



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej  
Polskiej

(96) Data i numer zgłoszenia patentu europejskiego:  
**09.01.2015 15701106.5**

(13) **T3**  
(51) **Int.Cl.**  
**A61K 47/48 (2006.01)**

(97) O udzieleniu patentu europejskiego ogłoszono:  
**23.03.2016 Europejski Biuletyn Patentowy 2016/12**  
**EP 2948184 B1**

---

(54) Tytuł wynalazku:

**ADC duokarmycyny wykazujące poprawioną aktywność przeciwnowotworową in vivo**

---

(30) Pierwszeństwo:  
**10.01.2014 EP 14150791**  
**10.10.2014 EP 14188450**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**02.12.2015 w Europejskim Biuletynie Patentowym nr 2015/49**

(45) O złożeniu tłumaczenia patentu ogłoszono:  
**30.11.2016 Wiadomości Urzędu Patentowego 2016/11**

(73) Uprawniony z patentu:  
**Synthon Biopharmaceuticals B.V., Nijmegen, NL**

(72) Twórca(y) wynalazku:  
**WILLEM DOKTER, Nijmegen, NL**  
**PETER JOHANNES GOEDINGS, Nijmegen, NL**  
**GIJSBERTUS FRANCISCUS MARIA VERHEIJDEN, Nijmegen, NL**  
**PATRICK HENRY BEUSKER, Nijmegen, NL**

(74) Pełnomocnik:  
**rzecz. pat. Janina Kossowska**  
**PATPOL**  
**KANCELARIA PATENTOWA SP. Z O.O.**  
**ul. Nowoursynowska 162 J**  
**02-776 Warszawa**

**PL/EP 2948184 T3**

---

**Uwaga:**

W ciągu dziewięciu miesięcy od publikacji informacji o udzieleniu patentu europejskiego, każda osoba może wnieść do Europejskiego Urzędu Patentowego sprzeciw dotyczący udzielonego patentu europejskiego. Sprzeciw wnosi się w formie uzasadnionego na piśmie oświadczenia. Uważa się go za wniesiony dopiero z chwilą wniesienia opłaty za sprzeciw (Art. 99 (1) Konwencji o udzielaniu patentów europejskich).

## Opis

## DZIEDZINA WYNAŁAZKU

5 [0001] Niniejszy wynalazek dotyczy koniugatów przeciwciało-lek (ADC) zawierających duokarmycynę do stosowania do leczenia ludzkich nowotworów litych i nowotworów układu krwiotwórczego wyrażających receptor ludzkiego czynnika wzrostu naskórka 2 (HER2), w szczególności raka sutka, raka żołądka, raka pęcherza, raka jajnika, raka płuc, raka prostaty, raka trzustki, raka jelita grubego, raka płaskonabłonkowego narządów głowy i szyi, kostniakomięsaka oraz ostrej białaczki limfoblastycznej.

10

## TŁO NINIEJSZEGO WYNAŁAZKU

[0002] Przeciwciała skoniugowano z różnymi lekami cytotoksycznymi, w tym małymi cząsteczkami, które alkilują lub siecują DNA (np. odpowiednio z duokarmycynami i kalicheamycynami lub dimerami pirolobenzodiazepiny), lub przerywają mikrotubule (np. majtanzynoidy i auristatyny) lub wiążą DNA (np. antracykliny). Jeden taki ADC zawierający humanizowane przeciwciało anty-CD33 skoniugowane z kalicheamycyną - Mylotarg™ (gemtuzumab ozogamicyny, Wyeth) – dopuszczono w 2000 roku do leczenia ostrej białaczki szpikowej. W 2011 roku Agencja Żywności i Leków (ang. *US Food and Drug Administration* (FDA)) zatwierdziła Adcetris™ (brentuksymab vedotin, Seattle Genetics), ADC zawierający przeciwciało chimeryczne do CD30 skoniugowanego z monometylo-aurostatyną E (MMAE) do leczenia chłoniaka Hodgkina i anaplastycznego chłoniaka wielkokomórkowego.

[0003] Duokarmycyny, po raz pierwszy wyizolowane z bulionu hodowlanego gatunku *Streptomyces*, są członkami rodziny antybiotyków przeciwnowotworowych, która obejmuje duokarmycynę A, duokarmycynę SA, oraz CC-1065. Te niezwykle silne czynniki rzekomo czerpią swoją aktywność biologiczną ze zdolności do selektywnego wobec sekwencji alkilowania DNA w pozycji N3 adeniny w małym rowku, co inicjuje kaskadę zdarzeń prowadzących do śmierci komórki nowotworowej.

[0004] W WO2011/133039A ujawniono serię nowych analogów czynnika CC-1065 alkilującego DNA i jego ADC ukierunkowanych na HER2. W Przykładzie 15 przetestowano kilka koniugatów trastuzumabu duokarmycyny wobec heteroprzeszczepów N87 (tj. IHC (immunohistochemia) HER2 3+ rak żołądka) u myszy nagich. Wyniki przedstawiono na Figurach 4A, 4B i 4C. Po potraktowaniu pojedynczą dawką 12 mg / kg iv, wszystkie sześć ADC zmniejszyło objętość guza oraz poprawiło przeżywalność w porównaniu z samym przeciwciałem - trastuzumabem i nośnikiem kontrolnym, bez negatywnego wpływu na masę ciała. Stwierdzono, że koniugaty, które zawierają stosunkowo krótki łącznik, mają lepszą (przeciwnowotworową) skuteczność niż odpowiadający koniugat ze stosunkowo długim łącznikiem, oraz wykazano, że zarówno rodzaj łącznika jak i rodzaj leku również mają wpływ na skuteczność.

[0005] Rak sutka pozostaje najbardziej powszechnym nowotworem wśród kobiet na świecie. Rak sutka jest chorobą heterogeniczną, która wykazuje szeroką gamę zachowań klinicznych i rokowań. Rak sutka jest nieprawidłowym, złośliwym wzrostem komórek nabłonkowych gruczołów mlekowych lub przewodów w gruczole sutkowym. Tkanka rakowa może być zlokalizowana wyłącznie w miejscu pochodzenia (rak *in situ*) lub może zaatakować otaczającą tkankę przez błonę podstawną (rak inwazyjny). Rak metastatyczny pojawia się jak tylko komórki rakowe rozprzestrzenia się drogą naczyń limfatycznych i krwionośnych do innych

narządów. Różnicowanie histologiczne i charakteryzowanie komórek raka sutka przeprowadza się z zastosowaniem biomarkerów.

- 5 **[0006]** Klasyfikacja molekularna raka sutka do decyzji terapeutycznych składa się głównie z oceny statusu wyrażania receptora estrogenowego (ER), receptora progesteronowego (PR), oraz ludzkiego receptora czynnika wzrostu naskórka 2 (HER2). Oznacza to, że globalnie można wyróżnić trzy typy raka sutka: (1) tkankę raka sutka z ekspresją receptora hormonalnego (ER lub PR) bez nadekspresji HER2, (2) tkankę raka sutka z nadekspresją HER2, z lub bez ekspresji receptora hormonalnego (HR), i (3) tkankę raka sutka, która nie ma istotnej z terapeutycznego punktu widzenia ekspresji receptora hormonalnego lub receptora HER2, tak zwanego potrójnie ujemnego raka sutka (TNBC).
- 10 **[0007]** Pacjenci z rakiem sutka z dodatnim statusem ekspresji receptora hormonalnego (HR) w tkance nowotworowej (ok. 60 - 70 % wszystkich pacjentów z rakiem sutka) mają lepsze rokowanie niż ci bez lub ze statusem minimalnej ekspresji receptora hormonalnego. W przeciwieństwie do tego, pacjenci, których nowotwór ma status dodatni IHC 3+ lub IHC 2+/FISH (hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ*), (występujący w około 20 % wszystkich przypadków raka sutka) mają gorsze rokowanie w porównaniu z pacjentami z rakiem sutka, których nowotwór ma niższą klasę błonowej ekspresji HER2 lub FISH-ujemne tempo amplifikacji. Teraz, gdy pacjenci z tkanką raka sutka dodatnią wobec receptora hormonalnego i z nadekspresją HER2 mają możliwość korzystania z terapii ukierunkowanej, najgorszą diagnozę oznacza potrójnie ujemny rak sutka, ponieważ dla tych pacjentów, których nowotwór jest ER-, PR- i HER2-ujemny, dostępna jest jedynie chemioterapia o ograniczonej skuteczności.
- 15 **[0008]** Herceptin™ (trastuzumab), rekombinowane, humanizowane monoklonalne przeciwciało IgG1 przeciwko HER2, został dopuszczony w USA przez FDA w 1998 do wspomagającego leczenia raka sutka z nadekspresją HER2 oraz do leczenia metastatycznego raka sutka z nadekspresją HER2 i raka żołądka, tj. HER2 IHC 3+ lub HER2 IHC 2+/FISH dodatniego. Lek został dopuszczony w Europie przez EMA w 2000 roku.
- 20 **[0009]** Badania kliniczne na pacjentach mających metastatyczny rak sutka wykazały, że klinicznie istotna skuteczność leczenia trastuzumabem istnieje jedynie, jeżeli pacjent ma nowotwór z nadekspresją HER2 IHC lub FISH-dodatnią amplifikacją genu. Z tego powodu, obecne algorytmy testowania HER2 są ukierunkowane na identyfikację tych pacjentów, którzy najprawdopodobniej osiągną znaczące korzyści z ukierunkowania na HER2. Podczas gdy błonowa ekspresja HER2 jest biologicznie kontinuum od niskiej do wysokiej nadekspresji, zatwierdzone testy IHC, takie jak HercepTest™ (Dako, Glostrup, Denmark), kategoryzują status HER2 na półilościowej skali w zakresie od 0 do 3+. Wynik IHC równy 3+ przypisywany jest, jeżeli jest silne obwodowe wybarwienie błony w > 10 % komórek rakowych. FISH-dodatnia amplifikacja genu przypisywana jest, jeżeli tempo amplifikacji w stosunku do centromeru wynosi  $\geq 2,0$ . Identyfikuje to pacjentów, którzy mogą mieć korzyść z leczenia trastuzumabem lub innymi czynnikami ukierunkowanymi na HER2. Przegląd 6556 raków sutka ujawnił, że około 92 % raków z wynikiem HER2 równym 3+ miało FISH-dodatnią amplifikację genu. Odwrotnie, w rakach z wynikami równymi 2+ (23,3 %), 1+ (7,4 %), oraz 0 (4,1 %) zaobserwowano niższe tempo amplifikacji HER2. Obecny algorytm wymaga testowania FISH raków z wynikiem IHC HER2 równym 2+, przy amplifikacji HER2 jako ustalonego predyktora odpowiedzi na czynniki ukierunkowane na HER2.
- 25 **[0010]** Ado-trastuzumab-emtanzyna lub trastuzumab-emtanzyna (Kadcyla™, T-DM1) jest ADC, w którym trastuzumab jest skoniugowany z cytotoksycznym czynnikiem anty-tubulinowym DM1 - majtanzyną. T-DM1 ma aktywność przeciwnowotworową w modelach heteroprzeszczepów nowotworowych, które nie
- 30
- 35
- 40

odpowiadają na terapię trastuzumabem jako pojedynczym czynnikiem. W Fazie 3 badania klinicznego EMILIA, pacjenci z HER2-dodatnim zaawansowanym rakiem sutka, wcześniej leczeni trastuzumabem i taksanem, zostali losowo przydzieleni do otrzymywania T-DM1 lub lapatynibu plus kapecytabiny. Leczenie T-DM1 sprawiło, że istotnie wydłużył się wolny od progresji i całkowity czas przeżycia w porównaniu do  
5 leczenia grupy kontrolnej.

**[0011]** Kadcyła™ (T-DM1) została dopuszczona w USA przez FDA w lutym 2013 roku do leczenia pacjentów z HER2-dodatnim metastatycznym rakiem sutka, którzy otrzymali wcześniejsze leczenie trastuzumabem i taksanem. Lek został dopuszczony w Japonii przez MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare) we wrześniu 2013 roku i w Europie przez EMA w listopadzie 2013 roku. Obecnie zatwierdzony  
10 schemat obejmuje dawkowanie 3,6 mg / kg masy ciała dożylnie co trzy tygodnie. Dawka 2,4 mg / kg masy ciała iv co tydzień jest badana w trwającym badaniu Fazy II z kombinacją T-DM1 i kapacytabiny do 2-giej linii leczenia pacjentów z rakiem sutka lub rakiem żołądka, oraz w trwającym badaniu Fazy III do zbadania T-DM1 wobec taksanu jako 2-giej linii leczenia pacjentów z rakiem żołądka. Trwa również badanie Fazy III dla kombinacji T-DM1 z pertuzumabem do leczenia pacjentów z HER2-dodatnim, miejscowo zaawansowanym  
15 lub metastatycznym rakiem sutka.

