



(19)

Евразийское
патентное
ведомство

(11) 030745

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента: 2018.09.28
(21) Номер заявки: 201590866
(22) Дата подачи: 2013.11.01

(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) КОМБИНАЦИЯ АНТИ-CD20 АНТИТЕЛА И СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА
КИНАЗЫ PI3

(31) 4595/CHE/2012; 61/771,812
(32) 2012.11.02; 2013.03.02
(33) IN; US
(43) 2015.12.30
(86) PCT/US2013/067956
(87) WO 2014/071125 2014.05.08
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТиДжи ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US);
РАЙЗЕН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ СА (CH);
ЛАБОРАТУАР ФРАНСЭ ДЮ
ФРАКСОННЕМЕ Э ДЕ
БИОТЕХНОЛОГИ (FR)

(72) Изобретатель:
Вейсс Майкл, Мискин Хари, Спортельи
Питер (US), Ваккаланка Сваруп К.В.С. (CH)

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

(57) В изобретении предложены высокоэффективные комбинации соединения формулы А (селективного ингибитора PI3Kδ) и анти-CD20 антител для лечения и облегчения заболеваний и расстройств, опосредованных PI3Kδ и/или CD20. В частности, указанная комбинация может быть использована для лечения раковых и аутоиммунных заболеваний. Более конкретно, в изобретении предложена комбинация соединения формулы (А) или его стереоизомеров и ублитуксимаба для лечения и/или облегчения гематологических злокачественных заболеваний, таких как лейкоз и лимфома.

030745

B1

B1

030745

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/771812, поданной 2 марта 2013 г., полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

В настоящем документе предложены высокоеффективные комбинации соединения формулы (A) (селективный ингибитор PI3Kδ) и анти-CD20 антител для лечения и облегчения заболеваний и расстройств, опосредованных PI3Kδ и/или CD20. В частности, указанная комбинация может быть использована для лечения раковых и аутоиммунных заболеваний. Более конкретно, в настоящем изобретении предложена комбинация соединения формулы (A) или его стереоизомеров и убдитуксимаба для лечения и/или облегчения гематологических злокачественных заболеваний, таких как лейкоз и лимфома.

Уровень техники

Существует множество данных, указывающих на то, что каждый из ферментов PI3Kδ и CD20 вносит свой вклад в опухолеобразование при самых разных раковых заболеваниях человека и особенно при гематологических злокачественных заболеваниях. Фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) представляют собой семейство ферментов, регулирующих разнообразные биологические функции со всех типов клеток путем образования фосфоинозитидных молекул - вторичных мессенджеров. Поскольку активность этих фосфоинозитидных вторичных мессенджеров определяется их состоянием фосфорилирования, то киназы и фосфатазы, действующие как модификаторы этих липидов, имеют первостепенное значение для правильного осуществления событий внутриклеточной передачи сигналов. PI3K фосфорилируют липиды по 3-гидроксильному остатку инозитольного кольца (Whitman et al., *Nature*, 332:664 (1988)) с образованием фосфорилированных фосфолипидов (PIP3), которые действуют как вторичные мессенджеры, привлекающие киназы с липидсвязывающими доменами (включая области гомологии плексстрина (PH)), такие как Akt и фосфоинозитид-зависимая киназа-1 (PDK1). Связывание Akt с мембранными PIP3 вызывает транслокацию Akt в плазматическую мембрану, приводя Akt в контакт с PDK1, который отвечает за активацию Akt. Фосфатаза, подавляющая опухоль, PTEN (гомолог фосфатазы и тензина с делецией по десятой хромосоме) дефосфорилирует PIP3 и действует, таким образом, как отрицательный регулятор активации Akt. PI3-киназы Akt и PDK1 являются важными для регуляции многих клеточных процессов, включая регуляцию клеточного цикла, пролиферации, выживания, апоптоза и подвижности, и являются существенными компонентами молекулярных механизмов заболеваний, таких как рак, диабет и иммунное воспаление (Vivanco et al., *Nature Rev. Cancer*, 2:489 (2002); Phillips et al., *Cancer*, 83:41 (1998)).

Семейство PI3K состоит из четырех различных классов: I, II, III и IV. Классы I-III представляют собой липидкиназы, а класс IV представляет собой серин/треонин-протеинкиназы.

Члены класса I семейства PI3K представляют собой димеры регуляторной и каталитической субъединиц. Семейство класса I состоит из четырех изоформ, определяемых каталитическими субъединицами α , β , γ и δ размером 110 кДа. См. Engelman J.A., *Nat. Rev. Genet.*, 7:606-619 (2006); Carnero A., *Curr Cancer Drug Targets*, 8:187-198 (2008) и Vanhaesebrouck B., *Trends Biochem. Sci.*, 30:194-204 (2005). Класс I может быть подразделен на два подкласса: класс 1a, образованный комбинацией p110 α , β и δ с регуляторной субъединицей (p85, p55 или p50); и класс 1b, образованный p110 γ и регуляторными субъединицами p101.

Исследования в отношении путей PI3K и родственных протеинкиназ были опубликованы различными исследовательскими группами, в том числе Liu et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 8:627-644 (2009); Nathan et al., *Mol. Cancer Ther.* 8(1), (2009) и Marone et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784:159-185 (2008). Два известных ингибитора PI3K, LY294002 и вортманнин, являются неспецифическими ингибиторами PI3K, поскольку они не различают указанных четырех членов класса I PI3K: α , β , γ и δ . Для ряда ингибиторов PI3K начаты клинические испытания для лечения раковых заболеваний, при этом в сферу терапевтического интереса входят различные типы рака, в том числе рак молочной железы, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), а также гематологические раковые заболевания.

CD20 представляет собой гидрофобный трансмембранный белок с молекулярной массой 35-37 кДа, который находится на поверхности зрелых В-лимфоцитов. Он экспрессируется во время развития В-лимфоцитов (В-клеток), начиная с ранней пре-В стадии и до дифференцировки на плазмоциты - стадии, на которой прекращается его экспрессия. CD20 присутствует как в нормальных В-лимфоцитах, так и в злокачественных В-клетках, включая большинство неходжкинских В-клеточных лимфом (NHL) и хронических лимфоцитарных лейкозов В-типа (B-CLL). Антиген CD20 не экспрессируется на гематопоэтических стволовых клетках или на плазмоцитах.

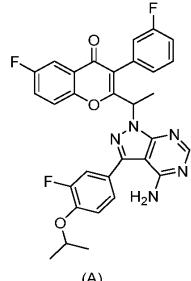
Разработаны и продолжают разрабатываться анти-CD20 антитела для лечения В-клеточных заболеваний. Описаны положительные результаты для анти-CD20 антитела ритуксимаба. Однако существует большое количество пациентов, которые являются невосприимчивыми к лечению ритуксимабом или у которых развивается резистентность в ходе продолжительного лечения ритуксимабом (используемым в качестве монотерапии или даже в комбинации с химиотерапевтическими режимами).

Соответственно, существует необходимость в более эффективных лекарствах для лечения и/или облегчения заболеваний или расстройств, связанных с модулированием ферментов PI3Kδ и/или белка

CD20 и, в частности, для лечения и/или облегчения В-клеточных заболеваний.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к комбинации, содержащей соединение формулы (A), которое представляет собой селективный ингибитор PI3Кδ:



и его стереоизомер, таутомер, фармацевтически приемлемые соли, сольваты и пролекарства; и по меньшей мере одно анти-CD20 антитело.

Указанная комбинация подходит для применения при лечении заболевания, расстройства или состояния, связанного с ферментом PI3Кδ и/или белком CD20, например пролиферативного заболевания, такого как рак. В частности, указанная комбинация подходит для лечения или облегчения В-клеточных заболеваний, например гематологических злокачественных заболеваний.

Так, в некоторых вариантах реализации изобретения предложены способы подавления пролиферации клеточной популяции. В некоторых вариантах реализации способ включает приведение указанной популяции в контакт с комбинацией, содержащей (i) соединение формулы (A), его стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство, (ii) и антитело анти-CD20 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело анти-CD20 или его фрагмент связывается с тем же эпитопом, что и ублитуксимаб.

В некоторых вариантах реализации способ включает приведение клеточной популяции в контакт с комбинацией, содержащей (i) соединение формулы (A), его стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство и (ii) антитело анти-CD20 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело анти-CD20 или его фрагмент демонстрируют высокую аффинность к Fc-γ-RIII (CD16).

В некоторых вариантах реализации способ включает приведение клеточной популяции в контакт с комбинацией, содержащей (i) соединение формулы (A), его стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство и (ii) антитело анти-CD20 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом содержание фукозы в антителе или его фрагменте составляет менее 65%.

В некоторых вариантах реализации способ включает приведение клеточной популяции в контакт с комбинацией, содержащей (i) соединение формулы (A), его стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство и (ii) антитело анти-CD20 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело или его фрагмент содержит область V_H CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей SEQ ID NO: 1, 2 и 3 и область V_L CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей SEQ ID NO: 6, 7 и 8. В некоторых вариантах реализации антитело анти-CD20 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H SEQ ID NO: 4 и V_L SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах реализации антитело анти-CD20 представляет собой ублитуксимаб (ublituximab).

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение формулы (A) представляет собой

(RS)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он;

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он или

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он.

В некоторых вариантах реализации соединение формулы (A) представляет собой (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он.

В некоторых вариантах реализации способ подавления пролиферации клеточной популяции включает приведение указанной популяции в контакт с комбинацией, содержащей:

(i) по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она;

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) по меньшей мере одно антитело анти-CD20 или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах реализации способ подавления пролиферации клеточной популяции включает приведение указанной популяции в контакт с комбинацией, содержащей:

(i) соединение, выбранное из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она;

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) по меньшей мере одно анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом анти-CD 20 антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из антител и их фрагментов, которые связываются с тем же эпипотом, что и убдитуксимаб, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, велтузумаб, GA101, AME-133v, PRO131921, тозитумомаб, hA20 и PRO70769.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанную популяцию приводят в контакт с композицией, содержащей:

(i) соединение, выбранное из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она;

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) анти-CD20 антитело.

В некоторых вариантах реализации изобретения указанную популяцию приводят в контакт:

(i) с первой композицией, содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она;

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) со второй композицией, содержащей анти-CD20 антитело.

В некоторых вариантах реализации популяция содержит В-клетки.

В некоторых вариантах реализации указанная популяция находится в организме субъекта-человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект страдает заболеванием или расстройством, связанным с избыточной пролиферацией В-клеток.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект страдает от рака. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание. В некоторых вариантах реализации гематологическое злокачественное заболевание представляет собой лимфому или лейкоз. В некоторых вариантах реализации гематологическое злокачественное заболевание выбрано из группы, состоящей из острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), множественной миеломы (MM), неходжкинской лимфомы (NHL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), В-клеточной лимфомы и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL). В некоторых вариантах реализации рак сверхэкспрессирует CD20. В некоторых вариантах реализации рак является невосприимчивым к химиотерапии.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект страдает аутоиммунным заболеванием или расстройством. В некоторых вариантах реализации аутоиммунное заболевание или расстройство представляет собой аллергический ринит, астму, хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ) или ревматоидный артрит.

В некоторых вариантах реализации субъект является невосприимчивым к ритуксимабу.

В некоторых вариантах реализации субъект ранее проходил лечение химиотерапией, ритуксимабом или их комбинацией.

В некоторых вариантах реализации (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он и анти-CD20 антитело или его фрагмент вводят последовательно.

В некоторых вариантах реализации (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он и анти-CD20 антитело или его фрагмент вводят одновременно. В некоторых вариантах реализации (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он и анти-CD20 антитело или его фрагмент содержатся в одной фармацевтической композиции. В некото-

рых вариантах реализации (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он и анти-CD20 антитело или его фрагмент содержатся в разных фармацевтических композициях.

В некоторых вариантах способ дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент выбран из группы, состоящей из ингибитора протеосом, бортезомиба (Velcade ®), карфилзомиба (PR-171), PR-047, дисульфирама, лактацистина, PS-519, эпонемицина, эпоксомицина, аклациномицина, СЕР-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341, винилсульфоновых трипептидных ингибиторов, ритонавира, PI-083, (+/-)-7-метиломуралида, (-)-7-метиломуралида, леналидомида и их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере двух дополнительных терапевтических агентов, при этом указанные по меньшей мере два дополнительных терапевтических агента выбраны из группы, состоящей из:

- a) CHOP (циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизон);
- b) R-CHOP (ритуксимаб-CHOP);
- c) гиппер CV AD (гиперфракционированный циклофосфамид, винкристин, доксорубицин, дексаметазон, метотрексат, цитарабин);
- d) R-гиппер CV AD (ритуксимаб-гиппер CV AD);
- e) FCM (флударабин, циклофосфамид, митоксантрон);
- f) R-FCM (ритуксимаб, флударабин, циклофосфамид, митоксантрон);
- g) бортезомиба и ритуксимаба;
- h) темсиролимуса и ритуксимаба;
- i) темсиролимуса и Велкад®;
- j) йод-131 тозитумомаба (Bexxar.RTM.) и CHOP;
- k) CVP (циклофосфамид, винкристин, преднизон);
- l) R-CVP (ритуксимаб-CVP);
- m) ICE (ифосфамид, карбоплатин, этопозид);
- n) R-ICE (ритуксимаб-ICE);
- o) FCR (флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб);
- p) FR (флударабин, ритуксимаб) и
- q) D.T. PACЕ (дексаметазон, талидомид, цисплатин, адриамицин, циклофосфамид, этопозид).

В некоторых вариантах реализации предложены способы истощения В-клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения способ включает приведение композиции, содержащей В-клетки, в контакт:

- (i) по меньшей мере с одним соединением формулы (A), выбранным из группы, состоящей из (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она,
- (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и
- (R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и
- (ii) по меньшей мере с одним анти-CD20 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах реализации предложен способ промотирования апоптоза. В некоторых вариантах реализации указанные способы включают приведение В-клетки в контакт:

- (i) по меньшей мере с одним соединением формулы (A), выбранным из группы, состоящей из (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она;
- (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и
- (R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и
- (ii) по меньшей мере с одним анти-CD20 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах реализации предложены способы промотирования остановки клеточного цикла. В некоторых вариантах реализации указанные способы включают приведение клетки в контакт:

- (i) по меньшей мере с одним соединением формулы (A), выбранным из группы, состоящей из (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она,
- (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и
- (R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) по меньшей мере с одним анти-CD20 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение формулы (A) и анти-CD20 антитело или его фрагмент доставляют последовательно.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение формулы (A) и анти-CD20 антитело или его фрагмент доставляют одновременно. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение формулы (A) и анти-CD20 антитело или его фрагмент доставляют в виде одной композиции. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение формулы (A) и анти-CD20 антитело или его фрагмент доставляют в виде разных композиций.

В настоящем документе предложены также наборы. В некоторых вариантах реализации изобретения набор содержит (i) соединение формулы (A), его стереоизомер, таутомер или фармацевтически приемлемую соль, сольват или пролекарство и (ii) инструкции по применению соединения в комбинации с анти-CD20 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, при этом анти-CD20 антитело или его фрагмент (a) связывается с тем же эпитопом, что и убдитуксимаб, (b) демонстрирует высокую аффинность к Fc- γ -RIII (CD16) или (c) имеет содержание фукозы менее 65%.

В некоторых вариантах реализации набор содержит:

(i) по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она,

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) инструкции по применению соединения в комбинации с анти-CD20 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах реализации набор дополнительно содержит анти-CD20 антитело или фрагмент.

В некоторых вариантах реализации набор содержит (i) по меньшей мере одно анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) инструкции по применению анти-CD20 антитела или его фрагмента в комбинации по меньшей мере с одним соединением, выбранным из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она;

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она,

при этом анти-CD20 антитело или его фрагмент (a) связывается с тем же эпитопом, что и убдитуксимаб, (b) демонстрирует высокую аффинность к Fc- γ -RIII (CD16) или (c) имеет содержание фукозы менее 65%.

В некоторых вариантах реализации набор содержит (i) по меньшей мере одно анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и (ii) инструкции по применению анти-CD20 антитела или его фрагмента в комбинации по меньшей мере с одним соединением, выбранным из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она;

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она.

В некоторых вариантах реализации набор содержит:

(i) соединение, выбранное из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она,

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом анти-CD20 антитело или фрагмент (a) связывается с тем же эпитопом, что и убдитуксимаб, (b) демонстрирует высокую аффинность к Fc- γ -RIII (CD16) или (c) имеет содержание фукозы менее 65%.

В некоторых вариантах реализации набор содержит:

(i) соединение, выбранное из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она,

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело или его фрагмент и указанное соединение находятся в одной композиции.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело или его фрагмент и указанное соединение находятся в разных композициях.

В некоторых вариантах реализации набор дополнительно содержит один или более дополнительных активных агентов.

В настоящем документе предложены также фармацевтические композиции. В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит:

(i) соединение, выбранное из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она,

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит:

(i) соединение, выбранное из группы, состоящей из

2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она,

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она и

(R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом анти-CD20 антитело или фрагмент (a) связывается с тем же эпигопом, что и убдитуксимаб, (b) демонстрирует высокую аффинность к Fc-γ-RIII (CD16) или (c) имеет содержание фукозы менее 65%.

Краткое описание графических материалов/фигур

Фиг. 1: Столбчатые диаграммы, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) и убдитуксимаба на истощение CD19-положительных клеток (слева) и истощение CD20-положительных клеток (справа) в цельной крови человека.

Фиг. 2: Столбчатые диаграммы, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) и убдитуксимаба на LPS-индуцированную пролиферацию CD19-положительных клеток.

Фиг. 3: Столбчатые диаграммы, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) и убдитуксимаба на LPS-индуцированную пролиферацию CD20-положительных клеток.

Фиг. 4: Столбчатые диаграммы, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) и убдитуксимаба на апоптоз клеток Daudi, RPMI-8226, Raji и U266B1.

Фиг. 5: Гистограммы, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) на клеточный цикл в клетках U226B1.

Фиг. 6: Гистограммы, демонстрирующие влияние анти-CD20 антитела на клеточный цикл в клетках U226B1.

Фиг. 7: Гистограммы, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) и анти-CD20 антитела убдитуксимаба на клеточный цикл в клетках U226B1.

Фиг. 8: Гистограммы, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) на клеточный цикл в клетках Raji.

Фиг. 9: Гистограммы, демонстрирующие влияние анти-CD20 антитела на клеточный цикл в клетках Raji.

Фиг. 10: Гистограммы, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) и анти-CD20 антитела убдитуксимаба на клеточный цикл в клетках Raji.

Фиг. 11: Графики активности каспазы 3, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) и убдитуксимаба на апоптоз в клетках LY1.

Фиг. 12: Графики активности каспазы 3, демонстрирующие влияние S-изомера соединения формулы (A) и убдитуксимаба на апоптоз в клетках Raji.

Подробное описание изобретения

I. Определения.

Для облегчения понимания настоящего изобретения ниже представлены некоторые термины и выражения.

Термин "CD20" (известный также как антиген CD20 В-лимфоцитов, MS4A1, антиген В1 поверхности В-лимфоцитов, Bp35, антиген поверхности лейкоцитов Leu-16) относится к нативному CD20, если не указано иное. Термин "CD20" охватывает непроцессированный CD20 "полной длины", а также любую форму CD20, которая образована в результате его процессирования в клетке. Этот термин охватывает также природные варианты CD20, например сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы. Полипептиды CD20, описанные в настоящем документе, могут быть выделены из множества источников, таких как различные типы тканей человека, или из других источников, или могут быть получены рекомбинантными или синтетическими методами. Примеры последовательностей CD20 включают, но не ограничиваются ими, регистрационные номера NCBI NP 068769.2 и NP 690605.1.

Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или их комбинации, по меньшей мере, за счет одного сайта распознавания антигенов в пределах вариабельной области молекулы иммуноглобулина. При использовании в настоящем документе термин "антитело" охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, фрагменты антител (такие как фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv), одноцепочечные мутанты Fv(scFv), полиспецифичные антитела, такие как биспецифичные антитела, образованные по меньшей мере из двух интактных антител, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитные белки, содержащие антиген-определяющую часть антитела, и любые другие модифицированные молекулы иммуноглобулина, содержащие сайт распознавания антигена, в той степени, в какой эти антитела проявляют требуемую биологическую активность. Антитело может быть антителом любого из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) на основании идентичности их константных областей тяжелой цепи, упоминаемых как альфа, дельта, иpsilonон, гамма и мю соответственно. Различные классы иммуноглобулинов имеют различные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть открытыми или сопряженными с другими молекулами, такими как токсины, радиоизотопы, белки и т.д.

"Блокирующее" антитело или антитело "антагонист" представляет собой антитело, которое подавляет или снижает биологическую активность антигена, с которым оно связывается, такого как CD20. В некоторых вариантах реализации изобретения блокирующие антитела или антитела-антагонисты по существу или полностью подавляют биологическую активность антигена. Желательно, чтобы биологическая активность была снижена на 10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 или даже 100%.

Термин "анти-CD20 антитело" или "антитело", которое связывается с CD20" относится к антителу, которое может связывать CD20 с достаточной аффинностью, так что указанное антитело подходит в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на CD20. Степень связывания анти-CD20 антитела с неродственным, не-CD20 белком составляет менее примерно 10% от связывания указанного антитела с CD20 по результатам измерения, например, методом радиоиммунного анализа (RIA). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, которое связывается с CD20, имеет константу диссоциации (Kd), составляющую ≤ 1 мкМ, ≤ 100 , ≤ 10 , ≤ 1 или $\leq 0,1$ нМ.

Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела и относится к антиген-определяющим вариабельным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, линейные антитела, одноцепочечные антитела и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

"Моноклональное антитело" относится к однородной группе антител, участвующих в высокоспецифичном распознавании и связывании одной антигенной детерминанты, или эпитопа. Это определение противоположно поликлональным антителам, которые, как правило, содержат различные антитела, направленные против различных антигенных детерминант. Термин "моноклональное антитело" охватывает интактные полноразмерные моноклональные антитела, а также фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные мутанты (scFv), слитые белки, содержащие часть антитела, и любые другие модифицированные молекулы иммуноглобулина, содержащие сайт распознавания антигена. Кроме того, "моноклональное антитело" относится к таким антителам, которые получены любыми из множества методов, включая, но не ограничиваясь ими, гибридому, фаговую селекцию, рекомбинантную экспрессию и трансгенных животных.

Термин "гуманизированное антитело" относится к формам антител, отличных от человеческих (например, мышьяных), которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулина, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальные нечеловеческие (например, мышьяные) последовательности. Как правило, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины, в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), заменены остатками из CDR нечеловеческих видов (например, мышей, крыс, кроликов, хомяков), которые обладают требуемой специфичностью, аффинностью и способностью (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986);

Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)). В некоторых случаях остатки Fv каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками антитела, отличного от нечеловеческого, которое обладает требуемой специфичностью, аффинностью и способностью. Гуманизированное антитело может быть дополнительно модифицировано замещением дополнительных остатков в каркасной области Fv и/или в замененных нечеловеческих остатках для улучшения и оптимизации специфичности, аффинности и/или способности антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит по существу все по меньшей мере из одного, а обычно двух или трех вариабельных доменов, содержащих все или по существу все области CDR, которые соответствуют нечеловеческому иммуноглобулину, при этом все или по существу все области FR представляют собой области FR консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Примеры способов, используемых для получения гуманизированных антител, описаны в патентах США 5225539 или 5639641.

"Вариабельная область" антитела относится к вариабельной области легкой цепи антитела или к вариабельной области тяжелой цепи антитела, по отдельности или в комбинации. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей состоят из четырех каркасных областей (FR), связанных тремя областями, определяющими комплементарность (CDR), известными также как гипервариабельные участки. CDR в каждой цепи удерживаются друг рядом с другом с помощью FR и вместе с CDR из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Существует по меньшей мере два способа определения CDR: (1) подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей (т.е. Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., 1991, Национальный институт здравоохранения, Бетесда, штат Мэриленд); и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антигена-антитела (Al-lazikani et al. *J. Molec. Biol.* 273:921-948 (1997)). Кроме того, в данной области техники для определения CDR иногда используют комбинации этих двух подходов.

Систему нумерации Кабата используют, как правило, в отношении остатков в вариабельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*. 5-е изд., Public Health Service, Национальный институт здравоохранения, Бетесда, штат Мэриленд (1991)).

Нумерация положения аминокислот по Кабату относится к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи при компиляции антител в публикации Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., Public Health Service, Национальный институт здравоохранения, Бетесда, штат Мэриленд (1991). При использовании этой системы нумерации фактическая линейная последовательность аминокислот может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, что соответствует укорачиванию FR или CDR вариабельного домена или вставке в FR или CDR вариабельный домен. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать вставку одной аминокислоты (остаток 52а по Кабату) после остатка 52 в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82а, 82b и 82c и т.д. по Кабату) после остатка 82 в FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Кабату может быть определена для данного антитела путем соотнесения в областях гомологии указанной последовательности антитела со "стандартной" нумерованной последовательностью Кабата. В отношении положения структурных петель используют нумерацию Чотиа (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-911 (1987)). Конец петли Чотиа CDR-H1 при нумерации по системе нумерации Кабата варьируется между H32 и H34, в зависимости от длины петли (это обусловлено тем, что в схеме нумерации по Кабату вставки помещают в H35A и H35B; при отсутствии 35A и 35B петля заканчивается у 32; при наличии только 35A петля заканчивается у 33; при наличии 35A и 35B петля заканчивается у 34). Гипервариабельные области AbM представляют собой компромисс между CDR по Кабату и структурными петлями по Чотиа, и их используют в программах моделирования антител AbM компании Oxford Molecular.

Петля	Кабата	AbM	Чотиа
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34 (нумерация Кабата)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32 (нумерация Чотиа)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

Термин "человеческое антитело" означает антитело, вырабатываемое в организме человека, или антитело, имеющее аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, вырабатываемому в

организме человека, полученное при помощи любого метода, известного в данной области техники. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид человеческой тяжелой и/или легкой цепи, такие как, например, антитело, содержащее полипептиды мышиной легкой цепи и человеческой тяжелой цепи.

Термин "химерные антитела" относится к антителам, в которых аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена из двух или более видов. Как правило, вариабельная область легкой и тяжелой цепей соответствует вариабельной области антител, полученных из одного вида млекопитающих (например, мышей, крыс, кроликов и т.д.) с заданной специфичностью, аффинностью и способностью, тогда как константные области являются гомологичными последовательностям в антителах, полученных из другого вида (обычно человека) во избежание возникновения иммунной реакции в этих видах.

Термины "эпитоп" или "антигенная детерминанта" используются в настоящем документе взаимозаменяющими и относятся к части антигена, которая может распознаваться и быть специфически связанной определенным антителом. Если антигеном является полипептид, то эпитопы могут быть образованы из соседних аминокислот и не соседних аминокислот, расположенных рядом в третичной структуре белка. Эпитопы, образованные из соседних аминокислот, обычно сохраняются при денатурации белка, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно не сохраняются при денатурации белка. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3-5 и более часто по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

"Аффинность связывания", как правило, относится к прочности суммы всех нековалентных взаимодействий между одним связывающим сайтом молекулы (например, антитела) и его связывающим партнером (например, антигеном). Если не указано иное, то при использовании в настоящем документе "аффинность связывания" относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y может быть, как правило, представлена константой диссоциации (Kd). Аффинность может быть измерена обычными методами, известными в данной области техники, включая методы, описанные в настоящем документе. Антитела с низкой аффинностью, как правило, слабо связывают антиген и склонны к быстрой диссоциации, а антитела с высокой аффинностью, как правило, быстрее связываются с антигеном и склонны к более продолжительному сохранению связи. В данной области техники известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых может быть использован для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные варианты реализации описаны в настоящем документе.

Выражение "или лучше" при использовании в настоящем документе в отношении аффинности связывания относится к более прочному связыванию между молекулой и его связывающим партнером. "Или лучше" при использовании в настоящем документе относится к более прочному связыванию, представленному меньшим числовым значением Kd. Например, антитело, которое имеет аффинность к антигену "0,6 нМ или лучше" представляет собой антитело с аффинностью к антигену <0,6 нМ, т.е. 0,59, 0,58, 0,57 нМ и т.д. или с любым значением менее 0,6 нМ.

Выражение "по существу, одинаковые" или "по существу, такой же" при использовании в настоящем документе означает достаточно высокую степень схожести между двумя числовыми значениями (как правило, между одним значением, связанным с антителом согласно настоящему изобретению, и другим значением, связанным с эталонным/сравнительным антителом), так что специалисты в данной области техники считают разницу между этими двумя значениями небольшой или не имеющей биологического и/или статистического значения в контексте биологических характеристик, измеряемых указанными значениями (например, значениями Kd). Разница между указанными двумя значениями составляет менее примерно 50%, менее примерно 40%, менее примерно 30%, менее примерно 20% или менее примерно 10% относительно указанного значения для эталонного/сравнительного антитела.

Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые "выделены", представляют собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которые находятся в форме, не встречающейся в природе. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают те, которые были очищены до такой степени, в которой они больше не находятся в той форме, в которой они встречаются в природе. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенное антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция является по существу чистой.

При использовании в настоящем документе "по существу чистый" относится к материалу, который по меньшей мере на 50% чистый (т.е. не содержит примесей), по меньшей мере на 95% чистый, по меньшей мере на 98% чистый или по меньшей мере на 99% чистый.

Термины "рак" и "раковый" относятся или описывают физиологическое состояние млекопитающего, при котором популяции клеток характеризуются нерегулируемым клеточным ростом. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак лег-

ких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких, плоскоклеточную карциному легких, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, желудочно-кишечный рак, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак толстой и прямой кишок, эндометриальную или маточную карциному, карциному слюнной железы, рак почек, рак печени, рак предстательной железы, рак влагалища, рак щитовидной железы, гепатокарциному и различные типы рака головы и шеи.

"Опухоль" и "неоплазма" относятся к любой массе ткани, которая образована в результате избыточного роста или пролиферации клеток, как доброкачественной (нераковой), так и злокачественной (раковой), включая предраковые повреждения.

Термин "раковая клетка", "опухолевая клетка" и грамматические эквиваленты относятся к общей популяции клеток, полученных из опухоли или предракового повреждения, включая неопухолеобразующие клетки, которые содержат значительную часть популяции опухолевых клеток, и опухолеобразующие стволовые клетки (раковые стволовые клетки). При использовании в настоящем документе термин "опухолевая клетка" может быть модифицирован термином "неопухолеобразующая", если он относится только к тем клеткам опухоли, которые не обладают способностью восстановления и дифференцировки, чтобы отличать такие опухолевые клетки от раковых стволовых клеток.

Термин "субъект" относится к любому животному (например, млекопитающему), включая, но не ограничиваясь ими, людей, не являющихся человеком приматов, грызунов и т.п., которое станет реципиентом конкретного лечения. Как правило, термины "субъект" и "пациент" в настоящем документе используются взаимозаменяющими в отношении субъекта-человека.

"Популяция" клеток может относиться к одной клетке или к множеству клеток. Клетка или клетки могут быть клетками в культуре или клетками в организме. Например, клеточная популяция может находиться в организме субъекта или пациента.

Термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечивать возможность эффективность биологического действия активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые неприемлемым образом являются токсичными для субъекта, которому будет введен этот состав. Такой состав может быть стерильным.

"Эффективное количество" антитела, описанного в настоящем документе, представляет собой количество, достаточное для осуществления конкретной поставленной цели. "Эффективное количество" может быть определено эмпирически и стандартным образом в отношении поставленной цели.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела или другого лекарства, эффективному для "лечения" заболевания или расстройства у субъекта или млекопитающего. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарства может снижать количество раковых клеток; уменьшать размер опухоли; подавлять (т.е. замедлять до некоторой степени и в некоторых вариантах реализации останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферийные органы; подавлять (т.е. замедлять до некоторой степени и в некоторых вариантах реализации останавливать) метастаз опухоли; подавлять до некоторой степени рост опухоли и/или облегчать до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком; см. представленное в настоящем документе определение "лечения". В той степени, в которой лекарство может предотвращать рост и/или убивать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, которое в необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени является эффективным для достижения требуемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическую дозу применяют у пациентов до начала или на ранних стадиях заболевания, профилактически эффективное количество меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Такие термины, как "лечащий", или "лечение", или "лечить", или "облегчающий", или "облегчать", относятся к 1) терапевтическим мерам, которые лечат, замедляют, ослабляют симптомы и/или останавливают прогрессирование диагностированного патологического состояния или расстройства и 2) профилактическим или превентивным мерам, которые предупреждают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или расстройства. Следовательно, нуждающиеся в лечении включают тех, которые уже страдают от расстройства; тех, которые предрасположены к приобретению расстройства; и тех, у которых необходимо предупредить расстройство. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект успешно прошел "лечение" от рака в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, если пациент демонстрирует один или более из следующих признаков: снижение кахексии, увеличение продолжительности выживаемости, увеличение времени до прогрессирования опухоли, снижение массы опухоли, уменьшение опухолевой нагрузки и/или увеличение времени до метастаза опухоли, времени до рецидива опухоли, ответа опухоли, полного ответа, частичного ответа, стабильного заболевания, прогрессирующего заболевания, выживаемости без прогрессирования (PFS), общей выживаемости (OS), каждое из которых измеряют в соответствии со стандартами, установленными Национальным онкологическим институтом и Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США, для одобрения новых лекарств. См. Johnson et al., J. Clin. Oncol. 21(7):1404-1411 (2003).

"Комбинация" анти-CD20 антитела и селективного ингибитора Р13Кб относится к анти-CD20 антителу или его фрагменту и соединению А, описанному в настоящем документе, которые предназначены для введения в одну популяцию клеток или одному субъекту одновременно, последовательно или и одновременно, и последовательно. Поэтому, например, введение анти-CD20 антитела или его фрагмента, предшествующее или следующее (например, через 1 ч, 1 день, 1 неделю или 1 месяц) за введением соединения А, представляет собой введение комбинации анти-CD20 антитела или его фрагмента и соединения А. Кроме того, одновременное введение анти-CD20 антитела или его фрагмента и соединения А также представляет собой введение комбинации анти-CD20 антитела или его фрагмента и соединения А, независимо от того, были ли анти-CD20 антитело или его фрагмент и соединение А введены вместе в виде одного фармацевтического состава или введены одновременно в виде отдельных фармацевтических составов одним или разными способами введения.

Опухоль, которая "не отвечает", "слабо отвечает" или является "невосприимчивой" к лечению анти-CD20 антителом, не проявляет статистически значимого улучшения в ответ на лечение анти-CD20 антителом по сравнению с отсутствием лечения или с лечением плацебо в известных испытаниях на животных моделях или в клинических испытаниях на людях, или которая отвечает на первоначальное лечение анти-CD20 антителами, но растет при продолжении лечения.

Способность опухоли или клеточного типа отвечать на анти-CD20 антитело может быть измерена при помощи лабораторных клеточных линий, таких как Raji или Wil2-S, или клеточных линий пациентов-доноров. Кроме того, активность может быть измерена при помощи анализов истощения В-клеток, например, в цельной крови пациентов.

Термины "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", которые используются в настоящем документе взаимозаменяя, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут быть дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифицированными нуклеотидами или основаниями и/или их аналогами, или любым субстратом, который может быть внедрен в полимер при помощи ДНК или РНК полимеразы. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. При ее наличии модификация нуклеотидной структуры может быть выполнена до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, как, например, конъюгацией с метящим компонентом. Другие типы модификаций включают, например, "кэпы", замещения одного или более природных нуклеотидов его аналогом, межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации с незаряженными связями (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфорамидаты, карбаматы и т.п.) и с заряженными связями (например, тиофосфатами, дитиофосфатами и т.п.), модификации, содержащие подвешенные фрагменты, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, ply-L-лизин и т.п.), модификации с интеркаляторами (например, акридин, псорален и т.п.), модификации, содержащие хелаторы (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.п.), модификации, содержащие алкиляторы, модификации с модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т.п.), а также немодифицированные формы полинуклеотида(ов). Кроме того, любая из гидроксильных групп, обычно присутствующих в сахара, может быть замещена, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищена стандартными защитными группами или активирована для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами или может быть конъюгирована с твердыми подложками. 5'- и 3'-концевой OH может быть фосфорилирован или замещен аминами или органическими фрагментами кэп-групп, содержащими от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксили также могут быть дериватизованы стандартными защитными группами. Полинуклеотиды также могут содержать формы аналогов сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые общеизвестны в данной области техники, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил, 2'-фтор- или 2'-азидорибозу, карбоциклические аналоги сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилоза или ликсоза, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогентулоза, ациклические аналоги и лишенные основания нуклеотидные аналоги, такие как метилрибозид. Одна или более фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связывающими группами. Такие альтернативные связывающие группы включают, но не ограничиваются ими, варианты реализации, в которых фосфат заменен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формацеталь"), где каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), факультативно содержащий простую эфирную (-O-) связь, арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. В полинуклеотиде не все связи должны быть одинаковыми. Предшествующее описание относится ко всем полинуклеотидам, упомянутым в настоящем документе, включая РНК и ДНК.

Термин "вектор" означает конструкцию, которая может доставлять и экспрессировать один или более требуемых гена(ов) или последовательность(ей) в клетке-хозяине. Примеры векторов включают, но не ограничиваются ими, вирусные векторы, векторы экспрессии "оголенной" ДНК или РНК, плазмиду, космиду или фаговые векторы, векторы экспрессии ДНК или РНК, связанные с катионными конденсирующими агентами, векторы экспрессии ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы и некоторые

эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок", которые используются в настоящем документе взаимозаменяю, относятся к полимерам аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться неаминокислотами. Эти термины охватывают также аминокислотный полимер, который модифицирован естественным образом или при внешнем вмешательстве; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование и любые другие манипуляции или модификации, такие как конъюгирование с метящим компонентом. В это определение включены также, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т.п.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Следует понимать, что поскольку полипептиды согласно настоящему изобретению основаны на антителах, то в некоторых вариантах реализации полипептиды могут быть в виде одиночных цепей или ассоциированных цепей.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании (при необходимости, внедрении гэпов) для максимального соответствия, без учета любых консервативных замещений аминокислот как части идентичности последовательностей. Процентная идентичность может быть измерена при помощи компьютерных программ или алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального изучения. В данной области техники известны различные алгоритмы и компьютерные программы, которые могут быть использованы для получения выравниваний аминокислотных или нуклеотидных последовательностей. Один такой неограничивающий пример алгоритма выравнивания последовательностей представляет собой алгоритм, описанный в публикации Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:2264-2268 (1990), который модифицирован в публикации Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 90:5873-5877 (1993) и внедрен в компьютерные программы NBLAST и XBLAST (Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1991)). В некоторых вариантах реализации может быть использована программа Gapped BLAST, описанная в публикации Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997). BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Южный Сан-Франциско, штат Калифорния) или Megalign (DNASTAR) представляют собой дополнительные общедоступные компьютерные программы, которые могут быть использованы для выравнивания последовательностей. В некоторых вариантах реализации изобретения процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями определяют при помощи программы GAP в пакете программ GCG (например, при помощи матрицы NWSgapdna.CMP, штрафа за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 90 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых альтернативных вариантах реализации может быть использована программа GAP в пакете программ GCG, которая включает алгоритм Нидмана-Вунша (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), для определения процентной идентичности между двумя аминокислотными последовательностями (например, с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5). Альтернативно, в некоторых вариантах реализации процентную идентичность между нуклеотидными или аминокислотными последовательностями определяют при помощи алгоритма Майерса и Миллера (CABIOS, 4:11-17 (1989)). Например, процентная идентичность может быть определена при помощи программы ALIGN (версия 2.0) и с использованием PAM120 с таблицей остатков, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за пропуск в последовательности 4. Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для максимального выравнивания в конкретной программе выравнивания. В некоторых вариантах реализации в программе выравнивания используют параметры по умолчанию. В некоторых вариантах реализации процентную идентичность "X" первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью рассчитывают как $100 \times (Y/Z)$, где Y представляет собой количество аминокислотных остатков, засчитанных как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (при выравнивании с помощью визуального изучения или конкретной программы выравнивания последовательности), а Z представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше длины второй последовательности, то процентная идентичность первой последовательности со второй последовательностью будет больше, чем процентная идентичность второй последовательности с первой последовательностью.

