

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490742** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.05.20**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.09.15**

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)  
*A61K 38/07* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 14/71* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО,  
КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **202111088584.9**

(32) **2021.09.16**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/118964**

(87) **WO 2023/040941 2023.03.23**

(71) Заявитель:  
**ШАНХАЙ МИРАКОДЖЕН ИНК.  
(CN)**

(72) Изобретатель:  
**Ли Ху, Ху Чаохун, Лю Вэньчао (CN)**

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

---

(57) Изобретение относится к применению конъюгата антитело-лекарственное средство и комбинированному лекарственному средству и его применению. В частности, предусматривается применение конъюгата антитело-лекарственное средство, комбинированное лекарственное средство и его применение. Конъюгат антитело-лекарственное средство демонстрирует выраженный фармакодинамический эффект ингибирования роста опухолевых клеток в различных клеточных линиях NSCLC с экспрессией мутации EGFR и различных моделях PDX для опухолей NSCLC человека с лекарственной резистентностью к AZD9291 и с экспрессией мутации EGFR. Кроме того, комбинированное введение конъюгата антитело-лекарственное средство и антитела против PD-1 или антитела против PD-L1 демонстрирует выраженный синергический фармакодинамический эффект ингибирования роста опухолевых клеток в модели PDX для опухоли NSCLC человека с лекарственной резистентностью к AZD9291 и экспрессией мутации EGFR.

**A1**

**202490742**

**202490742**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580851EA/042

### **ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТА АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, И КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

#### **Область изобретения**

[001] Настоящее изобретение относится к области биомедицины, в частности, к применению конъюгата антитело-лекарственное средство, комбинированному лекарственному средству и его применению.

#### **Уровень техники изобретения**

[002] Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) представляет собой трансмембранную рецепторную тирозинкиназу (RTK) семейства рецепторов EGF, состоящего из четырех близкородственных RTK: ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3 и ErbB4/HER4. EGFR сверхэкспрессируется на различных опухолях человека, включая рак ободочной и прямой кишки, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак легкого, рак предстательной железы, рак почки, рак поджелудочной железы, рак яичника, злокачественную опухоль головного мозга и рак мочевого пузыря. В этих опухолях EGFR вовлечен в каскады передачи сигнала, которые регулируют рост злокачественных клеток, передачу сигнала, дифференцировку, адгезию, миграцию и выживаемость.

[003] Вследствие его многообразной роли в злокачественной опухоли, EGFR стал привлекательной терапевтической мишенью. Многие нацеленные на EGFR низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназы (TKI, такие как gefitinib, erlotinib и osimertinib) и моноклональные антитела (такие как cetuximab и panitumumab) одобрены в качестве лекарственных средств для монотерапии или терапии в комбинации с химиотерапией. Несмотря на успех этих существующих таргентных способов терапии, у пациентов часто развивается резистентность к низкомолекулярным ингибиторам EGFR вследствие мутаций в киназном домене EGFR. Кроме того, на настоящий момент, продаваемые на рынке моноклональные антитела, такие как cetuximab, одобрены только для лечения метастазирующего колоректального рака с KRAS дикого типа (RAS wt mCRC) и/или плоскоклеточной карциномы головы и шеи (SCCHN), и panitumumab одобрен для лечения метастазирующего рака толстого кишечника.

[004] Ген EGFR человека расположен на хромосоме 7p12-14 и состоит из 24 экзонов. Экзоны 18-24 кодируют функциональную область ТК, где экзоны 18-20 кодируют N-долю, и экзоны 21-24 кодируют C-долю. Мутации, связанные с чувствительностью к лекарственным средствам TKI, сконцентрированы в экзонах 18-21. Приблизительно 49% мутаций являются делеционными мутациями (например, DelE746-A750) в области кодонов 746-752 экзона 19, и у более 80% из них отсутствует мотив лейцин (L)-аргинин (R)-глутаминовая кислота (E)-аланин (A). Приблизительно 45% мутаций представляют собой точковые мутации L858R в экзоне 21 (мутация лейцина в положении 858 на аргинин), а другие менее частые мутации включают G719S в экзоне 18 и L861Q в экзоне 21.

[005] Исследования показали, что приблизительно 50-60% пациентов с NSCLC с

приобретенной резистентностью к ТКИ имеют мутацию T790M и не отвечают на гефитиниб или эрлотиниб. Даже после лечения осимертинибом, ТКИ третьего поколения, который специфически нацелен на мутацию T790M, у пациентов с NSCLC все еще происходит прогрессирование заболевания после лечения в течение приблизительно 10 месяцев.

**[006]** Для немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), хотя изобретение ТКИ значительно трансформировало подход к лечению и оказалось полезным для этих пациентов, скорость, с которой возникают мутации в киназном домене EGFR, значительно опережает разработку новых ТКИ для преодоления резистентности, вызываемой этими мутациями. Лекарственная резистентность, вызываемая мутациями EGFR, является одной из основных проблем современных направленных на EGFR ТКИ. Таким образом, доступные в настоящее время направленные на EGFR способы лечения не могут полностью удовлетворять потребности пациентов, и существует очевидная неудовлетворенная медицинская потребность в способах лечения с новыми механизмами.

**[007]** Ингибиторы иммунной точки контроля, направленные на каскад PD-1/PD-L1, продемонстрировали значительные и длительные клинические ответы у пациентов с несколькими злокачественными опухолями, включая NSCLC. Хотя блокада точки контроля PD-1/PD-L1 может приводить к выраженным ответам, эта терапия является эффективной только у подгруппы пациентов, и многие пациенты отвечают на лечение только частично. Клинические испытания продемонстрировали, что частота объективного ответа на антитела против PD-1 у пациентов с плоскоклеточным NSCLC составляет приблизительно 33%, и частота объективного ответа на антитела против PD-1 у пациентов с неплюскоклеточным NSCLC составляет 12%. Кроме того, применение ингибиторов PD-1/PD-L1 при NSCLC, имеющем EGFR-активирующие мутации, все еще является сомнительным в настоящее время. Неясно, могут ли при NSCLC с мутантным EGFR быть полезными ингибиторы PD-1/PD-L1.

**[008]** Ввиду вышеупомянутых проблем лекарственной резистентности, имеющих у существующих таргетных лекарственных средств EGFR-ТКИ и ограничений терапии с блокадой точки контроля PD-1/PD-L1, все еще требуется способ лечения с лучшей эффективностью, меньшими токсическими и побочными эффектами, и меньшей лекарственной резистентностью.

### **Сущность изобретения**

**[009]** Было обнаружено, что конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как МУК-3) по настоящему изобретению продемонстрировал выраженные фармакодинамические эффекты ингибирования роста опухолевых клеток в различных клеточных линиях NSCLC, экспрессирующих мутации EGFR, а также различных моделях опухоли PDX для резистентного к AZD9291 (Осимертиниб) NSCLC человека, экспрессирующего мутации EGFR.

**[010]** Кроме того, также было обнаружено, что комбинированное применение конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению (такого как МУК-3) и антитела против PD-1 (такого как АК103) демонстрирует выраженные

синергические фармакодинамические эффекты ингибирования роста опухолевых клеток в моделях PDX для резистентного к AZD9291 (Осимертиниб) NSCLC, экспрессирующего мутации EGFR.

[011] Ввиду этого, в первом аспекте настоящего изобретения предусматривается применение конъюгата антитело-лекарственное средство, фармацевтически приемлемой соли или сольвата конъюгата антитело-лекарственное средство или сольвата соли, которое представляет собой одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

[012] 1) получение ингибитора немелкоклеточного рака легкого; и

[013] 2) получение лекарственного средства для лечения и/или предупреждения немелкоклеточного рака легкого;

[014] где немелкоклеточный рак легкого представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

[015] 1) резистентного к EGFR-ТКИ немелкоклеточного рака легкого; и

[016] 2) немелкоклеточного рака легкого с мутантным EGFR, и необязательно немелкоклеточный рак легкого с мутантным EGFR также имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3;

[017] где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы I,  
Ab-(L-D)<sub>p</sub>  
формула I

[018] где:

[019] Ab обозначает антитело против EGFR, где антитело против EGFR содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 5-7, или их мутанты, и CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области легкой цепи, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 12-14, или их мутанты;

[020] L обозначает линкер;

[021] D обозначает цитотоксическое средство;

[022] p обозначает 1-9 (как например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, или, например, 1-7), как например, 2-6, 3-5, в частности, например, 3,9, 4,0 или 4,1.

[023] Во втором аспекте настоящего изобретения предусматривается конъюгат антитело-лекарственное средство, фармацевтически приемлемая соль или сольват конъюгата антитело-лекарственное средство, или сольват соли, для применения в одном или нескольких из следующих:

[024] 1) ингибирование роста опухоли немелкоклеточного рака легкого; и

[025] 2) лечение и/или предупреждение немелкоклеточного рака легкого,

[026] где немелкоклеточный рак легкого представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

[027] 1) резистентного к EGFR-ТКИ немелкоклеточного рака легкого; и

**[028]** 2) немелкоклеточного рака легкого с мутантным EGFR, и необязательно немелкоклеточный рак легкого с мутантным EGFR также имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации с-Met и амплификации HER3;

**[029]** где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы I,

$Ab-(L-D)_p$

формула I

**[030]** где:

**[031]** Ab обозначает антитело против EGFR, где антитело против EGFR содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 5-7, или их мутанты, и CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области легкой цепи, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 12-14, или их мутанты;

**[032]** L обозначает линкер;

**[033]** D обозначает цитотоксическое средство;

**[034]** p обозначает 1-9 (как например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, или, например, 1-7), как например, 2-6, 3-5, в частности, например, 3,9, 4,0 или 4,1.

**[035]** В третьем аспекте настоящего изобретения предусматривается способ ингибирования роста опухоли немелкоклеточного рака легкого, и/или способ лечения и/или предупреждения немелкоклеточного рака легкого, включающий: введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство, фармацевтически приемлемой соли или сольвата конъюгата антитело-лекарственное средство, или сольвата соли,

**[036]** где немелкоклеточный рак легкого представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

**[037]** 1) резистентного к EGFR-ТКИ немелкоклеточного рака легкого; и

**[038]** 2) немелкоклеточного рака легкого с мутантным EGFR, и необязательно немелкоклеточный рак легкого с мутантным EGFR также имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации с-Met и амплификации HER3;

**[039]** где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы I,

$Ab-(L-D)_p$

формулу I

**[040]** где:

**[041]** Ab обозначает антитело против EGFR, где антитело против EGFR содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 5-7, или их мутанты, и CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области легкой цепи, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 12-14, или

их мутанты;

**[042]** L обозначает линкер;

**[043]** D обозначает цитотоксическое средство;

**[044]** p обозначает 1-9 (как например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, или, например, 1-7), как например, 2-6, 3-5, в частности, например, 3,9, 4,0 или 4,1.

**[045]** В некоторых вариантах осуществления доза конъюгата антитело-лекарственное средство, фармацевтически приемлемой соли или сольвата конъюгата антитело-лекарственное средство, или сольвата соли составляет 0,1-10,0 мг/кг (как например, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,1 мг/кг, 2,2 мг/кг, 2,3 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,5 мг/кг, 2,6 мг/кг, 2,7 мг/кг, 2,8 мг/кг, 2,9 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,2 мг/кг, 3,4 мг/кг, 3,6 мг/кг, 3,8 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,2 мг/кг, 4,4 мг/кг, 4,6 мг/кг, 4,8 мг/кг, 5,0 мг/кг, 6,2 мг/кг, 6,4 мг/кг, 6,6 мг/кг, 6,8 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,2 мг/кг, 7,4 мг/кг, 7,6 мг/кг, 7,8 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,2 мг/кг, 8,4 мг/кг, 8,6 мг/кг, 8,8 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,2 мг/кг, 9,4 мг/кг, 9,6 мг/кг, 9,8 мг/кг или 10,0 мг/кг, или 0,1-0,3 мг/кг, 0,3-0,5 мг/кг, 0,5-0,7 мг/кг, 0,7-0,9 мг/кг, 0,9-1,0 мг/кг, 1,0-1,3 мг/кг, 1,3-1,5 мг/кг, 1,5-1,7 мг/кг, 1,7-1,9 мг/кг, 1,9-2,0 мг/кг, 2,0-2,3 мг/кг, 2,3-2,5 мг/кг, 2,5-2,7 мг/кг, 2,7-2,9 мг/кг, 2,9-3,0 мг/кг, 3,0-3,3 мг/кг, 3,3-3,5 мг/кг, 3,5-3,7 мг/кг, 3,7-3,9 мг/кг, 3,9-4,0 мг/кг, 4,0-4,3 мг/кг, 4,3-4,5 мг/кг, 4,5-4,7 мг/кг, 4,7-4,9 мг/кг или 4,9-5,0 мг/кг).

**[046]** В некоторых вариантах осуществления доза конъюгата антитело-лекарственное средство, фармацевтически приемлемой соли или сольвата конъюгата антитело-лекарственное средство, или сольвата соли составляет 0,5-2,5 мг/кг.

**[047]** В некоторых вариантах осуществления доза конъюгата антитело-лекарственное средство, фармацевтически приемлемой соли или сольвата конъюгата антитело-лекарственное средство, или сольвата соли составляет 2,0-2,5 мг/кг.

**[048]** Кроме того, следует отметить, что "конъюгат антитело-лекарственное средство", описанный выше, относится к композиции, содержащей молекулы ADC с одинаковым или разным DAR.

**[049]** В частности, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей множество молекул ADC против EGFR. В некоторых случаях все ADC в композиции, описанной в настоящем описании, содержат одинаковое количество одного или нескольких цитотоксических средств. В других случаях каждый ADC в композиции, описанной в настоящем описании, содержит отличающееся количество одного или нескольких цитотоксических средств.

**[050]** В конъюгате антитело-лекарственное средство, описанном в настоящем описании, каждое антитело против EGFR может быть конъюгировано с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более цитотоксических средств.

**[051]** Соотношение лекарственного средства и антитела (DAR), упоминаемое выше, относится к количеству молекул цитотоксического средства, конъюгированного с антителами против EGFR. Количество молекул цитотоксического средства, содержащегося

в ADC, описанном в настоящем описании, как правило, представляет собой целое число, когда количество (например,  $p$  в формуле I) молекул цитотоксического средства, содержащихся в ADC, описанном в настоящем описании, представляет собой дробное число, это дробное число относится к среднему количеству цитотоксических средств, конъюгированных с каждым антителом против EGFR, в композиции, содержащей множество молекул ADC.

