[®] був дозволений до застосування в 1998 для лікування пацієнток з метастатичними злоякісними пухлинами молочної залози з надекспресією ErbB2 (Baselga et al., 1996, J. Clin. Oncol., 14:737-744), які до цього отримували інтенсивну протипухлинну терапію, і з того часу його застосовували на більш ніж 300000 пацієнтках (Slamon D.J. et al., N. Engl. J. Med., 2001, 344:783-92; Vogel C.L. et al., J. Clin. Oncol., 2002, 20:719-26; Marty M. et al., J. Clin. Oncol., 2005, 23:4265-74; Romond E.H. et al., TN. Engl. J. Med., 2005, 353:1673-84; Piccart-Gebhart M.J. et al., N. Engl. J. Med., 2005, 353:1659-72; Slamon D. et al., [abstract]. Breast Cancer Res. Treat., 2006, 100 (Suppl. 1):52). У 2006 р. FDA дозволила герцептин[®] (трастузумаб, Genentech Inc.) до застосування як складового компонента в схемі лікування, що містить доксорубіцин, циклофосфамід і паклітаксел, для ад'ювантного лікування пацієнток з HER2-позитивною, метастатичною злоякісною пухлиною молочної залози. Незважаючи на те, що герцептин[®], розроблений для пацієнток з HER2-позитивними пухлинами, забезпечував більш високий терапевтичний ефект в порівнянні з однією хіміотерапією, в кінцевому результаті у всіх пацієнток з HER2-позитивною метастатичною злоякісною пухлиною молочної залози (MBC) мало місце прогресування захворювання на доступних лікарських засобах. Залишалися можливості для поліпшення ефективності в лікуванні пацієнток з MBC. Незважаючи на різні механізми дії трастузумабу, у ряду пацієнток, що зазнали лікування трастузумабом, не було відповіді на лікування або відповідь припинилася після позитивного періоду лікування. Деякі HER2+ (HER2-позитивні) пухлини не відповідали на лікування герцептином[®] і у більшості пацієнток, у яких спостерігали відповідь пухлин, в кінцевому результаті мало місце прогресування захворювання. У клініці є істотна потреба в розробці додаткових, направлених на HER2 протипухлинних засобів для лікування пацієнтів з пухлинами, які надмірно експресують HER2, або з іншими захворюваннями, асоційованими з експресією HER2, які не відповідають або слабо відповідають на лікування герцептином[®].

Альтернативним підходом для антитіло-направленої терапії є застосування антитіл для доставки цитотоксичних лікарських засобів специфічно в антиген-експресуючі пухлинні клітини. Майтансиноїди, похідні антимітотичного засобу майтансину, зв'язуються з мікротрубочками аналогічно лікарським засобам на основі алкалоїдів барвінку (Issell B.F. et al., 1978, *Cancer Treat. Rev.*, 5:199-207; Cabanillas F. et al., 1979, *Cancer Treat. Rep.*, 63:507-509). Кон'югати антитіло-лікарський засіб (ADC), що складаються з майтансиноїду DM1, зв'язаного з трастузумабом, проявляють високу протипухлинну активність на HER2-експресуючих чутливих до трастузумабу і резистентних до трастузумабу лініях пухлинних клітин і на моделях ксенотрансплантатів злоякісної пухлини молочної залози людини. Ефективність кон'югату майтансиноїдів, зв'язаних з мишачим антитілом проти HER2, TA.1 через лінкер MCC, в 200 разів вище в порівнянні з відповідним кон'югатом з дисульфідним лінкером (Chari et al., 1992, *Cancer Res.*, 127-133). Кон'югати антитіло-лікарський засіб (ADC), що складаються з майтансиноїду, DM1, зв'язаного з трастузумабом, проявляють високу протипухлинну активність на чутливих до трастузумабу і резистентних до трастузумабу лініях пухлинних клітин і на моделях ксенотрансплантатів злоякісної пухлини молочної залози людини. У цей час кон'югат трастузумаб-MCC-DM1 (T-DM1) проходить фазу II клінічних випробувань у пацієнтів, які стійкі до лікування препаратами, направленими на HER2 (Beeram et al., 2007, "A phase I study of trastuzumab-MCC-DM1 (T-DM1), a first-in-class HER2 antibody-drug conjugate (ADC) in patients (pts) with HER2+metastatic breast cancer (BC)", *American Society of Clinical Oncology* 43rd:June 02 (Abs 1042; Krop et al., *European Cancer Conference ECCO*, Poster 2118, September 23-27, 2007, Barcelona; патент США № 7097840; заявка на патент США № 2005/0276812; заявка на патент США № 2005/0166993).

Комбінована терапія, в якій використовують два або декілька лікарських засобів по певній схемі або в певній формі введення, як правило, має одну або декілька цілей: (i) зниження частоти виникнення набутої резистентності об'єднанням лікарських засобів з мінімальною перехресною резистентністю, (ii) зниження дозування лікарських засобів, які не є токсичними, і має аналогічний терапевтичний профіль для досягнення ефективності з проявом менших побічних ефектів, тобто збільшенням терапевтичного індексу, (iii) сенсibiliзація клітин до впливу одного лікарського засобу через дію іншого лікарського засобу, за допомогою зміни стадії клітинного циклу або здатності до росту і (iv) досягнення підвищеної ефективності при використанні адитивної дії або декілька ніж адитивної дії, ефектів в біологічній активності двох лікарських засобів (Pegram M. et al., 1999, *Oncogene*, 18:2241-2251; Konecny G. et al., 2001, *Breast Cancer Res. and Treatment*, 67:223-233; Pegram M. et al., 2004, *J. Nat. Cancer Inst.*, 96(10):739-749; Fitzgarrald et al., 2006, *Nature Chem. Biol.*, 2(9):458-466; Borisy et al., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(13):7977-7982).

Адитивність Леве (Chou T.C. and Talalay P., 1977, *J. Biol. Chem.*, 252:6438-6442; Chou T.C. and Talalay P., 1984, *Adv. Enzyme Regul.*, 22:27-55; Berenbaum M.C., 1989, *Pharmacol. Rev.*, 41:93-141) і незалежність/синергія Блісса (Bliss C.I., 1956, *Bacteriol. Rev.*, 20:243-258; Greco et al., 1995, *Pharmacol. Rev.*, 47:331-385) є методами, що застосовуються для розрахунку передбачуваного взаємовідношення доза-ефект при комбінованій терапії в порівнянні з монотерапією, засновані на таких параметрах, як IC_{50} , дозі лікарського засобу, необхідній для інгібування 50 % мішені і що дорівнює K_i в найбільш простому випадку.

Повідомлялося про застосування антитіл-інгібіторів димеризації HER2 і інгібіторів EGFR для комбінованої терапії раку (заявка на патент США № 2007/0020261). Трастузумаб-MCC-DM1 (T-DM1) і пертузумаб окремо виявили ефективність на пацієнтах з MBC, і було показано, що комбінація пертузумабу і трастузумабу є активною у пацієток з HER-позитивними MBC (Baselga J. et al., "A Phase II trial of trastuzumab and pertuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer that had progressed during trastuzumab therapy: full response data", *European Society of Medical Oncology*, Stockholm, Sweden, September 12-16, 2008).

Суть винаходу

Винахід головним чином стосується кон'югату анти-HER2-антитіло-лікарський засіб, трастузумабу-MCC-DM1, який вводять в комбінації з одним або декількома хімотерапевтичними засобами, для пригнічення росту пухлинних клітин. Деякі комбінації трастузумабу-MCC-DM1 і хімотерапевтичного засобу проявляють синергічну дію в пригніченні росту пухлинних клітин в умовах *in vitro* і *in vivo*. Комбінації і способи за винаходом можуть бути придатними при лікуванні гіперпроліферативних порушень, таких як злоякісна пухлина. Комбінації можуть інгібувати ріст пухлин у ссавців і можуть бути придатними для лікування людей із злоякісними пухлинами.

В одному аспекті винахід стосується способу лікування гіперпроліферативного порушення, що включає введення терапевтичної комбінації у вигляді комбінованої композиції або почергово ссавцеві, в якому терапевтична комбінація містить терапевтично ефективну кількість

трастузумабу-MCC-DM1 і терапевтично ефективну кількість хіміотерапевтичного засобу, вибраного з антитіла-інгібітора димеризації HER2, антитіла до VEGF, 5-FU, карбоплатину, лапатинібу, ABT-869, доцетакселу, GDC-0941 і GNE-390.

Терапевтично ефективну кількість трастузумабу-MCC-DM1 і терапевтично ефективну кількість хіміотерапевтичного засобу можна вводити у вигляді комбінованої композиції або по чергово.

Також винахід стосується способів застосування композицій для діагностики або лікування клітин ссавців, організмів в умовах *in vitro*, *in situ* і *in vivo*, або асоційованих патологічних станів.

Також винахід стосується способів, в яких введення терапевтичної комбінації приводить до синергічного ефекту.

Ще один аспект винаходу стосується фармацевтичних композицій, що містять трастузумаб-MCC-DM1, хіміотерапевтичний засіб, вибраний з антитіла-інгібітора димеризації HER2, антитіла до VEGF, 5-FU, карбоплатину, лапатинібу, ABT-869, доцетакселу, GDC-0941 і GNE-390; і один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, регуляторів сипкості, розріджувачів або наповнювачів.

Ще один аспект винаходу стосується способів лікування гіперпроліферативного захворювання або порушення, що включають введення ссавцеві, який потребує такого лікування, терапевтично ефективних кількостей трастузумабу-MCC-DM1 і хіміотерапевтичного засобу. Трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичний засіб можна формулювати спільно для введення в комбінації у вигляді фармацевтичної композиції або їх можна вводити по чергово (що чергуються, послідовні введення) у вигляді терапевтичної комбінації. В одному варіанті здійснення T-DM1 вводять інфузією, і хіміотерапевтичний засіб вводять перорально.

Ще один аспект винаходу стосується способів прогнозу ефективних лікарських комбінацій відносно ефективності в умовах *in vivo*, де комбінації містять трастузумаб-MCC-DM1 і протипухлинний хіміотерапевтичний засіб, що широко застосовується. Дані по ефективності, отримані в дослідках за оцінкою проліферації клітин в умовах *in vitro* і на пухлинних ксенотрансплантатах в умовах *in vivo*, піддають якісному і кількісному аналізу. Методи кількісного аналізу можуть бути засновані на принципі медіанного ефекту Chou&Talalay і ізоболограмах, за допомогою яких визначають значення комбінаційного індексу (CI) для встановлення синергізму, антагонізму або адитивного ефекту, або вони можуть бути засновані на незалежності відхилення Блісса.

Ще один аспект винаходу стосується способу застосування терапевтичної комбінації за винаходом для лікування у ссавця захворювання або стану, такого як злоякісна пухлина, що включає захворювання, яке модулюється HER2 або KDR9 (рецептором 1 VEGF).

Ще один аспект винаходу стосується застосування терапевтичної комбінації за винаходом у виробництві лікарського засобу для лікування у ссавця захворювання або стану, такого як злоякісна пухлина, що включає захворювання, яке модулюється HER2 або KDR9 (рецептором 1 VEGF).

Ще один аспект винаходу стосується виробів або наборів, що містять трастузумаб-MCC-DM1, хіміотерапевтичний засіб, контейнер і необов'язково вкладиш в упаковці або етикетку, з описом лікування.

Ще один аспект винаходу стосується способу визначення сполук для застосування в комбінації для лікування злоякісної пухлини, що включає: (а) введення терапевтичної комбінації трастузумабу-MCC-DM1 і хіміотерапевтичного засобу, вибраного з антитіла-інгібітора димеризації HER2, антитіла до VEGF, 5-FU, карбоплатину, лапатинібу, ABT-869, доцетакселу, GDC-0941 і GNE-390 в пухлинну клітинну лінію в умовах *in vitro* і (b) визначення синергічного або не синергічного ефекту.

Додаткові переваги і нові ознаки даного винаходу будуть частково наведені в подальшому описі, і частково стануть зрозумілими фахівцям в даній галузі при ознайомленні з подальшою заявкою або вивчені при практичному застосуванні винаходу. Переваги винаходу можуть бути реалізовані і досягнуті за допомогою інструментального виконання, комбінацій, композицій і способів, заявлених в прикладеній формулі винаходу.

Короткий опис Фігур

На Фіг. 1 наведений графік залежності життєздатності клітин SK-BR-3 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ трастузумабу, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінації трастузумабу і T-DM1.

На Фіг. 2 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 EEI в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ трастузумабу, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінації трастузумабу і T-DM1.

На Фіг. 3 наведений графік залежності життєздатності клітин MDA-MB-175 в умовах *in vitro* на 5 добу від кратних концентрацій IC₅₀ пертузумабу, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінації пертузумабу і T-DM1.

5 На Фіг. 3а наведений графік залежності життєздатності клітин MDA-MB-175 в умовах *in vitro* на 5 добу від кратних концентрацій IC₅₀ пертузумабу, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінації пертузумабу і T-DM1.

На Фіг. 4 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 5 добу від різних фіксованих концентрацій пертузумабу в комбінації з концентрацією реакції у відповідь трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і різних концентрацій одного T-DM1.

10 На Фіг. 5 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 5 добу від різних фіксованих концентрацій трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) в комбінації з концентрацією пертузумабу реакції у відповідь і різних концентрацій одного пертузумабу.

На Фіг. 6 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 5 добу від кратних концентрацій IC₅₀ пертузумабу, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінації пертузумабу і T-DM1.

15 На Фіг. 7 наведений графік залежності життєздатності клітин SK-BR-3 в умовах *in vitro* на 3 добу від різних концентрацій T-DM1 в комбінації з фіксованими концентраціями лапатинібу (4,5 нМ; 14 нМ; 41 нМ; 123 нМ) і різних концентрацій одного T-DM1 (0-1000 нг/мл).

20 На Фіг. 7а наведений графік залежності життєздатності клітин SK-BR-3 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ T-DM1, лапатинібу і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 і лапатинібу.

На Фіг. 8а наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ T-DM1, лапатинібу і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 і лапатинібу.

25 На Фіг. 8 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 3 добу від різних концентрацій T-DM1 в комбінації з фіксованими концентраціями лапатинібу (1,5 нМ; 4,5 нМ; 14 нМ; 41 нМ; 123 нМ) і різних концентрацій одного T-DM1 (0-1000 нг/мл).

30 На Фіг. 9 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474-EEI в умовах *in vitro* на 3 добу від різних концентрацій T-DM1 в комбінації з фіксованими концентраціями лапатинібу (14 нМ; 41 нМ; 123 нМ; 370 нМ; 1111 нМ) і різних концентрацій одного T-DM1 (0-1000 нг/мл).

35 На Фіг. 10 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для пухлин KPL-4, імплантованих в жирову подушку молочної залози імунodefіцитних мишей SCID (3 мільйони клітин в матригелі на мишу) після введення: (1) буфера ADC; (2) пертузумабу в дозі 15 мг/кг; (3) T-DM1 в дозі 0,3 мг/кг; (4) T-DM1 в дозі 1 мг/кг; (5) T-DM1 в дозі 3 мг/кг, (6) пертузумабу в дозі 15 мг/кг + T-DM1 в дозі 0,3 мг/кг; (7) пертузумабу в дозі 15 мг/кг + T-DM1 в дозі 1 мг/кг; (8) пертузумабу в дозі 15 мг/кг + T-DM1 в дозі 3 мг/кг. Буфер ADC і T-DM1 вводили один раз на 0 добу. Претузумаб вводили на 0; 7 і 14 добу.

40 На Фіг. 11 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для пухлин KPL-4, імплантованих в жирову подушку молочної залози імунodefіцитних мишей SCID (3 мільйони клітин в матригелі на мишу) після введення: (1) буфера ADC; (2) 5-FU в дозі 100 мг/кг; (3) пертузумабу в дозі 40 мг/кг, перша доза пертузумабу (групи 5, 7 і 9) була 2× навантажувальною дозою; (4) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг; (5) T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (6) 5-FU в дозі 100 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (7) пертузумабу в дозі 40 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (8) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (9) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + пертузумаб в дозі 40 мг/кг. Буфер ADC і T-DM1 вводили внутрішньовенно один раз на 0 добу. Претузумаб вводили на 0; 7 і 14 добу (один раз на тиждень ×4). 5FU вводили на 0; 7 14 і 21 доби (один раз на тиждень ×3). B20-4.1 вводили на 0; 3; 7; 10; 14; 17; 21 і 24 доби (2×/тиждень ×8 загалом).

45 На Фіг. 12 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинника (буфера ADC); (2) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг; (3) T-DM1 в дозі 3 мг/кг; (4) T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (5) T-DM1 в дозі 10 мг/кг; (6) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + T-DM1 в дозі 3 мг/кг; (7) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (8) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + T-DM1 в дозі 10 мг/кг. Буфер ADC і T-DM1 вводили на 0 і 21 добу. B20-4.1 вводили на 0; 3; 7; 10; 14; 17; 21 і 24 доби (2×/тиждень ×4, 8 загалом).

50 На Фіг. 13 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинника (буфера ADC); (2) T-DM1 в дозі 10 мг/кг; (3) 5-FU в дозі 100 мг/кг; (4) гемцитабіну в дозі 120 мг/кг; (5) карбоплатину в дозі 100 мг/кг; (6) 5-FU в дозі 100 мг/кг + T-DM1 в дозі 10 мг/кг; (7) гемцитабіну в дозі 120 мг/кг + T-DM1 в дозі 10 мг/кг; (8) карбоплатину в дозі 100 мг/кг + T-DM1 в дозі 10 мг/кг. Буфер ADC, T-DM1

і карбоплатин вводили однократно на 0 добу. 5-FU вводили однократно на 0; 7 і 14 доби (один раз на тиждень $\times 3$). Гемцитабін вводили на 0; 3; 6 і 9 доби (кожні 3 дні $\times 4$).

На Фіг. 14 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози безтимусних мишей Harlan, після введення: (1) розчинника (буфера PBS) в/в, один раз на тиждень $\times 4$; (2) лапатинібу в дозі 101 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (3) пертузумабу в дозі 40 мг/кг, в/в, один раз на тиждень $\times 4$; (4) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг, в/оч., $2\times$ /в тиждень $\times 4$; (5) T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз на 3 тижні до кінця; (6) лапатинібу в дозі 101 мг/кг перорально, два рази на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз на 3 тижні до кінця; (7) пертузумабу в дозі 40 мг/кг в/в, один раз на тиждень $\times 4$ +T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз в 3 тижні до кінця; (8) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг, в/б, $2\times$ /в тиждень $\times 4$ +T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз в 3 тижні до кінця.

На Фіг. 15 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози безтимусних мишей Harlan, після введення: (1) розчинник (буфера PBS) перорально, два рази на день $\times 21$; (2) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг, в/в, один раз на день $\times 1$; (3) T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз на день $\times 1$; (4) АВТ-869 в дозі 5 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (5) АВТ-86 в дозі 15 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (6) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$ +АВТ-869 в дозі 5 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (7) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$ +АВТ-869 в дозі 15 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (8) T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз на день $\times 1$ +АВТ-869 в дозі 5 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (9) T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз в день $\times 1$ +АВТ-869 в дозі 15 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$.

На Фіг. 16 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози безтимусних мишей Harlan, після введення: (1) розчинника в/в, один раз на тиждень $\times 3$; (2) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні $\times 2$; (3) T-DM1 в дозі 15 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні $\times 2$; (4) доцетакселу в дозі 30 мг/кг в/в, один раз на тиждень $\times 3$; (5) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні $\times 2$ + доцетакселу в дозі 30 мг/кг в/в, один раз на тиждень $\times 3$; (6) T-DM1 в дозі 15 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні $\times 2$ + доцетакселу в дозі 30 мг/кг в/в, один раз на тиждень $\times 3$.

На Фіг. 17 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози безтимусних мишей Harlan, після введення: (1) розчинник перорально, один раз на день $\times 21$; (2) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні $\times 2$; (3) T-DM1 в дозі 15 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні $\times 2$; (4) лапатинібу в дозі 100 мг/кг перорально, два рази на день $\times 21$; (5) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні $\times 2$ + лапатинібу в дозі 100 мг/кг перорально, два рази на день $\times 21$; (6) T-DM1 в дозі 15 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні $\times 2$ + лапатинібу в дозі 100 мг/кг перорально, два рази на день $\times 21$.

На Фіг. 18 наведений графік залежності життєздатності клітин SK-BR-3 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC_{50} 5-FU, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій 5-FU і T-DM1.

На Фіг. 19 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC_{50} 5-FU, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій 5-FU і T-DM1.

На Фіг. 20 наведений графік залежності життєздатності клітин SK-BR-3 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC_{50} гемцитабіну, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій гемцитабіну і T-DM1.

На Фіг. 21 наведений графік залежності життєздатності клітин MDA-MD-361 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC_{50} гемцитабіну, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій гемцитабіну і T-DM1.

На Фіг. 22 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин KPL4 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій 1:10 T-DM1 і GDC-0941 (від 62,5 нМ до 1 мкМ) при кратних концентраціях IC_{50} від $0,25\times$ до $4\times$. Будували графік прогнозу аддитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії.

На Фіг. 23 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин KPL4 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій 1:25 (від 1,25 до 80 нг/мл) і GDC-0941 (від 31,25 нМ до 2 мкМ) при кратних

концентраціях IC_{50} від $0,0625\times$ до $16\times$. Бували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії.

На Фіг. 24 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин KPL4 з ампліфікацією Her2, резистентних до герцептину®, мутантних по PIK3CA (H1047R) в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, PI103, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1+PI103 і T-DM1+GDC-0941 при кратних концентраціях IC_{50} від 0 до $16\times$.

На Фіг. 25 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин KPL4 каспаза 3/7 в умовах *in vitro* через 24 год. після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 і GDC-0941 при концентраціях T-DM1 до 160 нг/мл.

На Фіг. 26 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин KPL4 в умовах *in vitro* через 3 діб після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 і GDC-0941 при концентраціях T-DM1 від 0 до 200 нг/мл.

На Фіг. 27 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин MDA-0MB-361 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій 1:20 T-DM1 (від $3,125$ до 50 нг/мл) і GDC-0941 (від $62,5$ нМ до 1 мкМ) при кратних концентраціях IC_{50} від $0,125\times$ до $8\times$. Бували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії.

На Фіг. 28 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин MDA-0MB-361 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій 1:20 T-DM1 (від $3,125$ до 100 нг/мл) і GDC-0941 (від $62,5$ нМ до 2 мкМ) при кратних концентраціях IC_{50} від $0,125\times$ до $8\times$. Бували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії.

На Фіг. 29 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій 1:10 T-DM1 (від $3,125$ до 100 нг/мл) і GDC-0941 (від $31,25$ нМ до 1 мкМ) при кратних концентраціях IC_{50} від $0,125\times$ до $4\times$. Бували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії.

На Фіг. 30 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій 1:10 T-DM1 (від $6,25$ до 100 нг/мл) і GDC-0941 (від $62,5$ нМ до 1 мкМ) при кратних концентраціях IC_{50} від $0,25\times$ до $4\times$. Бували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії.

На Фіг. 31 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин AU565 з ампліфікацією Her2, мутантних без PIK3 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, PI103, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1+PI103 і T-DM1+GDC-0941 при кратних концентраціях IC_{50} від 0 до $16\times$.

На Фіг. 32 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин EFM192A з ампліфікацією Her2, мутантних по PIK3CA (C420R) в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, PI103, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1+PI103 і T-DM1+GDC-0941 при кратних концентраціях IC_{50} від 0 до $16\times$.

На Фіг. 33 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин HCC1954 з ампліфікацією Her2, резистентних до герцептину®, мутантних по PIK3CA (H1047R) в умовах *in vitro* після обробки T-DM1, PI103, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1+PI103 і T-DM1+GDC-0941 при кратних концентраціях IC_{50} від 0 до $16\times$.

На Фіг. 34 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинник перорально, один раз на день $\times 21$; (2) T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні; (3) 5-FU в дозі 100 мг/кг перорально, один раз на тиждень $\times 2$; (4) T-DM1 в дозі 5 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні + 5-FU в дозі 100 мг/кг перорально, один раз на тиждень $\times 2$.

На Фіг. 35 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинник перорально, один раз на день $\times 21$; (2) T-DM1 в дозі 5 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$; (3) GDC-0941 в дозі 100 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$; (4) GDC-0152 дозі 50 мг/кг перорально, один раз на тиждень $\times 3$; (5) T-DM1 в дозі 5 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$ +GDC-0941 в дозі 100 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$; (6) T-DM1 в дозі 5 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$ +GDC-0152 в дозі 50 мг/кг перорально, один раз на тиждень $\times 3$.

На Фіг. 36 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для пухлин MDA-MB-361.1, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинник перорально, один раз на день $\times 21$; (2) GDC-0941 в дозі 25 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (3) GDC-0941 в дозі 50 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (4) GDC-0941 в дозі 100 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (5) T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$; (6) T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$; (7) GDC-0941 в дозі 25 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$; (8) GDC-0941 в дозі 50 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$; (9) GDC-0941 в дозі 100 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$; (10) GDC-0941 в дозі 25 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$; (11) GDC-0941 в дозі 50 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$; (12) GDC-0941 в дозі 100 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$.

На Фіг. 37 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для пухлин MDA-MB-361.1, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинники [MCT (0,5 % метилцелюлоза/0,2 % твін 80) + сукцинатний буфер (100 мМ сукцинату натрію, 100 мг/мл трегалози, 0,1 % твіну 80, pH 5,0)] перорально+в/в, один раз на день $\times 21$ і один раз на день; (2) GNE-390 в дозі 1,0 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (3) GNE-390 в дозі 2,5 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (4) T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз на день; (5) GNE-390 в дозі 1,0 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз на день; (6) GNE-390 в дозі 2,5 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз на день.

Докладний опис переважних варіантів здійснення

Далі будуть детально описані деякі варіанти здійснення винаходу, приклади яких наведені з прикладеними структурами і формулами. Незважаючи на те, що винахід буде описаний в поєднанні з перерахованими варіантами здійснення, очевидно, зрозуміло, що вони не призначені для обмеження винаходу даними варіантами здійснення. Навпаки, винахід призначений для включення всіх альтернатив, модифікацій і еквівалентних варіантів, які можуть бути включені в об'єм даного винаходу, визначеного формулою винаходу. Фахівцям в даній галузі, очевидно, зрозуміло, що існує багато способів і речовин, аналогічних або еквівалентних описаним в даному документі, які можна використати в практиці даного винаходу. Даний винахід ніяким чином не обмежується описаними способами і речовинами. У випадку, коли один або декілька включених джерел літератури, патентів і аналогічних матеріалів відрізняється або суперечить даній заявці, включаючи, не обмежуючись цим, визначення термінів, використання термінів, опис методик або тому подібне, то дана заявка контролює це.

Визначення

Вирази "містить", "що містить", "включає", "що включає" і "включає" при використанні в даній заявці і формулі винаходу, призначаються для визначення наявності вказаних ознак, цілих чисел, компонентів або стадій, але вони не перешкоджають наявності або додаванню однієї або декількох ознак, цілих чисел, компонентів або стадій або їх груп.

Терміни "лікувати" і "лікування" стосуються лікувальних і профілактичних або превентивних заходів, метою яких є попередження або сповільнення (ослаблення) небажаної фізіологічної зміни або порушення, такої як ріст, розвиток або поширення гіперпроліферативного стану, такого як злоякісна пухлина. Для цілей даного винаходу позитивні або бажані клінічні результати включають, не обмежуючись цим, ослаблення симптомів, зниження ступеня вираженості захворювання, забезпечення стабільного (тобто, відсутність погіршення) стану захворювання, зниження або сповільнення прогресування захворювання, ослаблення або пом'якшення хворобливого стану і ремісія (часткова або повна), незалежно від того, чи вони детектуються або не детектуються. Також термін "лікування" може означати пролонговану здатність до виживання в порівнянні з передбачуваною здатністю до виживання в порівнянні з ситуацією при відсутності лікування. Суб'єкти, що потребують лікування, включають пацієнтів з станом або порушенням, що вже є, а також суб'єктів схильних до розвитку стану або порушення, і суб'єктів, у яких стан або порушення потрібно попередити.

Вираз "терапевтично ефективна кількість" означає кількість сполуки за даним винаходом, за допомогою якої можна (i) лікувати конкретне захворювання, стан або порушення, (ii) ослабляти, полегшувати або елімінувати один або декілька симптомів конкретного захворювання, стану або порушення і (iii) попереджати або сповільнювати початок розвитку одного або декількох симптомів конкретного захворювання, стану або порушення, описаного в даному документі. У разі злоякісної пухлини терапевтично ефективна кількість лікарського засобу може привести до

зменшення кількості пухлинних клітин, зменшення розміру пухлини, пригнічення (тобто сповільненню до певної міри і переважно зупинки) інфільтрації пухлинних клітин до периферичних органів, пригніченню (тобто сповільненню до певної міри і переважно зупинки) метастазування пухлини, пригніченню до певної міри росту пухлини і/або ослабленню до певної міри одного або декількох симптомів, асоційованих зі злоякісною пухлиною. Лікарський засіб може до певної міри попередити ріст пухлини і/або привести до загибелі пухлинних клітин, що є, він може бути цитостатичним і/або цитотоксичним. Відносно терапії злоякісної пухлини, то ефективність можна оцінити, наприклад, за часом прогресування захворювання (ТТР) і/або по швидкості прояву реакції у відповідь (RR).

Термін "гіперпроліферативне порушення" стосується пухлин, раку і новоутворень, включаючи передзлоякісні і незлоякісні стадії, а також він включає псоріаз, ендометріоз, поліпи і фіброаденому.

Терміни "рак" і "злоякісна пухлина" стосуються або описують фізіологічний стан у ссавців, який характеризується неконтрольованим ростом клітин. "Пухлина" містить одну або декілька пухлинних клітин. Приклади злоякісної пухлини включають, не обмежуючись цим, карциному, лімфому, бластоми, саркому і лейкоз або злоякісні пухлини лімфоїдної тканини. Більш конкретні приклади таких злоякісних пухлин включають плоскоклітинний рак (наприклад, епітеліальний плоскоклітинний рак), рак легень, в тому числі, дрібноклітинну карциному легень, недрібноклітинну карциному легень ("NSCLC"), аденокарциному легень і плоскоклітинну карциному легень, рак очеревини, гепатоцелюлярну карциному, рак шлунка, в тому числі, злоякісні пухлини органів травного тракту, рак підшлункової залози, гліобластоми, рак шийки матки, рак яєчників, печінки, сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, ободової кишки, прямої кишки, колоректальний рак, рак ендометрію або матки, рак слинних залоз, нирок або органів видільної системи, вульви, щитовидної залози, карциному печінки, рак анального отвору, рак статевих членів, а також злоякісні пухлини голови і шиї.

