



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019021680-4 A2



* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 1 6 8 0 A 2 *

(22) Data do Depósito: 20/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 12/05/2020

(54) Título: TERAPIA DE COMBINAÇÃO COM CONJUGADO ANTICORPO-FÁRMACO ANTI-CD25???

(51) Int. Cl.: A61K 47/68; A61K 31/7068; A61K 45/06; A61P 35/00; A61P 35/02.

(30) Prioridade Unionista: 20/04/2017 GB 1706252.2; 20/04/2017 GB 1706251.4; 20/04/2017 GB 1706250.6; 20/04/2017 GB 1706249.8; 20/04/2017 GB 1706248.0; (...).

(71) Depositante(es): ADC THERAPEUTICS SA; MEDIMMUNE LIMITED.

(72) Inventor(es): PATRICIUS HENDRIKUS CORNELIS VAN BERKEL; LISA SKELTON; FRANCESCA ZAMMARCHI; JAY MARSHALL FEINGOLD; JENS WUERTHNER; JOHN HARTLEY.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018060214 de 20/04/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/193104 de 25/10/2018

(85) Data da Fase Nacional: 15/10/2019

(57) Resumo: A presente divulgação refere-se a terapias de combinação para o tratamento de condições patológicas, tal como câncer. Em particular, a presente divulgação refere-se a terapias de combinação compreendendo tratamento com um Conjugado de Anticorpo Fármaco (ADC) e um agente secundário.

SEQUENCIAS

SEQ ID NO. 1 (V=1 CDR):
QKILVYSGEAEVKNGSEEVKVSOKASOGGIFSRVYINWWRQMPQQGLEWWRQPLGVEN
YAKKPGGRVNTADKSTAYMELSSLRGEDTAVYYCARKKDFYWGAGSTLTVSSAS
TKPSQPNYPLA

SEQ ID NO. 2 (V=1 CDR):
SVVLTSGTCILSLPQTETATISCAVNSQVSSYLAHYDQKPGCAFLLVYQASSPATGPD
RPSFGCGSGLDTFTLHSLEPEDFANYYDQC/GSSPLTFGGGTNEENRTVAAFSVFFP

SEQ ID NO. 3 (V=1 CDR):
RYVN

SEQ ID NO. 4 (V=1 CDR):
RPLILSVENYAKQFCG

SEQ ID NO. 5 (V=1 CDR):
KDWFGV

SEQ ID NO. 6 (V=1 CDR):
PASGSVSVSYLA

SEQ ID NO. 7 (V=1 CDR):
QASSPAT

SEQ ID NO. 8 (V=1 CDR):
GQYCGSSPLT

"TERAPIA DE COMBINAÇÃO COM UM CONJUGADO DE ANTICORPO ANTI-CD25-FÁRMACO"

REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS CORRELATOS

[001]Este pedido reivindica o benefício dos documentos GB1706252.2, GB1706251.4, GB1706250.6, GB1706249.8, GB1706248.0, GB1706247.2, GB1706246.4, GB1706245.6, todos depositados em 20 de abril de 2017, e GB1805189.6 depositado em 29 de março de 2017.

CAMPO

[002]A presente divulgação refere-se a terapias de combinação para o tratamento de condições patológicas, como câncer. Em particular, a presente divulgação refere-se a terapias de combinação compreendendo tratamento com um Conjugado de Fármaco e Anticorpo (ADC) e um agente secundário.

ANTECEDENTES

Terapia com Anticorpo

[003]A terapia com anticorpos foi estabelecida para o tratamento direcionado de indivíduos com câncer, distúrbios imunológicos e angiogênicos (Carter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6: 343-357). O uso de conjugados anticorpo-fármaco (ADC), ou seja, imunoconjugados, para a entrega local de agentes citotóxicos ou citostáticos, ou seja, fármacos para matar ou inibir células tumorais no tratamento de câncer, tem como alvo a entrega da porção de fármaco a tumores e acúmulo intracelular enquanto que a administração sistêmica desses agentes não conjugados pode resultar em níveis inaceitáveis de toxicidade para células normais (Xie *et al* (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6 (3): 281-291; Kovtun *et al* (2006) *Cancer Res.* 66 (6): 3214-3121; Law *et al* (2006) *Cancer Res.* 66 (4): 2328-2337; Wu *et al* (2005) *Nature Biotech.* 23 (9): 1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5: 543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9): 1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trai *et al* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337;

Syrigos e Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614).

CD25

[004]A proteína transmembrana CD25 do tipo I está presente nas células T e B ativadas, em alguns timócitos, precursores mieloides e oligodendrócitos. Nas células T ativadas, isso forma heterodímeros com as subunidades beta e gama (CD122 e CD132), compreendendo assim o receptor de alta afinidade para IL-2. Esse ligante representa um fator de sobrevivência das células T ativadas, pois a remoção de IL-2 leva à morte imediata dessas células.

[005]No caso das células B, o CD25 é fisiologicamente expresso nos estágios iniciais de desenvolvimento das células pró-B e pré-B tardias. As doenças malignas decorrentes deste estágio de diferenciação de células B podem, portanto, também expressar CD25. As lesões de mastócitos também são positivas para CD25, o que é considerado, assim, um critério diagnóstico chave para a determinação da mastocitose sistêmica. Nos linfomas de Hodgkin, o CD25 é relatado como não expresso nas células de Hodgkin-Reed-Sternberg no linfoma de Hodgkin com predominância de linfócitos nodulares (NLPHL), enquanto o mesmo tipo de célula expressa CD25 em níveis variáveis nos linfomas clássicos de Hodgkin do tipo de celularidade mista. Os níveis de expressão geral são relatados como inferiores aos linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), o que pode resultar em problemas demonstrando células tumorais CD25 nesses casos (Levi et al., Merz et al, 1995).

[006]Também foi relatada a expressão do antígeno alvo para vários subtipos derivados de células B e T de linfomas não Hodgkin, isto é, leucemia linfática crônica de células B, leucemia de células pilosas, linfoma linfocítico de pequenas células/leucemia linfocítica crônica, bem como leucemia/linfoma de células T de adulto e linfoma anaplásico de células grandes.

[007]O CD25 pode estar localizado na membrana, com alguma expressão observada no citoplasma. O CD25 solúvel também pode ser observado fora das

células, como no soro.

Usos terapêuticos de ADCs anti-CD25

[008]A eficácia de um Conjugado de Fármaco e Anticorpo compreendendo um anticorpo anti-CD25 (um ADC anti-CD25) no tratamento de, por exemplo, câncer foi estabelecida-ver, por exemplo, WO2014/057119, WO2016/083468, e WO2016/166341.

[009]A pesquisa continua a melhorar ainda mais a eficácia, tolerabilidade e utilidade clínica dos ADCs anti-CD25. Para esse fim, os presentes autores identificaram terapias de combinação clinicamente vantajosas nas quais um ADC anti-CD25 é administrado em combinação com pelo menos um agente secundário.

SUMÁRIO

[010]Os presentes autores determinaram que a administração de uma combinação de ADC e agente secundário a um indivíduo leva a vantagens clínicas inesperadas.

[011]Assim, em um aspecto, a divulgação fornece um método para o tratamento de um distúrbio em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um ADC e de um agente secundário.

[012]O distúrbio pode ser uma doença proliferativa, por exemplo, um câncer, tal como Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, incluindo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL) e leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo Filadélfia (Ph-ALL).

[013]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma

neoplasia compreendendo células CD25+ve e CD25-ve.

[014]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia composta por células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ve, tais como células T CD25+ve.

[015]O neoplasma alvo ou células neoplásicas podem ser todo ou parte de um tumor sólido.

[016]"Tumor sólido" neste documento será entendido como incluindo cânceres hematológicos sólidos, como linfomas (linfoma de Hodgkin ou linfoma não-Hodgkin), os quais são discutidos em mais detalhes aqui.

[017]Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, compreendendo ou compostos de células neoplásicas CD25+ve. Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, infiltrados com células T CD25+ve; tais tumores sólidos podem não ter expressão de CD25 (isto é, compreender ou ser composto por células neoplásicas CD25-ve).

[018]Por exemplo, o tumor sólido pode ser um tumor com altos níveis de células T reguladoras (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., *Targ Oncol* (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res.* Janeiro de 2017; 27 (1): 109-118) Portanto, o tumor sólido pode ser câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

[019]O ADC pode ser ADC anti-CD25, como o ADCX25 aqui descrito.

[020]O agente secundário pode ser um inibidor de tirosina quinase de Bruton (BTKi), um antagonista de PD1, um antagonista de PD-L1, um agonista de GITR, um agonista de OX40, um antagonista de CTLA-4, Fludarabina ou citarabina ou um agente de hipometilação.

[021]O indivíduo pode ser humano. O indivíduo pode ter câncer ou pode ter sido determinado como tendo câncer. O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer CD25+ ou células não tumorais associadas ao tumor CD25+, tal como células T infiltrantes CD25+.

[022]O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer PD-L1+.

[023]Nos métodos divulgados, o ADC pode ser administrado antes do agente secundário, simultaneamente com o agente secundário ou após o agente secundário. Os métodos divulgados podem compreender a administração de um agente quimioterapêutico adicional ao indivíduo.

[024]Em outro aspecto, a divulgação fornece uma primeira composição compreendendo um ADC para uso em um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo, em que o tratamento compreende a administração da primeira composição em combinação com uma segunda composição compreendendo um agente secundário.

[025]Também é fornecida por este aspecto uma primeira composição compreendendo um agente secundário para uso em um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo, em que o tratamento compreende a administração da primeira composição em combinação com uma segunda composição compreendendo um ADC.

[026]O distúrbio pode ser uma doença proliferativa, por exemplo, um câncer, tal como Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, incluindo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL) e leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo

Filadélfia (Ph-ALL).

[027]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia compreendendo células CD25+ve e CD25-ve.

[028]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia composta por células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ve, tais como células T CD25+ve.

[029]O neoplasma alvo ou células neoplásicas podem ser todo ou parte de um tumor sólido.

[030]“Tumor sólido” neste documento será entendido como incluindo cânceres hematológicos sólidos, como linfomas (linfoma de Hodgkin ou linfoma não-Hodgkin), os quais são discutidos em mais detalhes aqui.

[031]Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, compreendendo ou compostos de células neoplásicas CD25+ve. Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, infiltrados com células CD25+ve, tais como células T CD25+ve, esses tumores sólidos podem não ter expressão de CD25 (isto é, compreender ou ser composto por células neoplásicas CD25-ve).

[032]Por exemplo, o tumor sólido pode ser um tumor com altos níveis de células T infiltrantes, como células T reguladoras infiltrantes (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., Targ Oncol (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, Immunity 46, 1–10; Tanaka, A., et al., Cell Res. 27 de Jan de 2017(1):109-118). Portanto, o tumor sólido pode ser câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

[033]O ADC pode ser ADC anti-CD25, como o ADCX25 aqui descrito.

[034]O agente secundário pode ser um inibidor de tirosina quinase de Bruton (BTKi), um antagonista de PD1, um antagonista de PD-L1, um agonista de GITR, um agonista de OX40, um antagonista de CTLA-4, Fludarabina ou citarabina ou um agente de hipometilação.

[035]O indivíduo pode ser humano. O indivíduo pode ter câncer ou pode ter sido determinado como tendo câncer. O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer CD25+ ou células não tumorais associadas ao tumor CD25+, tais como células T infiltrantes CD25+.

[036]O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer PD-L1+.

[037]A primeira composição pode ser administrada antes da segunda composição, simultaneamente com a segunda composição ou após a segunda composição. O tratamento pode compreender a administração de um agente quimioterapêutico adicional ao indivíduo.

[038]Em um aspecto adicional, a divulgação fornece o uso de um ADC na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio em um indivíduo, em que o medicamento compreende um ADC e em que o tratamento compreende a administração do medicamento em combinação com uma composição compreendendo um agente secundário.

[039]Também é fornecido por este aspecto o uso de um agente secundário na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio em um indivíduo, em que o medicamento compreende um agente secundário e em que o tratamento compreende a administração do medicamento em combinação com uma composição compreendendo um ADC.

[040]O distúrbio pode ser uma doença proliferativa, por exemplo, um câncer, tal como Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, incluindo linfoma difuso de células B

grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL) e leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo Filadélfia (Ph-ALL).

[041]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia compreendendo células CD25+ve e CD25-ve.

[042]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia composta por células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ve, tal como células T CD25+ve.

[043]O neoplasma alvo ou células neoplásicas podem ser todo ou parte de um tumor sólido.

[044]“Tumor sólido” neste documento será entendido como incluindo cânceres hematológicos sólidos, como linfomas (linfoma de Hodgkin ou linfoma não-Hodgkin), os quais são discutidos em mais detalhes aqui.

[045]Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, compreendendo ou compostos de células neoplásicas CD25+ve. Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, infiltrados com células CD25+ve, como células T CD25+ve; esses tumores sólidos podem não ter expressão de CD25 (isto é, compreender ou ser compostos por células neoplásicas CD25-ve).

[046]Por exemplo, o tumor sólido pode ser um tumor com altos níveis de células T infiltrantes, tal como células T regulatórias infiltrantes (Treg; Ménétrier-Caux, et al., Targ Oncol (2012) 7:15-28; Arce Vargas et al., 2017, immunity 46, 1-10; Tanaka, A., et al., Cell Res. Jan 2017;27(1):109-118). Por conseguinte, o tumor sólido pode ser

câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de célula não pequena, câncer ovariano, carcinoma hepatocelular, carcinoma de célula renal e câncer de cabeça e pescoço.

[047]O ADC pode ser ADC anti-CD25, como o ADCX25 aqui descrito.

[048]O agente secundário pode ser um inibidor da Tiroxina Cinase de Bruton (BTKi), um antagonista de PD1, um antagonista de PD-L1, um agonista de GITR, um agonista de OX40, um antagonista de CTLA-4, Fludarabina ou Citarabina ou um agente de hipometilação.

[049]O indivíduo pode ser humano. O indivíduo pode ter câncer ou pode ter sido determinado como tendo câncer. O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer CD25+ ou células não tumorais associadas ao tumor CD25+, tal como células T infiltrantes CD25+.

[050]O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer PD-L1+.

[051]O medicamento pode ser administrado antes da composição, simultaneamente com a composição ou após a composição. O tratamento pode compreender a administração de um agente quimioterapêutico adicional ao indivíduo.

[052]Outro aspecto da divulgação fornece um kit que compreende:
um primeiro medicamento compreendendo um ADC;
um segundo medicamento compreendendo um agente secundário; e,
opcionalmente,

uma bula que compreende instruções para administração do primeiro medicamento a um indivíduo em combinação com o segundo medicamento para o tratamento de um distúrbio.

[053]Também é fornecido por este aspecto um kit compreendendo um medicamento compreendendo um ADC e uma bula compreendendo instruções para

administração do medicamento a um indivíduo em combinação com uma composição compreendendo um agente secundário para o tratamento de um distúrbio.

[054]Além disso, é fornecido por este aspecto um kit que compreende um medicamento que compreende um agente secundário e uma bula que compreende instruções para administração do medicamento a um indivíduo em combinação com uma composição que compreende um ADC para o tratamento de um distúrbio.

[055]O distúrbio pode ser uma doença proliferativa, por exemplo, um câncer, tal como Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, incluindo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL) e leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo Filadélfia (Ph-ALL).

[056]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia compreendendo células CD25+ve e CD25-ve.

[057]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia composta por células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ve, tais como células T CD25+ve.

[058]O neoplasma alvo ou células neoplásicas podem ser todo ou parte de um tumor sólido.

[059]“Tumor sólido” neste documento será entendido como incluindo cânceres hematológicos sólidos, como linfomas (linfoma de Hodgkin ou linfoma não-Hodgkin), os quais são discutidos em mais detalhes aqui.

[060]Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, compreendendo ou compostos de células neoplásicas CD25+ve. Os

tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, infiltrados com células CD25+ve, como células T CD25+; esses tumores sólidos podem não ter expressão de CD25 (isto é, compreender ou ser composto por células neoplásicas CD25-ve).

[061]Por exemplo, o tumor sólido pode ser um tumor com altos níveis de células T infiltrantes, como células T reguladoras infiltrantes (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., *Targ Oncol* (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res.* 27 de Jan de 2017; 27(1):109-118). Portanto, o tumor sólido pode ser câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

[062]O ADC pode ser ADC anti-CD25, como o ADCXD25 aqui descrito.

[063]O agente secundário pode ser um inibidor de tirosina quinase de Bruton (BTKi), um antagonista de PD1, um antagonista de PD-L1, um agonista de GITR, um agonista de OX40, um antagonista de CTLA-4, Fludarabina ou citarabina ou um agente de hipometilação.

[064]O indivíduo pode ser humano. O indivíduo pode ter câncer ou pode ter sido determinado como tendo câncer. O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer CD25+ ou células não tumorais associadas ao tumor CD25+. Tais como células T infiltrantes CD25+.

[065]O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer PD-L1+.

[066]O medicamento ou composição compreendendo o ADC pode ser administrado antes do medicamento ou composição que compreende o agente secundário, simultaneamente com o medicamento ou composição que compreende o agente secundário, ou após o medicamento ou composição que compreende o agente secundário. O tratamento pode compreender a administração de um agente

quimioterapêutico adicional ao indivíduo.

[067]Ainda em um aspecto adicional, a divulgação fornece uma composição que compreende um ADC e um agente secundário.

[068]Também é fornecido neste aspecto da divulgação um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz da composição compreendendo um ADC e um agente secundário.

[069]Também é fornecida neste aspecto da divulgação uma composição compreendendo um ADC e um agente secundário para uso em um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo.

[070]Também é fornecido neste aspecto da divulgação o uso de uma composição compreendendo um ADC e um agente secundário na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio em um indivíduo.

[071]Também é fornecido neste aspecto da divulgação um kit que compreende uma composição compreendendo um ADC e um agente secundário e um conjunto de instruções para administração do medicamento a um indivíduo para o tratamento de um distúrbio.

[072]O distúrbio pode ser uma doença proliferativa, por exemplo, um câncer, tal como Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, incluindo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL) e leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo Filadélfia (Ph-ALL).

[073]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma

neoplasia compreendendo células CD25+ve e CD25-ve.

[074]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia composta por células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ve, tais como células T CD25+ve.

[075]O neoplasma alvo ou células neoplásicas podem ser todo ou parte de um tumor sólido.

[076]“Tumor sólido” neste documento será entendido como incluindo cânceres hematológicos sólidos, como linfomas (linfoma de Hodgkin ou linfoma não-Hodgkin), os quais são discutidos em mais detalhes aqui.

[077]Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, compreendendo ou compostos de células neoplásicas CD25+ve. Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, infiltrados com células CD25+ve, como células T CD25+; esses tumores sólidos podem não ter expressão de CD25 (isto é, compreender ou ser composto por células neoplásicas CD25-ve).

[078]Por exemplo, o tumor sólido pode ser um tumor com altos níveis de células T infiltrantes, como células T reguladoras infiltrantes (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., Targ Oncol (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, Immunity 46, 1–10; Tanaka, A., et al., Cell Res. 27 de Jan de 2017; 27(1):109-118). Portanto, o tumor sólido pode ser câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

[079]O ADC pode ser ADC anti-CD25, como o ADCXD25 aqui descrito.

[080]O agente secundário pode ser um inibidor de tirosina quinase de Bruton (BTKi), um antagonista de PD1, um antagonista de PD-L1, um agonista de GITR, um

agonista de OX40, um antagonista de CTLA-4, Fludarabina ou citarabina, ou um agente de hipometilação.

[081]O indivíduo pode ser humano. O indivíduo pode ter câncer ou pode ter sido determinado como tendo câncer. O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer CD25+ ou células não tumorais associadas ao tumor CD25+, tais como células T infiltrantes CD25+.

[082]O indivíduo pode ter, ou foi determinado como tendo, um câncer PD-L1+.

[083]O tratamento pode compreender a administração de um agente quimioterapêutico adicional ao indivíduo.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Conjugados de Fármacos e Anticorpos (ADCs)

[084]A presente divulgação refere-se à eficácia melhorada de combinações de um ADC e um agente secundário.

[085]O ADC pode aplicar um fármaco em um local alvo. O local alvo é, de preferência, uma população de células proliferativas. O anticorpo é um anticorpo para um antígeno presente em uma população de células proliferativas. Em um aspecto, o antígeno está ausente ou presente em um nível reduzido em uma população de células não proliferativas em comparação com a quantidade de antígeno presente na população de células proliferativas, por exemplo, uma população de células tumorais.

[086]O ADC pode compreender um ligante que pode ser clivado de modo a liberar o fármaco no local alvo. O fármaco pode ser um composto selecionado entre RelA, RelB, RelC, RelD ou RelE. Assim, o conjugado pode ser usado para fornecer seletivamente um composto RelA, RelB, Rel C, RelD ou RelE para o local alvo.

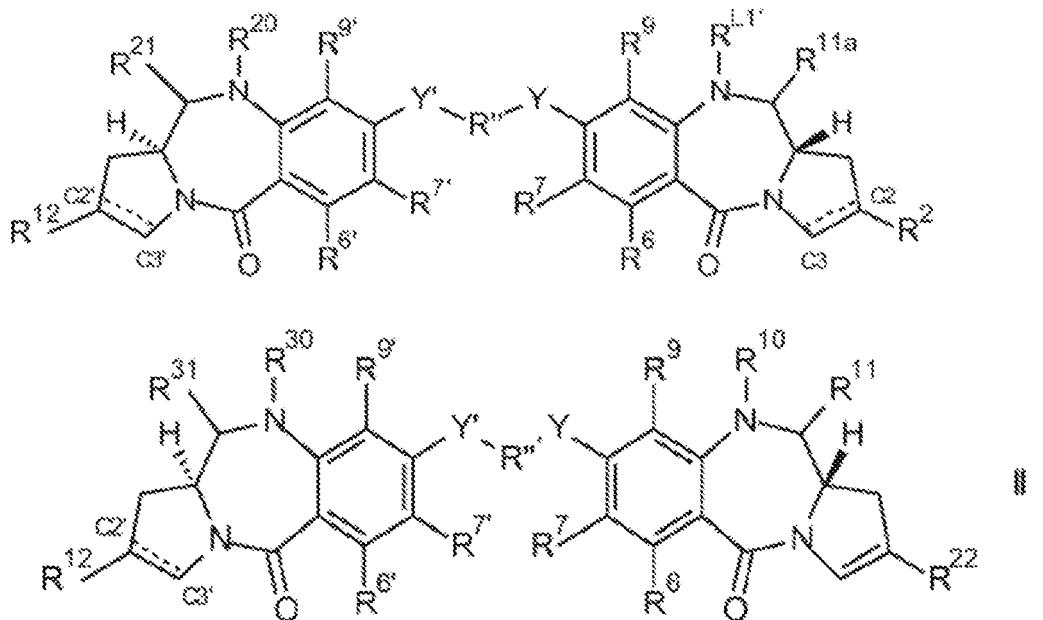
[087]O ligante pode ser clivado por uma enzima presente no local alvo.

[088]A divulgação se relaciona particularmente ao tratamento com um ADC anti-CD25 divulgado no WO2014/057119, e como aqui descrito.

ADCs anti-CD25

[089] Como usado aqui, o termo “CD25-ADC” refere-se a um ADC no qual o componente do anticorpo é um anticorpo anti-CD25. O termo “PBD-ADC” refere-se a um ADC no qual o componente do fármaco é uma ogiva de pirrolobenzodiazepina (PBD). O termo “ADC anti-CD25” refere-se a um ADC no qual o componente de anticorpo é um anticorpo anti-CD25 e o componente do fármaco é uma ogiva de PBD.

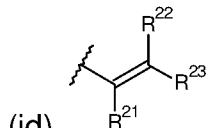
[090] O ADC pode compreender um conjugado de fórmula L –(D^L)_p, onde D^L é da fórmula I ou II:



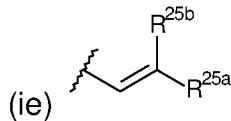
em que:

L é um anticorpo (Ab) que é um anticorpo que se liga ao CD25;
quando existe uma ligação dupla presente entre C2' e C3', R¹² é selecionado do grupo que consiste em:

- (ia) grupo arila C₅₋₁₀, opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados do grupo que compreende: halo, nitro, ciano, éter, carbóxi, éster, alquila C₁₋₇, heterociclila C₃₋₇ e bis-óxi-C₁₋₃ alquíleno;
- (ib) alquila alifático saturado C₁₋₅;
- (ic) cicloalquila C₃₋₆ saturado;



, em que cada um de R²¹, R²² e R²³ são independentemente selecionados de H, alquila C₁₋₃ saturado, alquenila C₂₋₃, alquinila C₂₋₃ e ciclopropila, em que o número total de átomos de carbono no grupo R¹² não é mais de 5;

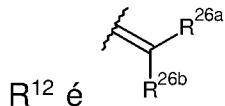


, em que um de R^{25a} e R^{25b} é H e o outro é selecionado de: fenila, cujo fenila é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo, metila, metoxila; piridila; e tiofenila; e



, em que R²⁴ é selecionado de: H; alquila C₁₋₃ saturado; alquenila C₂₋₃; alquinila C₂₋₃; ciclopropila; fenila, cujo fenila é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo, metila, metoxila; piridila; e tiofenila;

quando existe uma ligação simples presente entre C2' e C3',



, em que R^{26a} e R^{26b} são selecionados independentemente de H, F, alquila C₁₋₄ saturado, alquenila C₂₋₃, cujos grupos alquila e alquenila são opcionalmente substituídos por um grupo selecionado de alquilamido C₁₋₄ e éster de alquila C₁₋₄; ou quando um de R^{26a} e R^{26b} é H, o outro é selecionado de nitrila e um éster de alquila C₁₋₄;

R⁶ e R⁹ são selecionados independentemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', nitro, Me₃Sn e halo;

onde R e R' são independentemente selecionados de grupos alquila C₁₋₁₂ opcionalmente substituída, heterociclila C₃₋₂₀ e arila C₅₋₂₀;

R⁷ é selecionado de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NHRR', nitro, Me₃Sn e halo;

R'' é um grupo alquíleno C₃₋₁₂, cuja cadeia pode ser interrompida por um ou mais heteroátomos, por exemplo, O, S, NR^{N2} (onde R^{N2} é H ou alquila C₁₋₄) e/ou anéis

aromáticos, por exemplo, benzeno ou piridina;

Y e Y' são selecionados de O, S ou NH;

R^{6'}, R^{7'}, R^{9'} são selecionados dos mesmos grupos que R⁶, R⁷ e R⁹ respectivamente;

[Fórmula I]

R^{L1'} é um ligante para conexão ao anticorpo (Ab);

R^{11a} é selecionado de OH, OR^A, onde R^A é alquila C₁₋₄ e SO_zM, onde z é 2 ou 3 e M é um cátion monovalente farmaceuticamente aceitável;

R²⁰ e R²¹ juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de nitrogênio e carbono aos quais estão ligados ou;

R²⁰ é selecionado entre H e R^C, onde R^C é um grupo de terminação;

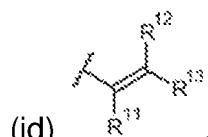
R²¹ é selecionado de OH, OR^A e SO_zM;

quando existe uma ligação dupla presente entre C₂ e C₃, R² é selecionado o grupo que consiste em:

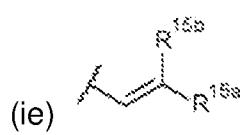
(ia) grupo arila C₅₋₁₀, opcionalmente substituído por um ou mais substituintes selecionados do grupo que compreende: halo, nitro, ciano, éter, carbóxi, éster, alquila C₁₋₇, heterociclila C₃₋₇ e bis-óxi-C₁₋₃ alquíleno;

(ib) alquila alifático saturado C₁₋₅;

(ic) cicloalquila C₃₋₆ saturado;



(id), em que cada um de R¹¹, R¹² e R¹³ são independentemente selecionados de H, alquila C₁₋₃ saturado, alquenila C₂₋₃, alquinila C₂₋₃ e ciclopropila, em que o número total de átomos de carbono no grupo R² não é mais de 5;

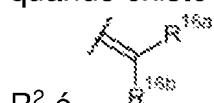


(ie), em que um de R^{15a} e R^{15b} é H e o outro é selecionado de: fenila, cujo fenila é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo, metila, metoxila; piridila; e tiofenila; e



, em que R^{14} é selecionado de: H; alquila C₁₋₃ saturado; alquenila C₂₋₃; alquinila C₂₋₃; ciclopropila; fenila, cujo fenila é opcionalmente substituído por um grupo selecionado de halo, metila, metoxila; piridila; e tiofenila;

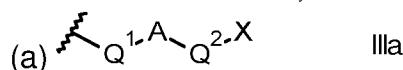
quando existe uma ligação simples presente entre C2 e C3,



, em que R^{16a} e R^{16b} são selecionados independentemente de H, F, alquila C₁₋₄ saturado, alquenila C₂₋₃, cujos grupos alquila e alquenila são opcionalmente substituídos por um grupo selecionado de alquilamido C₁₋₄ e éster de alquila C₁₋₄; ou quando um de R^{16a} e R^{16b} é H, o outro é selecionado de nitrila e um éster de alquila C₁₋₄;

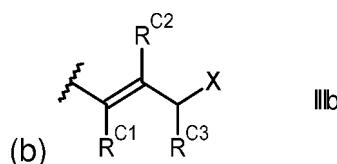
[Fórmula II]

R^{22} é de fórmula IIIa, fórmula IIIb ou fórmula IIIc:



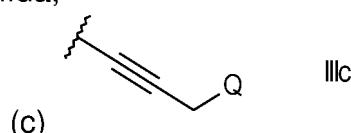
onde A é um grupo arila C₅₋₇, e quer

- (i) Q^1 é uma ligação simples, e Q^2 é selecionado de uma ligação simples e - $Z-(CH_2)_n-$, onde Z selecionado de uma ligação simples, O, S e NH e n é de 1 a 3; ou
- (ii) Q^1 é $-CH=CH-$, e Q^2 é uma ligação simples;



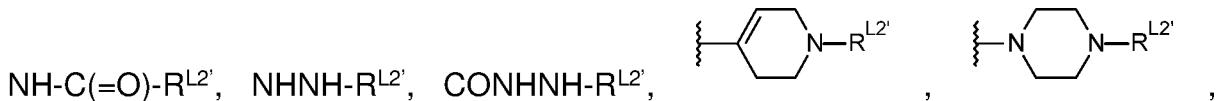
onde;

R^{C1} , R^{C2} e R^{C3} são selecionados independentemente de H e alquila C₁₋₂ não substituída;



onde Q é selecionado de $OR^{L2'}$, $SR^{L2'}$ e $NR^N-R^{L2'}$ e R^N é selecionado de H, metila e etila

X é selecionado do grupo que compreende: O-R^{L2'}, S-R^{L2'}, CO₂-R^{L2'}, CO-R^{L2'},



NH-C(=O)-R^{L2'}, NHNH-R^{L2'}, CONHNH-R^{L2'},

NR^NR^{L2'}, em que R^N é selecionado do grupo que compreende H e alquila C₁₋₄;

R^{L2'} é um ligante para conexão ao anticorpo (Ab);

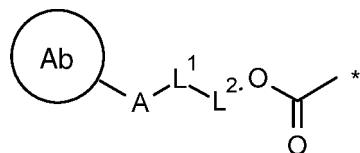
R¹⁰ e R¹¹ juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de nitrogênio e carbono aos quais estão ligados ou;

R¹⁰ é H e R¹¹ é selecionado de OH, OR^A e SO₂M;

R³⁰ e R³¹ juntos formam uma ligação dupla entre os átomos de nitrogênio e carbono aos quais estão ligados ou;

R³⁰ é H e R³¹ é selecionado de OH, OR^A e SO₂M.

Em algumas modalidades LR^{L1'} ou L-R^{L2'} é um grupo:

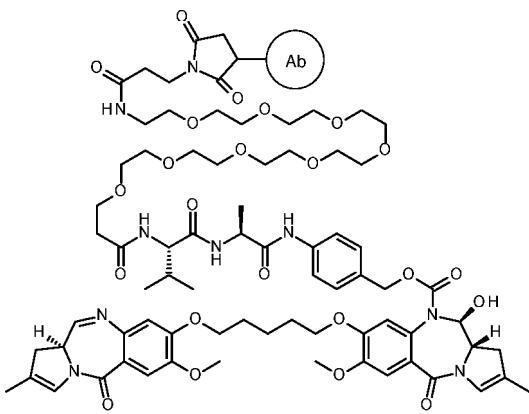


onde o asterisco indica o ponto de ligação ao PBD, Ab é o anticorpo, L¹ é um ligador clivável, A é um grupo de conexão que conecta L¹ ao anticorpo, L² é uma ligação covalente ou juntamente com -OC (=O)- forma um ligador autoimolativo.

[091] Em algumas dessas modalidades, L¹ é clivável por enzimas.

[092] Foi demonstrado anteriormente que tais ADCs são úteis no tratamento de cânceres que expressam CD25 (ver, por exemplo, WO2014/057119, que é incorporado por referência aqui na sua totalidade).

[093] O termo ADC anti-CD25 pode incluir qualquer modalidade descrita no documento WO 2014/057119. Em particular, em modalidades preferidas, o ADC pode ter a estrutura química:



, em que o Ab é um anticorpo CD25 e

o DAR está entre 1 e 8.

[094] O anticorpo pode compreender um domínio VH compreendendo um VH CDR1 com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.3, um VH CDR2 com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.4 e um VH CDR3 com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.5.

[095] Em alguns aspectos, o componente de anticorpo do ADC anti-CD25 é um anticorpo que compreende: um domínio VH que compreende um VH CDR1 com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO.3, uma VH CDR2 com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.4 e um VH CDR3 com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.5. Em algumas modalidades, o anticorpo compreende um domínio VH com a sequência de acordo com a SEQ ID NO. 1.

[096] O anticorpo pode ainda compreender: um domínio VL que compreende um VL CDR1 com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 6 um VL CDR2 com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.7 e um VL CDR3 com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO.8. Em algumas modalidades, o anticorpo ainda compreende um domínio VL com a sequência de acordo com a SEQ ID NO. 2.

[097] Em algumas modalidades o anticorpo compreende um domínio VH e um domínio VL, os domínios VH e VL com a sequências de SEQ ID NO. 1 emparelhada com SEQ ID NO. 2.

[098] O(s) domínio(s) VH e VL podem se emparelhar de modo a formar um sítio de ligação ao antígeno de anticorpo que se liga a CD25.

[099]Em modalidades preferidas o anticorpo é um anticorpo intacto compreendendo um domínio VH e um domínio VL, os domínios VH e VL tendo sequências de SEQ ID NO. 1 e SEQ ID NO. 2.

[0100]Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo IgG1 monoclonal totalmente humano, de preferência, IgG1,κ.

[0101]Em algumas modalidades, o anticorpo é o anticorpo AB12 descrito no documento WO 2004/045512 (Genmab A/S).