**[052]** В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из группы, состоящей из 6-малеимидокапроила (MC), малеимидопропионила (MP), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)валерата (SPP), 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-формила (MCC), N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоата (SIAB) и 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонила (MC-vc-PAB).

**[053]** В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил (MC-vc-PAB).

**[054]** В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство выбрано из группы, состоящей из токсинов, таких как SN-38, Гемцитабин, Монометилауристатин E (MMAE), Монометилауристатин F (MMAF), майтанзиноиды (такие как Майтанзин DM1 и Майтанзин DM4), калихеамицин, MGBA (такой как дуокармицин), доксорубицин, Ригин и дифтерийный токсин, P131, интерлейкины, факторы некроза опухоли, хемокины и наночастицы.

**[055]** В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой Монометилауристатин E (MMAE).

**[056]** В некоторых вариантах осуществления области FR1, FR2, FR3 и FR4 в переменной области тяжелой цепи антитела против EGFR, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID NO: 8-11, или их мутанты.

**[057]** В некоторых вариантах осуществления области FR1, FR2, FR3 и FR4 в переменной области легкой цепи антитела против EGFR, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID NO: 15-18, или их мутанты.

**[058]** В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела против EGFR выбрана из константных областей IgG, IgM, IgA, IgD и IgA человека или их мутантов.

**[059]** В некоторых вариантах осуществления IgG выбран из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

**[060]** В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи антитела против EGFR выбрана из константных областей лямбда и каппа человека или их мутантов.

**[061]** В некоторых вариантах осуществления последовательность переменной области тяжелой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 1, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 1.

**[062]** В некоторых вариантах осуществления последовательность переменной

области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 1.

**[063]** В некоторых вариантах осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 2, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 2.

**[064]** В некоторых вариантах осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 2.

**[065]** В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 3, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 3.

**[066]** В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 3.

**[067]** В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области легкой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 4, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 4.

**[068]** В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области легкой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 4.

**[069]** В некоторых вариантах осуществления резистентный к EGFR-ТКИ немелкоклеточный рак легкого имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации EGFR, мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3.

**[070]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой мутацию в одном или нескольких участках, выбранных из группы, состоящей из: экзона 18, экзона 19, экзона 20 и экзона 21.

**[071]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R, T790M, C797S, G719S, L861Q, G719C, G719A, T854A и D761Y.

**[072]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R, T790M и C797S.

**[073]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R и T790M.

**[074]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой DelE746-A750, L858R, T790M, C797S или двойную мутацию L858R/T790M.

**[075]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой DelE746-A750, L858R, T790M или двойную мутацию L858R/T790M.

**[076]** В некоторых вариантах осуществления EGFR-ТКИ представляет собой одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: осимертиниба (AZD9291), gefitinibi, erlotinibi, icotinibi, afatinibi, dacomitinibi, imatinibi, lapatinibi, nazartinibi, rociletinibi, nkvotinibi, vandatinibi, neratinibi, pelitinibi, канертиниба, бригабиниба, РКС412, Go6976, мавелертиниба, олмутиниба, WZ4002, TAS2913, цетуксимаба, панитумумаба, авитиниба, HS-10296 и TQB3804.

**[077]** В некоторых вариантах осуществления EGFR-ТКИ представляет собой осимертиниб (AZD9291).

**[078]** В некоторых вариантах осуществления немелкоклеточный рак легкого выбран из группы, состоящей из аденокарциномы легкого (предпочтительно, бронхоальвеолярной карциномы), плоскоклеточной карциномы легкого, аденосквамозной карциномы легкого и крупноклеточной карциномы легкого.

**[079]** В четвертом аспекте настоящего изобретения предусматривается комбинация лекарственных средств, содержащая:

**[080]** первое лекарственное средство, причем первое лекарственное средство представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, фармацевтически приемлемую соль или сольват конъюгата антитело-лекарственное средство, или сольват соли; и

**[081]** второе лекарственное средство, причем второе лекарственное средство представляет собой ингибитор PD-1/PD-L1;

**[082]** где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы I,

$Ab-(L-D)_p$

формула I

**[083]** где:

**[084]** Ab обозначает антитело против EGFR, где антитело против EGFR содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID NO: 5-7, или их мутанты, и CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области легкой цепи, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID NO: 12-14, или их мутанты;

**[085]** L обозначает линкер;

**[086]** D обозначает цитотоксическое средство;

**[087]** p обозначает 1-9 (как например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, или, например, 1-7), как например, 2-6, 3-5, в частности, например, 3,9, 4,0 или 4,1.

**[088]** В некоторых вариантах осуществления первое лекарственное средство и второе лекарственное средство отделены друг от друга. Следует отметить, что отделение друг от друга означает, что первое лекарственное средство и второе лекарственное средство используются не в качестве смеси, а используются в разделенном состоянии. Например, первое лекарственное средство и второе лекарственное средство используются для

комбинированного введения (такого как одновременное введение или последовательное введение, или перекрестное введение).

**[089]** В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из группы, состоящей из 6-малеимидокапроила (MC), малеимидопропионила (MP), N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)валерата (SPP), 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-формила (MCC), N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоата (SIAB) и 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонила (MC-vc-PAB).

**[090]** В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил (MC-vc-PAB).

**[091]** В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство выбрано из группы, состоящей из токсинов, таких как SN-38, Гемцитабин, Монометилауристатин E (MMAE), Монометилауристатин F (MMAF), майтанзиноиды (такие как Майтанзин DM1 и Майтанзин DM4), калихеамицин, MGBA (такие как дуокармицин), доксорубицин, Ригин и дифтерийный токсин, P131, интерлейкины, факторы некроза опухоли, хемокины и наночастицы.

**[092]** В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой Монометилауристатин E (MMAE).

**[093]** В некоторых вариантах осуществления области FR1, FR2, FR3 и FR4 в вариательной области тяжелой цепи антитела против EGFR, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID NO: 8-11, или их мутанты.

**[094]** В некоторых вариантах осуществления области FR1, FR2, FR3 и FR4 в вариательной области легкой цепи антитела против EGFR, соответственно, содержат последовательности, как показано под SEQ ID NO: 15-18, или их мутанты.

**[095]** В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела против EGFR выбрана из константных областей IgG, IgM, IgA, IgD и IgA человека или их мутантов.

**[096]** В некоторых вариантах осуществления IgG выбран из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

**[097]** В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи антитела против EGFR выбрана из константных областей лямбда и каппа человека или их мутантов.

**[098]** В некоторых вариантах осуществления последовательность вариательной области тяжелой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 1, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 1.

**[099]** В некоторых вариантах осуществления последовательность вариательной области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 1.

**[0100]** В некоторых вариантах осуществления последовательность вариательной области легкой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 2, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%,

предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 2.

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 2.

**[0102]** В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 3, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 3.

**[0103]** В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 3.

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области легкой цепи антитела против EGFR содержит последовательность, как показано под SEQ ID NO: 4, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 4.

**[0105]** В некоторых вариантах осуществления последовательность константной области легкой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 4.

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело против PD-1.

**[0107]** В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: АК103 (HX008), Торипалимаба (JS-001), Синтилимаба (IBI308), Камрелизумаба, Тислелизумаба (BGB-A317), Опдиво или Ниволумаба, Кейтруды или Пембролизумаба, CS1003, серплулимаба (HLX10), АК104, гептанолимаба (GB226), лизумаба (например, LZM009), BAT-1306, SCT-110A, F520, SG001, GLS-010, PDR001, REGN2810 и STI-A1110.

**[0108]** В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой АК103 (HX008).

**[0109]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело против PD-L1.

**[0110]** В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1 представляет собой Дурвалумаб, Атезолизумаб или их комбинацию.

**[0111]** В некоторых вариантах осуществления соотношение масс первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 15:1-1:15 (как например, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14 или 1:15, или 15:1-14:1, 14:1-12:1, 12:1-10:1, 10:1-8:1, 8:1-6:1, 6:1-4:1, 4:1-2:1, 2:1-1:2, 1:2-1:4, 1:4-1:6, 1:6-1:8, 1:8-1:10, 1:10-1:12, 1:12-1:14 или 1:14-1:15).

**[0112]** В некоторых вариантах осуществления соотношение масс первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 1:1-1:10.

**[0113]** В некоторых вариантах осуществления соотношение масс первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 1:1-1:9, 1:2-1:8, 1:3-1:7 или 1:4-1:6.

**[0114]** В некоторых вариантах осуществления соотношение масс первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 1:5.

**[0115]** В пятом аспекте настоящего изобретения предусматривается применение комбинации лекарственного средства, описанной выше, которое представляет собой одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

**[0116]** 1) получения ингибитора немелкоклеточного рака легкого; и

**[0117]** 2) получения лекарственного средства для лечения и/или предупреждения немелкоклеточного рака легкого;

**[0118]** где немелкоклеточный рак легкого представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

**[0119]** 1) резистентного к EGFR-ТКИ немелкоклеточного рака легкого; и

**[0120]** 2) немелкоклеточного рака легкого с мутантным EGFR, и необязательно немелкоклеточный рак легкого с мутантным EGFR также имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3.

**[0121]** В шестом аспекте настоящего изобретения предусматривается комбинация лекарственного средства, описанного выше, для применения в одном или нескольких из следующих:

**[0122]** 1) ингибирование роста опухоли немелкоклеточного рака легкого; и

**[0123]** 2) лечение и/или предупреждение немелкоклеточного рака легкого;

**[0124]** где немелкоклеточный рак легкого представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

**[0125]** 1) резистентного к EGFR-ТКИ немелкоклеточного рака легкого; и

**[0126]** 2) немелкоклеточного рака легкого с мутантным EGFR, и необязательно немелкоклеточный рак легкого с мутантным EGFR также имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3.

**[0127]** В некоторых вариантах осуществления резистентный к EGFR-ТКИ немелкоклеточный рак легкого имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации EGFR, мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3.

**[0128]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой мутацию в одном или нескольких участках, выбранных из группы, состоящей из: экзона 18, экзона 19, экзона 20 и экзона 21.

**[0129]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R, T790M, C797S, G719S, L861Q, G719C, G719A, T854A и D761Y.

**[0130]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R и T790M.

**[0131]** В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой DelE746-A750, L858R, T790M или двойную мутацию L858R/T790M.

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления EGFR-ТКИ представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из: осимертиниба (AZD9291), gefitinibi, erlotinibi, icotinibi, afatinibi, dacomitinibi, imatinibi, lapatinibi, nazartinibi, rociletinibi, nkvotinibi, vandatinibi, neratinibi, pelitinibi, canertinibi, brigatinibi, PKC412, G6976, mavelertinibi, olmutinibi, WZ4002, TAS2913, cetuximaba, panitumumaba, avitinibi, HS-10296 и TQB3804.

**[0133]** В некоторых вариантах осуществления EGFR-ТКИ представляет собой осимертиниб (AZD9291).

**[0134]** В некоторых вариантах осуществления немелкоклеточный рак легкого выбран из группы, состоящей из аденокарциномы легкого (предпочтительно, бронхоальвеолярная карцинома), плоскоклеточной карциномы легкого, аденосквамозной карциномы легкого и крупноклеточной карциномы легкого.

**[0135]** В седьмом аспекте настоящего изобретения предусматривается способ ингибирования роста опухоли немелкоклеточного рака легкого, и/или способ лечения и/или предупреждения немелкоклеточного рака легкого, включающий: введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества первого лекарственного средства и эффективного количества второго лекарственного средства, где первое лекарственное средство представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, как описано выше, или фармацевтически приемлемую соль или сольват конъюгата антитело-лекарственное средство, или сольват соли, где второе лекарственное средство представляет собой ингибитор PD-1/PD-L1;

**[0136]** где немелкоклеточный рак легкого представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

**[0137]** 1) резистентного к EGFR-ТКИ немелкоклеточного рака легкого; и

**[0138]** 2) немелкоклеточного рака легкого с мутантным EGFR, и необязательно немелкоклеточный рак легкого с мутантным EGFR также имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3.

**[0139]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело против PD-1.

**[0140]** В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: AK103 (HX008), Торипалимаба (JS-001), Синтилимаба (IBI308), Камрелизумаба, Тислелизумаба (BGB-A317), Опдиво или Ниволумаб, Кейтруды или Пембролизумаба, CS1003, серплулимаба (HLX10), AK104, гептанолимаба (GB226), лизумаба (например, LZM009), BAT-1306, SCT-

I10A, F520, SG001, GLS-010, PDR001, REGN2810 и STI-A1110.

**[0141]** В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-1 представляет собой АК103 (HX008).

**[0142]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело против PD-L1.

**[0143]** В некоторых вариантах осуществления антитело против PD-L1 представляет собой Дурвалумаб, Атезолизумаб или их комбинацию.

**[0144]** В некоторых вариантах осуществления соотношение дозы первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 15:1-1:15 (как например, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14 или 1:15, или 15:1-14:1, 14:1-12:1, 12:1-10:1, 10:1-8:1, 8:1-6:1, 6:1-4:1, 4:1-2:1, 2:1-1:2, 1:2-1:4, 1:4-1:6, 1:6-1:8, 1:8-1:10, 1:10-1:12, 1:12-1:14 или 1:14-1:15).

**[0145]** В некоторых вариантах осуществления соотношение доз первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 1:1-1:10.

**[0146]** В некоторых вариантах осуществления соотношение доз первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 1:1-1:9, 1:2-1:8, 1:3-1:7 или 1:4-1:6.

**[0147]** В некоторых вариантах осуществления соотношение доз первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 1:5.

**[0148]** Следует отметить, что специалисты в данной области могут понять, что доза первого лекарственного средства и второго лекарственного средства представляет собой общую дозу для предупреждения и лечения заболеваний. Когда общая доза остается неизменной, могут быть разные режимы введения, такие как один раз каждые X суток и введение Y раз, и т.д.

**[0149]** В некоторых вариантах осуществления доза первого лекарственного средства составляет 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза второго лекарственного средства составляет 5 мг/кг.

**[0150]** В некоторых вариантах осуществления первое лекарственное средство и второе средство вводят перекрестно.

**[0151]** В некоторых вариантах осуществления режим введения первого лекарственного средства представляет собой: с 0 суток один раз в 4 суток всего 3 раза.

**[0152]** В некоторых вариантах осуществления режим введения второго лекарственного средства представляет собой: с 0 суток один раз в 3 суток в течение всего 10 раз.

**[0153]** В некоторых вариантах осуществления путь введения первого лекарственного средства и второго лекарственного средства представляет собой внутривенную инъекцию.