Термін "хіміотерапевтичний засіб" являє собою хімічну сполуку, придатну для лікування раку, незалежно від механізму дії. Групи хіміотерапевтичних засобів включають, не обмежуючись цим: алкілюючі агенти, антиметаболіти, рослинні алкалоїди, що являють собою отрути мітотичного веретена, цитотоксичні/протипухлинні антибіотики, інгібітори топоізомерази, антитіла, фотосенсибілізатори і інгібітори кінази. Хіміотерапевтичні засоби включають сполуки, що застосовуються в "цілеспрямованій терапії" і звичайній хіміотерапії. Приклади хіміотерапевтичних засобів включають: ерлотиніб (тарцева®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (таксотер®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, номер по CAS 51-21-8), гемцитабін (гемзар®, Lilly), PD-0325901 (номер по CAS 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-діамін дихлорплатини (II), номер по CAS 15663-27-1), карбоплатин (номер по CAS 41575-94-4), паклітаксел (таксол®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), трастузумаб (герцептин®, Genentech), темозоломід (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентабіцикло[4.3.0]нона-2,7,9-триєн-9-карбоксамід, номер по CAS 85622-93-1, темодар®, темодал®, Shering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенілбут-1-еніл)фенокси]-N, N-диметилетанамін, нольвадекс®, істубал®, валодекс®) і доксорубіцин (адриаміцин®), акти-1/2, HPPD і рапаміцин.

Інші приклади хіміотерапевтичних засобів включають: оксалиплатин (елоксатин®, Sanofi), бортезоміб (велкаде®, Millennium Pharm.), сутент (сунітиніб®, SU11248, Pfizer), летрозол (фемара®, Novartis), іматиніб мезилат (глівек®, Novartis), XL-518 (інгібітор MEK, Exelixis, міжнародна заявка WO 2007/044515), ARRY-886 (інгібітор MEK, AZD6244, Array BioPharma, AstraZeneca), SF-1126 (інгібітор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (інгібітор PI3K, Novartis), XL-147 (інгібітор PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), фулвестрант (фазлодек®, AstraZeneca), лейковорин (фолінова кислота), рапаміцин (сиролімум, рапамун®, Wyeth), лапатиніб (тикерб®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарніб (сарасар™, SCH 66336, Shering Plough), сорафеніб (нексавар®, BAY43-9006, Bayer Labs), гефітиніб (іресса®, AstraZeneca), іринотекан (камтосар®, CPT-11, Pfizer), типіфарніб (зарнестра™, Johnson&Johnson), абраксан™ (не містить кремофору), наночастинки на основі альбуміну з паклітакселом (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), вандетаніб (rINN, ZD6474, закзима®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролімум (торисел®, Wyeth), пазопаніб (GlaxoSmithKline), канфосфамід (телсіта®, Telik), тіотеру і циклофосфамід (цитоксан®, неосар®); алкісульфонати, такі як бусульфан, імпросульфан і піпосульфан; азиридили, такі як бензодоба, карбоквон, метуредоба і уредоба; етиленіміни і метиламеламіни, включаючи альтретамін; триетиленамін, триетилєнфосфорамід, триетилєнтіофосфорамід і триметилломеламін; ацетогеніни (зокрема, булатацин і булатацінон); камптотетин (включаючи синтетичний аналог топотекан); бріостатин; калістатин; CC-1065 (включаючи його синтетичні аналоги адозелезин, карзелезин і бізелезин); криптофіцини (зокрема, криптофіцин 1 і криптофіцин 8); доластатин;

дуокарміцин (включаючи синтетичні аналоги KW-2189 і CB1-TM1); елеутеробін; панкреатистатин; саркодиктиїн; спонгістатин; азотистий іприт, такий як хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамід, естрамустин, іфосфамід, мехлоретамін, мехлортаміну оксид гідрохлорид, мелфалан, новембіхін, фенестрин, преднімустин, трофосфамід, урациловий іприт; 5 нітрозосечовини, такі як кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, німустин і ранімнустин; антибіотики, такі як енедїїнові антибіотики (наприклад, каліхеаміцин, каліхеаміцин гамма 1I, каліхеаміцин омега1 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl., 1994, 33:183-186); динеміцин, динеміцин А; біфосфонати, такі як клодронат; еспераміцин; а також неокарзиностатин хромофор і близькі хромопротеїнові енедїїнові антибіотики хромофори), аклациномізини, 10 актиноміцин, аутраміцин, азасерин, блеоміцини, кактиноміцин, карабіцин, карміноміцин, карзинофілін, хромоміцини, дактиноміцин, даунорубіцин, деторубіцин, 6-діазо-5-оксо-L-норлейцин, морфоліно-доксорубіцин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, 2-піроліно-доксорубіцин і дезоксидоксорубіцин), епірубіцин, езорубіцин, ідарубіцин, марцеломіцин, мітоміцини, такі як мітоміцин С, мікофенолову кислоту, ногаламіцин, олівоміцини, пепломіцини, порфіроміцин, 15 пуроміцин, квеламіцин, родорубіцин, стрептонігрин, стрептозоцин, туберцидин, убенімес, зиностатин, зорубіцин; антиметаболіти, такі як метотрексат і 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолієвої кислоти, такі як деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пуринів, такі як флударабін, 6-меркаптопурин, тіаміприн, тіогуанін; аналоги піримідинів, такі як анцитабін, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабін, дидезоксиуридин, доксифлуридин, еноцитабін, 20 флоксуридин; андрогени, такі як калустерон, дромостанолон пропіонат, епітіостанол, мепітіостан, тестолактон; інгібітори наднирників, такі як аміноглутетимід, мітотан, трилостан; поповнювачі фолієвої кислоти, такі як фролінова кислота; ацеглатон; альдофосфамід глікозид; амінолевулінову кислоту; енілурацил; амсакрин; бестрабуцил; бісантрен; едотраксат; дефофамін; демеколцин; діазиквон; елфорнітрин; еліптиній ацетат; епотилон; етоглуцид; нітрат галію; гідроксисечовину; лентинан; лонідаїнін; майтансіноїди, такі як майтансин і ансамітоцини; 25 мітогуазон; мітоксантрон; мопіданмол; нітаерин; пентостатин; фенамет; парарубіцин; лозоксантрон; подофілову кислоту; 2-етилгідразид; прокарбазин; полісахаридний комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофіран; спірогерманій; теназонову кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлоретиламін; трихотецени (Т-2 токсин, веракурин 30 А, роридин А і ангуїдин); уретан; віндезин; дакарбазин; маномустин; мітобронітол; мітолактол; піпоброман; гацитозин; арабінозид (Ара-С); циклофосфамід; тіотепа; 6-тіогуанін; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платини, такі як цисплатин і карбоплатин; вінбластин; етопозид (VP-16); іфосфамід; мітоксантрон; вінкрисин; вінорельбін (навельбін®); новантрон; теніпозид; етатрексат; дауноміцин; аміноптерин; капецитабін (кселода®, Roche); ібандронат; 35 CPT-11; інгібітор топоізомерази RFS 2000; диформетилорнітин (DMFO); ретиноїди, такі як ретиноева кислота, і фармацевтично прийнятні солі, кислоти і похідні будь-якого з перерахованих вище продуктів.

Також в поняття "хіміотерапевтичний засіб" входять: (i) антигормональні засоби, що регулюють або інгібують дію гормонів на пухлини, такі як антиестрогени і селективні модулятори 40 рецепторів естрогенів (SERM), включаючи, наприклад, тамоксифен (нольвадекс®; тамоксифену цитрат), ралоксифен, дролоксифен, 4-гідрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон і фарестон® (тореміфін цитрат); (ii) інгібітори ароматази, що інгібують фермент ароматазу, яка регулює продукцію естрогенів в наднирниках, наприклад, такі як 4(5)-імідазоли, аміноглутетимід, мегаза® (мегестрол ацетат), аромазин® (ексместан, Pfizer), форместан, 45 фадрозол, ривізор® (ворозол), фемара® (летрозол, Novartis) і аримідекс® (анастрозол, AstraZeneca); (iii) антиандрогени, такі як флутамід, нілутамід, бікалутамід, лейпролід і гозерелін, а також троксацитабін (аналог нуклеозиду цитозину 1,3-діоксолан); (iv) інгібітори протеїнкінази, такі як інгібітори MEK (міжнародна заявка WO 2007/044515); (v) інгібітори ліпідкінази; (vi) антисмислові олігонуклеотиди, зокрема, які інгібують експресію генів в сигнальних шляхах, що 50 беруть участь в аномальній проліферації клітин, наприклад, РКС-альфа, Raf і H-Ras, така як облімерсен (генасенс®, Genta Inc.); (vii) рибозими, такі як інгібітори експресії VEGF (наприклад, ангіозим®) і інгібітори експресії HER2; (viii) вакцини, такі як вакцини на основі генної терапії, наприклад, аловектин®, лейвектин® і ваксид®; пролейкін® rIL-2; інгібітори топоізомерази 1, такі як луртотекан®, абарелікс® gmRH; (ix) антиангіогенні засоби, такі як бевацизумаб (авастин®, Genentech), і фармацевтично прийнятні солі, кислоти і похідні будь-якого з перерахованих вище 55 продуктів.

Також в поняття "хіміотерапевтичний засіб" входять терапевтичні антитіла, такі як алемтузумаб (Campath®), бевацизумаб (авастин®, Genentech); цетуксимаб (ербітукс®, Imclone); панітумаб (вектибікс®, Amgen), ритуксимаб (ритуксан®, Genentech/Biogen Idec), пертузумаб

(омнітарг™, 2C4, Genentech), трастузумаб (герцептин®, Genentech), тозитумомаб (Веххаг, Corixa) і кон'югат антитіло-лікарський засіб, гемтузумаб озогаміцин (мілотарг®, Wyeth).

Гуманізовані моноклональні антитіла з лікувальною активністю у вигляді хіміотерапевтичних засобів в комбінації з трастузумабом-MCC-DM1 включають: алемтузумаб, аплізумаб, азелізумаб, атлізумаб, бапіньюзумаб, бевацизумаб, біватузумаб мертанзин, кантузумаб мертанзин, цеделізумаб, сертолізумаб пегол, цитфуситузумаб, цидтузумаб, даклізумаб, екулізумаб, ефалізумаб, еплатузумаб, ерлізумаб, фелвизумаб, фонтолізумаб, гемтузумаб озогаміцин, інотузумаб озогаміцин, іпілімуаб, лабетузумаб, лінтузумаб, матузумаб, меполізумаб, мотавізумаб, мотовізумаб, наталізумаб, німоіузаб, ноловізумаб, нумавізумаб, окрелізумаб, омалізумаб, палівізумаб, пасколізумаб, пекфуситузумаб, пектузумаб, пертузумаб, пекселізумаб, ралівізумаб, ранібізумаб, реслівізумаб, реслізумаб, резівізумаб, ровелізумаб, руплізумаб, сибротузумаб, сиплізумаб, сонтузумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, талізумаб, тефібазумаб, тоцилізумаб, торазумаб, трастузумаб, тукотузумаб целмолейкін, тукузитузумаб, умавізумаб, уртоксазумаб і візілізумаб.

Термін "метаболіт" означає продукт, синтезований внаслідок метаболізму певної сполуки або її солі в організмі. Метаболіти сполуки можна ідентифікувати з використанням звичайних методів, відомих в даній галузі, і їх активність оцінити з використанням тестів, описаних в даному документі. Такі продукти можуть утворитися, наприклад, внаслідок окислення, відновлення, гідролізу, амідування, деамідування, етерифікації, деетерифікації, ферментативного розщеплення і тому подібне, сполуки, що вводиться. Отже, винахід включає метаболіти сполук за винаходом, в тому числі, сполуки, продукуювані способом, що включає контактування сполуки за даним винаходом з ссавцем протягом періоду часу, достатнього для утворення продукту його метаболізму.

У тому значенні, в якому термін "вкладиш в упаковці" використовується в даному документі, він стосується інструкцій, які звичайно включають в промислові упаковки лікарських продуктів, що містять інформацію про покази, застосування, дозування, введення, протипокази і/або застереження, що стосуються застосування таких лікарських продуктів.

У тому значенні, в якому термін "фармацевтично прийнятна сіль" використовується в даному документі, він стосується фармацевтично прийнятних органічних або неорганічних солей сполуки за винаходом. Наведені як приклад солі включають такі солі, не обмежуючись цим, як сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромід, йодид, нітрат, бісульфат, фосфат, гідрофосфат, ізонікотинат, лактат, саліцилат, гідроксид, тартрат, олеат, танат, пантотенат, бітартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, форміат, бензоат, глутамат, метансульфонат, "мезилат", етансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат і памоат (тобто 1,1'-метилен-біс-(2-гідрокси-3-нафтоат)). Фармацевтично прийнятні солі можуть містити включення іншої молекули, такої як іон ацетат, іон сукцинат або інший протиіон. Протиіон може являти собою будь-яку органічну або неорганічну групу, яка стабілізує заряд у вихідній сполуці. Крім того, фармацевтично прийнятні солі можуть містити в своїй структурі більш ніж один заряджений атом. У тих випадках, коли численні заряджені атоми є частиною фармацевтично прийнятої солі, то вони можуть містити численні протиіони. Отже, фармацевтично прийнятна сіль може містити один або декілька заряджених атомів і/або один або декілька протиіонів.

У тому випадку, коли сполуки за винаходом є основою, то бажану фармацевтично прийнятну сіль можна отримати за допомогою будь-якого прийнятного методу, відомого в даній галузі, наприклад, обробкою вільної основи неорганічною кислотою, такою як соляна кислота, бромистоводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, метансульфонова кислота, фосфорна кислота і тому подібне, або органічною кислотою, такою як оцтова кислота, малеїнова кислота, янтарна кислота, мигдалева кислота, фумарова кислота, маленова кислота, піровиноградна кислота, щавлева кислота, гліколева кислота, саліцилова кислота, піранозидильна кислота, така як глюкуронова кислота або галактуринова кислота, альфа-оксикислота, така як лимонна кислота або винна кислота, амінокислота, така як аспарагінова кислота або глютамінова кислота, ароматична кислота, така як бензойна кислота або цинамова кислота, сульфонова кислота, така як п-толуолсульфонова кислота або етансульфонова кислота, або тому подібне. Загальні аспекти по кислотах, що підходять для отримання фармацевтично придатних або прийнятних солей з основних фармацевтичних сполук, обговорюються, наприклад, P. Stahl et al., Camille G. (eds.) Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use, 2002, Zurich: Wiley-VCH; S. Berge et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1977, 66(1), 119; P. Gould, International J. of Pharmaceutics, 1986, 33:201-217; Anderson et al., the Practice of Medicinal Chemistry, 1996, Academic Press, New York; Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., 1995, Mack Publishing Co., Easton P.A.; і в The Orange Book

(Food&Drug Administration, Washington, D.C. на їх сайті). Вказані джерела включені в даний документ до відома.

У тому випадку, коли сполука за винаходом є кислотою, то бажану фармацевтично прийнятну сіль можна отримати за допомогою будь-якого прийнятного методу, наприклад, обробкою вільної кислоти неорганічною або органічною основою, такою як амін (первинний, вторинний або третинний), гідроксид лужного металу або гідроксид лужно-земельного металу або тому подібне. Показові приклади відповідних солей включають, не обмежуючись цим, органічні солі, отримані з амінокислот, таких як гліцин і аргінін, аміаку, первинних, вторинних і третинних амінів і циклічних амінів, таких як піперидин, морфолін і піперазин, і неорганічні солі, отримані з натрію, кальцію, калію, магнію, марганцю, заліза, міді, цинку, алюмінію і літію.

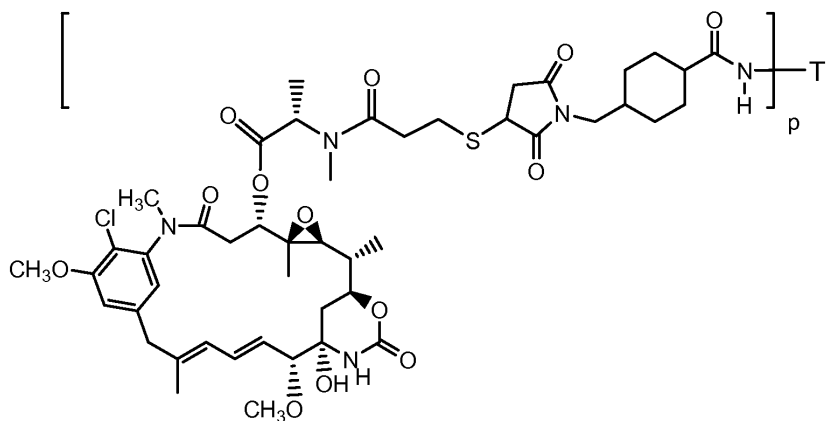
Вираз "фармацевтично прийнятні" вказує на те, що сполука або композиція можуть бути сумісними хімічно і/або з точки зору токсикології з іншими інгредієнтами, що входять до складу композиції, або з ссавцем, який зазнає лікування ними.

Термін "сольват" стосується фізичної асоціації або комплексу однієї або декількох молекул розчинника і сполуки за винаходом. Сполуки за винаходом можуть знаходитися як в несольватованій формі, так і сольватованій формі. Приклади розчинників, які утворюють сольвати, включають, не обмежуючись цим, воду, ізопропанол, етанол, метанол, ДМСО, етилацетат, оцтову кислоту і етаноламін. Термін "гідрат" стосується комплексу, в якому молекула розчинника являє собою воду. Дана фізична асоціація має різні ступені іонного і ковалентного зв'язування, в тому числі, водневі зв'язки. У деяких випадках сольват можна виділити, наприклад, коли одна або декілька молекул розчинника входять в кристалічну решітку кристалічної твердої речовини. Загалом отримання сольватів відоме, наприклад, воно описане M. Caira et al., J. Pharmaceutical Sci., 93(3), 601-611, 2004. Аналогічні способи отримання сольватів, гемісольватів, гідратів і тому подібне описані E.C. van Tonder et al., AAPS Pharm. Sci. Tech., 5(1), article 12, 2004 і A.L. Bingham et al., Chem. Commun., 603-604, 2001. Типовий, не обмежувальний спосіб включає розчинення сполуки за винаходом в бажаній кількості бажаного розчинника (органічного розчинника або води, або їх сумішей) при більш високій, ніж кімнатна, температурі, і охолодження розчину з швидкістю, достатньою для утворення кристалів, які потім виділяють звичайними методами. За допомогою аналітичних методів, наприклад, таких як ІК-спектроскопія, визначають присутність розчинника (або води) в кристалах у вигляді сольвату (або гідрату).

У тому значенні, в якому в даному документі використовується термін "синергічний", він стосується до терапевтичної комбінації, яка є більш ефективною в порівнянні з адитивною дією двох або декількох агентів. Визначення синергічної взаємодії між трастузумабом-MCC-DM1 і одним або декількома хіміотерапевтичними засобами може бути засноване на результатах тестів, описаних в даному документі. Результати даних тестів аналізують з використанням комбінаційного методу Chou і Talalay і аналізу доза-ефект з використанням програми CalcuSyn для визначення комбінаційного індексу "CI" (Chou and Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul., 22:27-55). Комбінації за даним винаходом були оцінені в декількох аналітичних системах і отримані дані можна піддати обробці з використанням стандартної програми для кількісного визначення синергізму, адитивного ефекту і антагонізму у протипухлинних засобів. Переважно використовують програму, описану Chou and Talalay в "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy", Academic Press, 1987, chapter 2. Значення комбінаційного індексу (CI) нижче за 0,8 вказують на наявність синергізму, значення вище за 1,2 вказують на антагонізм і значення в межах від 0,8 до 1,2 вказують на адитивний ефект. Комбінована терапія може забезпечувати "синергію" і бути "синергічною", тобто коли ефект, що досягається при спільному використанні активних інгредієнтів, вище в порівнянні з сумою ефектів, що забезпечуються з використанням сполук по окремоті. Синергічну дію можна забезпечити, коли активні інгредієнти: (1) формують разом і вводять або доставляють одночасно в комбінованій разовій лікарській формі; (2) вводять по чергово у вигляді окремих лікарських форм або (3) вводять по іншій схемі. При введенні по чергово синергічну дію можна забезпечити, коли сполуку вводять або доставляють послідовно, наприклад, за допомогою різних ін'єкцій в окремих шприцах. В основному під час "почергової" терапії ефективну дозу кожного активного інгредієнта вводять послідовно, наприклад, по чергово у часі.

Трастузумаб-MCC-DM1

Даний винахід стосується терапевтичних комбінацій, що містять трастузумаб-MCC-DM1(Т-DM1), кон'югат антитіло-лікарський засіб (номер по CAS № 139504-50-0), що має формулу:



де Tr представляє трастузумаб, зв'язаний через лінкер MCC, з групою лікарського засобу мейтансиноїду, DM1 (патент США № 5208020; патент США № 6441163). Співвідношення лікарського засобу і антитіла або навантаження лікарським засобом представлена показником "p" в наведеній вище структурі трастузумабу-MCC-DM1 і межі цілих значень складають від 1 до приблизно 8. Значення навантаження лікарським засобом "p" становить 1-8. Трастузумаб-MCC-DM1 містить всі суміші по-різному навантажених і приєднаних кон'югатів антитіло-лікарський засіб, де 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 і 8 груп лікарського засобу ковалентно приєднані до антитіла трастузумаб (патент США № 7097840; заявка на патент США № 2005/0276812; заявка на патент США № 2005/0166993). Кон'югат трастузумаб-MCC-DM1 можна приготувати, слідуючи способу, описаному в прикладі 1.

Трастузумаб продукується в суспензійній культурі клітин ссавців (клітин яєчника китайського хом'ячка, CHO). Прото-онкоген HER2 (або c-erbB2) кодує трансмембранний білок рецептора масою 185 kDa, який в структурному відношенні близький до рецептора епідермального фактора росту. Надекспресію білка HER2 відмічають в 25-30 % первинних злоякісних пухлин молочної залози і її можна детектувати з використанням імуногістохімічного методу, заснованого на аналізі фіксованих пухлинних блоків (Press M.F. et al., 1993, Cancer Res., 53:4960-70). Трастузумаб являє собою антитіло, що містить антигензв'язувальні залишки або отримане з мишачого антитіла 4D5 (ATCC CRL 10463, яке депозоване в Американській колекції типових культур, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852 по Будапештській угоді від 24 травня 1990). Гуманізовані антитіла 4D5, що наводяться як приклад, включають huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 і huMAb4D5-8 (герцептин®), описані в патенті США № 5821337.

У фазі I клінічних випробувань було встановлено, що максимально переносима доза (MTD) T-DM1, при внутрішньовенній інфузії кожні 3 тижні, становить 3,6 мг/кг. Значення DLT (токсичність, що обмежує дозу) по тромбоцитопенії ступеня 4 у 2 з 3 пацієнтів дорівнює 4,8 мг/кг. Побічні ефекти ступеня ≥ 2 , що спостерігаються в дозі 3,6 мг/кг, виявлялися рідко і були незначними. Дана схема лікування добре переносилася хворими і забезпечувала хороший клінічний ефект, як описано раніше. У фазі II клінічних випробувань було показано, що доза 3,6 мг/кг добре переносилася при введенні кожні 3 тижні при невеликому проценті пацієнтів (3 з 112 пацієнтів), для яких було потрібне зниження дозування засобу. Таким чином, дозу T-DM1, що дорівнює 3,6 мг/кг кожні 3 тижні, вибрали для тестування в даному дослідженні, засновуючись на наступному: (1) була показана ефективність і безпека T-DM1 в дозі 3,6 мг/кг кожні 3 тижні і (2) для даної групи пацієнтів зручна схема один раз в 3 тижні.

Хіміотерапевтичні засоби

Було показано, що деякі хіміотерапевтичні засоби проявляють дивні і несподівані властивості в комбінації з трастузумабом-MCC-DM1 в пригніченні клітинної проліферації в умовах *in vitro* і *in vivo*. Такі хіміотерапевтичні засоби включають антитіло-інгібітор димеризації HER2, антитіло до VEGF, 5-FU, карбоплатин, лапатиніб, ABT-869, доцетаксел, GDC-0941 і GNE-390.

Пертузумаб (номер по CAS 380610-27-5, омнітарг®, 2C4, Genentech) представляє рекомбінантне, гуманізоване моноклональне антитіло, яке інгібує димеризацію HER2 (патент США № 6054297; патент США № 6407213; патент США № 6800738; патент США № 6949245; патент США № 7041292). Пертузумаб і трастузумаб направлені на різні позаклітинні області рецептора тирозинкінази HER-2 (Nahta et al., 2004, Cancer Res., 64:2343-2346). Гібридомна клітинна лінія, що експресує 2C4 (пертузумаб) депозована в Американській колекції типових

культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA як ATCC HB-12697 8 квітня 1999. Пертузумаб блокує здатність рецептора HER2 сполучатися з іншими членами сімейства рецепторів HER2, тобто HER1/EGFR, HER3 і HER4 (Agus et al., 2002, Cancer Cell, 2:127-137; Jackson et al., 2004, Cancer Res., 64:2601-2609; Takai et al., 2005, Cancer, 104:2701-2708; патент США № 6949245). У пухлинних клітинах порушення здатності HER2 до взаємодії з іншими членами сімейства рецепторів HER приводить до блокування передачі клітинних сигналів і в кінцевому результаті може привести до пригнічення росту пухлинних клітин і загибелі пухлинних клітин. HDI за рахунок унікального механізму їх дії мають здатність функціонувати в широкому ряді пухлин, включаючи пухлини без надекспресії HER2 (Mullen et al., 2007, Molecular Cancer Therapeutics, 6:93-100).

Пертузумаб заснований на послідовностях каркасної області людського IgG1 (κ). Він складається з двох важких ланцюгів і двох легких ланцюгів. Подібно трастузумабу пертузумаб направлений на позаклітинний домен HER2. Однак він відрізняється від трастузумабу по епітоп-зв'язувальних областях легкого ланцюга і важкого ланцюга. У результаті пертузумаб зв'язується з епітопом всередині, який відомий як субдомен 2 HER2, в той час як епітоп з трастузумабу знаходиться в субдоміні 4 (Cho et al., 2003; Franklin et al., 2004). Пертузумаб функціонує за допомогою блокування асоціації HER2 з іншими членами сімейства HER, включаючи HER1 (рецептор епідермального фактора росту; EGFR), HER3 і HER4. Дана асоціація необхідна для передачі сигналів в присутності ліганду через MAP-кіназу і PI3-кіназу. У результаті пертузумаб інгібує ініційовану лігандом внутрішньоклітинну передачу сигналів. Інгібування даних сигнальних шляхів може привести відповідно до зупинки росту і апоптозу (Hanahan and Weinberg, 2000). Внаслідок того, що пертузумаб і трастузумаб зв'язуються з різними епітопами в рецепторі HER2, активована лігандом передача сигналів нижче блокується пертузумабом, але не під дією трастузумабу. Отже, для пертузумабу не потрібна надекспресія HER2 для прояву його активності як протипухлинного засобу. Крім того, внаслідок доповнюючих механізмів їх дії комбінація пертузумабу і T-DM1, має потенційну можливість застосовуватися в лікуванні захворювань, при яких є надекспресія HER2.

Пертузумаб оцінювали як препарат для монотерапії в п'яти клінічних випробуваннях в фазі II, проведених на різних злоякісних пухлинах, включаючи МБС з низьким рівнем експресії HER2, недрібноклітинну карциному легень, гормон-стійку злоякісну пухлину передміхурової залози і злоякісну пухлину яєчників. У фазі II клінічних випробувань оцінювали ефективність пертузумабу як самостійного препарату при другій або третій лінії хіміотерапії у пацієнток з метастатичним раком молочної залози (МБС) з нормальною експресією HER2 (Cortes et al., 2005, J. Clin. Oncol., 23:3068). Оцінювали ефективність пертузумабу в фазі II клінічних випробувань в комбінації з трастузумабом (Baselga J. et al., "A Phase II trial of trastuzumab and pertuzumab in patients with HER-2-positive metastatic breast cancer that had progressed during trastuzumab therapy: full response data", European Society of Medical Oncology, Stockholm, Sweden, September 12-16, 2008; Gelmon et al., 2008, J. Clin. Oncol., 26:1026). У першому дослідженні брало участь 11 пацієнток з HER-позитивною МБС, які раніше отримували до трьох курсів лікування з включенням трастузумабу (Portera et al., 2007).

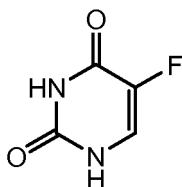
Бевацизумаб (номер по CAS 216974-75-3, авастин®, Genentech) являє собою моноклональне антитіло до VEGF, до васкулярного ендотеліального фактора росту (патент США № 7227004; патент США № 6884879; патент США № 7060269; патент США № 7169901; патент США № 7297334), препарат застосовують для лікування злоякісних пухлин, де він пригнічує їх ріст, блокуючи утворення нових кровоносних судин. Бевацизумаб був першим застосовуваним в клініці інгібітором ангіогенезу в США, дозволеним FDA в 2004 р., для застосування в комбінації із звичайною хіміотерапією для лікування метастатичного раку ободової кишки і більшості форм метастатичної недрібноклітинної карциноми легень. Було проведено декілька завершальних стадій клінічних випробувань для оцінки його безпеки і ефективності у пацієнтів з ад'ювантним/неметастатичним раком ободової кишки, метастатичним раком молочної залози, метастатичним раком нирки, метастатичною мультиформною гліобластомою, метастатичним раком яєчників, метастатичним гормон-стійким раком передміхурової залози і метастатичним або неоперабельним місцево-розповсюдженим раком підшлункової залози.

Звичайно анти-VEGF-антитіло не буде зв'язуватися з іншими гомологами VEGF, такими як VEGF-B або VEGF-3, і з іншими факторами росту, такими як PlGF, PDGF або bFGF. Переважні антитіла до VEGF включають моноклональне антитіло, яке зв'язується з тим самим епітопом, що і моноклональне анти-VEGF-антитіло A4.6.1, продуковане гібридомом ATCC HB 10709; рекомбінантне гуманізоване моноклональне антитіло до VEGF, отримане, як описано Presta et al. 1997, Cancer Res., 57:4593-4599, включаючи, не обмежуючись цим, бевацизумаб.