В качестве неограничивающих примеров в некоторых вариантах реализации при помощи программы Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, Университетский научно-исследовательский парк, 575 Science Drive, Мэдисон, штат Висконсин, 53711) можно определить, имеет ли любой конкретный полинуклеотид определенную процентную идентичность последовательности (например, идентичен по меньшей мере на 80%, идентичен по меньшей мере на 85%, идентичен по меньшей мере на 90% и в некоторых вариантах реализации идентичен по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99%) с эталонной последовательностью. В программе Bestfit используется алгоритм

локальной гомологии Смита и Ватермана (Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 2:482489 (1981) для определения наилучшего сегмента гомологии между двумя последовательностями. При использовании программы Bestfit или любой другой программы выравнивания последовательности для определения того, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной с эталонной последовательностью согласно настоящему изобретению, параметры устанавливают так, чтобы процент идентичности рассчитывался по всей длине эталонной нуклеотидной последовательности и чтобы в гомологии допускалось до 5% гэпов от общего количества нуклеотидов в эталонной последовательности.

В некоторых вариантах реализации две нуклеиновые кислоты или два полипептида согласно настоящему изобретению являются, по существу, идентичными, это означает, что они имеют по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% и в некоторых вариантах реализации по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичности нуклеотидных или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, измеренной при помощи алгоритма сравнения последовательностей или при визуальном изучении. В некоторых вариантах реализации идентичность существует в пределах области последовательностей, которая имеет длину по меньшей мере примерно 10, примерно 20, примерно 40-60 остатков или любое целочисленное значение в указанных диапазонах, или в пределах области длиной более 60-80 остатков, по меньшей мере примерно 90-100 остатков, или эти последовательности являются, по существу, идентичными в пределах всей длины сравниваемых последовательностей, такой как, например, кодирующая область нуклеотидной последовательности.

"Консервативная замена аминокислот" представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим такую же боковую цепь. В данной области известны семейства аминокислотных остатков, имеющих одинаковые боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Например, замена фенилаланина на тирозин представляет собой консервативную замену. В некоторых вариантах реализации консервативные замены в последовательностях полипептидов и антител согласно настоящему изобретению не аннулируют связывание полипептида или антитела, содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном(ами), т.е. FOLR1, с которым связывается полипептид или антитело. В данной области техники известны способы определения консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не исключают антигенные связывание (см., например, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999) и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

Все числовые значения в данном описании, обозначающие количества, диапазоны количества материалов, физических свойств материалов и/или применения, следует понимать как модифицированные словом "примерно", за исключением специально указанных случаев. Термин "примерно", при упоминании числа или числового диапазона, означает, что это число или числовой диапазон относится к приближению в пределах экспериментальной вариабельности (или в пределах статистической экспериментальной ошибки), и поэтому это число или числовой диапазон может варьироваться, например, от 1 до 15% от указанного числа или числового диапазона.

Соединение согласно настоящему изобретению может содержать один или более центров асимметрии (хиральных центров), и поэтому могут образовывать энантиомеры, диастереомеры и другие стереоизомерные формы, которые могут быть определены в терминах абсолютной стереохимии, как (R)- или (S)-. Настоящее описание охватывает все такие возможные формы, а также их рацемические и разделенные формы и смеси. Отдельные энантиомеры могут быть выделены при помощи методов, известных в данной области техники, с учетом настоящего описания.

При использовании в настоящем документе термин "стереоизомеры" представляет собой общий термин для всех изомеров отдельных молекул, которые отличаются только ориентацией их атомов в пространстве. Он включает энантиомеры и изомеры соединений более чем с одним хиральным центром, которые не являются зеркальными отображениями друг друга (диастереомеры).

Термин "хиральный центр" относится к атому углерода, к которому присоединены четыре различные группы.

Термины "энантиомер" и "энантиомерная" относятся к молекуле, которая не может быть совмещена со своим зеркальным отображением и, следовательно, является оптически активной, при этом один энантиомер вращает плоскость поляризованного света в одном направлении, а его зеркальное соединение вращает плоскость поляризованного света в противоположном направлении.

Термин "рацемическая" относится к смеси с равными частями энантиомеров, которая является оптически неактивной.

Термин "разделение" относится к выделению, концентрированию или удалению одной из двух энантиомерных форм молекулы.

Настоящее описание включает сольваты соединений согласно изобретению. Сольваты обычно существенно не изменяют физиологическую активность или токсичность соединений и, следовательно, могут действовать как фармакологические эквиваленты. Термин "сольват", используемый в настоящем документе, представляет собой комбинацию, физическую связь и/или сольватацию соединения согласно изобретению с молекулой растворителя, например дисольват, моносольват или полусольват, в которых соотношение молекулы растворителя к соединению согласно изобретению составляет примерно 2:1, примерно 1:1 или примерно 1:2 соответственно. Такая физическая связь включает переменные степени ионного и ковалентного связывания, в том числе водородного связывания. В некоторых случаях сольват может быть выделен, например, если одна или более молекул растворителя внедрена в кристаллическую решетку кристаллического вещества. Следовательно, "сольват" включает фазу в растворе и поддающиеся выделению сольваты. Соединения согласно изобретению могут быть представлены в виде сольватированных форм с фармацевтически приемлемым растворителем, таким как вода, метанол, этанол и т.п., и подразумевается, что настоящее описание включает сольватированные и несольватированные формы соединений согласно изобретению. Один из типов сольватов представляет собой гидрат. "Гидрат" относится к определенной подгруппе сольватов, где молекула растворителя представляет собой воду. Как правило, сольваты могут действовать в качестве фармакологических эквивалентов. Получение сольватов известно в данной области техники. См., например, M. Caira et al., *J. Pharmaceut. Sci.*, 93(3):601-611 (2004); E.C. van Tonder et al., *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 5(1), Article 12 (2004) и A.L. Bingham et al., *Chem. Commun.* 603-604 (2001). Типичный неограничивающий способ получения сольвата включает растворение соединения согласно настоящему изобретению в требуемом растворителе (органическом растворителе, воде или их смеси) при температурах от примерно 20 до примерно 25°C, затем охлаждение раствора со скоростью, достаточной для образования кристаллов, и выделение кристаллов известными способами, например фильтрацией. Для подтверждения наличия растворителя в кристалле сольвата могут быть использованы аналитические приемы, такие как инфракрасная спектроскопия.

Термин "пролекарство" относится к соединению, которое является неактивным предшественником соединения, которое превращается в свою активную форму в организме под действием нормальных метаболических процессов. Разработка пролекарства рассмотрена, в целом, в публикации Hardma, et al. (ред.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9-е изд., р. 11-16 (1996). Детальное рассмотрение представлено в публикациях Higuchi, et al., *Prodrugs as Novel Delivery Systems*, том 14, серия симпозиумов ASCD, и Roche (ред.), *Bioreversible Carriers in Drug Design*, Американская фармацевтическая ассоциация и Pergamon Press (1987). Для примера пролекарства могут быть превращены в фармакологически активную форму путем гидролиза, например, сложноэфирной или амидной связи с образованием или открытием функциональной группы у конечного продукта. Пролекарства могут быть разработаны так, чтобы они реагировали с эндогенным соединением с образованием водорастворимых конъюгатов, что дополнительно усиливает фармакологические свойства этого соединения, например увеличивает циркуляционный период полувыведения. Альтернативно, пролекарства могут быть разработаны так, чтобы они подвергались ковалентной модификации по функциональной группе, например, с глюкуроновой кислотой, сульфатом, глутатионом, аминокислотами или ацетатом. Полученный конъюгат может быть инактивирован или экскретирован с мочой или может обладать большей эффективностью по сравнению с исходным соединением. Высокомолекулярные конъюгаты также могут экскретироваться с желчью, подвергаясь ферментативному расщеплению, и выделяться обратно в кровоток, таким образом эффективно увеличивая биологический период полувыведения первоначально введенного соединения. Пролекарства соединений согласно изобретению входят в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение включает также соединения, которые отличаются только наличием одного или более изотопно обогащенных атомов, например заменой водорода дейтерием или тритием или заменой углерода на ¹³C- или ¹⁴C-обогащенный углерод. Соединения согласно настоящему изобретению могут содержать также неприродные пропорции атомных изотопов у одного или более атомов, образующих эти соединения. Например, соединения могут быть помечены радиоактивными изотопами, как, например, тритием (³H), йодом-125 (¹²⁵I) или углеродом-14 (¹⁴C). Все изотопные варианты соединений настоящего изобретения, радиоактивные или не радиоактивные, входят в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно охватывает соли соединений согласно изобретению, включая нетоксичные фармацевтически приемлемые соли. Примеры фармацевтически приемлемых аддитивных солей включают соли присоединения неорганических и органических кислот и основные соли. Фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваются ими, соли металлов, такие как натриевая соль, калиевая соль, цезиевая соль и т.п.; соли щелочно-земельных металлов, такие как кальциевая соль, магниевая соль и т.п.; соли органических аминов, такие как триэтиламинная соль, пиридиновая соль, пиколиновая соль, этаноламинная соль, триэтаноламинная соль, дициклогексиламинная соль, N,N'-дibenзил этилендиаминная соль и т.п.; соли неорганических кислот, такие как гидрохлорид, гидробромид, фосфат, сульфат и т.п.; соли органических кислот, такие как цитрат, лактат, тартрат, малеат, фумарат, манделат, ацетат, дихлорацетат, трифторацетат, оксалат, формиат, сукцинаты, пальмоаты, бензоа-

ты, салицилаты, аскорбаты, глицерофосфаты, кетоглутараты и т.п.; сульфонаты, такие как метансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и т.п.; соли природных аминокислот, таких как глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, норлейцин, тирозин, цистин, цистеин, метионин, пролин, гидроксипролин, гистидин, орнитин, лизин, аргинин и серин; и соли неприродных аминокислот, таких как D-изомеры или замещенные аминокислоты; соли гуанидина; и соли замещенного гуанидина, где заместители выбраны из нитро, амино, алкила, алкинила, аммониевые или замещенные аммониевые соли, а также соли алюминия.

Термин "селективный ингибитор" в отношении биологически активного агента относится к способности этого агента селективно снижать целевую сигнальную активность по сравнению с нецелевой сигнальной активностью за счет прямого или косвенного взаимодействия с мишенью.

Термин "селективный ингибитор Р13Кδ" относится к соединению А, описанному в настоящем документе, которое селективно ингибитирует активность изоформы Р13Кδ более эффективно, чем другие изоформы семейства Р13К (α, β и γ). Например, соединение формулы (А) может быть соединением, которое демонстрирует 50% ингибирующую концентрацию (IC_{50}) по отношению к δ типу Р13-киназы, которая по меньшей мере в 20 раз ниже, чем IC_{50} этого ингибитора по отношению к остальным изоформам Р13К (т.е. α, β и γ).

Подавление Р13Кδ может иметь терапевтическую пользу при лечении различных состояний, например состояний, характеризующихся воспалительной реакцией, включая, но не ограничиваясь ими, аутоиммунные заболевания, аллергические заболевания и артритные заболевания. Важно, что подавление функции Р13Кδ не влияет на биологические функции, такие как выживаемость и фертильность.

Термин "воспалительная реакция", используемый в настоящем документе, характеризуется покраснением, жаром, опуханием и болью (т.е. воспалением) и обычно включает повреждение или разрушение тканей. Воспалительная реакция обычно является локализованной защитной реакцией, вызванной повреждением или разрушением тканей, которая служит для уничтожения, разбавления или закупорки (изолирования) повреждающего агента и поврежденной ткани. Воспалительные реакции заметно связаны с притоком лейкоцитов и/или хемотаксисом лейкоцитов (например, нейтрофилов). Воспалительные реакции могут быть результатом инфекции патогенных организмов и вирусов, неинфекционных причин, таких как травма или реперфузия после инфаркта миокарда или инсульта, иммунные реакции на чужеродные антигены и аутоиммунные заболевания. Воспалительные реакции, восприимчивые к лечению способами и соединениями согласно изобретению, включают состояния, связанные с реакциями специфической защитной системы, а также состояния, связанные с реакциями неспецифической защитной системы.

Терапевтические способы согласно изобретению включают способы лечения состояний, связанных с активацией воспалительных клеток. "Активация воспалительных клеток" относится к возбуждению посредством стимула (включая, но не ограничиваясь ими, цитокины, антигены или аутоантитела) пролиферативной клеточной реакции, выработке растворимых медиаторов (включая, но не ограничиваясь ими, цитокины, кислородные радикалы, ферменты, простаноиды или вазоактивные амины) или экспрессии клеточной поверхностью новых или увеличенного количества медиаторов (включая, но не ограничиваясь ими, основные антигены гистосовместимости или молекулы клеточной адгезии) в воспалительных клетках (включая, но не ограничиваясь ими, моноциты, макрофаги, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, гранулоциты (полиморфоядерные лейкоциты, включая нейтрофилы, базофилы и эозинофилы), макроциты, дендритные клетки, клетки Лангерганса и эндотелиальные клетки). Специалистам в данной области понятно, что активация одного или комбинации этих фенотипов в указанных клетках может способствовать инициации, сохранению или обострению воспалительного состояния.

Термин "аутоиммунное заболевание" при использовании в настоящем документе относится к любой группе расстройств, в которых поражение ткани связано с гуморальными или клеточно-опосредованными реакциями на собственные компоненты организма.

Термин "отторжение трансплантата" при использовании в настоящем документе относится к иммунной реакции, направленной против пересаженной ткани (включая органы или клетки, например костный мозг, характеризующиеся снижением функции пересаженной и окружающих тканей, болью, опуханием, лейкоцитозом и тромбоцитопенией).

Термин "аллергическое заболевание" при использовании в настоящем документе относится к любым симптомам, повреждению тканей или снижению функции ткани в результате аллергии.

Термин "артритное заболевание" при использовании в настоящем документе относится к любому заболеванию, которое характеризуется воспалительным поражением суставов, приписываемым различным этиологиям.

Термин "дерматит" при использовании в настоящем документе относится к любому из обширного семейства заболеваний кожи, которое характеризуется воспалением кожи, приписываемым различным этиологиям.

Термин "синергетический эффект", используемый в настоящем документе, относится более чем к аддитивному терапевтическому эффекту, обусловленному комбинацией соединений, при этом терапев-

тический эффект, полученный с комбинацией, превышает аддитивные эффекты, которые могут быть получены иначе при введении этих соединений по отдельности. Варианты реализации настоящего изобретения включают способы получения синергетического эффекта при лечении гематологического рака, при этом указанный эффект по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% больше, чем соответствующий аддитивный эффект.

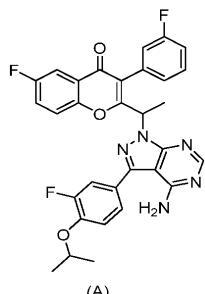
"Терапевтическая синергия" в настоящем документе означает, что комбинация анти-CD20 антитела с соединением А вызывает терапевтический эффект лечения, который больше, чем аддитивные эффекты анти-CD20 антитела и селективного ингибитора PI3K δ , используемых по отдельности.

При использовании в настоящем описании и формуле изобретения форма единственного числа включает формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

Следует понимать, что при описании вариантов реализации в настоящем документе со словом "содержащий" предложены также другие аналогичные варианты реализации, описанные в терминах "состоящий из" и/или "состоящий по существу из".

II. Селективный ингибитор Р1ЗКδ.

В настоящем документе предложен селективный ингибитор Р13Кδ, используемый в комбинации с антителами анти-CD20 и их антигенсвязывающими фрагментами, который представляет собой соединение формулы (A)



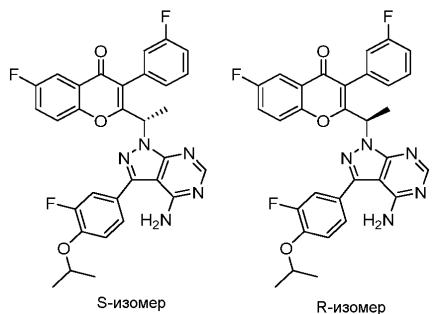
и его стереоизомер, таутомер, фармацевтически приемлемые соли, сольваты и пролекарства.

В одном из вариантов реализации изобретения соединение А, используемое в комбинации с антителами анти-CD20 и их антигенсвязывающими фрагментами, представляет собой (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он, его фармацевтически приемлемые соли, сольваты и пролекарства.

Этот стереоизомер в настоящем документе упоминается так же, как "S-изомер соединения формулы (A)", "S-изомер", "TGR-1202" и "RP 5307".

В другом варианте реализации изобретения соединение А, используемое в комбинации с антителами анти-CD20 и их антигенсвязывающими фрагментами, представляет собой (R)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он, его фармацевтически приемлемые соли, сольваты и пролекарства.

Химические структуры этих соединений представлены ниже:



III. Антитела анти-CD20.

CD20 представляет собой трансмембранный фосфопротеин семейства тетраспанинов, который экспрессируется преимущественно в пре-В-клетках и в зрелых периферийных В-клетках в организме людей и мышей. У людей CD20 также сильно и гомогенно экспрессируется на большинстве зрелых В-клеточных злокачественных образований.

Как предложено в настоящем документе, антитела анти-CD20 и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть использованы в комбинации с селективным ингибитором Р13К8.

Известно множество анти-CD20 антител, включая, например, убlitуксимаб, ритуксимаб, офатумумаб (Humax; Intracel), окрелизоумаб, велтузумаб, GA101 (обинутузумаб), AME-133v (Applied Molecular

Evolution), окаратузумаб (Mentrik Biotech), PRO131921, тозитумомаб, ибритумомаб-тиуксетан, hA20 (Immunomedics, Inc.), BLX-301 (Biolex Therapeutics), редитукс (Dr. Reddy's Laboratories) и PRO70769 (описанный в WO 2004/056312).

Ублитуксимаб (Utxxin™, LFB-R603, TG20, EMAB603) представляет собой моноклональное антитело, которое нацелено на специфический и уникальный эпитоп на CD20 и которое было создано биоинженерным способом для усиления клинической активности и эффективности.

Ритуксимаб представляет собой генно-инженерное химерное мышью/человеческое моноклональное антитело, направленное против антигена CD20. Ритуксимаб представляет собой антитело, называемое "C2B8" в патенте США № 5736137. Аминокислотная последовательность антитела ритуксимаба и иллюстративные способы его получения путем рекомбинантной экспрессии в клетках яичников китайского хомячка (CHO) описаны в патенте США № 5736137, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Офатумумаб представляет собой анти-CD20 человеческое моноклональное антитело IgG1κ. Исследования показывают, что офатумумаб диссоциирует из CD20 медленнее, чем ритуксимаб, и связывается с ближайшим к мембране эпитопом. Zhang et al., Mabs, 1:326-331 (2009). Эпитопное картирование показало, что офатумумаб связывается с эпитопом, расположенным ближе N-концу CD20, по сравнению с положением, на которое нацелен ритуксимаб, и включает внеклеточную петлю антигена. Id.