**[0154]** В некоторых вариантах осуществления резистентный к EGFR-ТКИ немелкоклеточный рак легкого имеет одно или несколько, выбранных из группы,

состоящей из: мутации EGFR, мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3.

[0155] В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой мутацию в одном или нескольких участках, выбранных из группы, состоящей из: экзона 18, экзона 19, экзона 20 и экзона 21.

[0156] В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R, T790M, C797S, G719S, L861Q, G719C, G719A, T854A и D761Y.

[0157] В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R и T790M.

[0158] В некоторых вариантах осуществления мутация EGFR представляет собой DelE746-A750, L858R, T790M или двойную мутацию L858R/T790M.

[0159] В некоторых вариантах осуществления EGFR-ТКИ представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из: осимертиниба (AZD9291), gefitinib, erlotinib, icotinib, afatinib, dacomitinib, imatinib, lapatinib, nazartinib, rociletinib, naxotinib, vandetanib, neratinib, pelitinib, canertinib, brigatinib, PKC412, G6976, mavelertinib, olmutinib, WZ4002, TAS2913, cetuximab, panitumumab, avitinib, HS-10296 и TQB3804.

[0160] В некоторых вариантах осуществления EGFR-ТКИ представляет собой осимертиниб (AZD9291).

[0161] В некоторых вариантах осуществления немелкоклеточный рак легкого выбран из группы, состоящей из аденокарциномы легкого (предпочтительно, бронхоальвеолярной карциномы), плоскоклеточной карциномы легкого, аденосквамозной карциномы легкого и крупноклеточной карциномы легкого.

[0162] Благоприятный эффект:

[0163] 1. Конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как MYC-3) по настоящему изобретению продемонстрировал выраженные фармакодинамические эффекты ингибирования роста опухолевых клеток в различных клеточных линиях NSCLC, экспрессирующих мутации EGFR, а также в различных моделях опухоли PDX для резистентного к AZD9291 NSCLC человека, экспрессирующего мутации EGFR.

[0164] 2. Комбинированное применение конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению (такого как MYC-3) и антитела против PD-1 (такого как AK103) или антитела против PD-L1 демонстрирует выраженные синергические фармакодинамические эффекты ингибирования роста опухоли в моделях опухоли PDX для резистентного к AZD9291 NSCLC человека экспрессирующего мутации EGFR.

#### **Краткое описание чертежей**

[0165] На фиг.1 представлена хроматограмма HPLC-ВЭЖХ для определения соотношения лекарственное средство/антитело в конъюгате антитело-лекарственное средство.

[0166] На фиг.2 представлены репрезентативные кривые уничтожения клеток МҮК-3 и Эрбитуксом® в линии клеток рака легкого человека NCI-H1975.

[0167] На фиг.3 представлены репрезентативные кривые уничтожения клеток МҮК-3 и Эрбитуксом® в линии клеток рака легкого человека NCI-H1650.

[0168] На фиг.4 представлена эффективность ADC-3 и Эрбитукса® в отношении подкожных ксенотрансплантатов опухолей рака легкого NCI-H1975 у мышей nude.

[0169] На фиг.5 представлен эффект различных тестируемых лекарственных средств на объем опухоли в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека LUN#2005-143.

[0170] На фиг.6 представлен эффект различных тестируемых лекарственных средств на объем опухоли в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека LUN#2210-4a.

[0171] На фиг.7 представлен эффект различных тестируемых лекарственных средств на объем опухоли в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека LUN#2210-106.

[0172] На фиг.8 представлен эффект различных тестируемых лекарственных средств на объем опухоли в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека LUN#2355-128.

[0173] На фиг.9 представлен эффект различных тестируемых лекарственных средств на объем опухоли в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека LUN#2441-118.

[0174] На фиг.10 представлен эффект различных тестируемых лекарственных средств на объем опухоли в модели PDX для рака легкого человека LUN#2210-106.

#### **Подробное описание вариантов осуществления**

[0175] Варианты осуществления изобретения подробно описаны ниже с помощью примеров. Однако специалистам в данной области будет понятно, что приведенные ниже примеры используются только для иллюстрации изобретения, а не для ограничения объема изобретения. Варианты осуществления без конкретных условий в примерах, как правило, осуществляются в общепринятых условиях или условиях, рекомендованных изготовителями. Реагенты или устройства, используемые без указания изготовителей, во всех случаях являются общепринятыми продуктами, которые могут быть приобретены коммерчески.

[0176] В рамках изобретения все научные и технические термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, хорошо понятные специалистам в данной области, если нет иных конкретных указаний. Кроме того, термины, касающиеся химии белков и нуклеиновых кислот, молекулярной биологии, культуры клеток и тканей, микробиологии, иммунологии и лабораторных методик, используемые в настоящем описании, во всех случаях являются терминами и рутинными методиками, широко используемыми в соответствующей области. Более того, определения и пояснения соответствующих терминов приведены ниже для лучшего понимания изобретения.

**[0177]** Если нет иных указаний, в рамках изобретения любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или числовой диапазон подразумевает включение любого целого числа из указанного диапазона и, когда это целесообразно, дробных величин из указанного диапазона.

**[0178]** Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, относится к молекуле иммуноглобулина, обычно состоящей из двух пар идентичных полипептидных цепей, где каждая пара имеет "легкую" (L) цепь и "тяжелую" (H) цепь. Легкие цепи антитела могут быть подразделены на две категории:  $\kappa$  и  $\lambda$ . Тяжелые цепи могут быть подразделены на пять категорий:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  или  $\epsilon$ . В соответствии с различием тяжелых цепей, антитела могут быть разделены на пять категорий: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В легких и тяжелых цепях переменные и константные области соединены областью "J" приблизительно из 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь также имеет область "D" приблизительно из 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) и константной области тяжелой цепи ( $C_H$ ). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ ). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи ( $V_L$ ) и константной области легкой цепи ( $C_L$ ). Константная область легкой цепи состоит из одного домена,  $C_L$ . Константные области антитела могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компонент C1q системы комплемента.  $V_H$  и  $V_L$  также могут быть подразделены на высоковарибельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), между которыми находятся более консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из, от N-конца к C-концу, трех CDR и четырех FR, расположенных в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области ( $V_H$  и  $V_L$ ) каждой пары тяжелая цепь/легкая цепь образуют связывающий центр антитела, соответственно. Отнесение аминокислоты к каждой области или структурному домену осуществляется в соответствии с определением Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342:878-883.

**[0179]** Вариант моноклонального антитела, описанный в настоящем описании, может быть получен посредством традиционных способов генной инженерии. Специалистам в данной области хорошо знакомы способы модификации молекул ДНК с использованием мутаций нуклеиновых кислот. Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие варианты тяжелой цепи и легкой цепи, также могут быть получены посредством химического синтеза.

**[0180]** В рамках настоящего изобретения алгоритмы, используемые для определения идентичности последовательностей (гомология) и процентного сходства последовательностей, представляют собой, например, алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, соответственно, описанные Altschul et al., (1977) *Nucl. Acid. Res.* 25: 3389-3402 и Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. BLAST и BLAST2.0 могут использоваться для

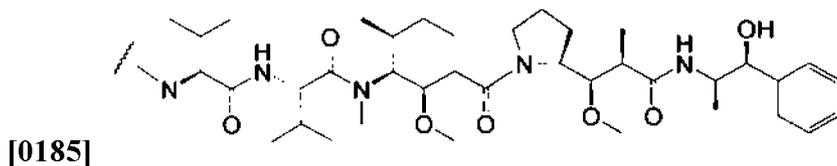
определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей по настоящему изобретению с использованием, например, параметров, описанных в ссылках, или параметров по умолчанию. Программное обеспечение, используемое для проведения анализа BLAST, является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации.

**[0181]** Как описано в настоящем описании, указанная аминокислотная последовательность, обладающая по меньшей мере 70% идентичностью с некоторой аминокислотной последовательностью, включает полипептидную последовательность, которая по существу идентична указанной аминокислотной последовательности, например, последовательности, обладающие идентичностью по меньшей мере 70%, предпочтительно по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше с полипептидной последовательностью по изобретению при использовании способов, описанных в настоящем описании (таких как анализ BLAST с использованием стандартных параметров).

**[0182]** Мутант указанной аминокислотной последовательности, как используют в рамках изобретения, относится к последовательности, которая обладает идентичностью более 70%, как например, более 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, с указанной аминокислотной последовательностью, такой как последовательность, имеющая три, две или одну замену, делецию или вставку аминокислот. Предпочтительно, не более трех аминокислот заменено, вставлено или удалено. Более предпочтительно, не более двух аминокислот заменено, вставлено или удалено. Наиболее предпочтительно, не более одной аминокислоты заменено, вставлено или удалено.

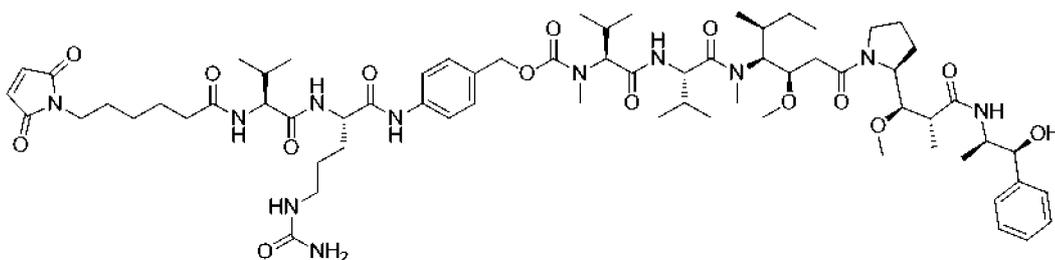
**[0183]** Вариант "с заменой" представляет собой вариант, в котором по меньшей мере один аминокислотный остаток в нативной последовательности удален и отличающийся аминокислотный остаток встроен в то же положение. Замены могут быть единичными, где в молекуле заменена только одна аминокислота, или множественными, где в одной молекуле заменено две или более аминокислот. Множественные замены могут быть внесены в соседние участки. Аналогично, одна аминокислота может быть заменена несколькими остатками, где такие варианты включают как замены, так и инсерции. Вариант с "инсерцией" (или "вставкой") представляет собой вариант, в котором одна или несколько аминокислот встроены в конкретном положении непосредственно рядом с нативной последовательностью. Непосредственно рядом с аминокислотой означает присоединение к альфа-карбоксильной или альфа-амино функциональной группе аминокислоты. Вариант с "делецией" представляет собой вариант, в котором одна или несколько аминокислот в нативной аминокислотной последовательности удалены. Как правило, делеционные варианты имеют делецию одной или двух аминокислот в конкретной области их молекулы.

**[0184]** В рамках настоящего изобретения структура ММАЕ представляет собой



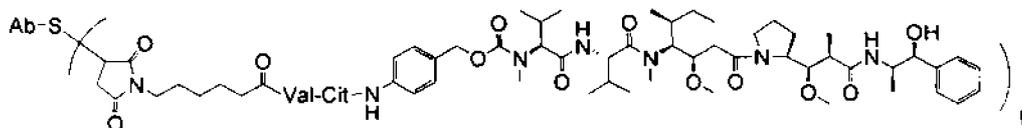
[0186] В рамках настоящего изобретения в формуле I L представляет собой MC-vc-PAB, D представляет собой MMAE, то есть, в случае, где L-D представляет собой MC-vc-PAB-MMAE, его структура соответствует:

[0187]



[0188] В рамках настоящего изобретения антитело Ab против EGFR соединено с L-D через тиол, образовавшийся после восстановления его собственной дисульфидной связи. Например, в случае, где L-D представляет собой MC-vc-PAB-MMAE, структура после соединения Ab с L-D соответствует:

[0189]



[0190] В рамках настоящего изобретения соотношение лекарственного средства и антитела (DAR) или лекарственная нагрузка обозначается как  $p$ , т.е. среднее количество модулей лекарственного средства (т.е. цитотоксических агентов) на антитело в молекуле формулы I:  $Ab-(L-D)_p$ , которое может представлять собой целое или дробное число. ADC общей формулы I включает совокупность антител, конъюгированных с диапазоном модулей лекарственного средства. Среднее количество модулей лекарственного средства в составе ADC после реакции конъюгации может быть определено общепринятыми способами, такими как масс-спектрометрия, ELISA, НИС и ВЭЖХ. Также может быть определено количественное распределение ADC в отношении  $p$ . В некоторых случаях разделение, очистка и подтверждение однородных ADC с  $p$  определенной величины от ADC с другими DAR могут быть достигнуты такими способами, как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез.

[0191] В определенных вариантах осуществления в реакции конъюгации с антителом конъюгируется менее чем теоретический максимум лекарственных частей. Как правило, антитела не содержат множество свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут соединять лекарственные части; в действительности, большинство тиольных групп цистеина в антителах существуют в качестве дисульфидных

мостиков. В определенных вариантах осуществления антитело может быть восстановлено посредством восстановителя, такого как дитиотреитол (ДТТ) или трис(2-карбоксиил)фосфин (ТСЕР), в частично или полностью восстанавливающих условиях с образованием реакционноспособных тиольных групп цистеина

**[0192]** В рамках настоящего изобретения "лечение" относится к клиническому вмешательству, которое проводится для изменения естественного течения у индивидуума или клетки, подвергаемых лечению, либо для предупреждения, либо в процессе клинической патологии. Желаемые эффекты лечения включают предупреждение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, смягчение каких-либо прямых или непрямых патологических последствий заболевания, предупреждение метастазов, замедление прогрессирования заболевания, смягчение или облегчение болезненного состояния, и устранение или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению используют для отсрочивания возникновения заболевания или нарушения, или для замедления прогрессирования заболевания или нарушения. Описанные выше параметры для оценки успешного лечения и облегчения заболевания могут быть без труда определены с использованием стандартных методик, известных врачам. Для лечения злокачественной опухоли эффективность может быть определена, например, путем оценки времени до прогрессирования заболевания (ТТР) и/или определения частоты ответа (RR).

**[0193]** В рамках настоящего изобретения термин "индивидуум" относится к позвоночным. В некоторых вариантах осуществления позвоночные представляют собой млекопитающих. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, сельскохозяйственных животных (таких как крупный рогатый скот), питомцев (таких как кошки, собаки и лошади), приматов, мышей и крыс. В некоторых вариантах осуществления млекопитающие относятся к людям.

