

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201992326 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.03.13

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)  
C07K 14/435 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
C07K 16/46 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.03.30

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ОКАЗАНИЯ НАПРАВЛЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА АЛЬФА-V БЕТА-3-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ РАКОВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ (CSC) И ЛЕЧЕНИЯ (AVB3) ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ВИДОВ РАКА

(31) 62/479,768

(72) Изобретатель:

(32) 2017.03.31

Чиреш Дэвид, Веттерстен Хирони  
(US)

(33) US

(86) PCT/US2018/025470

(74) Представитель:

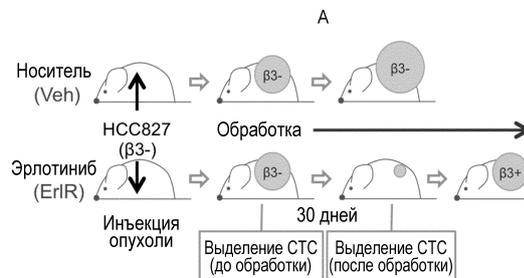
(87) WO 2018/183894 2018.10.04

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ  
(US)

(57) Предоставлены композиции и способы лечения или ослабления рака путем направленного воздействия на экспрессируемые на клеточной поверхности полипептиды  $\alpha\beta 3$  (avb3) в раковых стволовых клетках (CSC) для уничтожения CSC, таким образом, для лечения, ослабления или замедления развития рака, вызванного, или инициированного, или поддерживаемого раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha\beta 3$  на своих клеточных поверхностях. Предоставлены композиции и способы для осуществления направленного воздействия и уничтожения  $\alpha\beta 3$ -положительных раковых стволовых клеток (CSC) и лечения лекарственно-устойчивых форм рака. В альтернативных вариантах осуществления в композициях и способах, предлагаемых в настоящей заявке, используют антитело, которое может специфически связываться с человеческим  $\alpha\beta 3$  и которое содержит Fc-участок, способный опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), уничтожающую раковые или опухолевые клетки посредством макрофагов; например, используют гуманизированное анти- $\alpha\beta 3$  антитело, которое модифицировано путем включения сконструированного Fc-участка, специфически связывающегося с макрофагами человека.



A1

201992326

201992326

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–559254EA/019

### **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ОКАЗАНИЯ НАПРАВЛЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА АЛЬФА–V БЕТА–3–ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ РАКОВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ (CSC) И ЛЕЧЕНИЯ (AVB3) ЛЕКАРСТВЕННО–УСТОЙЧИВЫХ ВИДОВ РАКА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

По настоящей международной заявке, поданной в соответствии с договором о патентной кооперации (РСТ), испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/479,768, поданной 31 марта 2017 г. вышеуказанная заявка специально включена в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки и для любых целей.

#### **УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРАВАХ ПРАВИТЕЛЬСТВА**

Настоящее изобретение выполнено при государственной поддержке в виде грантов T32 OD017853; T32 HL086344; T32 HL098062–03; P–857GC; NCI R01CA045726, предоставленных Национальным институтом здравоохранения (NIH). Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

#### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

В целом настоящее изобретение относится к иммунологии и онкологии. В альтернативных вариантах осуществления предоставлены композиции и способы лечения или ослабления рака путем оказания направленного воздействия на экспрессируемые на клеточной поверхности полипептиды  $\alpha\beta 3$  (avb3) в раковых стволовых клетках (CSC), для уничтожения CSC, таким образом осуществляя лечение, ослабление или замедление развития рака, вызванного или инициированного, или поддерживаемого раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha\beta 3$  на своих клеточных поверхностях.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Связанные с опухолью макрофаги участвуют в регуляции роста и агрессивности рака. В то время как M1 макрофаги запускают воспалительный ответ и подавляют рост опухоли, M2 макрофаги секретируют проопухолевые цитокины в микроокружение, поддерживая прогрессирование опухоли. Переключение макрофагов с M1 типа на M2 связано с прогрессированием рака легких, и раковые стволовые клетки участвуют в таком перепрограммировании в качестве движущей силы.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В альтернативных вариантах осуществления предоставлены способы для:

- уничтожения или уменьшения количества экспрессирующих полипептид  $\alpha\beta 3$  (avb3) раковых клеток или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума,
- лечения, ослабления или регрессии, или замедления развития рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta 3$  (avb3), у нуждающегося в этом индивидуума,
- ослабления или замедления развития раковых заболеваний, вызванных или

инициированных, или поддерживаемых раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha v \beta 3$  на своих клеточных поверхностях,

– увеличения популяции макрофагов, способных запускать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли *in vivo*, причем популяция макрофагов, способных запускать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли, необязательно содержит популяцию ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) или M1 макрофагов,

– повышения чувствительности рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha v \beta 3$  ( $\alpha v \beta 3$ ), к воздействию терапии, необязательно химиотерапии, необязательно терапии ингибитором фактора роста,

причем способ включает:

(a) введение нуждающемуся в этом индивидууму антитела или полипептида, способного специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha v \beta 3$  ( $\alpha v \beta 3$ ), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC, или

(b) (i) предоставление антитела или полипептида, способного специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha v \beta 3$  ( $\alpha v \beta 3$ ), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC,

причем антитело или полипептид имеет Fc-домен или эквивалентный домен или фрагмент, способный связываться с макрофагом и инициировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), уничтожающую клетку, с которой это антитело специфически связывается,

(ii) введение антитела или полипептида нуждающемуся в этом индивидууму, таким образом приводя к:

уничтожению или уменьшению количества экспрессирующих полипептид  $\alpha v \beta 3$  ( $\alpha v \beta 3$ ) раковых клеток или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума,

– лечению, ослаблению или регрессии, или замедлению развития рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha v \beta 3$  ( $\alpha v \beta 3$ ), у нуждающегося в этом индивидуума,

– ослаблению или замедлению развития раковых заболеваний, вызванных или инициированных, или поддерживаемых раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha v \beta 3$  на своих клеточных поверхностях,

– увеличению популяции макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли *in vivo*, причем необязательно популяция макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли, содержит популяцию ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) или M1 макрофагов,

– повышению чувствительности рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha v \beta 3$  ( $\alpha v \beta 3$ ), к воздействию терапии.

В альтернативных вариантах осуществления предоставлены способы, в которых

антитело или полипептид представляет собой гуманизированное антитело, необязательно гуманизированное мышинное антитело; или в которых антитело или полипептид представляет собой рекомбинантное или сконструированное антитело; или в которых антитело представляет собой человеческое антитело; или в которых антитело представляет собой моноклональное антитело или поликлональное антитело; или в которых антитело представляет собой моноклональное антитело LM609 (Chemicon Int., Temecula, CA) (CVCL\_KS89) (мышиную гибридому с номером доступа ATCC HB 9537) (см., например, патент США № 7,115,261); моноклональное антитело CBL544, полученное из клона 23C6 (MilliporeSigma, Burlington, MA); моноклональное антитело ab7166 (abcam, Cambridge, MA); или моноклональное антитело ab78289 (abcam, Cambridge, MA); или любую гуманизированную версию этих антител, или любой полипептид, содержащий  $\alpha\beta 3$ -связывающую CDR антитела LM609, CBL544, ab7166 или ab78289.

В альтернативных вариантах осуществления предоставлены способы, в которых макрофаг является человеческим макрофагом или ассоциированным с опухолью макрофагом (TAM), M1 макрофагом или ингибирующим опухоль M2 макрофагом.

В альтернативных вариантах осуществления предложены способы, в которых рак представляет собой эпителиальную раковую или эпителиальную опухолевую клетку; или в которых рак представляет собой лекарственно-устойчивый рак, и, необязательно, лекарственное вещество представляет собой ингибитор фактора роста или ингибитор киназы, причем необязательно ингибитор фактора роста содержит ингибитор рецепторной тирозинкиназы (RTK), необязательно эрлотиниб.

В альтернативных вариантах осуществления предоставлены способы, в которых антитело или полипептид вводят нуждающемуся в этом индивидууму внутривенно, внутримышечно или подкожно; или в которых антитело или полипептид приготовлен в виде стерильной фармацевтической композиции или состава или приготовлен для введения внутривенно, внутримышечно или подкожно; или в которых доза антитела или полипептида основана либо на фиксированной дозе или на дозе с учетом массы тела, либо на фиксированной дозе от примерно 100 до 1200 мг в месяц или на дозе от примерно 0,3 до 10 мг/кг.