**[0012]** Pomimo poprawy jakiej dostarczyło wprowadzenie do praktyki klinicznej T-DM1 zamiast trastuzumabu w leczeniu metastatycznego raka sutka HER2-dodatniego, zastosowanie T-DM1 związane jest z kilkoma poważnymi skutkami ubocznymi, z których najważniejsze to trombocytopenia, hepatotoksyczność i neuropatia (nieodwracalne zniszczenie aksonów). Ponadto, ani trastuzumab ani T-DM1 nie mają zezwolenia  
20 do leczenia ludzkich nowotworów litych i nowotworów układu krwiotwórczego z umiarkowaną lub niską ekspresją HER2, tj. IHC 2+ lub 1+ i / lub FISH ujemnym statusem amplifikacji HER2 w tkance nowotworowej.

**[0013]** Analogicznie do raka sutka ekspresja HER2 wskazuje na złe rokowanie dla pacjentów z rakiem jajników (A. Berchuck et al., 1990, Cancer Res., 50, 4087-4091; H. Meden i W. Kuhn, 1997, Eur. J. Obstet. & Gynecol. Reprod. Biol., 71, 173-1.79). Komórki SKOV3 pochodzą z płynu puchlinowego pacjentów z gruczolakorakiem jajników. Ta linia komórkowa wykazuje nadekspresję HER2 i często stosowana jest do *in vitro* i *in vivo* rozpoznawczego badania czynników ukierunkowanych na HER2. Trastuzumab i pertuzumab wykazują w tej linii komórkowej kilka efektów przeciwnowotworowych (N. Gaborit et al., 2011, J. Biol. Chem., 286, 13, 11337-11345). Monoterapia przeciwciałami anti-HER2 trastuzumabem i pertuzumabem do tej pory miała skromną skuteczność (G.M. Mantia-Smaldone et al., 2011, Cancer Management Res. 3, 25-38; S.P. Langdon et al., 2010, Expert Opin. Biol. Ther. 10:7, 1113-1120). Efekt przeciwnowotworowy jest znacznie zwiększony, jeżeli przeciwciało ukierunkowane na HER2 jest w kombinacji z chemioterapią (S. Makhija et al., 2010, J. Clin. Oncol., 28:7, 1215-1223; I. Ray-Coquard et al., 2008, Clin. Ovarian Cancer, 1:1, 54-59).

**[0014]** Dodatkowo, istnieje duże zapotrzebowanie medyczne na leczenie późnego stadium choroby nowotworowej pęcherza. Chemioterapia np. kombinacja cisplatyny i gemcytabiny do leczenia  
35 zaawansowanego lub metastatycznego raka pęcherza ma ograniczoną skuteczność, ponieważ średnio wywołuje odsetek odpowiedzi poniżej 50 %, podczas gdy całkowity czas przeżycia pacjentów wynosi 6 do 12 miesięcy. W przypadku oporności na chemioterapię w ogóle nie ma opcji terapii standardowej. Dodatność HER2 została istotnie powiązana ze zmniejszonymi odsetkami całkowitej odpowiedzi (50 % wobec 81, p=0,026) po chemioradiacji (A. Chakravarti et al., 2005, Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 62:2, 309-317). Dodatek trastuzumabu do schematu paklitakselu i karboplatyny jako pierwsza linia terapii HER2-dodatniego zaawansowanego raka pęcherza wykazał odsetek całkowitej odpowiedzi wynoszący 70 %  
40 i całkowity czas przeżycia wynoszący 14,1 miesięcy w badaniu Fazy II (M.H.A. Hussain et al., 2007, J. Clin.

Oncol., 25:16, 2218-24). W zastosowaniu kazuistycznym pacjent z nawrotem nowotworu po standardowej chemioterapii odpowiedział na kombinację trastuzumabu, paklitakselu i karboplatyny (D. Amsellem-Ouazana et al., 2004, Ann. Oncol., 15, 3, 538).

5 **[0015]** W przypadku inwazyjnego niedrobnokomórkowego gruczolaka płuc mutacja i amplifikacja HER2 są powiązane z niekorzystnym skutkiem (M. Suzuki et al., 2014, Lung Cancer, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungca.2014.10.014>). U pacjentów z rakiem płuc z mutacją HER2 można wprowadzić poziom kontroli choroby wynoszący 93 % terapiami opartymi na trastuzumabie (J. Mazieres et al., 2013, J. Clin. Oncol., 31:16, 1997-2004). Chemo-oporność raka płuc jest często związana ze zwiększoną ekspresją HER2 (C.-M. Tsai et al., 1993, J. Natl. Cancer Inst., 85:11, 897-901; Z. Calikusu et al., 2009, J. Exp. Clin. Cancer Res., 28:97), a oporność na inhibitory kinazy tyrozynowej jest skorelowana ze zwiększoną amplifikacją HER2 (K. Takezawa et al., 2012, Cancer Discov. 2(10), 922-33).

15 **[0016]** Pacjenci z wczesnym lub zaawansowanym rakiem prostaty otrzymują głównie terapię ukierunkowaną na receptor androgenowy. W funkcjach sygnalingowych receptora androgenowego i HER2 istnieje wymiana sygnałów pomiędzy receptorami (F.-N. Hsu et al., 2011, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 300:E902-E908; L. Chen et al., 2011, Clin. Cancer Res., 17(19), 6218-28). Aktywacja HER2 hamuje ekspresję receptora androgenowego (C. Cai et al., 2009, Cancer Res., 69(12), 5202-5209), zwiększona ekspresja HER2 jest związana z progresją PSA, szybką proliferacją i złym rokowaniem.

20 **[0017]** (S. Minner et al., 2010, Clin. Cancer Res., 16(5), 1553-60; S.F. Shariat et al., 2007, Clin. Cancer Res., 13(18), 5377-84). Zwiększona ekspresja HER2 wydaje się być zaangażowana w progresję niezależności androgenowej w około jednej czwartej przypadków raka prostaty (J.M.S. Bartlett et al., 2005, J. Pathol., 205, 522-529).

25 **[0018]** Rak trzustki znajduje się wśród najbardziej śmiertelnych ludzkich nowotworów litych ze względu na swój zdradliwy początek i oporność na terapię. Gemcytabina lub kombinacja 5-FU, leukoworyny, irinotekanu, oraz oksaliplatyny może pomóc wydłużyć życie pacjentów z zaawansowaną chorobą (H. Burris and A.M. Storniolo, 1997, Eur. J. Cancer 33(1):S18-S22; T. Conroy et al., 2011, N. Engl. J. Med. 364(19): 1817-25). Ostatnio doniesiono, że ekspresja HER2 jest również rozpowszechniona wśród raka trzustki z równym 10 % udziałem oznaczonym jako HER2 2+ i 3+. Na podstawie tego faktu leczenie ukierunkowane na HER2 obejmujące trastuzumab uważa się za opłacalną opcję w tej populacji pacjentów na podstawie efektów zaobserwowanych w modelach przedklinicznych [C. Larbouret et al., 2012, Neoplasia 14(2), 121-130].

30 **[0019]** Stosując zatwierdzone sposoby barwienia i punktacji zaobserwowano nadekspresję HER2 u około 6 % pacjentów z rakiem jelita grubego (CRC) (A.N. Seo et al., 2014, PLoS ONE, 9(5): e98528). Na tej podstawie, w tym podzbiorze pacjentów CRC, skuteczne może być leczenie ukierunkowane na HER2. W dwóch badaniach klinicznych zbadano korzyść skojarzonej terapii zawierającej trastuzumab w zaawansowanym i metastatycznym CRC i zaobserwowano w tych badaniach odpowiedzi kliniczne dostarczające dowodu skuteczności leczenia (R.K. Ramanathan et al., 2004, Cancer Invest. 22(6): 858-865; J. Clark et al., 2003, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 22: abstr 3584). Ponadto, jedno z badań zasugerowało włączenie terapii trastuzumabem jako części schematu leczenia (przeciwciała monoklonalne anty-EGFR) dla pacjentów z opornym na cetuksymab CRC (A. Bertotti et al., 2011, Cancer Discov. 1(6): 508-523).

40 **[0020]** Leczenie zaawansowanego raka lub nowotworu płaskonabłonkowego narządów głowy i szyi (HNSCC) składa się z terapii o wielu sposobach leczenia z zastosowaniem operacji chirurgicznej, naświetlania i chemioterapii. Beckhardt et al. donieśli o wysokiej nadekspresji HER2 w 16 % próbek linii komórkowej, oraz umiarkowanej i niskiej ekspresji HER2 w odpowiednio 31 % i 35 % próbek (R.N.

Beckhardt et al., 1995, Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 121:1265-1270). Pokazuje to potencjał terapeutyczny leczenia trastuzumabem w HNSCC.

5 [0021] W 1999 roku, Gorlick et al. donieśli o nadekspresji HER2 w 20 z 47 próbek kostniakomięsaka i wykazali, że pacjenci ci wykazywali słabą odpowiedź na terapię oraz zmniejszony odsetek przeżywalności w porównaniu z pacjentami, których nowotwory nie wykazywały nadekspresji tego antygenu (R. Gorlick et al., 1999, J. Clin. Oncol. 17:2781-8). Stąd, HER2 wyłonił się jako obiecujący kandydat do ukierunkowanej terapii biologicznej w tym wskazaniu. Niedawne odkrycia z badania klinicznego z zastosowaniem trastuzumabu wskazują, że leczenie anty-HER2 można bezpiecznie dostarczyć w kombinacji z chemioterapią opartą na antracyclinie i deksarazoksanem (D. Ebb et al., 2012, J. Clin. Oncol. 30(20), 2545-2551).

10 [0022] Ponadto, nadekspresję HER2 obserwuje się u około jednej trzeciej pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL), jeszcze częściej w obecności translokacji Philadelphia. Zahamowanie HER2 indukuje apoptozę komórek białaczki *in vitro* (M.E. Irwin et al., 2013, PLoS ONE, 8:8, e70608). W badaniu Fazy II wykazano, że leczenie trastuzumabem dorosłych pacjentów z oporną lub nawracającą B-ALL z nadekspresją HER2 w złośliwych komórkach B spowodowało całkowity odsetek odpowiedzi równy 13 %, co pokazuje odpowiedź tej choroby na czynnik ukierunkowany na HER2 (P. Chevalier et al., Blood, 2012, DOI 10.1182/blood-2011-11-390781).

15 [0023] Stąd, istnieje zapotrzebowanie na nowe terapie ukierunkowane na HER2, głównie do leczenia pacjentów z nowotworami i nowotworami złośliwymi, które mają (i) umiarkowany lub niski status IHC, i/lub (ii) status FISH-ujemny, i/lub (iii) ujemny status receptora hormonalnego (HR) w tkance nowotworowej. W szczególności, potrzebne są nowe dopuszczone terapie regulatorowe do ukierunkowanego leczenia potrójnie ujemnego raka sutka (TNBC).

#### KRÓTKI OPIS NINIEJSZEGO WYNAŁAZKU

25 [0024] Niniejszy wynalazek dotyczy zawierających duokarmylinę koniugatów (ADC) przeciwciało-lek do stosowania w leczeniu ludzkich nowotworów litych wyrażających HER2, przy czym ludzkim nowotworem litym jest HER2 IHC 2+ lub 1+, w szczególności raka sutka, raka żołądka, raka pęcherza, raka jajnika, raka płuc, raka prostaty, raka trzustki, raka jelita grubego, raka płaskonabłonkowego narządów głowy i szyi, kostniakomięsaka oraz ostrej białaczki limfoblastycznej.

30

#### KRÓTKI OPIS RYSUNKÓW

##### [0025]

35 Figura 1. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu PDX MAXF-1162 (rak sutka, gruczolakorak, HER2 IHC 3+, HER2 FISH-dodatni) (CRO: Oncotest).

Figura 2. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu PDX HBCx-34 (rak sutka, inwazyjny rak przewodowy, HER2 IHC 2+, HER2 FISH-ujemny, ER- i PR-dodatni) (CRO: XenTech).

40 Figura 3 Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu PDX MAXF 449 (rak sutka, inwazyjny rak przewodowy, HER2 IHC 1+, HER2 FISH-ujemny, ER- i PR-ujemny, tj. potrójnie ujemny rak sutka) (CRO: Oncotest).

Figura 4. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu PDX HBCx-10 (rak sutka, gruczolakorak przewodowy, HER2 IHC 1+, HER2 FISH-ujemny, ER- i PR-ujemny, tj. potrójnie ujemny rak sutka) (CRO: XenTech).

Figura 5. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu MAXF-MX1 PDX (rak sutka, inwazyjny rak przewodowy, HER2 IHC 1+, HER2 FISH-ujemny, ER- i PR-ujemny, tj. potrójnie ujemny rak sutka) (CRO: Oncotest).

Figura 6. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu PDX ST313 (rak sutka, HER2 IHC 2+, HER2 FISH-ujemny, ER i PR dodatni) (CRO: Start).