Следовательно, в некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело или его фрагмент выбран из группы, состоящей из антител, которые связываются с тем же эпитопом, что и ублитуксимаб, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, велтузумаб, GA101, AME-133v, PRO131921, тозитумомаб, hA20 или PRO70769. В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его фрагмент представляет собой ублитуксимаб, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, велтузумаб, GA101, AME-133v, PRO131921, тозитумомаб, hA20, PRO70769 или его фрагмент.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его фрагмент связывается с тем же эпитопом, что и ублитуксимаб. В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его фрагмент связывается с последовательностью, содержащей аминокислоты N153-S179 в CD20. В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его фрагмент связывается с эпитопом прерывистого типа в аминокислотах N153-S179 в CD20.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его фрагмент связывается с CD20 с аффинностью, характеризующейся константой диссоциации KD менее примерно 10^{-7} M, менее примерно 10^{-8} M или менее примерно 10^{-9} M. В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его фрагмент связывается с CD20 с аффинностью, характеризующейся константой диссоциации KD от 10^{-10} до 10^{-9} M. В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его фрагмент связывается с CD20 с аффинностью, характеризующейся константой диссоциации KD $0,7 \times 10^{-9}$ M. При использовании в контексте констант диссоциации связывания антитела термин "примерно" допускает некоторую степень отклонения, своюственную методам, используемым для измерения аффинности антитела. Например, в зависимости от степени точности используемого оборудования, стандартной ошибки, основанной на количестве измеренных образцов, и погрешности округления, термин "примерно 10-2 M" может включать, например, от 0,05 до 0,005 M.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело демонстрирует высокую аффинность к Fc-γ-RIII (CD16). В некоторых вариантах реализации в результате их высокой аффинности к области Fc антитела CD16, такие антитела не вытесняются поликлональными антителами IgG, особенно IgG, содержащегося в сыворотке крови. В некоторых вариантах реализации антитело связывается с CD16 (например, экспрессируемом на макрофаге) с аффинностью, составляющей по меньшей мере 2×10^6 M⁻¹, по меньшей мере 2×10^7 M⁻¹, 2×10^8 M⁻¹ или 2×10^7 M⁻¹, например, по результатам определения в анализе Скэтчарда или при помощи технологии BIACore (технология на основе поверхностного плазмонного резонанса без меток).

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело демонстрирует профиль гликозилирования, характеризующийся низким содержанием фукозы в его области Fc. Например, в некоторых вариантах реализации композиция содержит анти-CD20 антитела, где эти антитела содержат N-гликозид-связанные сахарные цепи, связанные на Fc-гамма сайте гликозилирования (Asn 297, нумерация ЕС), при этом среди N-гликозид-связанных сахарных цепей всех антител композиции содержание фукозы составляет менее 65%, менее 60%, менее 55%, менее 50%, менее 45% или менее 40%. В некоторых вариантах реализации среди N-гликозид-связанных сахарных цепей всех антител композиции содержание фукозы составляет от 15 до 45% или от 20 до 40%.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело демонстрирует эффективную in vitro клеточную антителозависимую цитотоксичность (ADCC). В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело создает плато ADCC, составляющее по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 25% или по меньшей мере примерно 30% при концентрации 50 нг/мл с использованием природных клеток-киллеров (NK), полученных от здоровых доноров. Способы измерения ADCC известны в данной области техники и

представлены, например, в публикации Romeaup et al., British Journal of Haematology, 140:635-643 (2008). В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело создает плато ADCC примерно при 35% в концентрации 50 нг/мл с использованием природных клеток-киллеров, полученных от здоровых доноров.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело может снижать активность NF-к-В. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело может снижать экспрессию SNAIL. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело может повышать активность RKIP. В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело может повышать активность PTEN. В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело может повышать чувствительность клетки к TRAIL-апоптозу.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело представляет собой оптимизированный Fc- γ -RIII (CD16). Антитела способные активировать рецепторы Fc типа III и имеющие определенную гликановую структуру, описаны, например, в патенте США № 7931895, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Следовательно, в некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело модифицировано по Asn 297 (нумерация ЕС) путем N-гликозилирования 2-антенарного и/или олигоманнозидного типа, как описано в патенте США № 7931895. Способы получения антител с сильной аффинностью к рецептору CD16 эффекторных клеток иммунной системы представлены, например, в опубликованной заявке США № 2005/0271652, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело имеет высокую активность ADCC. Способы получения антител с высокой активностью ADCC представлены, например, в патенте США № 7713524, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Убlitуксимаб содержит последовательности антитела, представленные ниже:

Вариабельная CDR1 тяжелой цепи: Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
Tyr Asn (SEQ ID NO:1)

Вариабельная CDR2 тяжелой цепи: Ile Tyr Pro Gly Asn Gly
Asp Thr (SEQ ID NO:2)

Вариабельная CDR3 тяжелой цепи: Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn
Tyr Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO:3)

Вариабельная тяжелая цепь:
Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu
Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser Thr
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
Phe Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:4)

Константная тяжелая цепь:

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:5)

Вариабельная CDR1 легкой цепи: Ser Ser Val Ser Tyr (SEQ ID NO:6)

Вариабельная CDR2 легкой цепи: Ala Thr Ser (SEQ ID NO:7)

Вариабельная CDR3 легкой цепи: Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr (SEQ ID NO:8)

Вариабельная легкая цепь:

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys (SEQ ID NO:9)

Константная легкая цепь:

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO:10)

Так, в некоторых вариантах реализации изобретения выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное состоит по существу или состоит из вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (домен V_H), где по меньшей мере одна (т.е. одна, две или три) CDR домена V_H имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична области CDR1, CDR2 или CDR3 последовательностей SEQ ID NO: 1, 2 или 3, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домен V_H, может специфически или

меньшей мере одна (т.е. одна, две или три) CDR домена V_L имеют аминокислотную последовательность, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных замещений аминокислот, области CDR1, CDR2 или CDR3 последовательностей SEQ ID NO: 6, 7 или 8, и при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, содержащее V_H и V_L , может специфически или предпочтительно связываться с CD20.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное содержит области V_H CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей SEQ ID NO: 1, 2 и 3, и области V_L CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей SEQ ID NO: 6, 7 и 8.

В другом варианте реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное содержит, состоит по существу или состоит из домена V_H и домена V_L , причем V_H имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична V_H аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, причем домен V_L имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична V_L аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, и при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, содержащее такой домен V_H и V_L , может специфически или предпочтительно связываться с CD20.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит V_H последовательности SEQ ID NO: 4 и V_L последовательности SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом, что и антитело, которое содержит V_H последовательности SEQ ID NO: 4 и V_L последовательности SEQ ID NO: 9.

В другом варианте реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное содержит, состоит по существу или состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, причем тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100% идентична аминокислотной последовательности тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 4 и 5, а легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или на 100% идентична аминокислотной последовательности тяжелой цепи последовательности, содержащей SEQ ID NO: 9 и 10, и при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вариант или производное, содержащее тяжелую цепь, может специфически или предпочтительно связываться с CD20.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 4 и 5, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 9 и 10.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом, что и антитело, которое содержит SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело представляет собой убдитуксимаб.

В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой EMAB603 (см. WO 2006/064121, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме), полученный при помощи клона R603-12D11, который имеется в Национальной коллекции культур микроорганизмов под номером доступа CNCM 1-3529.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело вырабатывается в крысиной клеточной линии гибридомы YB2/0 (клетки YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, зарегистрированные в Американской коллекции типовых культур под номером ATCC CRL-1662).

Точная химическая структура антитела, способного специфически связывать CD20 и сохранять требуемую активность, зависит от ряда факторов. Поскольку в молекуле находятся ионизируемые амино- и карбоксильные группы, то конкретный полипептид может быть получен в виде кислотной или основной соли, или в нейтральной форме. Все такие препараты, которые сохраняют свою биологическую активность при помещении в подходящие условия окружающей среды, включены в определение анти-CD20 антител, используемого в настоящем документе. Кроме того, первичная аминокислотная последовательность антитела может быть увеличена путем дериватизации с применением сахарных фрагментов (гликозилирования) или путем других вспомогательных молекул, таких как липиды, фосфатные, ацетильные группы и т.п. Она может быть также увеличена путем сопряжения с сахарами. Некоторые аспекты такого удлинения осуществляют путем посттрансляционных процессирующих систем продуцирующего хозяина; другие такие модификации могут быть внедрены *in vitro*. В любом случае такие модификации включены в определение анти-CD20 антитела, используемого в настоящем документе, при условии сохранения требуемых свойств анти-CD20 антитела.

Предполагается, что такие модификации могут количественно или качественно влиять на активность, усиливая или ослабляя активность полипептида в различных анализах. Кроме того, отдельные аминокислотные остатки в цепи могут быть модифицированы окислением, восстановлением или иной дериватизацией, а полипептид может быть расщеплен с получением фрагментов, которые сохраняют активность. Такие изменения, которые не нарушают требуемых свойств (например, связывающую специфичность в отношении CD20), не исключают такую полипептидную последовательность из определения рассматриваемых анти-CD20 антител при использовании в настоящем документе.

В данной области техники существуют содержательные руководства по получению и применению полипептидных вариантов. При получении вариантов анти-CD20 связывающей молекулы, например, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, варианта или производного, специалисты в данной области техники могут легко определить, какие модификации нуклеотидной или аминокислотной последовательности природного белка приведут к получению варианта, подходящего для применения в качестве терапевтически активного компонента фармацевтической композиции.

В каркасные области или только в CDR области молекулы антитела могут быть внедрены мутации. Внедренные мутации могут быть молчаними или нейтральными миссенс-мутациями, т.е. могут не влиять или слабо влиять на способность антитела связывать антиген. Эти типы мутаций могут быть подходящими для оптимизации применения кодона или для улучшения выработки антител гибридомой. Альтернативно, не нейтральные миссенс-мутации могут изменять способность антитела связывать антиген. Положение большинства молчаний и нейтральных миссенс-мутаций, вероятно, находится в каркасных областях, тогда как положение большинства не нейтральных миссенс-мутаций, вероятно, находится в CDR, хотя это не является абсолютным требованием. Специалисты в данной области техники могут разработать и испытать мутантные молекулы с требуемыми свойствами, такими как отсутствие изменения антигенсвязывающей активности или изменение связывающей активности (например, облегчение антигенсвязывающей активности или изменение специфичности антитела). После мутагенеза кодируемый белок может быть стандартным образом экспрессирован, и может быть измерена функциональная и/или биологическая активность кодируемого белка (например, способность иммunoспецифически связывать по меньшей мере один эпипот полипептида CD20) при помощи способов, описанных в настоящем документе, или стандартными технологиями модификации, известными в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитела содержат по меньшей мере одну оптимизированную определяющую комплементарность область (CDR). Под "оптимизированной CDR" подразумевается, что эта CDR модифицирована и оптимизирована последовательностями, выбранными на основании устойчивой или улучшенной аффинности связывания и/или анти-CD20 активности, которой наделено анти-CD20 антитело, содержащее оптимизированную CDR. "Анти-CD20 активность" может включать, например, активность, которая модулирует одно или более из следующих активностей, связанных с CD20, например, способность вызывать апоптоз В-клеток, способность вызывать ADCC против В-клеток (например, клеток CLL), способность подавлять активность NF-каппа-B, способность подавлять экспрессию Snail, способность дерепрессировать RKIP, способность дерепрессировать PTEN, способность сенсибилизировать опухолевые клетки к TRAIL-апоптозу или любая другая активность, связанная с CD20. Такие активности описаны, например, в публикации Baritaki et al., International Journal of Oncology, 38: 1683-1694 (2011), которая включена в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме. Модификации могут включать замену аминокислотных остатков в пределах CDR, так что анти-CD20 антитело сохраняет специфичность в отношении антигена CD20 и обладает улучшенной аффинностью связывания и/или улучшенной анти-CD20 активностью.

В некоторых анти-CD20 антителах или их антигенсвязывающих фрагментах по меньшей мере часть одного или более из доменов константной области удалена или изменена иным образом с получением требуемых биохимических характеристик, таких как сниженные эффекторные функции, способность нековалентной димеризации, повышенная способность к локализации в очаге опухоли, сниженный период полувыведения из сыворотки или повышенный период полувыведения из сыворотки по сравнению с цельным, неизмененным антителом с приблизительно такой же иммуногенностью. Например, некоторые антитела представляют собой антитела с удаленным доменом, которые содержат полипептидную цепь, похожую на тяжелую цепь иммуноглобулина, но не содержат по меньшей мере части одного или более доменов тяжелой цепи. Например, в некоторых антителах удален один целый домен константной области модифицированного антитела, например, удален весь или часть домена CH2.

В некоторых анти-CD20 антителах или их антигенсвязывающих фрагментах может быть мутирована Fc часть для снижения эффекторной функции при помощи известных в данной области техники технологий. Например, могут быть использованы модификации константной области для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных фрагментов, которые обеспечивают возможность улучшенной локализации благодаря повышенной специфичности антигена или гибкости антитела. Полученный физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты таких модификаций могут быть легко измерены и количественно определены при помощи общезвестных иммунологических технологий, без лишних экспериментов.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не вызывает неблагоприятный иммунный ответ у животного, подлежащего лечению, например, у человека. В одном из вариантов реализации анти-CD20 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть модифицированы для снижения их иммуногенности при помощи известных в данной области техники способов. Например, антитела могут быть гуманизированы, приматизированы, деиммунизированы или могут быть получены химерные антитела. Эти типы антител получают из нечеловеческого антитела, как правило, из антитела мышей или приматов, которое сохраняет или по существу сохраняет антигенсвязывающие свойства исходного антитела, но является менее иммуногенным у

людей. Это может быть достигнуто различными способами, включая (а) прививание целых нечеловеческих вариабельных доменов на человеческие константные области с получением химерных антител; (б) прививание по меньшей мере части одной или нескольких нечеловеческих определяющих комплементарность областей (CDR) в человеческий каркас и константные области с сохранением или без сохранения критических остатков каркаса; или (с) трансплантацию целых нечеловеческих вариабельных доменов, но "скрывание" их человекоподобным сегментом путем замены поверхностных остатков. Такие способы описаны в публикациях Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994) и в патентах США № 5585089, 5693761, 5693762 и 6190370, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Модифицированные формы антител или их антигенсвязывающих фрагментов могут быть получены из целого предшественника или исходных антител при помощи технологий, известных в данной области техники.

Антитела анти-CD20 или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены или изготовлены при помощи способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах реализации молекулы антител или их фрагменты являются "полученными рекомбинантно", т.е. полученными при помощи технологии рекомбинантной ДНК. Анти-CD20 антитела или их фрагменты могут быть получены любым подходящим способом, известным в данной области техники, включая получение поликлональных антител или получение моноклональных антител, например, при помощи гибридомы или фагового дисплея.

Для экспрессии молекул антитела могут быть использованы многочисленные векторные системы экспрессии. Клетка-хозяин может быть совместно трансфицирована двумя векторами экспрессии, где первый вектор кодирует полипептид, полученный из тяжелой цепи, а второй вектор кодирует полипептид, полученный из легкой цепи. Эти два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые могут обеспечивать равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепей. Альтернативно, может быть использован один вектор, который кодирует полипептиды и тяжелой, и легкой цепи. В таких ситуациях легкую цепь преимущественно помещают перед тяжелой цепью во избежание избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot, Nature, 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980)). Клетка-хозяин также может быть трансфицирована одним вектором, кодирующим полипептид, полученный из тяжелой цепи, и полипептид, полученный из легкой цепи. Кодирующие последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

Вектор или векторы экспрессии могут быть перенесены в клетку-хозяина путем обычных технологий, а затем трансфицированные клетки выращивают стандартными способами с получением антитела. Так, предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий антитело, или его тяжелую или легкую цепь, функционально связанный с гетерологичным промотором. В некоторых вариантах реализации изобретения для экспрессии двухцепочечных антител вектор, кодирующий и тяжелую, и легкую цепи, может быть совместно экспрессирован в клетке-хозяине для экспрессии целой молекулы иммуноглобулина.

Системы экспрессии генов представляют собой носители, при помощи которых могут быть получены, а затем очищены рассматриваемые кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые, будучи трансформированными или трансфицированными подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями, могут экспрессировать антитело CD20 *in situ*. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E.coli*, *B.subtilis*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии ДНК бактериофага, ДНК плазмиды или ДНК космиды, содержащими последовательности, кодирующие антитело; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей, содержащими последовательности, кодирующие антитело; клеточные системы насекомых, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вируса (например, бакуловирус), содержащими последовательности, кодирующие антитело; системы клеток растений, инфицированные рекомбинантными векторами экспрессии вируса (например, вирус мозаики цветной капусты, CaMV; вирус табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии плазмиды (например, плазмида Ti), содержащими последовательности, кодирующие антитело; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, BLK, 293, 3T3), содержащие рекомбинантные экспрессирующие конструкции с промоторами, полученными из генома клеток млекопитающих (например, металлотионеиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденоовируса; промотор вируса вакцины 7.5K). Для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела, например для экспрессии целых молекул рекомбинантного антитела, используют бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичников китайских хомячков (CHO), в сочетании с вектором, таким как элемент промотора главного промежуточного раннего гена из человеческого цитомегаловируса, представляют собой эффективную систему экспрессии антител (Foecking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)). В некоторых вариантах реализации изобретения

тения анти-CD20 антитело вырабатывается в клетке-хозяине, которая не представляет собой клетку СНО.

После рекомбинантной экспрессии антитела оно может быть очищено любыми методами, известными в данной области техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в частности по аффинности к специальному антигену после белка А, эксклюзационной колоночной хроматографией), центрифугированием, дифференциальной растворимостью или любым другим стандартным способом очистки белков.

В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело получают при помощи крысины клеточной линии гибридомы. В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело получают в клеточной линии YB2/0 (ATCC CRL-16 62).

IV. Фармацевтические композиции.

Соединение формулы (А) и анти-CD20 антитела могут быть введены в любом порядке или с любым интервалом, определенным специалистом в данной области техники. Например, соединение формулы (А) и анти-CD20 антитело могут быть введены последовательно (в любом порядке), одновременно или в любой комбинации последовательных и одновременных введений. Соединение формулы (А) и анти-CD20 антитело могут быть введены в форме одной фармацевтической композиции или в разных фармацевтических композициях.

Введение комбинации - одновременное, последовательное (в любом порядке) или в обоих вариантах - может быть осуществлено в соответствии с любым количеством требуемых интервалов времени в минутах (например, 0-60 мин), часах (например, 0-24 ч), днях (например, 0-7 дней) и/или неделях (например, 0-52 недели), что может быть решено и определено специалистом в данной области техники. Доза также может варьироваться с течением времени, например, начиная с одной дозы в неделю в течение некоторого периода времени (например, в течение 1, 2, 3, 4, 5 или 6 недель) с последующим введением доз один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в пять недель или один раз в шесть недель.

Соединение формулы анти-CD20 и анти-CD20 антитела могут быть составлены в фармацевтические композиции для введения млекопитающим, в том числе людям. Фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемые носители, включая, например, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфат, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси частичных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, цинковые соли, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на целлюлозной основе, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу натрия, поликарилаты, воски, блок-сополимеры полиэтилена-полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин.

Композиции могут быть введены любым подходящим способом, например парентерально, интравентрикулярно, перорально, ингаляцией спрея, локально, ректально, назально, буккально, вагинально или при помощи имплантированного резервуара. В некоторых вариантах реализации изобретения соединение формулы (А) вводят перорально. Термин "парентерально", используемый в настоящем документе, включает подкожный, внутривенный, внутримышечный, внутрисуставный, внутрисиновиальный, внутристернальный, внутритечальный, внутривеночный, внутритканевый и внутричерепной способ введения инъекций или инфузий.

Парентеральные составы могут представлять собой одну болюсную дозу, инфузию или насыщающую болюсную дозу после поддерживающей дозы. Эти композиции могут быть введены с определенными фиксированными или переменными интервалами, например один раз в сутки или "по мере необходимости". В некоторых вариантах реализации анти-CD20 антитело вводят внутривенно (IV).

Некоторые фармацевтические композиции могут быть введены перорально в приемлемой лекарственной форме, включая, например, капсулы, таблетки, водные суспензии или растворы. Некоторые фармацевтические композиции также могут быть введены назальным аэрозолем или ингаляцией. Такие композиции могут быть получены в виде растворов в солевом растворе с применением бензилового спирта или других подходящих консервантов, промоторов абсорбции для усиления биодоступности и/или других стандартных солюбилизаторов или диспергаторов.