В альтернативных вариантах осуществления предоставлены способы, дополнительно включающие введение ингибитора фактора роста, причем ингибитор фактора роста необязательно содержит ингибитор рецепторной тирозинкиназы (RTK), ингибитор Src, ингибитор антиметаболического действия, гемцитабин, GEMZAR<sup>TM</sup>, митотический яд, паклитаксел, таксол, ABRAXANE<sup>TM</sup>, эрлотиниб, TARCEVA<sup>TM</sup>, лапатиниб, TYKERB<sup>TM</sup>, цетуксамиб, ERBITUX<sup>TM</sup> или ингибитор инсулиноподобного фактора роста.

В альтернативных вариантах осуществления предоставлено применение антитела или полипептида, способного специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha\beta 3$  ( $\alpha\text{v}\beta 3$ ), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC; или антитела или полипептида, способного специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha\beta 3$

(avb3), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC, где антитело имеет Fc-домен или эквивалентный домен или фрагмент, способный связываться с макрофагом и инициировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), уничтожающую клетку, с которой антитело специфически связывается, в приготовлении лекарственного средства для:

- уничтожения или уменьшения количества экспрессирующих полипептид  $\alpha\beta 3$  (avb3) раковых клеток или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума,

- лечения, ослабления или регрессии, или замедления развития рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta 3$  (avb3), у нуждающегося в этом индивидуума,

- ослабления или замедления развития раковых заболеваний, вызванных или инициированных, или поддерживаемых раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha\beta 3$  на своих клеточных поверхностях,

- увеличения популяции макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли *in vivo*, причем необязательно популяция макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и ингибировать рост опухоли, содержит популяцию ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) или M1 макрофагов,

- повышения чувствительности рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta 3$  (avb3), к воздействию терапии.

В альтернативных вариантах осуществления предоставлены фармацевтические композиции или составы для применения в способе для:

- уничтожения или уменьшения количества экспрессирующих полипептид  $\alpha\beta 3$  (avb3) раковых клеток или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума,

- лечения, ослабления или регрессии, или замедления развития рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta 3$  (avb3), у нуждающегося в этом индивидуума,

- ослабления или замедления развития раковых заболеваний, вызванных или инициированных, или поддерживаемых раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha\beta 3$  на своих клеточных поверхностях,

- увеличения популяции макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли *in vivo*, причем необязательно популяция макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли, содержит популяцию ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) или M1 макрофагов,

- повышения чувствительности рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta 3$  (avb3), к воздействию терапии,

причем фармацевтическая композиция или состав содержит:

антитело или полипептид, способный специфически связываться с полипептидом интегрин  $\alpha\beta 3$  (avb3), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC;

или антитело, способное специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha v \beta 3$  ( $\alpha v \beta 3$ ), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC, при этом антитело или полипептид имеет Fc-домен или эквивалентный домен или фрагмент, способный связываться с макрофагом и инициировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), уничтожающую клетку, с которой специфически связывается антитело или полипептид.

Детали одного или более приведенных в качестве примеров вариантов осуществления показаны на прилагаемых чертежах и раскрыты в приведенном ниже описании. Другие признаки, объекты и преимущества изобретения станут очевидны из описания и чертежей, а также из формулы изобретения. Все публикации, патенты, патентные заявки, процитированные в настоящем описании, включены в явном виде в виде ссылки для любых целей.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

Чертежи, представленные в настоящем описании, иллюстрируют варианты осуществления, раскрытые в настоящем описании, и не предназначены для ограничения объема изобретения, охватываемого формулой изобретения.