Figura 7. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu PDX GXA3057 (rak żołądka, HER2 IHC 1+, HER2 FISH-ujemny) (CRO: Oncotest).

Figura 8. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu PDX GXA3067 (rak żołądka, HER2 IHC 2+, HER2 FISH-dodatni) (CRO: Oncotest).

Figura 9. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu PDX GXA3054 (rak żołądka, HER2 IHC 3+, HER2 FISH-dodatni) (CRO: Oncotest).

Figura 10. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 porównana do T-DM1 w modelu PYX GXA3038 (rak żołądka, HER2 IHC 2+, HER2 FISH-ujemny) (CRO: Oncotest).

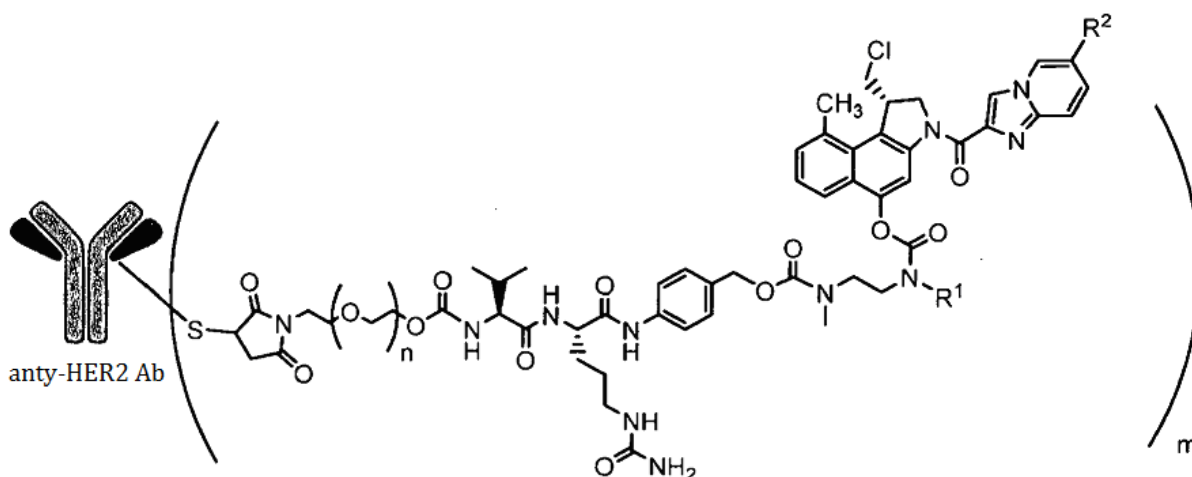
Figura 11. Aktywność przeciwnowotworowa SYD985 w modelu BXF439 PDX (rak pęcherza, HER2 IHC 3+, HER2 FISH-dodatni) (CRO: Oncotest).

Figura 12. Aktywność przeciwnowotworowa SYD983 w modelu heteroprzeszczepu pochodzącego z linii komórkowej SKOV3 (rak jajników, HER2 IHC 2+, HER2 FISH-dodatni) (CRO: Piedmont).

## SZCZEGÓŁOWY OPIS NINIEJSZEGO WYNAŁAZKU

**[0026]** Niniejszy wynalazek dotyczy ADC zawierających duokarmycynę do stosowania w leczeniu ludzkich nowotworów litych wyrażających HER2, przy czym ludzki nowotwór lity jest HER2 IHC 2+ lub 1+.

**[0027]** W jednym wykonaniu niniejszy wynalazek dostarcza związku o wzorze (I)



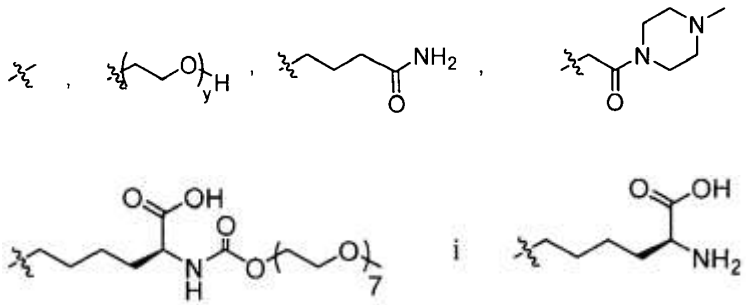
w którym

anty-HER2 Ab oznacza przeciwciało anti-HER2 lub fragment przeciwciała,

n wynosi 0-3, korzystnie 0-1,

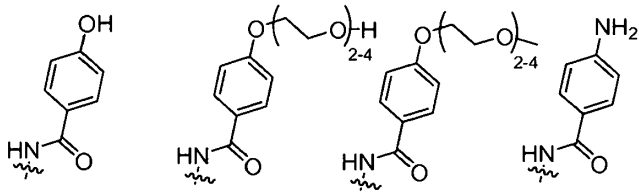
m reprezentuje średni SLP (stosunek lek-do-przeciwciała) od 1 do 4,

R<sup>1</sup> jest wybrany spośród



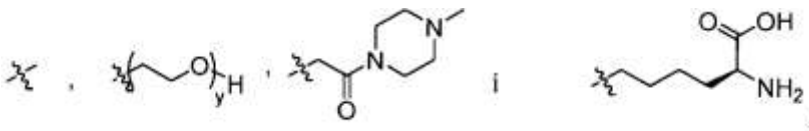
y wynosi 1-16, a

R<sup>2</sup> jest wybrany spośród

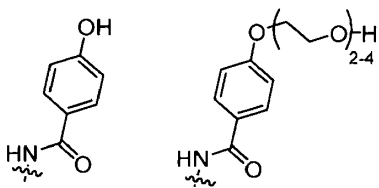


do zastosowania w leczeniu ludzkich nowotworów litych wyrażających HER2, przy czym ludzki nowotwór lity jest HER2 IHC 2+ lub 1+.

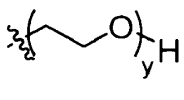
15 **[0028]** W innym wykonaniu niniejszy wynalazek dotyczy związku o wzorze (I), w którym przeciwciałem anti-HER2 jest przeciwciało anti-HER2 lub fragment przeciwciała, n wynosi 0-1, m reprezentuje średni SLP od 1 do 4, korzystnie od 2 do 3, R<sup>1</sup> wybrany jest spośród



y wynosi 1-16, korzystnie 1-4, a R<sup>2</sup> jest wybrany spośród

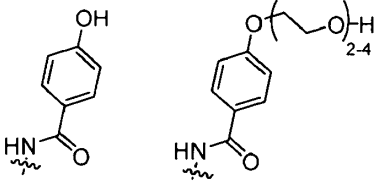


25 **[0029]** W kolejnym wykonaniu niniejszy wynalazek dotyczy związku o wzorze (I), w którym przeciwciałem anti-HER2 jest przeciwciało monoklonalne anti-HER2, n wynosi 0-1, m reprezentuje średni SLP od 2 do 3, korzystnie od 2,5 do 2,9, R<sup>1</sup> jest wybrany z

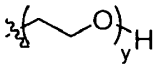


y wynosi 1-4, a R<sup>2</sup> jest wybrany spośród



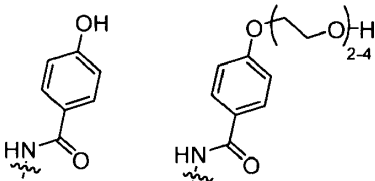


5 **[0030]** W jeszcze innym wykonaniu niniejszy wynalazek dotyczy związku o wzorze (I), w którym przeciwciałem anti-HER2 jest trastuzumab lub jego biodopowiednik, n wynosi 0-1, m reprezentuje średni SLP od 2 do 3, korzystnie 2,5 do 2,9, R<sup>1</sup> jest wybrany z



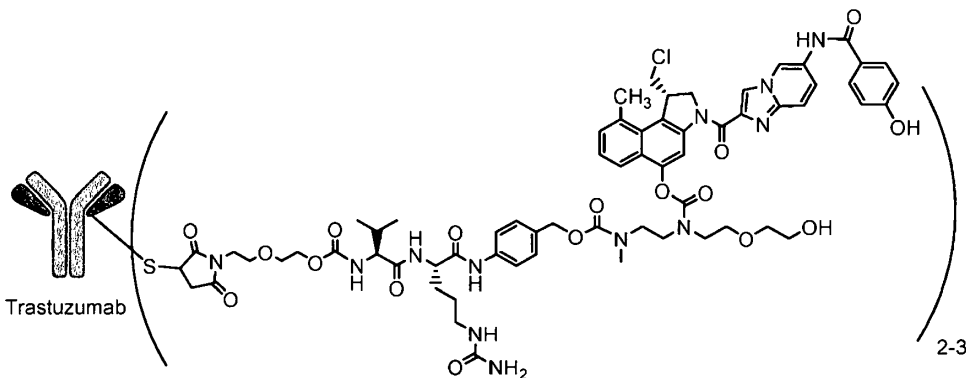
y wynosi 1-4, a R<sup>2</sup> jest wybrany spośród

10



15 **[0031]** W korzystnym wykonaniu niniejszy wynalazek dotyczy związku o wzorze (II), zawierającego trastuzumab lub jego biodopowiednik

15



**[0032]** Związek o wzorze (II) nazywany w niniejszym opisie SYD985 ma średni SLP od 2,6 do 2,9. SYD983 o wzorze (II) ma średni SLP równy 2,0.

20 **[0033]** We wzorze strukturalnym przedstawionym w niniejszym opisie, n reprezentuje liczbę całkowitą od 0 do 3, podczas gdy m reprezentuje średni stosunek lek-do-przeciwciała (SLP) od 1 do 4. Jak dobrze wiadomo z dziedziny, SLP i rozkład obciążania lekiem można oznaczyć, na przykład, z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIC) lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconej fazie (RP-HPLC). HIC jest szczególnie odpowiednia do oznaczania średniego SLP.

25 **[0034]** Przykładami ludzkich nowotworów litych, które można leczyć według niniejszego wynalazku, są rak sutka, rak żołądka, rak pęcherza, rak jajnika, rak płuc, rak prostaty, rak trzustki, rak jelita grubego, rak płaskonabłonkowy narządów głowy i szyi, oraz kostniakomięsak, szczególnie rak sutka, rak żołądka, rak

pęcherza, rak jajnika, rak płuc i rak prostaty, bardziej szczegółowo rak żołądka i rak pęcherza (patrz także S. Scholl et al., 2001, Ann. Oncol., 12(1): S81-S87). Przykładem nowotworu układu krwiotwórczego, którego nie leczy się według niniejszego wynalazku, jest ostra białaczka limfoblastyczna (ALL). Zakres niniejszego wynalazku nie jest jednak ograniczony do tych konkretnych przykładów.

5 **[0035]** W jednym wykonaniu niniejszy wynalazek dostarcza związek o wzorze (I) lub (II) do zastosowania w leczeniu raka sutka, raka żołądka lub raka pęcherza, szczególnie raka sutka lub raka żołądka, bardziej szczególnie raka sutka. Ten rak sutka albo jest dodatni albo ujemny względem receptora hormonalnego (ER i/lub PR), korzystnie ER- i PR-ujemny.

10 **[0036]** Niniejszy wynalazek dostarcza związek o wzorze (I) lub (II) do zastosowania w leczeniu ludzkich nowotworów litych wykazujących umiarkowaną lub niską ekspresję HER2 (tj. HER2 IHC 2+ lub 1+).

**[0037]** W innym wykonaniu niniejszy wynalazek dostarcza związek o wzorze (I) lub (II) do zastosowania w leczeniu ludzkich nowotworów litych bez amplifikacji genu HER2 (tj. HER2 FISH-ujemnych).

15 **[0038]** Nieoczekiwanie niniejsi twórcy stwierdzili, że związki ADC zawierające duokarmycynę według niniejszego wynalazku można stosować w szczególności do leczenia ludzkich nowotworów litych, zwłaszcza raka sutka i raka żołądka, z umiarkowaną lub niską ekspresją HER2 (tj. HER2 IHC 2+ lub 1+) i prawdopodobnie bez amplifikacji genu HER2 (tj. HER2 FISH-ujemnych). Ani trastuzumab ani T-DM1 nie otrzymały dopuszczenia do obrotu do leczenia pacjentów mających takie nowotwory. Ponadto, jak pokazano tu w poniższych Przykładach i na Figurach, T-DM1 pozbawiony jest skuteczności wobec takich nowotworów. Stąd związki ADC zawierające duokarmycynę według niniejszego wynalazku można stosować do leczenia  
20 grup pacjentów, dla których nie jest dostępna żadna obecna terapia ukierunkowana na HER2. Związki ADC zawierające duokarmycynę, które badano na myszach niosących heteroprzeszczep N87 (tj. HER2 IHC 3+ nowotwór żołądka) w Przykładzie 15 z WO2011/133039A, faktycznie wykazały skuteczność po pojedynczej dożylniej dawce 12 mg / kg. Jednakże, w tym dokumencie nie ma nic, co sugerowałoby specjalistę w dziedzinie zbadanie – nie mówiąc już o spodziewaniu się stwierdzenia skuteczności – nowotworów w  
25 niższym stopniu wyrażających HER2 (tj. HER2 IHC 2+ lub 1+) i/lub bez amplifikacji genu HER2 (tj. HER2 FISH-ujemnych), już przy dawce 3 mg / kg.