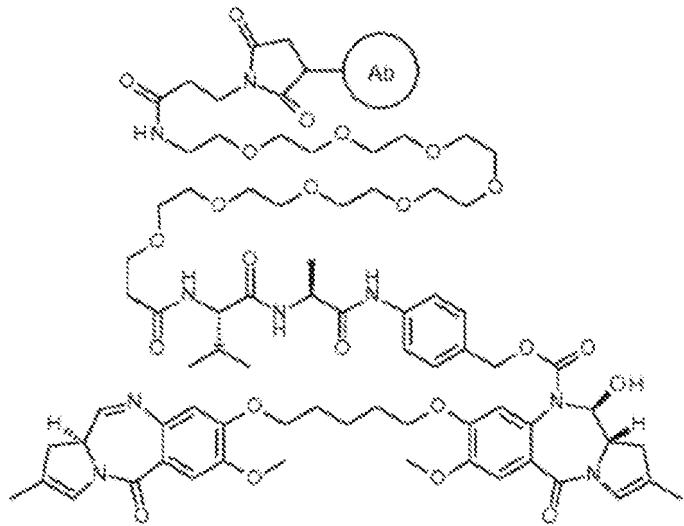
[0102]Em um aspecto, o anticorpo é um anticorpo como aqui descrito que foi modificado (ou modificado adicionalmente) como descrito a seguir. Em algumas modalidades, o anticorpo é uma versão humanizada, desimunizada ou recapeada de um anticorpo aqui divulgado.

[0103]O ADC anti-CD25 preferido para uso com os aspectos da presente divulgação é o ADCx25, conforme descrito a seguir.

ADCx25

[0104]ADCx25 é um conjugado de anticorpo e fármaco composto por um anticorpo humano contra CD25 humana ligado a uma ogiva de pirrolobenzodiazepina (PBD) por meio de um ligante clivável. O mecanismo de ação de ADCX25 depende da ligação de CD25. O anticorpo específico para CD25 tem como alvo o conjugado de anticorpo e fármaco (ADC) para células que expressam CD25. Após a ligação, o ADC internaliza e é transportado para o lisossomo, onde o ligante sensível à protease é clivado e o dímero de PBD livre é liberado dentro da célula alvo. O dímero de PBD liberado inibe a transcrição de maneira seletiva por sequência, devido à inibição direta da RNA polimerase ou à inibição da interação dos fatores de transcrição associados. O dímero de PBD produz reticulações covalentes que não distorcem a dupla hélice do DNA e que não são reconhecidas pelos fatores de reparo por excisão de nucleotídeos, permitindo um período efetivo mais longo (Hartley 2011).

[0105] O mesmo tem a estrutura química:



Ab - (DL)_p representa o Anticorpo AB12 (anticorpo monoclonal IgG1, K totalmente humano com as sequências de VH e VL de SEQ ID NO. 1 e SEQ ID NO. 2, respectivamente, também conhecido como HuMax-TAC). Isto é sintetizado como descrito no documento WO 2014/057119 (Conj AB12-E) e normalmente tem um DAR (Razão Fármaco/Anticorpo) de 2,0 +/- 0,3.

Ligação de CD25

[0106] A “primeira proteína alvo” (FTP), como usado aqui, é de preferência CD25.

[0107] Como usado aqui, “liga-se a CD25” é usado para significar que o anticorpo liga-se a CD25 com uma afinidade mais alta do que um parceiro não específico, como albumina de soro bovino (BSA, nº. de acesso ao Genbank CAA76847, versão CAA76847.1 GI: 3336842, data de atualização do registro: 7 de janeiro de 2011 14:30 h). Em algumas modalidades, o anticorpo se liga a CD25 com uma constante de associação (K_a) pelo menos 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1.000, 2.000, 5.000, 10^4 , 10^5 ou 10^6 vezes maior que a constante de associação do anticorpo para a BSA, quando medida em condições fisiológicas. Os anticorpos da divulgação podem se ligar a CD25 com uma alta afinidade. Por exemplo, em algumas modalidades, o anticorpo pode se ligar a CD25 com um K_D igual ou menor que cerca

de 10^{-6} M, como igual ou menor que um dentre 1×10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} ou 10^{-14} .

[0108]Em algumas modalidades, o polipeptídeo CD25 corresponde ao acesso Genbank nº. NP_000408, versão nº. NP_000408.1 GI:4557667, data da atualização do registro: 09 de setembro de 2012, 16:59 h. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo CD25 corresponde ao acesso de Genbank nº. NM_000417, versão nº. NM_000417.2 GI: 269973860, data da atualização do registro: 09 de setembro de 2012, 16:59 h. Em algumas modalidades, o polipeptídeo CD25 corresponde ao número de acesso Uniprot/Swiss-Prot Nº P01589.

Agentes secundários

[0109]O recente desenvolvimento de agentes que potencializam a imunidade antitumoral está mudando rapidamente o tratamento de uma ampla gama de cânceres. No entanto, estes tratamentos não são eficazes em todos os tipos de câncer, as respostas muitas vezes não são duráveis e muitos pacientes recebem pouco ou nenhum benefício do tratamento. O pressuposto predominante no campo da oncologia é que apenas combinações de imunoterapias com outras opções de tratamento serão capazes de curar pacientes com câncer.

[0110]O ADC está bem tolerado e ativo em uma faixa de tipos de cânceres, e provavelmente será um componente das terapias de combinação que aumentam a taxa de resposta e a durabilidade de tratamento. O objetivo desta divulgação é combinar o ADC com o agente secundário.

[0111]Um agente secundário, como descrito aqui, pode ser um fármaco imuno-oncológico (IO).

[0112]Os fármacos imuno-oncológicos (IO), um tipo de terapia contra o câncer que depende do sistema imunológico do corpo para ajudar a combater o câncer, demonstraram maior durabilidade da resposta antitumoral. Existem diferentes tipos de IO, incluindo, entre outros, inibidores de PD1, inibidores de PD-L1, inibidores de

CLTL4, agonistas de GITR e agonistas de OX40. Devido à considerável fração de pacientes que não são curados por imunoterapias de agente único e, por fim, recaem, são necessários tratamentos combinados com medicamentos alternativos para IO ou diferentes modalidades terapêuticas (ver KS Peggs et al. 2009, Clinical and Experimental Immunology, 157: 9–19 [doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03912.x]; DM Pardoll 2012 [doi:10.1038/nrc3239]).

[0113]A morte celular imunogênica (ICD) é uma forma particular de morte celular que estimula uma resposta imune contra抗ígenos de células mortas (liberados por células que estão morrendo) e é considerada uma das melhores maneiras de induzir uma resposta imune adaptativa e melhorar a eficácia de tratamento anticâncer. Esse processo é frequentemente subótimo, exigindo estratégias combinatórias que tentam restaurar a imunogenicidade total da morte celular para fins terapêuticos. Existem vários agentes antineoplásicos que podem induzir a ICD, como várias antraciclinas (incluindo doxorrubicina, epirrubicina e idarubicina), agentes alquilantes (incluindo oxaliplatina e ciclofosfamida), inibidor da topoisomerase II mitoxantrona e inibidor proteasomal Bortezomib.

[0114]Os conjugados de anticorpo-fármaco, incluindo aqueles com uma ogiva de PBD, podem ser particularmente adequados como parceiros de combinação porque são mais direcionados em comparação à quimioterapia convencional e espera-se que ofereçam uma apresentação de antígeno aumentada às células infiltrantes, como foi mostrado para os ADCs baseados em auristatina.

[0115]Portanto, a combinação de ADCs com IO permite benefícios duplos: por um lado, o ADC mata diretamente o tumor que expressa o alvo, fornecendo atividade antitumoral imediata e, por outro, a morte celular imunogênica induzida pela morte celular mediada pelo ADC pode aumentar a resposta imune adaptativa mais forte e mais durável, em comparação com quando o IO é administrado como um único agente.

[0116]O agente secundário pode ser:

- (a) Inibidor da tirosina quinase de Bruton (BTKi), como Ibrutinib (Imbruvica), Acalabrutinib/ACP-196, ONO/GS-4059, Spebrutinib/AVL-292/CC-292, HM71224 (Poseltinib) ou BGB-3111 (Zanubrutinib);
- (b) um antagonista de PD1, como pembrolizumab, nivolumab, MEDI0680, PDR001 (spartalizumab), Camrelizumab, AUNP12, Pidilizumab, Cemiplimab (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (Tisleizumab), ou BGB-108;
- (c) um antagonista de PD-L1, como atezolizumab (Tecentriq), BMS-936559/MDX-1105, durvalumab/MEDI4736, ou MSB0010718C (Avelumab);
- (d) um agonista de GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein-Proteína Relacionada a TNFR Induzida por Glucocorticoide), como MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK-4166, BMS-986156 ou INCAGN1876;
- (e) um agonista de OX40, como MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 ou PF-04518600;
- (f) um antagonista de CTLA-4, como ipilimumab (marca Yervoy) ou Tremelimumab (originalmente desenvolvido pela Pfizer, agora Medimmune);
- (g) Fludarabina ou Citarabina; ou
- (h) um agente de hipometilação, tal como análogos da citidina-por exemplo, 5-azacitina (azacitidina) e 5-aza-2'-deoxycitidina (decitabina).

[0117]Cada uma dessas classes de agente secundário é descrita em mais detalhes abaixo.

Inibidores de BTK

[0118]A BTK é uma tirosina quinase não receptora indispensável ao desenvolvimento, diferenciação e sinalização de linfócitos B. A ligação do antígeno ao receptor de antígeno das células B (BCR) desencadeia a sinalização que acaba levando à ativação das células B. Após o envolvimento e a ativação do BCR na membrana plasmática, a BTK fosforila o PLCG2 em vários sítios, iniciando a via de

sinalização a jusante através da mobilização de cálcio, seguida pela ativação dos membros da família da proteína quinase C (PKC). A fosforilação de PLCG2 é realizada em estreita cooperação com a proteína BLNK ligadora de células B da proteína adaptadora [Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 94:604-609(1997); Rodriguez et al., J. Biol. Chem. 276:47982-47992(2001)].

[0119]A BTK atua como uma plataforma para reunir uma matriz diversificada de proteínas de sinalização e está implicada nas vias de sinalização do receptor de citocinas. Ela desempenha um papel importante na função das células imunes da imunidade inata e adaptativa, como um componente da via de receptores do tipo Toll (TLR). A via de TLR atua como um sistema primário de vigilância para a detecção de patógenos e é crucial para a ativação da defesa do hospedeiro [Horwood et al. J. Immunol. 176:3635-3641(2006)].

[0120]Outro papel fundamental para o BTK é a regulação da ativação de TLR9 nas células B esplênicas. Dentro da via de TLR, a BTK induz a fosforilação da tirosina de TIRAP, o que leva à degradação de TIRAP.

[0121]A BTK também desempenha um papel crítico na regulação da transcrição, pois está envolvida na via de sinalização que liga o TLR8 e o TLR9. Como resultado, a atividade de BTK induz a atividade de NF-kappa-B, que está envolvido na regulação da expressão de centenas de genes. Outros alvos transpcionais de BTK incluem ARID3A, NFAT e GTF2I; BTK é necessário para a formação de complexos funcionais de ligação a ARID3A DNA; enquanto a fosforilação transitória de BTK de GTF2I faz com que este se transloque para o núcleo para ligar elementos potenciadores reguladores para modular a expressão gênica [Rajaiya, Mol. Cell. Biol. 26:4758-4768(2006)].

[0122]A BTK tem um papel duplo na regulação da apoptose.

[0123]“Inibidor da BTK” significa qualquer composto químico ou molécula biológica que inibe a atividade de BTK. Por exemplo, agentes que impedem a

atividade de quinase de BTK com um IC₅₀ de 0,001 µM a cerca de 2 µM.

[0124]A atividade inibidora da enzima BTK pode ser medida, com base no protocolo fornecido pelo fabricante, usando Btk (Invitrogen Corporation) e o peptídeo Tyr1-Kit de Ensaio de Z'-LYTE™ Kinase (Invitrogen Corporation), que contém os seguintes reagentes: Peptídeo Tyr-1, fosfopeptídeo Thy-1, tampão 5x quinase, ATP, reagente de desenvolvimento B, tampão de desenvolvimento e reagente de parada. 5 µl/poço de uma solução de um inibidor de BTK pode ser diluído com dimetilsulfóxido (DMSO) ou DMSO, e 10 µl/poço da solução de mistura de substrato/enzima dispensada em uma placa de ensaio de 96 poços e uma reação realizada por 20 minutos a 30 °C. A solução de mistura de substrato/enzima pode ser preparada por diluição com o tampão de quinase (DL-ditiotreitol (DTT, 2,7 mM), 1,33x de tampão de quinase) para fornecer uma concentração final para o peptídeo Tyr-1 de 4 µM e uma concentração final de BTK de 5 nM. 5 µl/poço do trifosfato de adenosina (ATP, concentração final = 36 µM) podem ser adicionados e uma reação realizada por 1 hora a 30°C. Após a conclusão da reação, 10 µl, de uma solução de desenvolvimento, fornecida pela diluição do reagente de desenvolvimento B para 128x usando o tampão de desenvolvimento, podem ser adicionados e uma reação realizada por uma hora adicional a 30°C. A reação enzimática pode ser interrompida adicionando 10 µl, da solução de parada. A intensidade de fluorescência a 445 nm e 520 nm em cada poço pode ser medida usando um leitor de placas de fluorescência (PerkinElmer Inc.) e Analisador de Microplaca de Fusão Universal. A porcentagem de fosforilação pode ser determinada utilizando a razão entre a emissão a 445 nm (emissão de cumarina) e a emissão a 520 nm (emissão de fluoresceína) de acordo com o protocolo fornecido com o kit.

[0125]A porcentagem de inibição (%) por um inibidor de BTK pode ser calculada usando a seguinte equação.

$$\text{inibição percentual (\%)} \text{ da fosforilação} = 1 - \{(AC - AX)/(AC - AB)\} \times 100$$

AX: % de fosforilação quando um inibidor de BTK foi adicionado

AB: % de fosforilação na ausência de adição de ATP (branco)

AC: % de fosforilação quando apenas DMSO foi adicionado (controle)

[0126] O valor de inibição de 50% (valor de IC₅₀) para um inibidor de BTK pode ser determinado a partir da curva de inibição com base na % de inibição em cada concentração de um inibidor de BTK.

[0127] O BTKi Ibrutinib (Imbruvica) é um fármaco de molécula pequena que se liga covalentemente à tirosina quinase de Bruton (BTK) e tem sido usado para tratar câncer de células B como linfoma de células do manto, leucemia linfocítica crônica e macroglobulinemia de Waldenström, uma forma de linfoma de não Hodgkin.

[0128] Foi relatado que o Ibrutinib reduz a quimiotaxia das células da leucemia linfocítica crônica (CLL) em relação às quimiocinas CXCL12 e CXCL13, e inibe a adesão celular após estimulação no receptor de células B (BCR) (S Ponader et al. 2011, doi:10.1182/blood-2011-10-386417. PMID 22180443.) Além disso, o ibrutinib modula negativamente a expressão de CD20 visando o eixo de CXCR4/SDF1 (Pavlasova 2016, PMID 27480113. Juntos, esses dados são consistentes com um modelo mecanicista pelo qual o ibrutinib bloqueia a sinalização de BCR, que leva as células B a apoptose e/ou interrompe a migração e a adesão celular a microambientes protetores de tumores.

[0129] Em estudos pré-clínicos sobre células de leucemia linfocítica crônica (CLL), foi relatado que o ibrutinib promove apoptose, inibe a proliferação e também impede que as células CLL respondam aos estímulos de sobrevivência fornecidos pelo microambiente (Pavlasova 2016). Isso também leva a uma redução dos níveis de Mcl1 (proteína anti-apoptótica) nas células B malignas. O tratamento de células CLL ativadas com ibrutinib resultou na inibição da fosforilação da tirosina BTK e também efetivamente revogou as vias de sobrevivência a jusante ativadas por esta quinase, incluindo ERK1/2, PI3K e NF-κB. Além disso, o ibrutinib inibiu a proliferação

de células CLL *in vitro*, bloqueando efetivamente os sinais de sobrevivência fornecidos externamente às células CLL a partir do microambiente, incluindo fatores solúveis (CD40L, BAFF, IL-6, IL-4 e TNF- α), envolvimento de fibronectina e contato de células estromais.

[0130]Portanto, é vantajoso combinar um ADC, que tem como alvo uma primeira proteína alvo (FTP) com um BTKi, porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais positivas para o FTP, enquanto, por outro lado, o BTKi irá interagir com células B malignas resultando na inibição da proliferação das células cancerígenas. Ao lado das células tumorais FTP(+), as células tumorais negativas FTP em proximidade com células tumorais FTP (+) serão potencialmente mortas pelo mecanismo de observação do dímero PBD liberado após a morte celular das células FTP(+). Portanto, o ADC irá matar diretamente as células tumorais.

[0131]Além disso, as indicações são de que o BTKi reduz a mobilidade das células tumorais e direciona o equilíbrio regulatório dessas células para a apoptose. Acredita-se que essas alterações induzidas pelo BTKi tornem as células tumorais mais suscetíveis à morte medicada por ADC direta e indireta.

[0132]Para mostrar que os ADCs funcionam sinergicamente com o BTKi, um painel de linhagens de células FTP(+) será cotratada com uma faixa de concentração de ambos, o ADC e o BTK1. Como controles negativos, o mesmo painel de linhagens celulares será tratado com uma faixa de concentrações de BTKi ou com uma faixa de concentração de ADC e veículo. Após a incubação, dois parâmetros serão medidos: a quantidade de FTP de superfície (conforme determinado por citometria de fluxo) e a citotoxicidade *in vitro* das combinações (conforme determinado pelos ensaios de MTS). Para determinar a citotoxicidade, a viabilidade celular é medida adicionando MTS por poço e incubando por 4 horas a 37°C. A porcentagem de viabilidade celular é calculada em comparação com o controle não tratado. A sinergia citotóxica é calculada transformando os dados de viabilidade celular na fração afetada e

calculando o índice de combinação usando o programa de análise CalcuSyn.

[0133]BTKi adequado para uso como agentes secundários na presente divulgação incluem:

- (1) 9-(1-acriloil-3-azetidinil)-6-amino-7-(4-fenóxi-fenil)-7, 9-di-hidro-8H-purin-8-ona,
- (2) 6-amino-9 - {(3R) -1- [(2E)-4- (dimetilamino) -2-butenoil] -3-pirrolidinil}-7-(4-fenóxi-fenil) -7,9-di-hidro-8H-purin-8-ona,
- (3) 9-[(1-acriloil-4-piperidinil)metil]-6-amino-7-(4-fenóxi-fenil)-7,9-di-hidro-8H-purin-8-ona,
- (4) 6-amino-9 -[(3R)-1- (2-butinoil) -3-pirrolidinil]-7- (4- fenóxi-fenil) -7,9-di-hidro-8H-purin-8-ona,
- (5) 6-amino-9-{(3 S)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil}-7-(4-fenóxi-fenil)-7,9-di-hidro-8H-purin-8-ona,
- (6) 6-amino-7-[4-(3-cloro-fenóxi)fenil]-9-{(3R)-1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil}-7,9-di-hidro-8H-purin-8-ona,
- (7) 6-amino-9-[l-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenóxi-fenil)-7,9-di-hidro-8H-purin-8-ona, e
- (8) 6-amino-9-{1-[(2E)-4-(dimetilamino)-2-butenoil]-3-pirrolidinil}-7-(4-fenóxi-fenil)-7,9-di-hidro-8H-purin-8-ona.

[0134]Os inibidores de BTK preferidos para uso como agentes secundários na presente divulgação incluem (o Ibrutinib sendo o mais preferido):

a)Ibrutinib (Imbruvica)

i.Número CAS → 936563-96-1

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

ii.Referência NCBI Pubchem → 24821094

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

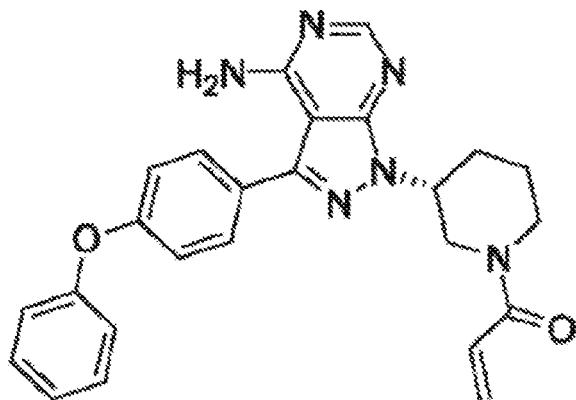
iii.Referência IUPHAR/BPS → 6912

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

iv. Identificador exclusivo de ingrediente (UNII) → 1X70 OSD4VX

(consulte

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



Fórmula I, Ibrutinib: 1-[3R]-3-[4-Amino-3-(4-fenoxy-fenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]prop-2-en-1-ona

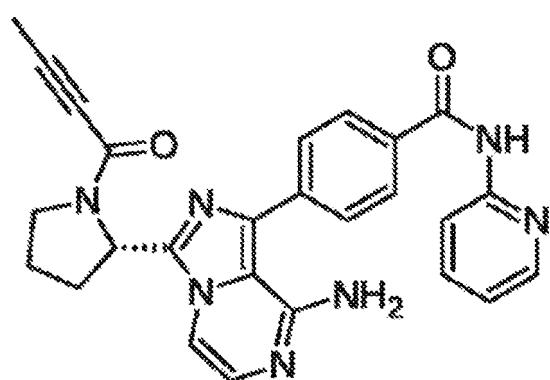
b. Acalabrutinib/ACP-196

i. Número CAS → 1420477-60-6

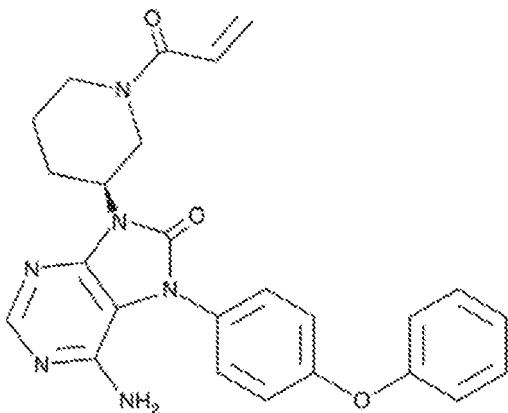
(consulte <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)

ii. Chemspider → 36764951

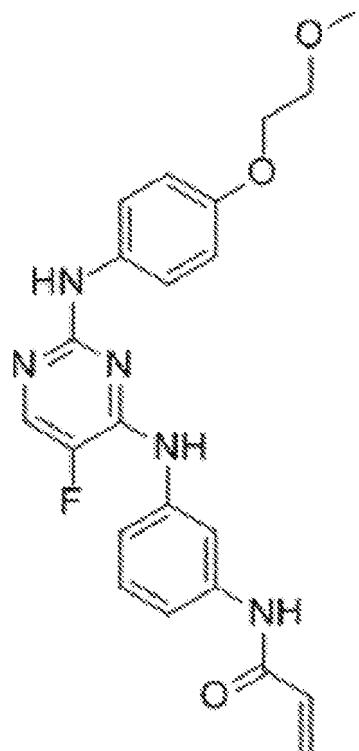
(consulte <https://www.chemspider.com/>)



Fórmula II, Acalabrutinib: 4-{8-Amino-3-[(2S)-1-(2-butinoil)-2-pirrolidinil]imidazo[1,5-a]pirazin-1-il}-N-(2-piridinil)benzamida
 c.ONO/GS-4059
 i.Número CAS → 1351635-67-0
 (consulte <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)



Fórmula III, ONO/GS-4059: 6-amino-7,9-di-hidro-9-[(3S)-1-(1-oxo-2-propen-1-il)-3-piperidinil]-7-(4-fenóxi-fenil)-8H-purina-8-ona
 d.Spebrutinib/AVL-292/CC-292
 i.Número CAS → 1202757-89-8
 (Consulte <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
 ii.PubChem ID → 59174488
 (Consulte <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

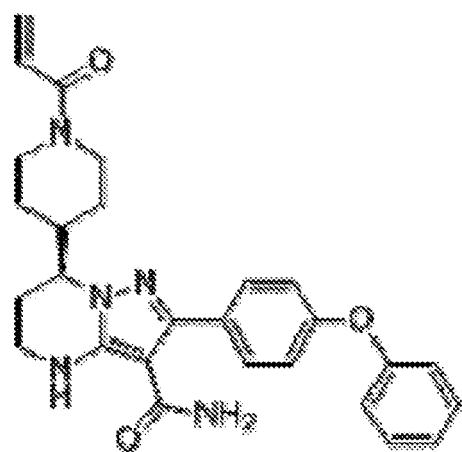


Fórmula IV, Spebrutinib: N-[3-(5-fluoro-2-[4-(2-metóxi-etóxi)anilino]pirimidin-4-il)amino]fenil]prop-2-enamida

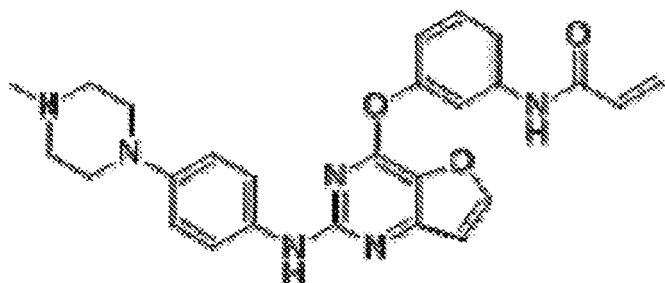
e.BGB-3111 (Zanubrutinib)

i.Número CAS → 1691249-45-2

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



Fórmula V, Zanubrutinib: (7S)-4,5,6,7-Tetra-hidro-7-[1-(1-oxo-2-propen-1-il)-4-piperidinil]-2-(4-fenóxi-fenil)pirazolo[1,5-a]pirimidina-3-carboxamida
 f.HM71224 (Poseltinib)
 i.Número CAS → 1353552-97-2
 (Consulte <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)



Fórmula VI, Poseltinib: N-(3-((2-((4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)amino)furo[3,2-d]pirimidin-4-il)oxi)fenil)acrilamida

[0135]Em algumas modalidades, o polipeptídeo BTK corresponde ao acesso ao Genbank nº. CAA41728, versão nº. CAA41728.1, data da atualização do registro: 2 de fevereiro de 2011 10:07 h. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo BTK corresponde ao acesso de Genbank nº. X58957, versão nº. X58957.1, data da atualização do registro: 2 de fevereiro de 2011 10:07 h. Em algumas modalidades, o polipeptídeo BTK corresponde ao número de acesso Uniprot/Swiss-Prot Nº Q06187.

Antagonistas de PD1

[0136]O receptor de morte programada 1 (PD1) é um receptor imuno-inibidor que é expresso principalmente nas células T e B ativadas. Demonstrou-se que a interação com seus ligantes atenua as respostas das células T *in vitro* e *in vivo*. Foi demonstrado que o bloqueio da interação entre PD1 e um de seus ligantes, PD-L1, aumenta a imunidade de células T CD8+ específicas do tumor e pode, portanto, ser

útil na remoção de células tumorais pelo sistema imunológico.

[0137]PD1 (codificado pelo gene Pdcd1) é um membro da superfamília de imunoglobulinas relacionado a CD28 e CTLA-4. Demonstrou-se que PD1 infrarregula a sinalização do receptor de antígeno após o acoplamento de seus ligantes (PD-L1 e/ou PD-L2). A estrutura de PD1 de murino foi resolvida, bem como a estrutura de co-cristal de PD1 de camundongo com PD-L1 humana (Zhang, X., et al., (2004) *Immunity* 20: 337-347; Lin, et al., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

[0138]USA 105: 30I I-6). PD1 e membros da família semelhantes são glicoproteínas transmembranares do tipo I que contêm um domínio do tipo Variável de Ig (tipo V) responsável pela ligação ao ligante e uma cauda citoplasmática responsável pela ligação das moléculas de sinalização. A cauda citoplasmática de PD1 contém dois motivos de sinalização à base de tirosina, um ITIM (motivo de inibição à base de tirosina imunoreceptora) e um ITSM (motivo de troca à base de tirosina imunoreceptora).

[0139]Em humanos, a expressão de PD1 (em linfócitos infiltrantes de tumores) e/ou PD-L1 (em células tumorais) foi encontrada em várias biópsias de tumores primárias avaliadas por imuno-histoquímica. Esses tecidos incluem câncer de pulmão, fígado, ovário, colo do útero, pele, cólon, glioma, bexiga, mama, rim, esôfago, estômago, célula escamosa oral, célula urotelial e pâncreas, além de tumores de cabeça e pescoço (Brown, J. A., et al., (2003) *J Immunol.* 170: I257-I266; Dong H., et al., (2002) *Nat. Med.* 8: 793-800; Wintterle, et al., (2003) *Cancer Res.* 63: 7462-7467; Strome, S. E., et al., (2003) *Cancer Res.* 63: 650I-6505; Thompson, R.H., et al., (2006) *Cancer Res.* 66: 338I-5; Thompson, et al., (2007) *Clin. Cancer Res.* 13: I 757-6I; Nomi, T., et al., (2007) *Clin. Cancer Res.* 13: 2I5I-7). O mais impressionante é que a expressão do ligante de PD nas células tumorais tem sido correlacionada ao mau prognóstico dos pacientes com câncer em vários tipos de tumor (revisado em Okazaki e Honjo, (2007) *Int. Immunol.* 19: 813-824).

[0140] Até o momento, numerosos estudos mostraram que a interação de PD1 com seus ligantes (PD-L1 e PD-L2) leva à inibição da proliferação de linfócitos *in vitro* e *in vivo*. O bloqueio da interação de PD1/PD-L1 pode levar a uma imunidade aumentada de células T específicas de tumor e, portanto, ser útil na remoção de células tumorais pelo sistema imunológico. Para resolver esse problema, vários estudos foram realizados. Em um modelo de murino de câncer pancreático agressivo (Nomi, T., et al. (2007) Clin. Cancer Res. 13: 2151-2157), foi demonstrada a eficácia terapêutica do bloqueio de PD1/PD-L1. A administração de anticorpo dirigido a PD1 ou PD-L1 inibiu significativamente o crescimento do tumor. O bloqueio de anticorpos promoveu eficazmente a infiltração de células T CD8+ reativas no tumor, resultando na sobreregulação de efetores antitumorais, incluindo gama IFN, perforina de banda de granzima. Além disso, os autores mostraram que o bloqueio de PD1 pode ser eficazmente combinado com quimioterapia para produzir um efeito sinérgico. Em outro estudo, usando um modelo de carcinoma de células escamosas em camundongos, o bloqueio de anticorpos PD1 ou PD-L1 inibiu significativamente o crescimento tumoral (Tsushima, F., et al., (2006) Oral Oneal. 42: 268-274).

[0141] “Antagonista de PD1” significa qualquer composto químico ou molécula biológica que estimula uma reação imune através da inibição da sinalização de PD1.

[0142] Para examinar a extensão da potencialização, por exemplo, da atividade de PD1, amostras ou ensaios comprendendo um dado, por exemplo, proteína, gene, célula ou organismo, são tratadas com um potencial agente ativador ou inibidor e são comparadas com amostras de controle tratadas com uma molécula de controle inativa. As amostras de controle recebem um valor relativo de atividade de 100%. A inibição é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 90% ou menos, tipicamente 85% ou menos, mais tipicamente 80% ou menos, mais tipicamente 75% ou menos, geralmente 70% ou menos, mais geralmente 65% ou menos, geralmente 60% ou menos, tipicamente 55% ou menos, geralmente

50% ou menos, mais geralmente 45% ou menos, mais geralmente 40% ou menos, de preferência 35% ou menos, com mais preferência 30% ou menos, ainda com mais preferência 25% ou menos e, com mais preferência, menos de 20%. A ativação é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 110%, geralmente pelo menos 120%, mais geralmente pelo menos 140%, mais geralmente pelo menos 160%, geralmente pelo menos 180%, mais frequentemente pelo menos duas vezes, na maioria das vezes pelo menos 2,5 vezes, geralmente pelo menos 5 vezes, mais geralmente pelo menos 10 vezes, de preferência pelo menos 20 vezes, com mais preferência pelo menos 40 vezes e com mais preferência mais de 40 vezes mais.

[0143]A combinação de um ADC, que tem como alvo uma primeira proteína alvo (FTP) com inibidores de PD1, é vantajosa, porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais FTP positivas, enquanto, por outro lado, o inibidor de PD1 envolve o sistema imune do próprio paciente para eliminar as células cancerosas. Ao lado das células tumorais FTP(+), as células tumorais FTP negativas próximas às células tumorais FTP (+) serão potencialmente mortas pelo mecanismo de observação do dímero de PBD liberado após a morte celular de células CD25(+). Portanto, o ADC mata diretamente as células tumorais.

[0144]A liberação resultante de抗ígenos associados a tumores de células que são mortas com o dímero de PBD acionará o sistema imunológico, que será ainda mais potencializado pelo uso de inibidores programados da proteína 1 de morte celular (PD1), expressos em uma grande proporção de linfócitos infiltrantes de tumores (TILs) de muitos tipos diferentes de tumores. O bloqueio da via de PD1 pode melhorar as respostas imunológicas antitumorais contra os抗ígenos liberados pelos tumores mortos pelo ADC, diminuindo o número e/ou a atividade supressora das células TReg intratumorais.

[0145]A principal função de PD1 é limitar a atividade das células T no

momento de uma resposta anti-inflamatória à infecção e limitar a autoimunidade. A expressão de PD1 é induzida quando as células T são ativadas e a ligação de um de seus próprios ligantes inibe as quinases envolvidas na ativação das células T. Portanto, no ambiente tumoral, isso pode se traduzir em uma grande resistência imune, porque muitos tumores são altamente infiltrados com células TReg que provavelmente suprimem ainda mais as respostas imunes efetoras. Este mecanismo de resistência é aliviado pelo uso de inibidores de PD1 em combinação com o ADC.

[0146]Antagonistas de PD1 adequados para uso como agentes secundários na presente divulgação incluem:

- a)um antagonista de PD1 que inibe a ligação de PD1 aos seus parceiros de ligação ao ligante.
- b)um antagonista de PD1 que inibe a ligação de PD1 a PD-L1.
- c)um antagonista de PD1 que inibe a ligação de PD-1 a PDL2.
- d)um antagonista de PD1 que inibe a ligação de PD-1 a PDL1 e PDL2.
- e)um antagonista de PD1 das partes (a) a (d) que é um anticorpo.

[0147]Antagonistas de PD1 específicos adequados para uso como agentes secundários na presente divulgação incluem:

- a)pembrolizumab (marca Keytruda)
 - i.Número CAS → 1374853-91-4
(ver <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
 - ii.Referência NCBI Pubchem → 254741536
(ver <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)
 - iii.Referência do DrugBank → DB09037
(ver <https://www.drugbank.ca/>)
 - iv.Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → DPT0O3T46P
(ver <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem->

UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm)

b)nivolumab (marca Opdivo)

i.Número CAS → 946414-94-4

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

ii.Referência do DrugBank → DB09035

(ver <https://www.drugbank.ca/>)

c)MEDI0680 (anteriormente AMP-514)

-Como descrito nos documentos WO2014/055648, WO2015/042246, WO2016/127052, WO2017/004016, WO2012/145493, US8609089, WO2016/007235, WO2016/011160; Int. J. Mol. Sci. julho de 2016; 17(7): 1151, doi: 10.3390/ijms17071151; and Drug Discov Today, Setembro de 2015;20(9):1127-34. doi: 10.1016/j.drudis.2015.07.003.