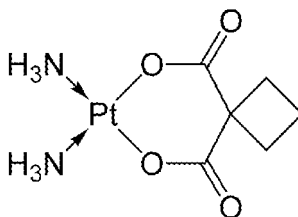
Бевацизумаб містить мутантні каркасні області людського IgG1 і антигензв'язувальні області, що визначають комплементарність з мишачого моноклонального анти-hVEGF-антитіла A4.6.1, яке блокує зв'язування людського VEGF з його рецепторами. Приблизно 93 % амінокислотної послідовності бевацизумабу, включаючи велику частину каркасних областей, походить з людського IgG1 і приблизно 7 % послідовності походить з мишачого антитіла A4.6.1. Бевацизумаб має молекулярну масу, що становить приблизно 149000 дальтон, і він глікозильований. Бевацизумаб і інші гуманізовані анти-VEGF-антитіла детально описані в патенті США № 6884879. Додаткові анти-VEGF-антитіла включають антитіла серій G6 і B20 (наприклад, G6-31, B20-4.1), як показано на Фіг. 27-29 в міжнародній заявці WO2005/012359. В одному варіанті здійснення антитіло серії B20 зв'язується з функціональним епітопом в людському VEGF, що містить залишки F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 і C104.

Гібридомні лінії, що експресують анти-VEGF-антитіла A4.6.1 (ATCC HB 10709) і B2.6.2 (ATCC HB 10710), депозовані і зберігаються в Американській колекції типових культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA. Клон, що експресує поліпептид VEGF-E (патент США № 6391311), кодований інсертом нуклеотидної послідовності депозиту ATCC під номером DNA29101-1276, депозований 5 березня 1998 і зберігається під номером ATCC 209653 в Американській колекції типових культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA.

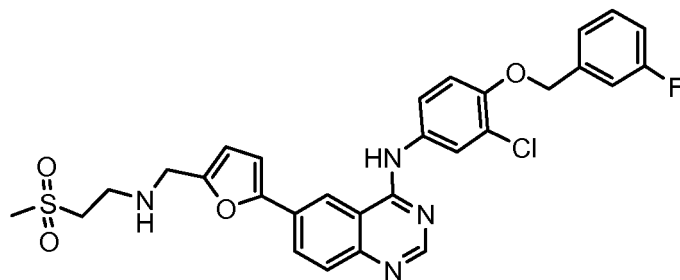
5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, номер по CAS № 51-21-8) являє собою інгібітор тимідилатсинтази, і протягом десятиріч його застосовували для лікування раку, включаючи колоректальний рак і рак підшлункової (патент США № 2802005; патент США № 2885396; Barton et al., 1972, Jour. Org. Chem., 37:329; Hansen R.M., 1991, Cancer Invest., 9:637-642). 5-FU представляє 5-фтор-1H-піримідин-2,4-діон і він має формулу:



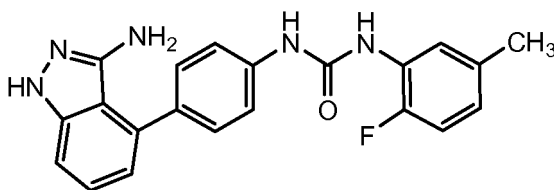
Карбоплатин (номер за CAS № 41575-94-4) являє собою хіміотерапевтичний засіб, який застосовують для лікування злоякісних пухлин яєчників, легень, голови і шиї (патент США № 4140707). Карбоплатин представляє азанід; циклобутан-1,1-дикарбонової кислоти платину і має формулу:



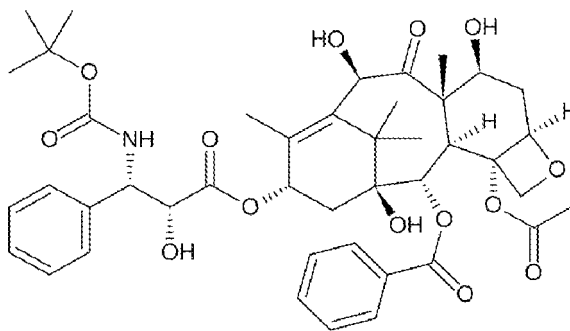
Лапатиніб (номер по CAS № 388082-78-8, тикерб®, GW572016, Glaxo SmithKline) дозволений для застосування в комбінації з капецитабіном (кселода®, Roche) для лікування пацієнток з місцево-розповсюдженою або метастатичною злоякісною пухлиною молочної залози із надекспресією HER2 (ErbB2) і пацієнток, що раніше отримували терапію антрацикліном, таксаном і трастузумабом. Лапатиніб є АТФ-конкурентним епідермальним фактором росту (EGFR) і подвійним інгібітором Her2/neu (ErbB-2) тирозинкінази (патент США № 6727256; патент США № 6713485; патент США № 7109333; патент США № 6933299; патент США № 7084147; патент США № 7157466; патент США № 7141576), який інгібує аутофосфорилування і активування рецепторів за допомогою зв'язування з АТФ-зв'язувальною ділянкою домену EGFR/HER2 протеїнкінази. Лапатиніб представляє N-(3-хлор-4-(3-фторбензилокси)феніл)-6-(5-((2-(метилсульфоніл)етиламіно)метил)фуран-2-іл)хіназолін-4-амін і він має формулу:



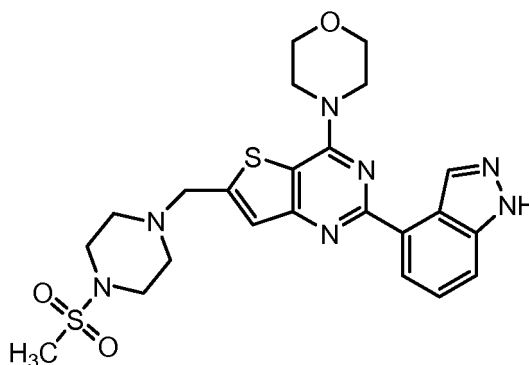
ABT-869 (Abbott and Genentech) є багатомішневим інгібітором сімейства рецепторів тирозинкіназ VEGF і PDGF для потенційного лікування раку при прийомі препарату перорально (патент США № 7297709; заявка на патент США № 2004/235892; заявка на патент США № 2007/104780). Початі клінічні випробування препарату при лікуванні недрібноклітинного раку легень (NSCLC), гепатоцелюлярної карциноми (HCC) і нирково-клітинної карциноми (RCC). У хімічному відношенні ABT-869 представляє 1-(4-(3-аміно-1H-індазол-4-іл)феніл)-3-(2-фтор-5-метилфеніл)сечовину (номер по CAS № 796967-16-3) і має формулу:



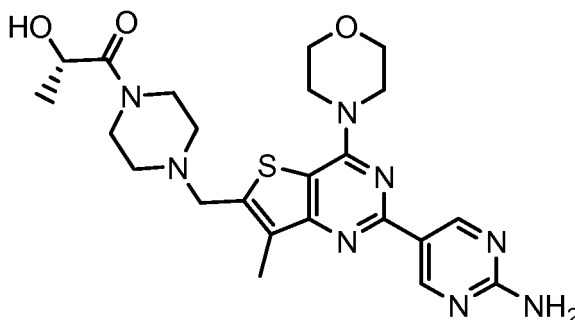
Доцетаксел (таксотер®, Sanofi-Aventis) застосовують для лікування раку молочної залози, яєчників і NSCLC (патент США № 4814470; патент США № 5438072; патент США № 5968582; патент США № 5714512; патент США № 5750561). Доцетаксел представляє N-трет-бутиловий ефір (2R, 3S)-N-карбокси-3-фенілізосерину, 13-ефір 5,20-епокси-1,2,4,7,10,13-гексагідрокситахс-11-ен-9-ону 4-ацетат-2-бензоату тригідрату (патент США № 4814470; Європейський патент 253738; номер по CAS 114977-28-5) і має формулу:



GDC-0941 (Genentech Inc.) являє собою селективний, що має гарну біодоступність при пероральному прийомі тієнопіримідиновий інгібітор PI3K з обіцяючими фармакокінетичними і фармацевтичними властивостями (Folkes et al., 2008, J. Med. Chem., 51(18):5522-5532; заявка на патент США № 2008/0076768; заявка на патент США № 2008/0207611; Belvin et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99th:April 15, Abstract 4004; Folkes et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99th:April 15, Abstract LB-146; Friedman et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99th:April 14, Abstract LB-110). GDC-0941 демонструє синергічну активність в умовах in vitro і in vivo в комбінації з деякими хімотерапевтичними засобами на клітинних лініях солідних пухлин (заявка на патент США № 12/208227, Belvin et al. "Combinations of phosphoinositide 3-kinase inhibitor compounds and chemotherapeutic agents and methods of use", подана 10 вересня 2008). У хімічному відношенні GDC-0941 представляє 4-(2-(1H-індазол-4-іл)-6-((4-(метилсульфоніл)піперазин-1-іл)метил)тієно[3,2-d]піримідин-4-іл)морфолін (номер по CAS 957054-30-7) і має формулу:



GNE-390 (Genentech Inc.) являє собою селективний, тієнопіримідиновий інгібітор PI3K, що має гарну біодоступність при пероральному прийомі з обіцяючими фармакокінетичними і фармацевтичними властивостями (заявка на патент США № 2008/0242665; міжнародна заявка WO 2008/070740). GNE-390 демонструє синергічну активність в умовах *in vitro* і *in vivo* в комбінації з деякими хіміотерапевтичними засобами на клітинних лініях солідних пухлин (заявка на патент США № 12/208227, Belvin et al. "Combinations of phosphoinositide 3-kinase inhibitor compounds and chemotherapeutic agents and methods of use", подана 10 вересня 2008). GDC-390 представляє (S)-1-(4-((2-(2-амінопіримідин-5-іл)-7-метил-4-морфолінотієно[3,2-d]піримідин-6-іл)метил)піперазин-1-іл)-2-гідроксипропан-1-он і має формулу:



Оцінка біологічної активності

Дослідження на клітинних культурах в умовах *in vitro* з використанням трастузумабу-MCC-DM1(T-DM1) в комбінації з різними хіміотерапевтичними засобами або біологічно націленими засобами проводили на ряді клітинних ліній з ампліфікацією HER2. Дані аналізували з використанням методу Chou&Talalay для визначення комбінаційного індексу (CI) для кожної комбінації при кратних значеннях IC_{50} для кожного лікарського засобу. Значення CI нижче за 0,7 означають наявність синергії; CI в межах 0,7-1,3 - адитивний ефект і значення CI вище за 1,3 - антагонізм. Відносно комбінацій з хіміотерапевтичними засобами, T-DM1 в комбінації з доцетакселем або 5-FU приводили до забезпечення адитивної або синергічної антипроліферативної активності, в той час як комбінації з гемцитабіном або карбоплатином були не активні або чинили антагоністичну дію по відношенню до T-DM1. У дослідях з мишачими ксенотрансплантатами були отримані аналогічні результати, де T-DM1 в комбінації з доцетакселем або 5-FU забезпечував істотно більш високу протипухлинну активність в порівнянні з цими засобами окремо. T-DM1 в комбінації з карбоплатином забезпечував більш високу ефективність в порівнянні з одними препаратами, в той час як комбінація T-DM1 з гемцитабіном не була більш ефективною в порівнянні з одним T-DM1. T-DM1 в поєднанні з пертузумабом, лапатинібом або GDC-0941 приводив до прояву адитивної або синергічної антипроліферативної дії на клітинних культурах, і протипухлинна активність істотно підвищувалася в умовах *in vivo* в порівнянні з лікуванням препаратами по окремоті. У протилежність некон'югований трастузумаб виявляв антагоністичну дію у відношенні T-DM1 за рахунок зв'язування з одним і тим самим епітопом на HER2. В експериментах в умовах *in vivo* з T-DM1 в комбінації з антиангіогенними засобами, такими як антитіло B20-4.1 або інгібітор на основі невеликої молекули ABT-869, було показане посилення протипухлинної ефективності з всіма тестованими комбінаціями, за винятком найбільш високої дози T-DM1 (10 або 15 мг/кг) в поєднанні з B20-4.1.

Оцінювали ефективність комбінацій трастузумабу-MCC-DM1(T-DM1) і численних протипухлинних засобів по визначенню їх антипроліферативної активності на моделях *in vitro* на клітинах пухлини молочної залози із надекспресією HER2 і по визначенню протипухлинної ефективності в умовах *in vivo* на ксенотрансплантатах злоякісної пухлини молочної залози. У даних дослідках трастузумаб-MCC-DM1 додавали до цитотоксичних хіміотерапевтичних засобів, антитіл або інгібіторів кінази на основі невеликої молекули.

Комбінація мишачого анти-VEGF-антитіла B20-4.1 (Liang et al., 2006, J. Biol. Chem., 281:951-961), аналога бевацизумабу, і трастузумабу-MCC-DM1 при випробуванні на моделі ксенотрансплантатів злоякісної пухлини молочної залози на мишах виявляла більш високу протипухлинну активність в порівнянні з одним B20-4.1. Результати даних досліджень забезпечують прогностичну основу синергічних ефектів і обґрунтування для майбутніх клінічних випробувань лікувальних схем, що включають трастузумаб-MCC-DM1 з різними протипухлинними засобами при HER-2-позитивних злоякісних пухлинах молочної залози.

Синергічну дію спостерігали з комбінаціями засобів, направлених на HER2, таких як трастузумаб-DM1 плюс лапатиніб або трастузумаб-DM1 плюс антитіло до HER2 пертузумаб (інгібітор димеризації HER2).

Трастузумаб-MCC-DM1 в поєднанні з карбоплатином або 5-FU показував підвищену активність в порівнянні з лікуванням одними цими засобами, в той час як комбіноване лікування з гемцитабіном не приводило до посилення протипухлинної активності.

Блокада шляху з участю PI3-кінази з використанням GDC-0941, інгібітора кінази з невеликою молекулою p110 ізоформ (міжнародна заявка WO 2007/129161), посилювала активність трастузумабу-DM1.

Використання T-DM1 в поєднанні з інгібітором PI3K GDC-0941 приводило до посилення протипухлинної активності на клітинних лініях HER2-експресуючої злоякісної пухлини молочної залози з мутантною PI3K: BT-474 (K111N), MDA-361.1 (E545K) і KPL4 (H1047R). Комбінована обробка в умовах *in vitro* приводила до адитивного або синергічного інгібування проліферації клітин, а також підвищеного апоптозу. Аналогічно ефективність в умовах *in vivo* посилювалася при комбінованій обробці лікарськими засобами в порівнянні з активністю одних препаратів на моделях MDA-MB-361.1 і ксенотрансплантатах Fo5 з ампліфікацією HER2. Результати біохімічного визначення біомаркерів при випробуванні кожного препарату показували, що мало місце інгібування фосфо-Akt і фосфо-ERK під дією обох T-DM1 і GDC-0941, зниження фосфорилювання Rb і PRAS40 під дією GDC-0941 і підвищення рівня мітотичних маркерів фосфогістону H3 і цикліну B1 після обробки T-DM1. Крім того, введення T-DM1 приводило до апоптозу клітин на даних моделях раку молочної залози за даними визначення фрагмента розщеплення PARP масою 23 kDa, зниження рівня Bcl-XL, а також активації каспаз 3 і 7. Додавання GDC-0941 до T-DM1 додатково індукувало посилення апоптозу. У даних дослідженнях була отримана доказова основа для застосування раціональних комбінацій лікарських засобів при лікуванні злоякісної пухлини молочної залози з ампліфікацією HER2 і пропозицій по додаткових терапевтичних підходах для пацієнтів, у яких має місце прогресування захворювання при терапії трастузумабом або лапатинібом.

Тести оцінки проліферації клітин в умовах *in vitro*

Активність комбінацій трастузумабу-MCC-DM1 з хіміотерапевтичними засобами оцінювали в умовах *in vitro* з використанням тесту оцінки проліферації клітин, описаного в прикладі 2; промислово доступний тест CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability від Promega Corp., Madison, WI. Даний гомогенний тест заснований на рекомбінантній експресії люциферази Coleoptera (патент США № 5583024; патент США № 5674713; патент США № 5700670) і визначенні кількості життєздатних клітин в культурі за кількістю присутньої АТФ, індикатора метаболічно активних клітин (Crouch et al., 1993, J. Immunol. Meth., 160:81-88; патент США № 6602677). Тест CellTiter-Glo[®] проводили в форматі 96- або 384-ямкових планшетів, зробивши їх придатними для автоматичного високопропускного скринінгу (HTS) (Cree et al., 1995, AntiCancer Drugs, 6:398-404). Гомогенний аналіз включає додавання одного реагенту (реагенту CellTiter-Glo[®]) безпосередньо до клітин, культивованих в середовищі з додаванням сироватки. Відмивання клітин, видалення середовища і численні стадії піпетування не потрібні. За допомогою даної системи можна детектувати таку невелику кількість клітин, як 15 клітин/ямку в 384-ямковому планшеті протягом 10 хв. після внесення реагенту і перемішування.

Гомогенний формат "додавання-перемішування-визначення" приводить до лізису клітин і генерації люмінесцентного сигналу, прямо пропорційного кількості присутньої АТФ. Кількість АТФ прямо пропорційна кількості клітин, що знаходяться в культурі. Тест CellTiter-Glo[®] відтворює люмінесцентний сигнал типу свічення, що утворюється в реакції з участю люциферази, який має період напіврозпаду більш, ніж 5 год., в залежності від типу клітин, що

використовується, і середовища. Життєздатні клітини відбиваються у відносних одиницях люмінесценції (RLU). Субстрат люциферин жуків зазнає окислювального декарбоксилювання, яке каталізується рекомбінантною люциферазою світляків, з одночасним перетворенням АТФ в АМФ і генерацією фотонів. Внаслідок великого періоду напіврозпаду усувається необхідність у використанні інжекторів, і забезпечується гнучкість для безперервного або періодичного способу обробки безлічі планшетів. Даний тест оцінки проліферації клітин можна використати в різних багатоямкових форматах, наприклад, 96- або 384-ямковому форматі. Дані можна реєструвати з допомогою люмінометра або візуалізуючого пристрою з CCD камерою. Вихід люмінесценції виражають у відносних світлових одиницях (RLU) протягом часу.

Антипроліферативну дію трастузумабу-MCC-DM1 і комбінацій з хіміотерапевтичними засобами оцінювали з використанням тесту CellTiter-Glo® (приклад 2) на пухлинних клітинних лініях, результати представлені на Фіг. 1-9 і 18-33.

Наведені як приклад варіанти здійснення включають спосіб ідентифікації сполук для застосування в комбінації для лікування раку, що включає: (а) введення терапевтичної комбінації трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і хіміотерапевтичного засобу в пухлинну клітинну лінію в умовах *in vitro* і (b) визначення синергічного або несинергічного ефекту. Значення комбінаційного індексу (CI) вище за 1,3 означає антагонізм; значення CI в межах від 0,7 до 1,3 означає адитивний ефект і значення CI нижче за 0,7 означає синергічну взаємодію препаратів.

На Фіг. 1 показана антагоністична дія трастузумабу в комбінації з трастузумабом-MCC-DM1 (T-DM1) в різних концентраціях при кратних окремих значеннях IC_{50} (таблиця 1) на клітинах SK-BR-3, які є чутливими до трастузумабу. Будували графік залежності кількості життєздатних клітин проти кратних значень IC_{50} . Комбінаційний індекс (CI) в інтервалі від IC_{10} до IC_{90} для кожної комбінації вище за 2, що вказує на наявність антагоністичної дії в умовах *in vitro*. Однак комбінація T-DM1+трастузумаб не показала антагоністичної дії в умовах *in vivo*.

Таблиця 1

Проліферація клітин SK-BR-3-3 доби

Кратні IC_{50}	Трастузумаб нг/мл	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,5 X	20,57	2,28	5,1	>2
1 X	61,72	6,86	26,2	>2
2 X	185,19	20,58	36,3	>2
4 X	555,56	61,73	43,6	>2
8 X	1666,67	185,19	45,0	>2
16 X	5000	555,56	41,7	>2

На Фіг. 2 показана антагоністична дія трастузумабу в комбінації з трастузумабом-MCC-DM1 (T-DM1) в різних концентраціях при кратних окремих значеннях IC_{50} (таблиця 2) на клітинах BT-474 EEI, які є резистентними до трастузумабу. Будували графік залежності кількості життєздатних клітин від кратних значень IC_{50} . Комбінаційний індекс (CI) в інтервалі від IC_{10} до IC_{90} для кожної комбінації вище за 2, що вказує на антагоністичну дію.

Таблиця 2

Проліферація клітин BT-474-EEI-3 доби

Кратні IC_{50}	Трастузумаб нг/мл	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,125 X	1,52	1,52	9,5	>2
0,25 X	4,57	4,57	4,5	>2
0,5 X	13,71	13,71	3,1	>2
1 X	41,15	41,15	12,1	>2
2 X	123,46	123,46	10,8	>2
4 X	370,4	370,4	11,6	>2
8 X	1111,1	1111,1	18,4	>2

На Фіг. 3 показана синергічна дія пертузумабу в комбінації з трастузумабом-MCC-DM1 (T-DM1) в різних концентраціях при кратних окремих значеннях IC_{50} (таблиця 3) на клітинах MDA-MB-175. Будували графік залежності кількості життєздатних клітин від кратних значень IC_{50} .

Комбінаційний індекс (CI) в інтервалі від IC_{10} до IC_{90} для кожної комбінації нижче за 1, що вказує на наявність синергічної дії.

Таблиця 3

Проліферація клітин MDA-MB-175-5 діб

Кратні IC_{50}	Пертузумаб нг/мл	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,0625 X	39,06	31,25	21,1	0,2
0,125 X	78,13	62,5	33,3	0,107
0,25 X	156,3	125	21,9	, 766
0,5 X	312,5	250	33,6	0,597
1 X	625	500	50,7	0,391
2 X	1250	1000	67,7	0,259

5 На Фіг. 3а наведений графік залежності життєздатності клітин в умовах *in vitro* на 5 добу від кратних концентрацій IC_{50} пертузумабу, трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і комбінації пертузумабу і T-DM1. Будували графік залежності кількості життєздатних клітин від кратних значень IC_{50} . Комбінаційний індекс (CI) в інтервалі від IC_{10} до IC_{90} для кожної комбінації нижче 1 із середнім значенням $CI=0,096$, що вказує на синергічну дію (

10

Таблиця 3а

Проліферація клітин MDA-MB-175-5 діб

Кратні IC_{50}	Ефект (%)	CI
0,0625x	21,3	0,093
0,125x	37,5	0,037
0,25x	40,1	0,060
0,5x	50,3	0,052
1x	53,9	0,078
2x	57,0	0,120
4x	65,5	0,117
8x	66,8	0,208

На Фіг. 4 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 5 добу від різних фіксованих концентрацій пертузумабу в комбінації з концентрацією реакції у відповідь трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) і різних концентрацій одного T-DM1. На Фіг. 4 показаний вплив фіксованих концентрацій T-DM1 в комбінації з різними концентраціями пертузумабу. Додавання пертузумабу до T-DM1 приводить до забезпечення трохи більш високої антипроліферативної активності в порівнянні з одним T-DM1.

15

На Фіг. 5 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 5 добу від різних фіксованих концентрацій трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) в комбінації з концентрацією реакції у відповідь пертузумабу і різних концентрацій одного пертузумабу. На Фіг. 5 показаний вплив фіксованих концентрацій пертузумабу в комбінації з різними концентраціями T-DM1 на проліферацію клітин BT-474. Додавання T-DM1 до пертузумабу приводить до посилення дії одного пертузумабу.

20

На Фіг. 6 показана синергічна дія пертузумабу в комбінації з трастузумабом-MCC-DM1 в різних концентраціях при кратних окремих значеннях IC_{50} (таблиця 4) на клітинах BT-474. Будували графік залежності кількості життєздатних клітин від кратних значень IC_{50} . Комбінаційний індекс (CI) в інтервалі від IC_{10} до IC_{90} знаходиться в межах від 0,198 до 1,328. Середнє значення CI для даної межі = 0,658, що вказує на синергічну дію.

25

Таблиця 4

Проліферація клітин BT-474-5 діб

Кратні IC ₅₀	Пертузумаб нг/мл	T-DM1 нг/л	Ефект (%)	CI
0,25 X	34,29	11,43	3,9	>2
0,5 X	102,88	34,29	2,0	>2
1 X	308,64	102,88	58,9	0,198
2 X	925,93	308,64	64,6	0,449
4 X	2777	926	64,9	1,328

5 На Фіг. 7 наведений графік залежності життєздатності клітин SK-BR-3 в умовах in vitro на 3 добу від різних концентрацій T-DM1 в комбінації з фіксованими концентраціями лапатинібу (4,5 нМ; 14 нМ; 41 нМ; 123 нМ) і різних концентрацій одного T-DM1 (0-1000 нг/мл). Додавання T-DM1 до лапатинібу приводить до деякого посилення антипроліферативної дії в порівнянні з одним T-DM1.

10 На Фіг. 7а наведений графік залежності життєздатності клітин SK-BR-3 в умовах in vitro на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ T-DM1, лапатинібу і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 і лапатинібу, як показано в таблиці 7а. Середнє значення CI в інтервалі від IC₁₀ до IC₉₀=0,793, що вказує на наявність адитивної дії.

Таблиця 7а

Проліферація клітин SK-BR-3-3 доби

Кратні IC ₅₀	Лапатиніб нМ	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,25x	4,57	1,52	3,5	>2
0,5x	13,72	4,57	22,0	1,384
1x	41,15	13,72	52,5	0,596
2x	123,44	41,15	75,9	0,406
4x	370,33	123,44	81,1	0,787
8x	1111	370,33	80,1	>2

15 На Фіг. 8а наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах in vitro на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ T-DM1, лапатинібу і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 і лапатинібу, як показано в таблиці 8а. Середнє значення CI в інтервалі від IC₁₀ до IC₉₀=0,403, що вказує на наявність синергії.

Таблиця 8а

Проліферація клітин BT-474-3 доби

Кратні IC ₅₀	Лапатиніб нМ	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,125x	0,51	1,52	1,4	>2
0,25x	1,52	4,57	1,2	>2
0,5x	4,57	13,72	26,8	0,493
1x	13,72	41,15	62,2	0,201
2x	41,15	123,44	73,9	0,293
4x	123,44	370,33	84,1	0,390
8x	370,33	1111	89,3	0,638

20 На Фіг. 8 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах in vitro на 3 добу від різних концентрацій T-DM1 в комбінації з фіксованими концентраціями лапатинібу (1,5 нМ; 4,5 нМ; 14 нМ; 41 нМ; 123 нМ) і різних концентрацій одного T-DM1 (0-1000 нг/мл). Додавання лапатинібу до T-DM1 приводить до посилення антипроліферативної дії в порівнянні з одним препаратом.

25 На Фіг. 9 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474-EEI в умовах in vitro на 3 добу від різних концентрацій T-DM1 в комбінації з фіксованими концентраціями лапатинібу (14

нМ; 41 нМ; 123 нМ; 370 нМ; 1111 нМ) і різних концентрацій одного Т-DM1 (0-1000 нг/мл). Додавання лапатинібу до Т-DM1 приводить до посилення антипроліферативної дії в порівнянні з одним препаратом.

- 5 На Фіг. 18 наведений графік залежності життєздатності клітин SK-BR-3 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ 5-FU, трастузумабу-MCC-DM1 (Т-DM1) і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій 5-FU і Т-DM1 (таблиця 18). Комбінація 5-FU і Т-DM1 чинить адитивну дію на клітини SK-BR-3 при середньому значенні CI в інтервалі від IC₁₀ до IC₉₀=0,952.

Таблиця 18

5-FU+T-DM1: проліферація клітин SK-BR-3-3 доби

Кратні IC ₅₀	5-FU (мкМ)	Т-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,5x	62,5	1,95	38,9	1,035
1x	125	3,91	60,3	0,647
2x	250	7,81	69,2	0,835
4x	500	15,625	74,3	1,292

10

На Фіг. 19 наведений графік залежності життєздатності клітин BT-474 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ 5-FU, трастузумабу-MCC-DM1 (Т-DM1) і комбінацій з співвідношенням фіксованих концентрацій 5-FU і Т-DM1 (таблиця 19). Комбінація 5-FU і Т-DM1 чинить синергічну дію на клітини BT-474 із середнім значенням CI=0,623.

15

Таблиця 19

5-FU+T-DM1: проліферація клітин BT-474-3 доби

Кратні IC ₅₀	5-FU (мкМ)	Т-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,25x	0,488	3,90	17,1	0,508
0,5x	0,976	7,81	26,8	0,494
1x	1,95	15,62	38,2	0,513
2x	3,91	31,25	46,8	0,661
4x	7,81	62,5	53,6	0,941

- 20 На Фіг. 20 наведений графік залежності життєздатності клітин SK-BR-3 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ гемцитабіну, трастузумабу-MCC-DM1 (Т-DM1) і комбінацій із співвідношенням фіксованих концентрацій гемцитабіну і Т-DM1 (таблиця 20). Гемцитабін в комбінації з Т-DM1 приводить до антагоністичної взаємодії лікарських засобів при середньому значенні CI>1,3 при всіх тестованих комбінаціях.

Таблиця 20

Гемцитабін (GEM) + Т-DM1: проліферація клітин SK-BR-3-3 доби

Кратні IC ₅₀	GEM (нМ)	Т-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,5x	3,12	6,25	28,7	1,308
1x	6,25	12,5	61,4	1,500
2x	12,5	25	69,9	2,588
4x	25	50	72,2	4,957

- 25 На Фіг. 21 наведений графік залежності життєздатності клітин MDA-MD-361 в умовах *in vitro* на 3 добу від кратних концентрацій IC₅₀ гемцитабіну, трастузумабу-MCC-DM1 (Т-DM1) і комбінацій із співвідношенням фіксованих концентрацій гемцитабіну і Т-DM1 (таблиця 21). Комбінація препаратів дає антагоністичний ефект при середньому значенні CI=1,706.