**[0039]** Nieoczekiwanie niniejsi twórcy stwierdzili ponadto, że związki ADC zawierające duokarmycynę o wzorze (I) lub (II) wykazują poprawioną aktywność przeciwnowotworową *in vivo* w zwierzęcych modelach nowotworowych w porównaniu do T-DM1 (patrz Przykłady i Figury) i trastuzumabu, gdy są podawane w tej  
30 samej dawce. W szczególności stwierdzono, że poprawa była największa w modelach nowotworowych z najniższym stopniem ekspresji HER2 (tj. HER2 IHC 1+), szczególnie w przypadku (potrójnie ujemnego) raka sutka i raka żołądka.

**[0040]** W korzystnym wykonaniu niniejszego wynalazku ludzkim nowotworem litym jest rak sutka lub rak żołądka wykazujący umiarkowaną lub niską ekspresję HER2 (tj. HER2 IHC 2+ lub 1+) bez amplifikacji genu  
35 HER2 (tj. HER2 FISH-ujemny).

**[0041]** W szczególnie korzystnym wykonaniu według niniejszego wynalazku ludzkim litym nowotworem jest potrójnie ujemny rak sutka (tj. HER2 IHC 2+ lub 1+, HER2 FISH-ujemny, oraz ER- i PR-ujemny).

40 **[0042]** Zazwyczaj, aktywność przeciwnowotworową ocenia się najpierw w (ludzkich) liniach komórek nowotworowych *in vitro*, a następnie ocenia się ją *in vivo*. Aktywność przeciwnowotworowa ADC znajdująca się w zakresie niniejszego wynalazku jest korzystnie oceniana w modelach zwierzęcych, zazwyczaj myszach z niedoborem odporności niosących podskórny heteroprzeszczep. Heteroprzeszczep może być albo (ludzką) linią komórek nowotworowych albo nowotworem (pierwotnym) pochodzącym od pacjenta.

Korzystnie, modelem zwierzęcym jest model heteroprzeszczepu nowotworu pochodzącego od pacjenta (PDX).

**[0043]** Ludzkie nowotwory w modelach PDX, jak oceniono za pomocą badania mikroskopowego, zachowują właściwości biologiczne oryginalnych nowotworów. Modele PDX są obecnie rutynowo stosowane w wielu instytucjach akademickich, a także są sprzedawane komercyjnie przez wiele Kontraktowych Organizacji Badawczych (ang. *Contract Research Organizations* (CRO)) w tym Jackson Lab (USA), Oncotest (Niemcy), Molecular Response (USA), Charles River (USA), Oncodesign (Francja), XenTech (Francja), Champions Oncology (USA), oraz Start (USA). Wiele modeli wykazało zachowanie w heteroprzeszczepie charakterystycznych cech morfologicznych i immunohistochemicznych oryginalnego ludzkiego nowotworu. Poza bliskim związkiem w odniesieniu do właściwości biologicznych, modele PDX mają bardzo dobrą wartość predykcyjną dla klinicznego wyniku terapeutycznego. Ogólnie, możnaby stwierdzić, że doniesienia z różnych źródeł wskazują co najmniej 90 % poprawne odtworzenie odpowiedzi na terapię w PDX w porównaniu do tej u pacjenta, zarówno pod względem wrażliwości jak i oporności nowotworu na terapię (Website Champions Oncology, <http://www.championsoncology.com/translational-oncology-solutions/predictive-value>; Fiebig et al., 1984, Behring Inst. Mitt. 74:343-352; Hidalgo et al., 2011, Mol. Cancer Ther. 10:1311-1316).

**[0044]** Według niniejszego wynalazku przeciwciało anti-HER2 lub fragment przeciwciała może być dowolnym przeciwciałem lub fragmentem przeciwciała zdolnym do wiązania HER2, np. przeciwciałem IgG1 mającym regiony determinujące komplementarność (CDR) trastuzumabu lub przeciwciałem, które wykazuje kompetytywne wiązanie z trastuzumabem. Korzystnym przeciwciałem jest przeciwciało monoklonalne anti-HER2. Szczególnie korzystnym przeciwciałem jest trastuzumab lub jego biodopowiednik.

**[0045]** Związki koniugatu przeciwciało-lek (ADC) o wzorze (I) i (II) zgodnie z niniejszym wynalazkiem mają łącznik-lek skoniugowany z przeciwciałem przez atom S reszty cysteinowej, tj. są połączonymi cysteiną koniugatami przeciwciało-lek. Reszta cysteinowa może być albo naturalną resztą cysteinową, która występuje w łańcuchu ciężkim i/lub lekkim przeciwciała (Ab) i tworzy wewnątrzłańcuchowe wiązania disulfidowe, albo zaprojektowaną inżynierijsko resztą cysteinową, którą wprowadza się do Ab w jednej lub więcej odpowiednich pozycji w łańcuchu ciężkim i/lub lekkim. Niniejszy wynalazek jest szczególnie skierowany do związków ADC, w których łącznik-lek jest skoniugowany przez wewnątrzłańcuchowe wiązania disulfidowe Ab, bardziej konkretnie monoklonalne Ab (mAb). Przeciwciała różnych klas zawierają różne ilości wewnątrzłańcuchowych wiązań disulfidowych. Na przykład, przeciwciała IgG1 typowo mają cztery wewnątrzłańcuchowe wiązania disulfidowe, wszystkie cztery zlokalizowane w regionie zawiasowym, a po (częściowej) redukcji wiązań disulfidowych łącznik-lek jest losowo przyłączany do wolnych grup tiolowych.

**[0046]** Związki o wzorze (I) i (II) do stosowania według niniejszego wynalazku można otrzymać zgodnie ze sposobami i procedurami, które są dobrze znane specjalistom w tej dziedzinie. Koniugacja przez wewnątrzłańcuchowe mostki disulfidowe może wystąpić po częściowej redukcji tych mostków disulfidowych. Odpowiednie sposoby do wytwarzania takich związków można znaleźć w opisie i przykładach WO2011/133039A Zgłaszającego. W szczególności, w przykładzie 15 z WO2011/133039A opisano częściową redukcję trastuzumabu z wytworzeniem 2 wolnych grup tiolowych na mAb oraz koniugację kilku łączników-leków z ADC mającymi średni SLP wynoszący ok. 2. Specjaliści w tej dziedzinie łatwo zrozumieją, jak otrzymać ADC mające średni SLP wynoszący od 1 do 4. W przykładach 7 i 8 z WO2005/084390A opisano strategię częściowej redukcji, częściowej redukcji/częściowego ponownego utleniania, oraz całkowitej redukcji do (częściowego) załadunku przeciwciał łącznikiem-lekiem vcMMAE.

**[0047]** IHC i status FISH tkanki nowotworowej określane są z zastosowaniem znanych testów, procedur i wyposażenia. Według niniejszego wynalazku amplifikację genu HER2 można zmierzyć z zastosowaniem fluorescencyjnego (FISH) lub chromogenicznego (CISH) lub dowolnego innego testu hybrydyzacji *in situ*. Do określania statusu błonowej ekspresji HER2 tkanki nowotworowej są dostępne komercyjnie odpowiednie testy, takie jak HercepTest™ (Dako Denmark). Ponadto testy HER2 IHC są sprzedawane przez Ventana Medical Systems (PATHWAY anty-HER2/neu), Biogenex Laboratories (InSite™ HER2/neu) i Leica Biosystems (Bond Oracle™ HER2 IHC). Testy FISH/CISH można otrzymać od Abbott Molecular (PathVysion HER2 DNA Probe Kit), Life Technologies (SPOT-Light® HER2 CISH Kit), Dako Denmark (HER2 CISH PharmDx™ Kit), Dako Denmark (HER2 FISH PharmDx™ Kit), i Ventana Medical Systems (INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail). FISH-dodatni oznacza stosunek amplifikacji FISH  $\geq 2,0$  (np. z zastosowaniem zestawu testowego Dako HER2 FISH PharmDX™). FISH-ujemny oznacza stosunek amplifikacji FISH  $< 2,0$ .

**[0048]** Nowotworami wyrażającymi HER2 - HER2 IHC 2+ lub 1+, które można korzystnie leczyć według niniejszego wynalazku, są rak sutka i rak żołądka, szczególnie rak sutka, bardziej szczegółowo potrójnie ujemny rak sutka. Nieoczekiwanie niniejsi twórcy stwierdzili, że związki ADC według niniejszego wynalazku były szczególnie skuteczne w modelach PDX raka sutka, które są HER2 IHC 2+ lub 1+ i FISH-ujemne, w modelach PDX potrójnie ujemnego raka sutka, oraz w modelach PDX raka żołądka, które są HER2 IHC 2+ lub 1+ i FISH-ujemne, jak pokazano w poniższych Przykładach i na Figurach. W świetle faktu, że modele PDX mają bardzo dobrą wartość predykcyjną dla klinicznego wyniku terapeutycznego, te odkrycia konkretnie oferują nową opcję leczenia ukierunkowanego na HER2 do leczenia raka sutka i raka żołądka, dla których nie ma obecnie dostępnej żadnej zatwierdzonej opcji leczenia.

**[0049]** Niniejszy wynalazek dotyczy również związku o wzorze (I) lub (II) do leczenia pacjentów mających ludzkie nowotwory lite wyrażające HER2, które są HER2 IHC 2+ lub 1+, oraz które są prawdopodobnie HER2 FISH-ujemne, jak opisano powyżej w niniejszym dokumencie.

**[0050]** Niniejszy wynalazek dotyczy ponadto zastosowania kombinacji związku o wzorze (I) lub (II) z przeciwciałem terapeutycznym i / lub środkiem chemioterapeutycznym do leczenia ludzkich nowotworów litych wyrażających HER2, które są HER2 IHC 2+ lub 1+, najbardziej korzystnie do leczenia potrójnie ujemnego raka sutka.

**[0051]** W jednym wykonaniu niniejszego wynalazku przeciwciałem terapeutycznym jest pertuzumab, bewacyzumab, ramucirumab lub trastuzumab, a środkiem chemoterapeutycznym jest i) taksan, w szczególności docetaksel, paklitaksel, nab-paklitaksel lub kabazytaksel ii) inhibitor mitotyczny, w szczególności eribulina, winorelbina lub winblastyna, iii) czynnik uszkodzający DNA, w szczególności 5-fluoro-uracyl, kapecytabina, gemcytabina, temozolomid, cisplatyna, karboplatyna, oksaliplatyna, cyklofosfamid lub ifosfamid, iv) anty-fofan, w szczególności pemetreksed lub metotreksat, v) antracyklina korzystnie mitoksantron, doksorubicyna liposomalna doksorubicyna, epirubicyna, daunorubicyna lub walrubicyna, bardziej szczegółowo doksorubicyna, vi) inhibitor mTOR (ssaczy cel rapamycyny) w szczególności temsirolimus lub ewerolimus vii) inhibitory topo-izomerazy, w szczególności irynotekan lub topotekan, viii ) inhibitor kinazy tyrozynowej, w szczególności gefitynib, erlotynib, pazopanib, crizotinib, lapatinib lub afatynib ix), czynnik modulujący receptor androgenowy, w szczególności enzalutamid lub octan abirateronu x) hormon steroidowy, w szczególności prednizon, xi) hormonalny środek leczniczy konkretnie tamoksyfen, xii) lub czynnik hamujący aromatazę lub steroidowy czynnik modyfikujący, w szczególności anastrozol, letrozol, fulwestrant lub eksemestan lub xiii) inhibitor PARP, w szczególności olaparib.

Specjalista w tej dziedzinie nie będzie miał trudności w wyborze odpowiedniej skojarzonej terapii do stosowania w leczeniu ludzkich nowotworów litych i nowotworów układu krwiotwórczego wyrażających receptor HER2.

**[0052]** W innym wykonaniu niniejszego wynalazku przeciwciałem terapeutycznym jest pertuzumab, a środkiem chemoterapeutycznym jest taksan, w szczególności paklitaksel lub docetaksel lub antracyklina, w szczególności doksorubicyna, epirubicyna, daunorubicyna lub walrubicyna, bardziej szczegółowo doksombicyna.

**[0053]** Niniejszy wynalazek dotyczy ponadto zastosowania kombinacji związku o wzorze (I) lub (II) z innym ADC, jak na przykład T-DM1, do leczenia ludzkich nowotworów litych wyrażających HER2, które są HER2 IHC 2+ lub 1+.

**[0054]** Niniejszy wynalazek dotyczy kompozycji farmaceutycznej zawierającej związek o wzorze (I) lub (II) lub kombinacji z przeciwciałem terapeutycznym i / lub jego środkiem chemioterapeutycznym, jak opisano tutaj powyżej, oraz jedną lub więcej dopuszczalnych farmaceutycznie substancji pomocniczych.