На фиг. 1A–I схематически и графически представлена оценка пути приобретения устойчивости, включая устойчивость рака легкого к ингибиторам EGFR, приводящей к усилению экспрессии  $\alpha v \beta 3$  и приобретению фатального стволовоподобного состояния, устойчивого к лекарственным веществам:

На фиг. 1A схематично представлена модель ксенотрансплантата, устойчивого к эрлотинибу, т.е., схема лечения мышей, несущих подкожные ксенотрансплантаты человеческого  $\alpha v \beta 3$ -отрицательного EGFR-мутантного немелкоклеточного рака легкого (HCC827) носителем или эрлотинибом и измерения роста опухоли в зависимости от времени;

На фиг. 1B приведено графическое представление данных, показывающих, что в итоге через несколько недель происходит возобновление роста опухоли, в виде функции изменения объема опухоли по дням лечения относительно контроля («Носит» или носитель) у мышей с ( $\beta 3$ -)ксенотрансплантатом HCC827, которых лечили контролем или эрлотинибом;

На фиг. 1C показано изображение опухолевых тканей, окрашенных на  $\beta 3$ ;

На фиг. 1D приведено графическое представление данных проточной цитометрии, где клетки, выделенные из устойчивых к эрлотинибу тканей, окрашивали на  $\alpha v \beta 3$  и ALDH1A1;

На фиг. 1E: приведено графическое представление данных проточной цитометрии, где опухолевые клетки, выделенные из мыши, обработанной носителем (носит), и из мыши, обработанной эрлотинибом (ErlR), окрашивали на  $\alpha v \beta 3$ ;

На фиг. 1F: показан график жизнеспособности клеток в течение 72 часов после обработки клеток эрлотинибом или осимертинибом;

На фиг. 1G: приведено графическое представление данных, демонстрирующих, что

эрлотиниб приводил к увеличению количества CTC несмотря на то, что первичные опухоли все еще реагировали на лечение; где через 8 недель после введения ( $\beta 3^-$ , GFP+, люцифераза+) клеток HCC827 в легкие, мышей обрабатывали эрлотинибом в течение 30 дней до выделения CTC; CTC окрашивали на  $\alpha v\beta 3$ , и подсчитывали  $\alpha v\beta 3$ -положительные ( $\beta 3^+$ ) и отрицательные ( $\beta 3^-$ ) CTC у мышей до (до лечения, n=3) и после лечения (после лечения, n=5);

На фиг. 1H приведено изображение первичных масс по фиг. 1G;

На фиг. 1I приведено графическое представление данных, показывающих, каким образом происходило увеличение M2-TAM в резистентных к эрлотинибу тканях ксенотрансплантата; через 50 дней лечения в группах, которых лечили носителем (n=9) и эрлотинибом (n=9), сравнивали процентное содержание M1 (темно-серые) и M2-TAM (светло-серые) в опухолевых тканях;

более подробное обсуждение см. в примере 1 ниже.

На фиг. 2A-E приведено схематическое и графическое представление данных, показывающих, что LM609 продуцирует менее агрессивный фенотип:

На фиг. 2A графически показано LM609-подавленное приобретение устойчивости к эрлотинибу, где мышей с ( $\beta 3^-$ )ксенотрансплантатом HCC827 обрабатывали эрлотинибом или эрлотинибом и LM609;

На фиг. 2B на верхней и нижней панелях приведено графическое представление данных, а также изображения и изображения окрашенных тканей, показывающих, что LM609 уничтожает  $\beta 3$ -положительные клетки; где мышей с ( $\beta 3^-$ )ксенотрансплантатом HCC827 обрабатывали каптизолом и PBS, каптизолом и LM609, эрлотинибом и PBS или эрлотинибом и LM609 в течение 50 дней, и опухолевые ткани окрашивали (нижняя панель) на интегрин  $\beta 3$ , и выполняли количественную оценку  $\beta 3$ -положительной области в ткани (верхняя панель);

На фиг. 2C-E схематически и графически показано, что LM609 уменьшает количество CTC, индуцированных эрлотинибом: через восемь недель после инъекции ( $\beta 3^-$ , GFP+, люцифераза+) клеток HCC827 в правое легкое мышам вводили эрлотиниб или комбинацию эрлотиниба и LM609 (эрлотиниб+LM609) в течение четырех недель до выделения CTC, и объем опухоли измеряли с помощью билюминесценции (фиг. 2D) до лечения и после лечения эрлотинибом (после эрлотиниба, n=4) или комбинацией эрлотиниба и LM609 (после эрл+LM609, n=5) и выполняли количественную оценку (фиг. 2C, верхняя панель); CTC окрашивали на  $\alpha v\beta 3$  для количественной оценки  $\alpha v\beta 3$ -положительных ( $\beta 3^+$ ) и отрицательных ( $\beta 3^-$ ) CTC (фиг. 2C, нижняя панель); показан пример  $\alpha v\beta 3$ -положительных CTC (фиг. 2E);

более подробное обсуждение см. в примере 1 ниже.