**[0194]** В рамках настоящего изобретения "эффективное количество" относится к количеству, эффективному для достижения желаемого терапевтического или профилактического эффекта в необходимой дозе и момент времени. "Терапевтически эффективное количество" вещества/молекулы по настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса тела индивидуума, и способность вещества/молекулы индуцировать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также охватывает количество, в котором какие-либо токсичные и неблагоприятные последствия вещества/молекулы перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в необходимой дозе и в течение необходимого времени, для достижения желаемого профилактического эффекта. Обычно, но не обязательно, профилактически эффективное количество является меньшим, чем терапевтически эффективное количество, поскольку профилактическую дозу вводят индивидууму до возникновения заболевания или на ранней стадии заболевания. В случае злокачественной опухоли терапевтически эффективное количество лекарственного

средства уменьшает количество злокачественных клеток; уменьшает размер опухоли; ингибирует (т.е. замедляет до некоторой степени, предпочтительно останавливает) инфильтрацию злокачественных клеток в окружающие органы; ингибирует (т.е. замедляет до некоторой степени, предпочтительно останавливает) метастазирование опухоли; ингибирует рост опухоли до некоторой степени и/или облегчает один или несколько симптомов, ассоциированных со злокачественной опухолью, до некоторой степени.

**[0195]** Для предупреждения или лечения заболевания подходящая дозировка конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению (когда его используют отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтические средства) зависит от типа подвергаемого лечению заболевания, типа конъюгата антитело-лекарственное средство, тяжести и прогрессирования заболевания, введения конъюгата антитело-лекарственное средство для профилактических или терапевтических целей, предшествующих способов терапии, клинического анамнеза пациента и реактивности конъюгата антитело-лекарственное средство, и мнения лечащего врача. В подходящем случае конъюгат антитело-лекарственное средство вводят пациенту либо однократно, либо путем серии введений.

**[0196]** В рамках настоящего изобретения термин "синергический" относится к наблюдаемым последствиям возникновения такого эффекта (например, ингибирование роста опухоли, длительная выживаемость и т.д.) при комбинированном введении компонентов или средств (например, комбинированное введение конъюгата антитело-лекарственное средство, такого как МУК-3, и антитела против PD-1, такого как АК103, или антитела против PD-L1), который превышает эффект, который ожидался бы, исходя из аддитивных свойств или эффектов индивидуальных компонентов. В некоторых вариантах осуществления синергический эффект определяют путем проведения анализа Блисса (см., например, Fouquier et al., *Pharmacol. Res. Perspect.* (2015)3(3): e00149, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для всех целей). Модель независимости Блисса предполагает, что эффект лекарственного средства является результатом вероятностного процесса, и что лекарственные средства действуют полностью независимо (т.е. лекарственные средства не препятствуют друг другу (например, лекарственные средства имеют разные участки действия), но каждое из них вносит вклад в общий результат). Согласно модели независимости Блисса, ожидаемый эффект комбинирования двух лекарственных средств вычисляют с использованием следующего уравнения:

$$\mathbf{[0197] } E_{AB} = E_A + E_B - E_A \times E_B,$$

**[0198]** где  $E_A$  и  $E_B$  обозначают эффекты лекарственных средств А и В, соответственно, в то время как  $E_{AB}$  обозначает эффект комбинации лекарственных средств А и В. Когда наблюдаемый эффект комбинации превышает ожидаемый эффект  $E_{AB}$ , комбинация двух лекарственных средств считается синергической. Когда наблюдаемый эффект комбинации равен  $E_{AB}$ , комбинация двух лекарственных средств считается

аддитивной. Альтернативно, когда наблюдаемый эффект комбинации ниже, чем эффект  $E_{AB}$ , комбинация двух лекарственных средств считается антагонистической.

**[0199]** Наблюдаемый эффект комбинации лекарственных средств может быть основан, например, на индексе TGI индивидуума или группы индивидуумов, размере опухоли (например, объем, масса), абсолютном изменении размера опухоли (например, объем, масса) между двумя или более моментами времени (например, между первым днем введения лекарственного средства и конкретным количеством дней после первого введения лекарственного средства), скорости изменения размера опухоли (например, объем, масса) между двумя или более моментами времени (например, между первым днем введения лекарственного средства и конкретным количеством дней после первого дня введения лекарственного средства) или времени выживания. Когда индекс TGI используют в качестве показателя наблюдаемого эффекта комбинации лекарственных средств, индекс TGI может быть определен в один или несколько моментов времени. Когда индекс TGI определен в два или более моментов времени, в некоторых для определения наблюдаемого эффекта может использоваться среднее или срединное значение нескольких индексов TGI. Более того, индекс TGI может быть определен у индивидуума или в группе индивидуумов. Когда индекс TGI определяют в группе, в качестве показателя наблюдаемого эффекта может использоваться средний или срединный индекс TGI в группе (например, в один или несколько моментов времени). Когда размер опухоли или скорость роста опухоли используют в качестве показателя наблюдаемого эффекта, размер опухоли или скорость роста опухоли могут быть определены у индивидуума или в группе индивидуумов. В некоторых случаях средний или срединный размер опухоли или скорость роста опухоли определяют для индивидуума в два или несколько моментов времени или для группы индивидуумов в один или несколько моментов времени. Когда время выживания определяют в группе, в качестве показателя наблюдаемого эффекта можно использовать среднее или срединное время выживания.

**[0200]** "Фармацевтически приемлемый носитель", как используют в рамках изобретения, как правило, включает фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клеток или млекопитающих, которые подвергаются их воздействию, в используемых дозах и концентрациях. Как правило, физиологически приемлемые носители относятся к водным pH-буферным растворам. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфаты, цитраты и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу или декстрин; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™,

полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICS™.

**[0201]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль неорганической кислоты или соль органической кислоты, где соль неорганической кислоты представляет собой гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, нитрат, бикарбонат, карбонат, сульфат или фосфат, соль органической кислоты представляет собой формиат, ацетат, пропионат, бензоат, малеат, фумарат, сукцинат, тарترات, цитрат, аскорбат,  $\alpha$ -кетоглутарат,  $\alpha$ -глицерофосфат, алкилсульфонат или арилсульфонат; предпочтительно, алкилсульфонат представляет собой метансульфонат или этансульфонат; арилсульфонат представляет собой бензолсульфонат или п-толуолсульфонат.

**[0202]** Фармацевтически приемлемые соли могут быть получены с использованием стандартных методик, хорошо известных в данной области, например, путем реакции достаточного количества основного соединения с подходящей кислотой, которая предоставляет фармацевтически приемлемый анион.

**[0203]** В рамках настоящего изобретения сольваты относятся к следующим формам конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению: комплексы в твердой или жидкой форме, образованные путем координации конъюгатов антитело-лекарственное средство с молекулами растворителя. Гидраты являются определенной формой сольватов, которые имеют скоординированные молекулы воды. В рамках настоящего изобретения гидраты являются предпочтительными сольватами.

**[0204]** В рамках настоящего изобретения сверхэкспрессия EGFR относится к повышению уровня экспрессии EGFR по сравнению с уровнем экспрессии EGFR на поверхности нормальных эпителиальных клеток. Она может быть разделена на высокую экспрессию, среднюю экспрессию и низкую экспрессию (Wild, R., et al., *Mol. Cancer Res* 2006:5(1), p104-113, Cetuximab preclinical antitumor activity (monotherapy and combination based) is not predicted by relative total or activated epidermal growth factor receptor tumor expression levels).

**[0205]** В рамках настоящего изобретения 20 общепринятых аминокислот и их сокращенные обозначения соответствуют общепринятому применению. См. *Immunology-A Synthesis* (вторая версия, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки.

**[0206]** МУК-3 представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), который образован посредством конъюгации моноклонального антитела против EGFR (BA03) и мощного цитотоксического низкомолекулярного лекарственного средства MMAE (метилауристатин E) через линкер vc (т.е. 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил, также известный как MC-vc-PAV). Путем связывания с рецептором EGFR на поверхности опухолевых клеток происходит эндоцитоз МУК-3 и высвобождение MMAE, тем самым блокируя различные клеточные физиологические функции, вовлекающие тубулин, включая митоз, и, кроме того, ингибируя пролиферацию опухолевых клеток и вызывая гибель опухолевых клеток.

[0207] АК103 является лекарственным средством на основе моноклонального антитела против PD-1 и ингибитором иммунной точки контроля. Путем блокирования сигнального пути PD-1/PD-L1 происходит повышение активации Т-клеток и активация эндогенного противоопухолевого иммунного ответа, тем самым демонстрируя терапевтический эффект против опухолей.

[0208] Антитело ВА03 в настоящей заявке представляет собой ВА03 патентной заявки Китая CN103772504А. Для способа его получения см. пример 3 в указанной патентной заявке. Последовательности каждой части антитела являются следующими:

[0209] последовательность варибельной области тяжелой цепи представляет собой:

[0210]

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSNYDVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSSGNTD  
YNTPFTRLTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARALDYDYEFAYWGQGLT  
VSS (SEQ ID NO: 1).

[0211] В последовательности подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) и CDR3 (SEQ ID NO: 7), соответственно;

[0212] части без подчеркивания представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 8), FR2 (SEQ ID NO: 9), FR3 (SEQ ID NO: 10) и FR4 (SEQ ID NO: 11), соответственно.

[0213] Последовательность варибельной области легкой цепи представляет собой:

[0214]

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGIPSRFS  
GSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQNNEWPTSGGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 2).

[0215] В последовательности подчеркнутые части представляют собой CDR1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 13) и CDR3 (SEQ ID NO: 14), соответственно;

[0216] части без подчеркивания представляют собой FR1 (SEQ ID NO: 15), FR2 (SEQ ID NO: 16), FR3 (SEQ ID NO: 17) и FR4 (SEQ ID NO: 18), соответственно.

[0217] Последовательность константной области тяжелой цепи представляет собой:

[0218]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3).

[0219] Последовательность константной области легкой цепи представляет собой:

[0220]

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4).

[0221] Настоящее изобретение дополнительно объяснено ниже с помощью конкретных примеров, однако эти примеры не ограничивают объем настоящего изобретения.

[0222] Следует отметить, что в настоящем описании и приведенных ниже примерах ADC-3 или MRG003 относится к МУК-3.

Пример 1: Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство

10 мг антитела ВА03 подвергали замене буфера на восстанавливающий буфер (25 mM борат натрия, pH 8,0, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA) с использованием 15-мл устройства для ультрафильтрации, 30 кДа, всего три раза (конечный объем составлял приблизительно 1 мл), переносили в новую центрифужную пробирку Eppendorf (взвешенную) и взвешивали. Проводили детекцию концентрации белка и вычисляли общее количество белка. К антителу добавляли в 2,5 раза большее молярное количество DTT, смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч и тщательно перемешивали. Смесь подвергали замене буфера на буфер для присоединения (50 mM Tris, pH 7,2, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) с использованием 15-мл устройства для ультрафильтрации, 30 кДа, всего три раза. Концентрированный раствор отбирали, подвергали измерению концентрации белка при A280 и взвешивали, и вычисляли общее количество белка. 10 мкл образца отбирали для определения количества свободных тиольных групп с использованием теста Элмана;

и молярную концентрацию свободных тиольных групп вычисляли по следующей формуле:

$$C_{\text{тиол}} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 14153} \text{ ( M )}$$

b: длина оптического пути кюветы (обычно 1 см).

Количество моль свободных тиольных групп вычисляли на основе молярной концентрации свободных тиольных групп и объема общего раствора белка.

К восстановленному антителу добавляли *vc*-ММАЕ (приобретен у Shanghai Naoyuan Chemexpress Co., Ltd., каталожный номер № HY-15575) (растворенный в DMSO), в количестве, в 1,1 раза превышающем количество свободных тиольных групп, и смесь хорошо перемешивали для реакции при комнатной температуре в течение 2 ч при периодическом перемешивании. В реакционную систему добавляли N-ацетилцистеин в количестве, в 20 раз превышающем количество *vc*-ММАЕ. Реакционную смесь хорошо перемешивали и позволяли ей стоять в течение 5 мин. Смесь подвергали замене буфера на исходный раствор для конъюгата (20 mM Na-цитрат, 0,3% NaCl, 5% трегалоза, 0,05% Tween-80, pH 6,0) с использованием 15-мл устройства для ультрафильтрации, 30 кДа, всего три раза, с получением конъюгата антитело-лекарственное средство МУК-3. Образец хранили при 4°C.

Определение соотношения лекарственного средства и антитела:

Полученный конъюгат антитело-лекарственное средство анализировали посредством HIC-BЭЖХ (Jun Ouyang, Drug-To-Antibody (DAR) Ratio and Drug Distribution by Hydrophobic Interaction Chromatography and Reverse Phase High Performance Chromatography, Laurent Ducry (ed.), Antibody Drug Conjugates, Chapter 17, Methods in Molecular Biology, Vol 1045, p275-283) для определения соотношения лекарственного средства и антитела (DAR). Как показано на фиг.1 среднее DAR, вычисленное на основе площади пика спектра, составило 4,1.

Пример 2. Активность МҮК-3 в отношении уничтожения *in vitro* клеточных линий с мутациями EGFR

Для исследования эффекта МҮК-3 в отношении уничтожения клеточных линий с мутациями EGFR было выбрано две клеточных линии рака легкого человека, NCI-H1975 и NCI-H1650, с разными мутациями EGFR, и эффекты МҮК-3 и коммерческого эталонного лекарственного средства Эрбитукса® в отношении уничтожения определяли способом ингибирования пролиферации клеток с использованием тест-реагента ССК-8. Результаты исследования представлены в таблице 1 и на фиг.2-3.

Таблица 1. Эффекты МҮК-3 и Эрбитукса® в отношении уничтожения двух клеточных линий с разными мутациями EGFR

| Клеточная линия | Источник ткани               | Уровень экспрессии EGFR | Участок мутации | IC <sub>50</sub><br>(Среднее значение±SD, нг/мл) |           |
|-----------------|------------------------------|-------------------------|-----------------|--|-----------|
|                 |                              |                         |                 | МҮК-3  | Эрбитукс® |
| NCI-H1975       | NSCLC                        | Умеренная экспрессия    | L858R/T790 M    | 3,0±0,7  | ND        |
| NCI-H1650       | Бронхоальвеолярная карцинома | Умеренная экспрессия    | DelE746-A750    | 3,0*10 <sup>3</sup> ±7,9*10 <sup>2</sup>         | ND        |

Примечание: для уровней экспрессии EGFR и участков мутации, см. ссылочные документы. Величина IC<sub>50</sub> представляет собой среднее значение IC<sub>50</sub>, вычисленное для двух 96-луночных планшетов: ND указывает, что наиболее высокое % ингибирование пролиферации составляет менее 50%, так что величина IC<sub>50</sub> не может быть вычислена.

Экспериментальные результаты показывают, что МҮК-3 имеет выраженные эффекты уничтожения клеток в отношении двух клеточных линий рака легкого с разными мутациями EGFR, и эффекты являются значительно лучшими, чем у коммерчески доступного эталонного лекарственного средства Эрбитукс®.