**[0055]** Typowe formułacje farmaceutyczne białek terapeutycznych, takich jak przeciwciała monoklonalne oraz koniugatów (monoklonalne) przeciwciała-lek przyjmują postać liofilizowanych proszków lub placków, które wymagają (wodnego) rozpuszczania (tj. rekonstytucji) przed infuzją dożylną lub zamrożonych (wodnych) roztworów, które wymagają rozmrożenia przed użyciem. W szczególności, zgodnie z niniejszym wynalazkiem, kompozycja farmaceutyczna występuje w postaci liofilizowanego placka.

**[0056]** Odpowiednie farmaceutycznie dopuszczalne substancje pomocnicze do włączenia do kompozycji farmaceutycznej (przed suszeniem sublimacyjnym) według niniejszego wynalazku obejmują roztwory buforowe (np. cytrynianowy, histydynowy lub bursztynianowy zawierające sole w wodzie), lioprotektanty (np. sacharozę, trehalozę), modyfikatory toniczności (np. chlorek sodu), surfaktanty (np. polisorbata) i wypełniacze (np. mannitol, glicynę). Substancje pomocnicze stosowane w suszonych sublimacyjnie formułacjach białkowych wybiera się pod kątem ich zdolności do zapobiegania denaturacji białka podczas procesu suszenia sublimacyjnego, jak również podczas przechowywania.

**[0057]** Sterylny liofilizowany proszek wielodawkowej formułacji Herceptin<sup>™</sup> zawiera 440 mg trastuzumabu, 400 mg  $\alpha, \alpha$ -dihydratu trehalozy, 9,9 mg L-histidyny.HCl, 6,4 mg L-histidyny, i 1,8 mg polisorbata 20, USP. Rozpuszczenie w 20 ml bakteriostatycznej lub sterylnej wody do iniekcji (BWFI lub SWFI) daje roztwór wielodawkowy zawierający 21 mg / ml, trastuzumabu o pH około 6. Sterylny liofilizowany proszek formułacji jednorazowego użycia Kadcyła<sup>™</sup> zawiera po rozpuszczeniu 20 mg / ml ado-trastuzumabu emtanzyny, 0,02% wag. / obj. polisorbata 20, 10 mM bursztynianu sodu i 6 % wag. / obj. sacharozę o pH 5,0.

**[0058]** Terapeutycznie skuteczna ilość związku o wzorze (I) lub (II) do zastosowania według niniejszego wynalazku, znajduje się w zakresie od około 0,01 do około 15 mg / kg masy ciała, szczególnie w zakresie od około 0,1 do około 10 mg / kg, bardziej szczegółowo w zakresie od około 0,3 do około 10 mg / kg masy ciała. Ten ostatni zakres odpowiada w przybliżeniu stałej dawce w zakresie od 20 do 800 mg związku ADC. Związek według niniejszego wynalazku podaje się raz w tygodniu, dwa razy w tygodniu, trzy razy w tygodniu lub raz w miesiącu, na przykład raz w tygodniu w ciągu pierwszych 12 tygodni, a następnie co trzy tygodnie, aż do wystąpienia progresji choroby. Alternatywne schematy leczenia mogą być stosowane w zależności od ciężkości choroby, wieku pacjenta, podawanego związku, oraz innych takich czynników, jak zostanie to uznane za właściwe przez lekarza prowadzącego.

## PRZYKŁADY

**Badanie amplifikacji genu HER2 PDX**

5 [0059] Amplifikację genu HER2 określono za pomocą hybrydyzacji *in situ* (ISH) w utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie próbkach ludzkiej tkanki raka sutka z zastosowaniem zatwierdzonych przez FDA testów z Ventana Medical Systems (INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail) lub Abbott Molecular (PathVysion HER2 DNA Probe Kit). Stosowane protokoły były jak wyszczególnione przez dostawców testów.

10 **Barwienie IHC HER2 PDX**

[0060] Przygotowano przekroje tkankowe utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie próbek heteroprzeszczepu nowotworu. HER2 związano z zastosowaniem odpowiedniego Ab, na przykład króliczego przeciwciała poliklonalnego anty-ludzkie HER2 (DAKO, kat# A0485) i wykrywano za pomocą odpowiedniego drugorzędowego Ab, na przykład biotynylowanej koziej anty-króliczej IgG (JacksonImmuno research, kat# 111-065-04 ) i zestawu ABC kit Biozol (kat# VEC-PK-4000). Barwienie oceniano pół ilościowo na odpowiednim mikroskopie, na przykład z zastosowaniem mikroskopu Zeiss Axiovert 35. Barwienie interpretowano jako immunoreaktywność na podstawie liczby wybarwionych komórek nowotworowych, a także kompletności i intensywności barwienia błony.

20 0 : < 10 % komórek nowotworowych wykazuje zabarwienie błonowe.

1 : > 10 % komórek nowotworowych wykazuje zabarwienie błonowe, ale niecałkowite zabarwienie powierzchni.

25 2 : > 10 % komórek nowotworowych wykazuje słabe lub umiarkowane zabarwienie błonowe rozprzestrzenione po całej powierzchni.

3 : > 30 % komórek nowotworowych wykazuje silne zabarwienie błonowe rozprzestrzenione po całej powierzchni.

[0061] Do każdej procedury barwienia HER2 włączono znane HER2 dodatnie (IHC 3+) i HER2 ujemne (IHC 0) preparaty histologiczne z kontrolą nowotworu.

**Badania PDX i pochodzącego z linii komórkowej heteroprzeszczepu na zwierzętach**

[0062] Wszystkie badania na zwierzętach były zatwierdzone przez lokalne komisje etyczne ds. zwierząt i przeprowadzone zgodnie z lokalnymi wytycznymi etycznymi eksperymentów na zwierzętach. Wykorzystano samice myszy nu / nu z niedoborem odporności (w wieku 4-6 tygodni) lub myszy SCID od profesjonalnego hodowcy zwierząt jak Harlan lub Charles River i przeprowadzono randomizację według szczegółowych procedur odpowiednich CRO, jak opisane na przykład przez Fiebig et al. w Cancer Genomics & Proteomics 4: 197-210, 1997.

40 [0063] Wszystkie badania PDX sutka i żołądka przeprowadzono badając SYD985 głowa do głowy z T-DM1, ponieważ ten ostatni ADC został zatwierdzony do leczenia pacjentów z HER2-dodatnim rakiem sutka z przerzutami, a zatwierdzenie dla T-DM1 z HER2-dodatnim raka żołądka jest obecnie realizowane. Badania

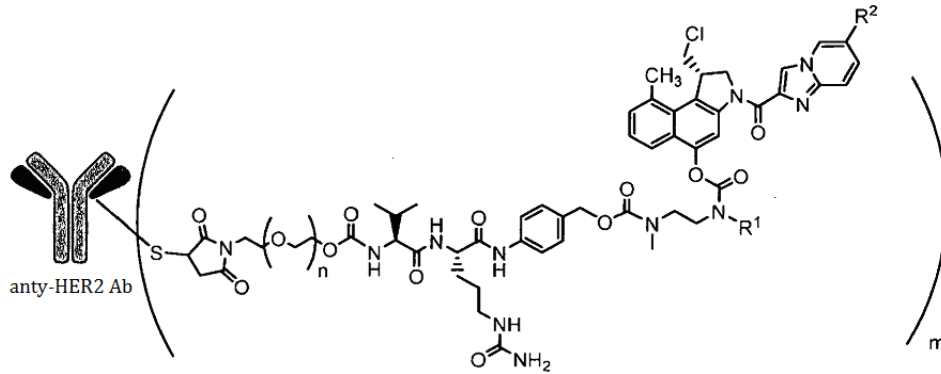
w innych wskazaniach (pęcherza moczowego i jajnika) zostały wykonane z zastosowaniem wyłącznie SYD985, ponieważ T-DM1 nie jest lekiem w tych wskazaniach. Mysiom podawano albo nośnik, 3 mg / kg SYD985 lub 3 mg / kg T-DM1 we wszystkich modelach PDX sutka (Figury 1-6) oraz nośnikiem, 10 mg / kg SYD985 lub 10 mg / kg T-DM1 we wszystkich modelach PDX żołądka (Figury 7-10). Myszy były leczone nośnikiem lub 10 mg / kg SYD985 w modelu PDX pęcherza (Figura 11), i nośnikiem lub 15 mg / kg SYD983 w modelu pochodzącego z linii komórek jajnika heteroprzeszczepu (Figura 12). Wszystkie traktowania przeprowadzono w dniu 0, po podaniu pojedynczej dawki dożylnie przez iniekcję do żyły ogonowej. Dane przedstawione jako średnia objętość guza  $\pm$  S.D., składają się z 6-8 zwierząt na grupę doświadczalną. Masę ciała i wielkość guza mierzono dwa razy w tygodniu. Objętość guza określano przez pomiar dwuwymiarowy z zaciskami. Kryteria kończące obejmowały m.in. objętość guza  $>2000 \text{ mm}^3$  lub utratę masy ciała  $> 30 \%$ . Wielkość guza u poszczególnych zwierząt przetworzono za pomocą Graph Pad Prism. Wyniki przedstawiono na Figurach od 1 do 12.

### **Pierwsze badanie kliniczne na ludziach**

**[0064]** Dwuczęściowe badanie pierwszego podania u człowieka fazy I (z rozszerzonymi kohortami) z koniugatem przeciwciała-lek SYD985 (trastuzumab vc-seco-DUBA) przeprowadza się w celu oceny bezpieczeństwa, farmakokinetyki i skuteczności stosowania u pacjentów z miejscowo zaawansowanymi lub metastatycznymi nowotworami litymi (np. NCT02277717). Część I stanowi część eskalacji dawki, w której podaje się niską dawkę SYD985 trzem pacjentom z rakiem (kobiety i mężczyźni mający nowotwory lite różnego pochodzenia). Jeśli dawka jest dobrze tolerowana, podaje się wyższą dawkę SYD985 trzem innym pacjentom z rakiem. Będzie to trwało, aż dalsze zwiększenie dawki nie będzie już bezpiecznie. W części II badania kilka grup pacjentów z konkretnym rodzajem raka (w tym raka sutka i raka żołądka) otrzyma dawkę SYD985 wybraną do dalszego rozwoju. Wszyscy pacjenci z obu części badania (szacuje się, że w sumie zostanie zapisanych 76 pacjentów) otrzyma (dożylnie) infuzje SYD985 co trzy tygodnie, do czasu wystąpienia progresji nowotworu lub rozwoju niedopuszczalnej toksyczności.

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek o wzorze (I)



5

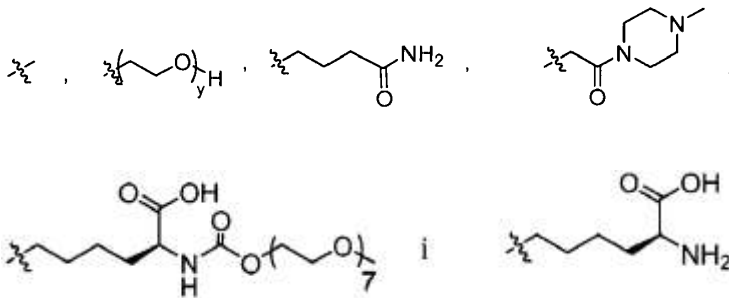
w którym

anty-HER2 Ab oznacza przeciwciało anti-HER2 lub fragment przeciwciała, n wynosi 0-3,

m reprezentuje średnie SLP wynoszące od 1 do 4,

R<sup>1</sup> jest wybrany spośród

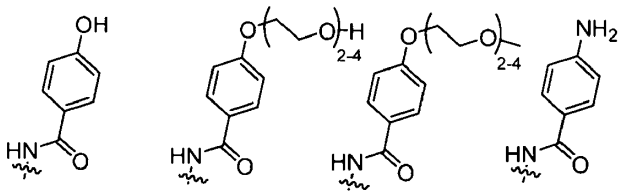
10



y wynosi 1-16, a

15

R<sup>2</sup> jest wybrany spośród



do zastosowania w leczeniu ludzkich nowotworów litych wyrażających HER2, przy czym ludzki nowotwór lity jest HER2 IHC 2+ lub 1+.