Конкретная доза и режим лечения для любого конкретного пациента зависят от различных факторов, включая конкретные используемые терапевтические агенты, возраст пациента, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион, а также время введения, скорость экскреции, комбинацию лекарств и тяжесть конкретного заболевания, подлежащего лечению. Специалисты в данной области техники могут выполнить оценку таких факторов. Количество зависит также от конкретного пациента, подлежащего лечению, способа введения, типа состава, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и требуемого эффекта. Используемое количество может быть определено при помощи фармакологических и фармакокинетических принципов, общезвестных в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения анти-CD20 антитело вводят в дозе менее 187,5, 75, 37,5, 15, 7,5, 3,75 мг/м². В некоторых вариантах реализации введенная доза может составлять от 187,5 до

75 мг/м², от 75 до 37,5 мг/м², от 75 до 15 мг/м², от 75 до 7,5 мг/м² или от 75 до 3,75 мг/м².

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение формулы (A) вводят в диапазоне доз от 10 до 2500 мг/сутки, от 10 до 1500 мг/сутки, от 50 до 1000 мг/сутки, от 100 до 750 мг/сутки, от 150 до 500 мг/сутки. В некоторых вариантах реализации введенная доза может составлять от 200 до 400 мг/сутки. В некоторых вариантах реализации введенная доза может составлять 500, 1000, 1500, 2000 или 2500 мг/сутки.

В композиции могут быть включены также вспомогательные активные соединения. Например, анти-CD20 антитело и соединение формулы (A) могут быть составлены в композицию или введены совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, такими как противораковые агенты.

V. Наборы.

В настоящем изобретении предложены наборы, которые содержат соединение формулы (A), анти-CD20 антитела и другие агенты, которые могут быть использованы для осуществления способов, описанных в настоящем документе, и их комбинаций. В некоторых вариантах реализации изобретения набор содержит по меньшей мере одно очищенное анти-CD20 антитело в одном или более контейнерах, а также инструкции по применению такого антитела в комбинации с соединением формулы (A). В некоторых вариантах реализации набор содержит соединение формулы (A) и инструкции по применению этого ингибитора в комбинации с анти-CD20 антителом. В некоторых вариантах реализации набор содержит по меньшей мере одно анти-CD20 антитело и соединение формулы (A).

В настоящем документе предложены также фармацевтические наборы, содержащие один или более контейнеров, наполненных одним или более ингредиентами фармацевтических соединений и композиций согласно настоящему изобретению, включая соединение формулы (A) и/или одно или более анти-CD20 антител. Такие наборы также могут содержать, например, другие соединения и/или композиции, устройство(а) для введения соединений и/или композиций и письменные инструкции в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов.

Специалистам в данной области техники понятно, что описанные антитела и соединение формулы (A), описанное в настоящем документе, могут быть легко внедрены в общепринятые форматы наборов, которые хорошо известны в данной области техники.

Дополнительно предложены наборы, содержащие (а) соединение формулы (A), анти-CD20 антитело или их комбинацию и (б) дополнительный противораковый агент. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный противораковый агент представляет собой химиотерапевтический агент.

VI. Способы применения комбинаций соединения формулы (A) и антител анти-CD20.

В способах лечения заболеваний и расстройств у субъекта могут быть использованы комбинации соединения формулы (A) и анти-CD20 антител.

Следовательно, предложено применение соединения формулы (A) в производстве лекарственного средства для лечения пролиферативного расстройства, при этом соединение формулы (A) подлежит введению в комбинации (например, последовательно или одновременно) с анти-CD20 антителом. Кроме того, предложено также применение анти-CD20 антител в производстве лекарственного средства для лечения пролиферативного расстройства, при этом анти-CD20 антитело подлежит введению в комбинации (например, последовательно или одновременно) с соединением формулы (A).

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ подавления изоформы Р13Кδ и/или CD20 в организме пациента путем введения пациенту эффективного количества комбинации согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения, предупреждения и/или подавления Р13Кδ-опосредованного заболевания, расстройства или состояния и/или CD20-опосредованного заболевания, расстройства или состояния (такого как рак или другое пролиферативное заболевание или расстройство) у пациента путем введения пациенту эффективного количества комбинации согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения у пациента заболевания, расстройства или состояния, связанного с изоформой Р13Кδ и/или CD20, путем введения пациенту эффективного количества комбинации согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов реализации количество соединения, введенного в комбинации, является достаточным для лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с изоформой Р13Кδ и/или CD20, за счет селективного подавления Р13Кδ и/или CD20.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения пролиферативного заболевания путем введения пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества по меньшей мере одного соединения формулы (A) и антитела согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов реализации изобретения количество соединения, введенного в комбинации, достаточно для лечения пролиферативного заболевания за счет селективного подавления Р13Кδ и/или подавления CD20.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения пролиферативного заболевания путем введения пациенту, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества комбинации согласно настоящему изобретению в дополнительной комбинации (одновременно или последовательно) по меньшей мере с одним другим противораковым агентом. В одном из вариантов реализации изобретения количество введенного соединения А достаточно для лечения (или облегчения лечения) пролиферативного заболевания за счет селективного подавления Р13Кδ.

Комбинации согласно настоящему изобретению подходят для лечения различных раковых заболеваний, включая, но не ограничиваясь ими, следующие:

карциному, включая карциному молочного пузыря, молочной железы, толстой кишки, почек, печени, легких (включая мелкоклеточный рак легких), пищевода, желчного пузыря, матки, яичников, яичек, гортани, ротовой полости, желудочно-кишечного тракта (например, пищевода, желудка, поджелудочной железы), головного мозга, шейки матки, щитовидной железы, предстательной железы, крови и кожи (включая плоскоклеточную карциному);

гематопоэтические опухоли лимфоидного происхождения, включая лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лимфому волосатых клеток и лимфому Беркитта;

гематопоэтические опухоли миелоидного происхождения, включая острые и хронические миелогенные лейкозы, миклодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз;

опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому;

опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванному;

другие опухоли, включая меланому, семиному, тератокарциному, остеосаркому, пигментную ксенодерому, кератоктантому, тиреоидный фолликулярный рак и саркому Капоши.

Комбинации согласно настоящему изобретению в качестве модуляторов апоптоза подходят для лечения, предупреждения и подавления рака (включая, но не ограничиваясь ими, типы, упомянутые выше в настоящем документе).

Комбинации согласно настоящему изобретению подходят для химиопрофилактики рака. Химиопрофилактика включает замедление развития инвазивного рака путем блокирования инициации мутагенного события, блокирования прогрессирования клеток в состоянии злокачественного перерождения, которые уже претерпевали повреждение, или замедление рецидива опухоли. Эти соединения подходят также для подавления ангиогенеза и метастаза опухоли. Один из вариантов реализации настоящего изобретения представляет собой способ подавления ангиогенеза или метастаза у пациента путем введения эффективного количества одного или более соединений согласно настоящему изобретению.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения заболевания, связанного с иммунной системой (например, аутоиммунного заболевания), заболевания или расстройства, включаяющего воспаление (например, астмы, хронической обструктивной болезни легких, ревматоидного артрита, воспалительной болезни кишечника, гломерулонефрита, нейровоспалительных заболеваний, рассеянного склероза,uveита и расстройств иммунной системы), рака или других пролиферативных заболеваний, болезни или расстройства печени или болезни или расстройства почек. Указанный способ включает введение эффективного количества комбинации согласно настоящему изобретению.

Примеры иммунных расстройств, которые можно лечить соединениями согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, псориаз, ревматоидный артрит, васкулит, воспалительную болезнь кишечника, дерматит, остеоартрит, астму, воспалительную болезнь мышц, аллергический ринит, вагинит, интерстициальный цистит, склеродермию, остеопороз, экзему, отторжение аллогенного или ксеногенного трансплантата (органа, костного мозга, стволовых клеток и других клеток и тканей), болезнь "трансплантат против хозяина", эритематозную волчанку, воспалительное заболевание, диабет I типа, фиброз легких, дерматомиозит, синдром Шегрена, тиреоидит (например, тиреоидит Хашимото и аутоиммунный тиреоидит), миастению гравис, аутоиммунную гемолитическую анемию, рассеянный склероз, кистозный фиброз, хронический рецидивирующий гепатит, первичный билиарный цирроз, аллергический конъюнктивит и атопический дерматит.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения лейкоза у пациента путем введения терапевтически эффективного количества комбинации согласно настоящему изобретению. Например, способы согласно настоящему изобретению являются эффективными для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), неходжкинской лимфомы (NHL), острого миелоидного лейкоза (AML), множественной миеломы (MM), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL) и вялотекущей неходжкинской лимфомы (I-NHL).

В вышеупомянутых способах лечения с комбинациями согласно настоящему изобретению могут быть введены один или более дополнительных активных агентов. Например, комбинация согласно настоящему изобретению подходит при комбинировании (введении вместе или последовательно) с известными противораковыми способами лечения, такими как лучевая терапия, или с одним или более цитостатическими, цитотоксическими или противораковыми агентами, такими как, например, взаимодействующие с ДНК агенты, такие как цисплатин или доксорубицин; ингибиторы топоизомеразы II, такие как

этопозид; ингибиторы топоизомеразы I, такие как СРТ-11 или топотекан; взаимодействующие с тубулином агенты, такие как паклитаксел, доцетаксел или эпотилоны (например, иксабепилон), как природные, так и синтетические; гормональные агенты, такие как тамоксифен; ингибиторы тимидилат-синтетазы, такие как 5-фторурацил; и антиметаболиты, такие как метотрексат; другие ингибиторы тирозинкиназы, такие как пресса и OSI-774; ингибиторы ангиогенеза; ингибиторы EGF; ингибиторы VEGF; ингибиторы CDK; ингибиторы SRC; ингибиторы с-Kit; ингибиторы Her1/2 и моноклональные антитела, направленные против рецепторов фактора роста, такие как эрбитукс (EGF) и герцептин (Her2); и другие модуляторы протеинкиназ. Дополнительный активный агент также может представлять собой ингибитор протеасом, бортезомиб (Velcade®), карфилзомиб (PR-171), PR-047, дисульфирам, лактацистин, PS-519, эпонемицин, эпоксомицин, аклациномицин, СЕР-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341, винилсульфоновые трипептидные ингибиторы, ритонавир, PI-083, (+/-)-7-метиломуралид, (-)-7-метиломуралид, леналидомид (Revlimid®) или их комбинации.

Комбинации согласно настоящему изобретению подбираются также при комбинировании (введенные вместе или последовательно) с одним или более стероидными противовоспалительными лекарствами, нестероидными противовоспалительными лекарствами (NSAID) или иммуноселективными противовоспалительными производными (ImSAID).

В конкретном варианте реализации изобретения рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание и/или солидную опухоль. В другом конкретном варианте реализации злокачественное заболевание представляет собой лейкоз или лимфому.

В некоторых вариантах реализации лимфома является зрелой (периферической) В-клеточной неоплазмой. В конкретных вариантах реализации зрелая В-клеточная неоплазма выбрана из группы, состоящей из В-клеточного хронического лимфоцитарного лейкоза/мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы; В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза; лимфоплазмацитарной лимфомы; лимфомы маргинальной зоны, такой как В-клеточная лимфома маргинальной зоны селезенки (+/-ворсинчатые лимфоциты), лимфома нодальной маргинальной зоны (+/-моноцитоидные В-клетки) и В-клеточная лимфома экстранодальной маргинальной зоны лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT); лейкоза ворсинистых клеток; миеломы/плазмацитомы клеток плазмы; фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток центра фолликула; лимфомы из клеток мантийной зоны; диффузной В-крупноклеточной лимфомы (включая медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому и первичную лимфому полостей тела) и лимфомы Беркитта/лейкоза клеток Беркитта.

В некоторых вариантах реализации изобретения лимфома выбрана из группы, состоящей из множественной миеломы (ММ) и неходжкинской лимфомы (NHL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема (WM) или В-клеточной лимфомы и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL).

В дополнительном конкретном варианте реализации изобретения лейкоз выбран из группы, состоящей из острого лимфоцитарного лейкоза/острого лимфобластного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL). В некоторых вариантах реализации неходжкинская лимфома (NHL) является агрессивной NHL или вялотекущей NHL. Примеры агрессивной NHL включают В-клеточные неоплазмы, диффузную В-крупноклеточную лимфому, неоплазмы Т/NK клеток, анатомическую крупноклеточную лимфому, периферическую Т-клеточную лимфому, В-лимфобластный лейкоз/лимфому из клеток-предшественников, Т-лимфобластный лейкоз/лимфому из клеток-предшественников, лимфому Беркитта, Т-клеточную лимфому/лейкоз взрослых (HTLV1+), первичную лимфому ЦНС, лимфому из клеток мантийной зоны, полиморфное посттранспланационное лимфопролиферативное расстройство (PTLD), лимфому, связанную со СПИДом, истинную гистиоцитарную лимфому и бластическую NK-клеточную лимфому. Наиболее распространенный тип агрессивной NHL представляет собой диффузная крупноклеточная лимфома. Неограничивающие примеры вялотекущей NHL включают фолликулярную лимфому, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому маргинальной зоны (такую как лимфома экстранодальной маргинальной зоны (также называемая лимфоидной тканью слизистых оболочек - лимфома MALT), В-клеточная лимфома нодальной маргинальной зоны (моноцитоидная В-клеточная лимфома), лимфома маргинальной зоны селезенки) и лимфоплазмацитарную лимфому (макроглобулинемию Вальденстрема). В некоторых вариантах реализации субъект страдает от агрессивной NHL или вялотекущей NHL.

В некоторых вариантах реализации изобретения пациент страдает от состояния, выбранного из группы, состоящей из лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы (FL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) и мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), множественной миеломы (ММ) и лимфомы маргинальной зоны.

В некоторых вариантах реализации изобретения пациент страдает от рецидивирующего или невосприимчивого состояния. В конкретном варианте реализации субъект является невосприимчивым к химиотерапевтическому лечению или имеет рецидив после лечения химиотерапией.

В некоторых вариантах реализации изобретения рак является резистентным к лечению ритуксимабом. В некоторых вариантах реализации рак демонстрирует сниженный ответ на лечение ритуксимабом. В некоторых вариантах реализации субъект ранее проходил лечение ритуксимабом.

В конкретном варианте реализации изобретения указанные способы включают снижение уровня активности NF-к-В, снижение экспрессии SNAIL, повышение активности RKIP, повышение активности PTEN, повышение чувствительности опухоли к TRAIL-апоптозу, снижение уровня активности PI3Kδ или их комбинацию в организме пациента.

В конкретном варианте реализации комбинация соединения формулы (A) и анти-CD20 антитела истощает В-клетки в цельной крови человека. В некоторых вариантах реализации комбинация соединения формулы (A) и анти-CD20 антитела истощает В-клетки в цельной крови человека в более высокой степени, чем соединение формулы (A) или анти-CD20 антитело, используемые по отдельности, истощают В-клетки в цельной крови человека. В некоторых вариантах реализации комбинация соединения формулы (A) и анти-CD20 антитела истощает В-клетки в цельной крови человека в более высокой степени, чем сумма истощения за счет соединения формулы (A) и истощения за счет анти-CD20 антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения соединение формулы (A) и анти-CD20 антитело используют в способе лечения заболевания или расстройства, связанного с избыточной пролиферацией В-клеток, при этом указанный способ включает введение соединения формулы (A) и анти-CD20 антитела субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (A) и анти-CD20 антитело используют в способе лечения заболевания или расстройства, связанного с избыточной активностью В-клеток, при этом указанный способ включает введение соединения формулы (A) и анти-CD20 антитела субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах реализации соединение формулы (A) и анти-CD20 антитело используют в способе лечения заболевания или расстройства, связанного с избыточным количеством В-клеток, при этом указанный способ включает введение соединения формулы (A) и анти-CD20 антитела субъекту, нуждающемуся в этом.

Соединение формулы (A) может быть получено при помощи общих способов синтеза, описанных в публикации международной заявки на патент № WO 2011/055215 A2 и в публикации заявки на патент США № 2011/0118257 A1, а получение конкретного соединения описано в предварительной заявке на патент Индии 2693/CHE/2012, поданной 4 июля 2012 г., в предварительной заявке на патент США с серийным № 61/69158 6, поданной 21 августа 2012 г., PCT/US2013/055434, поданной 2 июля 2013 г. и США № 13/933856, поданной 2 июля 2013 г. Полное содержание каждой из этих заявок и публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры

Синтез соединения формулы (A).

Если не указано иное, то очистка подразумевает колоночную хроматографию с применением силикагеля в качестве неподвижной фазы и смеси петролейного эфира (кипящего при 60-80°C) и этилацетата или дихлорметана и метанола подходящей полярности в качестве подвижных фаз. Термин "комнатная температура" относится к температуре окружающей среды (25-28°C).

Промежуточное соединение 1. 2-(1-Бромэтил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он.

Стадия 1. [1-(5-Фтор-2-гидроксифенил)-2-(3-фторфенил)этанон].

3-Фторфенилуксусную кислоту (7,33 г, 47,56 ммоль) растворили в 25 мл дихлорметана. К этой смеси добавили оксалилхлорид (7,54 г, 59,46 ммоль) и ДМФА (3 капли) при 0°C и перемешивали в течение 30 мин. Растворитель выпарили и растворили остаток в 25 мл дихлорметана. К этой смеси добавили 4-фторанизол (5,00 г, 39,64 ммоль) и охладили до 0°C. При 0°C добавили AlCl_3 (7,95 г, 59,46 ммоль), нагрели смесь до комнатной температуры и перемешивали в течение 12 ч. Реакционную смесь погасили добавлением 2н. раствора HCl , экстрагировали этилацетатом, высушили над сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного твердого вещества (4,5 г, выход 45%).

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 11,34 (с, 1H), 7,75 (дд, $J=9,4, 3,1$ Гц, 1H), 7,42 (м, 2H), 7,12 (м, 3H), 7,05 (дд, $J=9,0, 4,5$ Гц, 1H), 4,47 (с, 2H).

Стадия 2. [2-Этил-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он].

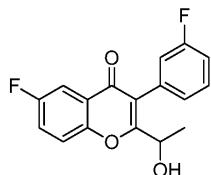
1-(5-Фтор-2-гидроксифенил)-2-(3-фторфенил)этанон, полученный на стадии 1 (3,00 г, 12,08 ммоль), поместили в круглодонную колбу и добавили к нему триэтиламин (25 мл) и пропионовый ангидрид (4,92 г, 37,82 ммоль), кипятили смесь с дефлэгматором в течение 24 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь подкислили 1н. раствором HCl , экстрагировали этилацетатом, промыли раствором бикарбоната натрия, высушили при помощи сульфата натрия и концентрировали. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде грязновато-желтого твердого вещества (1,80 г, выход 52%).

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 7,80 (м, 1H), 7,76 (м, 2H), 7,51 (дд, $J=8,0, 6,4$ Гц), 7,22 (м, 1H), 7,18 (м, 2H), 2,56 (к, $J=1,6$ Гц, 2H), 1,20 (т, $J=1,6$ Гц, 3H).

Стадия 3. К раствору 2-этил-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она, полученного на стадии 2 (1,80 г, 6,28 ммоль), в четыреххлористом углероде (20 мл) добавили N-бромусукцинимид (1,11 г, 6,28 ммоль) и нагрели до 80°C. К реакционной смеси добавили азо-бис-изобутиронитрил (10 мг) при 80°C. Через 12 ч реакционную смесь охладили до комнатной температуры, разбавили дихлорметаном и промыли водой. Органический слой высушили над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением с получением неочищенного указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (1,25 г, выход 55%).