-Ver também experimentos clínicos NCT02271945 e NCT02013804 em

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

d)PDR001 (spartalizumab)

i.Número CAS → 1935694-88-4

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

ii.Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → QOG25L6Z8Z

(ver

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

-Conforme descrito nos documentos WO2016/007235 e WO2016/011160

-Código thesaurus NCI → C121625

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

e)Camrelizumab [INCSHR-1210] (Incyte)

i.Número CAS → 1798286-48-2

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

ii. Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → 73096E137E

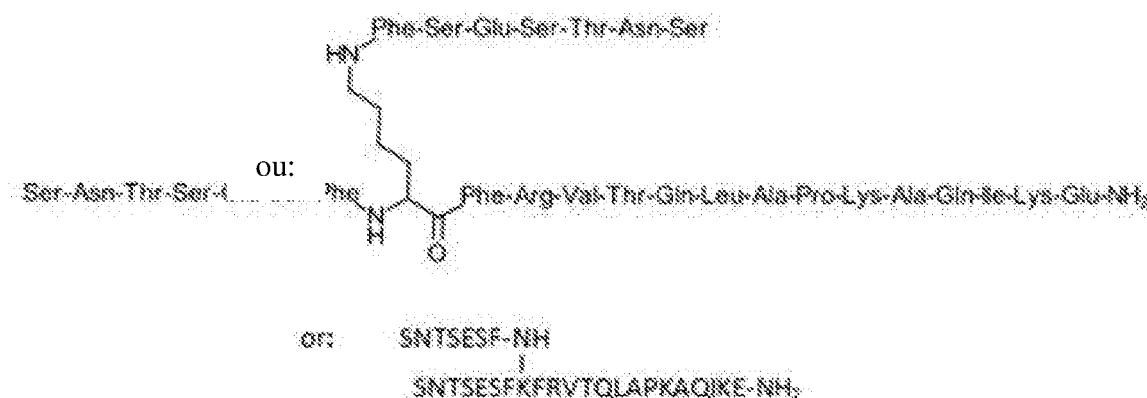
(ver

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

f) AUNP12 (peptídeo) (Aurigene/PierreFabre)

i. Divulgado no documento WO2011/161699 como SEQ ID NO:49 também conhecido como “composto 8”, ver o Exemplo 2 na página 77 da publicação A2 do documento WO2011/161699.

ii. Número CAS → 1353563-85-5



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

Pidilizumab (CT-011)

iii. Número CAS → 1036730-42-3

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

iv. Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → B932PAQ1BQ

(ver

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

g) Cemiplimab (anteriormente REGN-2810, SAR-439684)

i. Número CAS → 1801342-60-8

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

ii. Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → 6QVL057INT

(ver

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

- Conforme descrito no documento WO2016/007235

- Código thesaurus NCI → C121540

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

h)BGB-A317 (Tislelizumab)

i. Conforme descrito no documento US 9.834.606 B2

ii. Ver ensaio clínico NCT03209973 (<https://clinicaltrials.gov/>)

iii. Código de thesaurus NCI C121775

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

i)BGB-108

-Ver documentos WO2016/000619 e US8735553

j)AMP-224

ver ensaio clínico NCT02298946, <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

[0148]Em algumas modalidades, o polipeptídeo de PD1 corresponde ao nº.

de acesso ao Genbank. AAC51773, versão nº. AAC51773.1, data da atualização do registro: 23 de junho de 2010 09:24 h. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de PD1 corresponde ao nº. de acesso ao Genbank. U64863, versão nº. U64863.1, data da atualização do registro: 23 de junho de 2010 09:24 h. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de PD1 corresponde ao número de acesso Uniprot/Swiss-Prot Q15116.

Antagonistas de PD-L1

[0149]“Antagonista de PD-L1” significa qualquer composto químico ou molécula biológica que estimula uma reação imune através da inibição da sinalização

de PD-L1.

[0150]Para examinar a extensão da potencialização, por exemplo, da atividade de PD-L1, amostras ou ensaios compreendendo um dado, por exemplo, proteína, gene, célula ou organismo, são tratadas com um potencial agente ativador ou inibidor e são comparadas com amostras de controle tratadas com uma molécula de controle inativa. As amostras de controle recebem um valor relativo de atividade de 100%. A inibição é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 90% ou menos, tipicamente 85% ou menos, mais tipicamente 80% ou menos, mais tipicamente 75% ou menos, geralmente 70% ou menos, mais geralmente 65% ou menos , geralmente 60% ou menos, tipicamente 55% ou menos, geralmente 50% ou menos, mais geralmente 45% ou menos, mais geralmente 40% ou menos, de preferência 35% ou menos, com mais preferência 30% ou menos, ainda com mais preferência 25% ou menos e, com mais preferência, menos de 20%. A ativação é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 110%, geralmente pelo menos 120%, mais geralmente pelo menos 140%, mais geralmente pelo menos 160%, geralmente pelo menos 180%, mais frequentemente pelo menos duas vezes, na maioria das vezes pelo menos 2,5 vezes, geralmente pelo menos 5 vezes, mais geralmente pelo menos 10 vezes, de preferência pelo menos 20 vezes, com mais preferência pelo menos 40 vezes e com mais preferência mais de 40 vezes mais.

[0151]A combinação de um ADC, que tem como alvo os linfomas e leucemias positivos para a primeira proteína alvo (FTP) e os inibidores de PD-L1 é vantajosa porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais FTP positivas, enquanto, por outro lado, o inibidor de PD-L1 ativará o sistema imunológico do paciente para eliminar as células cancerosas.

[0152]Próximo das células tumorais FTP(+), as células tumorais negativas alvos próximas das células tumorais FTP(+) serão potencialmente mortas pelo

mecanismo de observação do dímero PBD liberado após a morte celular das células FTP(+). Portanto, o ADC mata diretamente as células tumorais. A liberação resultante de抗ígenos associados a tumores de células que são mortas com o dímero de PBD acionará o sistema imunológico, que será ainda mais potencializado pelo uso de inibidores do ligante da proteína 1 de morte celular programada (PD-L1, também conhecido como B7-H1 ou CD274).

[0153]O PD-L1 é geralmente sorregulado na superfície da célula tumoral de muitos tumores humanos diferentes. A interferência no ligante de PD1 expressa no tumor evitará a inibição imunológica no microambiente tumoral e, portanto, o bloqueio da via de PD1 usando inibidores de PDL1 pode melhorar as respostas imunes antitumorais contra os抗ígenos liberados pelos tumores mortos pelo ADC.

[0154]A combinação de um ADC, que tem como alvo uma primeira proteína alvo (FTP) com inibidores de PD1, é vantajosa, porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais positivas para FTP, enquanto, por outro lado, o inibidor de PD1 envolve o sistema imune do próprio paciente para eliminar as células cancerosas. Próximo das células tumorais FTP(+), as células tumorais FTP negativas próximas das células tumorais FTP (+) serão potencialmente mortas pelo mecanismo de observação do dímero de PBD liberado após a morte celular de células CD19(+) ou CD22(+). Portanto, o ADC mata diretamente as células tumorais.

[0155]Os antagonistas de PD-L1 adequados para uso como agentes secundários na presente divulgação incluem os antagonistas de PD-L1 que:

- (a)são antagonistas de ligação a PD-L1;
- (b)inibem a ligação de PD-L1 a PD1;
- (c)inibem a ligação de PD-L1 a B7-1;
- (d)inibem a ligação de PD-L1 a PD1 e B7-1;
- (e)são anticorpos anti-PD-L1.

[0156]Antagonistas de PD-L1 específicos adequados para uso como agentes

secundários na presente divulgação incluem:

a)atezolizumab (MPDL3280A, marca Tecentriq)

i.Número CAS → 1380723-44-3

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

ii.Referência do DrugBank → DB11595

(ver <https://www.drugbank.ca/>)

iii.Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → 52CMI0WC3Y

(ver

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

b)BMS-936559 / MDX-1105

I. Número CAS → 1422185-22-5

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

II.ver ensaio clínico NCT02028403, <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

IIIVer documento WO2007/005874 para sequências de anticorpos, em particular o:

i.Anticorpo tendo:

a.VH CDR1 = DYGFS

b.VH CDR2 = WITAYNGNTNYAQKLQG

c.VH CDR3 = DYFYGMMDV

d.VL CDR1 = RASQSVSSYLV

e.VL CDR2 = DASN RAT

f.VL CDR3 = QQRSNWPRT

ii.Anticorpo tendo:

a.VH CDR1 = TYAIS

b.VH CDR2 = GIPIFGKAHYAQKFQG

c.VH CDR3 = KFHFVSGSPFGMDV

d.VL CDR1 = RASQSVSSYLA

e.VL CDR2 = DASN RAT

f.VL CDR3 = QQRSNWPT

iii. Anticorpo tendo:

a.VH CDR1 = SYDVH

b.VH CDR2 = WLHADTGITKFSQKFQG

c.VH CDR3 = ERIQLWFDY

d.VL CDR1 = RASQGISSWLA

e.VL CDR2 = AASSLQS

f.VL CDR3 = QQYNSYPYT

c) durvalumab/MEDI4736

i. Número CAS → 1428935-60-7

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

ii. Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → 28X28X9OKV

(ver

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

iii. Sequência de VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWV
ANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWF
GELAFDYWGQQGTLTVSS

iv. Sequência de VL

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK

d) Avelumab/MSB0010718C

i. Número CAS → 1537032-82-8

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

ii. Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → KXG2PJ551I

(ver

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

[0157] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de PD-L1 corresponde ao nº. de acesso ao Genbank. AAF25807, versão nº. AAF25807.1, data da atualização do registro: 10 de março de 2010 22:14 h. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de PD1 corresponde ao nº. de acesso ao Genbank. AF177937, versão nº. AF177937.1, data da atualização do registro: 10 de março de 2010 22:14 h. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de PD1 corresponde ao número de acesso Uniprot/Swiss-Prot Q9NZQ7.

Agonistas de GITR

[0158] O termo “receptor de TNF induzido por glicocorticoide” (abreviado aqui como “GITR”), também conhecido como superfamília do receptor de TNF 18 (TNFRSF18, CD357), TEASR e 312C2, como usado aqui, refere-se a um membro do fator de necrose tumoral/família de receptores do fator de crescimento do nervo. A GITR é uma proteína transmembranar do tipo I de 241 aminoácidos caracterizada por três pseudorrepetições de cisteína no domínio extracelular e protege especificamente a apoptose induzida por receptor de células T, embora não proteja as células de outros sinais apoptóticos, incluindo desencadeamento de Fas, tratamento com dexametasona ou irradiação UV (Nocentini, G., et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6216-622).

[0159] A ativação de GITR aumenta a resistência a tumores e infecções virais, está envolvida em processos autoimunes/inflamatórios e regula o extravasamento de leucócitos (Nocentini supra; Cuzzocrea, et al. (2004) J Leukoc. Biol. 76:933-940; Shevach, et al. (2006) Nat. Rev. Immunol. 6:613-618; Cuzzocrea, et al. (2006) J

Immunol. I 77:63I-64I; e Cuzzocrea, et al. (2007) FASEB J 21 :I I 7-I29). Em modelos de camundongos com tumor, o anticorpo agonista de GITR, DTA-I, foi combinado com um anticorpo antagonista de CTLA-4, e mostrou resultados sinérgicos na regressão completa do tumor de tumores em estágios avançados em alguns camundongos do grupo de teste (Ko, et al. (2005) J Exp. Med. 7:885-89I).

[0160]As sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos de GITR humana (hGITR), das quais existem três variantes de splice, são conhecidas e podem ser encontradas, por exemplo, nos n°s. de acesso ao Genbank gi: 40354198, gi: 23238190, gi: 23238193 e gi: 23238196.

[0161]“Agonista de GITR” significa qualquer composto químico ou molécula biológica que estimula uma reação imune através da ativação da sinalização de GITR. Também estão contempladas proteínas GITR-L solúveis, um parceiro de ligação a GITR.

[0162]Para examinar a extensão da potencialização de, por exemplo, atividade de GITR, amostras ou ensaios compreendendo um dado, por exemplo, proteína, gene, célula ou organismo, são tratadas com um potencial agente ativador ou inibidor e são comparadas com amostras de controle tratadas com uma molécula de controle inativa. As amostras de controle recebem um valor relativo de atividade de 100%. A inibição é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 90% ou menos, tipicamente 85% ou menos, mais tipicamente 80% ou menos, mais tipicamente 75% ou menos, geralmente 70% ou menos, mais geralmente 65% ou menos , geralmente 60% ou menos, tipicamente 55% ou menos, geralmente 50% ou menos, mais geralmente 45% ou menos, mais geralmente 40% ou menos, de preferência 35% ou menos, com mais preferência 30% ou menos, ainda com mais preferência 25% ou menos e, com mais preferência, menos de 20%. A ativação é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 110%, geralmente pelo menos 120%, mais geralmente pelo menos 140%, mais geralmente

pelo menos 160%, geralmente pelo menos 180%, mais frequentemente pelo menos duas vezes, na maioria das vezes pelo menos 2,5 vezes, geralmente pelo menos 5 vezes, mais geralmente pelo menos 10 vezes, de preferência pelo menos 20 vezes, com mais preferência pelo menos 40 vezes e com mais preferência mais de 40 vezes mais.

[0163]É vantajoso combinar um ADC, que tem como alvo os linfomas e leucemias positivos para a primeira proteína alvo (FTP) com agonistas de GITR, porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais positivas de FTP, enquanto, por outro lado, o agonista de GITR envolve o próprio sistema imunológico do paciente para eliminar as células cancerosas. Próximo das células tumorais FTP(+), as células tumorais negativas alvos próximas das células tumorais FTP(+) serão potencialmente mortas pelo mecanismo de observação do dímero PBD liberado após a morte celular das células FTP(+). Assim, o ADC irá matar diretamente o tumor. A liberação resultante de抗ígenos associados a tumores de células mortas com o dímero de PBD acionará o sistema imunológico, o qual será potencializado ainda mais pelo uso de um agonista de GITR.

[0164]A GITR (proteína relacionada ao TNFR induzida por glucocorticoide) é expressa transitoriamente em células T ativadas e expressas constitutivamente em altos níveis em T-reg com indução adicional após a ativação. A ligação de GITR através do seu ligante GITRL estimula a proliferação e a função de células T CD4+ efetoras e reguladoras. Isso promove a sobrevivência das células T e a diferenciação em células efetoras, enquanto anula a supressão. Portanto, será benéfico direcionar um tumor FTP(+) com o ADC, causando a morte celular antigênica, enquanto o agonista de GITR induz uma resposta imune mais forte e durável.

[0165]Os agonistas de GITR específicos adequados para uso como agentes secundários na presente divulgação incluem:

a)MEDI1873, uma proteína de fusão de ligante GITR desenvolvida por

MedImmune

-Ver o documento WO2016/196792, US20160304607

-Código thesaurus NCI → C124651

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

-Ver também o ensaio clínico NCT023126110 em
<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

-Ver Tigue NJ, Bamber L, Andrews J, et al. MEDI1873, um agonista hexamérico estabilizado e potente de GITR humana com potencial alvo para células T reguladoras. Oncoimmunology. 2017;6(3):e1280645. doi:10.1080/2162402X.2017.1280645.

b)INCAGN1876, é um anticorpo agonista que tem como alvo a proteína relacionada a TNFR induzida por glicocorticoide, ou GITR. Descoberta durante uma colaboração com Ludwig Cancer Research. INCAGN1876 está sendo co-desenvolvido com Incyte

-Ver ensaios clínicos NCT02583165 e NCT03277352 em
<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

c)TRX518, um mAb humanizado de IgG1 anti-GITR agilcosilado (Fc desativado) com atividade imunomoduladora desenvolvida por Leap Therapeutics

o Ver documento WO2006/105021 para as sequências 58, 60-63; e EP2175884 sequências 1-7:

- VL compreendendo a sequência (CDR sublinhada):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTNVAYQQKPGQAPRLLIYSA
SYRYSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFA VYYCQQYNTDPLTFGGGKVEIK

- VH compreendendo a sequência (CDR sublinhada):

QVTLRESPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLA
HIWWDDDKEYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARTRRYFPFA
YWGQGTLTVS

QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLA
HIWWDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDTATYYCARTRRYFPFA
YWGQGTLTVS

o Ver ensaios clínicos NCT01239134 e NCT02628574 em
<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

o Código thesaurus NCI → C95023

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

d) GWN323, um anticorpo monoclonal agonístico anti-GITR, que ativa as GITRs encontradas em vários tipos de células T. GWN323 é desenvolvido pela Novartis

- Ver documento WO2016/196792

- Código thesaurus NCI → C128028

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

- Ver o ensaio clínico NCT02740270 em <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

e) MK-1248, um anticorpo monoclonal agonístico (MoAb) do receptor de fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide (GITR) de IgG4 humana com função efetora significativamente reduzida

- Ver o ensaio clínico NCT02553499 em <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

- MK-1248 tem a mesmo CDR que o MK4166 (ver Sukumar et al., Cancer Res. 2017)

f) MK-4166, um anticorpo monoclonal agonístico (MoAb) do receptor de fator de necrose tumoral (GITR) induzida por glucocorticoide de IgG1 anti-humana humanizado com potencial atividade imunomoduladora (ver Sukumar et al., Cancer Res. 2017).

- Ver o ensaio clínico NCT02132754 em <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

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

-Código de thesaurus NCI C116065

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

g)BMS-986156, um anticorpo monoclonal agonístico (GITR; membro 18 da superfamília do fator de necrose tumoral; TNFRSF18; CD357) do receptor de fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide anti-humano

-Ver o ensaio clínico NCT02598960 em <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

-Código de thesaurus NCI C132267

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

[0166]As sequências de anticorpos anti-GITR agonistas são fornecidas nos documentos WO2011/028683 e WO2006/105021.

[0167]Em algumas modalidades, o polipeptídeo de GITR corresponde ao nº. de acesso ao Genbank AAD22635, versão nº. AAD22635.1, data da atualização do registro: 10 de março de 2010 21:42 h. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de GITR corresponde ao nº. de acesso ao Genbank. AF125304, versão nº. AF125304.1, data da atualização do registro: 10 de março de 2010 21:42 h. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de GITR corresponde ao número de acesso Uniprot/Swiss-Prot Q9Y5U5.

Agonistas de OX40

[0168]OX40 (CD134; TNFRSF4) é um membro da superfamília de TNFR e é expresso por células T CD4 e CD8 durante a ativação específica do antígeno. A expressão de OX40 é amplamente transitória após a reticulação de TCR/CD3 e pela presença de citocinas inflamatórias. Na ausência de sinais de ativação, relativamente poucos subconjuntos de células T maduras expressam OX40 em níveis biologicamente relevantes. A geração de respostas ótimas das células T CD8 “matadoras” requer a ativação do receptor de células T mais a co-estimulação, que

pode ser fornecida através da ligação de OX40 usando um agonista de OX40. Esse mecanismo de ativação aumenta a diferenciação de células T e a função citolítica, levando a uma imunidade antitumoral aumentada. Portanto, será benéfico direcionar um tumor FTP(+) com o ADC, causando a morte celular antigênica, enquanto o agonista de OX40 induz uma resposta imune mais forte e durável.

[0169]O agonista de OX40 pode ser selecionado do grupo que consiste em um anticorpo de agonista de OX40, um fragmento de agonista de OX40L, um receptor oligomérico de OX40 e uma imunoadesina de OX40. Em algumas modalidades, o agonista de ligação ao OX40 é uma proteína OX40L-Fc trimérica.

[0170]Em algumas modalidades, o agonista de ligação de OX40 é um fragmento de agonista de OX40L compreendendo um ou mais domínios extracelulares de OX40L. Em algumas modalidades, o agonista de ligação ao OX40 é um anticorpo agonista de OX40 que se liga ao OX40 humano. Em algumas modalidades, o anticorpo agonista de OX40 esgota células que expressam OX40 humano. Em algumas modalidades, o anticorpo agonista de OX40 esgota células que expressam OX40 humano *in vitro*. Em algumas modalidades, as células são células T efetoras de CD4+. Em algumas modalidades, as células são células Treg. Em algumas modalidades, o esgotamento é por ADCC e/ou fagocitose. Em algumas modalidades, o esgotamento é pelo ADCC. Em algumas modalidades, o anticorpo agonista de OX40 liga OX40 humano com uma afinidade menor ou igual a cerca de 1 nM. Em algumas modalidades, o anticorpo agonista de OX40 aumenta a proliferação de células T efetoras de CD4+ e/ou aumenta a produção de citocinas pela célula T efetora de CD4+ em comparação com a proliferação e/ou produção de citocinas antes do tratamento com anticorpo agonista de OX40 anti-humano. Em algumas modalidades, a citocina é interferon gama. Em algumas modalidades, o anticorpo agonista de OX40 aumenta a proliferação de células T de memória e/ou aumenta a produção de citocinas pela célula de memória. Em algumas modalidades, a citocina é

interferon gama. Em algumas modalidades, o anticorpo agonista de OX40 inibe a função Treg. Em algumas modalidades, o anticorpo agonista de OX40 inibe a supressão de Treg da função de células T efetoras. Em algumas modalidades, a função de células T efetoras é a proliferação de células T efetoras e/ou a produção de citocinas. Em algumas modalidades, a célula T efetora é uma célula T efetora de CD4+. Em algumas modalidades, o anticorpo agonista de OX40 aumenta a transdução de sinal de OX40 em uma célula alvo que expressa OX40. Em algumas modalidades, a transdução de sinal de OX40 é detectada monitorando a sinalização a jusante de NFkB.

[0171]“Agonista de OX40” significa qualquer composto químico ou molécula biológica que estimula uma reação imune por meio da ativação da sinalização de OX40.

[0172]Para examinar a extensão da potencialização, por exemplo, da atividade de OX40, amostras ou ensaios compreendendo um dado, por exemplo, proteína, gene, célula ou organismo, são tratadas com um potencial agente ativador ou inibidor e são comparadas com amostras de controle tratadas com uma molécula de controle inativa. As amostras de controle recebem um valor relativo de atividade de 100%. A inibição é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 90% ou menos, tipicamente 85% ou menos, mais tipicamente 80% ou menos, mais tipicamente 75% ou menos, geralmente 70% ou menos, mais geralmente 65% ou menos , geralmente 60% ou menos, tipicamente 55% ou menos, geralmente 50% ou menos, mais geralmente 45% ou menos, mais geralmente 40% ou menos, de preferência 35% ou menos, com mais preferência 30% ou menos, ainda com mais preferência 25% ou menos e, com mais preferência, menos de 20%. A ativação é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 110%, geralmente pelo menos 120%, mais geralmente pelo menos 140%, mais geralmente pelo menos 160%, geralmente pelo menos 180%, mais frequentemente pelo menos

duas vezes, na maioria das vezes pelo menos 2,5 vezes, geralmente pelo menos 5 vezes, mais geralmente pelo menos 10 vezes, de preferência pelo menos 20 vezes, com mais preferência pelo menos 40 vezes e com mais preferência mais de 40 vezes mais.

[0173]É vantajoso combinar um ADC, que tem como alvo os linfomas e leucemias positivos para a primeira proteína alvo (FTP) com agonistas de OX40, porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais FTP positivas, enquanto, por outro lado, o agonista de OX40 envolve o próprio sistema imunológico do paciente para eliminar as células cancerosas. Próximo das células tumorais FTP(+), as células tumorais negativas alvos próximas das células tumorais FTP(+) serão potencialmente mortas pelo mecanismo de observação do dímero PBD liberado após a morte celular das células FTP(+). Assim, o ADC irá matar diretamente o tumor. A liberação resultante de抗ígenos associados a tumores de células mortas com o dímero de PBD acionará o sistema imunológico, o que será ainda mais potencializado pelo uso de um agonista de OX40.

[0174]Os agonistas de OX40 específicos adequados para uso como agentes secundários na presente divulgação incluem:

a) MEDI0562 (tcp Tavolixizumab, Tavolimab)

i) Número CAS → 1635395-25-3

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

ii) Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → 4LU9B48U4D

(ver

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

-Ver o ensaio clínico NCT02318394 em <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

-Conforme descrito nos documentos WO2015/095423, WO2015/153514,

WO2016/073380 e WO2016/081384

-Código thesaurus NCI → C120041

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

-Sequência de Cadeia Pesada:

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPKGLEYIGYI
SYNGITYHNPSLKSRTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAM
DYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPG

-Sequência de Cadeia Leve:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS
KLHSGVPSRFSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC

b) MEDI6383 (Efizone mod alfa)

i) Número CAS → 1635395-27-5

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

ii) Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → 1MH7C2X8KE

(ver

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

-Ver o ensaio clínico NCT02221960 em <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

-Conforme descrito nos documentos WO2015/095423, WO2016/081384, e
WO2016/189124

-Código thesaurus NCI → C118282

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

-Sequência de aminoácidos (Seq ID nº.17 do documento WO2016/189124):

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSGKDQDKIEALSSKVQQLERSIGLKDLAMADLEQKVLEMEASTQVSH
RYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIITSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGFYLISLKGYFSQEV
NISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDHVNGEL
ILIHQNPGEFCVL

c) MOXR0916 (também conhecido como RG7888, Pogalizumab), um anticorpo monoclonal humanizado anti-OX40

i.Número CAS → 1638935-72-4

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

ii.Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → C78148TF1D

(ver

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

iii.Código de thesaurus NCI → C121376

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

d) OX40mAb24 (9B12)

i.OX40mAb24 é uma versão humanizada de 9B12. 9B12 é um mAb anti-OX40 de IgGI de murino direcionado contra o domínio extracelular de OX40 humano (CD134) (Weinberg, AD, et al. J Immunother 29, 575-585 (2006)).

ii.Ver o documento WO2016/057667 Seq ID nº.59 para a sequência OX40mAb24 VH, nº.29 para a sequência VL (nº.32 é uma VL alternativa):

Sequência de VH

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYIGYI
SYNGITYHNPSLKSRTINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAM
DYWGQQGTLTVSS

Sequência de VL

DIQMTQSPSSLASVGDRVITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS
KLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK

e) INCAGN1949

i.Ver Gonzalez et al. 2016, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-3204

ii.Ver o ensaio clínico NCT02923349 em <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>

iii.As sequências de anticorpos são divulgadas no documento WO2016/179517

A1:

i.Em particular, um anticorpo compreendendo as sequências:

VH CDR1 → GSAMH

VH CDR2 → RIRSKANSYATAYAASVKG

VH CDR3 → GIYDSSGYDY

VL CDR1 → RSSQSLLHSNGNYLD

VL CDR2 → LGSNRAS

VL CDR3 → MQALQTPLT

ii.Tal como, um anticorpo compreendendo as sequências:

VH →

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWV
GRIRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGIYDS
SGYDYWGQQGTLTVSS

VL →

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGS
NRASGVPDFRGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGKVEIK

→

- g) GSK3174998, um anticorpo (mAb) monoclonal anti-OX40 agonista de IgG1 humanizada
- Ver o ensaio clínico NCT02528357 em <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
- h) PF-04518600 (PF-8600) é um anticorpo monoclonal (mAb) experimental e totalmente humano que tem como alvo a proteína OX40
- Ver patente [WO 2017/130076 A1](#)
 - Ver ensaio clínico NCT02315066 rm <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>- código thesaurus NCI → C121927

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

[0175]Em algumas modalidades, o polipeptídeo de OX40 corresponde ao nº. de acesso ao Genbank. CAA53576, versão nº. CAA53576.1, data da atualização do registro: 2 de fevereiro de 2011 10:10 h. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de OX40 corresponde ao nº. de acesso ao Genbank. X75962, versão nº. X75962.1, data da atualização do registro: 2 de fevereiro de 2011 10:10 h. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de OX40 corresponde ao número de acesso Uniprot/Swiss-Prot P43489.

Antagonista de CTLA

[0176]CTLA4 (CD152) é expresso em células T ativadas e serve como um co-inibidor para manter as respostas das células T sob controle após a ativação de células T mediada por CD28. Acredita-se que o CTLA4 regula a amplitude da ativação precoce de células T ingênuas e de memória após o envolvimento do TCR e faça parte de uma via inibidora central que afeta a imunidade antitumoral e a autoimunidade. CTLA4 é expresso exclusivamente em células T, e a expressão de seus ligantes CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) é amplamente restrita a células apresentadoras de抗ígenos, células T e outras células mediadoras imunológicas. Anticorpos anti-CTLA4 antagonistas que bloqueiam a via de sinalização de CTLA4 foram relatados como

potencializando a ativação de células T. Um desses anticorpos, o ipilimumab, foi aprovado pelo FDA em 2011 para o tratamento de melanoma metastático. Outro anticorpo anti-CTLA4, tremelimumab, foi testado em estudos de fase III para o tratamento de melanoma avançado, mas não aumentou significativamente a sobrevida global dos pacientes em comparação com o padrão de atendimento (temozolomida ou dacarbazina) naquele momento.

[0177]“Agonista de CTLA4” significa qualquer composto químico ou molécula biológica que estimula uma reação imune através da inibição da sinalização de CTLA4.

[0178]Para examinar a extensão da potencialização, por exemplo, da atividade de CTLA4, amostras ou ensaios compreendendo um dado, por exemplo, proteína, gene, célula ou organismo, são tratadas com um potencial agente ativador ou inibidor e são comparadas com amostras de controle tratadas com uma molécula de controle inativa. As amostras de controle recebem um valor relativo de atividade de 100%. A inibição é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 90% ou menos, tipicamente 85% ou menos, mais tipicamente 80% ou menos, mais tipicamente 75% ou menos, geralmente 70% ou menos, mais geralmente 65% ou menos , geralmente 60% ou menos, tipicamente 55% ou menos, geralmente 50% ou menos, mais geralmente 45% ou menos, mais geralmente 40% ou menos, de preferência 35% ou menos, com mais preferência 30% ou menos, ainda com mais preferência 25% ou menos e, com mais preferência, menos de 20%. A ativação é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 110%, geralmente pelo menos 120%, mais geralmente pelo menos 140%, mais geralmente pelo menos 160%, geralmente pelo menos 180%, mais frequentemente pelo menos duas vezes, na maioria das vezes pelo menos 2,5 vezes, geralmente pelo menos 5 vezes, mais geralmente pelo menos 10 vezes, de preferência pelo menos 20 vezes, com mais preferência pelo menos 40 vezes e com mais preferência mais de 40 vezes

mais.

[0179]A combinação de um ADC, que tem como alvo os linfomas e leucemias positivos para a primeira proteína alvo (FTP) e os inibidores de CTLA4 é vantajosa, porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais FTP positivas, enquanto, por outro lado, o inibidor de CTLA4 se envolve no próprio sistema imunológico do paciente para eliminar as células cancerosas. Próximo das células tumorais FTP(+), as células tumorais negativas alvos próximas das células tumorais FTP(+) serão potencialmente mortas pelo mecanismo de observação do dímero PBD liberado após a morte celular das células FTP(+). Assim, o ADC irá matar diretamente o tumor. A liberação resultante de抗ígenos associados a tumores de células mortas com o dímero de PBD acionará o sistema imunológico, que será ainda mais potencializado pelo uso de inibidores de CTLA4 expressos em uma grande proporção de linfócitos infiltrantes de tumores (TILs) de muitos tipos diferentes de tumores.

[0180]A principal função de CTLA4 (CD152) é regular a amplitude dos estágios iniciais da ativação das células T e, como tal, neutralizar a atividade do receptor co-estimulador de células T, CD28, no microambiente tumoral. O bloqueio da via de CTLA4 pode, portanto, melhorar o aumento da atividade das células T CD4+ efetoras, enquanto inibe a imunossupressão dependente de células TReg. Portanto, será benéfico direcionar um tumor FTP(+) com o ADC, causando a morte celular antigênica, enquanto o bloqueio de CTLA4 induz uma resposta imune e durável mais forte.

[0181]Antagonistas de CTLA4 específicos adequados para uso como agentes secundários na presente divulgação incluem:

a) ipilimumab

i. Número CAS → 477202-00-9

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

ii. Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → 6T8C155666

(ver

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

b) Tremelimumab

i. Número CAS → 745013-59-6

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

ii. Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → QEN1X95CIX

(ver

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

iii. Sequência de VH

GVVQPGRLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVIYDGSNK
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDV
 WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH [SEQ ID NO. 1]

iv. Sequência de VL

PSSLSASVGDRVITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFI
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV [SEQ ID NO. 2]

[0182] Em algumas modalidades, o polipeptídeo de CTLA corresponde ao nº. de acesso ao Genbank AAL07473, versão nº. AAL07473.1, data da atualização do registro: 11 de março de 2010 01:28 h. Em uma modalidade, o ácido nucleico que codifica o polipeptídeo de CTLA4 corresponde ao nº. de acesso ao Genbank. AF414120, versão nº. AF414120.1, data da atualização do registro: 11 de março de 2010 01:28 h. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de OX40 corresponde ao número de acesso Uniprot/Swiss-Prot P16410.

Fludarabina e Citarabina

[0183]A combinação de agentes com diferentes mecanismos de ação é um princípio terapêutico estabelecido para combater o câncer. Pode ser uma maneira de aumentar a atividade antitumoral quando é mostrado um efeito sinérgico e/ou quando é observada toxicidade reduzida. Conjugados de anticorpo-fármaco, incluindo aqueles com uma ogiva de PBD, podem ser particularmente adequados como parceiros de combinação porque são mais direcionados em comparação à quimioterapia convencional. À medida que os dímeros de PBD reticulam o DNA de maneira covalente, é provável que combiná-los com outros agentes que interferem na síntese de DNA por meio de um mecanismo diferente traga um benefício. Exemplos de tais combinações potenciais são fludarabina e citarabina.

Fludarabina

[0184]A fludarabina ou fosfato de fludarabina (Fludara) é um medicamento quimioterápico usado no tratamento de neoplasias hematológicas, como leucemias e linfomas. É um análogo da purina, que interfere no DNA, interferindo na ribonucleotídeo redutase (RNAR) e na DNA polimerase. É ativo contra células em divisão e em repouso. Também demonstrou-se que a fludarabina suprime a transcrição do ERCC1 e isso pode explicar a sinergia observada entre a fludarabina e o dímero de PBD SJG136 (SG2000) contra células de leucemia linfocítica crônica. CLAG/CLAG-M - a cladribina é outro análogo de purina que inibe o RNR.

[0185]A combinação de ADC, que tem como alvo linfomas e leucemias positivos para a primeira proteína alvo (FTP), com Fludarabina é vantajosa, porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais FTP positivas através de mecanismos que dependem da reticulação do DNA, resultando em apoptose, enquanto, por outro lado, a fludarabina inibirá as células de RNA e DNA polimerase, além de suprimir as enzimas de reparo de DNA necessárias para resolver as reticulações do DNA induzidas pelo dímero de PBD.