Таблиця 21

Гемцитабін (GEM) + T-DM1: проліферація клітин MDA-MD-361-3 доби

Кратні IC ₅₀	GEM (нМ)	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,125x	0,39	3,12	4,5	1,420
0,25x	0,78	6,25	10,3	1,584
0,5x	1,56	12,5	30,7	1,336
1x	3,12	25	59,2	1,280
2x	6,25	50	76,3	1,581
4x	12,5	100	80,3	2,747

На Фіг. 22 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин KPL4 в умовах in vitro на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 (від 6,25 до 100 нг/мл) і GDC-0941 (від 62,5 нМ до 1 мкМ) при кратних концентраціях IC₅₀ від 0,25x до 4x. У таблиці 22 показана дія в інтервалі інгібування 10-90 % з розрахунковими значеннями CI і середнім значенням CI, що дорівнює 1,111.

Будували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії на Фіг. 22. Графік незалежності Блісса показує розраховану адитивну дію комбінації двох окремих сполук.

Таблиця 22

GDC-0941+T-DM1: проліферація клітин KPL4-3 доби

Кратні IC ₅₀	GDC-0941 (нМ)	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,25x	62,5	6,25	1,0	6,319
0,5x	125	12,5	33,9	1,229
1x	250	25	71,8	1,053
2x	500	50	91,1	1,051
4x	1000	100	93,7	1,753

На Фіг. 23 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин KPL4 в умовах in vitro на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями із співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 (від 1,25 до 80 нг/мл) і GDC-0941 (від 31,25 нМ до 2 мкМ) при кратних концентраціях IC₅₀ від 0,0625x до 16x. Будували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії. У таблиці 23 показана дія в інтервалі інгібування 10-90 % з розрахунковими значеннями CI і середнім значенням CI, що дорівнює 0,802. Комбінація T-DM1 і GDC-0941 проявляє адитивний ефект на клітинній лінії KPL4.

Таблиця 23

GDC-0941+T-DM1: проліферація клітин KPL4-3 доби

Кратні IC ₅₀	GDC-0941 (нМ)	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,125x	31,25	1,25	12,6	1,100
0,25x	62,5	2,5	20,6	1,344
0,5x	125	5	39,2	1,263
1x	250	10	84,5	0,452
2x	500	20	94,9	0,350
4x	1000	40	97,1	0,440
8x	2000	80	97,9	0,668

На Фіг. 24 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин KPL4 з ампліфікацією Her2, резистентних до герцептину[®], мутантних по PIK3CA (H1047R) в умовах in vitro через 3 діб після обробки T-DM1, PI103, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1+PI103 і T-DM1+GDC-0941 при кратних концентраціях IC₅₀ від 0 до 16x. У таблиці 24 наведені значення комбінаційного індексу. На основі отриманих результатів можна передбачити, що між T-DM1 і GDC-0941 має місце синергія в умовах in vitro, оскільки значення

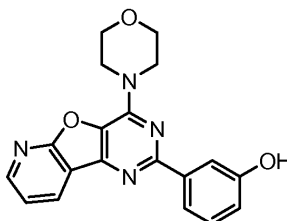
CI знаходяться в межах від 0,5 до 1, і між T-DM1 і PI103 має місце адитивний ефект, так як значення CI близькі до 1.

Таблиця 24

Комбінації: проліферація клітин KPL4

Значення CI при:	T-DM1+GDC-0941	T-DM1+PI103
ED50	0,74303	1,04069
ED75	0,63448	0,9721
ED90	0,54179	0,91094

- 5 PI3K представляє вибіркового інгібітора PI103 (Hayakawa et al., 2007, Bioorg. Med. Chem. Lett., 17:2438-2442; Raynaud et al., 2007, Cancer Res., 67:5850; Fan et al., 2006, Cancer Cell, 9:341-349; патент США № 6608053) і має формулу:



10

На Фіг. 25 наведений графік апоптозу (запрограмованої клітинної загибелі) клітин KPL4 каспаза 3/7 в умовах *in vitro* через 24 год. після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 і GDC-0941. Комбінація T-DM1 і GDC-0941 приводить до істотного посилення апоптозу в порівнянні з одним препаратом.

15

На Фіг. 26 наведений графік апоптозу (запрограмованої клітинної загибелі) клітин KPL4 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 і GDC-0941 в співвідношеннях фіксованих концентрацій. Комбінація T-DM1 і GDC-0941 приводить до істотного збільшення апоптозу в порівнянні з одним препаратом.

20

На Фіг. 27 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин MDA-MB-361 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 (від 3,125 до 50 нг/мл) і GDC-0941 (від 62,5 нМ до 1 мкМ) при кратних концентраціях IC_{50} від 0,125х до 8х. Будували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії. У таблиці 27 показана дія в інтервалі інгібування 10-90 % з розрахунковими значеннями CI і середнім значенням CI, що дорівнює 0,888. Комбінація T-DM1 і GDC-0941 приводить до адитивного антипроліферативного ефекту на клітинах MDA-MB-361 із середнім значенням $CI=0,889$.

25

Таблиця 27

GDC-0941+T-DM1: проліферація клітин MDA-MB-361-3 доби

Кратні IC_{50}	GDC-0941 (нМ)	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,25х	62,5	3,125	21,9	1,003
0,5х	125	6,25	37,3	0,862
1х	250	12,5	51,8	0,920
2х	500	25	73,1	0,742
4х	1000	50	82,3	0,917

30

На Фіг. 28 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин MDA-MB-361 в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 (від 3,125 до 100 нг/мл) і GDC-0941 (від 62,5 нМ до 2 мкМ) при кратних концентраціях IC_{50} від 0,125х до 8х. Будували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії. У таблиці 28 показана дія в інтервалі інгібування 10-90 % з розрахунковими значеннями CI і середнім значенням CI, що дорівнює 0,813. T-DM1 в комбінації з GDC-0941

35

приводить до прояву адитивного антипроліферативного ефекту на клітинах MDA-MB-361 при середньому значенні CI=0,813.

Таблиця 28

GDC-0941+T-DM1: проліферація клітин MDA-MB-361-3 доби

Кратні IC ₅₀	GDC-0941 (нМ)	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,25x	62,5	3,125	28,6	0,785
0,5x	125	6,25	36,7	0,960
1x	250	12,5	48,5	1,026
2x	500	25	66,6	0,807
4x	1000	50	83,2	0,590
8x	2000	100	87,7	0,709

- 5 На Фіг. 29 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин BT-474 в умовах in vitro на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 (від 3,125 до 100 нг/мл) і GDC-0941 (від 31,25 нМ до 1 мкМ) при кратних концентраціях IC₅₀ від 0,125x до 4x. Будували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії. У таблиці 29 показана дія в інтервалі інгібування 10-90 % з розрахунковими значеннями CI і середнім значенням CI, що дорівнює 1,2122. У використаних співвідношеннях концентрацій GDC-0941 в комбінації з T-DM1 не виявляють комбінованого ефекту на клітинах BT-474.

Таблиця 29

GDC-0941+T-DM1: проліферація клітин BT-474-3 доби

Кратні IC ₅₀	GDC-0941 (нМ)	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,125x	31,25	3,125	8,0	>2
0,25x	62,5	6,25	22,7	1,032
0,5x	125	12,5	31,4	1,178
1x	250	25	43,9	1,207
2x	500	50	53,9	1,473
4x	1000	100	71,5	1,171

- 15 На Фіг. 30 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин BT-474 в умовах in vitro на 3 добу після обробки T-DM1, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1 (від 6,25 до 100 нг/мл) і GDC-0941 (від 62,5 нМ до 1 мкМ) при кратних концентраціях IC₅₀ від 0,25x до 4x. Будували графік прогнозу адитивної дії Блісса у вигляді пунктирної лінії. У таблиці 30 показана дія в інтервалі інгібування 10-90 % з розрахунковими значеннями CI і середнім значенням CI, що дорівнює 0,997, що вказує на адитивну дію.

Таблиця 30

GDC-0941+T-DM1: проліферація клітин BT-474-3 доби

Кратні IC ₅₀	GDC-0941 (нМ)	T-DM1 нг/мл	Ефект (%)	CI
0,25x	62,5	6,25	19,7	1,338
0,5x	125	12,5	31,5	1,167
1x	250	25	49,0	0,886
2x	500	50	66,0	0,708
4x	1000	100	73,9	0,886

- 25 На Фіг. 31 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин AU565 з ампліфікацією Her2, мутантних без PI3K в умовах in vitro на 3 добу після обробки T-DM1, PI103, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1+PI103 і T-DM1+GDC-0941 при кратних концентраціях IC₅₀ від 0 до 16x. У таблиці 31 наведені значення комбінаційного індексу. На основі отриманих результатів можна передбачити, що між T-DM1 і GDC-0941 має місце

антагонізм в умовах *in vitro*, оскільки значення CI становлять >1 , і між T-DM1 і PI103 існує адитивний ефект або незначний антагонізм, так як значення CI близькі або трохи вищі за 1.

Таблиця 31

Комбінації: проліферація клітин AU565

Значення CI при:	T-DM1+GDC-0941	T-DM1+PI 103
ED50	1,19123	1,12269
ED75	1,36342	0,97338
ED90	1,56063	0,84956

- 5 На Фіг. 32 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин EFM192A з ампліфікацією Her2, мутантних по PIK3CA (C420R) в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, PI103, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1+PI103 і T-DM1+GDC-0941 при кратних концентраціях IC_{50} від 0 до 16 \times . У таблиці 32 наведені значення комбінаційного індексу. На основі отриманих результатів можна передбачити про наявність
- 10 помірної синергії між T-DM1 і GDC-0941 в умовах *in vitro*, оскільки значення CI знаходяться в межах від 0,5 до 1, і синергії між T-DM1 і PI103, так як значення CI близькі до 0,5.

Таблиця 32

Комбінації: проліферація клітин EFM192A

Значення CI при:	T-DM1+GDC-0941	T-DM1+PI 103
ED50	0,80379	0,53861
ED75	0,66352	0,52087
ED90	0,5485	0,52001

- 15 На Фіг. 33 наведений графік життєздатності (проліферації) клітин HCC1954 з ампліфікацією Her2, резистентних до герцептину[®], мутантних по PIK3CA (H1047R) в умовах *in vitro* на 3 добу після обробки T-DM1, PI103, GDC-0941 і комбінаціями з співвідношенням фіксованих концентрацій T-DM1+PI103 і T-DM1+GDC-0941 при кратних концентраціях IC_{50} від 0 до 16 \times . У таблиці 33 наведені значення комбінаційного індексу. На основі отриманих результатів можна передбачити про наявність адитивного ефекту або незначну синергію між T-DM1 і GDC-0941 в
- 20 умовах *in vitro*, оскільки значення CI близькі до 1, і є незначна синергія між T-DM1 і PI103, так як значення CI <1 .

Таблиця 33

Комбінації: проліферація клітин HCC1954

Значення CI при:	T-DM1+GDC-0941	T-DM1+PI 103
ED50	1,15864	0,78902
ED75	0,92365	0,78684
ED90	0,74198	0,80771

- Ефективність на пухлинних ксенотрансплантатах в умовах *in vivo*
- 25 Ефективність комбінацій за винаходом можна оцінити в умовах *in vivo* при імплантації алотрансплантатів або ксенотрансплантатів пухлинних клітин на гризунах і обробкою пухлин комбінаціями. Передбачається отримання різних результатів в залежності від клітинної лінії, наявності або відсутності певних мутацій в пухлинних клітинах, послідовності введення трастузумабу-MCC-DM1 і хіміотерапевтичного засобу, схеми введення і інших чинників. Мишей
- 30 обробляли лікарським засобом(ами) або контрольним розчином (розчинником) і спостерігали протягом декількох тижнів або декілька для оцінки періоду часу, необхідного для двократного збільшення пухлини, \log загибелі клітин і пригнічення росту пухлин (приклад 3). На Фіг. 10-17 і 34-37 показана ефективність трастузумабу-MCC-DM1 в комбінації з хіміотерапевтичними засобами відносно пригнічення росту пухлинних ксенотрансплантатів у мишей.
- 35 На Фіг. 10 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для пухлин KPL-4, імплантованих в жирову подушку молочної залози імунodefіцитних мишей

SCID, після введення: (1) буфера ADC; (2) пертузумабу в дозі 15 мг/кг; (3) T-DM1 в дозі 0,3 мг/кг; (4) T-DM1 в дозі 1 мг/кг; (5) T-DM1 в дозі 3 мг/кг; (6) пертузумабу в дозі 15 мг/кг + T-DM1 в дозі 0,3 мг/кг; (7) пертузумабу в дозі 15 мг/кг + T-DM1 в дозі 1 мг/кг; (8) пертузумабу в дозі 15 мг/кг + T-DM1 в дозі 3 мг/кг. У тварин, яким вводили буфер ADC (1) було 0 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили пертузумаб в дозі 15 мг/кг (2), було 0 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили один T-DM1 в дозі 0,3 мг/кг (3) було 0 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили один T-DM1 в дозі 1 мг/кг (4) було 1 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили один T-DM1 в дозі 3 мг/кг (5) було 7 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили комбінацію пертузумабу в дозі 15 мг/кг і T-DM1 в дозі 0,3 мг/кг (6) було 5 PR і 0 CR. Результат у тварин, яким вводили комбінацію пертузумабу в дозі 15 мг/кг і T-DM1 в дозі 1 мг/кг (7), становив 8 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили комбінацію пертузумабу в дозі 15 мг/кг і T-DM1 в дозі 3 мг/кг (8) було 8 PR і 0 CR. Комбінація пертузумабу і T-DM1 забезпечує більш високу протипухлинну активність на ксенотрансплантатах KPL4 в порівнянні з одним препаратом.

На Фіг. 11 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для пухлин KPL-4, імплантованих в жирову подушку молочної залози імунodefіцитних мишей SCID, після введення: (1) буфера ADC; (2) 5-FU в дозі 100 мг/кг; (3) пертузумабу в дозі 40 мг/кг; (4) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг; (5) T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (6) 5-FU в дозі 100 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (7) пертузумабу в дозі 40 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (8) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (9) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + пертузумабу в дозі 40 мг/кг. В кінці дослідження проводили гістологічне дослідження всіх пухлин, що залишилися, які мали об'єм менш, ніж 50 мм³, і встановили, що у 8 зразках пухлин від мишей, що отримували один T-DM1 в дозі 5 мг/кг (5), 5 зразках від мишей в групі, що отримувала комбінацію 5-FU в дозі 100 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг (6) і 8 зразках від мишей, що отримували комбінацію пертузумабу в дозі 40 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг (7), були відсутні життєздатні пухлинні клітини.

На Фіг. 12 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинника (буфера ADC); (2) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг; (3) T-DM1 в дозі 3 мг/кг; (4) T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (5) T-DM1 в дозі 10 мг/кг; (6) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + T-DM1 в дозі 3 мг/кг; (7) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + T-DM1 в дозі 5 мг/кг; (8) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг + T-DM1 в дозі 10 мг/кг. Комбінація T-DM1 і B20-4.1 забезпечує посилене інгібування росту пухлин при дозі T-DM1 3 і 5 мг/кг, але не 10 мг/кг.

На Фіг. 13 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинника (буфера ADC); (2) T-DM1 в дозі 10 мг/кг; (3) 5-FU в дозі 100 мг/кг; (4) гемцитабіну в дозі 120 мг/кг; (5) карбоплатину в дозі 100 мг/кг; (6) 5-FU в дозі 100 мг/кг + T-DM1 в дозі 10 мг/кг; (7) гемцитабіну в дозі 120 мг/кг + T-DM1 в дозі 10 мг/кг; (8) карбоплатину в дозі 100 мг/кг + T-DM1 в дозі 10 мг/кг. Комбінація T-DM1 з 5-FU, карбоплатином або гемцитабіном забезпечує більш високу протипухлинну активність в порівнянні з обробкою одним препаратом.

На Фіг. 14 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для ксенотрансплантатів трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози безтимусних мишей Harlan, після введення: (1) розчинника (буфера PBS) в/в, один раз на тиждень $\times 4$; (2) лапатинібу в дозі 101 мг/кг, перорально, два рази день $\times 21$; (3) пертузумабу в дозі 40 мг/кг, в/в, один раз на тиждень $\times 4$; (4) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг, в/оч., $2\times$ /в тиждень $\times 4$; (5) T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз в 3 тижні до кінця; (6) лапатинібу в дозі 101 мг/кг перорально, два рази на день $\times 21$ + T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз в 3 тижні до кінця; (7) пертузумабу в дозі 40 мг/кг в/в, один раз на тиждень $\times 4$ + T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз в 3 тижні до кінця; (8) B20-4.1 в дозі 5 мг/кг, перорально, $2\times$ /в тиждень $\times 4$ + T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/оч., один раз в 3 тижні до кінця.

Один T-DM1 в дозі 15 мг/кг (5) по ефективності не відрізняється достовірно від комбінації T-DM1 в дозі 15 мг/кг і B20-4.1 в дозі 5 мг/кг (8). У даному досліді лапатиніб і пертузумаб не відрізнялися від розчинника. Для B20-4.1 була характерна тенденція до підвищення ефективності в порівнянні з контролем. T-DM1 був ефективний у вигляді одного препарату ($p < 0,01$). Комбінація T-DM1 з лапатинібом була достовірно ефективніша в порівнянні з одним лапатинібом ($p < 0,01$), але її ефективність не відрізнялася в порівнянні з одним T-DM1. Ефективність комбінації T-DM1 з пертузумабом була достовірно вище в порівнянні з одним пертузумабом ($p < 0,01$), але не відрізнялася в порівнянні з одним T-DM1. Комбінація T-DM1 з B20-4.1 була статистично достовірно ефективніша в порівнянні з одним B20-4.1 ($p < 0,01$), але не відрізнялася від цього показника для одного T-DM1.

На Фіг. 15 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для ксенотрансплантатів трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози безтимусних мишей Harlan, після введення: (1) розчинник (буфера PBS) перорально, два рази на день $\times 21$; (2) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг, в/в, один раз на день $\times 1$; (3) T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз на день $\times 1$; (4) ABT-869 в дозі 5 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (5) ABT-869 в дозі 15 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (6) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз на день $\times 1$ + ABT-869 в дозі 5 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (7) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз на день $\times 21$ + ABT-869 в дозі 5 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (8) T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз на день $\times 1$ + ABT-869 в дозі 5 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$; (9) T-DM1 в дозі 15 мг/кг, в/в, один раз на день $\times 1$ + ABT-869 в дозі 15 мг/кг, перорально, два рази на день $\times 21$.

Комбінація T-DM1 і ABT-869 в дозі 5 мг/кг показувала дві часткові відповіді (8) і не була статистично достовірно ефективнішою в порівнянні з одним ABT-869 в дозі 5 мг/кг (4). Комбінація T-DM1 і ABT-869 в дозі 15 мг/кг (9) є трохи більш ефективною в порівнянні з одним ABT-869 в дозі 15 мг/кг (5). ABT-869 в дозі 5 мг/кг був достовірно ефективніший в порівнянні з розчинником до часу кінцевої точки ($p < 0,01$), але його ефективність не відрізнялася до часу подвоєння пухлини. Ефективність ABT-869 в дозі 15 мг/кг і T-DM1 в дозі 7,5 або 15 мг/кг була статистично достовірно вищою в порівнянні з розчинником до часу подвоєння об'єму пухлини і до часу кінцевої точки пухлини ($p < 0,01$). Комбінація T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг і ABT-869 в дозі 5 мг/кг достовірно не відрізнялася по ефективності в порівнянні з одним T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг. Ефективність комбінації T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг і ABT-869 в дозі 5 мг/кг була достовірно вище в порівнянні з одним ABT-869 в дозі 5 мг/кг до часу подвоєння об'єму пухлини ($p < 0,01$), але не відрізнялася до часу кінцевої точки. Комбінація T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг і ABT-869 в дозі 15 мг/кг була достовірно краще по ефективності в порівнянні з кожним одним препаратом ($p < 0,01$). Ефективність комбінації T-DM1 в дозі 15 мг/кг + ABT-869 в дозі 5 мг/кг не відрізнялася з одним T-DM1 в дозі 15 мг/кг. У порівнянні з одним ABT-869 в дозі 5 мг/кг ефективність комбінації T-DM1 в дозі 15 мг/кг + ABT-869 в дозі 5 мг/кг не відрізнялася до часу кінцевої точки, але на час подвоєння об'єму пухлини була достовірно вищою ($p < 0,01$). Ефективність комбінації T-DM1 в дозі 15 мг/кг + ABT-869 в дозі 15 мг/кг була достовірно вищою в порівнянні з одним ABT-869 в дозі 15 мг/кг і була вищою в порівнянні з одним T-DM1 в дозі 15 мг/кг до часу подвоєння об'єму пухлини ($p < 0,01$). На час кінцевої точки показники протипухлинної активності T-DM1 в дозі 15 мг/кг і T-DM1 в дозі 15 мг/кг + ABT-869 в дозі 15 мг/кг не відрізнялися між собою.

На Фіг. 16 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для ксенотрансплантатів трансгенних пухлин молочної залози MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози безтимусних мишей Harlan, після введення: (1) розчинника в/в, один раз на тиждень $\times 3$; (2) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні $\times 2$; (3) T-DM1 в дозі 15 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні $\times 2$; (4) доцетакселу в дозі 30 мг/кг в/в, один раз на тиждень $\times 3$; (5) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні $\times 2$ + доцетакселу в дозі 30 мг/кг в/в, один раз на тиждень $\times 3$; (6) T-DM1 в дозі 15 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні $\times 2$ + доцетакселу в дозі 30 мг/кг в/в, один раз на тиждень $\times 3$.

У тварин, яким вводили один T-DM1 в дозі 15 мг/кг (3) було 6 часткових відповідей (PR) і 1 повна відповідь (CR). У тварин, яким вводили один доцетаксел в дозі 30 мг/кг (4) було 2 PR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг і доцетакселу в дозі 30 мг/кг (5), було 10 PR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 15 мг/кг і доцетакселу в дозі 30 мг/кг (6) було 7 PR і 3 CR. Всі групи з введенням одних препаратів достовірно відрізнялися від результатів, отриманих на тваринах, яким вводили розчинник ($p < 0,01$). Ефективність комбінації T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг і доцетакселу була достовірно вищою в порівнянні з кожним одним препаратом на час подвоєння об'єму пухлини і на час кінцевої точки ($p < 0,01$). Об'єктивні відповіді були відсутні в групі мишей, що отримували T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг, і мали місце 2 часткові відповіді (PR) в групі з введенням одного доцетакселу. Введення комбінації T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг і доцетакселу приводило до 9 PR і 1 одної повної відповіді (CR). Ефективність комбінації T-DM1 в дозі 15 мг/кг + доцетакселу була достовірно вищою в порівнянні з кожним одним препаратом до часу подвоєння об'єму пухлини і до часу кінцевої точки ($p < 0,01$). Введення одного T-DM1 в дозі 15 мг/кг давало 5 PR і 2 CR. Комбіноване введення T-DM1 в дозі 15 мг/кг + доцетакселу підвищувало кількість об'єктивних відповідей на лікування до 7 PR і 3 CR. Всі миші в даній групі з комбінованою схемою мали об'єктивну відповідь на лікування.

На Фіг. 17 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин в умовах *in vivo* для ксенотрансплантатів трансгенних пухлин MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози безтимусних мишей Harlan, після введення: (1) розчинника перорально, один

раз на день $\times 21$; (2) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні $\times 2$; (3) T-DM1 в дозі 15 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні $\times 2$; (4) лапатинібу в дозі 100 мг/кг перорально, два рази на день $\times 21$; (5) T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні $\times 2$ + лапатинібу в дозі 100 мг/кг перорально, два рази на день $\times 21$; (6) T-DM1 в дозі 15 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні $\times 2$ + лапатинібу в дозі 100 мг/кг перорально, два рази на день $\times 21$.

У тварин, яким вводили один T-DM1 в дозі 15 мг/кг (3) було 6 часткових відповідей (PR) і 3 повних відповіді (CR). У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг і лапатинібу в дозі 100 мг/кг (5), мало місце 4 PR і 5 CR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 15 мг/кг і лапатинібу в дозі 100 мг/кг (6), реакція у відповідь на лікування виразилася в 8 CR. Всі групи з одним препаратом достовірно відрізнялися від результатів, отриманих на тваринах, яким вводили розчинник ($p < 0,01$) на час подвоєння об'єму пухлини і на час кінцевої точки. Ефективність комбінації T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг з лапатинібом була достовірно вище в порівнянні з лапатинібом і T-DM1 в дозі 7,5 мг/кг при введенні у вигляді одного препарату ($p < 0,01$). Ефективність T-DM1 в дозі 15 мг/кг в комбінації з лапатинібом була достовірно вищою в порівнянні з одним лапатинібом ($p < 0,01$). Дана комбінація не відрізнялася по ефективності від одного T-DM1 в дозі 15 мг/кг.

Час подвоєння об'єму пухлини визначали за допомогою статистичного аналізу Каплана-Мейєра у вигляді $2 \times V_0$. Час подвоєння об'єму пухлини і аналіз здатності до виживання кількісно аналізували по значеннях log-рангів-р. Час прогресування визначали у вигляді часу, що пройшов до досягнення об'єму пухлини 1000 мм³ або часу здатності до виживання, якщо об'єм пухлини 1000 мм³ не досягався. T-DM1 в комбінації з лапатинібом забезпечував істотно більш високу протипухлинну ефективність в порівнянні з лікуванням одним препаратом.

На Фіг. 34 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для ксенотрансплантатів трансгенних пухлин MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинника перорально, один раз на день $\times 21$; (2) T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні; (3) 5-FU в дозі 100 мг/кг перорально, один раз в тиждень $\times 2$; (4) (5) T-DM1 в дозі 5 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні + 5-FU в дозі 100 мг/кг перорально, один раз в тиждень $\times 2$. У тварин, яким вводили розчинник, мало місце 0 часткових відповідей (PR) і 0 повних відповідей (CR). У тварин, яким вводили один T-DM1, детектували 1 PR і 0 CR. У тварин, що отримували один 5-FU, мало місце 0 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 і 5-FU, реєстрували 3 PR і 0 CR на часову точку 42 доби. Обробка T-DM1 і 5-FU приводила до забезпечення підвищеної протипухлинної активності в порівнянні з кожним одним препаратом.

На Фіг. 35 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для ксенотрансплантатів трансгенних пухлин MMTV-Her2 Fo5, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинника перорально, один раз на день $\times 21$; (2) T-DM1 в дозі 5 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні; (3) GDC-0941 в дозі 100 мг/кг перорально, два рази на день $\times 21$; (4) GDC-0152 дозі 50 мг/кг перорально, один раз на тиждень $\times 2$; (5) T-DM1 в дозі 5 мг/кг в/в, один раз на 3 тижні + GDC-0941 в дозі 100 мг/кг перорально, два рази в день $\times 21$; (6) T-DM1 в дозі 5 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні + GDC-0152 в дозі 50 мг/кг перорально, один раз на тиждень $\times 2$. Обробка T-DM1 і GDC-0941 приводить до забезпечення підвищеної протипухлинної активності в порівнянні з лікуванням одним препаратом, в той час як комбінація T-DM1 і GDC-0152 не була більш ефективною в порівнянні з одним T-DM1.

GDC-0152 є інгібітором каспаз, які пригнічують білки апоптозу (Call et al., 2008, The Lancet Oncology, 9(10):1002-1011; Devereaux et al., 1999, J. Clin. Immunol., 19:388-398).

На Фіг. 36 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для пухлин MDA-MB-361.1, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинника перорально, один раз на день $\times 21$; (2) GDC-0941 в дозі 25 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (3) GDC-0941 в дозі 50 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (4) GDC-0941 в дозі 100 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (5) T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні; (6) T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні; (7) GDC-0941 в дозі 25 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ + T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні; (8) GDC-0941 в дозі 50 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ + T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні; (9) GDC-0941 в дозі 100 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ + T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні; (10) GDC-0941 в дозі 25 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ + T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні; (11) GDC-0941 в дозі 50 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ + T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні; (12) GDC-0941 в дозі 100 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ + T-DM1 в дозі 10 мг/кг в/в, один раз в 3 тижні.

У тварин, яким вводили розчинник (1) мало місце 0 часткових відповідей (PR) і 0 повних відповідей (CR). У тварин, яким вводили один GDC-0941 в дозі 25 мг/кг (2) було 0 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили один GDC-0941 в дозі 50 мг/кг (3) був 1 PR і 0 CR. Ефективність на тваринах, яким вводили один GDC-0941 в дозі 100 мг/кг (4), виразилася в 0 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили один T-DM1 в дозі 3 мг/кг (5), було 1 PR і 1 CR. У тварин, яким вводили один T-DM1 в дозі 10 мг/кг (6), реєстрували 8 PR і 1 CR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 3 мг/кг і GDC-0941 в дозі 25 мг/кг (7), мало місце 5 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 3 мг/кг і GDC-0941 в дозі 50 мг/кг (8), мало місце 3 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 3 мг/кг і GDC-0941 в дозі 100 мг/кг (9), мало місце 3 PR і 1 CR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 10 мг/кг і GDC-0941 в дозі 50 мг/кг (10) було 9 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 10 мг/кг і GDC-0941 в дозі 50 мг/кг (11), було 7 PR і 2 CR. На тваринах, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 10 мг/кг і GDC-0941 в дозі 100 мг/кг (12), її ефективність становила 9 PR і 1 CR.

На Фіг. 37 наведений графік зміни середнього об'єму пухлин протягом часу в умовах *in vivo* для пухлин MDA-MB-361.1, імплантованих в жирову подушку молочної залози мишей CRL nu/nu, після введення: (1) розчинники [MCT (0,5 % метилцелюлоза/0,2 % твін 80) + сукцинатний буфер (100 мМ сукцинату натрію, 100 мг/мл трегалози, 0,1 % твіну 80, pH 5,0)] перорально+в/в, один раз на день $\times 21$ і один раз в день; (2) GNE-390 в дозі 1,0 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (3) GNE-390 в дозі 2,5 мг/кг, перорально, один раз на день $\times 21$; (4) T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз в день; (5) GNE-390 в дозі 1,0 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз в день; (6) GNE-390 в дозі 2,5 мг/кг перорально, один раз на день $\times 21$ +T-DM1 в дозі 3 мг/кг в/в, один раз на день.