На фиг. 3A-E графически показано, что LM609 уничтожал  $\alpha v\beta 3$ -положительные клетки посредством макрофаг-опосредованной ADCC:

Фиг. 3A-C: LM609 уничтожал  $\alpha v\beta 3$ -положительные клетки посредством макрофаг-опосредованной ADCC *in vitro*; ADCC анализы с макрофагами (BMDM),

полученными из костного мозга, или НК–клетками выполняли, используя раковые клетки с  $\alpha\beta3$  интегрином и без него, обработанные изотипом IgG или LM609 в количестве 10 мкг/мл и/или блокатором Fc;

Фиг. 3D–E: LM609 подавляет рост  $\alpha\beta3$ –положительной опухоли только у мышей, имеющих макрофаги. Мышам линии Nude подкожно инъецировали клетки HCC827, эктопически экспрессирующие  $\beta3$ , и обрабатывали контрольной липосомой и PBS (фиг. 3D левая панель, контроль), контрольной липосомой и LM609 (фиг. 3D левая панель, LM609), клодронатной липосомой и PBS (фиг. 3D правая панель, контроль) или клодронатной липосомой и LM609 (фиг. 3D правая панель, LM609), отслеживали рост опухоли в течение 15 дней, и после обработки выполняли количественную оценку окрашивания F4/80 в тканях опухоли (фиг. 3E);

более подробное обсуждение см. в примере 1 ниже.

На фиг. 4A–C графически показано накопление интегрин  $\alpha\beta3$  в опухолевых клетках, устойчивых к эрлотинибу, и их устойчивость к осимертинибу:

На фиг. 4A приведено графическое представление данных, показывающих приобретение устойчивости у обработанной эрлотинибом опухоли, где мышью с подкожным ( $\beta3$ –)ксенотрансплантатом PC9 лечили носителем (Носит) (n=1) или эрлотинибом (ErlR, n=1);

На фиг. 4B приведено графическое представление данных, показывающих, что клетки из устойчивой к эрлотинибу ткани оказались  $\alpha\beta3$ –положительными, тогда как клетки, полученные от животного, обработанного носителем, таковыми не были; уровни  $\alpha\beta3$  в клетках, полученных от животных, получавших носитель (Носит, левая панель), и от животных, получавших эрлотиниб (ErlR, правая панель), измеряли с помощью проточной цитометрии;

Фиг. 4C: устойчивые к эрлотинибу клетки оказались устойчивыми к осимертинибу. Клетки, полученные от животных, обработанных носителем (Носит), и от животных, обработанных эрлотинибом (ErlR), обрабатывали эрлотинибом (левая панель) или осимертинибом (правая панель) в указанных дозах, и выполняли анализ МТТ для измерения жизнеспособности клеток;

более подробное обсуждение см. в примере 1 ниже.

На фиг. 5A–B приведено графическое представление данных, показывающих, что LM609 ингибировал связывание интегрин  $\alpha\beta3$  с лигандом, но не подавлял жизнеспособность клеток:

На фиг. 5A приведено графическое представление данных, показывающих, что LM609 ингибировал связывание интегрин  $\alpha\beta3$  с лигандом, где ( $\alpha\beta3$ +)клетки M21 высевали на коллаген или витронектин (лиганд  $\alpha\beta3$ ) с указанными дозами LM609, и измеряли количество прилипших клеток;

На фиг. 5B приведено графическое представление данных, показывающих, что LM609 не влияет на жизнеспособность клеток,  $\alpha\beta3$ –положительные ( $\beta3$ +) и отрицательные ( $\beta3$ –) клетки параллельно обрабатывали указанными дозами LM609, и для

измерения жизнеспособности клеток выполняли анализ МТТ.