¹Н-ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 7,91 (дд, J=9,2, 4,3 Гц, 1H), 7,81 (дт, J=8,2, 2,8 Гц, 1H), 7,74 (дд, J=8,3, 3,1 Гц, 1H), 7,57 (м, 1H), 7,32 (дт, J=8,5, 2,4 Гц, 1H), 7,19 (м, 2H), 5,00 (к, J=6,8 Гц, 1H), 1,97 (д, J=6,8 Гц, 3H).

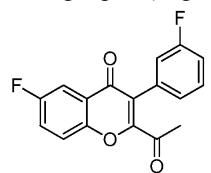
Промежуточное соединение 2. 6-Фтор-3-(3-фторфенил)-2-(1-гидроксиэтил)-4Н-хромен-4-он



К раствору промежуточного соединения 1 (15,0 г, 40,84 ммоль) в ДМСО (150 мл) добавили н-бутанол (7,5 мл) и нагревали до 120°C в течение 3 ч. Реакционную смесь охладили до комнатной температуры, погасили водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушили над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде грязновато-белого твердого вещества (7,90 г, 64%).

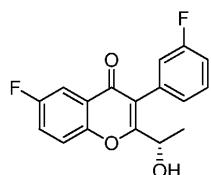
¹Н-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 7,85 (дд, J=8,1, 3 Гц, 1H), 7,54 (дд, J=9,2, 4,2 Гц, 1H), 7,47-7,37 (м, 2H), 7,15-6,98 (м, 3H), 4,74 (квинтет, J=6,8 Гц, 1H), 2,23 (д, J=1,4 Гц, 1H), 1,54 (д, J=6,6 Гц, 3H).

Промежуточное соединение 3. 2-Ацетил-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он



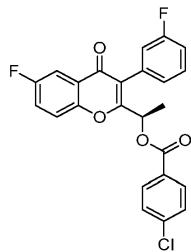
ДМСО (5,60 мл, 79,14 ммоль) добавили к дихлорметану (40 мл) и охладили до -78°C, затем добавили оксалилхлорид (3,40 мл, 39,57 ммоль). Через 10 мин по каплям добавили промежуточное соединение 2 (6,00 г, 19,78 ммоль) в дихлорметан (54 мл) и перемешивали в течение 20 мин. Добавили триэтиламин (12 мл) и перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь погасили водой и экстрагировали дихлорметаном. Органический слой высушили над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (4,2 г, 71%), которое использовали в этом виде на следующей стадии.

Промежуточное соединение 4. (S)-6-Фтор-3-(3-фторфенил)-2-(1-гидроксиэтил)-4Н-хромен-4-он



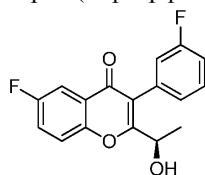
К промежуточному соединению 3 (2,00 г, 6,66 ммоль), добавили R-альпинборан (0,5 М в ТГФ, 20 мл) и нагревали до 60°C в течение 20 ч. Реакционную смесь погасили 2н. раствором HCl и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушили над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде грязновато-белого твердого вещества (1,51 г, 75%). Энантиомерный избыток: 94,2%, обогащенный быстро элюирующимся изомером (время удерживания: 8,78 мин), по результатам определения при помощи ВЭЖХ на колонке Chiralpak AD-H.

Промежуточное соединение 5. (R)-1-(6-Фтор-3-(3-фторфенил)-4-оксо-4Н-хромен-2-ил)этил 4-хлорбензоат



К раствору промежуточного соединения 4 (1,45 г, 4,78 ммоль) в ТГФ (15 мл) добавили 4-хлорбензойную кислоту (0,748 г, 4,78 ммоль) и трифенилфосфин (1,88 г, 7,17 ммоль) и нагрели до 45°C, затем добавили дизопропилазодикарбоксилат (1,4 мл, 7,17 ммоль). Через 1 ч реакционную смесь концентрировали, а остаток очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде грязновато-белого твердого вещества (1,81 г, 86%), которое использовали на следующей стадии без очистки.

Промежуточное соединение 6. (R)-6-Фтор-3-(3-фторфенил)-2-(1-гидроксиэтил)-4Н-хромен-4-он



Способ А.

Промежуточное соединение 5 (1,75 г, 3,96 ммоль) в метаноле (17 мл) охладили до 10°C, добавили карбонат калия (0,273 г, 1,98 ммоль) и перемешивали в течение 30 мин. Реакционную смесь концентрировали, подкислили 2н. раствором HCl, экстрагировали этилацетатом, высушили над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (1,05 г, выход 87%). Энантиомерный избыток: 93,6%, обогащенный вторым элюированным изомером (время удерживания: 11,12 мин.), по результатам определения при помощи ВЭЖХ на колонке Chiralpak AD-H.

Способ В.

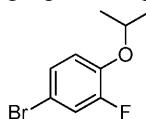
Стадия 1. [(R)-2-(1-(Бензилокси)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он].

К 1-(5-фтор-2-гидроксифенил)-2-(3-фторфенил)этанону (11,00 г, 44,31 ммоль) в дихлорметане добавили НАТУ (33,7 г, 88,63 ммоль) и R-(+)-2-бензилоксипропионовую кислоту (9,58 г, 53,17 ммоль) и перемешивали в течение 10 мин. По каплям добавили триэтиламин (66,7 мл, 0,47 моль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционную смесь погасили водой, экстрагировали дихлорметаном, высушили над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого твердого вещества (10,5 г, выход 60%).

¹Н-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 7,85 (dd, J=8,1, 3 Гц, 1H), 7,58 (dd, J=9,1, 4,1 Гц, 1H), 7,47-7,39 (m, 1H), 7,39-7,34 (m, 1H), 7,28-7,20 (m, 3H), 7,20-7,14 (m, 2H), 7,16-7,07 (m, 1H), 6,99-6,89 (m, 2H), 4,50-4,31 (m, 3H), 1,56 (d, J=6,4 Гц, 3H).

Стадия 2. (R)-2-(1-(Бензилокси)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он, полученный на стадии 1 (10,5 г, 26,69 ммоль) в дихлорметане (110 мл), охладили до 0°C, частями добавили хлорид алюминия (5,35 г, 40,03 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч. Реакционную смесь погасили 2н. раствором HCl, экстрагировали дихлорметаном, высушили над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением промежуточного соединения 6 в виде желтого твердого вещества (6,1 г, выход 76%). Энантиомерный избыток: 97,7%, обогащенный вторым элюированным изомером (время удерживания: 11,12 мин.), по результатам определения при помощи ВЭЖХ на колонке Chiralpak AD-H.

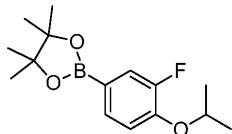
Промежуточное соединение 7. 4-Бром-2-фтор-1-изопропоксибензол



К раствору 4-бром-3-фторфенола (10 г, 52,35 ммоль) в ТГФ (100 мл) добавили изопропиловый спирт (4,8 мл, 62,62 ммоль) и трифенилфосфин (20,6 г, 78,52 ммоль) и нагрели до 45°C, затем добавили дизопропилазодикарбоксилат (15,4 мл, 78,52 ммоль). Смесь кипятили с дефлэгматором в течение 1 ч,

концентрировали, а остаток очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветной жидкости (13,1 г, выход 99%), которое использовали на следующей стадии без очистки.

Промежуточное соединение 8. 2-(3-Фтор-4-изопропоксифенил)-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан



Ацетат калия (10,52 г, 107,2 ммоль) и бис-(пинаколато)дибор (15 г, 58,96 ммоль) добавили к раствору промежуточного соединения 7 (10,52 г, 107,2 ммоль) в диоксане (125 мл) и дегазировали раствор в течение 30 мин. Под атмосферой азота добавили комплекс [1,1'-бис-(дифенилфосфино)ферроцен]дихлорпалладия(II) с CH_2Cl_2 (4,4 г, 5,36 ммоль) и нагрели до 80°C. Через 12 ч реакционную смесь отфильтровали через целин и концентрировали. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде желтого маслянистого вещества (13,9 г, 99%), которое использовали на следующей стадии без очистки.

Промежуточное соединение 9. 3-(3-Фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-4-амин



К раствору 3-йод-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-4-амина (11,0 г, 42,14 ммоль) в ДМФА (110 мл), этаноле (55 мл) и воде (55 мл) добавили промежуточное соединение 8 (23,4 г, 84,28 ммоль) и карбонат натрия (13,3 г, 126,42 ммоль) и дегазировали в течение 30 мин. Под атмосферой азота добавили тетракис-(трифенилфосфин)палладий(0) (2,4 г, 2,10 ммоль) и нагрели до 80°C. Через 12 ч реакционную смесь отфильтровали через целин, концентрировали и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушали над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт растворили с диэтиловым эфиром, отфильтровали и высушали под вакуумом с получением указанного в заголовке соединения в виде светло-коричневого твердого вещества (3,2 г, выход 26%), которое использовали в этом виде на следующей стадии.

(RS)-2-(1-(4-Амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он.

К раствору промежуточного соединения 9 (0,080 г, 0,293 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавили карбонат калия (0,081 г, 0,587 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. К этой смеси добавили промежуточное соединение 1 (0,215 г, 0,587 ммоль) и перемешивали в течение 12 ч. Реакционную смесь разбавили водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушали над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с метанолом:дихлорметаном с получением указанного в заголовке соединения в виде бледно-желтого твердого вещества (0,045 г).

Т.пл.: 175-177°C.

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 8,20 (с, 1H), 7,85 (дд, $J=81, 3,0$ Гц, 1H), 7,48-7,33 (м, 5H), 7,14 (т, $J=8,3$ Гц, 1H), 7,02 (м, 2H), 6,90 (м, 1H), 6,10 (к, $J=7,1$ Гц, 1H), 5,42 (с, 2H), 4,64 (квинтет, $J=6,0$ Гц, 1H), 1,99 (д, $J=7,1$ Гц, 3H), 1,42 (д, $J=6,1$ Гц, 6H).

(S)-2-(1-(4-Амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он ("S-изомер")

К раствору промежуточного соединения 9 (0,134 г, 0,494 ммоль) в ТГФ (2,0 мл) добавили промежуточное соединение 6 (0,150 г, 0,494 ммоль) и трифенилфосфин (0,194 г, 0,741 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавили дизопропилазодикарбоксилат (0,15 мл, 0,749 ммоль), нагрели до 45°C. Через 2 ч реакционную смесь погасили водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушали над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде грязновато-белого твердого вещества (0,049 г, выход 20%).

Т.пл.: 139-142°C.

Масса: 571,7 (M^+).

Энантиомерный избыток: 89,8%, определенный при помощи ВЭЖХ на колонке Chiralpak AD-H, обогащенный быстро элюирующимся изомером (время удерживания=10,64 мин).

(R)-2-(1-(4-Амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он.

К раствору промежуточного соединения 8 (0,284 г, 0,989 ммоль) в ТГФ (5,0 мл) добавили промежуточное соединение 4 (0,250 г, 0,824 ммоль) и трис-(4-метокси)фенилфосфин (0,435 г, 1,23 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавили дизопропилазодикарбоксилат (0,25 мл, 1,23 ммоль), перемешивали при комнатной температуре. Через 12 ч реакционную смесь погасили водой и экстрагировали этилацетатом. Органический слой высушали над сульфатом натрия и концентрировали под пониженным давлением. Неочищенный продукт очистили колоночной хроматографией с этилацетатом:петролейным эфиром с получением указанного в заголовке соединения в виде грязновато-белого твердого вещества (0,105 г, выход 22%).

Т.пл.: 145-148°C.

Масса: 571,7 (M⁺).

Энантиомерный избыток: 95,4%, определенный при помощи ВЭЖХ на колонке Chiralpak AD-H, обогащенный вторым элюированным изомером (время удерживания=14,83 мин).

Биологическая оценка комбинации соединения формулы (A) и анти-CD20 антитела.

Пример 1. Комбинации S-изомера соединения формулы (A) и ублитуксимаба истощают В-клетки в цельной крови.

Для сравнения способности S-изомера соединения формулы (A), ублитуксимаба (Ubx) и их комбинаций истощать В-клетки в цельной крови человека (HWB) использовали анализ проточной цитометрии. В этом анализе 50 мкл образца HWB обрабатывали либо S-изомером соединения формулы (A) (1000 нМ), либо UBX (от 100 до 0,1 мкг/мл), либо UBX в комбинации с S-изомером соединения формулы (A) в концентрации 1000 нМ и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. 20 мкл обработанного образца поместили в 1,5 мл центрифужные пробирки, маркировали при помощи CD45 FITC и CD19 PE или CD20 FITC антитела и инкубировали в темноте в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавили 1 мл лизирующего раствора красных кровяных клеток (RBC) и центрифугировали пробирки при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аспирировали, а к осадку добавили 250 мкл PBS. Пробирки встраивали на вортексе и при помощи проточного цитометра Guava® easyCyte™ получили 5000 событий, которые анализировали при помощи программы Incyte.

Популяцию CD45-положительных клеток, дающих сигнал выше порогового значения, дополнительно анализировали на CD19. Рассчитали количество клеток, которые были положительными для CD45 и CD19, и выразили данные в процентах содержания CD19-положительных клеток в популяции. CD20-положительные популяции селектировали как флуоресцентно-положительные минус немеченные клетки, а данные выразили в процентах CD20-положительных клеток в популяции. Рассчитали снижение CD19/CD20 популяции относительно контроля и выразили его как % истощения относительно контроля.

Результаты представлены на фиг. 1. S-изомер соединения формулы (A) не является цитотоксическим в отношении В-клеток в концентрациях до 10 мкМ. Поэтому при 1 мкМ S-изомера соединения формулы (A) не наблюдали снижения CD19-положительных или CD20-положительных В-клеток в HWB. Анти-CD20 антитело UBX обусловило лишь 20-30% истощения В-клеток в дозах от 1 до 100000 нг/мл, однако вызвало дозозависимое снижение CD20⁺ В-клеток. Комбинация 1000 нМ S-изомера соединения формулы (A) с 10 нг/мл UBX привела к усилению истощения CD19⁺ клеток, а комбинации 1000 нМ S-изомера соединения формулы (A) с 0,1-10 нг/мл концентрациями UBX привели к небольшому аддитивному эффекту на истощение CD20⁺ клеток. Эти результаты демонстрируют, что комбинация S-изомера соединения формулы (A) (1000 нМ) с UBX (10 нг/мл) демонстрирует усиление истощения CD19-положительных клеток и небольшой аддитивный эффект на истощение CD20-положительных клеток.

Пример 2. Комбинации S-изомера соединения формулы (A) и UBX влияют на LPS-индуцированную пролиферацию В-клеток.

Для изучения влияния S-изомера соединения формулы A, UBX и их комбинаций на LPS-индуцированную пролиферацию клеток CD19 и CD20 в HWB использовали проточную цитометрию. В этих экспериментах 250 мкл разбавленный (1:3,5 средой RPMI-HG) образец HWB обрабатывали либо S-изомером соединения формулы (A) (от 10 до 0,1 мкМ), либо UBX (от 100 до 0,1 мкг/мл), либо UBX с S-изомером соединения формулы (A) в концентрации 1000 нМ в течение 15 мин с последующей индукцией LPS в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали в течение 72 ч при 37°C и 5% CO₂. 20 мкл обработанного образца поместили в 1,5 мл центрифужные пробирки, и маркировали при помощи CD20 FITC и CD19 PE антитела и инкубировали в темноте в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавили 1 мл лизирующего раствора RBC и центрифугировали пробирки при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аспирировали, а к осадку добавили 250 мкл PBS. Пробирки встраивали на вортексе и на проточном цитометре Guava® easyCyte™ получили 5000 событий, которые анализировали при помощи программы Incyte.

Популяцию лимфоцит-положительных клеток, дающих сигнал выше порогового значения, дополнительно анализировали на CD19 и CD20. Рассчитали количество клеток, которые были положительны-

ми для CD19 и/или CD20, и выразили данные в процентах содержания положительных клеток в популяции. Рассчитали снижение положительной популяции относительно контроля с LPS-индуцией и выразили его как % подавления относительно контроля.

Результаты представлены на фиг. 2 и 3. S-изомер соединения формулы (A) (1 мкМ) обусловил дозозависимое подавление LPS-индуцированной пролиферации CD19⁺ В-клеток с применением HWB (~60%). Добавление 1 мкМ S-изомера соединения формулы (A) к различным концентрациям UBX не привело к увеличению ответа выше ~60% из-за минимального влияния UBX на CD19⁺ клетки. Однако отметили аддитивный эффект указанной комбинации на пролиферацию клеток CD19⁺ при концентрации UBX 100 нг/мл.

В отличие от его влияния на пролиферацию CD19⁺ клеток, S-изомер соединения формулы (A) обусловил ~40% подавление клеток CD20 при 1 мкМ. Замечен аддитивный эффект комбинации 1 мкМ S-изомера соединения формулы (A) с UBX, особенно для дозы 0,1 нг/мл.

Пример 3. Комбинации S-изомера соединения формулы (A) и UBX повышают апоптоз в раковых клетках.

Для определения влияния S-изомера соединения формулы A, UBX и их комбинаций на апоптоз в раковых клетках использовали *in situ* набор каспазы 3 (Millipore). Клетки поместили на 6-луночный планшет в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, обработали либо S-изомером соединения формулы (A) (1000 нМ), либо UBX (от 100 до 0,1 мкг/мл), либо UBX с S-изомером соединения формулы (A) в концентрации 1000 нМ и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки перенесли в микроцентрифужные пробирки для получения 100 мкл свежеприготовленного реагента FLICA™ и инкубировали в течение 1 ч при 37°C и 5% CO₂ без света. После обильного промывания промывочным буфером исследуемые образцы довели до равного количества клеток в PBS. 100 мкл каждой клеточной супензии перенесли на черные 96-луночные планшеты в двух экземплярах и считывали флуоресценцию при длине волны возбуждения 490 нм и длине волны испускания 520 нм в планшет-ридере. Интенсивность флуоресценции для контроля с ДМСО вычитали из значений для исследуемых соединений. Данные выразили как процент от максимального ответа (100%) и нанесли на график.

Результаты представлены на фиг. 4. UBX демонстрирует ограниченную способность индуцировать активность каспазы 3 в испытанных клеточных линиях, активность каспазы 3 была увеличена на 40-75% при инкубации клеточных линий с 1 мкМ S-изомера соединения формулы (A). Синергетический эффект комбинации был отмечен при 100 нг/мл UBX в клетках Daudi, тогда как в клеточных линиях RPMI-8226, Raji и U226B1 при более высоких концентрациях (10 и 100 нг/мл) UBX наблюдали аддитивный эффект.

Пример 4. Комбинация S-изомера соединения формулы (A) и UBX вызывает остановку клеточного цикла.

Для определения влияния S-изомера соединения формулы A, UBX и их комбинаций на клеточный цикл в раковых клетках использовали реагент для анализа клеточного цикла Millipore). В этих экспериментах клетки поместили в 6-луночный планшет в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, обработали либо S-изомером соединения формулы (A) (от 10 до 0,1 мкМ), либо UBX (от 100 до 0,1 мкг/мл), либо UBX с S-изомером соединения формулы (A) в концентрации 1000 нМ и инкубировали в течение 72 ч при 37°C и 5% CO₂. Клетки перенесли в микроцентрифужные пробирки для получения 50 мкл реагента клеточного цикла и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре без света. Затем клетки разбавили 300-400 мкл PBS и получили минимум 10000 событий на проточном цитометре Guava® easyCyte™. Данные анализировали при помощи программы Express Pro, а процент клеточной популяции в различных стадиях клеточного цикла относительно контроля представили в виде гистограмм.

На фиг. 5-10 представлены результаты, полученные с клетками U2 66B1 и Raji. Кроме того, в табл. 1-12 представлены количественные результаты, полученные с применением клеток U2 66B1, DB, Raji и Daudi.