У тварин, яким вводили розчинник (1), мало місце 0 часткових відповідей (PR) і 0 повних відповідей (CR). У тварин, яким вводили один GNE-390 в дозі 1,0 мг/кг (2), було 0 PR і 0 CR. Ефективність на тваринах, що отримували один GNE-390 в дозі 2,5 мг/кг (3), становила 1 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили один T-DM1 в дозі 3 мг/кг (5), реєстрували 1 PR і 1 CR. У тварин, яким вводили один T-DM1 в дозі 3 мг/кг (4), було 0 PR і 0 CR. У тварин, яким вводили комбінацію T-DM1 в дозі 3 мг/кг і GNE-390 в дозі 25 мг/кг (5), мало місце 3 PR і 0 CR. Ефективність комбінації T-DM1 в дозі 3 мг/кг і GNE-390 в дозі 2,5 мг/кг (6) становила 5 PR і 1 CR. Комбінація GNE-390 з T-DM1 приводила до достовірного збільшення протипухлинної активності в порівнянні з одними GNE-390 або T-DM1 на моделі ксенотрансплантатів злоякісної пухлини молочної залози MB-361.1.

Фармацевтичні композиції

Фармацевтичні композиції або лікарські форми за даним винаходом містять комбінації трастузумабу-MCC-DM1, хіміотерапевтичного засобу, і один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, регуляторів сипкості, розріджувачів або наповнювачів.

Трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичні засоби за даним винаходом можна використовувати в несольватованій формі, а також в сольватованих формах з фармацевтично прийнятними розчинниками, такими як вода, етанол і тому подібне, і передбачається, що винахід включає сольватовані і несольватовані форми.

Трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичні засоби за даним винаходом можуть знаходитися в різних таутомерних формах, і всі такі форми входять в об'єм винаходу. Терміни "таутомер" або "таутомерна форма" належать до структурних ізомерів з різною енергією, які перетворюються один в одний через низькоенергетичний бар'єр. Наприклад, протонні таутомери (також відомі як прототропні таутомери) включають взаємоперетворення за допомогою міграції протона, такі як ізомеризації кето-енол і імін-енамін. Валентні таутомери включають взаємоперетворення, що відбуваються за допомогою реорганізації деяких зв'язків електронів, що беруть участь в утворенні зв'язків електронів.

Фармацевтичні композиції включають насипні композиції і окремі разові лікарські форми, що містять більш ніж одну (наприклад, дві) фармацевтично активних речовин, в тому числі, трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичний засіб, вибраний з переліку додаткових лікарських засобів, описаних в даному документі, нарівні з будь-якими фармацевтично неактивними наповнювачами, розріджувачами, носіями або регуляторами сипкості. Насипна композиція і кожна окрема разова лікарська форма може містити фіксовані кількості вищезгаданих фармацевтично активних речовин. Насипна композиція представляє речовину, яка не була формульована в окремі разові лікарські форми. Показовою лікарською формою є лікарська форма для прийому перорально, така як таблетки, пілюлі, капсули і тому подібне. Аналогічно описаний в даному документі спосіб лікування пацієнта введенням фармацевтичної композиції також призначений для включення введення насипної композиції і окремих разових лікарських форм.

Фармацевтичні композиції також включають мічені ізотопами сполуки за даним винаходом, які аналогічні вже описаним в даному документі, але відрізняються тим, що один або декілька атомів заміщені атомом, що має атомну масу або масове число, які відрізняються від атомної маси або масового числа, які звичайно є в природі. Всі ізотопи будь-якого конкретного атома або елемента, як вже згадано, включаються в об'єм сполук за винаходом і їх застосувань. Наведені як приклад ізотопи, які можна включити в сполуки за винаходом, включають водень, вуглець, азот, кисень, фосфор, сірку, фтор, хлор і йод, такі як ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I і ^{125}I . Деякі мічені ізотопами сполуки за винаходом (наприклад, мічені ^3H і ^{14}C) є придатними для постановки аналізу розподілу сполуки і/або субстрату в тканинах. Ізотопи тритій (^3H) і вуглець-14 (^{14}C) підходять для простого отримання і детектування сполук. Крім того, заміщення більш важкими ізотопами, такими як дейтерій (2H), може додати деякі терапевтичні переваги внаслідок більш високої метаболічної стабільності (наприклад, підвищений період напіврозпаду або дещо рідка необхідність у введенні) і отже, в деяких ситуаціях можуть бути переважними. Ізотопи, що випускають позитрони, такі як ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C і ^{18}F , є придатними для досліджень з позитронно-емісійною томографією (PET) для вивчення зайнятості рецептора субстратом. Як правило, мічені ізотопами сполуки за даним винаходом можна отримати з використанням наступних методів, аналогічних описаним на схемах і/або в прикладах, наведених в даному документі нижче, заміщенням неміченого ізотопами реагента на мічений ізотопами реагент.

Трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичні засоби можна формулювати згідно із звичайною фармацевтичною практикою для застосування в терапевтичній комбінації для медикаментозного лікування (включаючи профілактичне лікування) гіперпроліферативних порушень у ссавців, в тому числі людей. Винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить трастузумаб-MCC-DM1 в асоціації з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, регуляторами сипкості, розріджувачами або наповнювачами.

Прийнятні носії, розріджувачі і наповнювачі добре відомі фахівцям в даній галузі, і вони включають речовини, такі як вуглеводи, воски, водорозчинні і/або полімери, що набухають, гідрофільні або гідрофобні речовини, желатин, масла, розчинники, воду і тому подібне. Конкретний носій, розріджувач і наповнювач для використання буде залежати від способів і мети, для яких застосовують сполуку за даним винаходом. Як правило, розчинники, які вибирають, являють собою розчинники, відомі фахівцям в даній галузі як безпечні (GRAS) для введення ссавцеві. В основному, безпечними розчинниками є нетоксичні водні розчинники, такі як вода, і інші нетоксичні розчинники, які розчинні або змішуються з водою. Прийнятні розчинники включають воду, етанол, пропіленгліколь, поліетиленгліколи (наприклад, ПЕГ 400, ПЕГ 300) і т.д. і їх суміші. Також композиції можуть містити один або декілька з буферів, стабілізаторів, поверхнево-активних речовин, змочувальних речовин, мастильних речовин, емульгаторів, суспендуючих речовин, консервантів, антиоксидантів, замутнюючих речовин, регуляторів сипкості, засобів для обробки, барвників, підсолоджувачів, ароматизаторів, смакових речовин і інших відомих добавок для забезпечення елегантної форми представлення лікарського засобу (тобто сполуки за даним винаходом або її фармацевтичної композиції) або допоміжних, що застосовуються у виробництві фармацевтичного продукту (тобто лікарського засобу).

Композиції можна приготувати з використанням звичайного розчинення і змішування. Наприклад, насипний лікарський засіб (тобто сполука за даним винаходом або стабілізована форма сполуки) (наприклад, комплекс з циклодекстрином або іншим комплексоутворювальним агентом) розчиняють у прийнятному розчиннику в присутності одного або декількох наповнювачів, вказаних вище. Як правило, сполуку за даним винаходом формулюють у вигляді фармацевтичних лікарських форм для забезпечення простого контрольованого введення лікарського засобу і з метою зручності для пацієнта по прописаній схемі.

Фармацевтичну композицію (або лікарську форму) для застосування можна упакувати різними шляхами в залежності від способу введення лікарського засобу, що використовується. Як правило, предмет для введення включає контейнер, що містить фармацевтичну композицію, що знаходиться в ньому у відповідній формі. Прийнятні контейнери добре відомі фахівцям в даній галузі і включають матеріали, такі як флакони (з пластику або скла), саше, ампули, пластикові мішки, металеві циліндри і тому подібне. Також контейнер може включати надійну сполуку для попередження ненавмисного доступу до вмісту упаковки. Крім того, контейнер також має етикетку, що знаходиться на ньому, на якій наводиться опис вмісту контейнера. Також на етикетці можуть знаходитися відповідні застереження.

Фармацевтичні композиції сполук за даним винаходом можна приготувати для різних шляхів і типів введення з фармацевтично прийнятними розріджувачами, носіями, наповнювачами або

стабілізаторами (Remington's Pharmaceutical Sciences, 1995, 18th edition, Mack Publ. Co., Easton, PA) у вигляді ліофілізованої композиції, подрібненого порошку або водного розчину. Композицію можна приготувати змішуванням при кімнатній температурі, при відповідному значенні pH і при бажаному ступеню чистоти з фізіологічно прийнятними носіями, тобто носіями, які не є токсичними для реципієнтів в дозах і концентраціях, що використовуються. Значення pH композиції в основному залежить від конкретного застосування і концентрації сполуки, але може знаходитися в межах приблизно від 3 до приблизно 8.

Переважно фармацевтична композиція є стерильною. Зокрема, композиції для застосування при введенні в умовах *in vivo* повинні бути стерильними. Таку стерилізацію легко провести фільтруванням через стерильні мембранні фільтри.

Звичайно фармацевтичну композицію можна зберігати у вигляді твердої композиції, ліофілізованої композиції або у вигляді водного розчину.

Фармацевтичні композиції за винаходом потрібно дозувати і вводити таким чином, тобто в кількостях, концентраціях, схемах, курсах, розчинниках і шляхах введення, що відповідають доброякісній медичній практиці. Чинники, які потрібно враховувати в цьому відношенні, включають конкретне порушення, яке лікують, конкретного ссавця, який зазнає лікування, клінічний стан окремого пацієнта, причину порушення, місце введення препарату, спосіб введення, схему введення і інші чинники, відомі практикуючим лікарям. При визначенні "терапевтично ефективної кількості" сполуки за винаходом для введення потрібно враховувати вищезгадані чинники, і вона є мінімальною кількістю, необхідною для попередження, ослаблення або лікування порушення, опосередкованого фактором коагуляції. Переважно така кількість нижче кількості, яка є токсичною для хазяїна або робить хазяїна істотно більш чутливим до кровотечі.

Як загальне положення первинна фармацевтично ефективна кількість трастузумабу-MCC-DM1, що вводиться на дозу, знаходиться в межах приблизно 0,01-1000 мг/кг, точніше приблизно від 0,1 до 20 мг/кг маси тіла пацієнта на день, з типовими вихідними межами сполуки, що використовується, від 0,3 до 15 мг/кг.

Прийнятні розріджувачі, носії, наповнювачі і стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів в дозах і концентраціях, що використовуються, і вони включають буфери, такі як фосфатний, цитратний і інші органічні кислоти; антиоксиданти, в тому числі аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламонію хлорид; гексаметонію хлорид; бензалконію хлорид; бензетонію хлорид; фенол, бутилетанол або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол і м-крезол); низькомолекулярні поліпептиди (довжиною приблизно менше 10 залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобулін; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди і інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; комплексуютьвальні агенти, такі як ЕДТА; цукор, такий як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворювальні протіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-протеїн) і/або неіоногенні поверхнево-активні речовини, такі як твінTM, включаючи твін 80, плуронікTM або поліетиленгліколь (ПЕГ), в тому числі, ПЕГ400. Активні фармацевтичні інгредієнти також можна включити в мікрокапсули, приготовані, наприклад, коацервацією або міжфазною полімеризацією, наприклад, мікрокапсули відповідно з гідроксиметилцелюлози або желатину і полі(метилметакрилату), в колоїдні системи для доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокпсули) або в макроемульсії. Такі методи розкриті в Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, 1995, Mack Publ. Co., Easton, PA.

Фармацевтичні композиції включають композиції, що підходять для введення шляхами, детально описаними в даному документі. Композиції можна відповідно представити в разовій лікарській формі і можна приготувати будь-яким з методів, добре відомих в галузі фармації. Загальний опис методів і композицій можна знайти в Remington's Pharmaceutical Sciences 18th edition, 1995, Mack Publ. Co., Easton, PA. Такі методи включають стадію приведення в контакт активного інгредієнта з носієм, який представляє одну або декілька допоміжних речовин. Загалом композиції готують однорідним і ретельним приведенням в асоціацію активного інгредієнта з рідкими носіями або дрібно подрібненими твердими носіями або обома видами носіїв і потім при необхідності наданням форми продукту.

Композиції хіміотерапевтичного засобу, що підходять для прийому перорально, можна приготувати у вигляді дискретних разових лікарських форм, таких як пілюлі, тверді або м'які, наприклад, желатинові капсули, облатки, пастилки, лікарські льодяники, водні або масляні суспензії, порошки або гранули, що диспергуються, емульсії, сиропи або еліксири, що кожна

містить заздалегідь визначену кількість сполуки трастузумабу-MCC-DM1 і/або хіміотерапевтичного засобу. Такі композиції можна приготувати з використанням будь-якого відомого в даній галузі методу, що використовується для виробництва фармацевтичних композицій, і такі композиції можуть містити одну або декілька добавок, що включають

5 підсолоджувачі, смакові речовини, барвники і консерванти, для забезпечення приємного на смак і запах препарату. Пресовані таблетки можна приготувати пресуванням, з використанням відповідного пристрою, активного інгредієнта в сипкій формі, такий як порошок або гранули, необов'язково в суміші зі зв'язувальною речовиною, регулятором сипкості, інертним розріджувачем, консервантом, поверхнево-активною або диспергуючою речовиною. Формовані

10 таблетки можна приготувати формуванням на прийнятному пристрої суміші порошкоподібного активного інгредієнта, зволоженого інертним рідким розріджувачем. Таблетки можна необов'язково покрити оболонкою або зробити насічки, і необов'язково формулювати із забезпеченням уповільненого або контрольованого вивільнення з них активного інгредієнта.

Наповнювачі в таблетках фармацевтичної композиції за винаходом можуть включати:

15 наповнювач (або розріджувач) для збільшення об'єму порошкоподібного препарату для приготування таблеток; розрихлювачі для забезпечення руйнування таблетки на невеликі фрагменти при пероральному прийомі, в ідеалі окремі частинки лікарського засобу, і швидкого розчинення і всмоктування лікарського засобу; зв'язувальна речовина для отримання гранул і таблетки з необхідною механічною силою і підтримки цілісності таблеток після пресування,

20 попередження її руйнуванню на складові порошки під час упакування, транспортування і звичайного обороту препарату; регулятор сипкості для забезпечення сипкості порошку під час виробництва таблеток; мастильна речовина для забезпечення того, щоб порошок для приготування таблеток не прилипав до обладнання, яке використовують для пресування таблеток у виробництві. Ці речовини підвищують сипкість порошкоподібних сумішей при

25 проходженні через преси і зводять до мінімуму стираність і ламкість під час витягання кінцевих таблеток з обладнання; антиприлипаць з функцією, аналогічною регулятору сипкості, який знижує адгезію між порошком для приготування таблеток і апаратом, який використовують для штампування таблеток у виробництві; смакова речовина, яку включають в таблетки для надання їм більш приємного смаку або маскування неприємного смаку, і барвник для

30 забезпечення ідентифікації і зручності для пацієнта.

Таблетки, що містять активний інгредієнт в суміші з нетоксичним фармацевтично прийнятним наповнювачем, який є придатним для виробництва таблеток, є прийнятними. Дані наповнювачі можуть, наприклад, являти собою інертні розріджувачі, такі як карбонат кальцію або натрію, лактозу, фосфат кальцію або натрію; допоміжні засоби для гранулювання і

35 розпушення, такі як кукурудзяний крохмаль або альгінова кислота; зв'язувальні речовини, такі як крохмаль, желатин або камедь; і мастильні речовини, такі як стеарат магнію, стеаринова кислота або тальк. Таблетки можуть бути без оболонки або їх можна покрити оболонкою з використанням відомих методів, що включають мікрокапсулювання для сповільнення розпушення і всмоктування в шлунково-кишковому тракті і тим самим забезпечення

40 уповільненої дії протягом більш тривалого періоду часу. Наприклад, можна використати речовину для сповільнення всмоктування у часі, таку як гліцерилмоностеарат або гліцерилдистеарат одні або з воском.

Для лікування очей або інших зовнішніх тканин, наприклад, ротової порожнини і шкіри, композиції переважно наносять у вигляді мазі або крему для зовнішнього застосування, що

45 містять активний інгредієнт(и) в кількості, наприклад, від 0,075 до 20 % мас./мас. При формуляції у вигляді мазі активні інгредієнти можна використати з парафіноювою основою або основою, що змішується з водою, для мазі. Альтернативно активні інгредієнти можна формулювати в кремі з основою для крему масло-в-воді.

Якщо бажано, то водна фаза основи для крему може містити багатоатомний спирт, тобто

50 спирт, що має дві або декілька гідроксильних груп, такий як пропіленгліколь, бутан-1,3-діол, маніт, сорбіт, гліцерин і поліетиленгліколь (включаючи ПЕГ 400) і їх суміші. Для композицій для зовнішнього застосування може бути бажаним включити в їх склад сполуку, яка посилює всмоктування або проникнення активного інгредієнта через шкіру або інші уражені області. Приклади таких речовин, що посилюють проникнення через шкіру, включають

55 диметилсульфоксид і близькі аналоги.

Масляна фаза емульсій за даним винаходом може складатися з відомих компонентів у відомому співвідношенні, включаючи суміш, щонайменше, одного емульгатора з жиром або маслом, або з жиром або маслом разом. Переважно гідрофільний емульгатор включають разом з ліпофільним емульгатором, який функціонує як стабілізатор. Емульгатор(и) з або без

60 стабілізатора(ів) забезпечують емульгуючий віск, і віск разом з маслом і жиром створює

емульгуючу основу мазі, яка утворює масляну дисперговану фазу кремових композицій. Емульгатори і стабілізатори емульсії, що підходять для застосування в композиції за винаходом, включають твін®60, спан®80, цетостеариловий спирт, бензиловий спирт, міристиловий спирт, гліцерилмоностеарат і лаурилсульфат натрію.

Водні суспензії фармацевтичних композицій за винаходом містять активні речовини в суміші з наповнювачами, що підходять для виробництва водних суспензій. Подібні наповнювачі включають суспендуючу речовину, таку як натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, кроскармелозу, повідон, метилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, альгінат натрію, полівінілпіролідон, трагакантову камедь і аравійську камедь, і диспергуючі або змочувальні речовини, такі як природний фосфатид (наприклад, лецитин), продукт конденсації алкіленоксиду з жирною кислотою (наприклад, поліетиленстеарат), продукт конденсації етиленоксиду з довголанцюговим аліфатичним спиртом (наприклад, гептанетиленоксицетанол), продукт конденсації етиленоксиду з неповним ефіром, отриманим з жирної кислоти і ангідриду гекситолу (наприклад, поліоксиетилен сорбітанмоноолеату). Водна суспензія також може містити один або декілька консервантів, таких як етил- або н-пропіл-п-гідроксибензоат, один або декілька барвників, одну або декілька смакових речовин і один або декілька підсолоджувачів, таких як сахароза або сахарин.

Фармацевтичні композиції можуть знаходитися у вигляді стерильного ін'єкційного препарату, такого як стерильна водна або масляна суспензія для ін'єкцій. Дану суспензію можна формулювати згідно з способами, відомими в даній галузі, з використанням прийнятних диспергуючих або змочувальних засобів і суспендуючих речовин, вказаних вище. Стерильний ін'єкційний препарат може являти собою розчин або суспензію в нетоксичному, прийнятному для парентерального введення розріджувачі або розчиннику, такий як розчин в 1,3-бутандіолі, або приготований з ліофілізованого порошку. Серед прийнятних носіїв або розчинників, які можна використати, можна згадати воду, розчин Рінгера і ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, можна використати стерильні нелеткі масла, що звичайно застосовуються як розчинник або суспендуюче середовище. Для даної мети можна використати будь-яке м'яке нелетке масло, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди. Крім того, для приготування ін'єкційних розчинів також можна використати жирні кислоти, такі як олеїнова кислота.

Кількість активного інгредієнта, яку можна об'єднати з носієм для приготування разової лікарської форми, може варіювати в залежності від хазяїна, який зазнає лікування і конкретного шляху введення. Наприклад, лікарська форма з уповільненим вивільненням, призначена для перорального введення людям, може містити приблизно від 1 до 1000 мг активної речовини, формульованої з відповідною і прийнятною кількістю носія, вміст якого може знаходитися в межах приблизно від 5 до приблизно 95 % до маси загальної композиції (маса:маси). Фармацевтичну композицію можна приготувати таким чином, щоб можна було легко визначати кількість для введення. Наприклад, водний розчин для внутрішньовенної інфузії, може містити приблизно від 3 до 500 мкг активного інгредієнта на мілілітр розчину для забезпечення прийнятного об'єму для інфузії з швидкістю введення приблизно 30 мл/год.

Композиції, що підходять для парентерального введення, включають водні або неводні стерильні ін'єкційні розчини, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатики і розчинені речовини, які додають композиції ізотонічності з кров'ю передбачуваного реципієнта; і водні і неводні стерильні суспензії, які можуть включати суспендуючі речовини і загусники.

Композиції, що підходять для місцевого застосування для очей, включають очні краплі, в яких активний інгредієнт розчинений або суспендований у прийнятному носії, зокрема, водному розчиннику для активного інгредієнта. Переважно активний інгредієнт знаходиться в таких композиціях в концентрації приблизно від 0,5 до 20 % мас./мас., наприклад, приблизно від 0,5 до 10 % мас./мас., наприклад, вона становить 1,5 % мас./мас.

Композиції, що підходять для місцевого застосування в ротовій порожнині, включають лікувальні льодяники, що містять активний інгредієнт в основі з смаковою речовиною, звичайно сахарозою і аравійською камеддю або трагакантом; пастилки, що містять активний інгредієнт в інертній основі, такий як желатин і гліцерин, або сахароза і аравійська камедь; і рідини для полоскання ротової порожнини, що містять активний інгредієнт у прийнятному рідкому носії.

Композиції для ректального введення можуть бути представлені у вигляді супозиторію з прийнятною основою, що містить, наприклад, какао-масло або саліцилат.

Композиції, що підходять для інтрапульмонарного або назального введення, мають розмір частинок, наприклад, в межах від 0,1 до 500 мікрон (включаючи розмір частинок в межах від 0,1 до 500 мікрон з приростом в мікронах, такому як 0,5; 1; 30; 35 мікрон і т.д.), які вводять швидкою інгаляцією через носові ходи або інгаляцією через рот таким чином, щоб досягнути альвеолярних мішків. Прийнятні композиції включають водні або масляні розчини активного

інгредієнта. Композиції, що підходять для введення у вигляді аерозолю або сухого порошку, можна приготувати з використанням звичайних методів і їх можна вводити з іншими лікарськими засобами, такими як сполуки, що застосовуються при лікуванні або профілактиці захворювань, вказаних в даному документі.

5 Композиції, що підходять для інтравагінального введення, можуть бути представлені у вигляді вагінальних свічок, тампонів, кремів, гелів, паст, пінок або спреїв, що містять в доповнення до активного інгредієнта відповідні носії, які відомі в даній галузі.

Композиції можна упакувати у вигляді разових лікарських форм або мультидозових контейнерів, наприклад, запаяних ампул і флаконів, і їх можна зберігати у висушеному виморожуванні (ліофілізованому) стані, коли потрібно тільки додати стерильний рідкий носій, наприклад, воду для ін'єкцій, безпосередньо перед використанням. Ін'єкційні розчини і суспензії, що готуються екстемпоро, готують з стерильних порошків, гранул і таблеток описаного раніше типу. Переважними разовими лікарськими формами є форми, що містять добову дозу або неповну добову дозу активного інгредієнта, вказані вище, або їх відповідну фракцію.

15 Також винахід стосується ветеринарних композицій, що містять, щонайменше, один активний інгредієнт, вказаний вище, разом з носієм для нього, що застосовується у ветеринарії. Носії, що застосовуються у ветеринарії, представляють речовини, придатні для введення композиції, і вони можуть бути твердими, рідкими або газоподібними речовинами, які є інертними або прийнятними для застосування у ветеринарії і сумісними з активним інгредієнтом. Дані ветеринарні композиції можна вводити парентерально, перорально або будь-яким іншим шляхом.

Комбінована терапія

Трастузумаб-MCC-DM1 можна використовувати в комбінації з іншими хіміотерапевтичними засобами для лікування гіперпроліферативного захворювання або порушення, включаючи пухлини, злоякісні пухлини і неопластичну тканину, поряд з передзлоякісними і не неопластичними або доброякісними гіперпроліферативними захворюваннями. У деяких варіантах здійснення трастузумаб-MCC-DM1 комбінують в фармацевтичній комбінованій композиції або в схемі введення для комбінованої терапії з іншою сполукою, що має антигіперпроліферативні властивості, або яка є придатною для лікування гіперпроліферативного порушення. Інша сполука в фармацевтичній комбінованій композиції або в схемі введення переважно має комплементарну активність для трастузумабу-MCC-DM1, і таким чином вони не чинять негативного впливу одна на одну. Такі сполуки відповідно знаходяться в комбінації в кількостях, які є ефективними для призначеної мети. В одному варіанті здійснення композиція за даним винаходом містить трастузумаб-MCC-DM1 в комбінації з хіміотерапевтичним засобом, описаним в даному документі. У прикладах 4 і 5 наводяться клінічні протоколи відповідно для T-DM1 + пертузумаб і T-DM1+GDC-0941.

Терапевтичні комбінації за винаходом включають композицію, схему введення або інший курс лікування, що включають введення трастузумабу-MCC-DM1 і хіміотерапевтичного засобу, вибраного з антитіла-інгібітора димеризації HER2, антитіла до VEGF, 5-FU, карбоплатину, лапатинібу, АВТ-869 і доцетакселу, у вигляді комбінованого препарату для роздільного, одночасного або послідовного застосування в лікуванні гіперпроліферативного порушення.

Комбіновану терапію можна провести у вигляді одночасної або послідовної схеми. При послідовному введенні комбінацію можна вводити в два або декілька прийомів. Комбіноване введення включає спільне введення, застосування роздільних лікарських форм або однієї фармацевтичної форми, і послідовне введення в будь-якому порядку, де переважно є період часу, коли обидві (або всі) активні сполуки одночасно проявляють свою біологічну активність.

Прийнятні дози будь-якого з вказаних вище препаратів для спільного введення являють собою застосовувані в даний час і які можна знизити за рахунок комбінованої дії (синергії) знову ідентифікованого препарату та інших хіміотерапевтичних засобів або видів лікування.

50 У конкретному варіанті здійснення протипухлинної терапії трастузумаб-MCC-DM1 можна комбінувати з хіміотерапевтичним засобом, в тому числі, гормональними засобами або антитілами, такими як описані вище, а також об'єднати з хірургічним лікуванням і променевою терапією. Кількості трастузумабу-MCC-DM1 й іншого фармацевтично активного хіміотерапевтичного засобу(ів) і відносний час введення вибирають для досягнення бажаного комбінованого лікувального ефекту.

Введення фармацевтичних композицій

Сполуки за винаходом можна вводити будь-яким шляхом, який відповідає стану, який зазнає лікування. Прийнятні шляхи включають пероральний, парентеральний (в тому числі, підшкірний, внутрішньом'язовий, внутрішньовенний, внутрішньоартеріальний, інгаляційний, внутрішньошкірний, інтратекальний, епідуральний і інфузійний), трансдермальний, ректальний,

назальний, місцевий (включаючи букальний або сублінгвальний), вагінальний, внутрішньоочеревинний, інтрапульмонарний і інтраназальний. Місцеве введення також може включати застосування трансдермального введення з допомогою трансдермальних пластирів або пристроїв для іонофорезу. Формуляція лікарських засобів обговорюється в Remington's Pharmaceutical Sciences, 1995, 18th edition, Mack Publ. Co., Easton, PA. Інші приклади лікарських форм можна знайти у Liberman H.A. and Lachman L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Vol. 3, 2nd Ed., New York, NY. Для місцевої імуносупресорної терапії сполуки можна вводити в область ураження, включаючи перфузію або інше контактування трансплантату з супресором перед трансплантацією. Фахівці в даній галузі, очевидно, розуміють, що переважний шлях може варіювати в залежності, наприклад, від стану реципієнта. У тому випадку, коли сполуку вводять перорально, то її можна формулювати у вигляді пілюлі, капсули, таблетки і т.д. з фармацевтично прийнятним носієм, регулятором сипкості або наповнювачем. У тому випадку, коли сполуку вводять парентерально, то її можна формулювати з фармацевтично прийнятним розчинником або наповнювачем для парентерального введення і в разовій лікарській ін'єкційній формі, як детально описано нижче.

Доза трастузумабу-MCC-DM1 для лікування людей може знаходитися в межах приблизно від 100 мг до приблизно 500 мг. Дозу трастузумабу-MCC-DM1 можна вводити один раз кожні 6 тижнів, один раз кожні 3 тижні, один раз в тиждень або частіше в залежності від фармакокінетичних (PK) і фармакодинамічних (PD) властивостей препарату, включаючи всмоктування, розподіл, метаболізм і виділення. Доза хіміотерапевтичного засобу, що використовується в комбінації з трастузумабом-MCC-DM1, може знаходитися в межах приблизно від 10 мг до приблизно 1000 мг. Хіміотерапевтичний засіб можна вводити один раз кожні 6 тижнів, один раз кожні 3 тижні, один раз на тиждень або частіше, наприклад, один або два рази на день. Крім того, на дозу і схему введення можуть впливати токсичні чинники. Для введення перорально пілюлю, капсулу або таблетку можна приймати щодня або рідше протягом певного періоду часу. Схему можна повторювати протягом ряду терапевтичних курсів.

Способи лікування

Терапевтичні комбінації: (1) трастузумаб-MCC-DM1 і (2) хіміотерапевтичний засіб є придатними для лікування захворювань, станів і/або порушень, включаючи, не обмежуючись цим, захворювання, для яких характерна активація шляху HER2. Отже, інший аспект даного винаходу стосується способів лікування захворювань або станів, які можна лікувати направленим впливом на HER2 або рецептор 1 VEGF. Терапевтичні комбінації: (1) трастузумабу-MCC-DM1 і (2) хіміотерапевтичного засобу можна використовувати для лікування гіперпроліферативного захворювання або порушення, включаючи пухлини, злоякісні пухлини і неопластичну тканину, поряд з передзловиякісними і не неопластичними або доброякісними гіперпроліферативними захворюваннями.

Злоякісні пухлини, які можна лікувати способами за даним винаходом, включають, не обмежуючись цим, рак молочної залози, яєчників, шийки матки, передміхурової залози, яєчка, органів сечостатевої системи, стравоходу, гортані, гліобластоми, нейробластоми, рак шлунка, шкіри, кератоакантому, рак легень, плоскоклітинну карциному, крупноклітинну карциному, недрібноклітинну карциному легень (NSCLC), дрібноклітинну карциному, аденокарциному легень, рак кістки, ободової кишки, аденому, рак підшлункової залози, аденокарциному, рак щитовидної залози, фолікулярну карциному, недиференційовану карциному, папілярну карциному, семіному, меланому, саркому, карциному сечового міхура, карциному печінки і жовчних протоків, карциному нирок, мієлоїдні порушення, лімфоїдні порушення, рак волосистих клітин, рак щічної кишені і глотки (ротової порожнини), рак губ, язика, ротової порожнини, глотки, тонкого кишечника, рак ободової-прямої кишки, товстого кишечника, прямої кишки, мозку і центральної нервової системи, ходжкінську лімфому і лейкоз.