20

2. Związek do zastosowania według zastrzeżenia 1, w którym

anty-HER2 Ab oznacza przeciwciało anti-HER2 lub fragment przeciwciała,

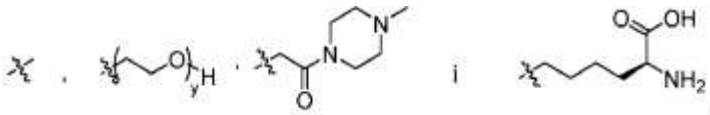
n wynosi 0-1,

m reprezentuje średnie SLP wynoszące od 1 do 4,

25

R<sup>1</sup> jest wybrany spośród

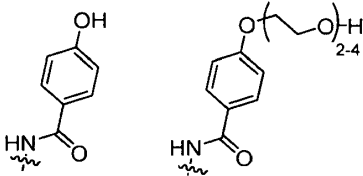




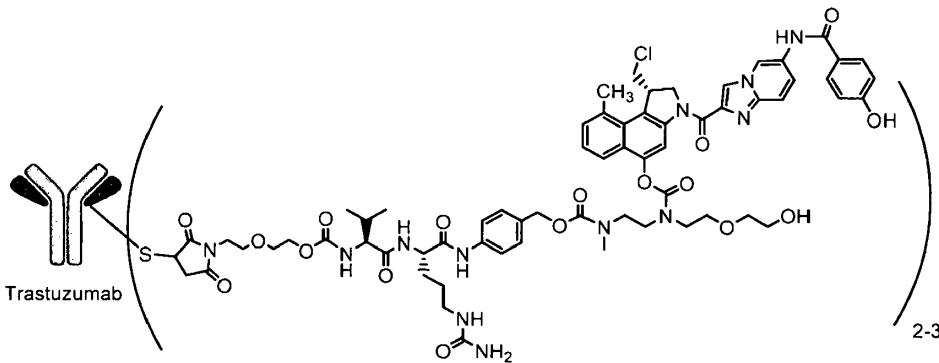
y wynosi 1-16, a

R<sup>2</sup> jest wybrany spośród

5



3. Związek do zastosowania według zastrzeżenia 1 lub 2 o wzorze (II)



10

4. Związek do zastosowania według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 3, w którym nowotworem litym wyrażającym HER2 jest rak sutka, rak żołądka, rak pęcherza, rak jajnika, rak płuc, rak prostaty rak trzustki, rak jelita grubego, rak płaskonabłonkowy narządów głowy i szyi lub kostniakomięsak.

15

5. Związek do zastosowania według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 4, w którym nowotworem litym wyrażającym HER2 jest rak sutka lub rak żołądka.

6. Związek do zastosowania według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 5, w którym rak sutka jest dodatni lub ujemny wobec receptora hormonalnego.

20

7. Związek do zastosowania według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 6, w którym nowotwór lity jest HER2 FISH-ujemny.

8. Związek do zastosowania według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 7, w którym ludzkim nowotworem litym jest potrójnie ujemny rak sutka.

25

9. Kombinacja związku do zastosowania według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 8 z przeciwciałem terapeutycznym i/lub czynnikiem chemioterapeutycznym, do zastosowania w leczeniu ludzkich nowotworów litych wyrażających HER2.

30

10. Kombinacja do zastosowania według zastrzeżenia 9, do zastosowania w leczeniu raka sutka, w szczególności potrójnie ujemnego raka sutka.
- 5 11. Kombinacja do zastosowania według zastrzeżenia 9 lub 10, w której przeciwciałem terapeutycznym jest pertuzumab, a czynnikiem chemoterapeutycznym jest taksan, w szczególności docetaksel lub paklitaksel, lub antracyklina, w szczególności doksorubicyna, epirubicyna, daunorubicyna lub walrubicyna.
- 10 12. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca związek do zastosowania według dowolnego z zastrzeżeń 1 do 8 lub kombinacja do zastosowania według dowolnego z zastrzeżeń 9 do 11, oraz jedna lub więcej farmaceutycznie dopuszczalnych substancji pomocniczych.
13. Kompozycja farmaceutyczna według zastrzeżenia 12 w postaci liofilizowanego proszku lub zamrożonego roztworu.

15

Figura 1. MAXF 1162 PDX

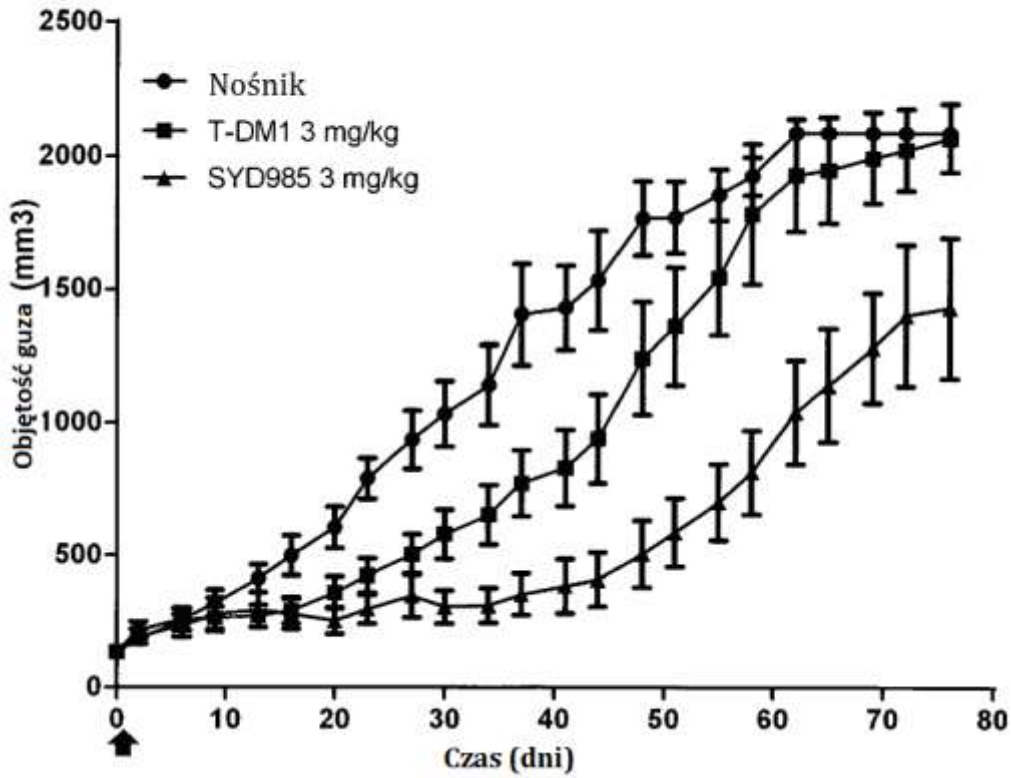


Figura 2. HBCx-34 PDX

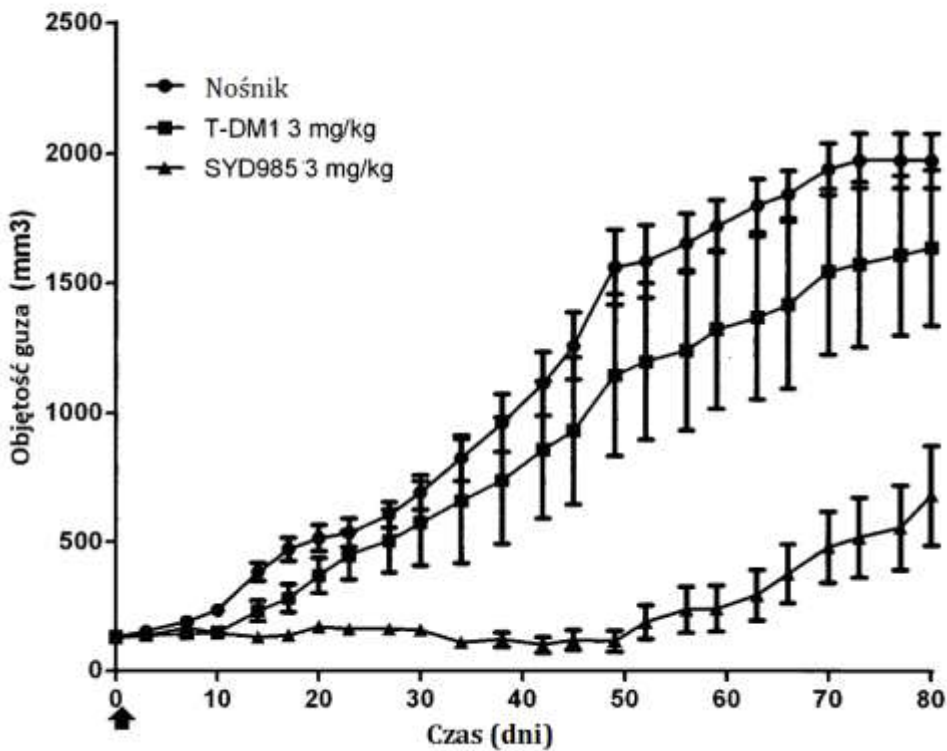
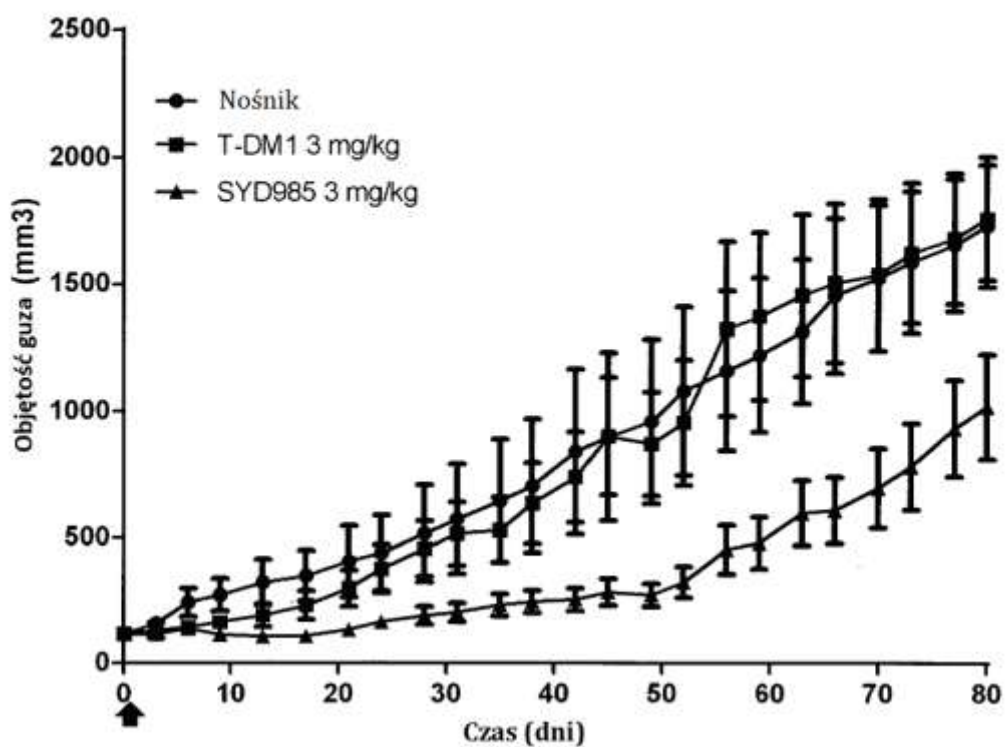