Таблица 1

Клетки U266B1 - 72 ч инкубирования с соединением формулы А

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-G0
Контроль	60,22	4,29	31,72	3,01
10000 нМ	2,00	0,94	64,31	28,88
1000 нМ	47,80	4,69	47,13	0,88
100 нМ	48,69	5,49	45,76	0,75
10 нМ	55,33	5,38	39,28	0,76
1 нМ	57,73	4,87	36,19	0,94
0,1 нМ	59,26	6,55	30,71	2,75

Таблица 2

Клетки U266B1 - 72 ч инкубирования с анти-CD20 антителом UBX

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-G0
Контроль	60,22	4,29	31,72	3,01
100 нг/мл	52,95	7,91	39,65	1,95
10 нг/мл	56,85	6,34	37,86	0,78
1 нг/мл	58,81	7,07	36,07	0,51
0,1 нг/мл	57,53	7,63	35,64	1,35
0,01 нг/мл	59,32	6,57	35,48	0,74
0,001 нг/мл	60,79	6,00	30,49	1,34

Таблица 3

Клетки U266B1 - 72 ч инкубирования с UBX + соединение формулы (A) (1000 нМ)

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-G0
Контроль	60,22	4,29	31,72	3,01
100 нг/мл + Соед. А	1,25	0,68	84,46	12,76
10 нг/мл + Соед. А	1,68	1,20	84,97	11,70
1 нг/мл + Соед. А	47,97	3,81	46,37	0,63
0,1 нг/мл + Соед. А	47,31	4,28	46,47	0,50
0,01 нг/мл + Соед. А	47,48	3,84	46,51	0,56
0,001 нг/мл + Соед. А	47,09	3,97	47,05	0,59

Таблица 4

Клетки DB - 72 ч инкубирования с соединением формулы (A)

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-G0
Контроль	54,30	8,00	36,38	0,48
10000 нМ	1,40	0,89	94,87	2,06
1000 нМ	0,75	0,42	92,79	5,36
100 нМ	41,21	6,96	50,22	0,43
10 нМ	47,22	4,98	46,85	0,55
1 нМ	50,61	6,53	41,44	0,54
0,1 нМ	54,37	4,84	39,41	0,84

Таблица 5

Клетки DB - 72 ч инкубирования с анти-CD20 антителом UBX

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-G0
Control	54,30	8,00	36,38	0,48
100 нг/мл	45,98	7,66	46,55	0,67
10 нг/мл	49,52	10,07	40,56	0,56
1 нг/мл	51,36	6,46	40,07	0,52
0,1 нг/мл	56,34	12,34	38,40	1,10
0,01 нг/мл	54,99	7,73	34,79	0,73
0,001 нг/мл	54,38	9,45	34,02	0,59

Таблица 6

Клетки DB - 72 ч инкубирования с UBX + соединение формулы (A)

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-G0
Контроль	54,30	8,00	36,38	0,48
100 нг/мл + Соед. А	0,48	0,32	93,78	5,91
10 нг/мл + Соед. А	0,70	0,99	93,34	4,79
1 нг/мл + Соед. А	0,31	0,74	92,65	6,00
0,1 нг/мл + Соед. А	0,44	0,63	92,84	5,83
0,01 нг/мл + Соед. А	0,09	0,84	93,97	4,30
0,001 нг/мл + Соед. А	0,06	0,17	94,48	5,31

Таблица 7

Клетки Raji - 72 ч инкубирования с соединением формулы (A)

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-G0
Контроль	54,10	9,08	33,54	2,14
10000 нМ	10,12	23,17	58,09	4,90
1000 нМ	52,04	3,92	41,21	1,29
100 нМ	52,81	6,72	37,80	1,04
10 нМ	55,96	5,80	34,81	1,06
1 нМ	56,93	5,51	34,13	1,89
0,1 нМ	56,54	8,38	33,63	1,32

Таблица 8

Клетки Raji - 72 ч инкубирования с анти-CD20 антителом UBX

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-G0
Контроль	54,10	9,08	33,54	2,14
100 нг/мл	22,19	11,05	33,74	34,78
10 нг/мл	45,01	8,15	12,90	31,86
1 нг/мл	39,72	14,82	15,35	27,32
0,1 нг/мл	41,11	8,93	22,00	23,73
0,01 нг/мл	54,54	12,65	25,08	5,51
0,001 нг/мл	50,52	10,61	33,66	4,35

Таблица 9

Клетки Raji - 72 ч инкубирования с UBX + соединение формулы (A) (1000 нМ)

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-G0
Контроль	54,10	9,08	33,54	2,14
100 нг/мл + Соед. А	44,19	3,20	0,21	51,17
10 нг/мл + Соед. А	46,93	5,98	3,20	42,80
1 нг/мл + Соед. А	46,35	6,75	5,98	40,10
0,1 нг/мл + Соед. А	44,85	9,72	13,00	30,88
0,01 нг/мл + Соед. А	50,11	12,22	24,04	13,51
0,001 нг/мл + Соед. А	49,23	5,16	38,21	4,73

Таблица 10

Клетки Daudi - 72 ч инкубирования с соединением формулы (A)

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-Г0
Контроль	50,91	11,10	28,51	10,81
10000 нМ	2,53	21,92	65,03	5,01
1000 нМ	48,27	7,91	40,10	2,22
100 нМ	47,39	11,33	38,05	1,30
10 нМ	46,84	12,55	37,79	1,68
1 нМ	48,11	13,27	36,75	0,74
0,1 нМ	49,56	14,13	33,23	0,34

Таблица 11

Клетки Daudi - 72 ч инкубирования с анти-CD20 антителом UBX

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-Г0
Контроль	50,91	11,10	28,51	10,81
100 нг/мл	43,66	9,28	28,55	19,55
10 нг/мл	40,92	13,23	28,08	17,77
1 нг/мл	40,52	17,54	26,99	14,95
0,1 нг/мл	37,40	17,06	32,42	13,42
0,01 нг/мл	36,24	19,15	37,83	6,77
0,001 нг/мл	38,12	17,90	41,95	2,03

Таблица 12

Клетки Daudi - 72 ч инкубирования с UBX + соединение формулы (A) (1000 нМ)

Обработка	G0/G1	S	G2/M	Суб-Г0
Контроль	50,91	11,10	28,51	10,81
100 нг/мл + Соед. А	38,37	8,43	12,95	40,24
10 нг/мл + Соед. А	49,56	8,47	9,80	32,17
1 нг/мл + Соед. А	51,73	8,75	11,81	26,26
0,1 нг/мл + Соед. А	56,23	7,25	11,60	24,80
0,01 нг/мл + Соед. А	55,87	6,17	17,00	22,02
0,001 нг/мл + Соед. А	36,58	17,03	35,74	10,64

Эти результаты показывают, что клетки, приведенные в контакт с S-изомером соединения формулы (A), демонстрируют дозозависимую остановку G2/M. Кроме того, обработка UBX в течение 72 ч обусловила слабую остановку G2/M в клетках диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DB) и U266B1, при этом этот агент привел к увеличению количества клеток Суб-Г0 в клетках Raji и Daudi. Комбинация с 1 мкМ S-изомера соединения формулы (A) усилила ответ на UBX во всех испытанных клеточных линиях.

Пример 5. Комбинации S-изомера соединения формулы (A) и UBX синергетически усиливают апоптоз в раковых клетках.

Для определения влияния S-изомера соединения формулы А, UBX и их комбинаций на апоптоз в раковых клетках использовали *in situ* набор каспазы 3 (Millipore). Клетки поместили в 6-луночный планшет в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл, обрабатывали либо S-изомером соединения формулы (A) (200-5000 нМ), либо UBX (от 10000 до 10 нг/мл), либо UBX с S-изомером соединения формулы (A) (как указано) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки перенесли в микроцентрифужные пробирки для получения 10 мкл свежеприготовленного реагента FLICA™ и инкубировали в течение 1 ч при 37°C и 5% CO₂ без света. После обильного промывания промывочным буфером исследуемые образцы довели до равного количества клеток в PBS. 100 мкл каждой клеточной суспензии перенесли на черные 96-луночные планшеты в двух экземплярах и считывали флуоресценцию при длине волны возбуждения 490 нм и длине волны испускания 520 нм в планшет-ридере. Интенсивность флуоресценции для контроля с ДМСО вычитали из значений для исследуемых соединений. Данные выразили как активность каспазы 3 и рассчитали показатель аддитивности (С.И.). С.И. менее одного означает синергизм, равный единице означает аддитивный эффект, а более одного означает антагонизм.

Результаты представлены на фиг. 11 и в табл. 13-15 для клеточной линии DBCL LY1. UBX вызывает активность каспазы 3 в LY1. Активность каспазы 3 синергетически увеличивалась в присутствии UBX (во всех концентрациях) и S-изомера соединения формулы (A) (1000 нМ).

Результаты представлены на фиг. 12 и в табл. 16-18 для клеточной линии Raji лимфомы Беркитта. UBX вызывает активность каспазы 3 в LY1. Активность каспазы 3 синергетически увеличивалась в присутствии UBX (во всех концентрациях) и S-изомера соединения формулы (A) (200 нМ).

Таблица 13

Клетки LY1, инкубированные с S-изомером

[00253] S-изомер	
[00254] Концентрация (нМ)	[00255] Активность каспазы 3
[00256] 200	0,06
[00257] 1000	0,17
[00258] 5000	0,61

Таблица 14

Клетки LY1, инкубированные с UBX

[00259] UBX	
[00260] Концентрация (нг/мл)	[00261] Активность каспазы 3
[00262] 10	0,23
[00263] 100	0,32
[00264] 1000	0,53
[00265] 10000	0,59

Таблица 15

Клетки LY1, инкубированные с S-изомером и UBX

[00266] КОМБИНАЦИЯ			
S-изомер (нМ)	UBX (нг/мл)	Активность каспазы 3	С.И.
200	10	0,2715	0,6
200	100	0,3404	1,2
200	1000	0,5902	0,2
200	10000	0,6317	0,8
1000	10	0,3811	0,5
1000	100	0,5523	0,2
1000	1000	0,743	0,1
1000	10000	0,8181	0,1
5000	10	0,7359	0,5
5000	100	0,8339	0,3
5000	1000	0,999	0,0
5000	10000	0,999	0,0

Таблица 16

Клетки Raji, инкубированные с S-изомером

[00267] S-изомер	
[00268] Концентрация (нМ)	[00269] Активность каспазы 3
[00270] 200	0,36
[00271] 1000	0,56
[00272] 5000	0,80

Таблица 17

Клетки Raji, инкубированные с UBX

[00273] UBX	
[00274] Концентрация (нг/мл)	[00275] Активность каспазы 3
[00276] 10	0,18
[00277] 100	0,31
[00278] 1000	0,51
[00279] 10000	0,60

Таблица 18

Клетки Raji, инкубированные с S-изомером и UBX

[00280] КОМБИНАЦИЯ			
S-изомер (нМ)	UBX (нг/мл)	Активность каспазы 3	С.И.
200	10	0,696	0,20
200	100	0,895	0,04
200	1000	0,999	0,00
200	10000	0,993	0,00
1000	10	0,805	0,49
1000	100	0,939	0,11
1000	1000	0,928	0,13
1000	10000	0,866	0,30
5000	10	0,901	0,97
5000	100	0,829	2,03
5000	1000	0,861	1,52
5000	10000	0,844	1,80

Оценили три дополнительные клеточные линии, LY10 (DLBCL), Толедо (DLBCL) и Daudi (лимфома Беркитта), на влияние комбинаций S-изомера соединения формулы (А) и UBX на активность каспазы 3, как описано выше. Результаты представлены в табл. 19-21. Эти комбинации также демонстрируют синергетическую активацию каспазы 3.

Таблица 19

Клетки LY10, инкубированные с S-изомером и UBX (DLBCL)

S-изомер (нМ)	UBX (нг/мл)	Активность каспазы 3	С.И.
5000	50	0,999	0,021
1000	10	0,421	0,560
200	2	0,119	0,440

Таблица 20

Клетки Толедо, инкубированные с S-изомером и UBX (DLBCL)

S-изомер (нМ)	UBX (нг/мл)	Активность каспазы 3	С.И.
5000	50	0,988	0,336
1000	10	0,685	0,548
200	2	0,136	0,576

Таблица 21

Клетки Daudi, инкубированные с S-изомером и UBX (лимфома Беркитта)

S-изомер (нМ)	UBX (нг/мл)	Активность каспазы 3	С.И.
5000	50	0,999	0,004
1000	10	0,594	0,582
200	2	0,296	0,393

Оценили три клеточные линии лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), Jeko, Maver и Rec-1, на влияние комбинаций S-изомера соединения формулы (A) и UBX на активность каспазы 3, как описано выше. Результаты представлены в табл. 22-24. Указанные комбинации также демонстрируют синергетическую активацию каспазы 3, при этом синергия оптимизируется при более высоких концентрациях S-изомера и UBX.

Таблица 22

Клетки Jeko, инкубированные с S-изомером и UBX

S-изомер (нМ)	UBX (нг/мл)	Активность каспазы 3	С.И.
5000	50	0,999	0,000
1000	10	0,655	0,274
200	2	0,335	0,506

Таблица 23

Клетки Maver, инкубированные с S-изомером и UBX

S-изомер (нМ)	UBX (нг/мл)	Активность каспазы 3	С.И.
5000	50	0,999	0,000
1000	10	0,437	0,603
200	2	0,213	0,648

Таблица 24

Клетки Rec-1, инкубированные с S-изомером и UBX

S-изомер (нМ)	UBX (нг/мл)	Активность каспазы 3	С.И.
5000	50	0,999	0,000
1000	10	0,484	0,303
200	2	0,403	0,132

В целом, все эти результаты показывают, что S-изомер соединения формулы (A) и UBX эффективно усиливают активацию каспазы 3, маркера для апоптоза, в моделях В-клеточной лимфомы.

Настоящее изобретение было описано выше при помощи функциональных блоков, иллюстрирующих воплощение конкретных функций и их взаимосвязей. Границы указанных функциональных блоков в настоящем документе определены произвольно, для удобства описания. Могут быть определены другие границы при условии надлежащего выполнения конкретных функций и взаимосвязей.

Приведенное выше описание конкретных вариантов реализации изобретения иллюстрирует общую сущность настоящего изобретения с полнотой, позволяющей другим специалистам легко модифицировать и/или адаптировать такие конкретные варианты реализации к различным применением с применением известных в данной области техники знаний без излишнего экспериментирования, без отклонения от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, предполагается, что такие адаптации и модификации подпадают под понятие и входят в объем эквивалентов описанных вариантов реализации на основании указаний и руководств, представленных в настоящем документе. Следует понимать, что фразеология и терминология в настоящем документе использована для целей описания, а не ограничения, поэтому терминологию или фразеологию настоящего изобретения специалистам в данной области следует интерпретировать в свете представленных указаний и руководств. Ссылки, цитируемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ТГ Терапевтикс, Инк.
Ризен Фармасьютикалз СА
ЛФБ Биотехнолоджис

<120> КОМБИНАЦИЯ АНТИ-CD20 АНТИТЕЛА И СЕЛЕКТИВНОГО ИНГИБИТОРА КИНАЗЫ Р13

<130> 43-101wo1

<150> IN 4595/CHE/2012
<151> 2012-11-02

<150> US 61/771,812
<151> 2013-03-02

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> фрагмент антитела

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> фрагмент антитела

<400> 2

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr
1 5

<210> 3
<211> 11
<212> протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> фрагмент антитела

<400> 3

Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 118
<212> протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> фрагмент антитела

<400> 4

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 330
<212> протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> фрагмент антитела

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

030745

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 6
<211> 5
<212> протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> фрагмент антитела

<400> 6

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 7
<211> 3
<212> протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> фрагмент антитела

<400> 7

Ala Thr Ser
1

<210> 8
<211> 9
<212> протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> фрагмент антитела

<400> 8

Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 9
<211> 106
<212> протеин
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> фрагмент антитела

<400> 9

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 106

<212> протеин

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> фрагмент антитела

<400> 10

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

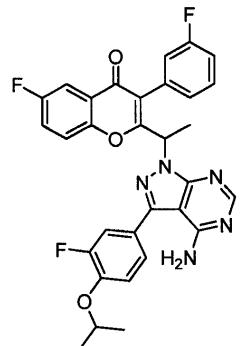
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ подавления пролиферации клеточной популяции, включающий приведение указанной популяции в контакт с комбинацией, содержащей:

(i) S-изомер или рацемическую смесь соединения формулы (A)



(A)

или его фармацевтически приемлемой соли или сольватата.

(ii) анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом указанное анти-CD20 антитело или его фрагмент представляют собой ублитуксимаб или связываются с тем же эпитопом, что и ублитуксимаб.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное антитело или его фрагмент содержат область V_H CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей SEQ ID NO: 1, 2 и 3 и область V_L CDR1, CDR2 и CDR3 последовательностей SEQ ID NO: 6, 7 и 8.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что указанное анти-CD20 антитело или его фрагмент содержит V_u SEO ID NO: 4 и V_l SEO ID NO: 9

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что указанное соединение формулы (A) представляет собой

(RS)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он или

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4H-хромен-4-он.

5. Способ подавления пролиферации клеточной популяции, включающий приведение указанной популяции в контакт с комбинацией, содержащей:

(i) по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из

(RS)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она или

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4H-хромен-4-она; и

(ii) по меньшей мере одно анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанное анти-CD20 антитело или его фрагмент выбрано из группы, состоящей из ритуксимаба, офатумумаба, окрелизумаба, велтузумаба, GA101, AME-133v, PRO131921, тозитумомаба, hA20 и PRO70769.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что популяцию приводят в контакт с композицией, содержащей:

(i) соединение, выбранное из группы, состоящей из

(RS)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она или

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) указанное анти-CD20 антитело.

8. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанную популяцию приводят в контакт:

(i) с первой композицией, содержащей соединение, выбранное из группы, состоящей из

(RS)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-d]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она или

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) со второй композицией, содержащей указанное анти-CD20 антитело.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанное анти-CD20 антитело представляет собой убилиуксимаб.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что соединение формулы (А) представляет со-

бой (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что указанная популяция находится в организме субъекта-человека.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что субъект страдает от заболевания или расстройства, связанного с избыточной пролиферацией В-клеток, рака или аутоиммунного заболевания или расстройства.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что рак представляет собой гематологическое злокачественное заболевание.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что гематологическое злокачественное заболевание представляет собой лимфому или лейкоз.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что гематологическое злокачественное заболевание выбрано из группы, состоящей из острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), множественной миеломы (MM), неходжкинской лимфомы (NHL), лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярной лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), В-клеточной лимфомы и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL).

16. Способ по любому из пп.11-15, отличающийся тем, что рак сверхэкспрессирует CD20.

17. Способ по любому из пп.11-16, отличающийся тем, что рак является невосприимчивым к химиотерапии.

18. Способ по любому из пп.11-17, отличающийся тем, что субъект ранее проходил лечение химиотерапией, ритуксимабом или их комбинацией.

19. Способ по любому из пп.11-18, отличающийся тем, что указанное соединение формулы (A) и указанное анти-CD20 антитело или его фрагмент вводят субъекту последовательно или одновременно.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что указанное соединение формулы (A) и указанное анти-CD20 антитело или его фрагмент содержатся в одной фармацевтической композиции или в разных фармацевтических композициях.

21. Набор для подавления пролиферации клеточной популяции, содержащий:

(i) по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из

(RS)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она или

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

(ii) анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

22. Набор по п.21, отличающийся тем, что указанное анти-CD20 антитело или его фрагмент представляют собой убдитуксимаб или связываются с тем же эпитопом, что и убдитуксимаб.

23. Набор по п.21 или 22, отличающийся тем, что указанное анти-CD20 антитело представляет собой убдитуксимаб.

24. Набор по любому из пп.21-23, отличающийся тем, что указанное соединение формулы (A) представляет собой (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он и указанное анти-CD20 антитело представляет собой убдитуксимаб.

25. Набор по любому из пп.21-24, отличающийся тем, что указанное анти-CD20 антитело или его фрагмент и указанное соединение содержатся в одной композиции или в разных композициях.