Інший аспект даного винаходу стосується фармацевтичної композиції або терапевтичної комбінації для застосування в лікуванні захворювань або станів, вказаних в даному документі, у ссавця, наприклад, людини, що страждає на таке захворювання або стан. Також забезпечується застосування фармацевтичної композиції у виробництві лікарського засобу для лікування захворювань і станів, вказаних в даному документі, у теплокровної тварини, такої як ссавець, наприклад, людини, що страждає на таке порушення.

Вироби

В іншому варіанті здійснення винаходу забезпечується виріб або "набір", що містить трастузумаб-MCC-DM1, придатний для лікування захворювань або порушень, описаних вище. В одному варіанті здійснення набір включає контейнер, що містить трастузумаб-MCC-DM1. Набір може додатково містити етикетку або вкладиш в упаковці на або зв'язані з контейнером. Термін "вкладиш в упаковці" використовується відносно інструкцій, що звичайно вкладаються в

промислові упаковки терапевтичних продуктів, які містять інформацію про покази, застосування, дозування, введення, протипокази і/або застереження, що стосуються застосування таких терапевтичних продуктів. Прийнятні контейнери включають, наприклад, бутлі, флакони, шприци, блістерні упаковки і т.д. Контейнер може бути виготовлений з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер може містити трастузумаб-MCC-DM1 або його композицію, яка є ефективною для лікування стану і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, контейнер може представляти мішок з розчином для внутрішньовенного введення або флакон з пробкою, проткнутою голкою для внутрішньошкірних ін'єкцій). Щонайменше, одна активна сполука в композиції являє собою трастузумаб-MCC-DM1. На етикетці або вкладиші в упаковці вказується, що композиція використовується для лікування стану вибору, такого як рак. В одному варіанті здійснення на етикетці або вкладиші в упаковці вказується, що композицію, що містить трастузумаб-MCC-DM1, можна використати для лікування порушення, яке виникає внаслідок аномального росту клітин. Також на етикетці або вкладиші в упаковці може вказуватися, що композицію можна використовувати для лікування інших порушень. Альтернативно або додатково виріб може також містити другий контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFI), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрази. Додатково він може містити інші речовини, бажані з комерційної точки зору і з точки зору споживача, включаючи буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

Набір може додатково містити інструкції по введенню трастузумабу-MCC-DM1 і, якщо він присутній, другої фармацевтичної композиції. Наприклад, якщо набір включає першу композицію, що містить трастузумаб-MCC-DM1, і другу фармацевтичну композицію, то набір може додатково містити інструкції по одночасному, послідовному або роздільному введенню першої і другої фармацевтичної композицій пацієнту, що потребує цього.

В іншому варіанті здійснення набори підходять для введення твердих лікарських форм трастузумабу-MCC-DM1 для прийому перорально, таких як таблетки або капсули. Переважно такий набір містить ряд разових лікарських форм. Такі набори можуть включати картку з дозами, розташованими в порядку для призначеного використання. Прикладом такого набору є "блістерна упаковка". Блістерні упаковки добре відомі в пакувальній промисловості, і вони широко використовуються для упакування фармацевтичних разових лікарських форм. Якщо бажано, то можна забезпечити набір пам'яткою, наприклад, в формі чисел, букв або інших поміток або календарем-вкладишем, на якому наведена схема лікування в днях, по якій можна вводити дози.

По одному варіанту здійснення набір містить (а) перший контейнер з трастузумабом-MCC-DM1 в ньому і необов'язково (б) другий контейнер з другою фармацевтичною композицією в ньому, де друга фармацевтична композиція містить другу сполуку, що має антигіперпроліферативну активність. Альтернативно або додатково набір також може включати третій контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFI), забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера і розчин декстрази. Додатково він може містити інші речовини, бажані з комерційної точки зору і з точки зору споживача, включаючи буфери, розріджувачі, фільтри, голки і шприци.

У тому випадку, якщо набір містить композицію трастузумабу-MCC-DM1 і другого лікарського засобу, тобто хіміотерапевтичного засобу, то набір може містити контейнер для окремих композицій, такий як розділений бутель або розділена упаковка з фольги, однак, окремі композиції також можуть знаходитися в одному, неподіленому контейнері. Як правило, набір містить інструкції для введення окремих компонентів. Форма набору є особливо переважною, коли окремі компоненти переважно вводять в різних лікарських формах (наприклад, перорально і парентерально), вводять при різних інтервалах введення або коли для лікаря бажано провести титрування окремих компонентів комбінації.

Приклади

Для ілюстрації винаходу наводяться наступні приклади. Однак, очевидно, зрозуміло, що дані приклади не обмежують винахід і тільки означають пропозиції для способу застосування винаходу на практиці.

Приклад 1. Отримання трастузумабу-MCC-DM1

Трастузумаб виділяли з герцептину® буфер-обміном в концентрації 20 мг/мл в буфері, що складається з 50 мМ фосфату калію/50 мМ хлориду натрію/2 мМ ЕДТА, рН 6,5 і обробляли 7,5-10 моль-екв. сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc), 20 мМ в ДМСО або DMA (диметилацетаміді), 6,7 мг/мл (заявка на патент США 2005/0169933; заявка на патент США 2005/0276812). Після перемішування протягом 2-4 год. в атмосфері аргону при кімнатній температурі реакційну суміш пропускали через колонку з

сефадексом G25, урівноважену буфером з 50 мМ фосфату калію/50 мМ хлориду натрію/2 мМ EDTA, pH 6,5. Альтернативно реакційну суміш фільтрували через гель з 30 мМ цитратом і 150 мМ хлоридом натрію при pH 6. Фракції, що містять антитіло, об'єднували і аналізували. Виділення трастузумабу-SMCC становило 88 %.

Проміжну сполуку лікарський засіб-лінкер, трастузумаб-MCC, вказаний вище, розводили буфером з 50 мМ фосфату калію/50 мМ хлориду натрію/2 мМ EDTA, pH 6,5 до кінцевої концентрації 10 мг/мл і піддавали взаємодії з 10 мМ розчином DM1 (1,7 екв., прийнявши співвідношення 5 SMCC/трастузумаб, 7,37 мг/мл) в диметилацетаміді. DM1 можна приготувати з продукту ферментації ансамітоцину (патент США № 6790954; патент США № 7432088) і дериватизувати для кон'югації (патент США № 6333410; RE 39151). Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі в атмосфері аргону протягом приблизно 4-16 год. Реакційну суміш для кон'югування пропускали через колонку для фільтрування з сефадексом G25 (1,5×4,9) 1× PBS з pH 6,5. Альтернативно реакційну суміш пропускали через гель з 10 мМ цитратом і 150 мМ хлоридом натрію при pH 5. Співвідношення DM1/трастузумаб (р) становило 3,1 за даними визначення поглинання при довжинах хвиль 252 нм і 280 нм. Співвідношення лікарського засобу до антитіла (р) можна визначити з використанням мас-спектрометрії. Також хід кон'югування можна прослідити з використанням електрофорезу в SDS-поліакриламідному гелі. Агрегацію можна оцінити аналізом розсіювання лазерних пучок світла.

Альтернативно трастузумаб-MCC-DM1 можна отримати приготуванням реагенту MCC-DM1 лінкер-лікарський засіб і потім взаємодією з трастузумабом.

Як правило, реакція кон'югації трастузумабу-MCC з DM1 приводить до утворення гетерогенної суміші, що містить антитіла з різною кількістю приєднаного кон'югованого лікарського засобу DM1, тобто з різним навантаженням лікарським засобом, де р представляє розподіл від 1 до приблизно 8. Має місце додаткове вимірювання гетерогенності з різними сайтами приєднання SMCC до трастузумабу, де безліч різних нуклеофілів в трастузумабі, наприклад, кінцеві аміногрупи лізину, можуть взаємодіяти з SMCC. Таким чином, трастузумаб-MCC-DM1 включає виділені, очищені молекули, а також суміші з середнім навантаженням лікарським засобом від 1 до 8, і де MCC-DM1 приєднаний через будь-який сайт антитіла трастузумабу.

Середня кількість груп лікарського засобу DM1 на антитіло трастузумаб в препаратах трастузумабу-MCC-DM1, отриманих реакцією кон'югації, можна визначити звичайними методами, такими як мас-спектроскопія, ELISA, електрофорез і ВЕРХ. Також можна визначити кількісний розподіл трастузумабу-MCC-DM1 по значенню р. С допомогою ELISA можна визначити середнє значення р в конкретному препараті ADC (Hamblett et al., 2004, *Clinical Cancer Res.*, 10:7063-7070; Sanderson et al., 2005; *Clinical Cancer Res.*, 11:843-852). Однак розподіл значень р (лікарського засобу) не помітний по зв'язуванню антитіло-антиген і з урахуванням межі детектування ELISA. Також з допомогою ELISA для кон'югатів антитіло-лікарський засіб неможливо встановити, в якій області групи лікарського засобу приєднуються до антитіла, наприклад, до фрагментів важкого ланцюга або легкого ланцюга, або до конкретних амінокислотних залишків. У деяких випадках можна провести виділення і характеристику гомогенного трастузумабу-MCC-DM1, де р має певні значення, з трастузумабу-MCC-DM1 з навантаженням іншими лікарськими засобами зворотnofазовою ВЕРХ або електрофорезом.

Приклад 2. Тест оцінки проліферації клітин в умовах *in vitro*

Ефективність комбінацій за винаходом можна визначити тестом оцінки проліферації клітин з використанням наступного протоколу (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al., 2002, *Cancer Res.*, 62:5485-5488). Реагенти і протокол для постановки аналізу Cell-Titer Glo є промислово доступними (Promega). За допомогою даного тесту можна оцінити здатність сполук проникати в клітини і впливати на проліферацію клітин. Принцип методу полягає у визначенні кількості життєздатних клітин, що є по кількісному аналізу АТФ. Cell-Titer Glo являє собою реагент, що використовується для кількісного аналізу. Цей гомогенний аналіз, при якому додавання реагенту Cell-Titer Glo приводить до лізису клітин і генерації люмінесцентного сигналу в реакції з люциферазою. Сигнал люмінесценції прямо пропорційний кількості присутньої АТФ.

Планшети для ДМСО і середовищ: 96-ямкові поліпропіленові планшети виробництва Nunc (cat.#249946).

Планшети для клітин: 384-ямкові чорні, з прозорим дном (microclear) планшети TC з кришкою виробництва Falcon (353962).

Культуральне клітинне середовище: RPMI або DMEM з високим вмістом глюкози; середовище Ham's F-12 (50:50), 10 % фетальної бичачої сироватки, 2 мМ L-глутаміну.

Cell-Titer Glo: Promega (Cat.#G7572).

Протокол методу:

1 доба - клітини висівають в планшети для клітин, збирають клітини, висівають клітини з титром 1000-2000 клітин в 54 мкл на ямку в 384-ямковій планшети для клітин на 3 добу.

5 Інкують протягом ночі (приблизно 16 год.) при 37°C, в атмосфері з 5 % CO₂.

2 доба - до клітин додають лікарський засіб, сполуку в розведенні, планшети для ДМСО (серійне розведення 1:2 на 9 точок). Вносять 20 мкл сполук (10 мМ матковий розчин лікарських засобів з невеликою молекулою) у другий ряд 96-ямкового планшета. Проводять серійне розведення 1:2 по планшету (10 мкл +10 мкл 100 % ДМСО) загалом на 9 точок з використанням планшетів Precision Media (розведення 1:50). Вносять 147 мкл середовища у всі ямки окремого 96-ямкового планшета для середовищ. З кожної ямки в планшеті для ДМСО переносять 3 мкл ДМСО+сполука у відповідну ямку в планшеті для середовищ з використанням Rapidplate. У дослідках з комбінацією двох лікарських засобів один лікарський засіб в 1,5 мкл ДМСО+сполука з кожної ямки в планшеті для ДМСО переносять в кожну відповідну ямку в планшеті для середовищ з використанням Rapidplate. Потім переносять 1,5 мкл іншого препарату в планшет для середовищ.

До клітин додають лікарські засоби, планшет для клітин (розведення 1:10), додають 6 мкл середовища+сполука безпосередньо до клітин (54 мкл середовища вже на клітинах). Інкують протягом 3 діб в термостаті при 37°C, в атмосфері з 5 % CO₂, який не повинен часто відкриватися.

5 доба - розвивають планшети, розморожують буфер для Cell-Titer Glo при кімнатній температурі. Виймають планшети для клітин з термостату з температурою 37°C і врівноважують до кімнатної температури протягом приблизно 30 хв. До субстрату Cell-Titer Glo додають буфер Cell-Titer Glo (бутель на бутель). Додають 30 мкл реагенти Cell Titer-Glo в кожну ямку з клітинами. Вміщують на шейкер для планшетів приблизно на 30 хв. Визначають люмінесценцію на рідері для планшетів PerkinElmer Envision (0,1 сек. на ямку) або Analyst HT (півсекунди на ямку).

Аналіз життєздатності клітин і комбінаційні тести: клітини висівають з титром 1000-2000/ямку в 384-ямковій планшети на 16 год. На 2 добу проводять дев'ять серійних розведень 1:2 сполуки в ДМСО в 96-ямковому планшеті. Сполуки потім розводять в культуральному середовищі з використанням автоматичного пристрою Rapidplate (Zymark Corp., Hopkinton, MA). Потім розведені сполуки вносять в чотири ямки в 384-ямкових планшетах для клітин і інкують при 37°C і в атмосфері з 5 % CO₂. Через 4 доби визначають відносні кількості життєздатних клітин по люмінесценції з використанням Cell-Titer Glo (Promega), слідуючи інструкціям виробника, і сигнал реєструють на рідері Envision або Wallac Multilabel (PerkinElmer, Foster City). Розраховують EC₅₀ з використанням програмного забезпечення Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software) або Prism 4.0 (GraphPad, San Diego). Лікарські засоби в комбінаційних тестах дозують, починаючи з концентрації 8× EC₅₀. У тих випадках, коли значення EC₅₀ лікарського засобу становило >2,5 мкМ, то використовували найбільш високу концентрацію 10 мкМ. У всіх тестах трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичні засоби додавали одночасно або роздільно з інтервалом 4 год. (один перед іншим).

У додатковому наведеному як приклад описі тесту оцінки проліферації клітин в умовах in vitro аналіз включає наступні стадії:

1. Аліквотну порцію клітинної культури об'ємом 100 мкл, що містить приблизно 10⁴ клітин (див. на Фіг. 1 клітинні лінії і тип пухлин) в середовищі вміщують в кожну ямку 384-ямкового планшета з непрозорими стінками.

2. Готують контрольну ямку, що містить середовище і без клітин.

3. У дослідну ямку додають сполуку і інкують протягом 3-5 діб.

4. Планшети врівноважують до кімнатної температури протягом приблизно 30 хв.

5. У кожну ямку вносять реагент Cell-Titer Glo в об'ємі, що дорівнює об'єму культурального клітинного середовища, що знаходиться в кожній ямці.

6. Вміст перемішують протягом 2 хв. на орбітальному шейкері для індукції лізису клітин.

7. Планшет інкують при кімнатній температурі протягом 10 хв. для стабілізації сигналу люмінесценції.

8. Реєструють люмінесценцію і будують графіки в RLU=відносний одиницях люмінесценції.

Альтернативно клітини висівали з оптимальною щільністю в 96-ямковому планшеті і інкубували протягом 4 діб в присутності випробуваної сполуки. Потім вносили аламар синійTM в середовище для постановки тесту і клітини інкубували протягом 6 год. перед реєстрацією сигналу при довжині хвилі збудження 544 нм і довжині емісії 590 нм. Значення EC₅₀ розраховували з використанням сигмоїдальної кривої залежності доза-ефект.

Приклад 3

Пухлинні ксенотрансплантати в умовах in vivo

Тварин, що підходять для трансгенних дослідів, можна отримати із звичайних комерційних розплідників. Імунодефіцитним мишам-самцям CB-17 SCID (Charles River Laboratory) імплантували 3 млн. клітин KPL-4 (з надекспресією Her2) злоякісної пухлини молочної залози в матригелі в жирову подушку молочної залози. Безтимусним мишам-самцям nude (Charles River Laboratory або Harlan) імплантували фрагменти трансгенних пухлин $2 \times 2 \text{ мм}^3$ молочної залози MMTV-Her2 Fo5 в жирову подушку молочної залози. На 0 добу в ксенотрансплантати у мишей вводили лікарський засіб, комбінацію лікарських засобів або носій по схемі, що відповідає кожній пухлинній моделі. 5-FU, гемцитабін, карбоплатин і B20-4.1 вводили внутрішньоочеревинно, пертузумаб вводили внутрішньовенно або внутрішньоочеревинно, як це відповідає, трастузумаб-MCC-DM1 і доцетаксел вводили внутрішньовенно, лапатиніб, GDC-0941 і ABT-869 вводили перорально за допомогою шлункового зонда. Розміри пухлин визначали двічі на тиждень протягом всього досліді. Також двічі на тиждень визначали масу мишей і регулярно проводили спостереження за станом тварин. Об'єм пухлин визначали в двох вимірюваннях (по довжині і ширині) з використанням штангенциркуля Ultra Cal IV (Model 54-10-111; Fred V. Fowler Co., Inc.; Newton, MA) і аналізували з використанням програми Excel v. 11.2 (Microsoft Corporation; Redmond, WA). Графіки інгібування пухлин будували з використанням програми KaleidaGraph 3.6 (Synergy Software; Reading, PA). Об'єм пухлин розраховували по формулі: розмір пухлин (мм^3) = (більш довге вимірювання \times більш коротке вимірювання²) \times 0,5.

Масу тварин аналізували з використанням програми Adventurera Pro AV812 (Ohaus Corporation; Pine Brook, NJ). Графіки будували з використанням програми KaleidaGraph Version 3.6. Зміну маси тіла в процентах розраховували з використанням формули: зміна маси по групі в процентах = $(1 - (\text{вихідна маса} / \text{нова маса})) \times 100$.

Мишей з об'ємом пухлин, що перевищує 2000 мм^3 , або з втратою маси тіла, що складає більше 20 % від вихідного, піддавали евтаназії згідно з прийнятою практикою.

Сповільнення росту пухлин в процентах (% TGD) в кінці досліді (EOS) розраховували з використанням формули: $\% \text{ TGD} = 100 \times (\text{середній час до кінцевої точки в дослідній групі} - \text{середній час до кінцевої точки в контрольній групі}) / \text{середній час до кінцевої точки в контрольній групі}$.

Частоту пухлин (TI) визначали, засновуючись на кількості пухлин, що визначаються, що залишаються в кожній групі в кінці досліді. Часткову відповідь (PR) визначали як більш ніж 50 %, але менш ніж 100 % зниження об'єму пухлин в порівнянні з вихідним об'ємом пухлин для трьох послідовних вимірювань. Повну відповідь (CR) визначали як 100 % зниження об'єму пухлин в порівнянні з вихідним об'ємом пухлин для трьох послідовних вимірювань. Дані аналізували і р-значення визначали з використанням t-тесту Даннетта зі статистичною програмою JMP, версія 5.1.2 (SAS Institute; Cary, NC). Значення об'єму окремих пухлин в кінці досліді і середнього об'єму пухлин $\pm \text{SEM}$ обробляли з використанням статистичної програми JMP, версія 5.1.2. Будували графік за даними визначення маси тіла на основі середнього процента зміни в порівнянні зі значеннями вихідної маси тіла $\pm \text{SEM}$.

Приклад 4. Клінічне вивчення трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) в комбінації з пертузумабом

Проводять фазу 1b/II відкритого клінічного вивчення безпеки, переносимості і ефективності трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) в комбінації з пертузумабом при внутрішньовенному введенні пацієнтам з HER2-позитивним місцево-розповсюдженим або метастатичним раком молочної залози для оцінки безпеки і переносимості комбінації. Комбінацію вводять один раз на 3 тижні пацієнтам з HER2-позитивним місцево-розповсюдженим або метастатичним раком молочної залози, які раніше отримували трастузумаб в будь-якій лінії терапії, отримували хіміотерапію в комбінації з HER2-направленою терапією для захворювання на пізніх стадіях або у яких мало місце прогресування захворювання при отриманні останньої терапії. Іншою метою є оцінка фармакокінетики T-DM1 при введенні комбінації T-DM1 і пертузумабу по даній схемі. Ще однією метою досліджень є попередня оцінка ефективності комбінації T-DM1 і пертузумабу при введенні по даній схемі за результатами об'єктивних відповідей, заснованих на оцінці дослідників, з використанням критеріїв оцінки відповідей на терапію при солідних пухлинах (RECIST), версія 1.0. Вторинними цілями даного дослідження є наступні: (1) встановлення здатності до виживання без прогресування захворювання (PFS) у пацієток, що отримували комбінацію T-DM1 і пертузумабу при введенні по даній схемі; (2) оцінка тривалості відповіді на комбінацію T-DM1 і пертузумабу при введенні по даній схемі і (3) оцінка вироблення антитіл до T-DM1.

T-DM1 вводять внутрішньовенною (в/в) інфузією в комбінації з пертузумабом, який також вводять внутрішньовенною (в/в) інфузією, пацієнтам з HER2-позитивним місцево-

розповсюдженим або метастатичним раком молочної залози, які раніше отримували трастузумаб і у яких спостерігали прогресування захворювання після або під час останньої терапії. Пацієнтки отримують комбінацію T-DM1 і пертузумабу в повторних курсах з мінімальним інтервалом, що становить 3 тижні.

5 Проводять спостереження за станом пацієнток при введенні даної дози на DLT (токсичність, що обмежує дозування) під час періоду спостережень за DLT (21 доба з часу першого введення T-DM1) після отримання перших доз випробуваних засобів перед введенням більш високих доз будь-якій пацієнтці. У тому випадку, якщо у даних пацієнток не спостерігають DLT під час періоду спостережень за DLT, то наступну дозу можна збільшити.

10 DLT визначають як прояв будь-якого з токсичних ефектів, пов'язаних з лікуванням, в період спостережень за DLT: (1) побічний ефект ступеня ≥ 3 , не зв'язаний з гематологічними показниками, який виявляється не внаслідок прогресування захворювання або по іншій причині, що чітко визначається, за винятком алопеції будь-якого ступеня; (2) діарея ступеня ≥ 3 , яка відповідає стандарту лікування; (3) нудота або блювота ступеня 3 при відсутності премедикації, які відповідають стандарту лікування; (4) підвищення рівня білірубину, активності трансаміназ печінки (АЛТ або АСТ) або лужної фосфатази (ЛФ) в сироватці крові ступеня ≥ 3 , що продовжується протягом 72 год., за винятком пацієнток з активністю трансаміназ печінки і ЛФ ступеня 2 на вихідному рівні ≤ 5 верхня межа норми [ULN] внаслідок наявності метастазів в печінці і кістках. Активність трансаміназ або ЛФ ступеня ≥ 10 ULN буде розглядатися як прояв DLT; (5) тромбоцитопенія ступеня ≥ 4 , що продовжується 24 год.; (6) нейтропенія ступеня ≥ 4 (абсолютна кількість нейтрофілів < 500 клітин/мм³), що продовжується протягом 4 діб або що супроводжується лихоманкою (температура при вимірюванні в ротовій порожнині і тимпанічна температура 100,4°F або 38°C); (7) будь-який побічний ефект, що суб'єктивно оцінюється, що відмічається дослідником, пов'язаний з введенням кожної випробуваної сполуки; (8) будь-який прояв токсичності, пов'язаний з лікуванням, який перешкоджає початку другого курсу лікування.

Після прийняття рішення про продовження лікування в наступній більш високій дозі, то дозволяється підвищення дози для пацієнток; пацієнтки, що беруть участь в даному дослідженні, спочатку отримують знижену дозу T-DM1 (3,0 мг/кг) разом з повною дозою пертузумабу. Цим пацієнткам дозволяється підвищити дози обох препаратів до повних при подальших курсах, якщо вони пройшли період спостережень за DLT. Однак безпека дозування 3,6 мг/кг буде засновуватися на оцінці DLT. Пацієнтки (включаючи пацієнток, що беруть участь в дослідженні під час фази підвищення дози в дослідженні) вважаються такими, що оцінюються відносно ефективності, якщо вони залишаються в дослідженні до першої подальшої оцінки пухлини. У кінці першого курсу і потім кожні три курси під час лікування потрібно провести ехокардіографію (ЕХО) або MUGA-сканування (багатовхідну артеріографію).

Складання лікарської форми T-DM1

T-DM1 можна формулювати у вигляді ліофілізованої композиції для однократного застосування в скляному флаконі місткістю 20 мл типу I по фармакопеї США/Європейській фармакопеї з фторрезиновою ламінованою пробкою розміром 20 мм і закатаному алюмінієвим ковпачком з темно-сірою знімною пластиковою кришкою. Після відновлення 8,0 мл стерильної води для ін'єкцій (SWFI) отриманий продукт містить T-DM1 в концентрації 20 мг/мл в 10 мМ сукцинаті натрію, рН 5,0, 6 % (мас./об.) сахарози і 0,02 % (мас./об.) полісорбату 20. Кожний флакон місткістю 20 мл містить приблизно 172 мг T-DM1, що дозволяє вводити 160 мг T-DM1. Вказаний об'єм розчину T-DM1 витягують з флакону(ів) і переносять в мішок для внутрішньовенного введення лікарських засобів. Відновлений T-DM1 розводять в полівінілхлорид них мішках (PVC) або мішках, що не містять латексу, не містять PVC поліолефінових (PO) з 0,45 % або 0,9 % хлоридом натрію для ін'єкцій (мінімальний об'єм 250 мл). Переважним є застосування мішків з PVC або PO, що містять 0,45 % хлорид натрію. У разі застосування мішків з PVC або PO, що містять 0,9 % хлорид натрію, рекомендується використовувати вбудовані 0,22 мкм фільтри. Мішок обережно перевертають для перемішування розчину. Розчин T-DM1 для інфузій, розведений в полівінілхлорид них мішках (PVC) або мішках, що не містять латексу, що не містять PVC поліолефінових (PO) з 0,9 % або 0,45 % розчином хлориду натрію для ін'єкцій USP, можна зберігати при 2°C-8°C (36°-46°F) протягом короткого періоду часу.

Складання лікарської форми пертузумабу

Пертузумаб можна формулювати у вигляді композиції для одноразового застосування, що містить пертузумаб в концентрації 30 мг/мл в буфері з 20 мМ L-гістидину (рН 6,0), 120 мМ сахарози і 0,02 % полісорбату 20. Кожний флакон місткістю 20 см³ містить приблизно 420 мг пертузумабу (14,0 мл/флакон). Вказаний об'єм розчин пертузумабу витягують з флаконів і переносять в мішок для внутрішньовенного введення місткістю 250 см³ з 0,9 % розчином

хлориду натрію для ін'єкцій. Мішок обережно перевертають для перемішування розчину і візуально оглядають на наявність частинок і знебарвлення перед введенням. Розчин пертузумабу для інфузій, розведений в поліетиленових або поліолефінових мішках, що не містять PVC, з 0,9 % розчином хлориду натрію для ін'єкцій, можна зберігати при 2°-8°C (36°-46°F) протягом короткого періоду часу.

Визначення показників безпеки

Безпеку і переносимість T-DM1 і пертузумабу оцінюють по наступних основних показниках безпеки: (1) частота, походження і тяжкість побічних ефектів; (2) побічні ефекти або зміни в фізичному стані і результатах клінічних лабораторних аналізів під час і після введення випробуваних засобів, які приводять до зміни дози, зниження дози або припинення лікування T-DM1 і пертузумабом і (3) зміни в функції серця (тобто фракції викиду лівого шлуночка [LVEF], аномалій сегментної стінки), включаючи дані ECHO або MUGA.

Визначення фармакокінетичних і фармакодинамічних параметрів

У всіх пацієнток, що отримують випробуване лікування, визначають фармакокінетичні параметри T-DM1 і пертузумабу, з використанням некомпартментного і/або популяційного методів, коли вони відповідають, у вигляді наступних параметрів: (1) концентрація T-DM1 (кон'югату) в сироватці крові, трастузумабу загалом (вільного і кон'югованого з DM1); (2) концентрація вільного DM1 в плазмі крові; (3) загальний вплив (площа під кривою концентрація-час [AUC]); (4) максимальна концентрація в сироватці крові (C_{max}); (5) мінімальна концентрація (C_{min}); (6) кліренс; (7) об'єм розподілу; (8) кінцевий період напіврозпаду; (9) антитіла до T-DM1.

Визначення ефективності

Як дані оцінки ефективності визначають об'єктивні відповіді з використанням програми RECIST v. 1.0. У даному дослідженні ефективність оцінюють по наступних вторинних показниках: (1) PFS, що визначається як час від початку випробуваного лікування до першого прояву прогресування захворювання або смерті в період проведення дослідження (протягом 30 днів після введення останньої дози при випробуваному лікуванні) по будь-якій причині за даними звіту оцінки пухлин з використанням RECIST v. 1.0 і (2) тривалість відповіді, що визначається у вигляді першого прояву документованої об'єктивної відповіді до часу початку прогресування захворювання за даними звіту оцінки пухлин з використанням модифікованої RECIST v. 1.0 або смерті в період проведення дослідження (протягом 30 днів після введення останньої дози при випробуваному лікуванні) по будь-якій причині.

Випробуване лікування

T-DM1 вводять не частіше, ніж один раз на 3 тижні в дозах 2,4; 3,0 або 3,6 мг/кг внутрішньовенно. Будь-яку пацієнтку можна перевести на більш низьку дозу T-DM1, що дорівнює 2,4 мг/кг. В залежності від токсичності, що виявляється, що спостерігається в групі пацієнток, які почали отримувати терапію в дозі 3,0 мг/кг, і якщо підтверджується, що T-DM1 добре переноситься в дозі 3,0 мг/кг, то в подальших курсах пацієнток можна перевести на більш високу дозу 3,6 мг/кг в/в один раз кожні 3 тижні. Пертузумаб вводять в навантажувальній дозі 840 мг в/в на 1 добу, 1 курс, потім 420 мг в/в кожні 3 тижні в подальших циклах.