Figura 3. MAXF 449 PDX



5

Figura 4. HBCx-10 PDX

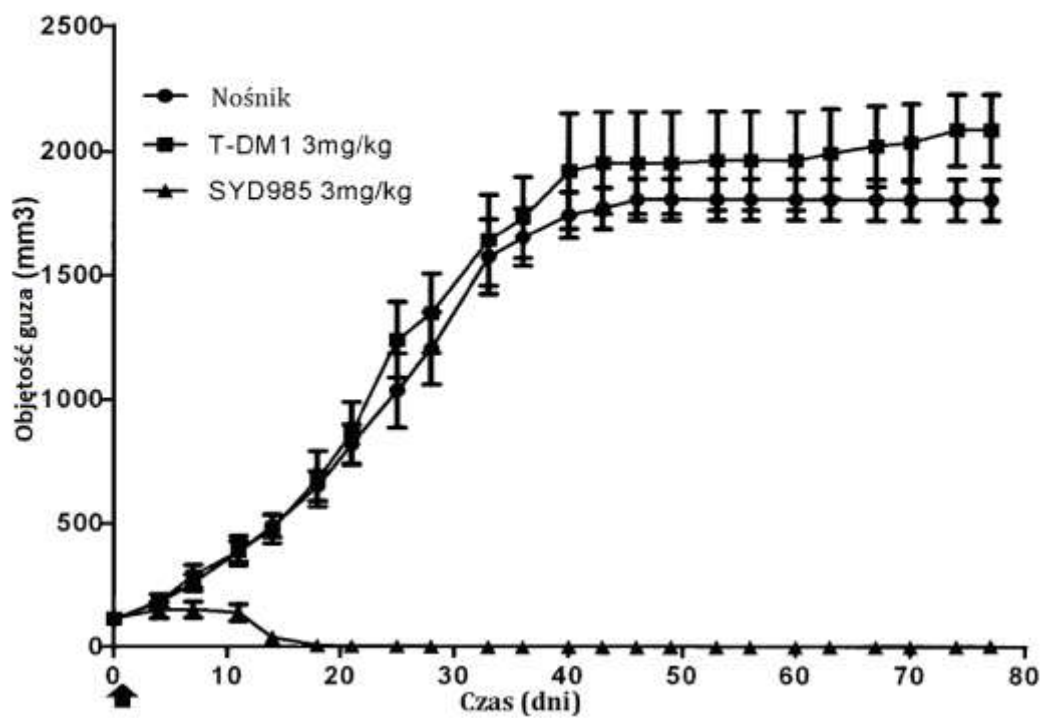
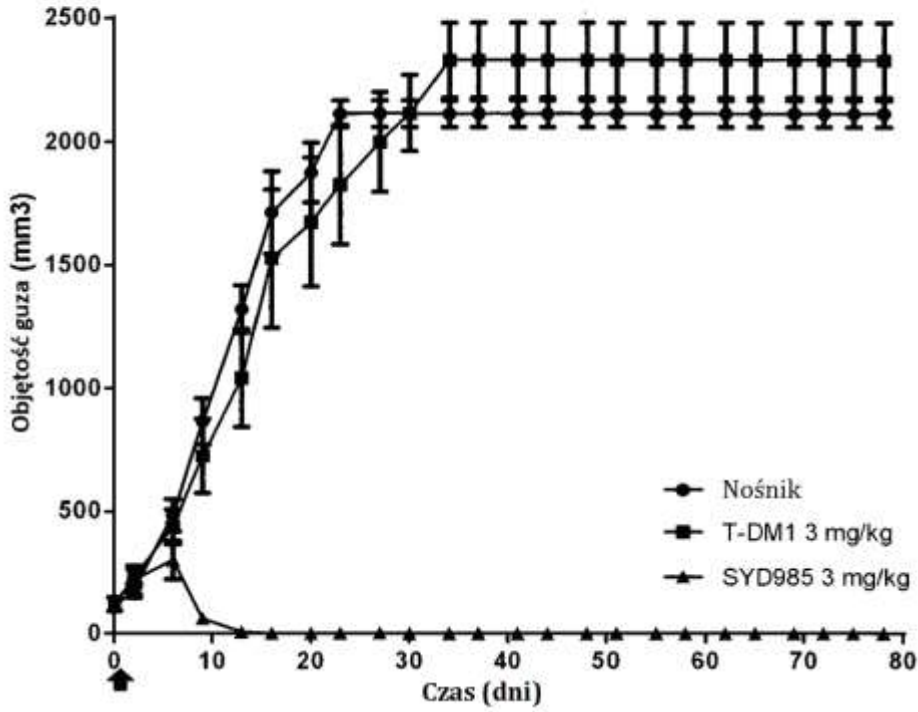


Figura 5. MAXF-MX1 PDX



5

Figura 6. ST313 PDX

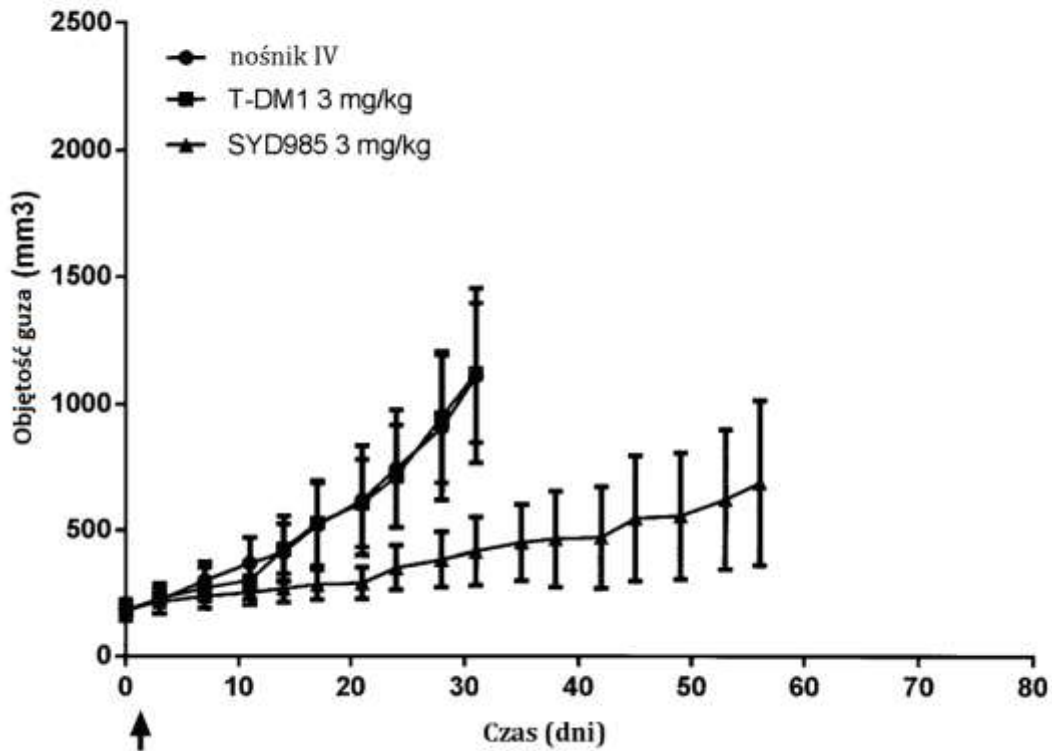
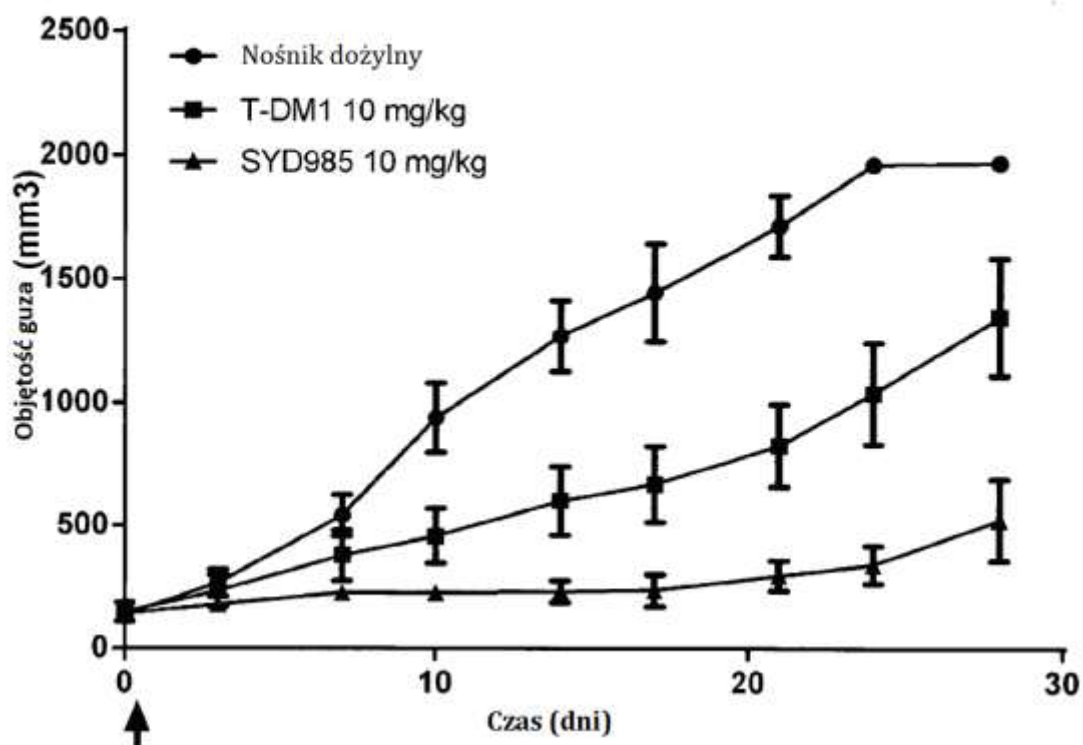


Figura 7. GXA3057 PDX



5

Figura 8. GXA3067 PDX

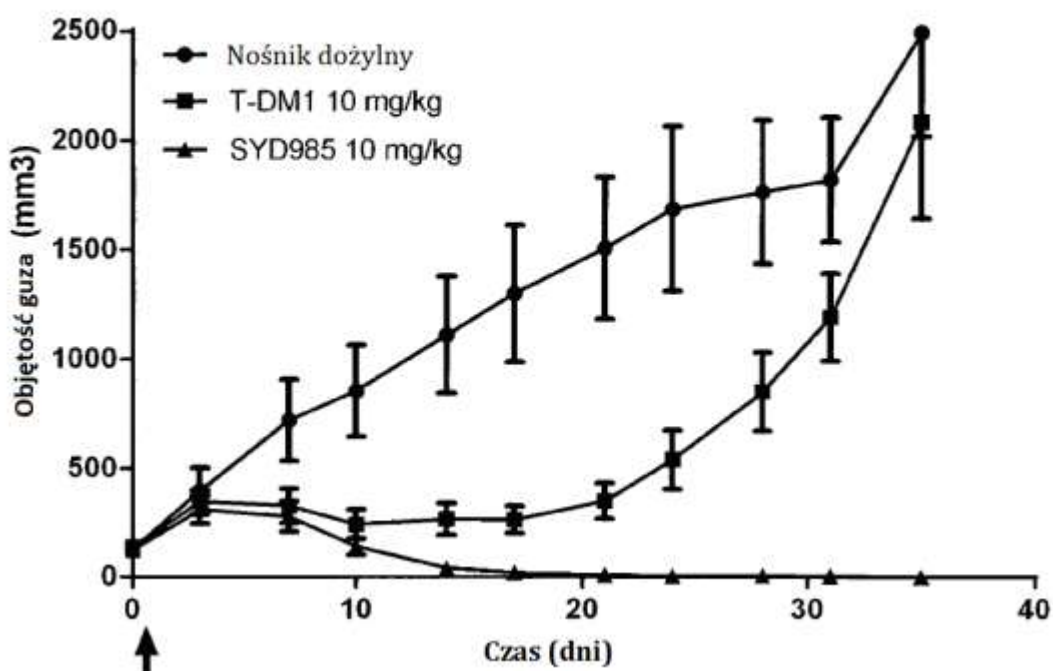
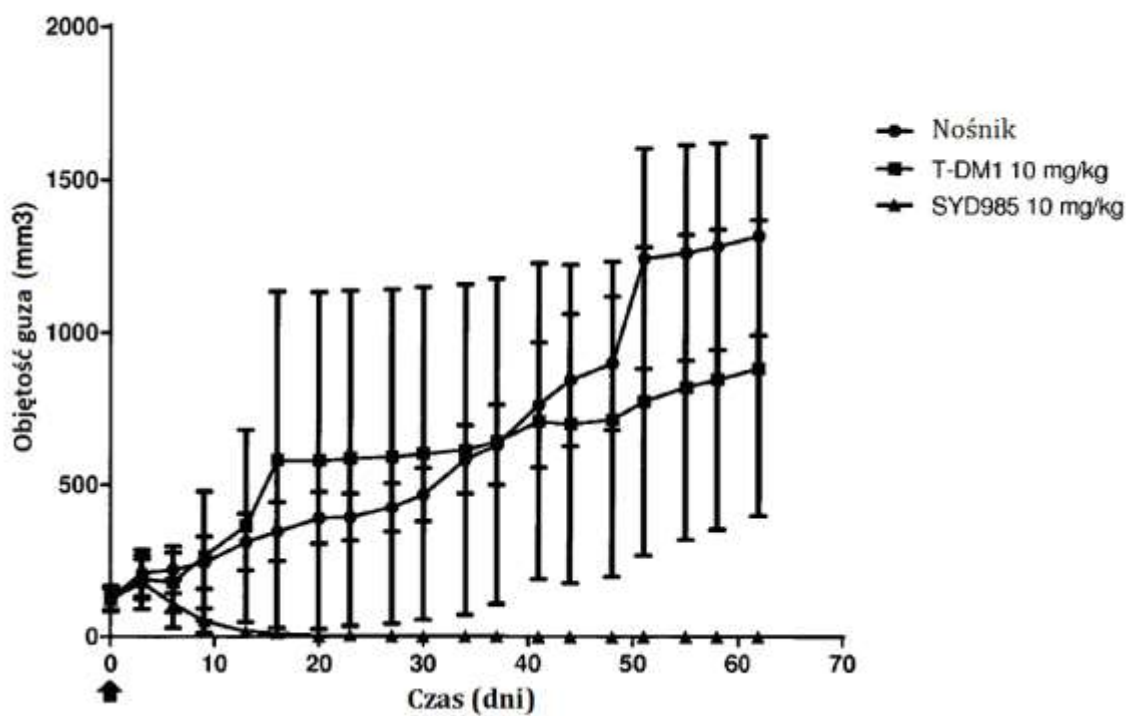