Пример 3. Эффект МҮК-3 в отношении ингибирования опухоли в модели CDX

Модель с ксенотрансплантатом опухолевых клеток человеческого происхождения (модель CDX) представляет собой модель опухоли, созданную с использованием опухолевых клеток человека у иммунодефицитных мышей. Для эффективной оценки эффективности МҮК-3 при будущих клинических показаниях проводили эксперименты в модели CDX с NSCLC человека с мутантным EGFR. Во всех экспериментах использовали коммерчески доступное направленное на EGFR лекарственное средство на основе моноклонального антитела Эрбитукс® в качестве эталонного лекарственного средства для сравнения активности ингибирования опухоли.

Таблица 2: Информация о модели PDX, использованной в фармакодинамических экспериментах *in vivo*

| Модель № | Экспрессия EGFR | Мутация |
|----------|-----------------|---------|
|----------|-----------------|---------|

Мышам Nude подкожно инокулировали клетки рака легкого человека H1975. После того, как опухоли дорастали до 100-200 мм<sup>3</sup>, животных случайным образом распределяли на группы (D0). МҮК-3 вводили в дозах 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг, и показатели ингибирования опухолей на 14 сутки (D14) составили 34%, 128% и 141%, соответственно. В группах доз 1 мг/кг и 3 мг/кг 7 из 8 мышей продемонстрировали частичную регрессию опухоли. К 26 суткам (D25) в группе 1 мг/кг все 5 из 8 мышей все еще имели частичную регрессию опухоли, в то время как в группе 3 мг/кг 5 из 8 мышей имели частичную регрессию опухоли и 2 из 8 мышей имели полную регрессию опухоли. Степень ингибирования опухоли у эталонного лекарственного средства Эрбитукс® (3 мг/кг, в/в) против H1975 составила 82% (D14). Вышеуказанные лекарственные средства хорошо переносились имевшими опухоль мышами. Эффективность АСC-3, вводимого в дозе 1 мг/кг, против H1975 была значительно лучшей, чем у Эрбитукса®, введенного в дозе 3 мг/кг. Результаты эксперимента представлены на фиг.4.

#### Пример 4. Эффект МҮК-3 в отношении ингибирования опухоли в модели PDX

Модель с ксенотрансплантатом опухолевой ткани человеческого происхождения (модель PDX) представляет собой модель опухоли, созданную на иммунодефицитных мышях с использованием опухолевой ткани человека, которая сохраняет гетерогенность, молекулярное разнообразие и гистологические характеристики первичной опухоли в наибольшей степени. Она имеет высокую предсказательную величину для клинического терапевтического эффекта лекарственных средств и в последние годы все больше используется в исследовании злокачественных опухолей (Hidalgo-2014). Для эффективной оценки эффективности МҮК-3 при будущих клинических показаниях, проводили эксперименты в пяти моделях PDX для резистентного к AZD9291 NSCLC человека. Во всех экспериментах использовали коммерчески доступный ингибитор EGFR третьего поколения AZD9291 в качестве эталонного лекарственного средства для сравнения активности ингибирования опухоли. Информация о пяти моделях PDX, использованных в испытании, представлена в таблице 3.

Таблица 3: Информация о моделях PDX, использованных в фармакодинамических экспериментах *in vivo*

| Модель №     | Пол     | Возраст | Патологический<br>диагноз            | Поколение,<br>использованное в<br>экспериментах | в мРНК EGFR             | Участок<br>мутации              | Резистентность<br>к AZD929 |
|--------------|---------|---------|--------------------------------------|---|-------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| LUN#2210-4a  | Мужской | 53      | Аденосквамозная<br>карцинома легкого | P2  | Высокая<br>экспрессия   | CDKN2A/2B,<br>STK11<br>L858R,   | Да                         |
| LUN#2210-106 | Мужской | 53      | Аденосквамозная<br>карцинома легкого | P2  | Высокая<br>экспрессия   | амплификаци<br>я c-Met          | Да                         |
| LUN#2355-128 | Мужской | 49      | Крупноклеточная<br>карцинома легкого | P2  | Высокая<br>экспрессия   | L858R/T790<br>M                 | Да                         |
| LUN#2441-118 | Женский | 49      | Аденосквамозная<br>карцинома легкого | P2  | Умеренная<br>экспрессия | Не доступно                     | Да                         |
| LUN#2005-143 | Мужской | 60      | Аденокарцинома<br>легкого            | P2  | Высокая<br>экспрессия   | L858R,<br>амплификаци<br>я HER3 | Да                         |

1) Исследование эффективности МҮК-3 в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека LUN#2005-143

LUN#2005-143 представляет собой модель PDX для резистентной к AZD9291 аденокарциномы легкого человека (тип NSCLC). Этот эксперимент проводили всего в 4 группах, включая группу носителя (носитель ADC-3), группу введения AZD9291 (5 мг/кг) и группы введения ADC-3 (1 мг/кг и 3 мг/кг). На протяжении всего эксперимента ADC-3 вводили всего четыре раза посредством инъекции в хвостовую вену на 0 сутки, 4 сутки, 8 сутки и 12 сутки, и AZD9291 вводили всего 29 раз, один раз в сутки путем внутривенного введения. Результаты эксперимента представлены на фиг.5. На 29 сутки относительная степень пролиферации опухоли T/C (%) для группы введения AZD9291 (5 мг/кг) составила 36,90% ( $P < 0,0001$ ) со степенью ингибирования роста опухоли TGI% 63,10%; T/C (%) для группы введения ADC-3 (1 мг/кг) составила 69,86% ( $P < 0,001$ ) с TGI% 30,14%; T/C (%) для группы введения ADC-3 (3 мг/кг) составила 25,27% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 74,73%. На 29 сутки в группе ADC-3 (3 мг/кг) наблюдалась полная регрессия опухоли у 1 из 8 животных. С точки зрения массы тела, все животные в протестированных группах лекарственных средств имели хорошую переносимость. Результаты эксперимента показали, что как AZD9291 (5 мг/кг), так и ADC-3 (3 мг/кг) могли значительно ингибировать рост опухоли, и ADC-3 (3 мг/кг) имел лучший эффект ингибирования опухолей, чем AZD9291 (5 мг/кг); ADC-3 (1 мг/кг) продемонстрировал определенную противоопухолевую активность, но не имел выраженного эффекта ингибирования опухолей [T/C (%) > 40%]. В этом эксперименте имевшие опухоль мыши имели хорошую переносимость тестируемых лекарственных средств.

2) Исследование эффективности МҮК-3 в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека LUN#2210-4a

LUN#2210-4a представляет собой модель PDX для резистентной к AZD9291 аденосквамозной карциномы легкого человека. Этот эксперимент проводили всего в 4 группах, включая группу носителя (носитель ADC-3), группу введения AZD9291 (5 мг/кг) и группы введения ADC-3 (1 мг/кг и 3 мг/кг). На протяжении всего эксперимента ADC-3 вводили всего четыре раза посредством инъекции в хвостовую вену на 0 сутки, 4 сутки, 8 сутки и 12 сутки, и AZD9291 вводили всего 28 раз один раз в сутки путем внутривенного введения. Результаты эксперимента представлены на фиг.6. На 28 сутки T/C (%) для группы введения AZD9291 (5 мг/кг) составила 68,99% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 31,01%; T/C (%) для группы введения ADC-3 (1 мг/кг) составила 13,10% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 86,90%; T/C (%) для группы введения ADC-3 (3 мг/кг) составила 0,31% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 99,69%. На 28 сутки в группах введения ADC-3 (1 мг/кг) и ADC-3 (3 мг/кг) наблюдалась полная регрессия опухоли у 1 из 8 животных и 7 из 8 животных, соответственно. Имевшие опухоль мыши имели хорошую переносимость тестируемых лекарственных средств.

3) Исследование эффективности МҮК-3 в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека LUN#2210-106

LUN#2210-106 представляет собой модель PDX для резистентной к AZD9291

аденосквамозной карциномы легкого человека. Этот эксперимент проводили всего в 4 группах, включая группу носителя (носитель ADC-3), группу введения AZD9291 (5 мг/кг) и группы введения ADC-3 (1 мг/кг и 3 мг/кг). На протяжении всего эксперимента ADC-3 вводили всего четыре раза посредством инъекции в хвостовую вену на 0 сутки, 4 сутки, 8 сутки и 12 сутки, и AZD9291 вводили всего 30 раз один раз в сутки путем внутривентрикулярного введения. Результаты эксперимента представлены на фиг.7. На 30 сутки Т/С (%) для группы введения AZD9291 (5 мг/кг) составила 65,31% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 34,69%; Т/С (%) для группы введения ADC-3 (1 мг/кг) составила 55,49% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 44,51%; Т/С (%) для группы введения ADC-3 (3 мг/кг) составила 0,0% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 100,00%. На 30 сутки в группе введения ADC-3 (3 мг/кг) наблюдалась полная регрессия опухоли у 1 из 8 животных. Как можно видеть из результатов экспериментов, ADC-3 (3 мг/кг) мог значительно ингибировать рост опухоли в ходе всего периода эксперимента. ADC-3 (1 мг/кг) мог значительно ингибировать рост опухоли в ходе периода введения; после остановки введения после 4 доз (12 сутки) до окончания эксперимента (30 сутки), хотя и существовала некоторая противоопухолевая активность, отсутствовал выраженный эффект ингибирования опухоли [Т/С (%)>40%]. AZD9291 (5 мг/кг) продемонстрировал определенную противоопухолевую активность в ходе всего периода эксперимента, но не имел выраженного эффекта ингибирования опухолей [Т/С (%)>40%]. Имевшие опухоль мыши имели хорошую переносимость тестируемых лекарственных средств.

4) Исследование эффективности МҮК-3 в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека LUN#2355-128

LUN#2355-128 представляет собой модель PDX для резистентной к AZD9291 крупноклеточной карциномы легкого человека. Этот эксперимент проводили всего в 4 группах, включая группу носителя (носитель ADC-3), группу введения AZD9291 (5 мг/кг), и группы введения ADC-3 (1 мг/кг и 3 мг/кг). На протяжении всего эксперимента ADC-3 вводили всего четыре раза посредством инъекции в хвостовую вену на 0 сутки, 4 сутки, 8 сутки и 12 сутки, и AZD9291 вводили всего 27 раз один раз в сутки путем внутривентрикулярного введения. Период эксперимента составил 27 суток. Результаты эксперимента представлены на фиг.8. На 16 сутки Т/С (%) для группы введения AZD9291 (5 мг/кг) составила 33,61% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 66,39%; Т/С (%) для группы введения ADC-3 (1 мг/кг) составила 45,32% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 54,68%; Т/С (%) для группы введения ADC-3 (3 мг/кг) составила 3,60% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 96,40%, и полная регрессия опухоли наблюдалась у 1 из 8 животных. На 27 сутки полная регрессия опухоли наблюдалась у 1 из 8 животных в группе введения ADC-3 (3 мг/кг). Результаты эксперимента показали, что как AZD9291 (5 мг/кг), так и ADC-3 (3 мг/кг) могли значительно ингибировать рост опухоли и ADC-3 (3 мг/кг) имели лучший эффект ингибирования опухолей, чем AZD9291 (5 мг/кг); ADC-3 (1 мг/кг) продемонстрировал определенную противоопухолевую активность, но не имел выраженного эффекта ингибирования опухолей [Т/С (%)>40%]. Имевшие опухоль мыши имели хорошую переносимость тестируемых лекарственных средств.

5) Исследование эффективности МҮК-3 в модели PDX для резистентного к

## AZD9291 рака легкого человека LUN#2441-118

LUN#2441-118 представляет собой модель PDX для резистентной к AZD9291 аденосквамозной карциномы легкого человека. Этот эксперимент проводили всего в 4 группах, включая группу носителя (носитель ADC-3), группу введения AZD9291 (5 мг/кг) и группы введения ADC-3 (1 мг/кг и 3 мг/кг). На протяжении всего эксперимента ADC-3 вводили всего четыре раза посредством инъекции в хвостовую вену на 0 сутки, 4 сутки, 8 сутки и 12 сутки, и AZD9291 вводили всего 28 раз один раз в сутки путем внутривентрикулярного введения. Период эксперимента составил 28 суток. Результаты эксперимента представлены на фиг.9. На 25 сутки Т/С (%) для группы введения AZD9291 (5 мг/кг) составила 29,35% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 70,65%; Т/С (%) для группы введения ADC-3 (1 мг/кг) составила 5,68% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 94,32%; Т/С (%) для группы введения ADC-3 (3 мг/кг) составила 3,44% ( $P < 0,0001$ ) с TGI% 96,56%. Результаты эксперимента показали, что все из AZD9291 (5 мг/кг), ADC-3(1 мг/кг) и ADC-3 (3 мг/кг) могли значительно ингибировать рост опухоли и ADC-3 (1 мг/кг) и ADC-3 (3 мг/кг) имели значимо лучшую противоопухолевую активность, чем AZD9291 (5 мг/кг) ( $P < 0,05$ ). Имевшие опухоль мыши имели хорошую переносимость тестируемых лекарственных средств.

б) Исследование эффективности MYK-3 и АК103, а также комбинации MYK-3 и АК103 в модели PDX для рака легкого человека LUN#2210-106 у мышей Nu-HSC-NPG

LUN#2210-106 представляет собой модель PDX резистентной к AZD9291 аденосквамозной карциномы легкого человека. Этот эксперимент проводили всего в 4 группах, включая группу носителя (носитель ADC-3), группу введения ADC-3 (1 мг/кг), группу введения АК103 (5 мг/кг) и группу введения ADC-3 (1 мг/кг) + АК103 (5 мг/кг). На протяжении всего эксперимента ADC-3 вводили всего три раза для группы введения единственного лекарственного средства ADC-3 посредством инъекции в хвостовую вену на 0 сутки, 4 сутки и 8 сутки; и АК103 вводили каждые трое суток посредством инъекции в хвостовую вену для группы введения единственного лекарственного средства АК103, всего 8 раз. Для группы введения ADC-3+АК103 ADC-3 вводили три раза и АК103 вводили всего десять раз, и их режимы введения были такими же, как и для групп введения единственного лекарственного средства. Период эксперимента составил 34 дня. Результаты эксперимента представлены на фиг. 10. На 20 сутки Т/С (%) для группы введения ADC-3 (1 мг/кг) составила 13,31% ( $P < 0,05$ ) с TGI% 86,69%; Т/С (%) для группы введения АК103 (5 мг/кг) составила 93,61% ( $P > 0,05$ ) с TGI% 6,39%; Т/С (%) для группы введения ADC-3 (1 мг/кг) + АК103 (5 мг/кг) составила 2,77% ( $P < 0,005$ ) с TGI% 97,23%, и полная регрессия опухоли наблюдалась у 3 из 6 животных. В ходе периода с 20 суток по 34 сутки средний объем опухоли у животных в группе введения ADC-3 (1 мг/кг) постепенно начинал расти (с 184 мм<sup>3</sup> до 893 мм<sup>3</sup>); средний объем опухоли у животных в группе введения ADC-3 (1 мг/кг) + АК103 (5 мг/кг) медленно рос (с 38 мм<sup>3</sup> до 126 мм<sup>3</sup>), и на 34 сутки все еще наблюдалась полная регрессия опухоли у 1 из 6 животных.