[0186] Para mostrar que o ADC trabalha sinergicamente com a fludarabina, um painel de linhagens celulares FTP(+) será co-tratado com uma faixa de concentração tanto de ADC quanto de fludarabina. Como controles negativos, o mesmo painel de linhagens celulares será co-tratado com uma faixa de concentrações de Fludarabina e uma ADC de controle não direcionada ou com uma faixa de concentração de ADC e do veículo. Após a incubação, dois parâmetros serão medidos: a quantidade de FTP de superfície (conforme determinado por citometria de fluxo) e a citotoxicidade *in vitro* das combinações (conforme determinado pelos ensaios CellTiter-Glo® ou MTS). A sinergia citotóxica é calculada transformando os dados de viabilidade celular em fração afetada e calculando o índice de combinação usando o programa de análise de CalcuSyn.

Número CAS → 21679-14-1

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

ii. Referência NCBI Pubchem → 657237

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

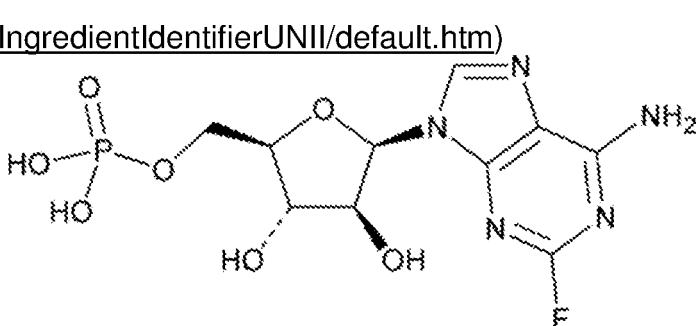
iii. Referência IUPHAR/BPS → 4802

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

iv. Identificador exclusivo de ingrediente (UNII) → 1X9VK9O1SC

(ver

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



Fórmula VII, Fludarabina: Ácido [(2R,3R,4S,5R)-5-(6-amino-2-fluoro-purin-9-yl)-3,4-dihidróxi-oxolan-2-il]metoxifosfônico

Citarabina

[0187]A citarabina ou citosina arabinosídeo (Cytosar-U ou Depocyt) é um medicamento quimioterápico antimetabólico usado no tratamento de neoplasias hematológicas, como leucemia mieloide aguda (AML) e linfoma não-Hodgkin. Também é conhecida como ara-C (arabinofuranosil citidina). Ela mata células cancerosas interferindo na síntese de DNA. É metabolizada ativamente para trifosfato de citosina arabinosídeo, que danifica o DNA quando o ciclo celular se mantém na fase S (síntese de DNA). As células em rápida divisão, que requerem replicação de DNA para mitose, são, portanto, as mais afetadas. A citosina arabinosídeo também inibe as polimerases de DNA e RNA e as enzimas de nucleotídeo redutase necessárias para a síntese de DNA.

[0188]A combinação de ADC, que tem como alvo linfomas e leucemias positivos para Primeira Proteína Alvo (FTP), com Citarabina é vantajosa, porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais FTP positivas através de mecanismos que dependem da reticulação do DNA, resultando em apoptose, enquanto, por outro lado, a citarabina inibirá as células de RNA e DNA polimerase, além de suprimir a síntese de DNA.

[0189]Para mostrar que o ADC trabalha sinergicamente com a citarabina, um painel de linhagens celulares FTP(+) será co-tratado com uma faixa de concentração de ADC e de citarabina. Como controles negativos, o mesmo painel de linhagens celulares será co-tratado com uma faixa de concentrações de Citarabine e um ADC de controle não direcionado ou com uma faixa de concentração de ADC e de veículo. Após a incubação, dois parâmetros serão medidos: a quantidade de FTP de superfície (conforme determinado por citometria de fluxo) e a citotoxicidade *in vitro* das combinações (conforme determinado pelos ensaios CellTiter-Glo® ou MTS). A sinergia citotóxica é calculada transformando os dados de viabilidade celular em fração afetada e calculando o índice de combinação usando o programa de análise

de CalcuSyn (ver o exemplo 4).

Número CAS → 147-94-4

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

ii. Referência NCBI Pubchem → 6253

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

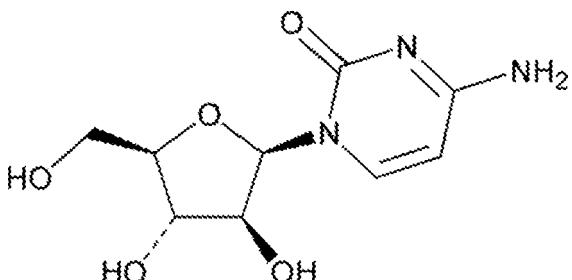
iii. Referência IUPHAR/BPS → 4827

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

iv. Identificador exclusivo de ingrediente (UNII) → 04079A1RDZ

(ver

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



Fórmula VIII, Citarabina: 4-amino-1-[(2R,3S,4R,5R)-3,4-di-hidróxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il] pirimidin-2-ona

Agente de hipometilação

[0190] O termo “agente de hipometilação” refere-se a uma classe de compostos que interferem na metilação de DNA, que é a adição de um grupo metila à posição 5 do anel citosina pirimidina ou ao nitrogênio na posição 6 do anel de adenina purina. A metilação do DNA altera de maneira estável o padrão de expressão gênica nas células, ou seja, diminui a expressão gênica (ou seja, para o receptor de vitamina D). Os agentes de hipometilação são compostos que podem inibir a metilação, resultando na expressão dos genes silenciados previamente hipermetilados.

Análogos de citidina, como 5-azacitidina (azacitidina) e 5-aza-2'-desoxicitididina (decitabina, são os agentes de hipometilação mais comumente usados. Esses compostos funcionam ligando-se às enzimas que catalisam a reação de metilação, isto é, as metiltransferases de DNA.

[0191]Para examinar a extensão da hipometilação, amostras ou ensaios compreendendo um dado, por exemplo, proteína, gene, célula ou organismo, são tratadas com um potencial agente ativador ou inibidor e são comparadas com amostras de controle tratadas com uma molécula de controle inativa. As amostras de controle recebem um valor relativo de atividade de 100%. A inibição é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 90% ou menos, tipicamente 85% ou menos, mais tipicamente 80% ou menos, mais tipicamente 75% ou menos, geralmente 70% ou menos, mais geralmente 65% ou menos , geralmente 60% ou menos, tipicamente 55% ou menos, geralmente 50% ou menos, mais geralmente 45% ou menos, mais geralmente 40% ou menos, de preferência 35% ou menos, com mais preferência 30% ou menos, ainda com mais preferência 25% ou menos e, com mais preferência, menos de 20%. A ativação é alcançada quando o valor da atividade em relação ao controle é de cerca de 110%, geralmente pelo menos 120%, mais geralmente pelo menos 140%, mais geralmente pelo menos 160%, geralmente pelo menos 180%, mais frequentemente pelo menos duas vezes, na maioria das vezes pelo menos 2,5 vezes, geralmente pelo menos 5 vezes, mais geralmente pelo menos 10 vezes, de preferência pelo menos 20 vezes, com mais preferência pelo menos 40 vezes e com mais preferência mais de 40 vezes mais.

[0192]A combinação de um ADC, que tem como alvo os linfomas e leucemias positivos para a primeira proteína alvo (FTP) com um agente de hipometilação é vantajosa, porque, por um lado, o ADC mata diretamente as células tumorais FTP positivas, enquanto, por outro lado, o agente de hipometilação irá interferir na metilação do DNA. Essa interferência é por causa da desmetilação nessa sequência,

o que afeta adversamente a maneira como as proteínas reguladoras celulares são capazes de se ligar ao substrato de DNA/RNA. Essa atividade sinergiza-se com o ADC porque os dímeros de PBD reticulam o DNA de maneira covalente, de modo que combinando-os com outros agentes que interferem na síntese de DNA por meio de um mecanismo diferente fornece um benefício.

[0193]Os agentes de hipometilação específicos adequados para uso como agentes secundários na presente divulgação incluem:

a)5-azacitidina (azacitidina)

i.Número CAS → 320-67-2

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

ii.Referência NCBI Pubchem → 9444

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

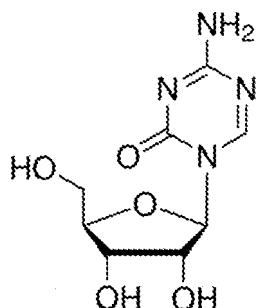
iii.Referência IUPHAR/BPS → 6796

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

iv.Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → M801H13NRU

(ver

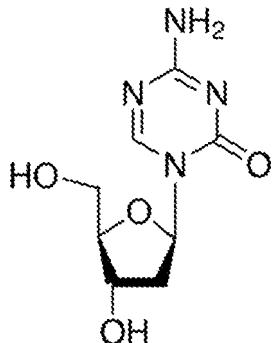
<http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>



Fórmula IX, 5-azacitidina: 4-Amino-1-β-D-ribofuranosil-1,3,5-triazin-2 (1H)-ona

b)5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina)

- i.Número CAS → 2353-33-5
(ver <http://www.cas.org/content/chemical-substances/faqs>)
- ii.Referência NCBI Pubchem → 451668
(ver <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- iii.Referência IUPHAR/BPS → 6805
(ver <http://www.guidetopharmacology.org/>)
- iv.Identificador Exclusivo de Ingrediente (UNII) → 776B62CQ27
(ver
<http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/SubstanceRegistrationSystem-UniqueIngredientIdentifierUNII/default.htm>)



Fórmula X, b) 5-aza-2'-desoxycitidina: 4-Amino-1-(2-desóxi-β-D-eritropentofuranosil)-1,3,5-triazin-2 (1H) -ona

Propriedades vantajosas das combinações descritas

[0194]Tanto o ADC quanto o agente secundário, quando usados como um único agente isoladamente, demonstraram utilidade clínica - por exemplo, no tratamento de câncer. No entanto, conforme descrito neste documento, espera-se que a combinação de ADC e do agente secundário forneça uma ou mais das seguintes vantagens sobre o tratamento com o ADC ou o agente secundário isoladamente:

- 1)tratamento eficaz de uma ampla gama de cânceres;
- 2)tratamento eficaz de formas resistentes ou refratárias de distúrbios, como câncer, e indivíduos com distúrbios, como câncer, que são reincidentes após um

período de remissão;

- 3) aumento da taxa de resposta ao tratamento; e/ou
- 4) maior durabilidade do tratamento.

[0195]O tratamento eficaz de uma gama mais ampla de cânceres, como usado aqui, significa que após o tratamento com a combinação, uma resposta completa é observada com uma maior variedade de tipos de cânceres reconhecidos. Ou seja, é observada uma resposta completa dos tipos de cânceres não relatados anteriormente para responder completamente ao ADC ou ao agente secundário isoladamente.

[0196]O tratamento eficaz de formas resistentes, refratárias ou reincidentes, como usado aqui, significa que após o tratamento com a combinação, uma resposta completa é observada em indivíduos que são parcial ou completamente resistentes ou refratários ao tratamento com ADC ou agente secundário isoladamente (por exemplo, indivíduos que não apresentam resposta ou apenas resposta parcial após o tratamento apenas com o agente ou com distúrbio reincidente). Em algumas modalidades, uma resposta completa após o tratamento com a combinação de ADC/agente secundário é observada em pelo menos 10% dos indivíduos que são parcial ou completamente resistentes ou refratários ao tratamento com ADC ou agente secundário isoladamente. Em algumas modalidades, uma resposta completa após o tratamento com a combinação de ADC/agente secundário é observada em pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos indivíduos que são parcial ou completamente resistentes ou refratários ao tratamento com o ADC ou com o agente secundário isoladamente.

[0197]O aumento da taxa de resposta ao tratamento, como usado aqui, significa que após o tratamento com a combinação é observada uma resposta completa em uma proporção maior de indivíduos do que a observada após o

tratamento com ADC ou com agente secundário isoladamente. Em algumas modalidades, uma resposta completa após o tratamento com a combinação de ADC/agente secundário é observada em pelo menos 10% dos indivíduos tratados. Em algumas modalidades, uma resposta completa após o tratamento com a combinação de ADC/agente secundário é observada em pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% dos indivíduos tratados.

[0198]O aumento da durabilidade do tratamento, como usado aqui, significa que a duração média da resposta completa em indivíduos tratados com a combinação é maior do que em indivíduos que atingem resposta completa após o tratamento com ADC ou com agente secundário isoladamente. Em algumas modalidades, a duração média de uma resposta completa após o tratamento com a combinação de ADC/agente secundário é de pelo menos 6 meses. Em algumas modalidades, a duração média de uma resposta completa após o tratamento com a combinação de ADC/agente secundário é de pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses, pelo menos 3 anos, pelo menos 4 anos, pelo menos 5 anos , pelo menos 6 anos, pelo menos 7 anos, pelo menos 8 anos, pelo menos 9 anos, pelo menos 10 anos, pelo menos 15 anos ou pelo menos 20 anos.

[0199]'Resposta completa' é usada aqui para significar a ausência de qualquer evidência clínica de doença em um indivíduo. As evidências podem ser avaliadas usando a metodologia apropriada na técnica, por exemplo, varredura de CT ou PET, ou biópsia, quando apropriado. O número de doses necessárias para obter resposta completa pode ser uma, duas, três, quatro, cinco, dez ou mais. Em algumas modalidades, os indivíduos alcançam resposta completa em não mais que um ano após a administração da primeira dose, como não mais que 6 meses, não mais que 3 meses, não mais que um mês, não mais que uma quinzena ou não mais que uma

semana após a administração da primeira dose.

Distúrbios tratados

[0200]As terapias de combinação aqui descritas incluem aquelas com utilidade para a atividade anticâncer. Em particular, em certos aspectos, as terapias incluem um anticorpo conjugado, isto é, covalentemente ligado por um ligante, a uma porção de fármaco de PBD, isto é, toxina. Quando o fármaco não é conjugado com um anticorpo, o fármaco PBD tem um efeito citotóxico. A atividade biológica da fração do fármaco de PBD é então modulada por conjugação a um anticorpo. Os conjugados anticorpo-fármaco (ADC) da invenção entregam seletivamente uma dose eficaz de um agente citotóxico ao tecido tumoral, pelo que pode ser conseguida maior seletividade, isto é, uma dose eficaz inferior.

[0201]Assim, em um aspecto, a presente divulgação fornece terapias de combinação compreendendo a administração de um ADC que se liga a uma primeira proteína alvo para uso em terapia, em que o método compreende selecionar um sujeito com base na expressão da proteína alvo.

[0202]Em um aspecto, a presente divulgação fornece uma terapia combinada com um rótulo que especifica que a terapia é adequada para uso com um sujeito determinado como adequado para esse uso. O rótulo pode especificar que a terapia é adequada para uso em um sujeito que tenha expressão da primeira proteína alvo, tal como superexpressão da primeira proteína alvo. O rótulo pode especificar que o sujeito tem um tipo específico de câncer.

[0203]A primeira proteína alvo é de preferência CD25. O câncer pode ser linfoma, tal como AML. O rótulo pode especificar que o indivíduo tem um linfoma CD25+.

[0204]Em um aspecto adicional, também é fornecida uma terapia combinada, como descrito aqui, para uso no tratamento de uma doença proliferativa. Outro aspecto da presente divulgação fornece o uso de um composto conjugado na

fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença proliferativa.

[0205]Um versado na técnica é prontamente capaz de determinar se uma terapia combinada candidata trata ou não uma condição proliferativa para qualquer tipo particular de célula. Por exemplo, os ensaios que podem ser convenientemente utilizados para avaliar a atividade oferecida por um composto particular são descritos a seguir.

[0206]As terapias de combinação aqui descritas podem ser usadas para tratar uma doença proliferativa. O termo “doença proliferativa” se refere a uma proliferação celular indesejada ou descontrolada de células excessivas ou anormais que é indesejada, tal como crescimento neoplástico ou hiperplástico, quer *in vitro* ou *in vivo*.

[0207]Exemplos de condições proliferativas incluem, mas não se limitam a, proliferação celular benigna, pré-maligna e maligna, incluindo mas não limitadas a, neoplasmas e tumores (por exemplo, histocitoma, glioma, astrocoma, osteoma), cânceres (por exemplo, câncer do pulmão, câncer das células pequenas do pulmão, câncer gastrointestinal, câncer do intestino, câncer do cólon, carcinoma da mama, carcinoma do ovário, câncer da próstata, câncer testicular, câncer do fígado, câncer do rim, câncer da bexiga, câncer do pâncreas, câncer do cérebro, sarcoma, osteossarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), linfomas, leucemias, psoríase, doenças ósseas, distúrbios fibroproliferativos (por exemplo, tecidos conjuntivos) e aterosclerose. Cânceres de interesse particular incluem, mas não estão limitados a, leucemias e cânceres do ovário.

[0208]Qualquer tipo de célula pode ser tratada, incluindo, mas não limitado a, pulmão, gastrointestinal (incluindo, por exemplo, intestino, cólon), mama (mamária), ovário, próstata, fígado (hepático), rim (renal), bexiga, pâncreas, cérebro e pele.

[0209]Os distúrbios proliferativos de interesse particular incluem, entre outros, Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, incluindo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático

crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL) e leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo Filadélfia (Ph-ALL). [Fielding A., Haematologica. Jan de 2010; 95(1): 8–12].

[0210]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia compreendendo células CD25+ve e CD25-ve.

[0211]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia composta por células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ve, tais como células T CD25+ve.

[0212]O neoplasma alvo ou células neoplásicas podem ser todo ou parte de um tumor sólido.

[0213]“Tumor sólido” neste documento será entendido como incluindo cânceres hematológicos sólidos, como linfomas (linfoma de Hodgkin ou linfoma não-Hodgkin), os quais são discutidos em mais detalhes aqui.

[0214]Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, compreendendo ou compostos de células neoplásicas CD25+ve. Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, infiltrados com células CD25+ve, como células T CD25+ve (isto é, compreender ou ser composto por células neoplásicas CD25-ve).

[0215]Por exemplo, o tumor sólido pode ser um tumor com altos níveis de células T infiltrantes, como células T reguladoras infiltrantes (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., Targ Oncol (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, Immunity 46, 1–10; Tanaka, A., et al., Cell Res. 27 de Jan de 2017; 27(1):109-118). Portanto, o tumor sólido pode ser câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não

pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

[0216] Considera-se que as terapias combinadas da presente divulgação podem ser utilizados para tratar diversas doenças ou distúrbios, por exemplo, caracterizadas pela sobreexpressão de um antígeno tumoral. Condições ou distúrbios hiperproliferativos exemplares incluem tumores benignos ou malignos; leucemia, neoplasias hematológicas e linfoides. Outros incluem desordens neuronais, gliais, astrocitais, hipotalâmicas, glandulares, macrófagas, epiteliais, estromais, blastocélicas, inflamatórias, angiogênicas e imunológicas, incluindo autoimunes e doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD).

[0217] Geralmente, a doença ou distúrbio a ser tratada é uma doença hiperproliferativa, tal como câncer. Os exemplos de câncer a serem tratados incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia ou malignidades linfoides. Exemplos mais específicos de tais cânceres incluem o câncer de células escamosas (por exemplo, câncer de células epiteliais escamosas), câncer de pulmão incluindo câncer de pequenas células do pulmão, câncer de pulmão de células não-pequenas, adenocarcinoma de pulmão e carcinoma escamoso de pulmão, câncer de peritônio, câncer hepatocelular, câncer gástrico ou de estômago incluindo câncer gastrointestinal, câncer pancreático, glioblastoma, câncer cervical, câncer ovariano, câncer de fígado, câncer da bexiga, hepatoma, câncer de mama, câncer de cólon, câncer do reto, câncer colorretal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma de glândulas salivares, câncer de rins ou renal, câncer de próstata, câncer vulvar, câncer de tireoide, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pênis, assim como câncer de cabeça e pescoço.

[0218] As doenças autoimunes para as quais as terapias de combinação podem ser utilizados no tratamento incluem desordens reumatológicas (como, por exemplo, artrite reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lúpus, como SLE e

nefrite lúpica, polimiosite/dermatomiosite, crioglobulinemia, síndrome do anticorpo anti-fosfolipídeo, e artrite psoriática), osteoartrite, desordens gastrointestinais e hepáticos autoimunes (como, por exemplo, doenças inflamatórias intestinais (por exemplo, colite ulcerativa e doença de Crohn), gastrite autoimune e anemia perniciosa, hepatite autoimune, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, e doença celíaca), vasculite (como, por exemplo, vasculite associado a ANCA, incluindo vasculite de Churg-Strauss, granulomatose de Wegener e poliarterite), desordens neurológicas autoimunes (como, por exemplo, esclerose múltipla, síndrome de opsoclonia-mioclonia, miastenia grave, neuromielite ótica, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, e polineuropatias autoimunes), desordens renais (como, por exemplo, glomerulonefrite, síndrome de Goodpasture e doença de Berger), desordens dermatológicas autoimunes (como, por exemplo, psoríase, urticária, erupção da pele, pênfigo vulgar, penfigoide bolhosa e lúpus eritematoso cutâneo), doenças hematológicas (como, por exemplo, púrpura trombocitopênica, púrpura trombocitopênica trombótica, púrpura pós-transfusão, e anemia hemolítica autoimune), aterosclerose, uveíte, doenças de audição autoimune (como, por exemplo, doença do ouvido interno e perda auditiva), doença de Behcet, síndrome de Raynaud, transplante de órgãos, doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) e doenças endócrinas autoimunes (como, por exemplo, doenças autoimunes relacionadas com diabetes como diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM), doença de Addison e doença autoimunes da tireoide (por exemplo, doença de Graves e tireoidite)). Essas doenças mais preferidas incluem, por exemplo, artrite reumatoide, colite ulcerativa, vasculite associada a ANCA, lúpus, esclerose múltipla, síndrome de Sjogren, doença de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tireoidite e glomerulonefrite.

[0219]Em alguns aspectos, o indivíduo tem um distúrbio proliferativo selecionado de linfomas de Hodgkin (clássicos), com tipo de celularidade mista (células de Hodgkin/Reed-Sternbert: CD25 +/-), ou linfoma não Hodgkin, incluindo

leucemia linfática crônica de células B, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL) e leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo Filadélfia (Ph-ALL). [Fielding A., Haematologica. Jan de 2010; 95(1): 8–12], linfoma linfocítico de células pequenas, leucemia/linfoma de células T do adulto ou linfoma anaplásico de células grandes.

[0220]Em alguns aspectos, o sujeito tem uma doença proliferativa que pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia compreendendo células CD25+ve e CD25-ve.

[0221]A doença proliferativa pode ser caracterizada pela presença de uma neoplasia composta por células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ve, tais como células T CD25+ve.

[0222]O neoplasma alvo ou células neoplásicas podem ser todo ou parte de um tumor sólido.

[0223]Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, compreendendo ou compostos de células neoplásicas CD25+ve. Os tumores sólidos podem ser neoplasias, incluindo cânceres não hematológicos, infiltrados com células CD25+ve, como células T CD25+; tais tumores sólidos podem não ter expressão de CD25 (isto é, compreender ou ser composto por células neoplásicas CD25-ve).

[0224]Por exemplo, o tumor sólido pode ser um tumor com altos níveis de células T infiltrantes, como células T reguladoras infiltrantes (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., Targ Oncol (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, Immunity 46, 1–10;

Tanaka, A., et al., Cell Res. 27 de Jan de 2017; 27(1):109-118). Portanto, o tumor sólido pode ser câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

[0225]O linfoma de Hodgkins clássico inclui os subtipos esclerosante nodular, predominante de linfócitos, celularidade esgotada e celularidade mista. O subtipo de linfoma de Hodgkins não pode ser definido. Em certos aspectos, os pacientes testados de acordo com os métodos aqui apresentam linfoma de Hodgkins dos subtipos esclerosante nodular e celularidade mista.

[0226]Em certos aspectos, o sujeito tem linfoma difuso de células B grandes ou linfoma de células T periférico, incluindo o linfoma anaplásico de células grandes e subtipos de linfoma de células T angioimunoblastico.

Seleção de Pacientes

[0227]Em certos aspectos, os indivíduos são selecionados como adequados para o tratamento com os tratamentos combinados antes dos tratamentos serem administrados.

[0228]Como usado aqui, os indivíduos considerados adequados para o tratamento são aqueles que se espera que se beneficiem ou respondam ao tratamento. Os indivíduos podem ter, ou ser suspeitos de terem, ou estar em risco de terem câncer. Os indivíduos podem ter recebido um diagnóstico de câncer. Em particular, os indivíduos podem ter, ou ser suspeitos de terem, ou estar em risco de terem, linfoma. Em alguns casos, os indivíduos podem ter, ou ser suspeitos de terem, ou estarem em risco de ter, um câncer sólido que tem células não tumorais associadas ao tumor que expressam uma primeira proteína alvo, tal como células T infiltrantes que expressam a primeira proteína alvo.

[0229]Em alguns aspectos, os indivíduos são selecionados com base na

quantidade ou padrão de expressão de uma primeira proteína alvo. Em alguns aspectos, a seleção é baseada na expressão de uma primeira proteína alvo na superfície celular. Portanto, em alguns casos, os indivíduos são selecionados com base no risco de terem ou serem suspeitos de ter risco de ter câncer, ou ter recebido o diagnóstico de uma doença proliferativa caracterizada pela presença de um neoplasma que compreende células com um nível baixo da expressão superficial de uma primeira proteína alvo (como CD25). O neoplasma pode ser composto de células com um baixo nível de expressão superficial de uma primeira proteína alvo (como CD25). Em alguns casos, baixos níveis de expressão da superfície significam que o número médio de anticorpos anti-FTP ligados por célula neoplásica é menor que 20.000, como menor que 10.000, menor que 5.000, menor que 2.000, menor que 1.000, menor que 500, menor que 400, menor que 300, menor que 200 ou menor que 100. Em alguns casos, o número médio de anticorpos ligados por célula é medido usando o ensaio descrito no Exemplo 9. Em alguns aspectos, os indivíduos são selecionados com base em um neoplasma que compreende células CD25+ve e CD25-ve. O neoplasma pode ser composto de células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ ve, como células T CD25+ ve. O neoplasma ou células neoplásicas pode ser todo ou parte de um tumor sólido. O tumor sólido pode ser CD25-ve parcialmente ou totalmente, e pode ser infiltrado com células CD25 + ve, como células T CD25+ve.

[0230]Em certos aspectos, o alvo é uma segunda proteína alvo. Em alguns aspectos, a seleção é baseada na expressão de uma segunda proteína alvo na superfície celular.

[0231]Em alguns aspectos, a seleção é baseada nos níveis de uma primeira proteína alvo e de uma segunda proteína alvo na superfície celular.

[0232]Em alguns casos, a expressão do alvo em um determinado tecido de interesse é determinada. Por exemplo, em uma amostra de tecido linfoide ou tecido tumoral. Em alguns casos, a expressão sistêmica do alvo é determinada. Por exemplo, em uma amostra de fluido circulante, como sangue, plasma, soro ou linfa.

[0233]Em alguns aspectos, o indivíduo é selecionado como adequado para tratamento devido à presença de expressão alvo em uma amostra. Nesses casos, os indivíduos sem expressão alvo podem ser considerados não adequados para o tratamento.

[0234]Em outros aspectos, o nível de expressão alvo é usado para selecionar um indivíduo como adequado para o tratamento. Quando o nível de expressão do alvo está acima de um nível limite, o indivíduo é determinado como adequado para o tratamento.

[0235]Em alguns aspectos, a presença de uma primeira proteína alvo e/ou uma segunda proteína alvo nas células da amostra indica que o indivíduo é adequado para o tratamento com uma combinação compreendendo um ADC e um agente secundário. Em outros aspectos, a quantidade da primeira proteína alvo e/ou uma segunda expressão da proteína alvo deve estar acima de um nível limite para indicar que o indivíduo é adequado para o tratamento. Em alguns aspectos, a observação de que a primeira proteína alvo e/ou uma segunda localização da proteína alvo é alterada na amostra em comparação com um controle indica que o indivíduo é adequado para o tratamento.

[0236]Em alguns aspectos, um indivíduo é indicado como adequado para o tratamento se as células obtidas a partir de linfonodos ou locais nodais extras reagirem com anticorpos contra a primeira proteína alvo e/ou uma segunda proteína alvo, conforme determinado por IHC.

[0237]Em alguns aspectos, um paciente é considerado adequado para tratamento se pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

55%, 60 %, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou mais de todas as células da amostra expressam uma primeira proteína alvo. Em alguns aspectos aqui divulgados, um paciente é determinado como adequado para tratamento se pelo menos 10% das células da amostra expressarem uma primeira proteína alvo.

[0238]Em alguns aspectos, um paciente é considerado adequado para tratamento se pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60 %, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou mais de todas as células da amostra expressam uma segunda proteína alvo. Em alguns aspectos aqui divulgados, um paciente é determinado como adequado para tratamento se pelo menos 10% das células da amostra expressarem uma segunda proteína alvo.

[0239]A primeira proteína alvo é de preferência CD25.

[0240]A segunda proteína alvo pode ser BTK, PD1, PDL1, GITR, OX40, ou CTLA. A segunda proteína alvo é de preferência PD-L1.

Amostras

[0241]A amostra pode compreender ou pode ser derivada de: uma quantidade de sangue; uma quantidade de soro derivado do sangue do indivíduo que pode compreender a porção fluida do sangue obtida após a remoção do coágulo de fibrina e das células sanguíneas; uma quantidade de suco pancreático; uma amostra de tecido ou biópsia; ou células isoladas do referido indivíduo.

[0242]Uma amostra pode ser retirada de qualquer tecido ou fluido corporal. Em certos aspectos, a amostra pode incluir ou pode ser derivada de uma amostra de tecido, biópsia, ressecção ou células isoladas do referido indivíduo.

[0243]Em certos aspectos, a amostra é uma amostra de tecido. A amostra pode ser uma amostra de tecido tumoral, como tecido tumoral canceroso. A amostra pode ter sido obtida por uma biópsia de tumor. Em alguns aspectos, a amostra é uma amostra de tecido linfoide, como uma amostra de lesão linfoide ou biópsia de linfonodo. Em alguns casos, a amostra é uma biópsia de pele.

[0244]Em alguns aspectos, a amostra é retirada de um fluido corporal, com mais preferência um que circula pelo corpo. Portanto, a amostra pode ser uma amostra de sangue ou de linfa. Em alguns casos, a amostra é uma amostra de urina ou de saliva.

[0245]Em alguns casos, a amostra é uma amostra de sangue ou uma amostra derivada de sangue. A amostra derivada do sangue pode ser uma porção selecionada do sangue de um indivíduo, por exemplo, uma fração contendo células selecionadas ou uma fração plasmática ou sérica.

[0246]Uma fração contendo células selecionada pode conter tipos de células de interesse que podem incluir glóbulos brancos (WBC), particularmente células mononucleares do sangue periférico (PBC) e/ou granulócitos e/ou glóbulos vermelhos (RBC). Portanto, os métodos de acordo com a presente divulgação podem envolver a detecção de um primeiro polipeptídeo ou ácido nucleico alvo no sangue, em glóbulos brancos, células mononucleares do sangue periférico, granulócitos e/ou glóbulos vermelhos.

[0247]A amostra pode ser nova ou arquivada. Por exemplo, o tecido de arquivo pode ser do primeiro diagnóstico de um indivíduo ou de uma biópsia em uma reincidência. Em certos aspectos, a amostra é uma biópsia nova.

[0248]O primeiro polipeptídeo alvo é de preferência CD25.

Estado do indivíduo

[0249]O indivíduo pode ser um animal, mamífero, um mamífero placentário, um marsupial (por exemplo, canguru, vombate), um monotreme (por exemplo, ornitorrinco com bico de pato), um roedor (por exemplo, um porquinho da índia, um hamster, um rato, um camundongo), murino (por exemplo, um camundongo), um lagomorfo (por exemplo, um coelho), aves (por exemplo, um pássaro), canino (por exemplo, um cachorro), felino (por exemplo, um gato), equino (por exemplo, um cavalo), suíno (por exemplo, um porco), ovino (por exemplo, uma ovelha), bovino (por

exemplo, uma vaca), um primata, símio (por exemplo, um macaco ou macaco de grande porte), um macaco (por exemplo, sagui, babuíno), um macaco de grande porte (por exemplo, gorila, chimpanzé, orangotango, gibão) ou um ser humano.

[0250]Além disso, o indivíduo pode estar em qualquer uma de suas formas de desenvolvimento, por exemplo, um feto. Em uma modalidade preferida, o indivíduo é um humano. Os termos “sujeito”, “paciente” e “indivíduo” são usados aqui de forma intercambiável.

[0251]Em alguns aspectos divulgados neste documento, um indivíduo tem ou é suspeito de ter ou foi identificado como estando em risco de ter câncer. Em alguns aspectos divulgados neste documento, o indivíduo já recebeu um diagnóstico de câncer. O indivíduo pode ter recebido um diagnóstico de linfoma de Hodgkins (clássico) (incluindo esclerosamento nodular, linfócito predominante, linfócito ou tipo de celularidade mista, ou quando o tipo não for especificado), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) ou linfoma de células T periférico (PTCL) (incluindo os subtipos ALCL: linfoma anaplásico de células grandes ou AITL: linfoma de células T angioimunoblástico). Em alguns casos, o indivíduo recebeu um diagnóstico de linfoma clássico de Hodgkins esclerosante nodular ou misto de celularidade, linfoma difuso de células B grandes ou linfoma de células T angioimunoblástico.

[0252]Em alguns casos, o indivíduo tem, ou é suspeito de ter uma doença proliferativa caracterizada pela presença de um neoplasma compreendendo células CD25 + ve e CD25-ve. O neoplasma pode ser composto de células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ ve, como células T CD25+ ve. O neoplasma ou células neoplásicas pode ser todo ou parte de um tumor sólido. O tumor sólido pode ser um neoplasma, incluindo um câncer não hematológico, compreendendo ou composto de células neoplásicas CD25+ve. O tumor sólido pode ser um neoplasma, incluindo um câncer não hematológico, infiltrado com células CD25+ve, como células T CD25+ve;

esses tumores sólidos podem não ter expressão de CD25 (isto é, compreender ou ser compostos por células neoplásicas CD25-ve).

[0253]Em alguns casos, o indivíduo tem ou é suspeito de ter um tumor sólido com altos níveis de células T infiltrantes, como as células T infiltrantes reguladoras (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., *Targ Oncol* (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, *Immunity* 46, 1–10; Tanaka, A., et al., *Cell Res.* 27 de Jan de 2017; 27(1):109-118). Algumas ou todas as células neoplásicas no tumor podem ser CD25-ve. O tumor sólido pode ser câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

[0254]Em alguns casos, o indivíduo recebeu um diagnóstico de linfoma de Hodgkins (clássico) (tipo de celularidade mista) ou linfoma não Hodgkins incluindo leucemia linfática crônica de células B, linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL) e leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML) e leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo Filadélfia (Ph-ALL). [Fielding A., *Haematologica*. Jan de 2010; 95(1): 8–12], linfoma linfocítico de células pequenas, leucemia/linfoma de células T do adulto e linfoma anaplásico de células grandes.

[0255]Em alguns casos, o indivíduo recebeu um diagnóstico de linfoma de células T cutâneo, micose fungoide, síndrome de Sezary, mastocitose sistêmica, linfoma de células B, tumores não hematopoiéticos, linfoma periférico de células T e proliferação histiocítica.