Figura 9. GXA3054 PDX



5

Figura 10. GXA3038 PDX

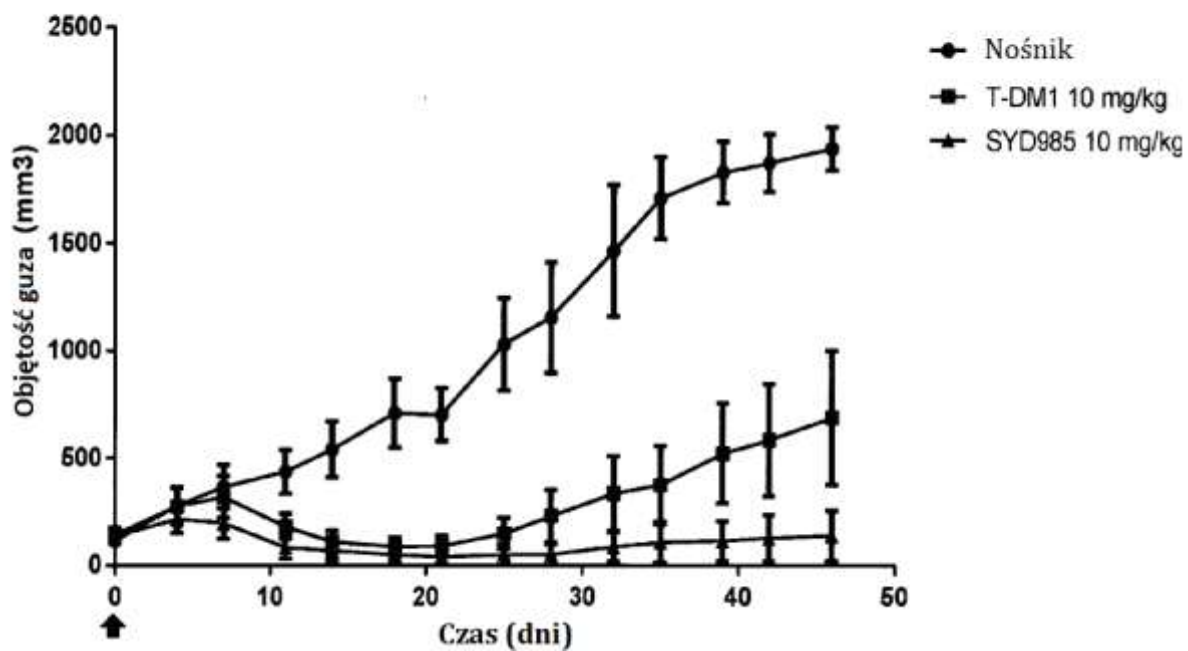


Figura 11. BXF439 PDX

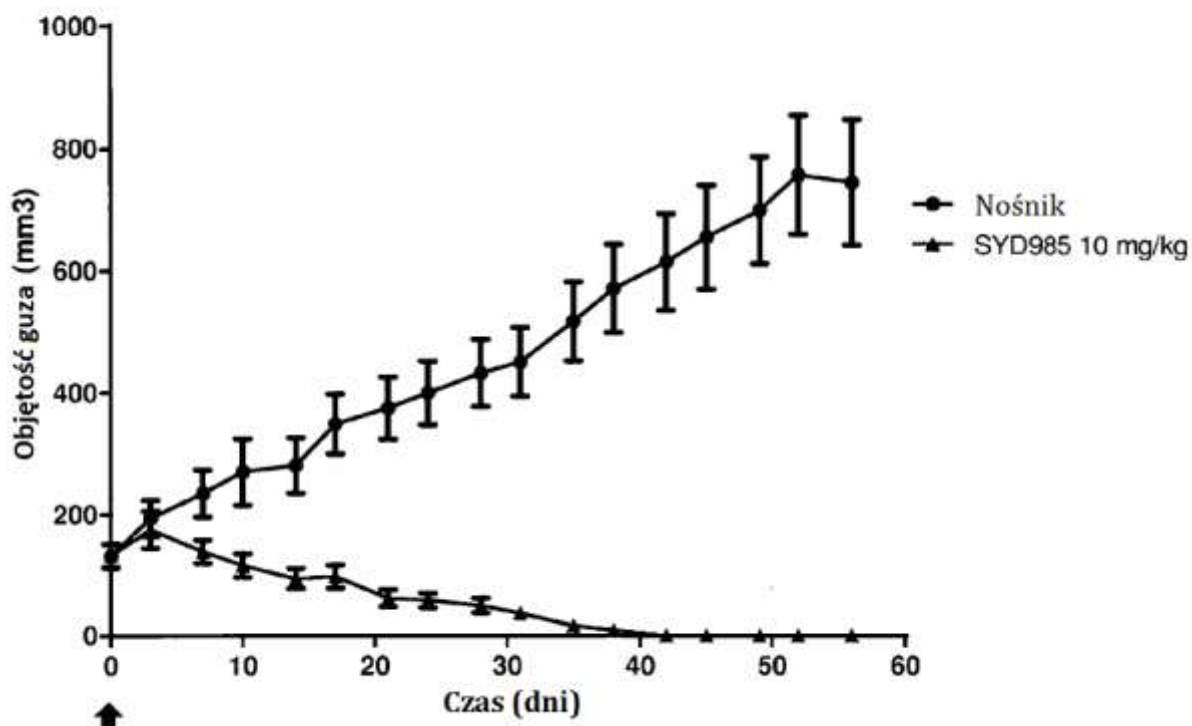
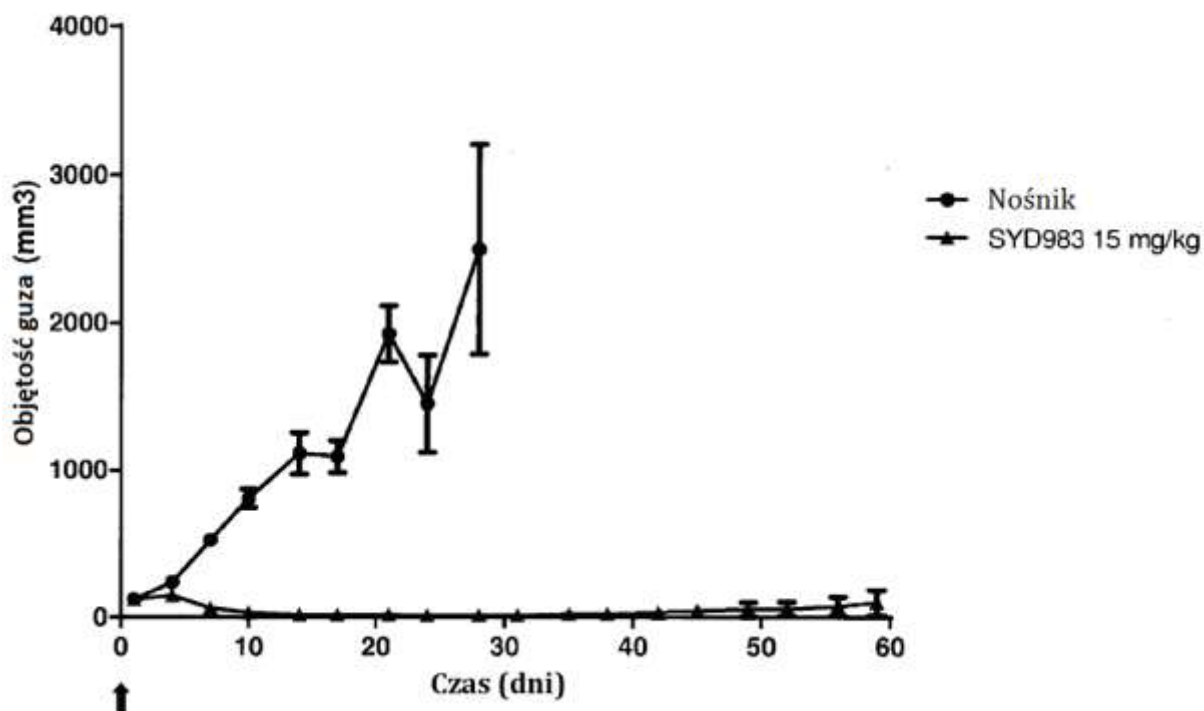


Figura 12. Heteroprzeszczep pochodzący z linii komórkowej SKOV3





## ODNIESIENIA CYTOWANE W OPISIE

5 Lista odnośników cytowanych przez zgłaszającego ma jedynie służyć wygodzie czytelnika. Nie stanowi ona części europejskiego dokumentu patentowego. Mimo że wyboru odnośników dokonano z wielką starannością, nie można wykluczyć błędów lub przeoczeń, a EUP nie bierze żadnej odpowiedzialności w tym względzie.

## Dokumenty patentowe cytowane w opisie

- 10
- [WO2011133039A](#) [0004] [0038] [0046] [0046]
  - [WO2005084390A](#) [0046]

## Literatura niepatentowa cytowana w opisie

- **A. BERCHUCK et al.** *Cancer Res.*, 1990, vol. 50, 4087-4091 [0013]
- **H. MEDEN ; W. KUHN.** *Eur. J. Obstet. & Gynecol. Reprod. Biol.*, 1997, vol. 71, 173-179 [0013]
- **N. GABORIT et al.** *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286 (13), 11337-11345 [0013]
- **G.M. MANTIA-SMALDONE et al.** *Cancer Management Res.*, 2011, vol. 3, 25-38 [0013]
- **S.P. LANGDON et al.** *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2010, vol. 10 (7), 1113-1120 [0013]
- **S. MAKHIJA et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2010, vol. 28 (7), 1215-1223 [0013]
- **I. RAY-COQUARD et al.** *Clin. Ovarian Cancer*, 2008, vol. 1 (1), 54-59 [0013]
- **A. CHAKRAVARTI et al.** *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 2005, vol. 62 (2), 309-317 [0014]
- **M.H.A. HUSSAIN et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2007, vol. 25 (16), 2218-24 [0014]
- **D. AMSELLEM-OUAZANA et al.** *Ann. Oncol.*, 2004, vol. 15 (3), 538 [0014]
- **M. SUZUKI et al.** *Lung Cancer*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungca.2014.10.014> [0015]
- **J. MAZIERES et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2013, vol. 31 (16), 1997-2004 [0015]
- **C.-M. TSAI et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1993, vol. 85 (11), 897-901 [0015]
- **Z. CALIKUSU et al.** *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2009, vol. 28, 97 [0015]
- **K. TAKEZAWA et al.** *Cancer Discov.*, 2012, vol. 2 (10), 922-33 [0015]
- **F.-N. HSU et al.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2011, vol. 300, E902-E908 [0016]
- **L. CHEN et al.** *Clin. Cancer Res.*, 2011, vol. 17 (19), 6218-28 [0016]
- **C. CAI et al.** *Cancer Res.*, 2009, vol. 69 (12), 5202-5209 [0016]
- **S. MINNER et al.** *Clin. Cancer Res.*, 2010, vol. 16 (5), 1553-60 [0017]
- **S.F. SHARIAT et al.** *Clin. Cancer Res.*, 2007, vol. 13 (18), 5377-84 [0017]
- **J.M.S. BARTLETT et al.** *J. Pathol.*, 2005, vol. 205, 522-529 [0017]
- **H. BURRIS ; A.M. STORNILO.** *Eur. J. Cancer*, 1997, vol. 33 (1), S18-S22 [0018]
- **T. CONROY et al.** *N. Engl. J. Med.*, 2011, vol. 364 (19), 1817-25 [0018]
- **C. LARBOURET et al.** *Neoplasia*, 2012, vol. 14 (2), 121-130 [0018]
- **A.N. SEO et al.** *PLoS ONE*, 2014, vol. 9 (5), e98528 [0019]
- **R.K. RAMANATHAN et al.** *Cancer Invest.*, 2004, vol. 22 (6), 858-865 [0019]
- **J. CLARK et al.** *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2003, 22 [0019]
- **A. BERTOTTI et al.** *Cancer Discov.*, 2011, vol. 1 (6), 508-523 [0019]
- **R.N. BECKHARDT et al.** *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 1995, vol. 121, 1265-1270 [0020]
- **R. GORLICK et al.** *J. Clin. Oncol.*, 1999, vol. 17, 2781-8 [0021]
- **D. EBB et al.** *J. Clin. Oncol.*, 2012, vol. 30 (20), 2545-2551 [0021]
- **M.E. IRWIN et al.** *PLoS ONE*, 2013, vol. 8 (8), e70608 [0022]
- **P. CHEVALIER et al.** *Blood*, 2012 [0022]
- **S. SCHOLL et al.** *Ann. Oncol.*, 2001, vol. 12 (1), S81-S87 [0034]
- **FIEBIG et al.** *Behring Inst. Mitt.*, 1984, vol. 74, 343-352, <http://www.championsoncology.com/translational-oncology-solutions/predictive-value> [0043]
- **HIDALGO et al.** *Mol. Cancer Ther.*, 2011, vol. 10, 1311-1316 [0043]
- **FIEBIG et al.** *Cancer Genomics & Proteomics*, 1997, vol. 4, 197-210 [0062]