Статистичні методи

Кінцевою точкою визначення первинної ефективності в даному дослідженні є об'єктивна відповідь, що оцінюється дослідником, що визначається у вигляді повної або неповної відповіді в двох послідовних обстеженнях з інтервалом ≥ 4 тижні. Значення частоти прояву основної відповіді отримують з використанням комп'ютерної програми, а також відповідний 95 % довірчий інтервал. Відносно об'єктивної відповіді, то пацієнток без достовірної оцінки пухлини на вихідному рівні, розглядають як пацієнток, що не дали відповіді на лікування. Відносно тривалості відповіді і PFS, то дані від пацієнток, що загубилися до подальшого огляду, розглядаються на останній час, коли були відомості про відсутність прогресування захворювання. Дані для пацієнток без оцінки пухлин після лікування або на момент смерті розглядаються на час початку лікування плюс 1 доба.

Приклад 5. Клінічне вивчення трастузумабу-MCC-DM1 (T-DM1) в комбінації з GDC-0941

Проводять фазу Ib відкритого клінічного вивчення комбінації T-DM1, який вводять в/в, і GDC-0941, який вводять перорально, пацієнткам з HER2-позитивним місцево-розповсюдженим або метастатичним раком молочної залози, у яких мало місце прогресування захворювання на попередній терапії трастузумабом, для оцінки безпеки, переносимості, фармакокінетики і ефективності комбінації. Основними цілями даного дослідження є: оцінка безпеки і переносимості GDC-0941 при введенні в комбінації з T-DM1; визначення MTD GDC-0941 при введенні в комбінації з T-DM1; ідентифікація рекомендованої в фазі II дози для GDC-0941 в комбінації з T-DM1 і оцінка будь-якої протипухлинної активності, що спостерігається GDC-0941 при введенні в комбінації з T-DM1. Цілями у відношенні фармакокінетики є: характеристика

фармакокінетики GDC-0941 при відсутності і в присутності T-DM1 і характеристика фармакокінетики T-DM1 у відносній відсутності і в присутності GDC-0941.

Складання лікарської форми GDC-0941

GDC-0941 являє собою сухий порошок, призначений для перорального введення.

- 5 Приготований лікарський продукт вміщують в тверді желатинові капсули з двома силами дії (15 і 50 мг), які інкапсулюють в оболонки 0 розміру і диференціюють кольором. Наповнювачами, включеними в капсули, є мікрокристалічна целюлоза NF/EP, лаурилсульфат натрію NF/DP (тільки в капсулах з силою дії 50 мг), лимонна кислота безводна USP/EP, натрієва сіль кроскармелози NF/EP, колоїдний діоксид кремнію NF/EP і стеарат магнію (не бичачий) NF/EP.
- 10 Капсули з GDC-0941 потрібно зберігати при охолодженні при температурі між 36°F і 46°F (2°C і 8°C). Пацієток потрібно інструктувати відносно необхідного режиму зберігання лікарського засобу при охолодженні при температурі між 36°F і 46°F (2°C і 8°C).

Визначення ефективності

- 15 Визначають і оцінюють параметри безпеки, фармакокінетики, фармакодинаміки і ефективності, включаючи статистичні методи, як описано в прикладі 4.

Випробуване лікування

- 20 Випробуване лікування проводять 3-тижневими курсами. Пацієтки, у яких спостерігається клінічний ефект внаслідок випробуваного лікування, можуть мати можливість пройти більше число курсів терапії, які можуть мати місце в окремому дослідженні, в залежності від стадії розробки препарату, доступності лікарського засобу і інших чинників.

- 25 На стадії підвищення дозування в дослідженні пацієтки, що беруть участь в дослідженні, отримують однократну дозу GDC-0941 на 1 день 1 курсу натщесерце для відбору проб до і після введення препарату для проведення фармакокінетичних досліджень і спостережень у відношенні варіабельності серед пацієток. Вихідна доза GDC-0941 становить 60 мг один раз на день, яка, як було визначено в фазі I клінічного вивчення, є безпечною при монотерапії препаратом без прояву токсичності, що обмежує дозування. На 2 день 1 курсу вводять повну дозу T-DM1, що становить 3,6 мг/кг в/в протягом 90 хв. без навантажувальної дози. Потім слідує введення дози GDC-0941. За станом пацієток спостерігають протягом 90 хв. після першої інфузії T-DM1. Потім GDC-0941 вводять один раз в день загалом протягом 14 діб з подальшим інтервалом в 1 тиждень після першого циклу.

- 30 Підвищення дози GDC-0941 у подальших пацієток продовжують до прогресування захворювання або прояву непереносимості препарату. Тривалість подальших курсів випробуваного лікування буде становити 3 тижні при дозі T-DM1, що дорівнює 3,6 мг/кг в/в протягом 30 хв. на 1 день кожного курсу, і після інфузії T-DM1 вводять GDC-0941 і лікування продовжують 2 тижні і роблять інтервал в 1 тиждень. Введення продовжують до прогресування захворювання або прояву непереносимості препарату. T-DM1 потрібно вводити протягом 30-90 (±10) хв. в/в інфузією в залежності від того, як переноситься T-DM1 в первинному дослідженні. Якщо інфузія тривалістю 90 хв. переноситься добре, то подальші інфузії можна провести протягом 30 (±10) хв.

- 40 Наведений вище опис потрібно розглядати тільки як ілюстративний відносно принципів винаходу. Крім того, оскільки для фахівців в даній галузі очевидні численні модифікації і зміни, то небажано обмежувати винахід точним конструюванням і способом, описаним в даному документі. Отже, всі прийнятні модифікації і еквівалентні варіанти входять в об'єм винаходу, що визначається формулою винаходу, яка слідує.

45

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 50 1. Спосіб лікування гіперпроліферативного порушення, який включає введення терапевтичної комбінації у вигляді комбінованої композиції або почергово ссавцю, де терапевтична комбінація містить трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичний засіб, вибраний з GDC-0941 і GNE-390.
2. Спосіб за п. 1, в якому хіміотерапевтичним засобом є GDC-0941.
3. Спосіб за п. 1, в якому хіміотерапевтичним засобом є GNE-390.
4. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-3, де трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичний засіб вводять у вигляді комбінованої композиції.
- 55 5. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-3, де трастузумаб-MCC-DM1 і хіміотерапевтичний засіб вводять почергово.
6. Спосіб за пунктом 5, де ссавцю вводять хіміотерапевтичний засіб і потім згодом вводять трастузумаб-MCC-DM1.
7. Спосіб за пунктом 5, де терапевтичну комбінацію вводять людині з гіперпроліферативним порушенням з інтервалами приблизно три тижні.
- 60

8. Спосіб за пунктом 5, де трастузумаб-MCC-DM1 вводять людині з гіперпроліферативним порушенням з інтервалами приблизно від одного тижня до трьох тижнів.

9. Спосіб за пунктом 5, де трастузумаб-MCC-DM1 вводять не частіше, ніж кожні 3 тижні при дозуванні 2,4, 3,0 або 3,6 мг/кг внутрішньовенно.

5 10. Спосіб за пунктом 5, де кількість трастузумабу-MCC-DM1 і кількість хіміотерапевтичного засобу складає для кожного приблизно від 1 мг до приблизно 1000 мг, і кількість трастузумабу-MCC-DM1 і кількість хіміотерапевтичного засобу знаходяться в співвідношенні від приблизно 1:10 до приблизно 10:1 по масі.

10 11. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-3, де гіперпроліферативне порушення являє собою злоякісну пухлину, яка експресує ErbB2.

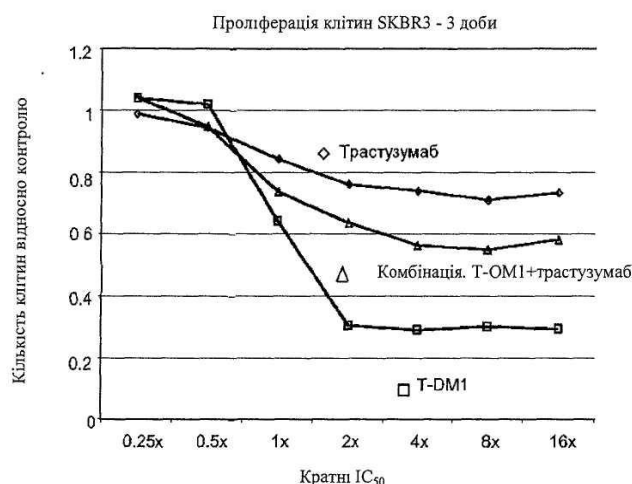
12. Спосіб за пунктом 11, де ссавцем є пацієнт з позитивною реакцією на HER2.

13. Спосіб за пунктом 12, де пацієнт з позитивною реакцією на HER2 отримував терапію трастузумабом або лапатинібом.

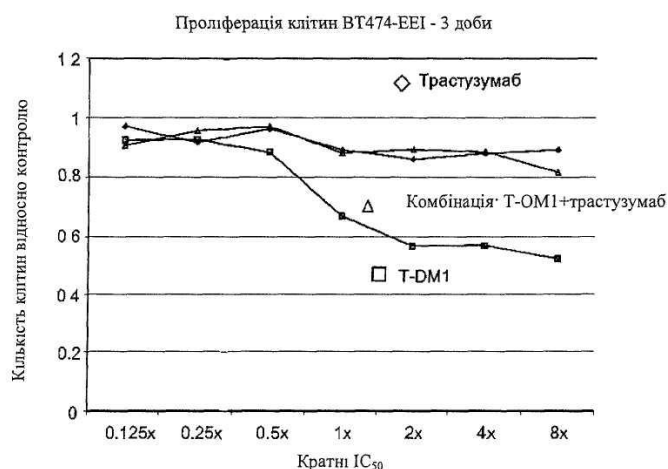
15 14. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-3, де введення терапевтичної комбінації приводить до синергічного ефекту.

15. Фармацевтична композиція, що містить трастузумаб-MCC-DM1, хіміотерапевтичний засіб, вибраний з GDC-0941 і GNE-390, і один або декілька фармацевтично прийнятних носіїв, регуляторів сипкості, розріджувачів або наповнювачів.

20 16. Фармацевтична композиція за п. 15, що містить фармацевтично прийнятний регулятор сипкості, вибраний з діоксиду кремнію, порошкоподібної целюлози, мікрокристалічної целюлози, стеаратів металів, алюмосилікату натрію, бензоату натрію, карбонату кальцію, силікату кальцію, кукурудзяного крохмалю, карбонату магнію, тальку, що не містить домішки азбесту, стеаровету С, крохмалю, крохмалю 1500, лаурилсульфату магнію, оксиду магнію і їх комбінацій.

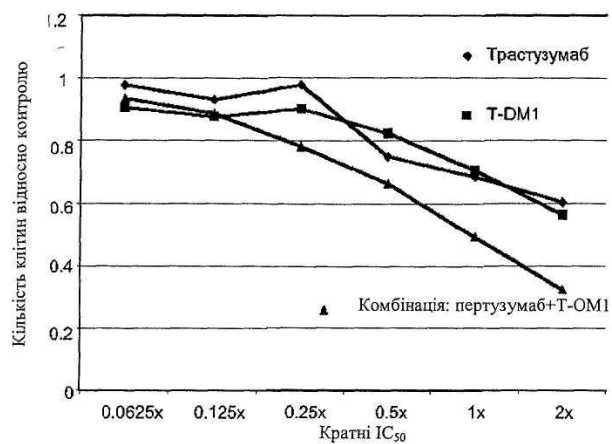


Фіг. 1



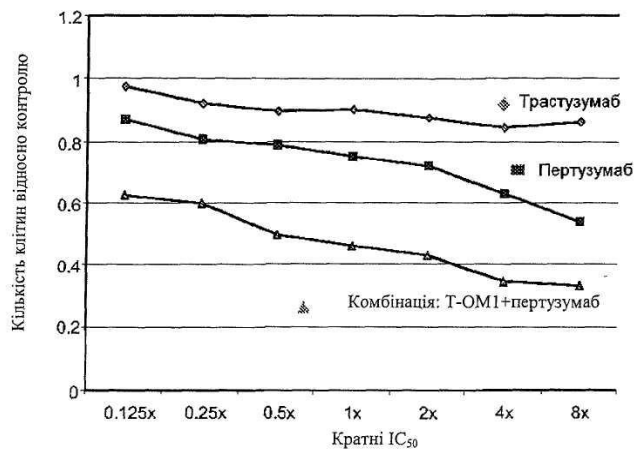
Фіг. 2

Проліферація клітин MDA-MB-175 - 5 діб



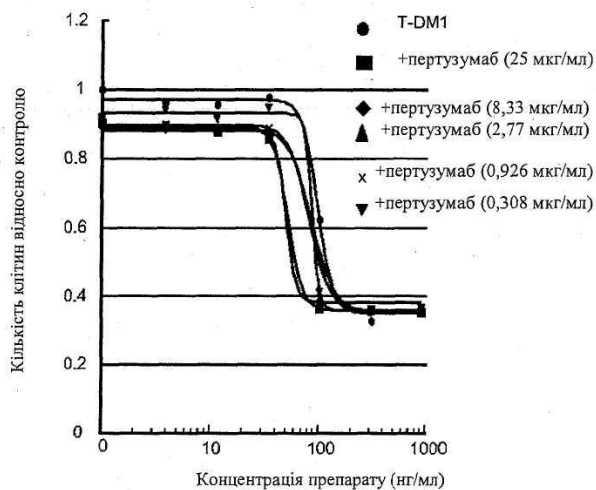
Фіг. 3

Проліферація клітин MDA-MB-175 - 5 діб

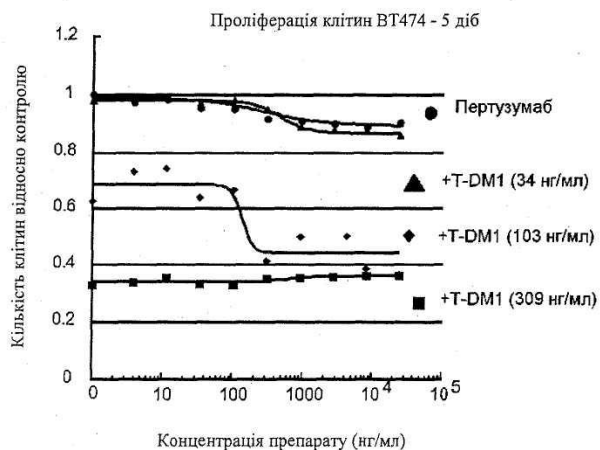


Фіг. 3а

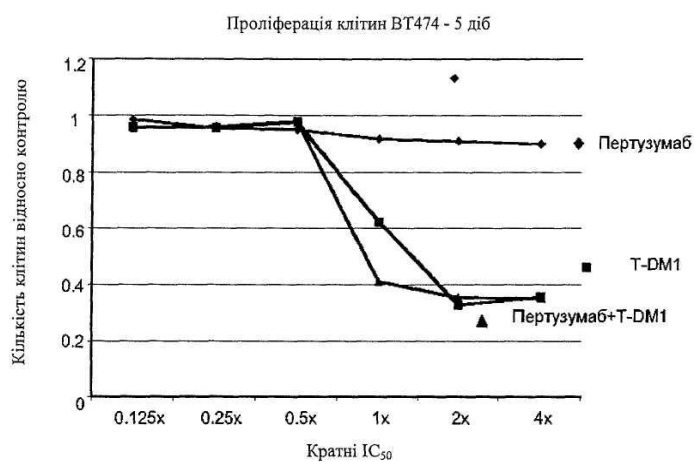
Проліферація клітин BT474 - 5 діб



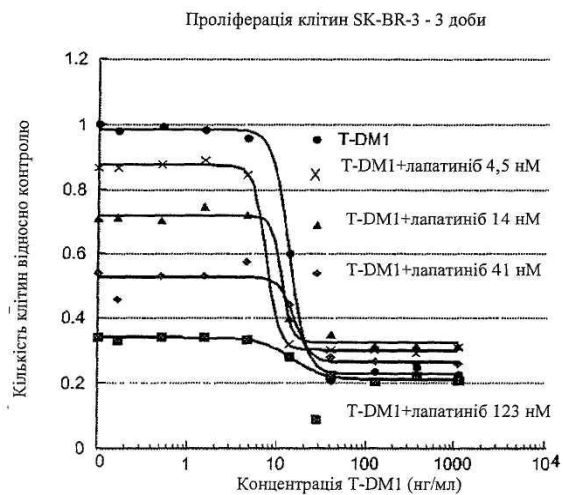
Фіг. 4



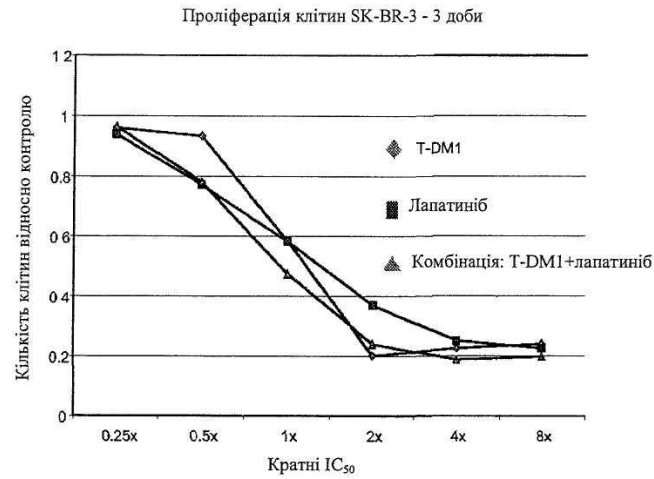
Фіг. 5



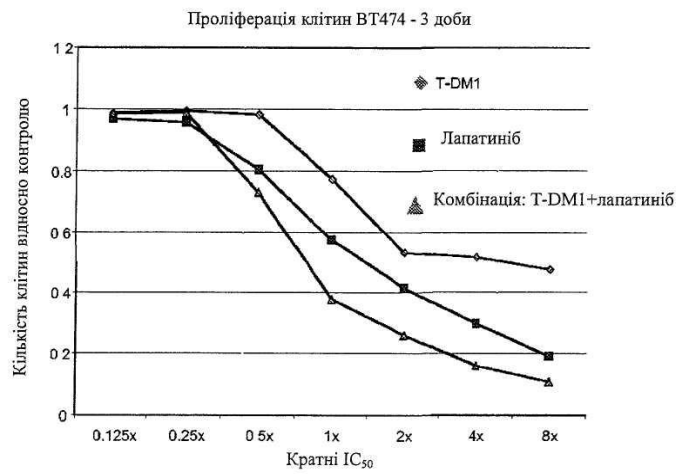
Фіг. 6



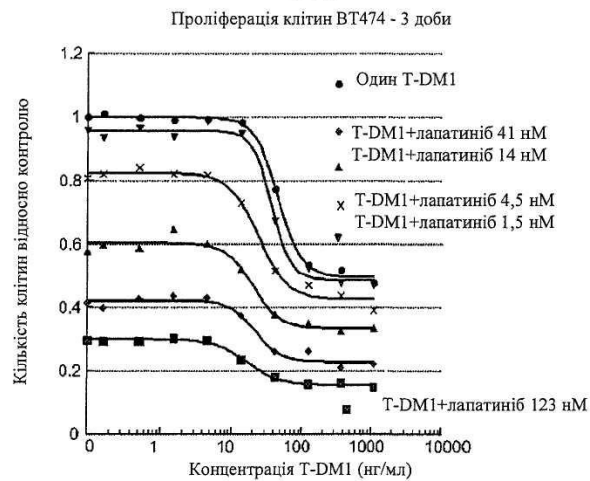
Фіг. 7



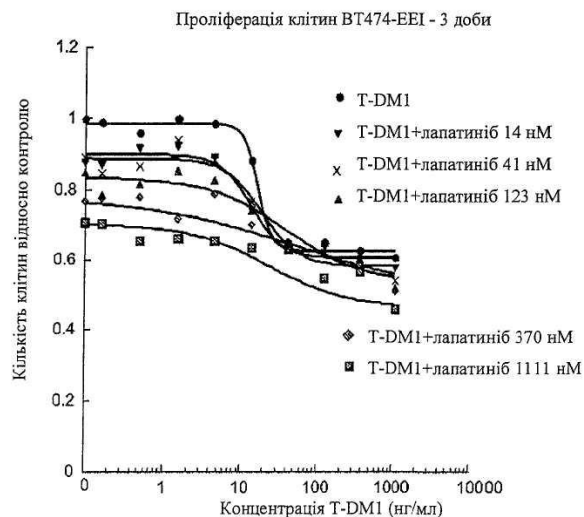
Фіг. 7а



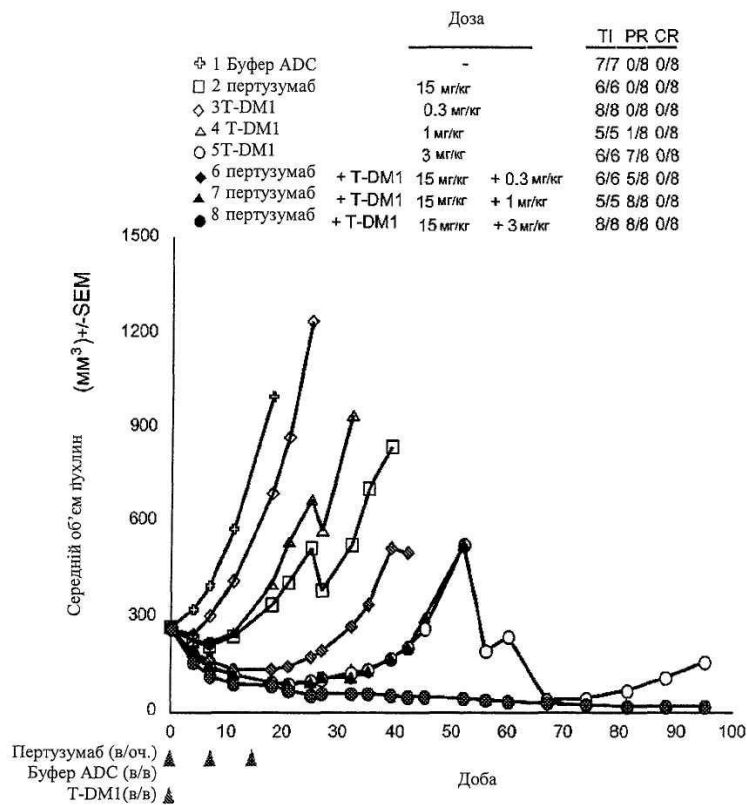
Фіг. 8а



Фіг. 8



Фіг. 9



Фіг. 10

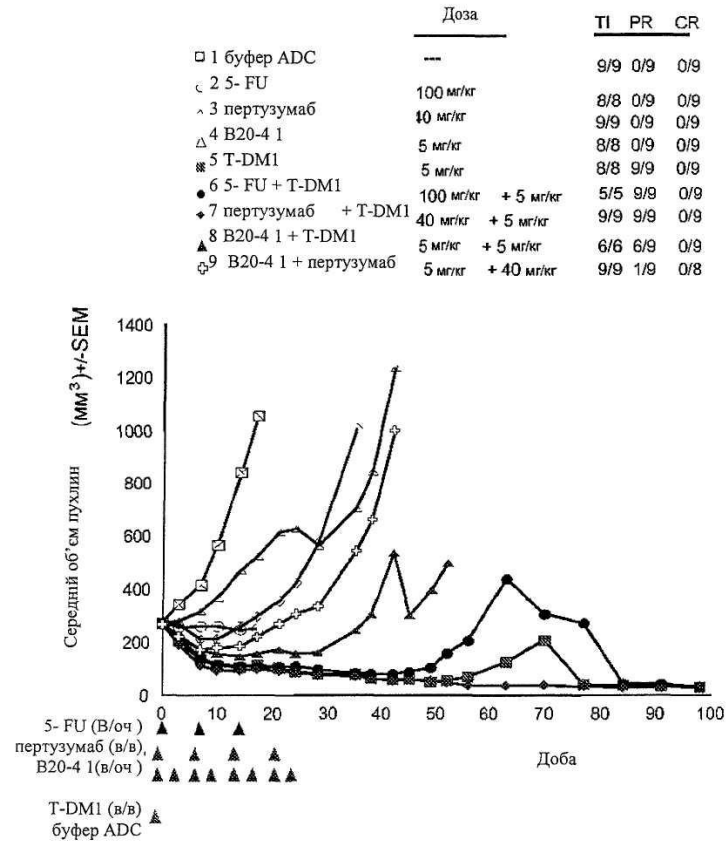
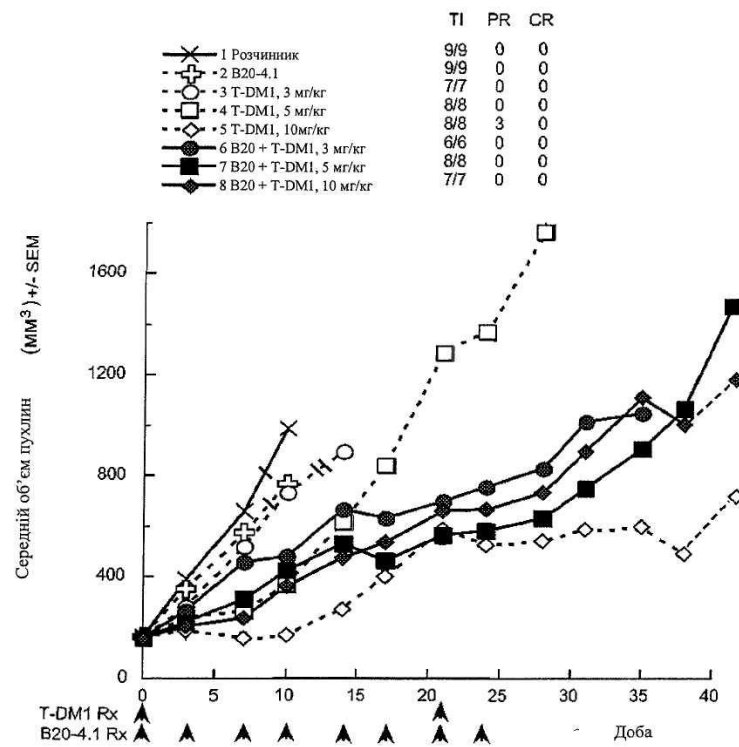
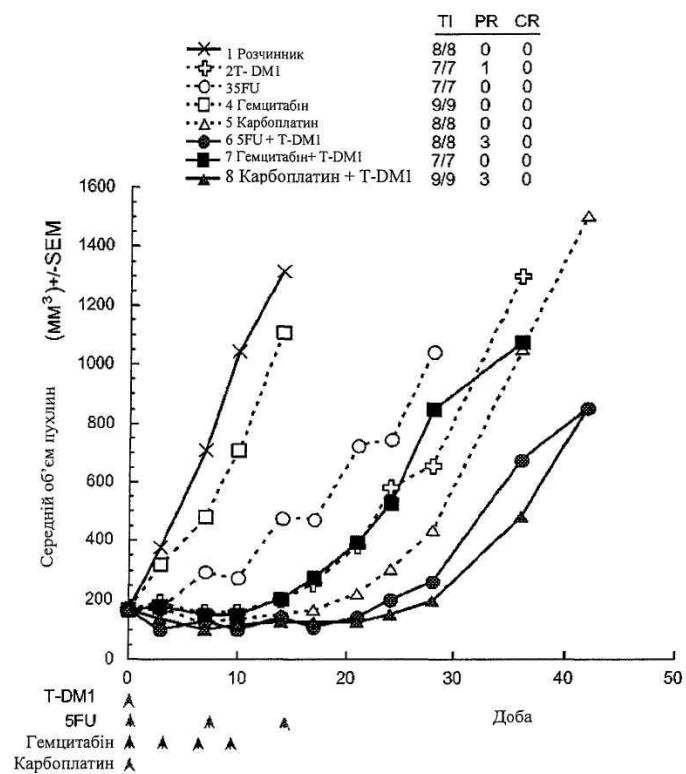