Вычисление того, имела ли комбинация ADC-3 и АК103 синергический эффект, проводили в соответствии с уравнением  $E_{AB} = E_A + E_B - E_A \times E_B$ , и задачей было вычисление

TGI%. Ожидаемый  $TGI\% = 0,8669 + 0,0639 - 0,8669 \times 0,0639 = 87,54\%$ . Очевидно, ожидаемый TGI% (87,54%) был меньшим, чем наблюдаемый TGI% (97,23%). Таким образом, стало возможным определить, что комбинация ADC-3 и АК103 имела синергический эффект.

Приведенные выше результаты показали, что, по сравнению с контрольной группой носителя, как ADC-3 (1 мг/кг), так и комбинация ADC-3 (1 мг/кг) и АК103 (5 мг/кг) могли значительно ингибировать рост опухоли, в то время как АК103 (5 мг/кг) не имел очевидного эффекта ингибирования роста опухоли. По сравнению с введением ADC-3 (1 мг/кг) отдельно, та же доза ADC-3 в комбинации с АК103 (5 мг/кг) имела более выраженный противоопухолевый эффект (20 сутки,  $P < 0,05$ ) и продемонстрировала синергический эффект. Имевшие опухоль мыши имели хорошую переносимость тестируемых лекарственных средств.

Результаты тестов эффективности MYK-3 *in vivo* в пяти моделях PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека обобщенно представлены в таблице 4.

Таблица 4: Результаты эффективности *in vivo* МУК-3 (в/в, q4d×4) в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека

| Модель<br>эффективности | Тестируемое<br>лекарственное<br>средство | Доза<br><br>(мг/кг) | Дата<br>вычисления | Относительная                                     | Степень  | Состояние регрессии                   |                                    | Активность<br>ингибирования<br>опухоли |
|-------------------------|--|---------------------|--------------------|---|--|---------------------------------------|------------------------------------|--|
|                         |  |                     |                    | степень<br>пролиферации<br>опухоли<br><br>T/C (%) | ингибировани<br>я роста<br>опухоли<br><br>TGI% | опухоли<br><br>Частичная<br>регрессия | опухоли<br><br>Полная<br>регрессия |  |
| LUN#2005-143            | Носитель<br>(носитель<br>МУК-3)          | /                   | Сутки 29           | 100   | 0  | /                                     | /                                  | /                                      |
|                         | МУК-3                                    | 1                   |                    | 69,86 (P<0,001)                                   | 30,14  | /                                     | /                                  | +                                      |
|                         |  | 3                   |                    | 25,27 (P<0,0001)                                  | 74,73  | /                                     | 1/8                                | +++                                    |
|                         | AZD9291                                  | 5                   |                    | 36,90 (P<0,0001)                                  | 63,10  | /                                     | /                                  | ++                                     |
| LUN#2210-4a             | Носитель<br>(носитель<br>МУК-3)          | /                   | Сутки 28           | 100   | 0  | /                                     | /                                  | /                                      |
|                         | МУК-3                                    | 1                   |                    | 13,10 (P<0,0001)                                  | 86,90  | /                                     | 1/8                                | +++                                    |
|                         |  | 3                   |                    | 0,31 (P<0,0001)                                   | 99,69  | /                                     | 7/8                                | ++++                                   |
|                         | AZD9291                                  | 3                   |                    | 68,99 (P<0,0001)                                  | 31,01  | /                                     | /                                  | +                                      |
| LUN#2210-<br>106        | Носитель<br>(носитель<br>МУК-3)          | /                   | Сутки 30           | 100   | 0  | /                                     | /                                  | /                                      |

|              |                                 |   |          |                   |        |   |     |      |
|--------------|---------------------------------|---|----------|-------------------|--------|---|-----|------|
|              | МҮК-3                           | 1 |          | 55,49 (P<0,0001)  | 44,51  | / | /   | +    |
|              |                                 | 3 |          | 0,0 (P<0,0001)    | 100,00 | / | 1/8 | ++++ |
|              | AZD9291                         | 5 |          | 65,31<br>P<0,0001 | 34,69  | / | /   | +    |
| LUN#2355-128 | Носитель<br>(носитель<br>МҮК-3) | / |          | 100               | 0      | / | /   | /    |
|              | МҮК-3                           | 1 | Сутки 16 | 45,32<br>P<0,0001 | 54,68  | / | /   | +    |
|              |                                 | 3 |          | 3,60 (P<0,0001)   | 96,40  | / | 1/8 | ++++ |
|              | AZD9291                         | 5 |          | 33,61 (P<0,0001)  | 66,39  | / | /   | ++   |
|              | Носитель<br>(носитель<br>МҮК-3) | / |          | 100               | 0      | / | /   | /    |
| LUN#2441-118 | МҮК-3                           | 1 | Сутки 25 | 5,68 (P<0,0001)   | 94,32  | / | /   | ++++ |
|              |                                 | 3 |          | 3,44 (P<0,0001)   | 96,56  | / | /   | ++++ |
|              | AZD9291                         | 3 |          | 29,35 (P<0,0001)  | 70,65  | / | /   | ++   |

Примечание: "/" означает не применимо. Формула для вычисления объема опухоли (TV) представляет собой:  $TV = l \times w^2 / 2$ , где  $l$  и  $w$  обозначают измеренную длину и ширину опухоли, соответственно. На основе результатов измерения вычисляют относительный объем опухоли (RTV) как  $RTV = V_f / V_0$ , где  $V_0$  представляет собой объем опухоли, измеренный в момент времени дозирования группам (т.е. 0 сутки) и  $V_f$  представляет собой объем опухоли, измеренный в последний день. T/C (%) = (RTV группы введения / RTV группы носителя)  $\times$  100%. TGI% = (средний объем опухоли в группе носителя - средний объем опухоли в группе введения) / средний объем опухоли в группе носителя  $\times$  100%. "++++" указывает на T/C (%)  $\geq 0$  и  $\leq 10\%$ . "+++" указывает на T/C (%)  $> 10\%$  и  $\leq 20\%$ . "++" указывает на T/C (%)  $> 20\%$  и  $\leq 40\%$ . "+" указывает на T/C (%)  $> 40\%$ . Активность ингибирования опухоли тестируемыми лекарственными средствами классифицирована на основе T/C (%) при наиболее высокой дозе в моделях.

Результаты тестов эффективности МУК-3 *in vivo* в комбинации с антителом против PD-1 в моделях PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека обобщенно представлены в таблице 5.

Таблица 5: Результаты эффективности *in vivo* МУК-3(в/в, q4d×3) и АК103, а также комбинации МУК-3 и АК103 в модели PDX для резистентного к AZD9291 рака легкого человека

| Модель эффективности | Тестируемое лекарственное средство | Доза (мг/кг) | Дата вычисления | Относительная степень пролиферации и опухоли | Степень ингибирования роста опухоли | Состояние регрессии опухоли |                  | Активность ингибирования опухоли |
|----------------------|------------------------------------|--------------|-----------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|------------------|----------------------------------|
|                      |                                    |              |                 | T/C (%)                                      | TGI%                                | Частичная регрессия         | Полная регрессия |                                  |
| LUN#2210-106         | Носитель (носитель МУК-3)          | /            |                 | 100  | 0                                   | /                           | /                | /                                |
|                      | МУК-3                              | 1            | сутки 20        | 13,31<br>(P<0,005)                           | 86,69                               | /                           | /                | +++                              |
|                      | АК103                              | 5            |                 | 93,61<br>(P>0,005)                           | 6,39                                |                             |                  | +                                |
|                      | МУК-3                              | 1            |                 | 2,77   |                                     |                             |                  |                                  |
|                      | АК103                              | 5            |                 | (P<0,005)                                    | 97,23                               | /                           | 3/6              | ++++                             |

Примечание: "/" означает не применимо. Формула для вычисления объема опухоли (TV) представляет собой:  $TV = l \times w^2 / 2$ , где  $l$  и  $w$  обозначают измеренную длину и ширину опухоли, соответственно. На основе результатов измерения вычисляют относительный объем опухоли (RTV) как  $RTV = V_f / V_0$ , где  $V_0$  представляет собой объем опухоли, измеренный в момент времени дозирования группам (т.е. 0 сутки) и  $V_f$  представляет собой объем опухоли, измеренный в последний день. T/C (%) = (RTV группы введения / RTV группы носителя)  $\times$  100%. TGI% = (средний объем опухоли в группе носителя - средний объем опухоли в группе введения) / средний объем опухоли в группе носителя  $\times$  100%. "++++" указывает на T/C (%)  $\geq 0$  и  $\leq 10\%$ . "+++" указывает на T/C (%)  $> 10\%$  и  $\leq 20\%$ . "++" указывает на T/C (%)  $> 20\%$  и  $\leq 40\%$ . "+" указывает на T/C (%)  $> 40\%$ . Активность ингибирования опухоли тестируемыми лекарственными средствами классифицирована на основе T/C (%) при наиболее высокой дозе в моделях.

Результаты тестов эффективности *in vivo* показали, что в пяти резистентных к AZD9291 моделях PDX (все модели представляли собой NSCLC), МУК-3 продемонстрировал выраженный эффект ингибирования роста опухоли, и имевшие опухоль мыши имели хорошую переносимость МУК-3. Следует отметить, что все эти пять моделей PDX имели среднюю-высокую экспрессию EGFR и были резистентными к AZD9291, и две из них были резистентными к мутациям EGFR.

В резистентных к AZD9291 моделях PDX с мутантным EGFR комбинация МУК-3 и АК103 (антитело против PD-1) продемонстрировала более выраженный эффект ингибирования роста опухоли, чем та же доза единственного лекарственного средства (МУК-3 или PD-1), достигая синергического эффекта. Более того, после прекращения введения до конца эксперимента средний объем опухоли у животных медленно рос, и полная регрессия опухоли все еще наблюдалась у 1 из 6 животных. По сравнению с дозировкой, требуемой для достижения терапевтической эффективности при монотерапии, комбинированную терапию проводили при более низкой дозе МУК-3 или PD-1.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство, фармацевтически приемлемой соли или сольвата конъюгата антитело-лекарственное средство, или сольвата соли, которое представляет собой одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

- 1) получение ингибитора немелкоклеточного рака легкого; и
- 2) получение лекарственного средства для лечения и/или предупреждения немелкоклеточного рака легкого;

где немелкоклеточный рак легкого представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

- 1) резистентного к EGFR-ТКИ немелкоклеточного рака легкого; и
- 2) немелкоклеточного рака легкого с мутантным EGFR, и необязательно немелкоклеточный рак легкого с мутантным EGFR также имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3;

где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы I,

Ab-(L-D)<sub>p</sub>

формула I

где:

Ab обозначает антитело против EGFR, где антитело против EGFR содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 5-7, или их мутанты, и CDR1, CDR2 и CDR3 в вариабельной области легкой цепи, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 12-14, или их мутанты;

L обозначает линкер;

предпочтительно, выбран из группы, состоящей из 6-малеимидокапроила (MC), малеимидопропионила (MP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)валерата (SPP), 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-формила (MCC), N-сукцинимидил(4-йодацетил)аминобензоата (SIAB) и 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонила (MC-vc-PAB);

более предпочтительно, линкер представляет собой 6-малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил (MC-vc-PAB);

D обозначает цитотоксическое средство;

предпочтительно, цитотоксическое средство выбрано из группы, состоящей из токсинов, таких как SN-38, Гемцитабин, Монометилауристатин E (ММАЕ), Монометилауристатин F (ММАF), майтанзиноиды (такие как Майтанзин DM1 и Майтанзин DM4), калихеамицин, MGVA (такой как дуокармицин), доксорубицин, Ригин и дифтерийный токсин, I131, интерлейкины, факторы некроза опухоли, хемокины и наночастицы;

более предпочтительно, цитотоксическое средство представляет собой MMAE;  
 р обозначает 1-9, предпочтительно 2-6, более предпочтительно 3-5.

2. Применение по п.1, где антитело против EGFR имеет один или несколько из следующих признаков:

1) области FR1, FR2, FR3 и FR4 в вариабельной области тяжелой цепи антитела против EGFR, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 8-11, или их мутанты;

2) области FR1, FR2, FR3 и FR4 в вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR, соответственно, включают последовательности, как показано под SEQ ID NO: 15-18, или их мутанты;

3) константная область тяжелой цепи антитела против EGFR выбрана из константных областей IgG, IgM, IgA, IgD и IgA человека или их мутантов;

предпочтительно, IgG выбран из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4; и

4) константная область легкой цепи антитела против EGFR выбрана из константных областей лямбда и каппа человека или их мутантов.

3. Применение по любому из пп. 1-2, где антитело против EGFR имеет один или несколько из следующих признаков:

1) последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела против EGFR включает последовательность, как показано под SEQ ID NO: 1, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 1;

предпочтительно, последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 1;

2) последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR включает последовательность, как показано под SEQ ID NO: 2, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 2;

предпочтительно, последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 2;

3) последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR включает последовательность, как показано под SEQ ID NO: 3, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 3;

предпочтительно, последовательность константной области тяжелой цепи антитела против EGFR представлена под SEQ ID NO: 3; и

4) последовательность константной области легкой цепи антитела против EGFR включает последовательность, как показано под SEQ ID NO: 4, или последовательность, обладающую идентичностью более 70%, предпочтительно более 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, с последовательностью, как показано под SEQ ID NO: 4;

предпочтительно, последовательность константной области легкой цепи антитела

против EGFR представлена под SEQ ID NO: 4.

4. Применение по любому из пп. 1-3, где резистентный к EGFR-ТКИ немелкоклеточный рак легкого имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации EGFR, мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3;

предпочтительно, мутация EGFR представляет собой мутацию в одном или нескольких участках, выбранных из группы, состоящей из: экзона 18, экзона 19, экзона 20 и экзона 21;

более предпочтительно, мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R, T790M, C797S, G719S, L861Q, G719C, G719A, T854A и D761Y.