[0256]Em alguns casos, os indivíduos têm, ou são suspeitos de terem, ou

receberam um diagnóstico de uma doença proliferativa caracterizada pela presença de um neoplasma que compreende células com um nível baixo da expressão superficial de uma primeira proteína alvo (como CD25). O neoplasma pode ser composto de células com um baixo nível de expressão superficial de uma primeira proteína alvo (como CD25). Em alguns casos, baixos níveis de expressão da superfície significam que o número médio de anticorpos anti-FTP ligados por célula neoplásica é menor que 20000, como menor que 10000, menor que 5.000, menor que 2.000, menor que 1.000, menor que 500, menor que 400, menor que 300, menor que 200 ou menor que 100. Em alguns casos, o número médio de anticorpos ligados por célula é medido usando o ensaio descrito no Exemplo 9.

[0257]Em alguns casos, o indivíduo recebeu o diagnóstico de uma doença proliferativa caracterizada pela presença de um neoplasma compreendendo células CD25 +ve e CD25-ve. O neoplasma pode ser composto de células neoplásicas CD25-ve, opcionalmente em que as células neoplásicas CD25-ve estão associadas a células não neoplásicas CD25+ ve, como células T CD25+ ve. O neoplasma ou células neoplásicas pode ser todo ou parte de um tumor sólido. O tumor sólido pode ser um neoplasma, incluindo um câncer não hematológico, compreendendo ou composto de células neoplásicas CD25+ve. O tumor sólido pode ser um neoplasma, incluindo um câncer não hematológico, infiltrado com células CD25+ve, como células T CD25+ve; esses tumores sólidos podem não ter expressão de CD25 (isto é, compreender ou ser compostos por células neoplásicas CD25-ve).

[0258]Em alguns casos, o indivíduo recebeu o diagnóstico de um tumor sólido com altos níveis de células T infiltrantes, como células T reguladoras infiltrantes (Treg; Ménétrier-Caux, C., et al., Targ Oncol (2012) 7:15–28; Arce Vargas et al., 2017, Immunity 46, 1–10; Tanaka, A., et al., Cell Res. 27 de Jan de 2017; 27(1):109-118). Algumas ou todas as células neoplásicas no tumor podem ser CD25-ve. O tumor sólido pode ser câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer

gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

[0259]Em alguns casos, o indivíduo recebeu um diagnóstico de um câncer sólido contendo células T infiltrantes que expressam CD25+.

[0260]O indivíduo pode estar passando ou foi submetido a um tratamento terapêutico para esse câncer. O sujeito pode ou não ter recebido anteriormente o ADCX25. Em alguns casos, o câncer é linfoma, incluído linfoma de Hodgkin e linfoma não Hodgkin.

Controles

[0261]Em alguns aspectos, a expressão alvo no indivíduo é comparada à expressão alvo em um controle. Os controles são úteis para apoiar a validade da coloração e identificar artefatos experimentais.

[0262]Em alguns casos, o controle pode ser uma amostra de referência ou conjunto de dados de referência. A referência pode ser uma amostra que foi previamente obtida de um indivíduo com um grau conhecido de adequação. A referência pode ser um conjunto de dados obtido da análise de uma amostra de referência.

[0263]Os controles podem ser controles positivos nos quais se sabe que a molécula alvo está presente, ou são expressos em alto nível, ou controles negativos nos quais a molécula alvo é conhecida por estar ausente ou expressa em um nível baixo.

[0264]Os controles podem ser amostras de tecido provenientes de indivíduos que se beneficiam do tratamento. O tecido pode ser do mesmo tipo que a amostra que está sendo testada. Por exemplo, uma amostra de tecido tumoral de um indivíduo pode ser comparada a uma amostra controle de tecido tumoral de um indivíduo conhecido por ser adequado para o tratamento, tal como um indivíduo que respondeu

anteriormente ao tratamento.

[0265]Em alguns casos, o controle pode ser uma amostra obtida do mesmo indivíduo que a amostra de teste, mas de um tecido conhecido por ser saudável. Assim, uma amostra de tecido canceroso de um indivíduo pode ser comparada a uma amostra de tecido não canceroso.

[0266]Em alguns casos, o controle é uma amostra de cultura de células.

[0267]Em alguns casos, uma amostra de teste é analisada antes da incubação com um anticorpo para determinar o nível de coloração de fundo inerente a essa amostra.

[0268]Em alguns casos, um controle de isotipo é usado. Os controles de isotipo usam um anticorpo da mesma classe que o anticorpo específico do alvo, mas não são imunorreativos à amostra. Tais controles são úteis para distinguir interações não específicas do anticorpo específico do alvo.

[0269]Os métodos podem incluir interpretação hematopatologista da morfologia e imuno-histoquímica, para garantir uma interpretação precisa dos resultados dos testes. O método pode envolver a confirmação de que o padrão de expressão se correlaciona com o padrão esperado. Por exemplo, quando a quantidade de uma primeira proteína alvo e/ou uma segunda expressão de proteína alvo é analisada, o método pode envolver a confirmação de que na amostra de teste a expressão é observada como coloração de membrana, com um componente citoplasmático. O método pode envolver a confirmação de que a razão entre o sinal alvo e o ruído está acima de um nível limite, permitindo assim uma discriminação clara entre sinais de fundo específicos e não específicos.

[0270]A primeira proteína alvo é de preferência CD25.

[0271]A segunda proteína alvo pode ser BTK, PD1, PDL1, GITR, OX40 ou CTLA. A segunda proteína alvo é de preferência PD-L1.

Métodos de tratamento

[0272]O termo “tratamento”, como usado aqui no contexto de tratamento de uma condição, refere-se geralmente ao tratamento e terapia, seja de um ser humano ou de um animal (por exemplo, em aplicações veterinárias), no qual é alcançado algum efeito terapêutico desejado, por exemplo , a inibição do progresso da condição e inclui uma redução na taxa de progresso, uma interrupção na taxa de progresso, regressão da condição, melhoria da condição e cura da condição. O tratamento como medida profilática (isto é, profilaxia, prevenção) também está incluído.

[0273]O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” ou “quantidade eficaz”, como usado aqui, refere-se à quantidade de um composto ativo, ou um material, composição ou dosagem que compreende um composto ativo, que é eficaz para produzir algum efeito terapêutico desejado, proporcional com uma razão de risco/benefício razoável, quando administrado de acordo com um regime de tratamento desejado.

[0274]Da mesma forma, o termo “quantidade profilaticamente eficaz”, como usado aqui, refere-se à quantidade de um composto ativo, ou um material, composição ou dosagem que compreende um composto ativo, que é eficaz para produzir algum efeito profilático desejado, proporcional a um razão de risco/benefício razoável, quando administrada de acordo com um regime de tratamento desejado.

[0275]São divulgados aqui métodos de terapia. Também é fornecido um método de tratamento, compreendendo a administração a um sujeito necessitado de tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ADC e de um agente secundário. O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” é uma quantidade suficiente para mostrar benefício para um sujeito. Esse benefício pode ser pelo menos a melhoria de pelo menos um sintoma. A quantidade real administrada, a taxa e o tempo de administração dependerão da natureza e da gravidade do tratamento. A prescrição do tratamento, por exemplo, decisões de dosagem, é de responsabilidade dos médicos generalistas e de outros médicos. O sujeito pode ter sido testado para

determinar sua elegibilidade para receber o tratamento de acordo com os métodos aqui divulgados. O método de tratamento pode compreender uma etapa para determinar se um sujeito é elegível para tratamento, usando um método divulgado neste documento.

[0276]O ADC pode compreender um anticorpo anti-CD25. The anti-CD25 antibody may be HuMax-TAC™. O ADC pode compreender um fármaco que é um dímero de PBD. O ADC pode ser um ADC anti-CD25 e, em particular, ADCX25. O ADC pode ser um ADC divulgado no documento WO2014/057119.

[0277]O agente secundário pode ser:

(a) um Inibidor da tirosina quinase de Bruton (BTKi), como Ibrutinib (Imbruvica), Acalabrutinib/ACP-196, ONO/GS-4059, Spebrutinib/AVL-292/CC-292, HM71224 (Poseltinib) ou BGB-3111 (Zanubrutinib);

(b)um antagonista de PD1, como pembrolizumab, nivolumab, MEDI0680, PDR001 (spartalizumab), Camrelizumab, AUNP12, Pidilizumab, Cemiplimab (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (Tisleizumab), ou BGB-108;

(c)um antagonista de PD-L1, como atezolizumab (Tecentriq), BMS-936559/MDX-1105, durvalumab/MEDI4736, ou MSB0010718C (Avelumab);

(d)um agonista de GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein-Proteína Relacionada a TNFR Induzida por Glucocorticoide) , como MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK-4166, BMS-986156 ou INCAGN1876;

(e)um agonista de OX40, como MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 ou PF-04518600;

(f)um antagonista de CTLA-4, como ipilimumab (marca Yervoy) ou Tremelimumab (originalmente desenvolvido pela Pfizer, agora Medimmune);

(g)Fludarabina ou Citarabina; ou

(h)um agente de hipometilação, tal como análogos da citidina-por exemplo, 5-azacitidina (azacitidina) e 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina);

[0278]O tratamento pode envolver a administração da combinação de ADC/agente secundário isoladamente ou em combinação adicional com outros tratamentos, dependentes simultaneamente ou sequencialmente da condição a ser tratada. Exemplos de tratamentos e terapias incluem, mas não estão limitados a, quimioterapia (a administração de agentes ativos, incluindo, por exemplo, fármacos, tais como quimioterápicos); cirurgia; e radioterapia.

[0279]Um “agente quimioterápico” é um composto químico útil no tratamento do câncer, independentemente do mecanismo de ação. As classes de agentes quimioterápicos incluem, mas não se limitam a: agentes alquilantes, antimetabólitos, alcaloides de plantas de veneno de fusos, antibióticos citotóxicos/antitumorais, inibidores de topoisomerase, anticorpos, fotossensibilizadores e inibidores de quinases. Os agentes quimioterápicos incluem compostos usados em “terapia direcionada” e quimioterapia convencional.

[0280]Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem: Lenalidomide (REVLIMID®, Celgene), Vorinostat (ZOLINZA®, Merck), Panobinostat (FARYDAK®, Novartis), Mocetinostat (MGCD0103), Everolimus (ZORTRESS®, CERTICAN®, Novartis), Bendamustina (TREAKISYM®, RIBOMUSTIN®, LEVACT®, TREANDA®, Mundipharma International), erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracil, 5-fluorouracil, nº CAS 51-21-8), gencitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (nº CAS 391210-10-9, Pfizer), cisplatina (cis-diamina, dicloroplatina (II), nº CAS 15663-27-1), carboplatina (nº CAS 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo- 2,3,4,6,8-pentazabiciclo [4.3.0] nona-2,7,9-trieno- 9-carboxamida, nº CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifen ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenóxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), e doxorubicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD, e rapamicina.

[0281]Mais exemplos de agentes quimioterápicos incluem: oxaliplatina (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomibe (VELCADE®, Millennium Pharm.), Sutent (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinibe (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inibidor de Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (inibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inibidor de PI3K Novartis), XL-147 (inibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Ionafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecano (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), formulações de nanopartículas de paclitaxel ABRAXANE™ (sem Cremophor), formuladas com albumina (American Phaceuti Parceiros cal, Schaumberg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), cloranmbucila, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanibe (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa e ciclosfosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquila, tais como bussulfano, impressulfano e pipossulfano; aziridinas, tais como benzodopa, carboquona, meturedopa e uredopa; etileniminas e metilamelaminas incluindo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida e trimetilamelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina e bulatacinona); uma camptotecina (incluindo o análogo sintético topotecano); bristostatina; calistatina; CC-1065 (incluindo os seus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluindo os análogos sintéticos, KW-2189 e CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; uma sarcodictina; espongistatina; mostardas de nitrogênio, tais como cloramambucila, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de

óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila; nitrosoureas tais como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimnustina; antibióticos, tais como os antibióticos enedine (por exemplo, calicheamicina, calicheamicina gama1I, calicheamicina omegal1 (*Angew Chem. Intl. Ed. Engl.* (1994) 33: 183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tais como clodronato; uma esperamicina; bem como cromóforo de neocarzinostatina e cromóforos de antibióticos cromoproteicos enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, authramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorubicina e desoxidoxicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, nemorubicina, marcelomicina, mitomicinas tais como mitomicina C, ido micofenico, nagalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodoarubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabólitos, tais como metotrexato e 5-fluorouracil (5-FU); análogos do ácido fólico, tais como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tais como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tais como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; androgênios, tais como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenais, tais como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glicosídeo de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracila; amsacrina; bestrabucila; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptínia; uma epotilona; etoglucida; nitrato de gálio; hidroxiureia; lentinan; ionidainina; maitansinoides, tais como maitansina e ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; molidanmol;

nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazina; Complexo polissacarídeo PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermânio; ácido tenuazoico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomona; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosídeo ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platina, tais como cisplatina e carboplatina; vinblastina; etoposídeo (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; teniposídeo; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inibidor de topoisomerase RFS 2.000; difluorometilarnitina (DMFO); retinoides, tais como ácido retinoico; e sais, ácidos e derivados farmaceuticamente aceitáveis de qualquer um dos anteriores. Podem ser utilizadas combinações de agentes, como CHP (doxorrubicina, prednisona, ciclofosfamida) ou CHOP (doxorrubicina, prednisona, ciclofopsfamida, vincristina).

[0282]Também incluídos na definição de "agente quimioterápico" estão: (i) agentes anti-hormonais que agem para regular ou inibir a ação do hormônio sobre tumores como antiestrogênios e moduladores de receptor seletivo de estrogênio (SERMs) incluindo, por exemplo, o tamoxifeno (incluindo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona e FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) os inibidores de aromatase que inibem a enzima aromatase, que regula a produção de estrogênio nas glândulas suprarrenais, tais como, por exemplo, 4 5-imidazóis, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestanie, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis,) e ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrogênios, tais como flutamida, bicalutamida, nilutamida, leuprolida e goserelina; assim como troxacitabina (um análogo de 1,3-

dioxolano nucleosídeo citosina); (iv) inibidores da quinase de proteína como inibidores MEK (WO 2007/044515); (v) inibidores da quinase de lipídeos; (vi) oligonucleotídeos antissentido, particularmente os que inibem a expressão de genes em vias de sinalização implicados na proliferação de células aberrantes, por exemplo, PKC-alfa, Raf e H-Ras, tais como oblimersen (GENASENSE®, Inc. Genta); (vii) ribozimas como inibidores de expressão de VEGF (por exemplo, ANGIOZYME®) e inibidores da expressão de HER2; (viii) vacinas, tais como vacinas de terapia do gene, por exemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® e VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inibidores da topoisomerase 1 como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogênicos, tal como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); e sais farmaceuticamente aceitáveis, ácidos e derivados de qualquer um dos anteriores.

[0283]Também estão incluídos na definição de “agente quimioterápico” os anticorpos terapêuticos, como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximabe (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), ofatumumabe (ARZERRA®, GSK), pertuzumabe (^{PERJETATM}, OMNITARG TM, 2C4, Genentech), trastuzumabe (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomabe (Bexxar, Corixia) MDX-060 (Medarex) e o conjugado anticorpo-fármaco, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth).

[0284]Anticorpos monoclonais humanizados com potencial terapêutico como agentes quimioterápicos em combinação com os conjugados da divulgação incluem: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatuzumab mertansine, cantuzumab mertansine, cedelizumab, pegol, cidefusituzumab, cidektuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, Gentuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, teleterapia, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab,

pecfusituzumab, pectuzumab, Pertuzumabe, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetan, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, Trastuzumabe, tucotuzumab celmoleukin, tucusituzumab, umavizumab, urtoxazumab e visilizumab.

[0285]As composições de acordo com a presente divulgação são de preferência composições farmacêuticas. As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção, e para utilização de acordo com a presente invenção, podem compreender, além do ingrediente ativo, isto é, um composto conjugado, um excipiente, carreador, tampão, estabilizante farmaceuticamente aceitável ou outros materiais bem conhecidos pelos versados na técnica. Tais materiais devem ser não tóxicos e não devem interferir com a eficácia do ingrediente ativo. A natureza precisa do carreador ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser oral ou por injeção, por exemplo, cutânea, subcutânea ou intravenosa.

[0286]As composições farmacêuticas para administração oral podem estar na forma de comprimido, cápsula, pó ou líquido. Um comprimido pode compreender um carreador sólido ou um adjuvante. As composições farmacêuticas líquidas compreendem geralmente um veículo líquido, tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. Pode ser incluída solução salina fisiológica, dextrose ou outra solução de sacarídeo ou glicóis, tais como etilenoglicol, propilenoglicol ou polietilenoglicol. Uma cápsula pode compreender um carreador sólido, tal como gelatina.

[0287]Para injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, ou injeção no local de aflição, o ingrediente ativo estará na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável que seja isenta de pirogênios e tenha pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Os versados na técnica são bem capazes de preparar soluções adequadas utilizando, por exemplo, veículos isotônicos, tais como injeção

de cloreto de sódio, injeção de Ringer, injeção de Ringer lactado. Conservantes, estabilizadores, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos podem ser incluídos, conforme necessário.

Dosagem

[0288]Será entendido por um versado na técnica que as dosagens apropriadas do ADC e/ou do agente secundário, e composições compreendendo esses elementos ativos, podem variar de um indivíduo para outro. A determinação da dosagem ideal geralmente envolverá o equilíbrio do nível de benefício terapêutico contra qualquer risco ou efeitos colaterais deletérios. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores incluindo, mas não limitados a, atividade do composto particular, da via de administração, do tempo de administração, da taxa de excreção do composto, da duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais utilizados em combinação, da gravidade da condição e das espécies, sexo, idade, peso, condição, estado geral de saúde e antecedente médico do paciente. A quantidade de composto e via de administração estarão finalmente à critério do médico, veterinário ou clínico, embora geralmente a dosagem seja selecionada para alcançar concentrações locais no sítio de ação que alcancem o efeito desejado sem causar efeitos colaterais substanciais prejudiciais ou deletérios.

[0289]Em certos aspectos, a dosagem de ADC é determinada pela expressão de uma primeira proteína alvo observada em uma amostra obtida do sujeito. Assim, o nível ou localização da expressão da primeira proteína alvo na amostra pode ser indicativo de que é necessária uma dose maior ou menor de ADC. Por exemplo, um alto nível de expressão da primeira proteína alvo pode indicar que uma dose mais alta de ADC seria adequada. Em alguns casos, um alto nível de expressão da primeira proteína alvo pode indicar a necessidade de administração de outro agente além do ADC. Por exemplo, administração do ADC em conjunto com um agente quimioterapêutico. Um alto nível de expressão da primeira proteína alvo pode indicar

uma terapia mais agressiva.

[0290]Em certos aspectos, o nível de dosagem é determinado pela expressão de uma primeira proteína alvo nas células neoplásicas em uma amostra obtida do indivíduo. Por exemplo, quando o neoplasma alvo é composto ou comprehende células neoplásicas que expressam a primeira proteína alvo.

[0291]Em certos aspectos, o nível de dosagem é determinado pela expressão de uma primeira proteína alvo nas células associadas ao neoplasma alvo. Por exemplo, o neoplasma alvo pode ser um tumor sólido composto de, ou comprehendendo, células neoplásicas que expressam a primeira proteína alvo. Por exemplo, o neoplasma alvo pode ser um tumor sólido composto de, ou comprehendendo células neoplásicas que não expressam a primeira proteína alvo. As células que expressam a primeira proteína alvo podem ser células não neoplásicas que se infiltram no tumor sólido, como células T infiltrantes.

[0292]Em certos aspectos, a dosagem do agente secundário é determinada pela expressão de uma segunda proteína alvo observada em uma amostra obtida do sujeito. Assim, o nível ou localização da expressão da segunda proteína alvo na amostra pode ser indicativo de que é necessária uma dose maior ou menor de agente secundário. Por exemplo, um alto nível de expressão da segunda proteína alvo pode indicar que uma dose mais alta de agente secundário seria adequada. Em alguns casos, um alto nível de expressão da segunda proteína alvo pode indicar a necessidade de administração de outro agente além do agente secundário. Por exemplo, administração do agente secundário em conjunto com um agente quimioterapêutico. Um alto nível de expressão da segunda proteína alvo pode indicar uma terapia mais agressiva.

[0293]A administração pode ser efetuada em uma dose, contínua ou intermitentemente (por exemplo, em doses divididas em intervalos apropriados) durante todo o curso do tratamento. Os métodos para determinar os meios mais

eficazes e a dosagem de administração são bem conhecidos pelos versados na técnica e variarão com a formulação utilizada para terapia, o objetivo da terapia, a(s) célula(s) alvo a ser tratada e o indivíduo a ser tratado. Administrações únicas ou múltiplas podem ser realizadas com o nível de dose e o padrão sendo selecionado pelo médico, veterinário ou clínico.

[0294]Em geral, cada dose adequada do composto ativo está na faixa de cerca de 100 ng a cerca de 25 mg (mais tipicamente cerca de 1 mg a cerca de 10 mg) por quilograma de peso corporal do indivíduo por dia. Quando o composto ativo é um sal, um éster, uma amida, um pró-fármaco ou semelhante, a quantidade administrada é calculada com base no composto original e assim o peso real a ser utilizado é aumentado proporcionalmente.

[0295]Em uma modalidade, cada composto ativo é administrado a um sujeito humano de acordo com o seguinte regime de dosagem: cerca de 100 mg, 3 vezes ao dia.

[0296]Em uma modalidade, cada composto ativo é administrado a um sujeito humano de acordo com o seguinte regime de dosagem: cerca de 150 mg, 2 vezes por dia.

[0297]Em uma modalidade, cada composto ativo é administrado a um sujeito humano de acordo com o seguinte regime de dosagem: cerca de 200 mg, 2 vezes por dia.

[0298]Contudo, em uma modalidade, cada composto conjugado é administrado a um sujeito humano de acordo com o seguinte regime de dosagem: cerca de 50 ou cerca de 75 mg, 3 ou 4 vezes por dia.

[0299]Em uma modalidade, cada composto conjugado é administrado a um sujeito humano de acordo com o seguinte regime de dosagem: cerca de 100 mg ou cerca de 125 mg, 2 vezes por dia.

[0300]Para o ADC, quando ele é um PBD com ADC, as quantidades de dosagem descritas anteriormente podem ser aplicadas ao conjugado (incluindo a porção de PBD e o ligante ao anticorpo) ou à quantidade eficaz de composto de PBD provida, por exemplo, a quantidade de composto que pode ser liberada após clivagem do ligante.

[0301]A primeira proteína alvo é de preferência CD25. O ADC pode compreender um anticorpo anti-CD25. The anti-CD25 antibody may be HuMax-TAC™. O ADC pode compreender um fármaco que é um dímero de PBD. O ADC pode ser um ADC anti-CD25 e, em particular, é de preferência ADCX25. O ADC pode ser um ADC divulgado no documento WO2014/057119.

[0302]A segunda proteína alvo pode ser BTK, PD1, PDL1, GITR, OX40 ou CTLA. A segunda proteína alvo é, de preferência, PD-L1. O agente secundário pode ser:

(a)um Inibidor da tirosina quinase de Bruton (BTKi), como Ibrutinib (Imbruvica), Acalabrutinib/ACP-196, ONO/GS-4059, Spebrutinib/AVL-292/CC-292, HM71224 (Poseltinib) ou BGB-3111 (Zanubrutinib);

(b)um antagonista de PD1, tal como pembrolizumab, nivolumab, MEDI0680, PDR001 (espartalizumab), Camrelizumab, AUNP12, Pidilizumab, Cemiplimab (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (Tisleizumab) ou BGB-108;

(c)um antagonista de PD-L1, como atezolizumab (Tecentriq), BMS-936559/MDX-1105, durvalumab/MEDI4736, ou MSB0010718C (Avelumab);

(d)um agonista de GITR (proteína relacionada ao TNFR induzida por glicocorticoide), como MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK-4166, BMS-986156 ou INCAGN1876;

(e)um agonista OX40, como MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998, ou PF-04518600;

(f)um antagonista de CTLA-4, como ipilimumab (marca registrada Yervoy) ou

Tremelimumab (Originalmente desenvolvido por Pfizer, agora Medimmune);

(g) Fludarabina ou Citarabina; ou

(h) um agente de hipometilação, como análogos da citidina - por exemplo, 5-azacitidina (azacitidina) e 5-aza-2'-desoxicitididina (decitabina).

Anticorpos

[0303] O termo “anticorpo” aqui é usado no sentido mais amplo e abrange especificamente anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, dímeros, multímeros, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), anticorpos intactos (também descritos como anticorpos “de comprimento total”) e fragmentos de anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada, por exemplo, a capacidade de ligar uma primeira proteína alvo (Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Os anticorpos podem ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos ou derivados de outras espécies, como coelho, cabra, ovelha, cavalo ou camelo.

[0304] Um anticorpo é uma proteína gerada pelo sistema imunológico que é capaz de reconhecer e se ligar a um antígeno específico. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Um antígeno alvo geralmente possui vários locais de ligação, também chamados epítopos, reconhecidos pelas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) em múltiplos anticorpos. Cada anticorpo que se liga especificamente a um epítopo diferente tem uma estrutura diferente. Assim, um antígeno pode ter mais de um anticorpo correspondente. Um anticorpo pode compreender uma molécula de imunoglobulina completa ou uma porção imunologicamente ativa de uma molécula de imunoglobulina completa, ou seja, uma molécula que contém um sítio de ligação ao antígeno que se liga imunoespecificamente a um antígeno de um alvo de interesse ou parte dele, tais alvos, incluindo mas não se limitando a células cancerosas ou células que produzem

anticorpos autoimunes associados a uma doença autoimune. A imunoglobulina pode ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse ou alótipo (por exemplo, G1m1, G1m2, G1m3 humano, non-G1m1 [que é qualquer alótipo que não seja G1m1], G1m17, G2m23, G3m21, G3m28, G3m11, G3m5, G3m13, G3m14, G3m10, G3m15, G3m16, G3m6, G3m24, G3m26, G3m27, A2m1, A2m2, Km1, Km2 e Km3) da molécula de imunoglobulina. As imunoglobulinas podem ser derivadas de qualquer espécie, incluindo origem humana, de murino ou de coelho.

[0305]Os “fragmentos de anticorpos” compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento total, geralmente a ligação ao antígeno ou região variável do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e scFv; diacorpos; anticorpos lineares; fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão de Fab, anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (região determinante de complementaridade) e fragmentos de ligação a epítópos de qualquer um dos acima, que se ligam imunoespecificamente a抗ígenos de células cancerosas,抗ígenos virais ou抗ígenos microbianos, moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

[0306]O termo “anticorpo monoclonal”, como usado aqui, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compõem a população são idênticos, exceto por possíveis mutações que ocorrem naturalmente que podem estar presentes em pequenas quantidades. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único sítio antigenico. Além disso, em contraste com as preparações de anticorpos policlonais que incluem anticorpos diferentes direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. Além de sua

especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos, pois podem ser sintetizados não contaminados por outros anticorpos. O modificador “monoclonal” indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como exigindo a produção do anticorpo por qualquer método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente divulgação podem ser produzidos pelo método de hibridoma descrito pela primeira vez por Kohler et al (1975) Nature 256:495, ou podem ser produzidos por métodos de DNA recombinante (ver US 4816567) . Os anticorpos monoclonais também podem ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos fágicos utilizando as técnicas descritas em Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597 ou de camundongos transgênicos portadores de um sistema de imunoglobulina totalmente humano (Lonberg (2008) Curr. Opinion 20(4):450-459).

[0307]Os anticorpos monoclonais aqui incluem especificamente anticorpos “quiméricos” nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga às sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencentes a uma classe ou subclasse de anticorpo específica, enquanto o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo às sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencentes a outra classe ou subclasse de anticorpos, bem como fragmentos de tais anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada (US 4816567; e Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Os anticorpos quiméricos incluem anticorpos “primatizados” compreendendo sequências de ligação a antígeno de domínio variável derivadas de um primata não humano (por exemplo, macaco do mundo antigo ou macaco de grande porte) e sequências de região constante humana.

[0308]Um “anticorpo intacto” neste documento é aquele compreendendo domínios VL e VH, bem como um domínio constante de cadeia leve (CL) e domínios

constantes da cadeia pesada, CH1, CH2 e CH3. Os domínios constantes podem ser domínios constantes de sequência nativa (por exemplo, domínios constantes de sequência nativa humana) ou variante de sequência de aminoácidos dos mesmos. O anticorpo intacto pode ter uma ou mais “funções efetoras” que se referem às atividades biológicas atribuíveis à região Fc (uma região Fc de sequência nativa ou região Fc variante da sequência de aminoácidos) de um anticorpo. Exemplos de funções efetoras de anticorpos incluem ligação a C1q; citotoxicidade dependente do complemento; ligação ao receptor Fc; citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC); fagocitose; e infraregrulação de receptores de superfície celular, tais como receptor de células B e BCR.

[0309] Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante de suas cadeias pesadas, os anticorpos intactos podem ser atribuídos a diferentes “classes”. Existem cinco classes principais de anticorpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e vários deles podem ser divididos em “subclasses” (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de anticorpos são chamados α, δ, ε, γ e μ, respectivamente. As estruturas das subunidades e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

[0310] Os anticorpos anti-CD25 são conhecidos na técnica e são úteis nos métodos aqui divulgados. Estes incluem anticorpos 4C9 (obtidos junto à Ventana Medical Systems, Inc.). Outros anticorpos adequados incluem o anticorpo AB12 descrito em WO 2004/045512 (Genmab A/S), IL2R.1 (obtido junto à Life Technologies, número de catálogo MA5-12680) e RFT5 (descrito em US6383487). Outros anticorpos adequados incluem B489 (143-13) (obtido junto à Life Technologies, número de catálogo MA1-91221), SP176 (obtido junto à Novus, número de catálogo NBP2-21755), 1B5D12 (obtido junto à Novus, número de catálogo NBP2-37349), 2R12 (obtido junto à Novus, número de catálogo NBP2-21755) ou BC96

(obtido junto à BioLegend, número de catálogo V T-072) e M-A251 (obtido junto à BioLegend, número de catálogo IV A053). Outros anticorpos anti-CD25 adequados são daclizumab (ZenapaxTM) e basiliximab (SimulectTM), ambos os quais foram aprovados para uso clínico.

[0311]Os anticorpos anti-PD-L1 são conhecidos na técnica e são úteis nos métodos aqui divulgados. Esses anticorpos incluem Atezolizumab (MPDL3280; número CAS 1380723-44-3), Avelumab (MSB0010718C; número CAS 1537032-82-8) e Durvalumab (número CAS 1428935-60-7).

Breve Descrição dos Desenhos

[0312]As modalidades e experimentos que ilustram os princípios da divulgação serão agora discutidos com referência às Figuras anexas nas quais:

Figura 1.Sequências

Figura 2.Volume de tumor *in vivo* após monotratamento com ADCx25 substituto, tratamento com anti-PD1 ou ADC de controle (conforme Exemplo 4)

Figura 3.Volume de tumor *in vivo* mostrando sinergia entre baixa dose de ADCx25 substituto e tratamento anti-PD1 (como no Exemplo 4)

Figura 4.Dados de citotoxicidade *in vitro* contra a linhagem celular Karpas299 da Citarabina isoladamente (gráfico da esquerda) ou em combinação com o ADCx25 (gráfico da direita).

Figura 5.Dados de citotoxicidade *in vitro* contra a linhagem celular de KG-1 da citarabina isoladamente (gráfico da esquerda) ou em combinação com ADCx25 (gráfico da direita).

Figura 6.Os níveis de CD25 de superfície na linhagem celular de Karpas299 (gráfico da esquerda) e na linhagem celular de KG-1 (gráfico da direita) incubadas com ou sem citarabina.

Figura 7.Citotoxicidade da decitabina *in vitro* isoladamente (gráfico da esquerda) ou ADCx25 em combinação com decitabina (gráfico da direita).

Figura 8.Níveis de superfície celular de CD25 nas células (não tratadas ou após incubação com decitabina 30 mM)

Figure 9.Citotoxicidade in vitro contra células de Karpas299 de ADCx25 em combinação com citarabina (9A) ou decitabina (9B).

Figure 10.Citotoxicidade in vitro contra células de KG-1 de ADCx25 em combinação com citarabina (9A) ou decitabina (9B).

[0313]A divulgação inclui a combinação dos aspectos e recursos preferenciais descritos, exceto quando tal combinação é claramente inadmissível ou expressamente evitada.

[0314]Os títulos das seções usados aqui são apenas para fins organizacionais e não devem ser interpretados como limitando o assunto descrito.

[0315]Aspectos e modalidades da presente divulgação serão agora ilustrados, a título de exemplo, com referência às figuras anexas. Outros aspectos e modalidades serão evidentes para os versados na técnica. Todos os documentos mencionados neste texto são incorporados aqui por referência.

[0316]Em todo este relatório descritivo, incluindo as reivindicações a seguir, a menos que o contexto exija de outra forma, a palavra “compreender” e variações como “compreende” e “compreendendo” serão entendidas como implicando a inclusão de um número inteiro declarado, etapa ou grupo de números inteiros ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas.

[0317]Deve-se notar que, conforme usado no relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares “um”, “uma” e “o, a” incluem os referentes plurais, a menos que o contexto indique claramente o contrário. As faixas podem ser expressas aqui como de “cerca de” um valor específico e/ou para “cerca de” outro valor específico. Quando essa faixa é expressa, outra modalidade inclui de um valor particular e/ou para outro valor particular. Da mesma forma, quando os valores são

expressos como aproximações, pelo uso do antecedente “cerca de”, será entendido que o valor específico forma outra modalidade.

ALGUMAS MODALIDADES

[0318]Os parágrafos a seguir descrevem algumas modalidades específicas da presente divulgação:

1.Um método de tratamento de câncer em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de ADCX25 e um agente secundário.

2.Uma primeira composição que comprehende ADCX25 para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo, em que o tratamento comprehende a administração da primeira composição em combinação com uma segunda composição comprehendendo um agente secundário.

3.Uma primeira composição que comprehende um agente secundário para uso em um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo, em que o tratamento comprehende a administração da primeira composição em combinação com uma segunda composição comprehendendo ADCX25.

4.Uso de ADCX25 na fabricação de um medicamento para tratamento de câncer em um indivíduo, em que o medicamento comprehende ADCX25, e em que o tratamento comprehende administração do medicamento em combinação com uma composição que comprehende um agente secundário.

5.Uso de um antagonista de PD1 na fabricação de um medicamento para tratamento de câncer em um indivíduo, em que o medicamento comprehende um agente secundário, e em que o tratamento comprehende a administração do medicamento em combinação com uma composição comprehendendo ADCX25.

6.Um Kit que comprehende:

um primeiro medicamento comprehendendo ADCX25;

um segundo medicamento comprehendendo um agente secundário; e,

opcionalmente,

uma bula compreendendo instruções para administração do primeiro medicamento a um indivíduo em combinação com o segundo medicamento para o tratamento de câncer.