26. Набор по любому из пп.21-25, дополнительно содержащий инструкцию по применению указанного соединения формулы (A) в комбинации с анти-CD20 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(i) соединение формулы (A), выбранное из группы, состоящей из

(RS)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она или

(S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-она; и

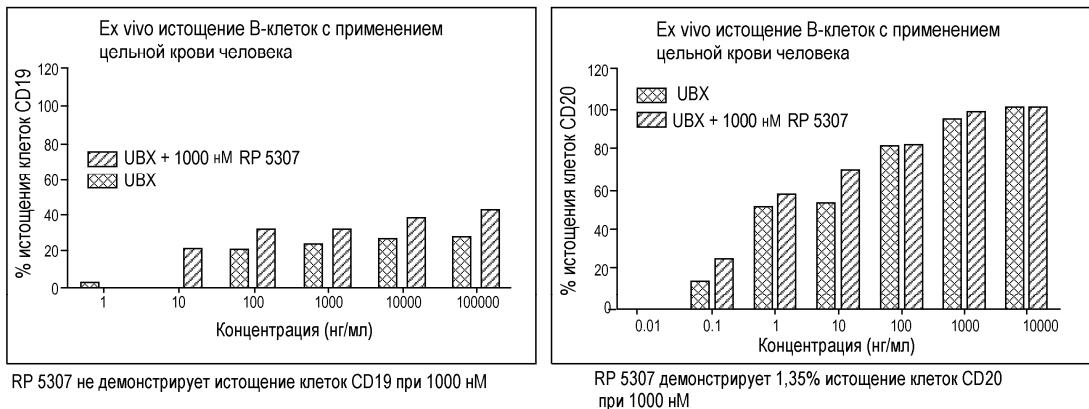
(ii) анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

28. Фармацевтическая композиция по п.27, отличающаяся тем, что указанное анти-CD20 антитело или его фрагмент представляют собой убдитуксимаб или связываются с тем же эпитопом, что и убдитуксимаб.

29. Фармацевтическая композиция по п.27 или 28, отличающаяся тем, что анти-CD20 антитело представляет собой убдитуксимаб.

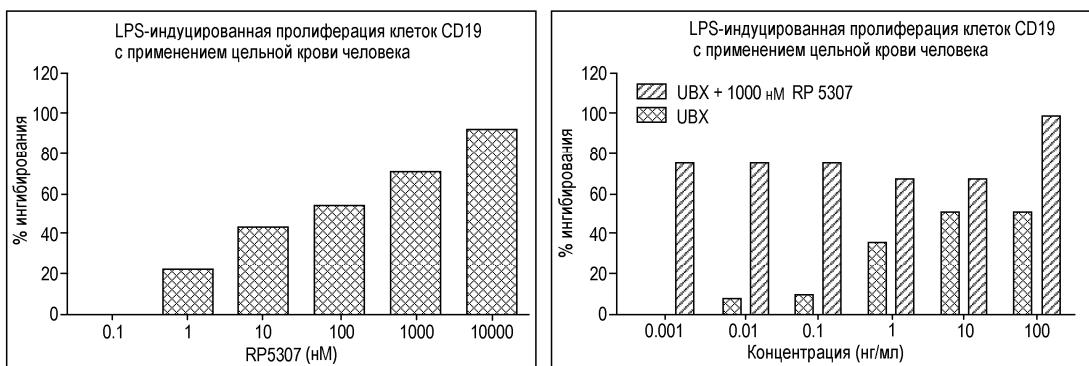
30. Фармацевтическая композиция по любому из пп.27-29, отличающаяся тем, что указанное соединение формулы (A) представляет собой (S)-2-(1-(4-амино-3-(3-фтор-4-изопропоксифенил)-1Н-пиразоло[3,4-д]пиrimидин-1-ил)этил)-6-фтор-3-(3-фторфенил)-4Н-хромен-4-он.

Результаты



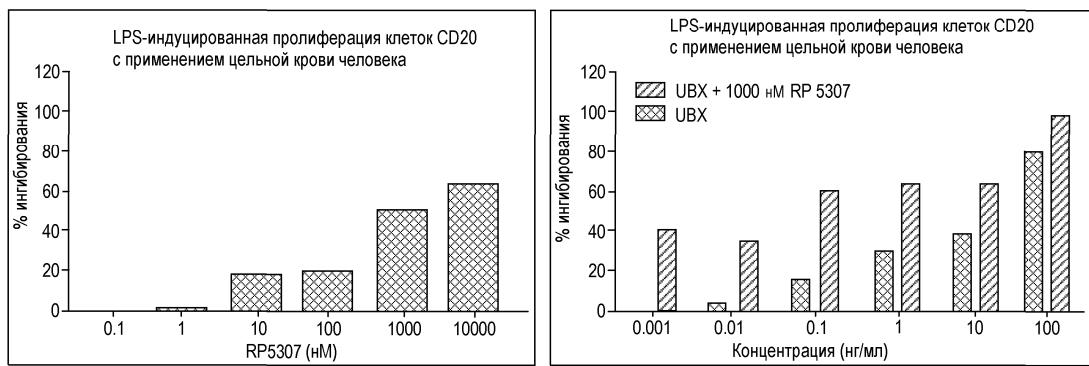
Фиг. 1

Результаты



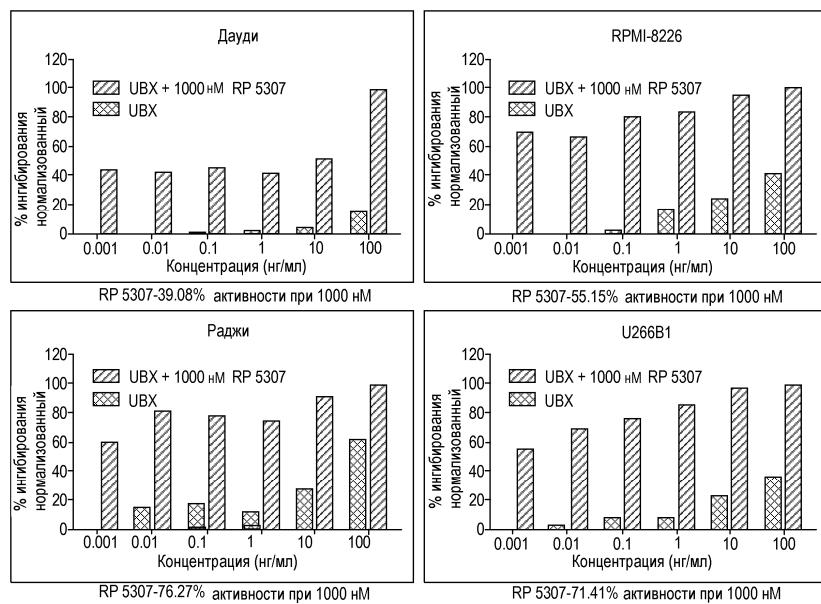
Фиг. 2

Результаты



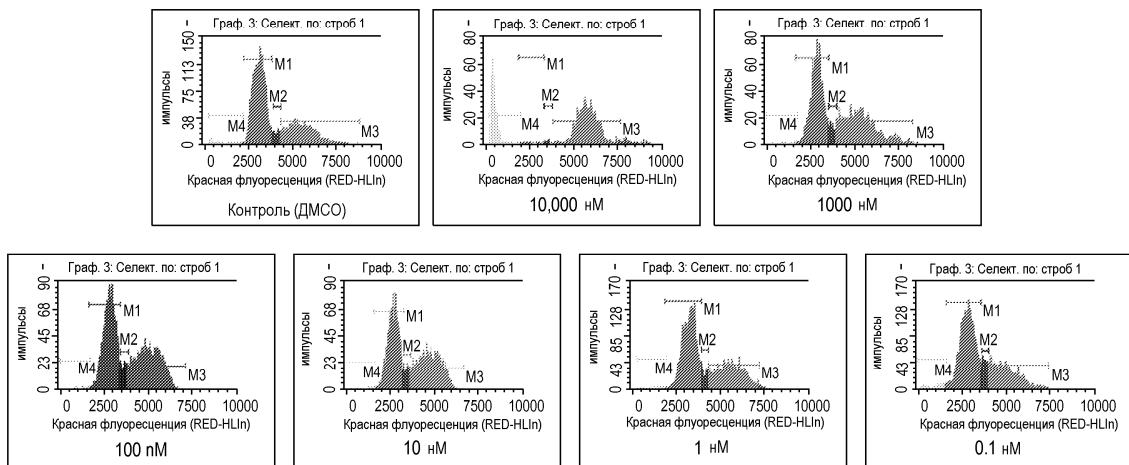
Фиг. 3

Результаты



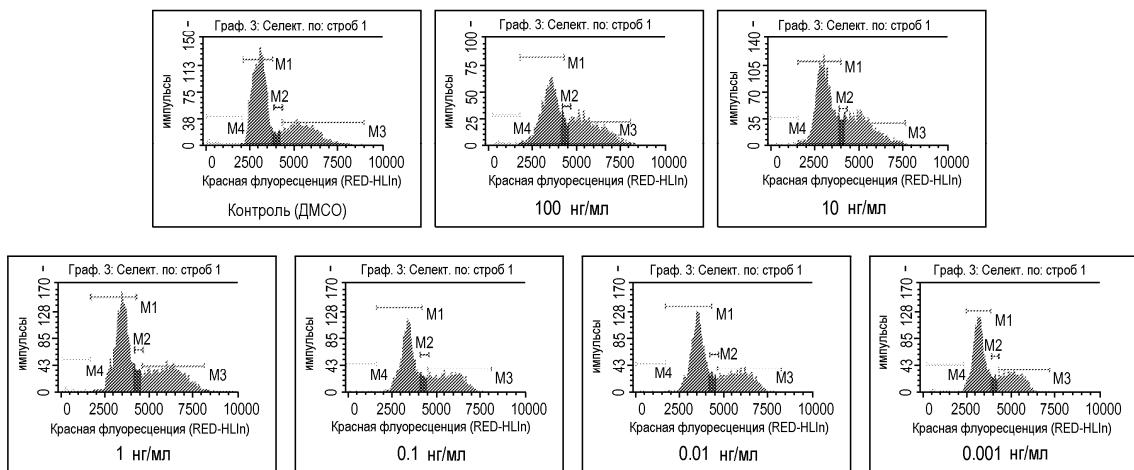
Фиг. 4

U266B1 – 72 часа инкубирования-RP 5307



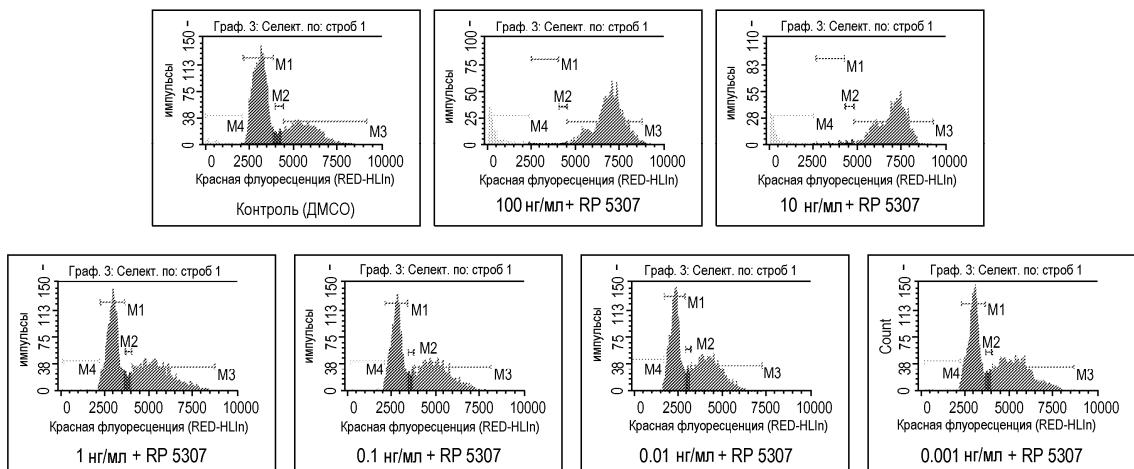
Фиг. 5

U266B1- 72 часа, анти-CD20 антитело UBX



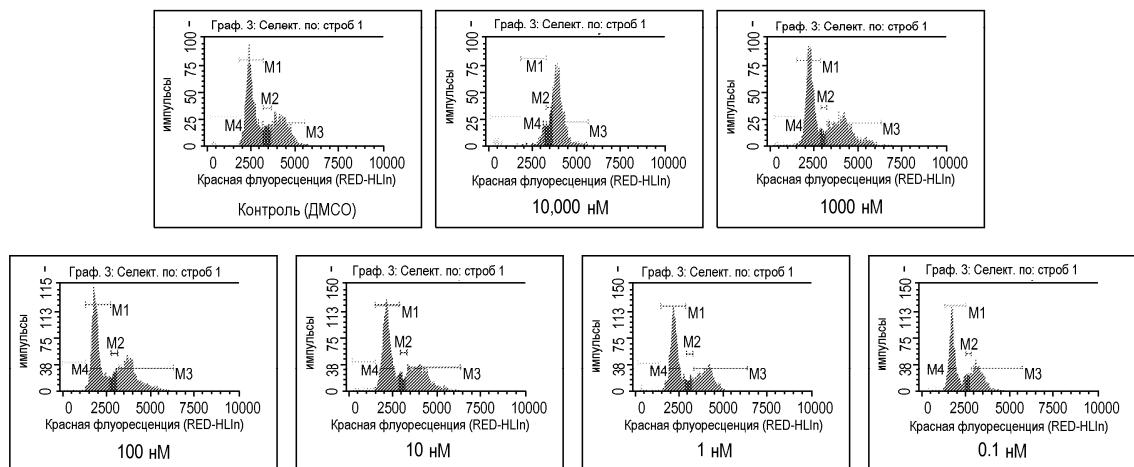
Фиг. 6

U266B1- 72 часа, UBX + RP 5307 (1000 нМ)



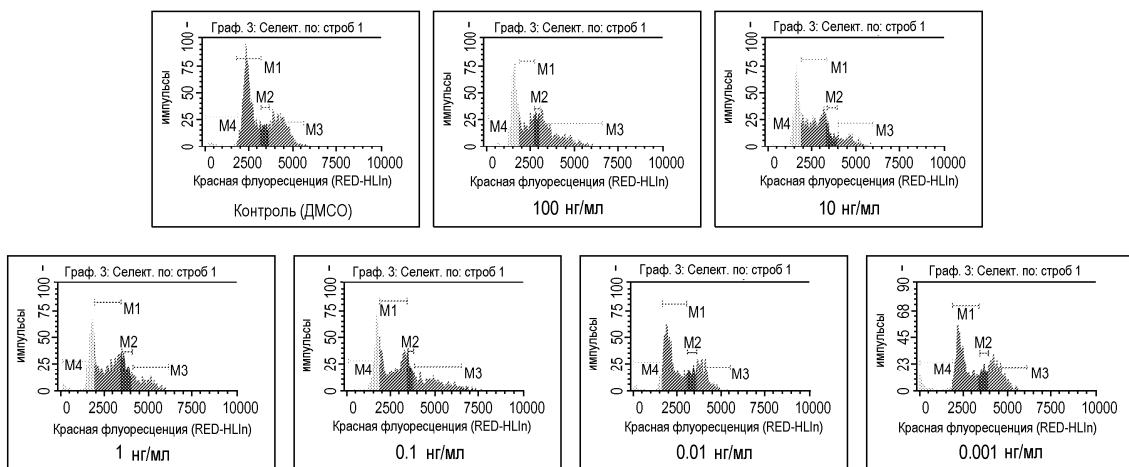
Фиг. 7

Raji - 72 часа инкубирования - RP 5307



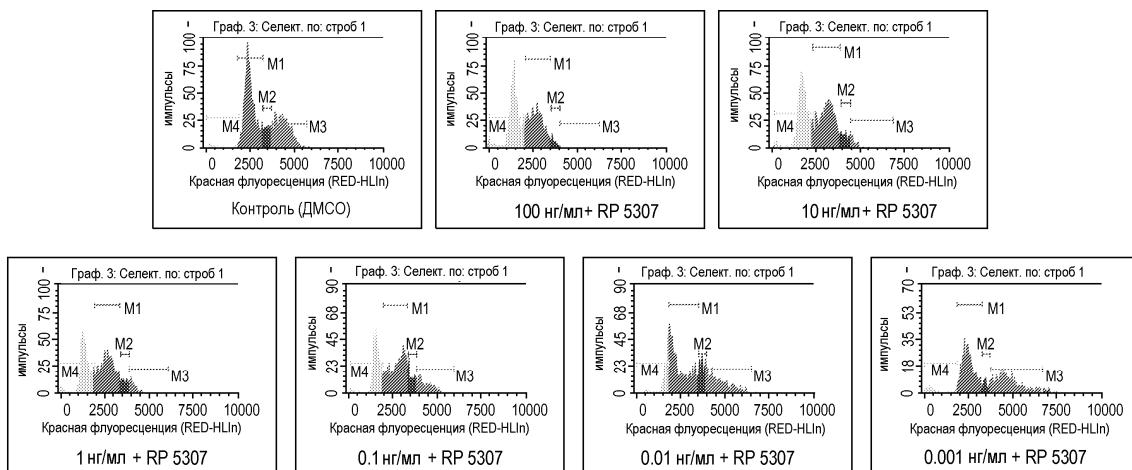
Фиг. 8

Raji - 72 часа, анти-CD20 антитело UBX



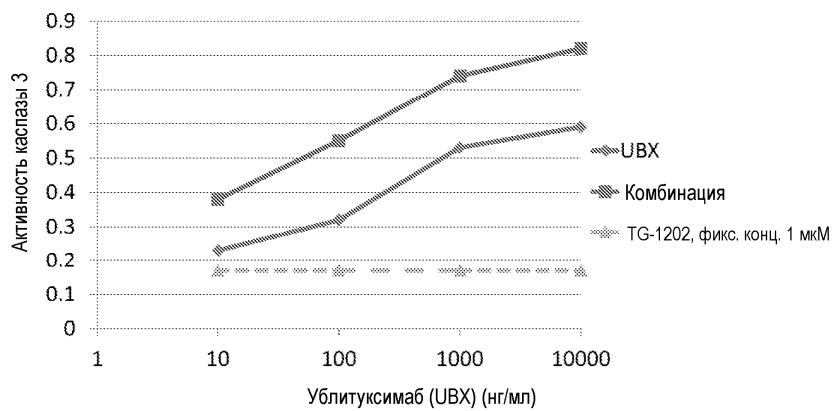
Фиг. 9

Raji - 72 часа, UBX + RP 5307 (1000 нМ)



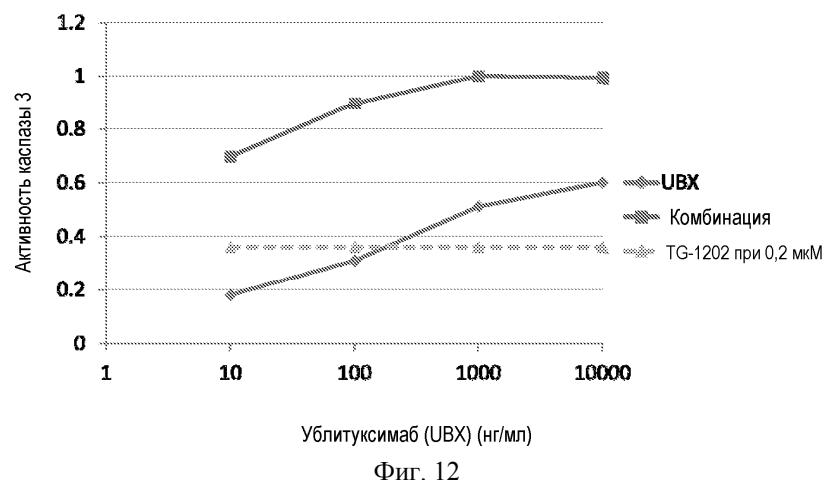
Фиг. 10

TGR-1202 и убlitуксимаб синергетически активируют каспазу 3
в клеточной линии DLBCL LY1



Фиг. 11

TGR-1202 и ублитуксимаб синергетически активируют каспазу 3
в клеточной линии Raji лимфомы Беркитта



Фиг. 12