еще более предпочтительно, мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R и T790M;

наиболее предпочтительно, мутация EGFR представляет собой DelE746-A750, L858R, T790M или двойную мутацию L858R/T790M.

5. Применение по любому из пп. 1-4, где EGFR-ТКИ представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из: осимертиниба (AZD9291), gefитиниба, эрлотиниба, икотиниба, афатиниба, дакотиниба, иматиниба, лапатиниба, назартиниба, роцилетиниба, наковтиниба, вандатаниба, нератиниба, пелитиниба, канертиниба, бригаиниба, РКC412, Gо6976, мавелертиниба, оломутиниба, WZ4002, TAS2913, цетуксимаба, панитумумаба, авитиниба, HS-10296 и TQB3804;

предпочтительно, EGFR-ТКИ представляет собой осимертиниб (AZD9291);

или немелкоклеточный рак легкого выбран из группы, состоящей из аденокарциномы легкого (предпочтительно, бронхоальвеолярная карцинома), плоскоклеточной карциномы легкого, аденосквамозной карциномы легкого и крупноклеточной карциномы легкого.

6. Комбинация лекарственных средств, содержащая:

первое лекарственное средство, причем первое лекарственное средство представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, фармацевтически приемлемую соль или сольват конъюгата антитело-лекарственное средство, или сольват соли; и

второе лекарственное средство, причем второе лекарственное средство представляет собой ингибитор PD-1/PD-L1;

где конъюгат антитело-лекарственное средство определен в любом из пп. 1-3;

предпочтительно, первое лекарственное средство и второе лекарственное средство отделены друг от друга.

7. Комбинация лекарственных средств по п.6, где ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело против PD-1 или антитело против PD-L1;

предпочтительно, антитело против PD-1 является одним или несколькими, выбранными из группы, состоящей из: AK103, Торипалимаба (JS-001), Синтилимаба

(IBI308), Камрелизумаба, Тислелизумаба (BGB-A317), Опдиво или Ниволумаба, Кейтруды или Пембролизумаба, CS1003, серплулимаба (HLX10), АК104, гептанолимаба (GB226), лизумаба (например, LZM009), BAT-1306, SCT-110A, F520, SG001, GLS-010, PDR001, REGN2810 и STI-A1110;

более предпочтительно, антитело против PD-1 представляет собой АК103;

предпочтительно, антитело против PD-L1 представляет собой Дурвалумаб, Атезолизумаб или их комбинацию.

8. Комбинация лекарственных средств по любому из пп. 6-7, где соотношение масс первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 15:1-1:15;

предпочтительно, соотношение масс первого лекарственного средства и второго лекарственного средства составляет 1:1-1:10.

9. Применение комбинации лекарственных средств по любому из пп. 6-8, которое представляет собой одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

1) получения ингибитора немелкоклеточного рака легкого; и

2) получения лекарственного средства для лечения и/или предупреждения немелкоклеточного рака легкого;

где немелкоклеточный рак легкого представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из:

1) резистентного к EGFR-ТКИ немелкоклеточного рака легкого; и

2) немелкоклеточного рака легкого с мутантным EGFR, и необязательно немелкоклеточный рак легкого с мутантным EGFR также имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3.

10. Применение по п.9, где резистентный к EGFR-ТКИ немелкоклеточный рак легкого имеет одно или несколько, выбранных из группы, состоящей из: мутации EGFR, мутации CDKN2A/2B, мутации STK11, амплификации c-Met и амплификации HER3;

предпочтительно, мутация EGFR представляет собой мутацию в одном или нескольких участках, выбранных из группы, состоящей из: экзона 18, экзона 19, экзона 20 и экзона 21;

более предпочтительно, мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R, T790M, C797S, G719S, L861Q, G719C, G719A, T854A и D761Y;

еще более предпочтительно, мутация EGFR представляет собой одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из: DelE746-A750, L858R и T790M;

наиболее предпочтительно, мутация EGFR представляет собой DelE746-A750, L858R, T790M или двойную мутацию L858R/T790M;

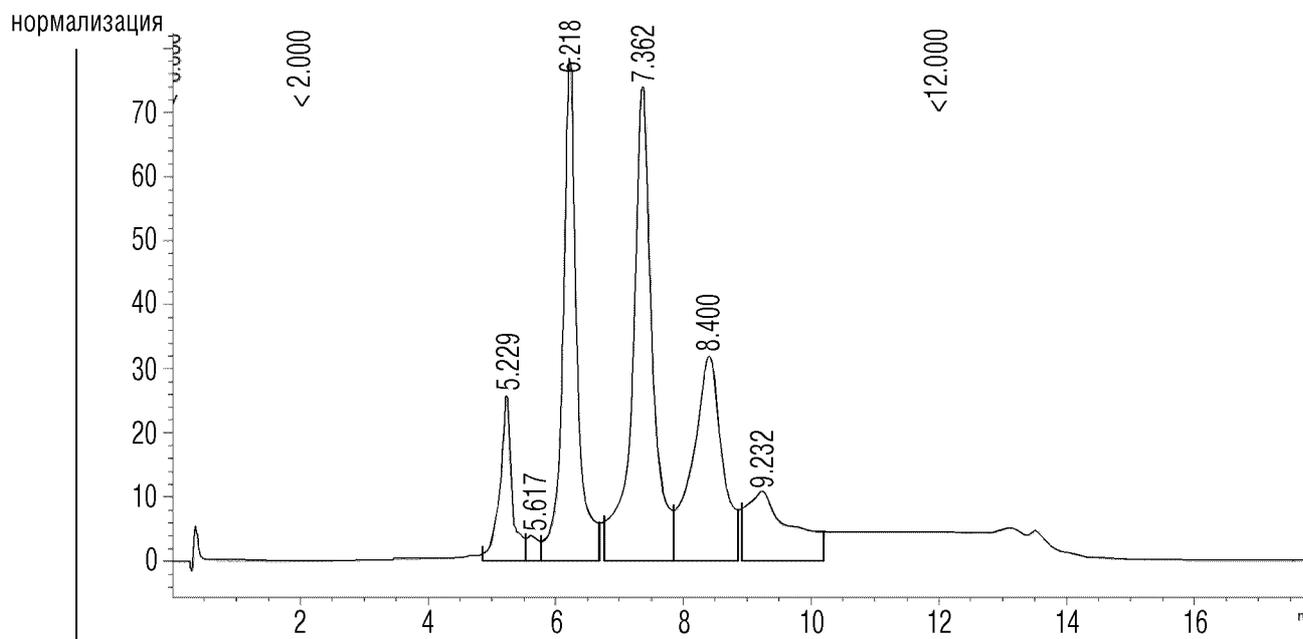
или EGFR-ТКИ представляет собой один или несколько, выбранных из группы, состоящей из: осимертиниба (AZD9291), гефитиниба, эрлотиниба, икотиниба, афатиниба, дакотиниба, иматиниба, лапатиниба, назартиниба, роцилетиниба, наkvотиниба, вандатаниба, нератиниба, пелитиниба, канертиниба, бригатиниба, PKC412, Go6976,

мавелертиниба, олмутиниба, WZ4002, TAS2913, цетуксимаба, панитумумаба, авитиниба, HS-10296 и TQB3804;

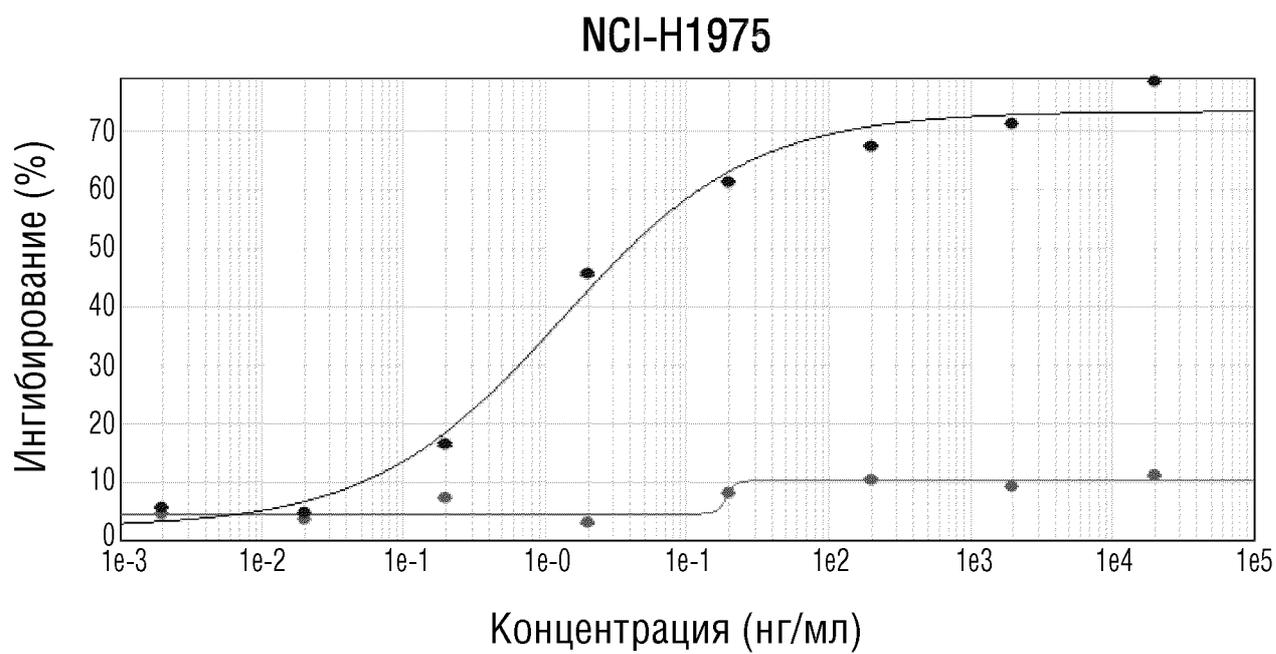
предпочтительно, EGFR-ТКИ представляет собой осимертиниб (AZD9291);

или немелкоклеточный рак легкого выбран из группы, состоящей из аденокарциномы легкого (предпочтительно, бронхоальвеолярная карцинома), плоскоклеточной карциномы легкого, аденосквамозной карциномы легкого и крупноклеточной карциномы легкого.