7.Um Kit que comprehende um medicamento compreendendo ADCX25 e uma bula compreendendo instruções para administração do medicamento a um indivíduo em combinação com uma composição compreendendo um agente secundário para o tratamento de câncer.

8.Um Kit que comprehende um medicamento compreendendo um agente secundário e uma bula compreendendo instruções para administração do medicamento a um indivíduo em combinação com uma composição compreendendo ADCX25 para o tratamento de câncer.

9.Uma composição farmacêutica compreendendo ADCX25 e um agente secundário.

10.Um método de tratamento de câncer em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz da composição do parágrafo 9.

11.A composição do parágrafo 9 para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo.

12.O uso da composição do parágrafo 9 na fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer em um indivíduo.

13.Um kit que comprehende a composição do parágrafo 9 e um conjunto de instruções para administração do medicamento a um indivíduo para o tratamento de câncer.

14.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o tratamento comprehende a administração de ADCX25 antes do agente secundário, simultaneamente com o agente secundário ou após o agente

secundário.

15.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o tratamento compreende ainda a administração de um agente quimioterapêutico.

16.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo é humano.

17.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo tem ou foi determinado como tendo câncer.

18.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo possui, ou foi determinado como tendo, um câncer caracterizado pela presença de um neoplasma compreendendo células CD25 +ve e CD25-ve.

19.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo possui, ou foi determinado como tendo, um câncer caracterizado pela presença de uma neoplasia que compreende ou é composta por células neoplásicas CD25-ve.

20.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o câncer ou neoplasia é todo ou parte de um tumor sólido.

21.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo tem, ou foi determinado como tendo, um câncer que expressa células não tumorais associadas a tumores CD25 ou CD25+, como células T infiltrantes CD25+.

22.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior,. em que o indivíduo tem, ou foi determinado como tendo, um câncer que expressa um baixo nível de expressão superficial de CD25.

23.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo tem, ou foi determinado como tendo, um câncer que

expressa uma segunda proteína alvo.

24.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o tratamento:

- a)trata eficazmente uma ampla gama de distúrbios,
- b)trata eficazmente distúrbios resistentes, refratários ou reincidentes,
- c)tem uma taxa de resposta aumentada e/ou
- d)aumentou a durabilidade;

em comparação com o tratamento com ADCX25 ou o agente secundário isoladamente.

25.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o câncer é selecionado do grupo que compreende:

Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, incluindo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL);

leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para o cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo Filadélfia (Ph-ALL);

câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

26.Composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o agente secundário é um inibidor da tirosina quinase de Bruton (BTKi).

27.Composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 26, em que o inibidor da tirosina quinase de Bruton (BTKi) é selecionado entre Ibrutinib (Imbruvica),

Acalabrutinib/ACP-196, ONO/GS-4059, Spebrutinib/AVL-292/CC-292, HM71224 (Poseltinib) e BGB-3111 (Zanubrutinib).

28.A composition, method, use, or kit according to any one of paragraphs 1 to 25, wherein the secondary agent is a PD1 antagonist.

29. Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 28, em que o antagonista de PD1 é selecionado de pembrolizumab, nivolumab, MEDI0680, PDR001 (spartalizumab), Camrelizumab, AUNP12, Pidilizumab Cemiplimab (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (Tisleizumab), e BGB-108.

30.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, em que o agente secundário é um antagonista de PD-L1.

31.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 30, em que o antagonista de PD-L1 é selecionado de atezolizumab (Tecentriq), BMS-936559/MDX-1105, durvalumab/MEDI4736, e MSB0010718C (Avelumab).

32.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, em que o agente secundário é um agonista de GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein-proteína Relacionada a TNFR Induzida por Glucocorticoide) .

33.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 32, em que o agonista de GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein-proteína Relacionada a TNFR Induzida por Glucocorticoide) é selecionado de MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK 4166, BMS-986156 e INCAGN1876.

34. Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, em que o agente secundário é um agonista de OX40.

35.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 34, em que o agonista de OX40 é selecionado de MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 e PF-04518600.

36.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos

parágrafos 1 a 25, em que o agente secundário é um antagonista de CTLA-4.

37.Uma composição, método, uso, ou kit de acordo com o parágrafo36, em que o agonista de CTLA-4 é selecionado de ipilimumab e Tremelimumab.

38.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, em que o agente secundário é Fludarabina.

39.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, em que o agente secundário é citarabina.

40.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 25, em que o agente secundário é um agente de hipometilação.

41.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 40, em que o agente de hipometilação é selecionado de 5-azacitidina (azacitidina) e 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina).

42.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 40, em que o agente de hipometilação é decitabina.

DECLARAÇÕES DA INVENÇÃO

1.Um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um ADC e de um agente secundário.

2.Uma primeira composição compreendendo um ADC para uso em um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo, em que o tratamento compreende a administração da primeira composição em combinação com uma segunda composição compreendendo um agente secundário.

3.Uma primeira composição compreendendo um agente secundário para uso em um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo, em que o tratamento compreende a administração da primeira composição em combinação com uma segunda composição compreendendo um ADC.

4.Uso de um ADC na fabricação de um medicamento para o tratamento de

um distúrbio em um indivíduo, em que o medicamento compreende um ADC e em que o tratamento compreende a administração do medicamento em combinação com uma composição que compreende um agente secundário.

5.Uso de um agente secundário na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio em um indivíduo, em que o medicamento compreende um agente secundário e em que o tratamento compreende a administração do medicamento em combinação com uma composição compreendendo um ADC.

6.Um Kit que compreende:

um primeiro medicamento compreendendo um ADC;
um segundo medicamento compreendendo um agente secundário; e,
opcionalmente,

uma bula que compreende instruções para administração do primeiro medicamento a um indivíduo em combinação com o segundo medicamento para o tratamento de um distúrbio.

7.Um kit compreendendo um medicamento compreendendo um ADC e uma bula compreendendo instruções para administração do medicamento a um indivíduo em combinação com uma composição compreendendo um agente secundário para o tratamento de um distúrbio.

8.Um kit compreendendo um medicamento compreendendo um agente secundário e uma bula compreendendo instruções para administração do medicamento a um indivíduo em combinação com uma composição compreendendo um ADC para o tratamento de um distúrbio.

9.Uma composição farmacêutica compreendendo um ADC e um agente secundário.

10.Um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo, o método compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz da composição do parágrafo 9.

11.A composição do parágrafo 9 para uso em um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo.

12.O uso da composição do parágrafo 9 na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio em um indivíduo.

13.Um kit que comprehende a composição do parágrafo 9 e um conjunto de instruções para administração do medicamento a um indivíduo para o tratamento de um distúrbio.

14.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o tratamento comprehende administrar o ADC antes do agente secundário, simultaneamente com o agente secundário ou após o agente secundário.

15.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o tratamento comprehende ainda a administração de um agente quimioterapêutico.

16.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo é humano.

17.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo tem um distúrbio ou foi determinado como tendo um distúrbio.

18.A composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 17, em que o indivíduo possui, ou foi determinado como tendo, um câncer que expressa uma primeira proteína alvo (FTP) ou células não tumorais associadas ao tumor FTP+, como como células T infiltrantes FTP+.

19.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo tem, ou foi determinado como tendo, um câncer que expressa uma segunda proteína alvo (STP).

20.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o tratamento:

a)trata eficazmente uma ampla gama de distúrbios,
b)trata eficazmente distúrbios resistentes, refratários ou reincidentes,
c)tem uma taxa de resposta aumentada e/ou
d)aumentou a durabilidade;
em comparação com o tratamento com o ADC ou o agente secundário isoladamente.

21.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o ADC é um ADC anti-CD25.

22.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 21, em que o ADC anti-CD25 é ADCX25.

23.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o FTP é CD25.

24.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o distúrbio é uma doença proliferativa.

25.A composição, método, uso ou kit do parágrafo 24, em que o distúrbio é câncer.

26.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo possui, ou foi determinado como tendo, um distúrbio caracterizado pela presença de um neoplasma compreendendo células CD25 +ve e CD25-ve.

27.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior, em que o indivíduo possui, ou foi determinado como tendo, um distúrbio caracterizado pela presença de uma neoplasia que compreende ou é composta por células neoplásicas CD25-ve.

28.A composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 26 ou 27, em que o câncer ou neoplasia é todo ou parte de um tumor sólido.

29.A composição, método, uso ou kit de qualquer parágrafo anterior, em que o distúrbio é selecionado do grupo que compreende:

Linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, incluindo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL);

leucemias como leucemia de células pilosas (HCL), variante de leucemia de células pilosas (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML), e leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para o cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativo para cromossomo Filadélfia (Ph-ALL);

câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

30. Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos anteriores, em que o agente secundário é um inibidor da tirosina quinase de Bruton (BTKi)..

31.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 30, em que o inibidor da tirosina quinase de Bruton (BTKi) é selecionado entre Ibrutinib (Imbruvica), Acalabrutinib/ACP-196, ONO/GS-4059, Spebrutinib/AVL-292/CC-292, HM71224 (Poseltinib) e BGB-3111 (Zanubrutinib).

32.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o qualque um dos parágrafos 1 a 29, em que o agente secundário é o antagonista de PD1.

33.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com parágrafo 32, em que o antagonista de PD1 é selecionado dentre pembrolizumab, nivolumab, MEDI0680, PDR001 (spartalizumab), Camrelizumab, AUNP12, Pidilizumab Cemiplimab (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (Tisleizumab), e BGB-108..

34.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos

parágrafos 1 a 29, em que o agente secundário é um antagonista de PD-L.

35. Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 34, em que o antagonista de PD-L1 é selecionado entre atezolizumab (Tecentriq), BMS-936559/MDX-1105, durvalumab/MEDI4736, e MSB0010718C (Avelumab).

36.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 29 em que o agente secundário é um agonista de GITR (proteína relacionada a TNFR induzido por glicocorticoide).

37.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 36, em que o agonista de GITR (proteína relacionada ao TNFR induzido por glicocorticoide) é selecionado dentre MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK 4166, BMS-986156 e INCAGN1876.

38.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 29 em que o agente secundário é um agonista de OX40.

39.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 38, em que o agonista OX40 é selecionado dentre MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 e PF-04518600.

40.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 29 em que o agente secundário é um antagonista de CTLA-4.

41.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 40, em que o antagonista de CTLA-4 é selecionado dentre ipilimumab e Tremelimumab.

42.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 29 em que o agente secundário é Fludarabina ou Citarabina.

43.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 29 em que o agente secundário é um agente de hipometilação.

44.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com o parágrafo 43, em que o agente de hipometilação é selecionado de 5-azacitidina (azacitidina) e 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina).

45Uma composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer parágrafo anterior onde o STP é BTK, PD1, PDL1, GITR, OX40 ou CTLA.

46.Uma composição, método, uso ou kit de acordo com parágrafo 33 onde o STP é PD-L1.

EXEMPLOS

[0319]Nos seguintes exemplos:

-o FTP é de preferência CD25.

-Linhagens celulares expressando CD25 adequadas para uso nos exemplos incluem Células L540, Karpas299, Sudhl1, HDLM-2.

-Doença A - Linfoma difuso de células B grandes/DLBC é um tipo agressivo de linfoma não Hodgkin que se desenvolve a partir das células B no sistema linfático. Constitui o maior subgrupo de linfoma não Hodgkin.

-Doença B - Linfoma de células do manto/MCL é um NHL raro de células B que afeta mais frequentemente homens com mais de 60 anos de idade. A doença pode ser agressiva (crescimento rápido), mas também pode se comportar de maneira mais indolente (crescimento lento) em alguns pacientes. O MCL compreende cerca de cinco por cento de todos os NHLs.

-Doença C - Linfoma folicular/FL é um tipo de NHL bastante indolente, com longo tempo de sobrevivência, mas para o qual é muito difícil atingir a cura. Também pode se transformar em formas mais agressivas de linfomas.

Exemplo 1

[0320]Para mostrar que um PBD-ADC pode induzir ICD e, portanto, pode ser um agente de combinação adequado com fármacos imuno-oncológicos (IO), as linhagens celulares que expressam a primeira proteína alvo (FTP) serão incubadas por 0, 6, 24 e 48 horas com etoposídeo (controle negativo) e oxaliplatina (controle positivo), 1 µg/mL de ADC, 1 µg/mL de anti-FTP (o anticorpo no ADC) e 1 µg/mL de B12-SG3249 (um ADC de controle sem ligação com a mesma carga útil de PBD que

ADC).

[0321]Após a incubação, a quantidade de AnnexinV-/PI+ (células apoptóticas precoces) será medida por citometria de fluxo, juntamente com a sobreregulação da calreticulina de superfície e HSP-70. O estresse de ER será medido por análises de Northern blot da fosforilação de IRE1, fosforilação de ATF4 e JNK.

Exemplo 2

[0322]Em um experimento separado, as linhagens celulares que expressam FTPs serão incubadas por 0, 6, 24 e 48 horas com etoposídeo (controle negativo) e oxaliplatina (controle positivo), 1 µg/mL de ADC (ADC direcionado ao FTP com uma ogiva de dímero de PBD), 1 µg/mL de anti-FTP (o anticorpo no ADC) e 1 µg/mL de B12-SG3249 (um ADC de controle sem ligação com a mesma carga útil de PBD que ADC).

[0323]Após a incubação, as células são lavadas e alimentadas com células dendríticas humanas (DCs) por mais 24 horas. A ativação das DCs é subsequentemente medida pelo aumento da expressão da superfície de CD86 na população de DC (conforme determinado por citometria de fluxo) e medindo a liberação mediada por DC de IL-8 e MIP2.

Exemplo 3

[0324]O objetivo deste estudo é avaliar preliminarmente a segurança, tolerabilidade, atividade farmacológica e clínica dessa combinação.

[0325]Os seguintes tipos de câncer foram escolhidos para estudo: Doença A, Doença B e Doença C

[0326]Existem evidências de eficácia como agentes únicos para ambos os fármacos:

- ADC (ver, por exemplo, WO2014/057119, WO2016/083468, e WO2016/166341)
- Agente secundário (ver KS Peggs et al.2009, Clinical and Experimental

Immunology, 157: 9–19 [doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03912.x])

[0327]O objetivo principal deste estudo é explorar se esses agentes podem ser combinados com segurança e, em caso afirmativo, identificarão a(s) dose(s) e os regimes apropriados para estudos futuros. O estudo também avaliará se cada combinação induz alterações farmacológicas no tumor que sugerem potencial benefício clínico.

[0328]Além disso, fornecerá evidências preliminares de que uma combinação pode aumentar a taxa de resposta e a durabilidade da resposta em comparação com os dados publicados para tratamento com ADC de agente único ou agente secundário.

[0329]Cada grupo de doença pode incluir um subconjunto de pacientes tratados anteriormente com o agente secundário para explorar se a terapia combinada pode superar a resistência à terapia com agente secundário. Para cada doença, não pretende-se aplicar seleção molecular específica, pois os dados disponíveis no momento geralmente não suportam a exclusão de pacientes com base em testes de diagnóstico molecular aprovados.

Justificativa para a dose inicial de ADC

[0330]O RDE já estabelecido para ADC (em ug/kg administrado a cada três semanas) será usado para todos os pacientes deste estudo. Para garantir a segurança do paciente, será usada uma dose inicial abaixo de RDE; o nível da dose inicial será aquele em que o benefício do paciente ainda possa ser demonstrado no estudo de ADC1, sugerindo que os pacientes inscritos nesse nível de dose obterão pelo menos algum benefício ao participar.

Justificativa para a dose inicial do agente secundário

[0331]O RDE já estabelecido para o agente secundário (em ug/kg administrado a cada três semanas) será usado para todos os pacientes deste estudo. Para garantir a segurança do paciente, será usada uma dose inicial abaixo de RDE; o nível da dose inicial será aquele em que o benefício do paciente ainda possa ser

demonstrado no estudo de SA1, sugerindo que os pacientes inscritos nesse nível de dose obterão pelo menos algum benefício ao participar.

Objetivos e pontos finais do teste relacionados

Objetivo	Ponto final
<p><i>Objetivo primário</i> Caracterizar a segurança e a tolerabilidade do ADC em combinação com o agente secundário e identificar a dose e os horários recomendados para estudos futuros</p>	<p>Frequência e gravidade dos EAs e SAEs emergentes do tratamento Alterações entre os parâmetros laboratoriais da linha de base e após a linha de base e os sinais vitais Incidência de toxicidade limitante da dose (DLTs) durante o primeiro ciclo de tratamento (somente escalonamento da dose) Frequência de interrupções e reduções de dose</p>
<p><i>Objetivos secundários</i> Avaliar a atividade clínica da combinação de ADC com o agente secundário Caracterizar o perfil farmacocinético (PK) de cada um dos dois compostos dentre ADC e o agente secundário Evidências de imunogenicidade e ADAs para ADC</p>	<p>ORR, DOR, PFS, OS AUC e Cmáx para cada composto Anticorpos Antifármacos (ADAs) antes, durante e após o tratamento com ADC</p>
<p><i>Objetivos Exploratórios</i> Examinar a correlação potencial dos perfis farmacocinéticos com segurança/tolerabilidade e eficácia Caracterizar alterações no infiltrado imunológico nos tumores Caracterizar alterações nos níveis circulantes de citocinas no plasma e marcadores de ativação nas células imunes em circulação</p>	<p>Coeficientes de correlação entre AUC e/ou Cmáx de cada composto ou medida de composto e qualquer uma das variáveis de segurança ou eficácia Imuno-histoquímica de biópsias de tumores antes e durante o tratamento, Medições (por exemplo, via ELISA) de citocinas imunologicamente relevantes no plasma ou soro; níveis de coloração para marcadores de ativação de células imunes circulantes (por exemplo, FACS)</p>

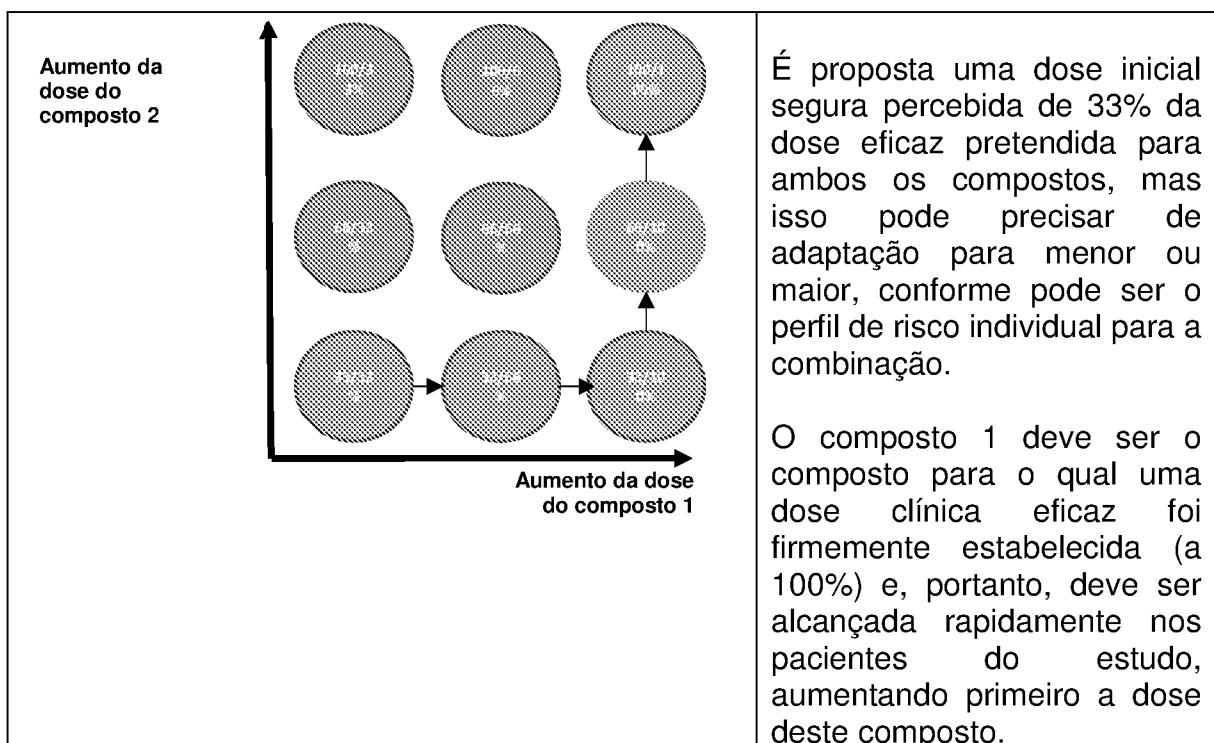
Modelo de estudo

[0332]Esta fase Ib, estudo multicêntrico, de rótulo aberto, é para caracterizar

a segurança, tolerabilidade, farmacocinética (PK), farmacodinâmica (DP) e atividade antitumoral do ADC em combinação com o agente secundário, em pacientes com doença A, doença B, e doença C.

[0333]O estudo é composto por uma parte de escalonamento de dose seguida por uma parte da expansão de dose.

[0334]O aumento da dose começará com doses iniciais reduzidas (em comparação com os respectivos níveis recomendados de fase 2 ou dose licenciada), tanto para a ADC quanto para o agente secundário, para garantir a segurança do paciente. As doses iniciais serão de 33% (ou 50%) do RDE para cada composto. Posteriormente, as doses serão escaladas primeiro para o agente secundário até que o RDE ou a dose licenciada seja atingida ou uma dose mais baixa, se necessário, por razões de tolerabilidade. Em seguida, a dose de ADC será aumentada, até que o RDE para o tratamento combinado seja alcançado. Isso é visualizado no diagrama abaixo:



[0335]Se a combinação de doses for considerada segura, ela pode ser testada em pacientes adicionais para confirmar a segurança e a tolerabilidade nesse nível de

dose. Pode ser realizada uma adaptação adicional da dose de cada composto e/ou o regime pode ser modificado.

[0336]A escala da dose da combinação será guiada por um Modelo de Regressão Logística Bayesiana (BLRM) com base em qualquer Toxicidade Limitadora de Dose (DLTs) observada nos primeiros (ou dois primeiros, TBC) ciclos de terapia. O uso de um BLM é um método bem estabelecido para estimar a dose máxima tolerada (MTD)/dose recomendada para expansão (RDE) em pacientes com câncer. O BLM adaptável será guiado pelo escalonamento com princípio de controle de superdosagem (EWOC) para controlar o risco de DLT em futuros pacientes do estudo. O uso de modelos adaptativos de resposta bayesiana para pequenos conjuntos de dados foi aceito pela FDA e EMEA ("Guideline on clinical trials in small populations", February 1, 2007) e endossado por inúmeras publicações (Babb et al. 1998, Neuenschwander et al. 2008).

[0337]As decisões sobre novas combinações de doses são tomadas pelos pesquisadores e pela equipe do estudo patrocinador em uma chamada de segurança de escalonamento de dose (DESC) com base na revisão das informações de tolerabilidade e segurança do paciente (incluindo os resumos de BLM de risco de DLT, se aplicável), juntamente com informações sobre PK, PD e atividades preliminares disponíveis no momento da decisão.

[0338]Depois que a MTD (s)/RDE é determinada para a combinação, a parte de expansão do estudo pode ser iniciada para avaliar melhor a segurança, tolerabilidade e eficácia preliminar.

■Para combinações com IO, as alterações no infiltrado imunológico nos tumores além disso será caracterizada após tratamento combinado nas indicações de doença alvo.

[0339]Dada a experiência clínica prévia disponível com os agentes deste estudo, espera-se que na maioria dos casos uma dose combinada possa ser

identificada sem testar um grande número de níveis ou programações de doses. Para avaliar a atividade farmacodinâmica das combinações, os pacientes serão solicitados a realizar uma biópsia de tumor na linha de base e novamente após aproximadamente dois ciclos de terapia.

■Para combinação de IO: A extensão da mudança na infiltração tumoral por células imunes, incluindo linfócitos e macrófagos, contribuirá para uma decisão sobre qualquer benefício potencial.

Parte de escalonamento de dose

[0340]Durante a parte de escalonamento de dose do estudo, os pacientes serão tratados com uma dose fixa de ADC administrada i.v. e doses crescentes do agente secundário até que o RDE do agente secundário seja atingido. Posteriormente, as doses de ADC são aumentadas (em diferentes coortes) enquanto a dose para o agente secundário é mantida constante.

[0341]Dois a aproximadamente 3 ou 4 pacientes com doença A, doença B ou doença C serão tratados em cada coorte do escalonamento até que seja determinada a determinação de MTD(s)/RDE(s).

[0342]Haverá uma observação de 24 horas antes de inscrever o segundo paciente no Nível de Dose 1. O período de observação de DLT em cada nível de dose é de 1 ciclo (3 semanas) ou 2 ciclos (6 semanas), conforme exigido pelas autoridades apropriadas para terapias de IO, após as quais será determinado se o escalonamento para o próximo nível de dose será mantido no nível de dose atual ou diminuído para o nível de dose anterior para a próxima coorte. Não haverá redução de escala do Nível de Dose 1. Não é permitido o aumento da dose entre pacientes.

[0343]O aumento da dose não é permitido, a menos que 2 ou mais pacientes tenham informações completas sobre DLT durante o primeiro ciclo em qualquer nível de dose. O escalonamento de dose será determinado usando um mCRM com uma taxa de DLT alvo de 30% e um intervalo de equivalência de 20% a 35%, e com o

escalonamento de dose com controle de superdosagem (EWOC) e sem pular a dose.

[0344]Os pacientes serão designados para uma coorte que está se inscrevendo ativamente. O escalonamento de dose será realizado em cada combinação após a conclusão de um ciclo de tratamento. As avaliações de segurança, incluindo eventos adversos (AEs) e valores laboratoriais, serão monitoradas de perto para todos os pacientes inscritos, a fim de identificar quaisquer DLTs. Uma única MTD/RDE será definida; uma MTD/RDE específica da doença não será estabelecida.

[0345]O mCRM será implementado para DE sob a supervisão de um Comitê Diretor de Escalonamento de Dose (DESC). O DESC confirmará cada nível de dose escalonada após revisar todos os dados de segurança disponíveis. Dados de farmacocinética de pacientes nesse nível de dose e em níveis de dose anteriores também podem informar a tomada de decisão. O DESC pode interromper o aumento da dose antes da determinação de MTD com base em dados emergentes de PK, PD, toxicidade ou resposta.

[0346]Pacientes adicionais podem ser incluídos em qualquer nível de dose para avaliar melhor a segurança e a tolerabilidade se pelo menos 1 paciente no estudo tiver obtido uma resposta parcial ou melhor, ou se uma avaliação adicional dos dados de PK ou PD for considerada necessária pelo DESC para determinar o RDE.

[0347]O aumento da dose será interrompido após 3 coortes (ou pelo menos 6 pacientes) serem consecutivamente atribuídas ao mesmo nível de dose. Se MTD não for atingida, a dose recomendada para expansão (RDE) será determinada. Antes da determinação de MTD/RDE, um mínimo de 6 pacientes deve ter sido tratado com a combinação.

[0348]Pretende-se que biópsias tumorais emparelhadas sejam obtidas de pacientes durante o aumento da dose. A análise dessas biópsias contribuirá para uma melhor compreensão da relação entre a dose e a atividade farmacodinâmica da combinação.

Supervisão de Segurança pela Comitê Diretor de Escalonamento de Dose

[0349]Um DESC composto pela ADC Therapeutics e os pesquisadores analisará a segurança do paciente continuamente durante o DE para determinar se o cronograma de aumento da dose prescrito pelo mCRM justifica a modificação. Além das observações de segurança, os dados de PK e/ou PD também podem informar a tomada de decisão. Doses intermediárias podem ser atribuídas após acordo entre a ADC Therapeutics e os pesquisadores. O DESC pode continuar a supervisionar durante a Parte 2. Nenhum Comitê de Monitoramento de Segurança de Dados (DSMB) formal será usado.

Parte de expansão de dose

[0350]Depois que a MTD/RDE for declarada, a parte da expansão da dose poderá começar. O principal objetivo da parte de expansão é avaliar ainda mais a segurança e a tolerabilidade do tratamento do estudo na MTD/RDE e obter uma compreensão preliminar da eficácia da combinação em comparação com os dados históricos de eficácia de um único agente.

[0351]Um objetivo exploratório importante é avaliar as alterações no infiltrado imune no tumor em resposta ao tratamento. Isso será avaliado em biópsias de tumor emparelhadas coletadas de pacientes, com um mínimo de dez pares de biópsias avaliables (as amostras de biópsia devem conter tumor suficiente para análise) em pacientes tratados na MTD/RDE. Se isso não for possível, a coleta dessas biópsias pode ser interrompida. Um mínimo de 10 a 20 pacientes está planejado para ser tratado em cada ramo de investigação,

[0352]Vários ramos de investigação diferentes serão abertos, um por doença. Um total de nove ramos de investigação pode ser executado na expansão da dose. Se a inscrição para qualquer um desses grupos não for viável, a inscrição nesse grupo poderá ser encerrada antes que a meta de 10 a 20 pacientes seja atingida.

[0353]Em cada grupo de tratamento, um máximo de aproximadamente seis

pacientes que receberam e progrediram na administração única anterior (ou seja, não em combinação) poderá receber tratamento secundário. Esse número pode ser aumentado se uma combinação mostrar promessa de superação de resistência ao tratamento anterior com agente secundário de administração única.

População de Pacientes

[0354]O estudo será realizado em pacientes adultos com Doença A, Doença B ou Doença C avançada, conforme descrito acima. O pesquisador ou designado deve garantir que apenas pacientes que atendam a todas as seguintes inclusões e nenhum dos critérios de exclusão recebam tratamento no estudo.

Critério de inclusão

[0355]Os pacientes elegíveis para inclusão neste estudo devem atender a todos os seguintes critérios:

1.O consentimento informado por escrito deve ser obtido antes de qualquer procedimento

2.Idade 18 anos.

3.Pacientes com câncer avançado/metastático, com doença mensurável determinada pelo RECIST versão 1.1, que progrediram apesar da terapia padrão ou que são intolerantes à terapia padrão ou para os quais não existe terapia padrão. Os pacientes devem se enquadrar em um dos seguintes grupos:

- Doença A
- Doença B
- Doença C

4.Estado de desempenho de ECOG 0-1 (ou 2 TBC)

5.TBC: O paciente deve ter um local de doença passível de biópsia e ser candidato à biópsia de tumor de acordo com as diretrizes da instituição de tratamento. O paciente deve estar disposto a se submeter a uma nova biópsia do tumor na linha de base e novamente durante a terapia neste estudo.

6. É permitida a terapia prévia com o agente secundário ou compostos relacionados (ou seja, o mesmo MOA)

Critério de exclusão

[0356] Os pacientes elegíveis para este estudo não devem atender a nenhum dos seguintes critérios:

1. História de reações graves de hipersensibilidade a outros mAbs (OR para o mesmo mAb de coluna vertebral que no ADC OR para o mesmo mAb IO, se aplicável)

2. História conhecida de ADA humano sérico positivo na coluna vertebral do mAb, como no ADC

3. Apenas doença do Sistema Nervoso Central (CSN) (se aplicável)

4. Metástases sintomáticas do CSN ou evidência de doença leptomenígea (ressonância magnética cerebral ou citologia do líquido cefalorraquidiano (CSF) previamente documentada)

➤ São permitidas metástases do CSN assintomáticas previamente tratadas, desde que o último tratamento (terapia sistêmica anticâncer e/ou radioterapia local) tenha sido concluído ≥ 8 semanas antes de 1º dia da administração, exceto no uso permitido de baixa dose de esteroides em um afunilamento)

➤ Pacientes com metástases durais discretas são elegíveis.

5. Paciente com valores laboratoriais fora da faixa definidos como:

- Creatinina sérica $\leq 1,5 \times$ ULN. Se creatinina sérica $> 1,5$, a depuração da creatinina (calculada usando a fórmula de Cockcroft-Gault ou medida) deve ser > 60 mL/min/1,73m² para que um paciente seja elegível

- Bilirrubina total $> 1,5 \times$ ULN, exceto pacientes com síndrome de Gilbert que são excluídos se bilirrubina total $> 3,0 \times$ ULN ou bilirrubina direta $> 1,5 \times$ ULN

- Alanina aminotransferase (ALT) $> 3 \times$ ULN, exceto pacientes com envolvimento hepático do tumor, que são excluídos se ALT $> 5 \times$ ULN

- Aspartato aminotransferase (AST) $> 3 \times$ ULN, exceto pacientes com

envolvimento do tumor no fígado, que são excluídos se AST > 5 x ULN

- Contagem absoluta de neutrófilos < 1,0 x 10e9/L
- Contagem de plaquetas < 75 x 10e9/L
- Hemoglobina (Hgb) < 8 g/dL
- Anormalidade em potássio, magnésio, cálcio ou fosfato > CTCAE grau 1, apesar da terapia de reposição apropriada

6.Função cardíaca comprometida ou doença cardíaca clinicamente significativa, incluindo qualquer um dos seguintes:

- Doença cardíaca clinicamente significativa e/ou não controlada, como insuficiência cardíaca congestiva que requer tratamento (NYHA grau III ou IV) ou hipertensão não controlada definida por uma pressão arterial sistólica (PAS) de 160 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) de 100 mm Hg, com ou sem medicação anti-hipertensiva.
- QTcF > 470 msec para mulheres ou > 450 msec para homens na triagem de ECG usando a correção de Fridericia, síndrome de QT longo congênita
 - Infarto agudo do miocárdio ou angina de peito instável < 3 meses (meses antes da entrada no estudo)
 - Doença valvular clinicamente significativa com comprometimento documentado da função cardíaca
 - Pericardite sintomática
 - História ou cardiomiopatia documentada em andamento
 - Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (LVEF) < 40%, conforme determinado por ecocardiograma (ECHO) ou varredura de aquisição múltipla (MUGA)
 - História ou presença de arritmias cardíacas clinicamente significativas, por exemplo, arritmias ventriculares, supraventriculares, nodais ou anormalidade de condução (qualificador do TBC: ... exigindo um marcapasso ou não sendo controlada com medicação)

- Presença de fibrilação atrial instável (taxa de resposta ventricular > 100 bpm).

➤NOTA: Pacientes com fibrilação atrial estável podem ser incluídos desde que não atendam a outros critérios de exclusão cardíaca.

- Bloqueio completo do ramo esquerdo (LBBB), bloqueio bifascicular

- Qualquer segmento ST clinicamente significativo e/ou anormalidades da onda T

7. Toxicidade atribuída à terapia IO anterior que levou à descontinuação da terapia. Pacientes tratados adequadamente para erupção cutânea relacionada à fármaco ou com terapia de reposição para endocrinopatias não são excluídos, desde que essas toxicidades não levem à interrupção do tratamento anterior.

8. Pacientes com doença autoimune ativa, conhecida ou suspeita. É permitido o registro de indivíduos com vitiligo, diabetes mellitus tipo I, hipotireoidismo residual devido a condição autoimune que requer apenas reposição hormonal, psoríase que não requer tratamento sistêmico ou condições que não se espera que ocorram na ausência de um fator externo, desde que o fator possa ser evitado.

9. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou infecção ativa pelo vírus da Hepatite B (HBV) ou Hepatite C (HCV)

➤O teste não é obrigatório ser elegível. O teste para o HCV deve ser considerado se o paciente estiver em risco de ter o HCV não diagnosticado (por exemplo, histórico de uso de fármacos injetáveis).