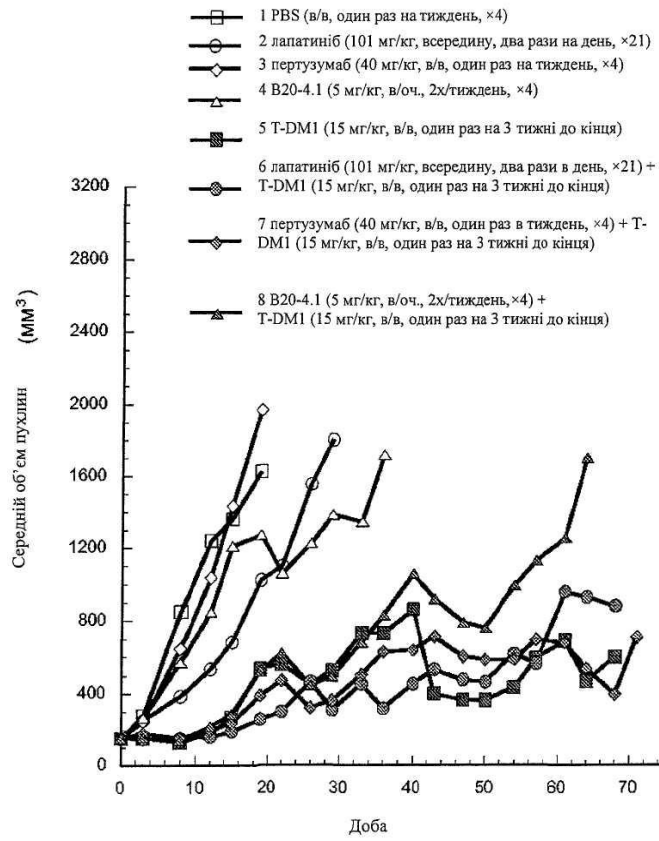
Fig. 11



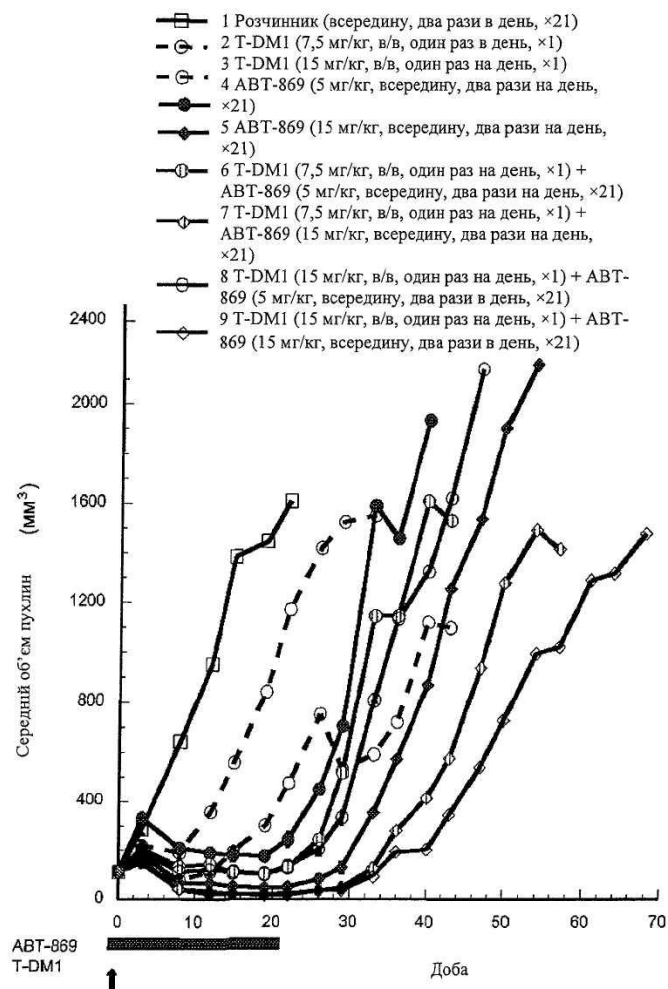
Фіг. 12



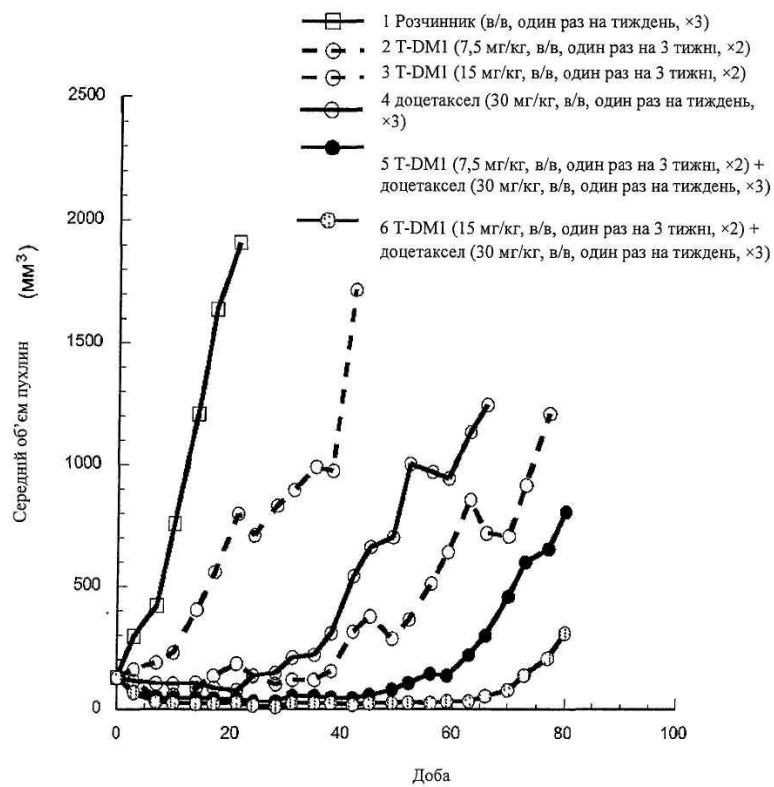
Фіг. 13



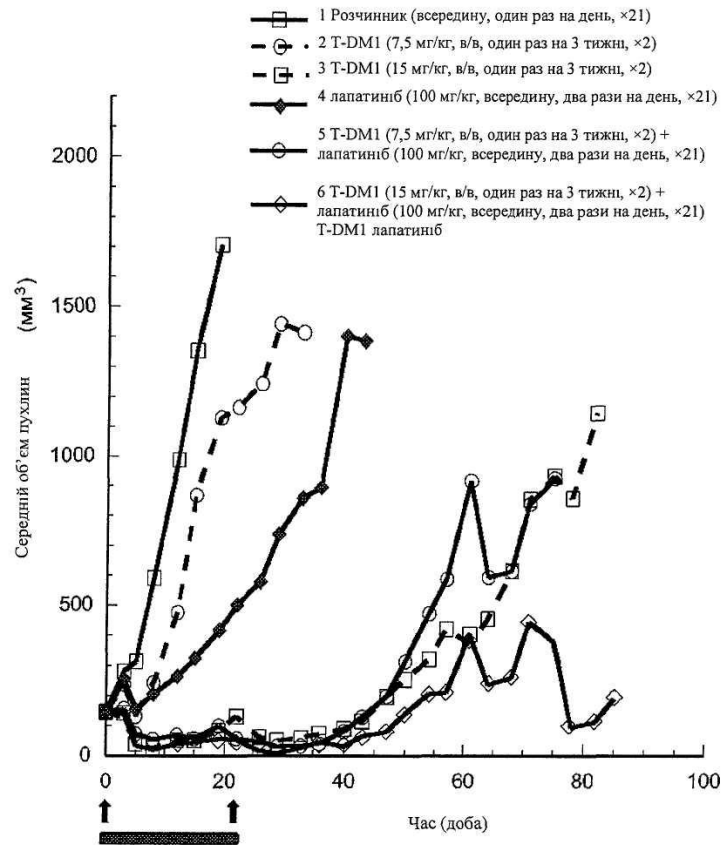
Фіг. 14



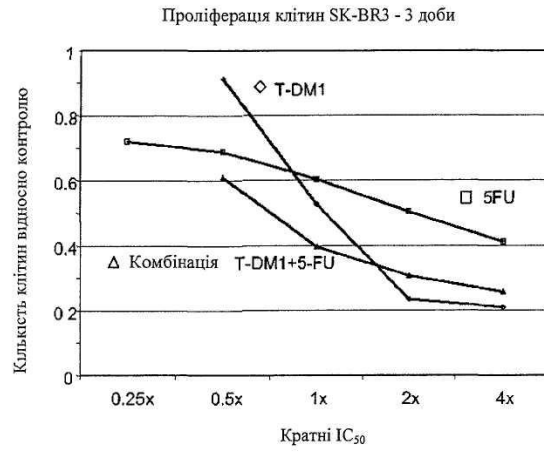
Фіг. 15



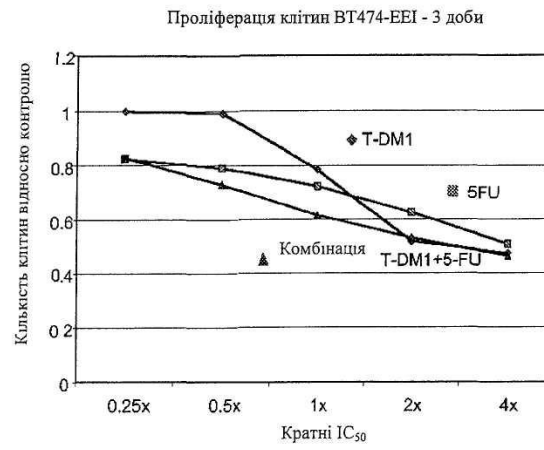
Фіг. 16



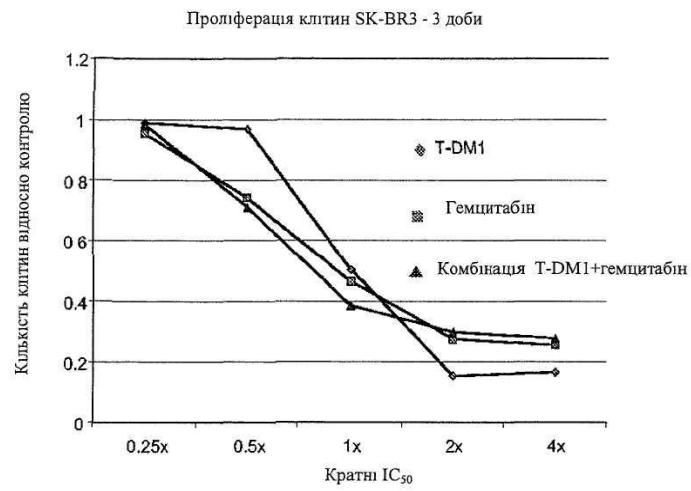
Фіг. 17



Фіг. 18



Фіг. 19



Фіг. 20

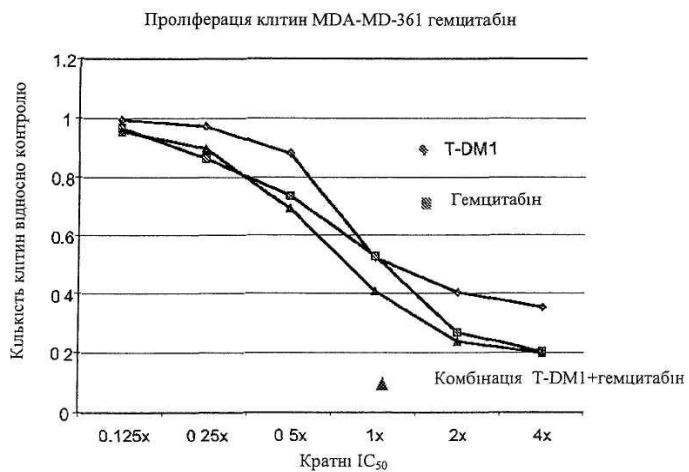


Fig. 21

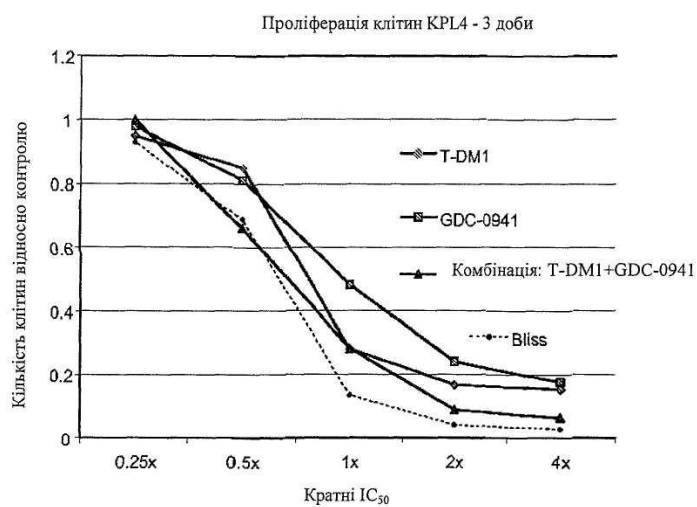


Fig. 22

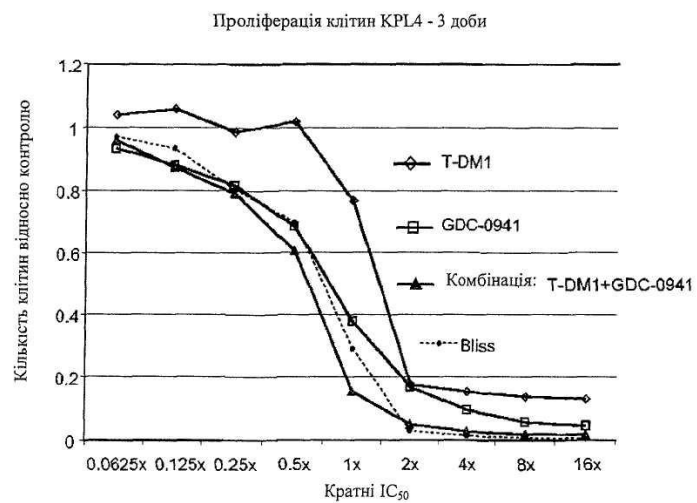
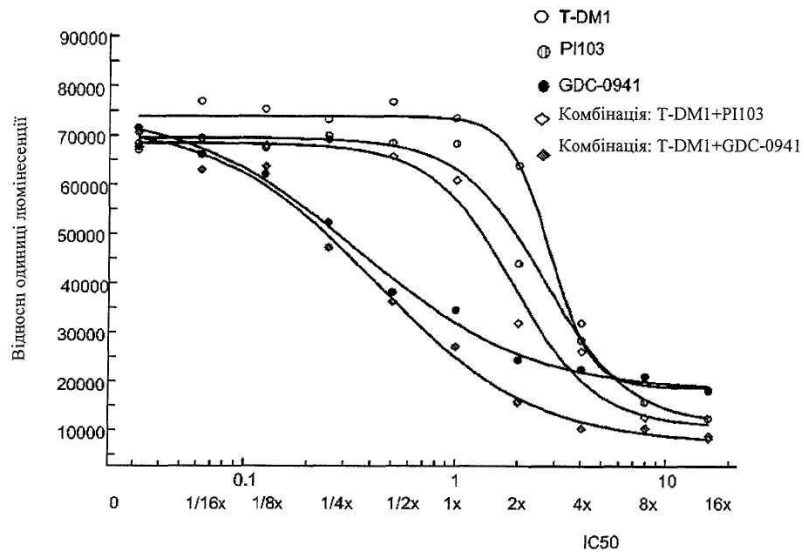
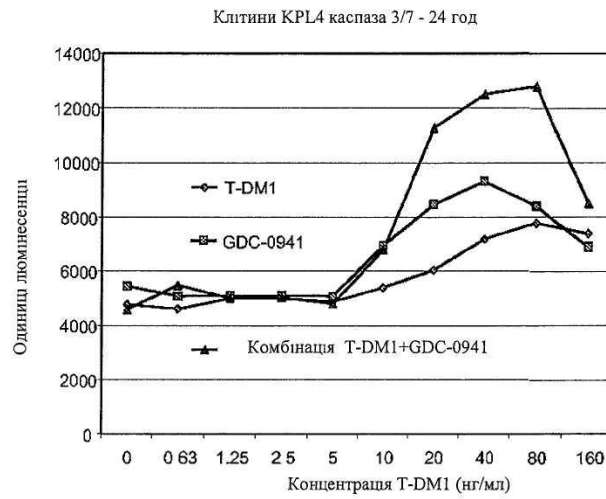


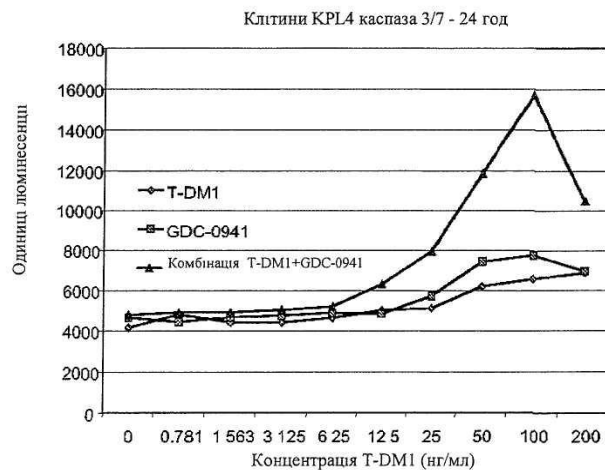
Fig. 23



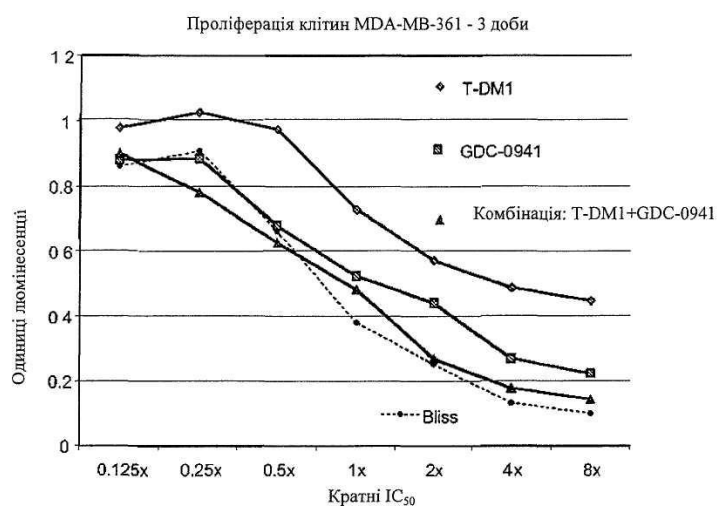
Фіг. 24



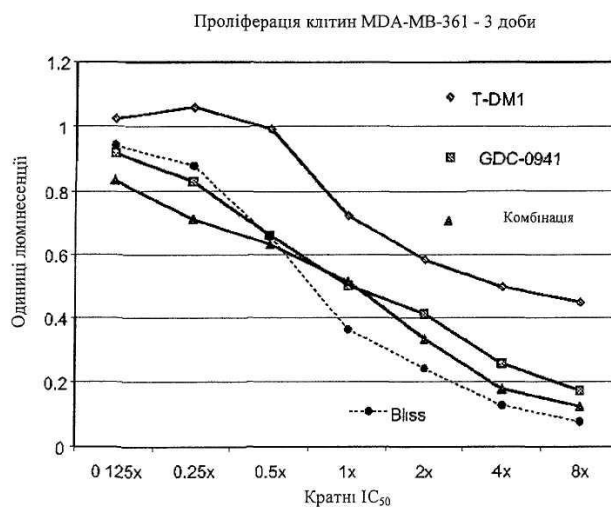
Фіг. 25



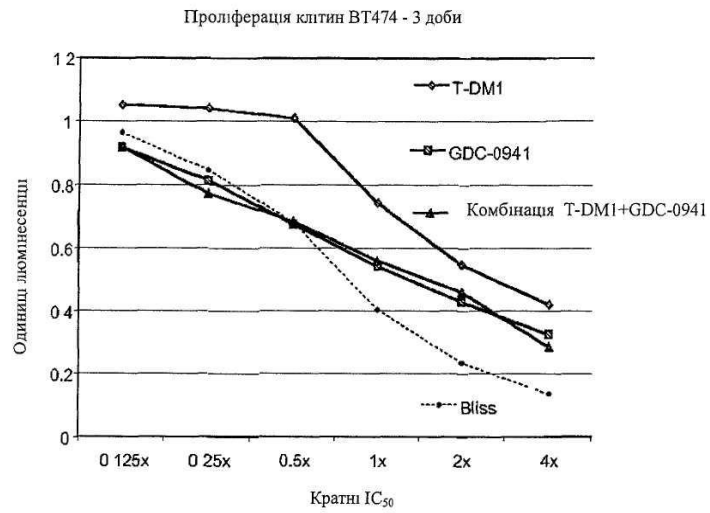
Фіг. 26



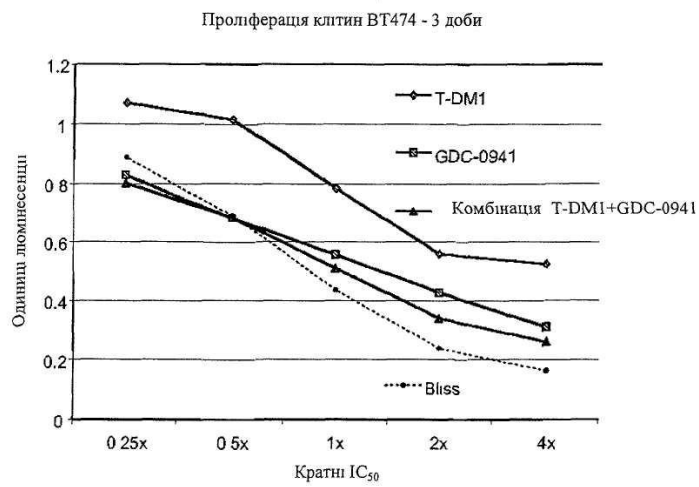
Фіг. 27



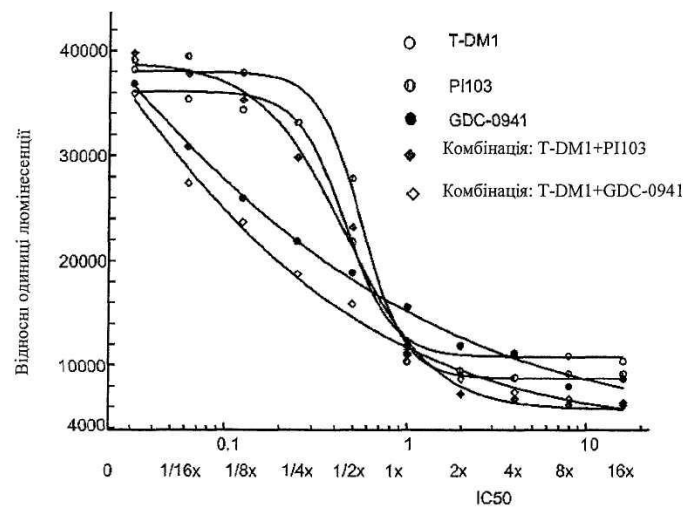
Фіг. 28



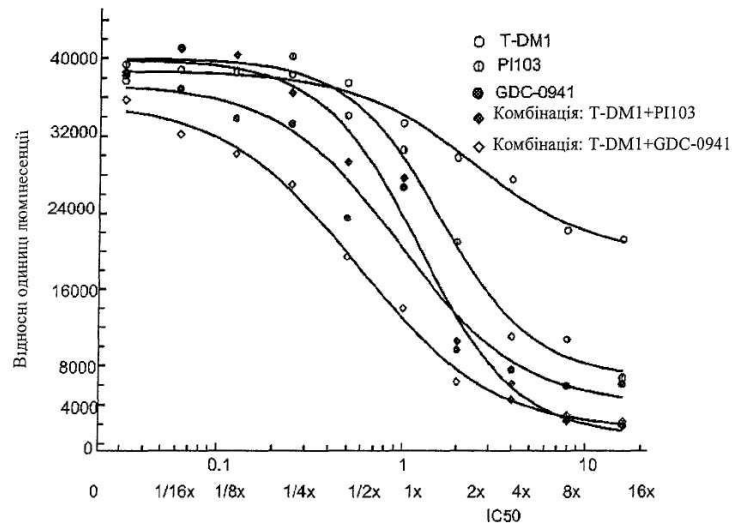
Фіг. 29



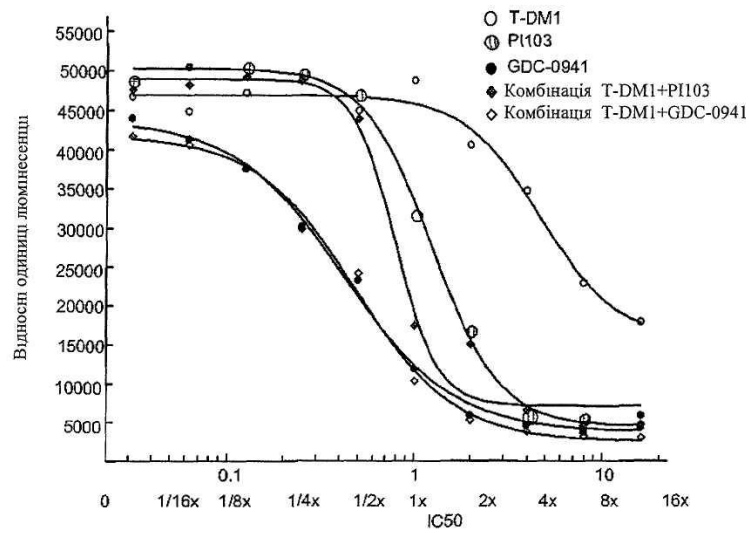
Фіг. 30



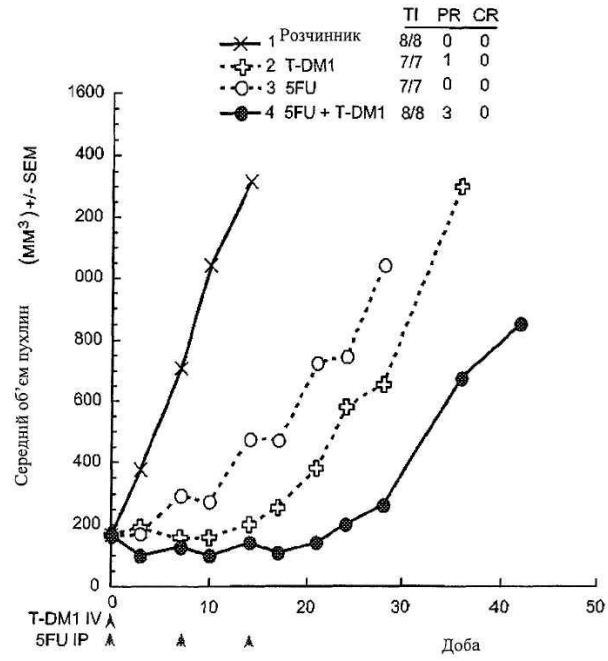
Фіг. 31



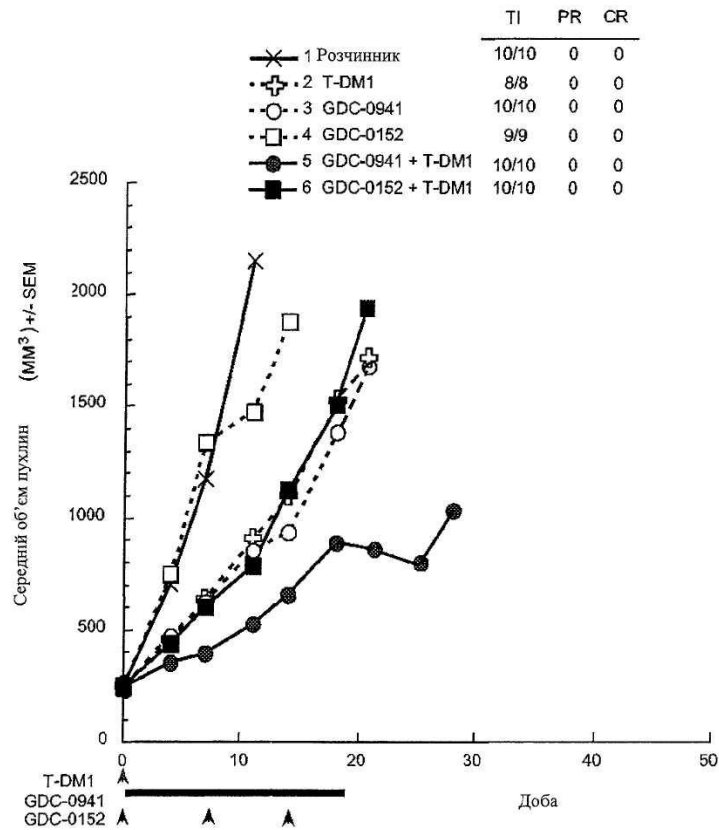
Фиг. 32



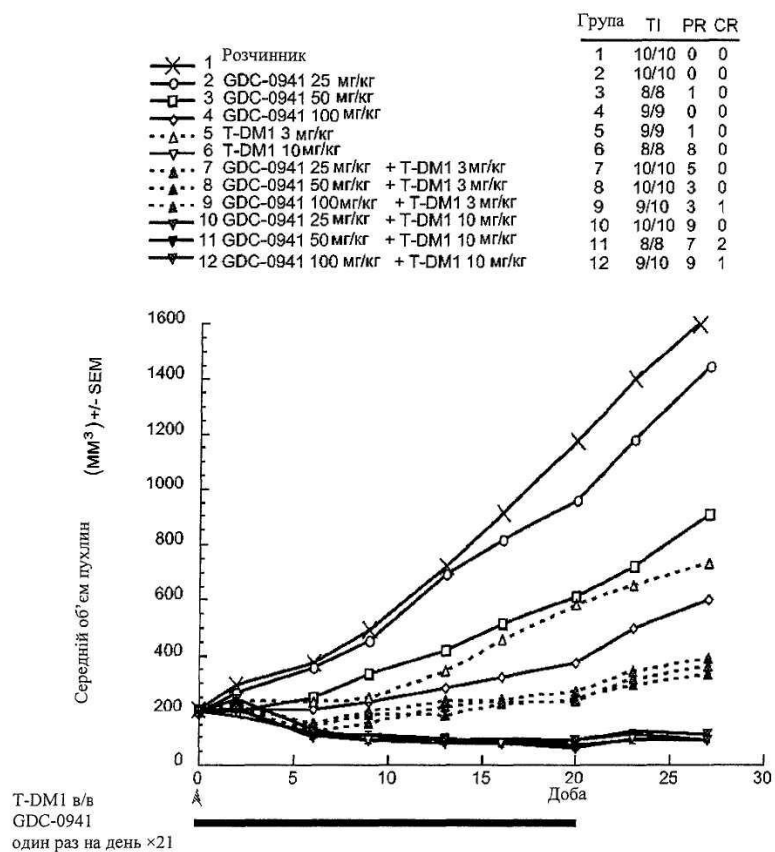
Фиг. 33



Фіг. 34



Фіг. 35



Фіг. 36

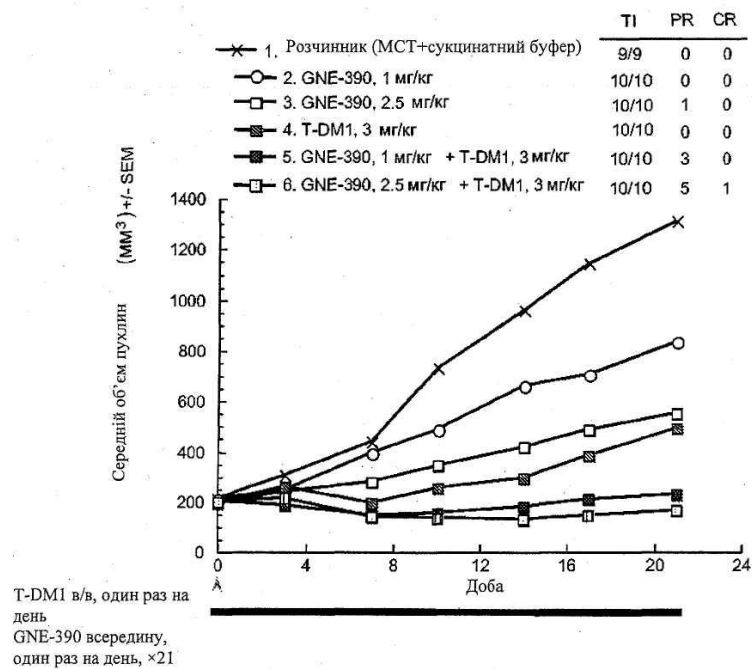


Fig. 37

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601