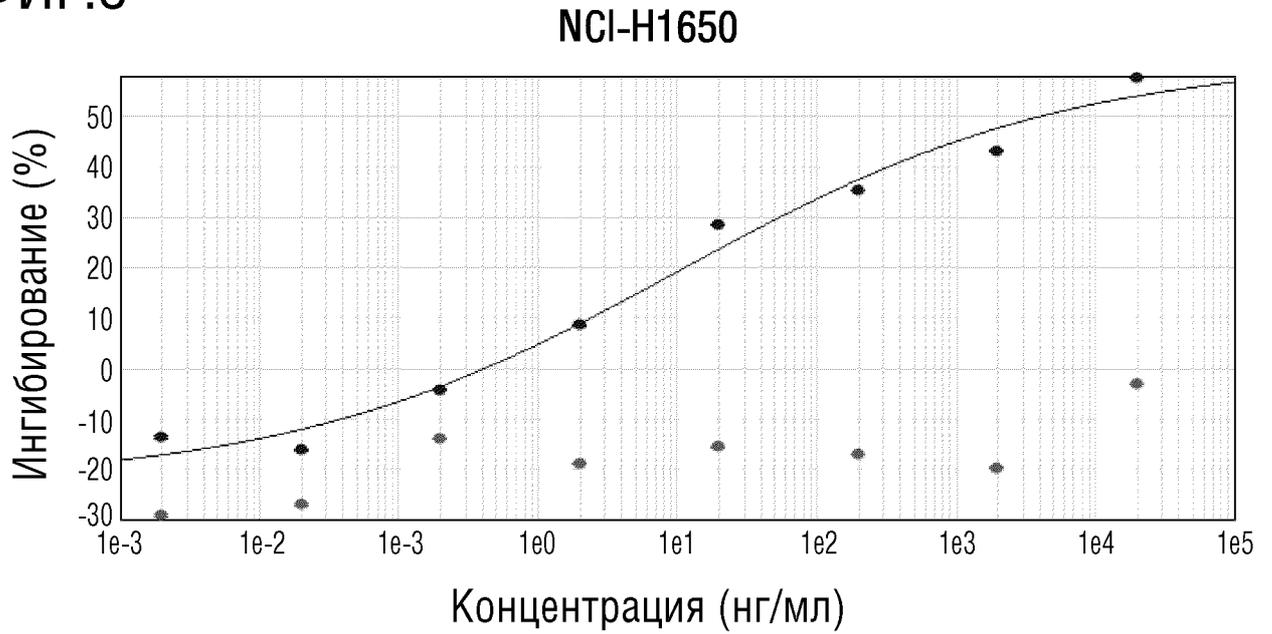
ФИГ.1



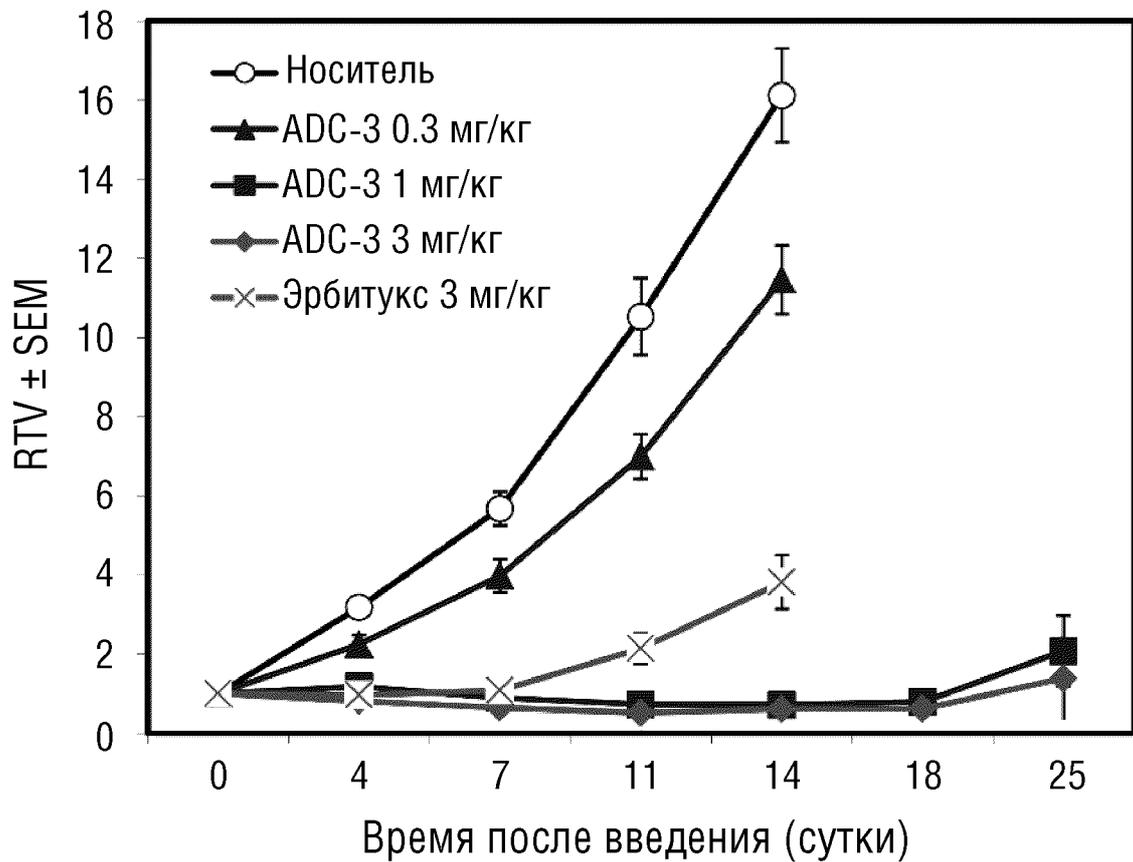
ФИГ.2



ФИГ.3

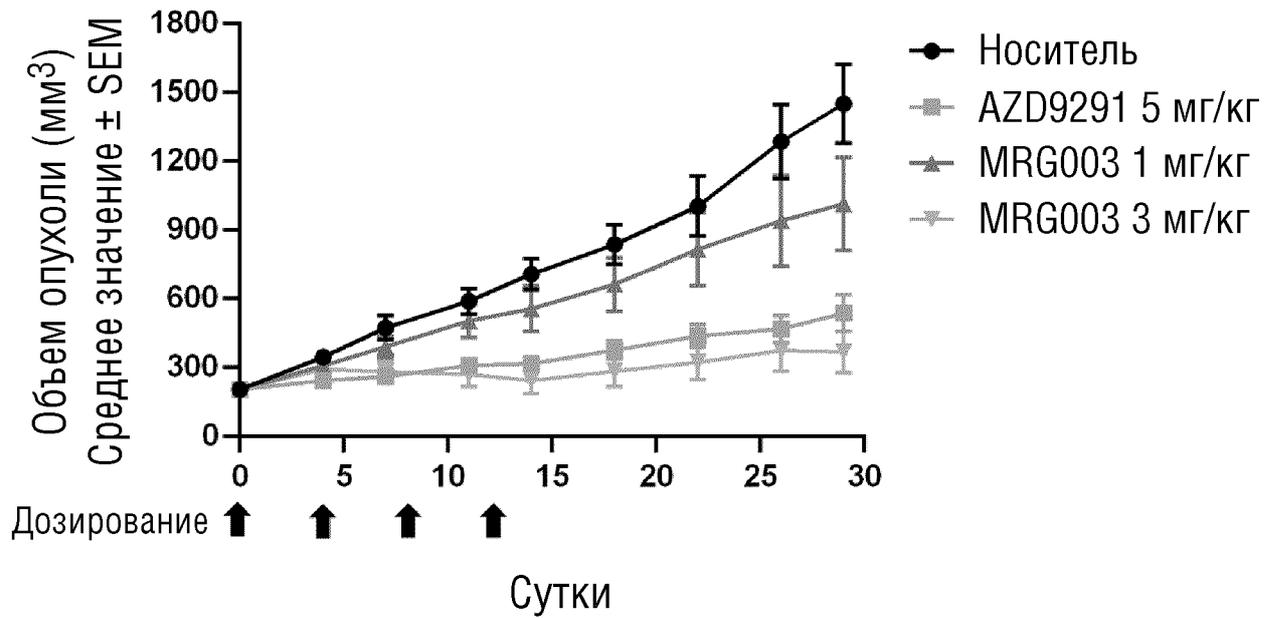


ФИГ.4



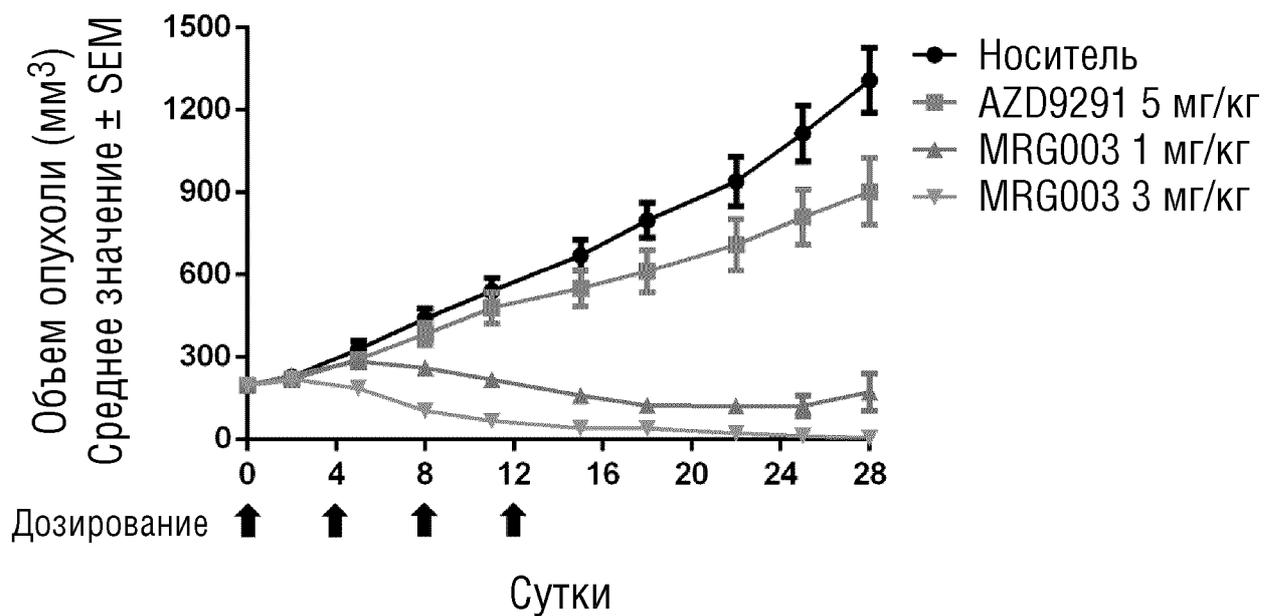
ФИГ.5

LUN#2005-143

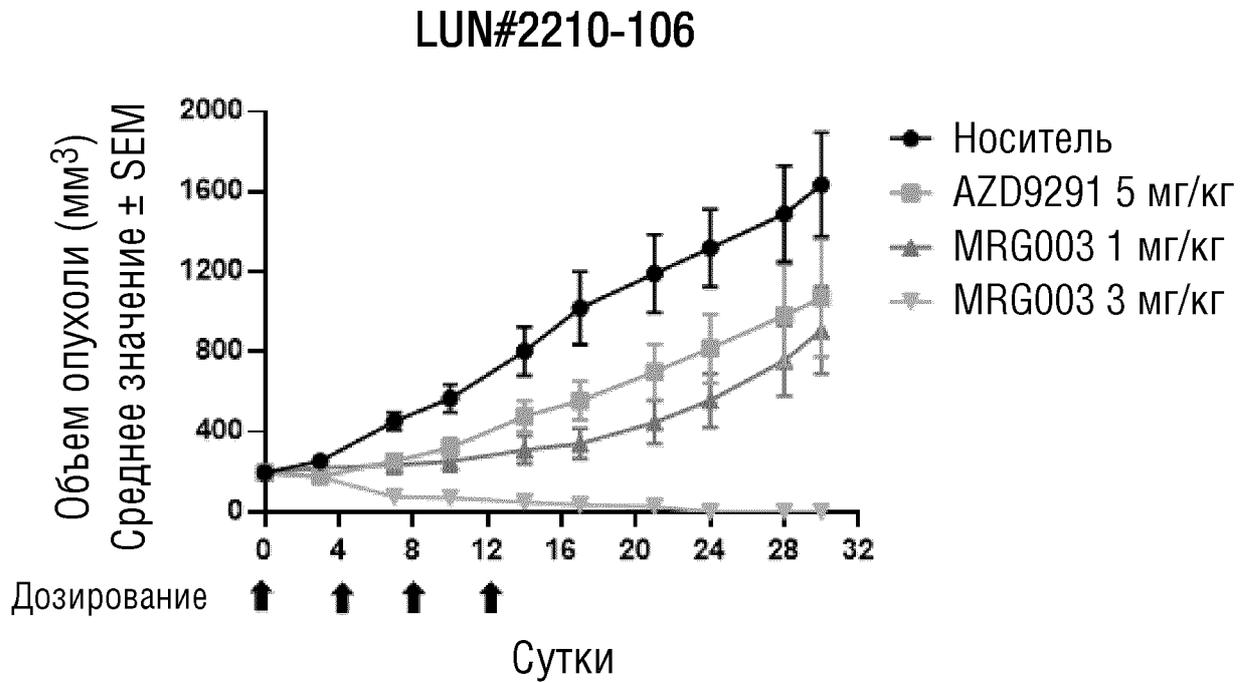


ФИГ.6

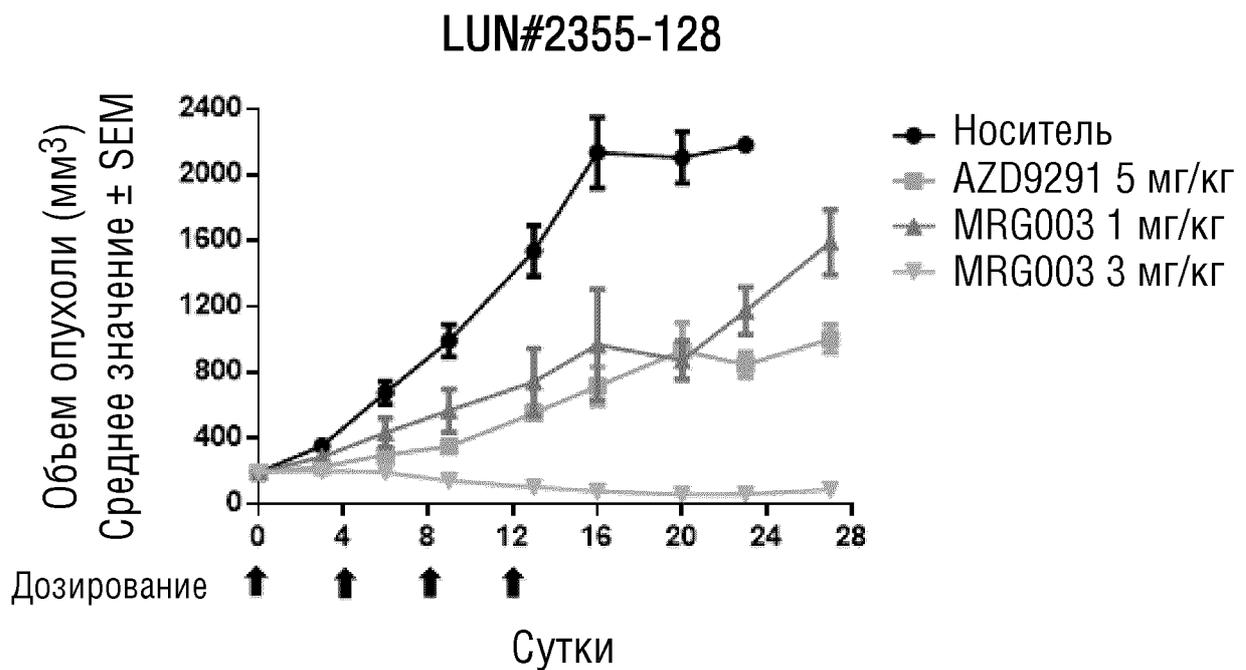
LUN#2210-4a



ФИГ.7

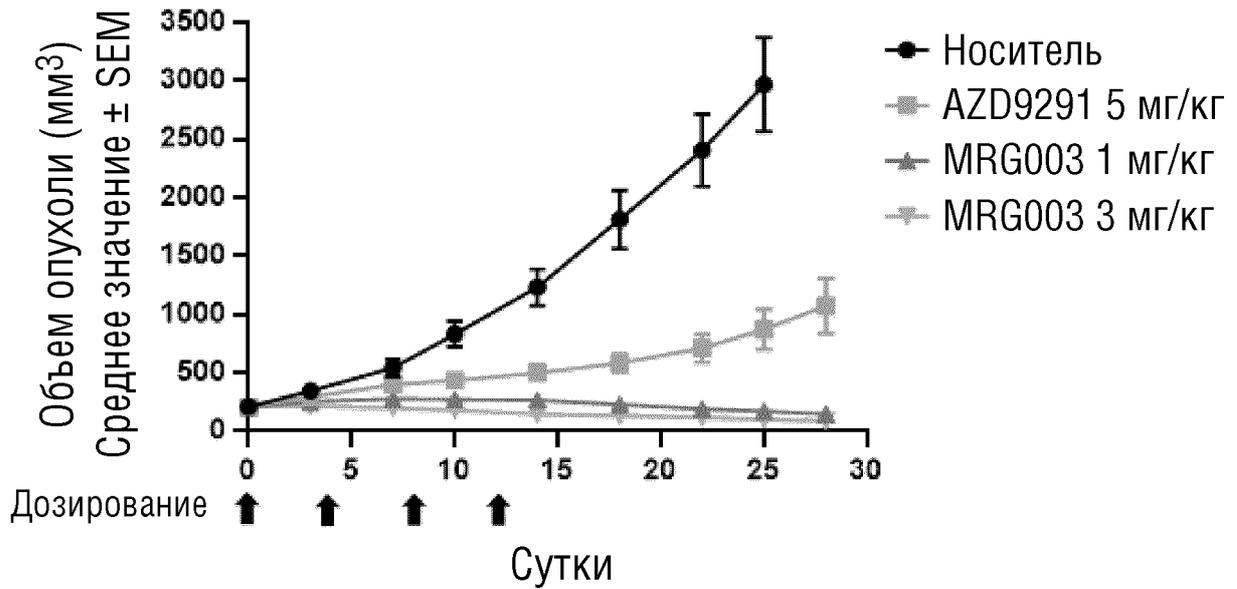


ФИГ.8



ФИГ.9

LUN#2441-118



ФИГ.10

Изменение объема опухоли в LUN#2210-106