10. Doença maligna, além da tratada neste estudo. As exceções a essa exclusão incluem o seguinte: doenças malignas que foram tratadas curativamente e não se repetiram nos 2 anos anteriores ao tratamento em estudo; câncer de pele de células escamosas de células basais e completamente ressecadas; qualquer malignidade considerada indolente e que nunca requereu terapia; e carcinoma completamente ressecado *in situ* de qualquer tipo.

11. Terapia anticâncer sistêmica dentro de 2 semanas após a primeira dose

do tratamento em estudo. Para agentes citotóxicos com maior toxicidade retardada, por exemplo, mitomicina C e nitrosoureas, 4 semanas são indicadas como período de washout. Para pacientes que recebem imunoterapias anticâncer, como antagonistas de CTLA-4, 6 semanas são indicadas como o período de washout.

12. Diarreia ativa CTCAE grau 2 ou uma condição médica associada à diarreia crônica (como síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal)

13. Presença de 2: Toxicidade de CTCAE grau 2 (exceto alopecia, neuropatia periférica e ototoxicidade, que são excluídas se $>=$ CTCAE grau 3) devido a terapia prévia contra o câncer.

14. Infecção ativa que requer antibioticoterapia sistêmica.

15. Ulceração ativa do trato GI superior ou sangramento GI

16. Diátese hemorrágica ativa ou medicação oral anti-vitamina K (exceto doses baixas de varfarina e aspirina ou equivalente, desde que o INR $\leq 2,0$)

17. Doença autoimune ativa, neuropatia motora considerada de origem autoimune e outras doenças autoimunes do CSN

18. Pacientes que necessitam de agentes imunossupressores concomitantes ou tratamento crônico com corticoides, exceto:

➤ dose de reposição de esteroides no cenário de insuficiência adrenal

➤ esteroides tópicos, inalados, nasais e oftálmicos são permitidos

19. O uso de qualquer vacina viva contra doenças infecciosas (por exemplo, gripe, varicela, pneumococo) dentro de 4 semanas após o início do tratamento do estudo (NB, o uso de vacinas vivas não é permitido durante toda a duração do estudo)

20. Uso de fatores de crescimento estimuladores de colônias hematopoiéticos (por exemplo, G-CSF, GMCSF, M-CSF) < 2 semanas antes do início do medicamento em estudo. Um agente estimulador eritroide é permitido desde que tenha sido iniciado pelo menos 2 semanas antes da primeira dose do tratamento em estudo.

21. As principais cirurgias dentro de 2 semanas da primeira dose do tratamento

em estudo (mediastinoscopia de NB, inserção de um dispositivo de acesso venoso central ou inserção de um tubo de alimentação não são consideradas cirurgias de grande porte).

22.Radioterapia dentro de 2 semanas após a primeira dose do medicamento em estudo, exceto radioterapia paliativa para um campo limitado, como para o tratamento de dores ósseas ou uma massa sintonizadora de focagem dolorosa. Para permitir a avaliação da resposta ao tratamento, os pacientes devem ter uma doença mensurável remanescente que não foi irradiada.

23.Participação em um estudo experimental de intervenção dentro de 2 semanas da primeira dose do tratamento do estudo.

24.Qualquer condição médica que, no julgamento do pesquisador, impeça a participação do paciente no estudo clínico devido a questões de segurança, conformidade com os procedimentos do estudo clínico ou interpretação dos resultados do estudo.

25.Homens sexualmente ativos, a menos que usem preservativo durante a relação sexual enquanto tomam remédio e por 90 dias após a interrupção do tratamento em estudo e não devem ter filhos nesse período. É necessário que o preservativo seja usado também por homens vasectomizados, a fim de impedir a administração do medicamento via fluido seminal.

26.Mulheres grávidas ou lactantes, em que a gravidez é definida como o estado de uma mulher após a concepção e até o término da gestação, confirmada por um teste laboratorial de hCG positivo. Em casos raros de um tumor secretor endócrino, os níveis de hCG podem estar acima dos limites normais, mas sem gravidez no paciente. Nesses casos, deve-se repetir o teste sérico de hCG (com um resultado contínuo) e um ultrassom vaginal/pélvico para descartar a gravidez. Após confirmação dos resultados e discussão com o representante médico, esses pacientes podem entrar no estudo.

27. Mulheres com potencial para engravidar, definidas como todas as mulheres fisiologicamente capazes de engravidar, a menos que estejam usando métodos contraceptivos altamente eficazes durante o tratamento em estudo e por 90 dias após a última dose do tratamento em estudo. Métodos de contracepção altamente eficazes incluem:

- Abstinência total (quando isso está de acordo com o estilo de vida preferido e habitual do paciente. Abstinência periódica (por exemplo, calendário, ovulação, métodos sintotérmicos, pós-ovulação) e abstinência não são métodos contraceptivos aceitáveis
- Esterilização feminina (teve ooforectomia bilateral cirúrgica com ou sem hysterectomy), hysterectomy total ou ligadura tubária pelo menos 6 semanas antes de fazer o tratamento do estudo. No caso de ooforectomia isolada, somente quando o estado reprodutivo da mulher tiver sido confirmado pela avaliação do nível hormonal de acompanhamento
- Esterilização masculina (pelo menos 6 meses antes da triagem). Para pacientes do sexo feminino no estudo, o parceiro masculino vasectomizado deve ser o único parceiro desse paciente.
- Uso de métodos hormonais combinados orais (estrogênio e progesterona), injetados ou implantados de contracepção ou colocação de um dispositivo intra-uterino (DIU) ou sistema intra-uterino (IUS) ou outras formas de contracepção hormonal com eficácia comparável (taxa de falha <1%), por exemplo anel vaginal hormonal ou contracepção hormonal transdérmica.

➤ No caso de uso de contraceptivos orais, as mulheres devem permanecer estáveis na mesma pílula por no mínimo 3 meses antes de fazer o tratamento no estudo.

➤ As mulheres são consideradas na pós-menopausa e não têm potencial para engravidar se tiverem 12 meses de amenorréia natural (espontânea) com um perfil

clínico apropriado (por exemplo, idade apropriada, histórico de sintomas vasomotores) ou se tiverem ooforectomia cirúrgica bilateral (com ou sem histerectomia) ou ligadura tubária há pelo menos 6 semanas. Somente no caso da ooforectomia, somente quando o estado reprodutivo da mulher foi confirmado pela avaliação do nível hormonal de acompanhamento é considerado não ter potencial para engravidar.

Toxicidade limitadora de dose e diretrizes de modificação de dose

[0357]Uma toxicidade de limitação de dose (DLT) é definida como qualquer um dos seguintes eventos que se acredita estarem pelo menos possivelmente relacionados ao ADC por julgamento do pesquisador que ocorre durante o período de avaliação de DLT de 21 dias. A toxicidade que está clara e diretamente relacionada à doença primária ou a outra etiologia é excluída desta definição.

Definições de DLT

Uma DLT hematológica é definida como:

- Neutropenia febril de grau 3 ou 4 ou infecção neutropênica
- Neutropenia de grau 4 com duração > 7 dias
- Trombocitopenia grau 4
- Trombocitopenia de grau 3 com sangramento clinicamente significativo ou trombocitopenia de grau 3 que requer transfusão de plaquetas
- Anemia de grau 3 que requer transfusão
- Anemia de grau 4

Uma DLT não hematológica é definida como:

- Toxicidade não hematológica de grau 4
- Toxicidade não hematológica de grau 3 com duração > 3 dias, apesar dos cuidados de suporte ideais ou intervenção médica
- Um caso da lei de Hy (AST e/ou ALT > 3x ULN e bilirrubina > 2x ULN, e sem achados iniciais de colestase (atividade da fosfatase alcalina sérica (ALP) < 2x ULN) e nenhum outro motivo que possa explicar a combinação de transaminases

aumentadas e bilirrubina total sérica, como hepatite viral A, B ou C, doença hepática pré-existente ou aguda ou outro medicamento capaz de causar a lesão observada)

- Reação relacionada à hipersensibilidade/infusão de grau 3 ou superior (independentemente da pré-medicação). Uma reação relacionada à hipersensibilidade/infusão de grau 3 que se resolve dentro de 8 horas após o início com tratamento clínico apropriado não se qualifica como DLT.

- LVEF diminui para <40% ou > 20% da linha de base

- Síndrome de lise tumoral de grau 4 (TLS de grau 3 não constituirá DLT, a menos que leve a danos irreversíveis em órgãos de extremidade)

[0358] As seguintes condições não são consideradas DLT não hematológicas:

- Fadiga grau 3 por ≤ 7 dias

- Diarreia, náusea ou vômito de Grau 3, na ausência de pré-medicação, que responda à terapia e melhore em pelo menos 1 grau em 3 dias para eventos de Grau 3 ou ≤ Grau 1 em 7 dias.

- Elevação de AST ou ALT ≥ 5 x ULN, mas ≤ 8 x ULN, sem elevação simultânea da bilirrubina, que diminui para ≤ Grau 2 dentro de 5 dias após o início.

- Lipase sérica de grau 3 ou amilase sérica por ≤ 7 dias se não houver sinais ou sintomas clínicos de pancreatite

[0359] Os pacientes que experimentam uma DLT que resolve ou se estabiliza com o tratamento médico apropriado podem continuar o tratamento a critério do pesquisador, em consulta com o patrocinador.

Modificações de dose

[0360] As diretrizes para o gerenciamento de toxicidades específicas estão detalhadas na tabela abaixo. Para o gerenciamento de eventos não especificados nas tabelas, o seguinte pode servir como orientação aos pesquisadores:

Grau de AE	Diretriz de Gerenciamento de ADC
1	Não é necessário ajuste da dose.
2	<u>Primeira ocorrência:</u> Considere manter um ou ambos os fármacos até melhorar para ≤ Grau

	<p>1 ou de linha de base. Até 1 dose de um ou de ambos os fármacos pode ser pulada para permitir melhorias. Se ocorrer uma melhora no ≤ Grau 1 ou na linha de base dentro de 21 dias a partir da última dose programada (mas perdida) de um ou ambos os fármacos, continue um ou ambos os fármacos no nível de dose original designado nos ciclos de tratamento subsequentes.</p> <p>Se a melhora do ≤ Grau 1 ou da linha de base não ocorrer dentro de 21 dias a partir da última dose programada (mas perdida), interrompa permanentemente um ou ambos os fármacos.</p> <p><u>Segunda ocorrência:</u></p> <p>Mantenha um ou ambos os fármacos até melhorar para ≤ Grau 1 ou de linha de base. Até 1 dose de um ou dos dois fármacos pode ser pulada para permitir a resolução. Se ocorrer uma melhora no ≤ Grau 1 ou na linha de base dentro de 21 dias a partir da última dose programada (mas perdida), continue um ou ambos os fármacos com 1 nível de dose abaixo da dose atribuída original nos ciclos de tratamento subsequentes. Se a melhora do ≤ Grau 1 ou da linha de base não ocorrer dentro de 21 dias a partir da última dose programada (mas perdida), interrompa permanentemente um ou ambos os fármacos.</p> <p><u>Terceira ocorrência:</u></p> <p>Interrompa permanentemente um ou ambos os fármacos.</p>
3	<p><u>Primeira ocorrência:</u></p> <p>Mantenha um ou ambos os fármacos até melhorar para ≤ Grau 1 ou de linha de base. Até 1 dose de um ou de ambos os fármacos pode ser pulada para permitir melhora e, em seguida, continue com 1 nível de dose abaixo da dose original atribuída nos ciclos de tratamento subsequentes.</p> <p><u>Segunda ocorrência:</u></p> <p>Interrompa permanentemente um ou ambos os fármacos</p>
4	Interrompa permanentemente um ou ambos os fármacos.

EXEMPLO 4: Estudo de eficácia *in vivo* de substituto-301 em um modelo singêntico de camundongo imunocompetente usando células MC38 de câncer de cólon de camundongo.

Introdução

[0361]O MC38 é um modelo derivado do câncer de cólon de camundongo usado pré-clinicamente em estudos do tipo imunoterapia que é conhecido por ter infiltração de células Treg e Teff.

[0362]Em Arce Vargas et al., 2017, Immunity 46, 1–10, 18 de abril de 2017

(<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.013>) a depleção seletiva de células Treg infiltradas em tumores no modelo MC38 foi mostrada usando uma versão melhorada de Fc de PC61, um anticorpo de rato direcionado contra CD25 de camundongo e a sinergia com PD1 foi descrita. O PC61 do tipo selvagem foi conjugado com o dímero PBD SG3249 e designado como ADCx25-substituto. A eficácia de ADCx25 Substituto foi estudada em monoterapia ou em combinação com anti-PD1 (Anti-PD1, clone RPM1-14, BioXcell cat # BE0146) no modelo de camundongo MC38 singêntico.

Projeto de Estudo

[0363]O ADCx25 substituto foi administrado em dose única (0,1, 0,5 e 1 mg/kg) no dia 1 isoladamente ou em combinação com o anticorpo anti-PD1 (administrado no regime de dosagem padrão, ou seja, 5 mg/kg nos dias 2, 5 e 8). Como controle, o Isotype Control ADC (B12-SG3249) foi administrado em dose única (1 mg/kg) no dia 1, isoladamente ou em combinação com o anticorpo anti-PD1 (administrado no regime de dosagem padrão), enquanto o anticorpo anti-PD1 foi administrado isoladamente no regime de dosagem padrão.

Resultados

[0364]O ADCx25-substituto apresentou atividade antitumoral forte e dependente da dose em si no modelo singêntico de MC38. O isotipo ADC de controle apresentou atividade significativamente menor que o ADCx25-substituto a 1 mg/kg. (Figura 2). Uma forte sinergia foi observada ao combinar uma dose única baixa de ADCx25-substituto com anticorpo anti-PD1 (Figura 3). A alta eficácia de doses mais altas de ADCx25-substituto no presente modelo impediu a avaliação da sinergia em doses mais altas.

Exemplo 5

[0365]Para mostrar que o ADCx25 trabalha sinergicamente com a Citarabina, um painel de linhagens celulares CD25(+) incluindo, mas não se limitando a Karpas e SUDHL1, foi co-tratado com uma faixa de concentração de ADCx25 e Citarabina.

Como controles negativos, o mesmo painel de linhagens celulares foi co-tratado com uma faixa de concentrações de Citarabina e um ADC de controle não alvo ou com uma faixa de concentração de ADC e veículo.

[0366]Após a incubação, dois parâmetros foram medidos: a quantidade de CD25 de superfície (conforme determinado por citometria de fluxo) e a citotoxicidade *in vitro* das combinações (conforme determinado pelos ensaios CellTiter-Glo® ou MTS). A sinergia citotóxica foi calculada transformando os dados de viabilidade celular na fração afetada e calculando o índice de combinação (Tabela 1) usando o programa de análise CalcuSyn.

Valor de CI		Sinergismo/Antagonismo
<0,1	+++++	Sinergismo muito forte
0,1-0,3	++++	Forte sinergismo
0,3-0,7	+++	Sinergismo
0,7-0,85	++	Sinergismo moderado
0,85-0,9	+	Leve sinergismo
0,9-1,1		Quase aditivo
1,1-1,2	-	Antagonismo leve
1,2-1,45	-	Antagonismo moderado
1,45-3,3	---	Antagonismo
3,3-10	----	Antagonismo forte
>10	-----	Antagonismo muito forte

Tabela 1

[0367]A Figura 4 mostra os dados de citotoxicidade *in vitro* contra a linhagem celular de Karpas299 da citarabina isoladamente (gráfico da esquerda) ou em combinação com ADCx25 (gráfico da direita). A análise de Calcusyn (Tabela 2) mostrou que há uma sinergia clara, especialmente em concentrações mais altas de ADC.

CI para valores experimentais			
ADCx25 (ng/ml)	Decitabina (nm)	Fa	CI
0,1	30	0,016	2,846
0,4	30	0,019	4,966

1,2	30	0,156	0,928
3,7	30	0,358	0,747
11,1	30	0,662	0,522
33,3	30	0,821	0,589
100	30	0,836	1,563
<hr/>			
0,1	100	0,145	0,505
0,4	100	0,172	0,580
1,2	100	0,313	0,433
3,7	100	0,437	0,568
11,1	100	0,669	0,522
33,3	100	0,823	0,587
100	100	0,832	1,622

Tabela 2

[0368]A Figura 5 mostra os dados de citotoxicidade *in vitro* contra a linhagem celular de KG-1 da citarabina isoladamente (gráfico da esquerda) ou em combinação com ADCx25 (gráfico da direita). A análise de Calcusyn (Tabela 3) mostrou que há uma sinergia clara, especialmente com 10 nM de citarabina.

CI para valores experimentais			
ADCx25 (ng/ml)	Decitabina (nm)	Fa	CI
0,005	1	0,078	1,296
0,05	1	0,022	15,593
0,5	1	0,120	3,690
5	1	0,393	1,596
50	1	0,883	0,136
<hr/>			
0,05	10	0,044	27,002
0,5	10	0,205	4,241
5	10	0,597	0,747
50	10	0,906	0,131

Tabela 3

[0369]O KG-1 expressa baixos níveis de CD25. A Figura 6 mostra que a sinergia de Citarabina e ADCx25 contra a linhagem celular KG-1 pode ser explicada

por um aumento no CD25 de superfície, pois a incubação de células CD25(+) KG-1 com Citarabina resultou em um aumento de duas vezes nos níveis de CD25 superficiais (conforme determinado pela análise de FACS). Não foi observado aumento no CD25 de superfície quando a linhagem celular de Karpas299, que é alta em CD25, foi incubada com Citarabina.

Exemplo 6

[0370]Para mostrar que o ADCx25 trabalha sinergicamente com Decitabina, um painel de linhagens de células de CD25 (+) foi co-tratado com uma faixa de concentração de ADCx25 e Decitabina. Como controles negativos, o mesmo painel de linhagens celulares foi cotratado com uma faixa de concentrações de Decitabina ou com uma faixa de concentrações de ADCx25 e veículo.

[0371]Após a incubação, dois parâmetros foram medidos: a quantidade de CD25 de superfície (conforme determinado por citometria de fluxo) e a citotoxicidade *in vitro* das combinações (conforme determinado por ensaios MTS). Para determinar a citotoxicidade, a viabilidade celular é medida adicionando MTS por poço e incubando por 4 horas a 37 °C. A porcentagem de viabilidade celular é calculada em comparação com o controle não tratado. A sinergia citotóxica é calculada transformando os dados de viabilidade celular na fração afetada, e calculando o índice de combinação (Tabela 30 usando o programa de análise CalcuSyn).

Valor de CI		Sinergismo/Antagonismo
<0,1	+++++	Sinergismo muito forte
0,1-0,3	+++	Sinergismo forte
0,3-0,7	++	Sinergismo
0,7-0,85	+	Sinergismo moderado
0,85-0,9		Leve sinergismo
0,9-1,1		Quase aditivo
1,1-1,2	-	Antagonismo leve
1,2-1,45	-	Antagonismo moderado
1,45-3,3	---	Antagonismo
3,3-10	----	Antagonismo forte

>10	-----	Antagonismo muito forte
-----	-------	-------------------------

Tabela 3

[0372]A Figura 7 mostra os dados de citotoxicidade *in vitro* contra a linhagem celular de Karpas299 de decitabina isoladamente ou em combinação com a análise de ADCx25 Calcusyn. A Tabela 4 mostra que há uma sinergia clara, especialmente em concentrações mais baixas do ADC. Não houve diferença na quantidade de CD25 nas células na presença de decitabina 30 mM (ver Figura 8).

CI para valores experimentais			
ADCx25 (ng/ml)	Decitabina (nm)	Fa	CI
0,1	30	0,183	0,265
0,4	30	0,171	0,514
1,2	30	0,264	0,426
3,7	30	0,377	0,658
11,1	30	0,645	0,559
33,3	30	0,712	1,182
100	30	0,836	1,560
<hr/>			
0,1	100	0,311	0,095
0,4	100	0,290	0,207
1,2	100	0,374	0,2472
3,7	100	0,468	0,433
11,1	100	0,682	0,463
33,3	100	0,731	1,062
100	100	0,824	1,718

Tabela 4

Exemplo 7

[0373]Para avaliar a sinergia citotóxica entre o ADCx25 e os agentes secundários Citarabina e Decitabine na linhagem celular de alta expressão de CD25 Karpas299, 1×10^4 células Karpas 299 foram semeadas em 50 μl , em cada poço de uma placa de fundo plano de 96 poços com 30 ou 100 nM de Citarabina/Decitabina. Após 24 horas, uma série de diluições em série de ADCx25 foi preparada em uma

placa separada, e 50 µl de ADC foram adicionados às células Karpas 299 e incubados por 96 horas, juntamente com controles não tratados, para permitir pelo menos três duplicações de células.

[0374]Após 120 horas, 20 µl de MTS foram adicionados a cada poço e incubados por 2-3 horas em condições normais de cultura de células. A OD foi medida a 492 nm, utilizando um leitor de placas, e % de crescimento calculado em comparação com as células de controle não tratadas.

[0375]As curvas de crescimento foram plotadas usando o GraphPad Prism usando a equação sigmoidal, 4PL, X é log (concentração). Os valores de IC50 (dose do medicamento que inibe o crescimento em 50%) foram determinados. A porcentagem de sobrevivência celular foi convertida na fração afetada (Fa) e o índice de combinação (CI) para cada dose calculada usando o CalcuSyn v2.1 1.

[0376]Os resultados são mostrados nas Figuras 9A (Citarabina) e 9B (Decitabina), onde < * indica sinergismo moderado e ** sinergismo forte, conforme determinado por CalcuSyn.

Exemplo 8

[0377]Para avaliar a sinergia citotóxica entre ADCx25 e os agentes secundários Citarabina e Decitabina na linhagem celular de baixa expressão de CD25 KG-1, o protocolo do Exemplo 7 foi seguido usando a célula KG-1 no lugar das células Karpas299 do Exemplo 7.

[0378]Os resultados são mostrados nas Figuras 10A (Citarabina) e 10B (Decitabina), onde *indica sinergismo moderado e ** sinergismo forte, conforme determinado pelo CalcuSyn.

Exemplo 9

Medição do nível de expressão de CD25-mRNA

[0379]As células Karpas-299, EOL-1 ou KG-1 foram incubadas com citarabina 30 nM por 24 horas antes do mRNA ser isolado e transcrito reversamente. O cDNA

foi sondado para IL2Ralpha (CD25) por TaqMan qRT-PCR. A mudança de vezes média na expressão em comparação com o controle não tratado foi calculada usando o método de ddCT usando o gene de referência abl-1. Também foi realizado um período de tempo para medir a alteração da expressão em 3-4 dias nas células Karpas-299 (alta expressão de CD25) e KG-1 (baixa expressão de CD25) nas mesmas condições, prolongando apenas o tempo de incubação com Citarabina.

[0380]Resultados: Verificou-se que a incubação com Citarabina 30 nM tem pouco efeito na expressão do CD25mRNA em células Karpas299 durante o período de 72 horas do ensaio. Por outro lado, as células KG-1 mostraram um aumento de 2 vezes na expressão de CD25 mRNA após 24 horas de incubação com Citarabina, aumentando para um aumento de 4 vezes na expressão de CD25 após 48 horas de incubação, e depois caindo gradualmente para um aumento de 3 vezes após 96 horas de incubação.

Medindo o nível de expressão da proteína de superfície de CD25

[0381]As células Karpas-299 e KG-1 foram coletadas após tratamento com Citarabina 30 nM por 24 horas, depois bloqueadas e coradas com mAb anti-CD25-PE marcado diretamente por 1 hora. As células foram então lavadas e testadas em um citômetro de fluxo Fortessa X20. O número médio de anticorpos CD25 ligados por célula foi calculado usando esferas de referência QuantiBRITE-PE da BD usando Ab CD25-PE anti-humano de camundongo monoclonal diretamente marcado da BD (cat#555432).

[0382]Resultados: Verificou-se que a incubação com 30 nM de Citarabina tem pouco efeito na expressão da proteína de superfície de CD25 em células Karpas299 durante o período de 24 horas do ensaio, com células Karpas299 não tratadas e tratadas, ligando uma média média de -60000 anticorpos por célula. Em contraste, as células KG-1 incubadas com Citarabina 30 nM apresentaram níveis significativamente aumentados de expressão da superfície de CD25, com células KG-1 não tratadas

ligando uma média de cerca de -200 anticorpos por célula, em comparação com uma média de cerca de -400 anticorpos por célula ligada por células KG-1 tratadas.

EXEMPLO 10: sinergia contra células neoplásicas CD25+ ve entre ADCxCD25 e cada um dentre agentes secundários de Imuno-oncologia (I/O), antagonistas de PD1, antagonistas de PDL1, antagonistas de CTLA4, agonistas de OX40 e agonistas de GITR.

Antagonistas de PD1

[0383]Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com um antagonista de PD1 mostra efeito aditivo ou sinérgico, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singênico em camundongos imunocompetentes (para CD25, modelos potencialmente adequados incluem YAC1, MC38, B16F10, CT26). Para este fim, um anticorpo reativo cruzado com CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e este ADC é administrado com o antagonista de PD1 a camundongos enxertados com uma linhagem de células tumorais de camundongo que expressa CD25. O ADC é administrado antes do antagonista de PD1, concomitantemente com o antagonista de PD1, ou após o antagonista de PD1, conforme decidido pelo pesquisador.

[0384]Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o antagonista de PD1 é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o antagonista de ADC ou PD1. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo.

[0385]A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o antagonista de ADC ou PD1.

Antagonistas de PDL1

[0386]Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com um antagonista de PDL1 mostra efeito aditivo ou sinérgico, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singêntico em camundongos imunocompetentes. Para este fim, um anticorpo reativo cruzado com CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e este ADC é administrado com o antagonista de PDL1 a camundongos enxertados com uma linhagem de células tumorais de camundongo que expressa CD25. O ADC é administrado antes do antagonista de PDL1, concomitantemente com o antagonista de PDL1, ou após o antagonista de PDL1, conforme decidido pelo pesquisador.

[0387]Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o antagonista de PD1 é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o antagonista de ADC ou PDL1. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo.

[0388]A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o antagonista de ADC ou PDL1.

Antagonistas de CTLA4

[0389]Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com um antagonista de CTLA4 mostra efeito aditivo ou sinérgico, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singêntico em camundongos imunocompetentes. Para este fim, um anticorpo reativo cruzado com CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e este ADC é administrado com o antagonista de CTLA4 a camundongos enxertados com uma linhagem de células tumorais de camundongo que expressa CD25. O ADC é administrado antes do antagonista de CTLA4, concomitantemente com o antagonista de CTLA4, ou após o antagonista de CTLA4,

conforme decidido pelo pesquisador.

[0390] Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o antagonista de CLTA4 é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o antagonista de ADC ou CLTA4. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo.

[0391] A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o antagonista de ADC ou CLTA4.

Agonistas de OX40

[0392] Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com um agonista de OX40 mostra efeito aditivo ou sinérgico, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singêntico em camundongos imunocompetentes. Para este fim, um anticorpo reativo cruzado com CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e este ADC é administrado com o agonista de OX40 a camundongos enxertados com uma linhagem de células tumorais de camundongo que expressa CD25. O ADC é administrado antes do agonista de OX40, concomitantemente com o agonista de OX40, ou após o agonista de OX40, conforme decidido pelo pesquisador.

[0393] Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o agonista de OX40 é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o agonista de ADC ou OX40. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo.

[0394]A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o agonista de ADC ou OX40.

Agonistas de GITR

[0395]Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com um agonista de GITR mostra efeito aditivo ou sinérgico, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singêntico em camundongos imunocompetentes. Para este fim, um anticorpo reativo cruzado com CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e este ADC é administrado com o agonista de GITR a camundongos enxertados com uma linha de células tumorais de camundongo que expressa CD25. O ADC é administrado antes do agonista de GITR, concomitantemente com o agonista do GITR, ou após o agonista do GITR, conforme decidido pelo pesquisador.

[0396]Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o agonista de GITR é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o agonista de ADC ou GITR. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo.

[0397]A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o agonista de ADC ou GITR.

EXEMPLO 11: sinergia contra células neoplásicas CD25- ve entre ADCxCD25 e cada um dentre agentes secundários de Imuno-oncologia (I/O), antagonistas de PD1, antagonistas de PDL1, antagonistas de CTLA4, agonistas de OX40 e agonistas de GITR.

[0398]O CD25 também é expresso em células imunes que se infiltram no

ambiente do tumor local e que podem ter um impacto supressor na resposta imune inata contra o tumor. Exemplos de tais células são células T, como células T reguladoras. O ADCxCD25 pode ser usado para atingir essas células imunológicas, o que mata as células imunossuppressoras, aumentando a resposta imune.

[0399] Além desse efeito de “liberação da supressão imunológica”, a morte das células imunes pelo ADCxCD25 liberará ogivas locais de PBD, matando as células neoplásicas vizinhas por meio da morte de espectadores.

[0400] Portanto, através destes dois mecanismos, os tumores que não expressam CD25 podem ser mortos ao atingir células imunes no ambiente local do tumor. Além disso, as células tumorais CD25-ve mortas por PBD liberadas pelas células imunes vizinhas induzirão a morte celular imunogênica adicional, fortalecendo ainda mais a resposta imune antitumoral.

Antagonista de PD1

[0401] Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com um antagonista de PD1 mostra efeito aditivo ou sinérgico contra tumores que não expressam CD25, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singêntico em camundongos imunocompetentes. Para este propósito, um anticorpo reativo cruzado com o CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e esse ADC é administrado com o antagonista de PD1 a camundongos enxertados com uma linhagem celular tumoral de camundongo conhecidos por terem altos níveis de linfócitos infiltrantes, como, sem limitação, MC38 e CT26. O ADC é administrado antes do antagonista de PD1, concomitantemente com o antagonista de PD1, ou após o antagonista de PD1, conforme decidido pelo pesquisador.

[0402] Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o antagonista de PD1 é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o antagonista de ADC ou PD1. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para

todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo.

[0403]A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o antagonista de ADC ou PD1.

Antagonistas de PD-L1

[0404]Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com um antagonista de PDL1 mostra efeito aditivo ou sinérgico contra tumores que não expressam CD25, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singêntico em camundongos imunocompetentes. Para este propósito, um anticorpo reativo cruzado com o CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e esse ADC é administrado com o antagonista de PDL1 a camundongos enxertados com uma linhagem celular tumoral de camundongo conhecidos por terem altos níveis de linfócitos infiltrantes, como, sem limitação, MC38 e CT26. O ADC é administrado antes do antagonista de PDL1, concomitantemente com o antagonista de PDL1, ou após o antagonista de PDL1, conforme decidido pelo pesquisador.

[0405]Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o antagonista de PDL1 é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o antagonista de ADC ou PDL1. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo.

[0406]A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o antagonista de ADC ou PDL1.

Antagonistas de CTLA4

[0407]Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com

um antagonista de CTLA4 mostra efeito aditivo ou sinérgico contra tumores que não expressam CD25, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singêntico em camundongos imunocompetentes. Para este propósito, um anticorpo reativo cruzado com o CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e esse ADC é administrado com o antagonista de CTLA4 a camundongos enxertados com uma linhagem celular tumoral de camundongo conhecidos por terem altos níveis de linfócitos infiltrantes, como, sem limitação, MC38 e CT26. O ADC é administrado antes do antagonista de CTLA4, concomitantemente com o antagonista de CTLA4, ou após o antagonista de CTLA4, conforme decidido pelo pesquisador.

[0408] Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o antagonista de CTLA4 é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o antagonista de ADC ou CTLA4. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo. A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o antagonista de ADC ou CTLA4.

Agonistas de OX40

[0409] Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com um agonista de OX40 mostra efeito aditivo ou sinérgico contra tumores que não expressam CD25, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singêntico em camundongos imunocompetentes. Para este propósito, um anticorpo reativo cruzado com o CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e esse ADC é administrado com o agonista de OX40 a camundongos enxertados com uma linhagem celular tumoral de camundongo conhecidos por terem altos níveis de linfócitos infiltrantes, como, sem limitação, MC38 e CT26. O ADC é administrado antes

do agonista de OX40, concomitantemente com o agonista de OX40, ou após o agonista de OX40, conforme decidido pelo pesquisador.

[0410]Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o agonista de OX40 é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o agonista de ADC ou OX40. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo.

[0411]A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o agonista de ADC ou OX40.

Agonistas de GITR

[0412]Para testar se um ADC baseado em PBD contra CD25 combinado com um agonista de GITR mostra efeito aditivo ou sinérgico contra tumores que não expressam CD25, a combinação é testada *in vivo* em um modelo de tumor singêntico em camundongos imunocompetentes. Para este propósito, um anticorpo reativo cruzado com o CD25 de camundongo é conjugado com uma ogiva de PBD e esse ADC é administrado com o agonista de GITR contra camundongos enxertados com uma linhagem celular tumoral de camundongo conhecidos por terem altos níveis de linfócitos infiltrantes, como, sem limitação, MC38 e CT26. O ADC é administrado antes do agonista de GITR, concomitantemente com o agonista do GITR, ou após o agonista do GITR, conforme decidido pelo pesquisador.

[0413]Tipicamente, o ADC é administrado como uma dose única entre 0,1 e 1 mg/kg, enquanto o agonista de GITR é administrado Q3d x 3 em doses entre 1 e 10 mg/kg. Os grupos de controle incluem apenas o agonista de ADC ou GITR. Os volumes de tumor e o peso corporal são subsequentemente medidos até 60 dias para

todos os grupos e o número de camundongos TFS sobreviventes livres de tumor que respondem parcialmente (RP), e completamente (RC) é determinado em cada grupo.

[0414]A análise estatística (tipicamente um teste log-rank) é realizada para determinar se os camundongos tratados com a combinação superaram os camundongos tratados apenas com o agonista de ADC ou GITR.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de tratamento de câncer em um indivíduo, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de ADCX25 e um agente secundário.
2. Primeira composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ADCX25 para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo, em que o tratamento compreende a administração da primeira composição em combinação com uma segunda composição compreendendo um agente secundário.
3. Primeira composição, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um agente secundário para uso em um método de tratamento de um distúrbio em um indivíduo, em que o tratamento compreende a administração da primeira composição em combinação com uma segunda composição compreendendo ADCX25.
4. Uso de ADCX25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para tratamento de câncer em um indivíduo, em que o medicamento compreende ADCX25, e em que o tratamento compreende a administração do medicamento em combinação com uma composição compreendendo um agente secundário.
5. Uso de um antagonista de PD1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é na fabricação de um medicamento de tratamento de câncer em um indivíduo, em que o medicamento compreende um agente secundário e em que o tratamento compreende a administração do medicamento em combinação com uma composição compreendendo ADCX25.
6. Kit, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:
 - um primeiro medicamento compreendendo ADCX25;
 - um segundo medicamento compreendendo um agente secundário; e,
 - opcionalmente,

uma bula compreendendo instruções para administração do primeiro

medicamento a um indivíduo em combinação com o segundo medicamento para o tratamento de câncer.

7. Kit, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um medicamento que compreende ADCX25 e uma bula compreendendo instruções para administração do medicamento a um indivíduo em combinação com uma composição compreendendo um agente secundário para o tratamento de câncer.

8. Kit, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um medicamento compreendendo um agente secundário e uma bula compreendendo instruções para administração do medicamento a um indivíduo em combinação com uma composição compreendendo ADCX25 para o tratamento de câncer.

9. Composição farmacêutica, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende ADCX25 e um agente secundário.

10. Método de tratamento de câncer em um indivíduo, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz da composição conforme a reivindicação 9.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADA** pelo fato de que é para uso em um método de tratamento de câncer em um indivíduo.

12. Uso da composição, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer em um indivíduo.

13. Kit, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a composição de acordo com a reivindicação 9 e um conjunto de instruções para administração do medicamento a um indivíduo para o tratamento de câncer.

14. Composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o tratamento compreende a administração de ADCX25 antes do agente secundário, simultaneamente com o agente secundário ou depois do agente secundário.

15. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA**(o) pelo fato de que o tratamento compreende ainda a administração de um agente quimioterapêutico.

16. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA**(o) pelo fato de que o indivíduo é humano.

17. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA**(o) pelo fato de que o indivíduo tem, ou foi determinado como tendo, câncer.

18. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA**(o) pelo fato de que o indivíduo tem, ou foi determinado como tendo, um câncer definido pela presença de uma neoplasia compreendendo ambas dentre células CD25+ve e CD25 -ve.

19. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA**(o) pelo fato de que o indivíduo tem ou foi determinado como tendo um câncer definido pela presença de uma neoplasia compreendendo ou composta de células neoplásicas CD25-ve.

20. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA**(o) pelo fato de que o câncer ou neoplasia é todo ou parte de um tumor sólido.

21. Composição, método, uso ou kit de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA**(o) pelo fato de que o indivíduo tem, ou foi determinado como tendo, um câncer que expressa células não tumorais associadas a tumores CD25 ou CD25+, como células-T infiltrantes de CD25+.

22. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA**(o) pelo fato de que o indivíduo tem, ou foi determinado como tendo, um câncer que expressa um baixo nível de expressão superficial de CD25.

23. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer reivindicação anterior, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o indivíduo tem, ou foi determinado como tendo, um câncer que expressa uma segunda proteína alvo.

24. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o tratamento:

- a) trata eficazmente uma ampla gama de distúrbios,
- b) trata eficazmente distúrbios resistentes, refratários ou reincidentes,
- c) tem uma taxa de resposta aumentada e/ou
- d) aumentou a durabilidade;

em comparação com o tratamento com ADCX25 ou o agente secundário sozinho.

25. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o câncer é selecionado do grupo que compreende:

Linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, incluindo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular, (FL), linfoma de células do manto (MCL), linfoma linfático crônico (CLL), linfoma de células B da zona marginal (MZBL);

leucemias como leucemia de células capilares (HCL), variante de leucemia de células capilares (HCL-v), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), como ALL positiva para o cromossomo Filadélfia (Ph+ALL) ou ALL negativa para o cromossomo Filadélfia (Ph-ALL);

câncer pancreático, câncer de mama, câncer colorretal, câncer gástrico e esofágico, leucemia e linfoma, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço.

26. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agente secundário é

um antagonista de PD1.

27. Composição, método, uso ou kit, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o antagonista de PD1 é selecionado dentre pembrolizumab, nivolumab, MEDI0680, PDR001 (spartalizumab), Camrelizumab, AUNP12, Pidilizumab Cemiplimab (REGN-2810), AMP-224, BGB-A317 (Tisleizumab), e BGB-108.

28. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agente secundário é um inibidor de Tirosina Quinase de Bruton (BTKi).

29. Composição, método, uso ou kit, de acordo com a reivindicação 28, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o inibidor da Tirosina Quinase de Bruton (BTKi) é selecionado dentre Ibrutinib (Imbruvica), Acalabrutinib/ACP-196, ONO/GS-4059, Spebrutinib/AVL-292/CC-292, HM71224 (Poseltinib) e BGB-3111 (Zanubrutinib).

30. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agente secundário é um antagonista de PD-L1.

31. Composição, método, uso ou kit, de acordo com a reivindicação 30, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o antagonista de PD-L1 é selecionado a partir de atezolizumab (Tecentriq), BMS-936559/MDX-1105, durvalumab/MEDI4736 e MSB0010718C (Avelumab).

32. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agente secundário é um agonista de GITR GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein - proteína Relacionada a TNFR Induzida por Glucocorticoide).

33. Composição, método, uso ou kit, de acordo com a reivindicação 32, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agonista de GITR (Glucocorticoid-Induced

TNFR-Related protein - proteína Relacionada a TNFR Induzida por Glucocorticoide) é selecionado dentre MEDI1873, TRX518, GWN323, MK-1248, MK 4166, BMS-986156 e INCAGN1876.

34. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agente secundário é um agonista de OX40.

35. Composição, método, uso ou kit, de acordo com a reivindicação 34, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agonista de OX40 é selecionado dentre MEDI0562, MEDI6383, MOXR0916, RG7888, OX40mAb24, INCAGN1949, GSK3174998 e PF-04518600.

36. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agente secundário é um antagonista de CTLA-4.

37. Composição, método, uso ou kit, de acordo com a reivindicação 36, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o antagonista de CTLA-4 é selecionado dentre ipilimumab e Tremelimumab.

38. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agente secundário é fludarabina.

39. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agente secundário é citarabina.

40. Composição, método, uso ou kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, **CARACTERIZADA(o)** pelo fato de que o agente secundário é um agente de hipometilação.

41. Composição, método, uso ou kit, de acordo com reivindicação 40,
CARACTERIZADA(o) pelo fato de que o agente de hipometilação é selecionado
entre 5-azacitidina (azacitidina) e 5-aza-2'-desoxicitididina (decitabina)

42. Composição, método, uso ou kit, de acordo com a reivindicação 40,
CARACTERIZADA(o) pelo fato de que o agente de hipometilação é decitabina.

SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO. 1 (AB12 VH):

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSRYIINWVRQAPGQQGLEWMGRIIPILGVEN
YAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKDWFDYWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLA

SEQ ID NO. 2 (AB12 VL):

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIPP

SEQ ID NO. 3 (VH CDR1):

RYHN

SEQ ID NO. 4 (VH CDR2):

RIIPILGVENYAQKFQG

SEQ ID NO. 5 (VH CDR3):

KDWFDY

SEQ ID NO. 6 (VL CDR1):

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO. 7 (VL CDR2):

GASSRAT

SEQ ID NO. 8 (VL CDR3):

QQYGSSPLT

Figura 1

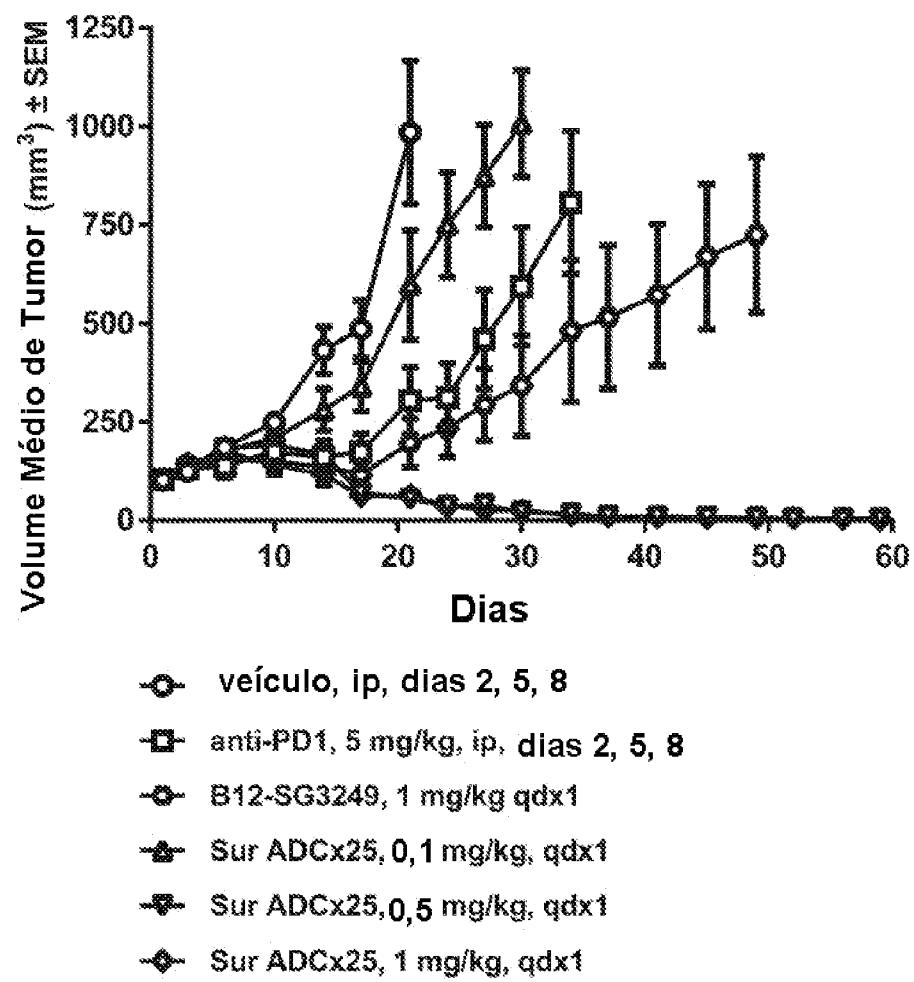


Figura 2

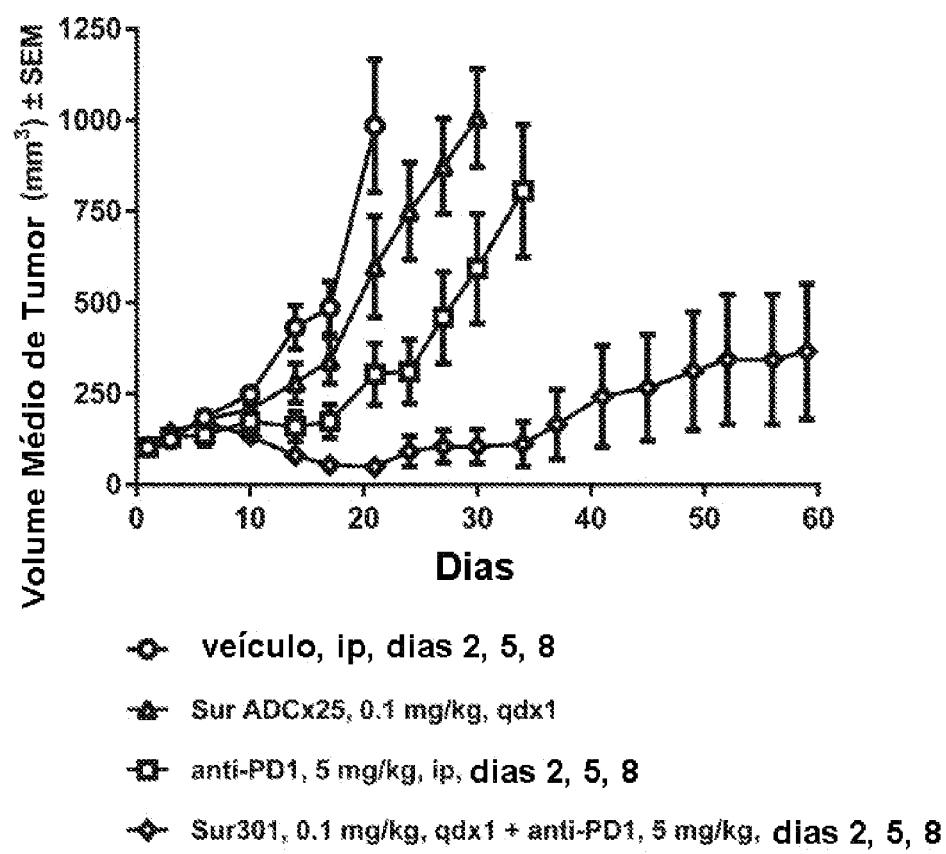


Figura 3

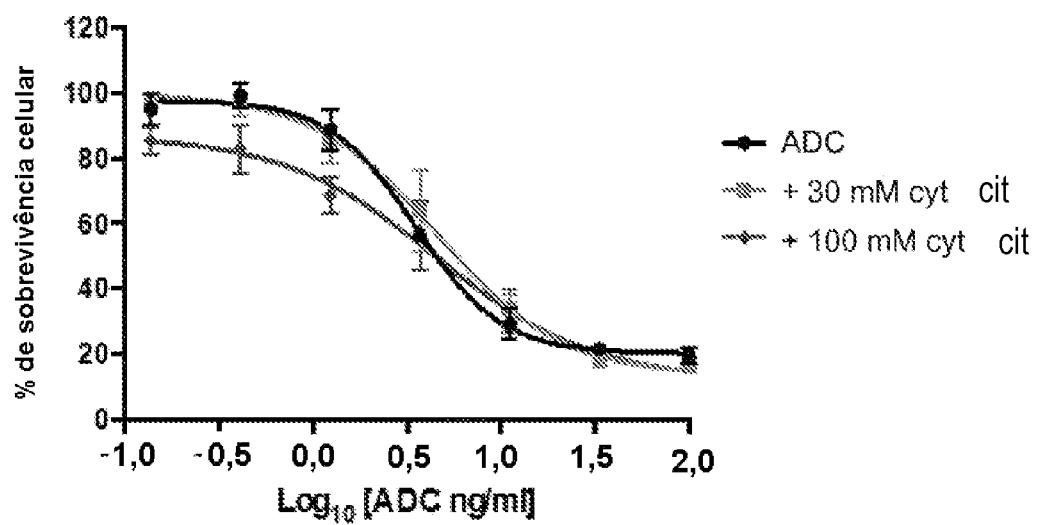
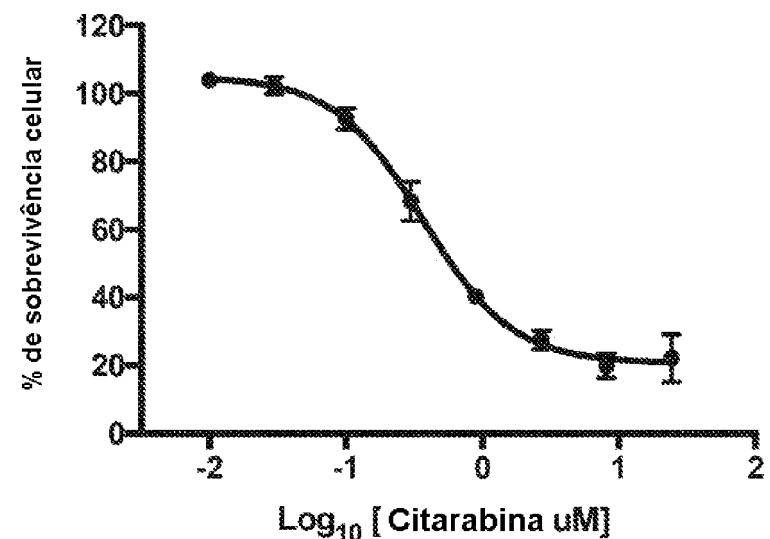


Figura 4

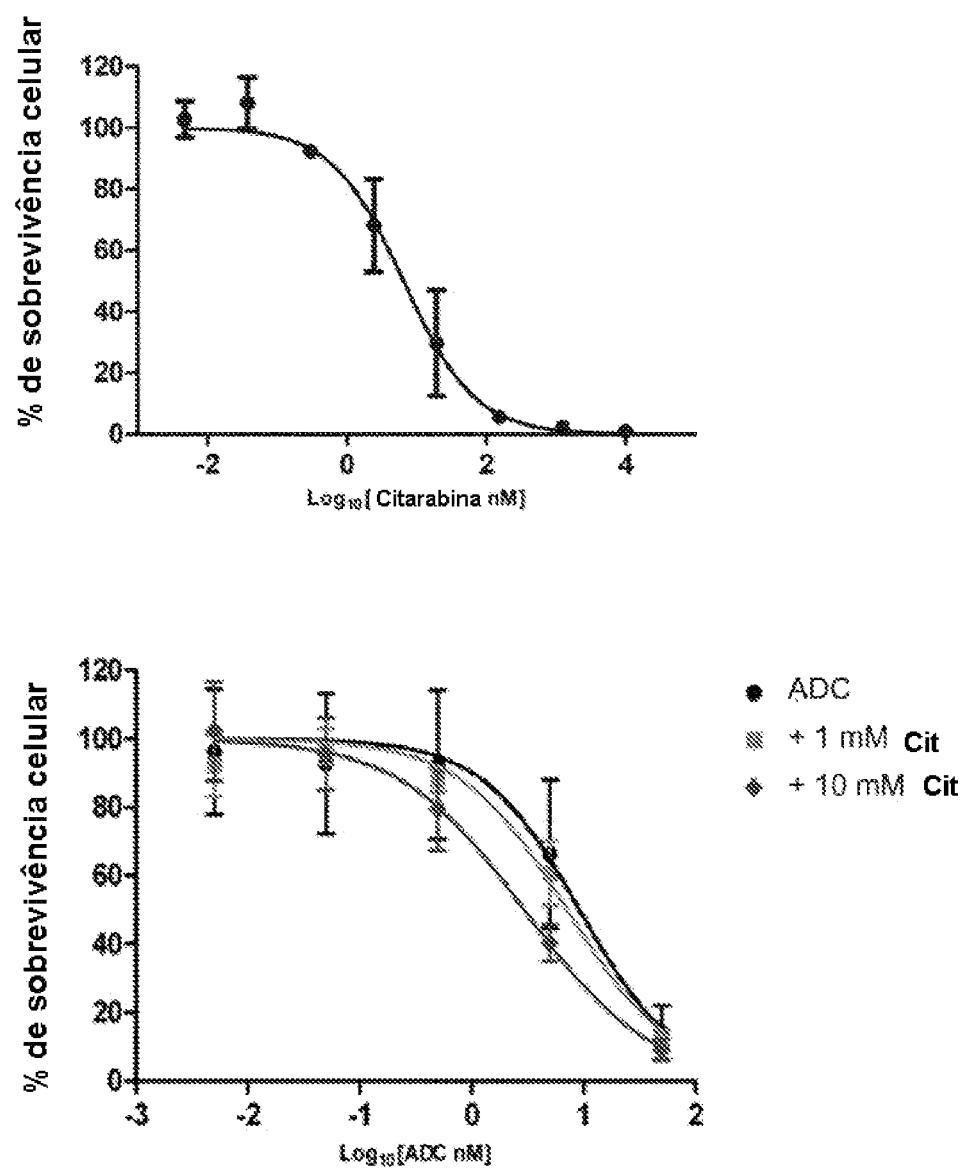


Figura 5

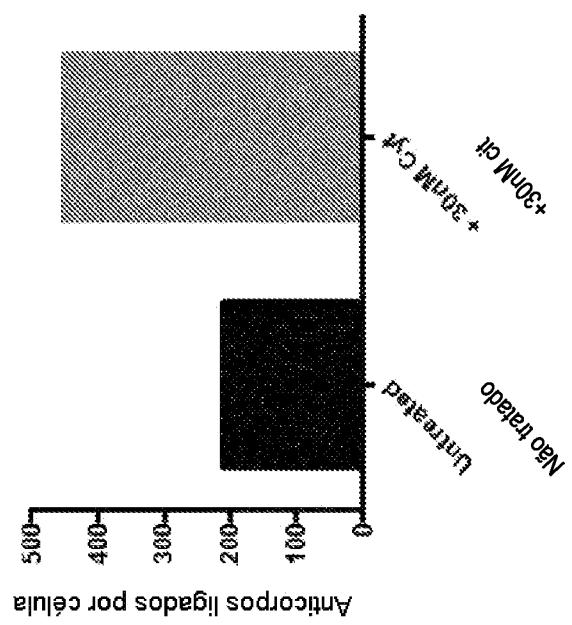
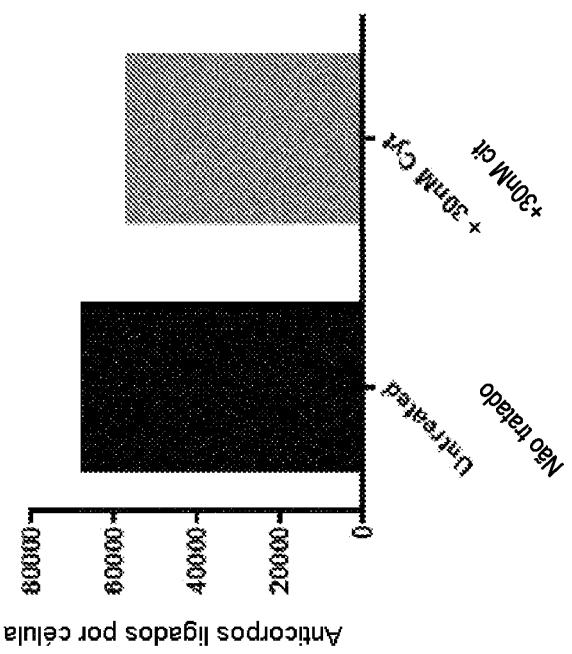


Figura 6



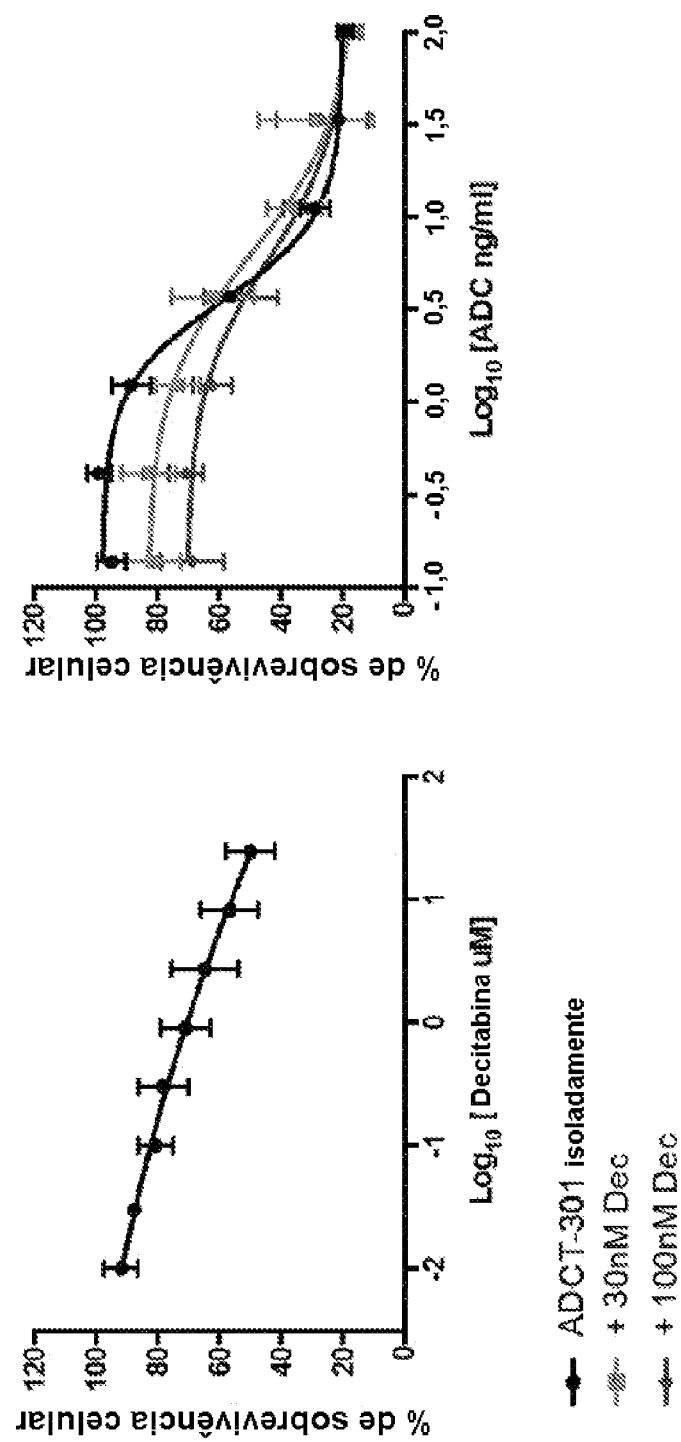


Figura 7

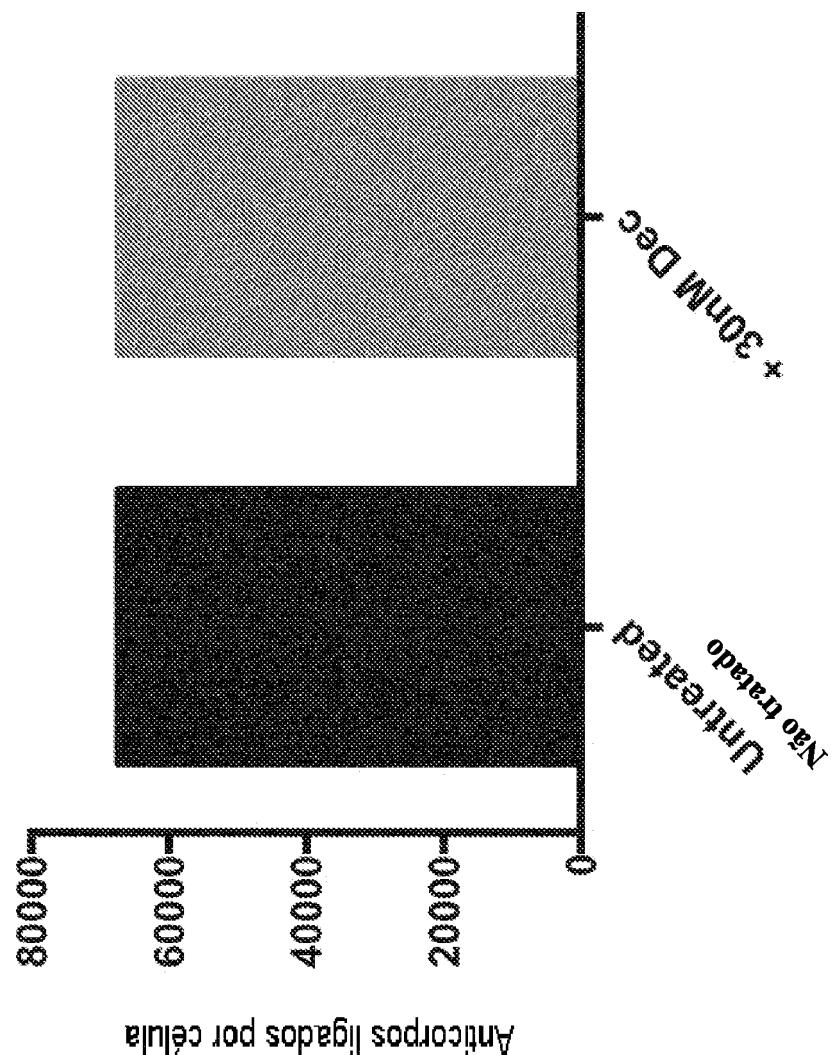


Figura 8

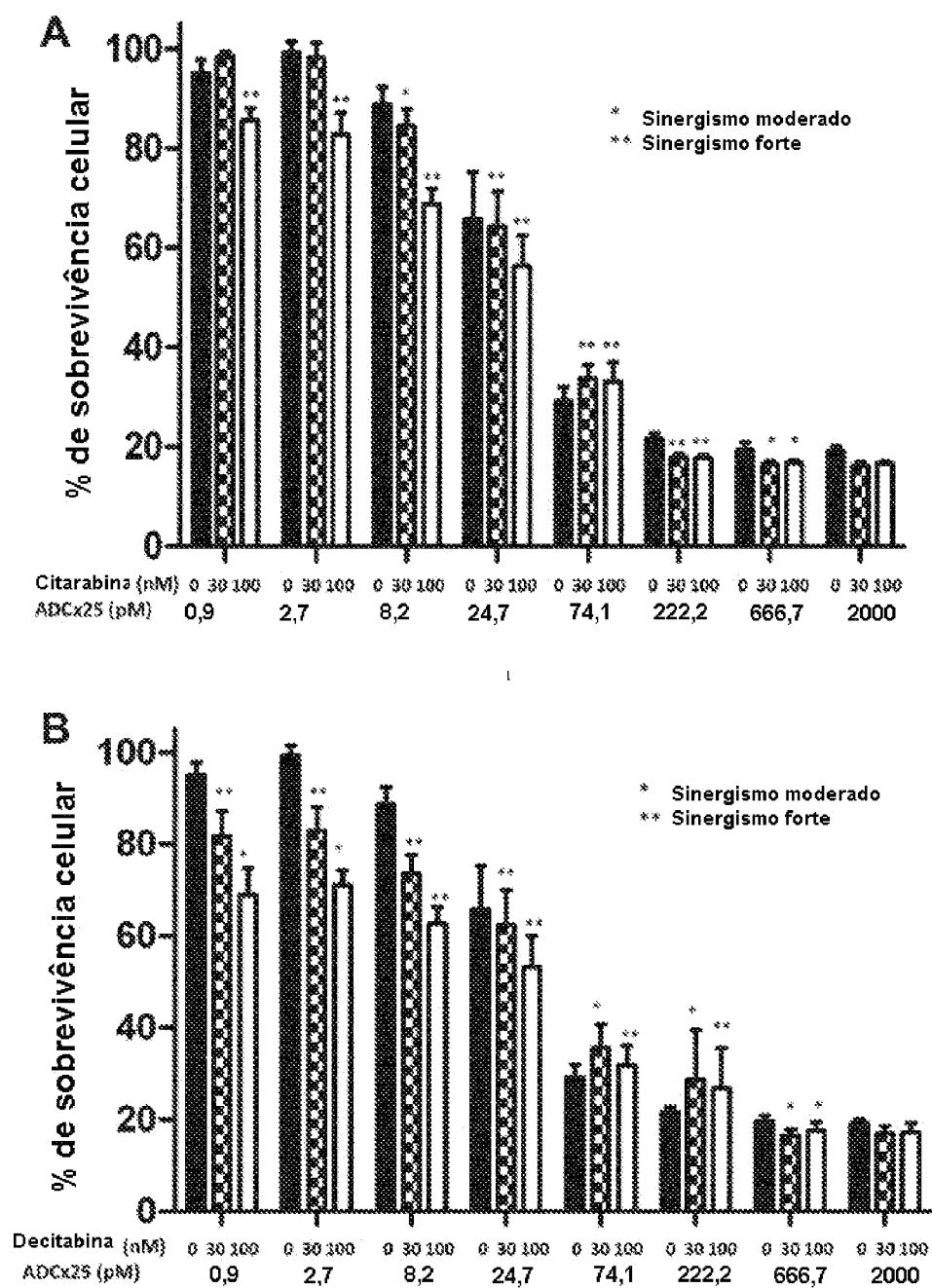


Figura 9

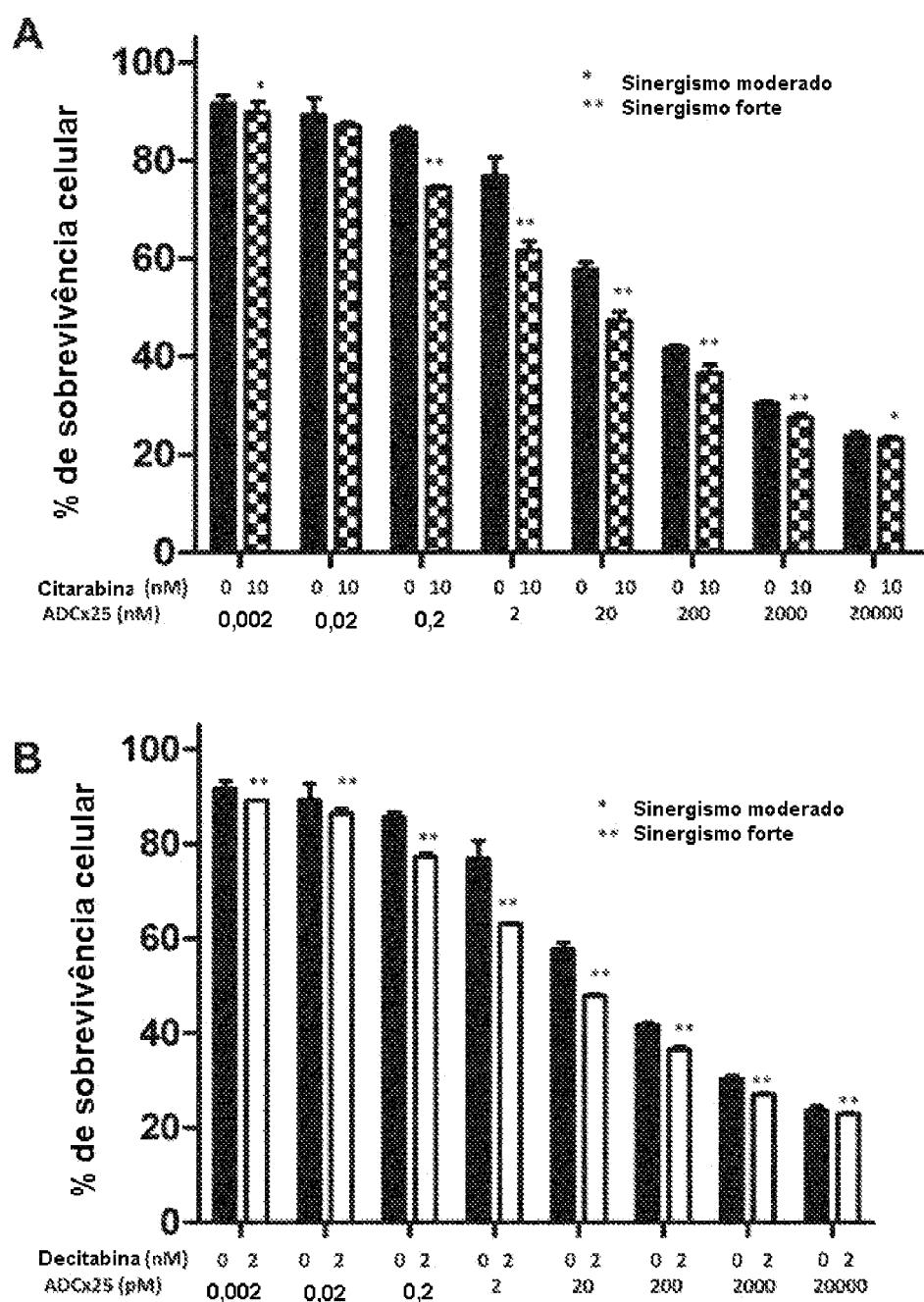


Figura 10

RESUMO

"TERAPIA DE COMBINAÇÃO COM CONJUGADO ANTICORPO-FÁRMACO ANTI-CD25"

A presente divulgação refere-se a terapias de combinação para o tratamento de condições patológicas, tal como câncer. Em particular, a presente divulgação refere-se a terapias de combinação compreendendo tratamento com um Conjugado de Anticorpo Fármaco (ADC) e um agente secundário.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 195.362-1 Listagem de Sequências.txt
- Data de Geração do Código: 17/12/2019
- Hora de Geração do Código: 10:31:26
- Código de Controle:
 - Campo 1: E5BE2E4AF0A1FD27
 - Campo 2: C805AF63FEDB9CB7