На фиг. 6 приведено графическое представление данных, показывающих, что противораковые терапевтические средства обогащают клетки эпителиального рака интегрином  $\beta 3$ : количественную ПЦР использовали для детектирования экспрессии мРНК  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц интегрин в ответ на увеличение дозы перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) в течение 72 часов, результаты выражены в виде кратного изменения относительно контроля – носителя.

Одинаковые условные обозначения на разных чертежах обозначают одинаковые элементы.

Ниже приведено подробное описание различных приведенных в качестве примера вариантов осуществления, проиллюстрированных на прилагаемых чертежах. Приведенное ниже подробное описание предоставлено для лучшего понимания некоторых деталей аспектов и вариантов осуществления, представленных в настоящем описании, которое не следует интерпретировать как ограничение объема изобретения.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В альтернативных вариантах осуществления предоставлены композиции и способы лечения или ослабления рака путем оказания направленного воздействия на экспрессируемые на клеточной поверхности полипептиды  $\alpha v \beta 3$  ( $\alpha v \beta 3$ ) в раковых стволовых клетках (CSC) для уничтожения CSC, таким образом осуществляя лечение, ослабление или замедление развития рака, вызванного или инициированного, или поддерживаемого раковыми или опухолевыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha v \beta 3$  на своих клеточных поверхностях. В альтернативных вариантах осуществления предоставлены композиции и способы оказания направленного воздействия на  $\alpha v \beta 3$ –положительные раковые стволовые клетки (CSC) и их уничтожения и лечения лекарственно–устойчивых видов рака. В альтернативных вариантах осуществления в композициях и способах, предлагаемых в настоящей заявке, используется антитело или полипептид, который может специфически связываться с человеческим  $\alpha v \beta 3$  и который содержит Fc–участок, способный опосредовать обусловленную макрофагами антитело–зависимую клеточно–опосредованную цитотоксичность (ADCC), уничтожающую раковые или опухолевые клетки; например, используется гуманизованное анти– $\alpha v \beta 3$  антитело, модифицированное путем включения сконструированного Fc–участка, который специфически связывается с макрофагами человека. В альтернативных вариантах осуществления введение анти– $\alpha v \beta 3$  антитела может уничтожать или уменьшать количество высокоагрессивных,  $\alpha v \beta 3$ –положительных лекарственно–устойчивых раковых заболеваний путем рекрутирования ассоциированных с опухолью макрофагов, которые связываются с антителом или полипептидом (который также связывается с  $\alpha v \beta 3$ ), таким образом приводя к ADCC–опосредованному уничтожению рака макрофагами. В альтернативных вариантах осуществления антитела, например гуманизованные антитела, такие как анти– $\alpha v \beta 3$  антитело LM609, используются для направленного воздействия на полипептиды  $\alpha v \beta 3$  in

*in vivo* путем связывания  $\alpha v \beta 3$ -положительных раковых клеток, например CSC, а также связывания с макрофагами, и ADCC-опосредованного уничтожения CSC, экспрессирующих полипептид  $\alpha v \beta 3$ .

Хотя изобретение не ограничено каким-либо конкретным механизмом действия, в альтернативных вариантах осуществления анти- $\alpha v \beta 3$  антитела, такие как LM609 (Chemicon Int., Temecula, CA); CBL544, полученное из клона 23C6 (MilliporeSigma, Burlington, MA); ab7166 (abcam, Cambridge, MA); и моноклональное антитело ab78289 (abcam, Cambridge, MA) и гуманизированные версии этих антител, используются для продления чувствительности у нуждающихся в этом индивидуумов к противораковым лекарственным средствам путем направленного воздействия на лекарственно-устойчивые раковые клетки через опосредованную макрофагами антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

Композиции и способы, представленные в настоящем документе, используются для осуществления направленного воздействия на раковые стволовые клетки (CSC), которые могут представлять наиболее агрессивные и лекарственно-устойчивые клетки в популяции опухолей, и их уничтожения. Композиции и способы, представленные в настоящем документе, используются для оказания направленного воздействия на полипептид интегрина  $\alpha v \beta 3$ , который является идентификатором популяции CSC в различных злокачественных новообразованиях эпителиальных тканей и является необходимым и достаточным для стимуляции устойчивости к лекарственным средствам.

Антитело к интегрину  $\alpha v \beta 3$ , LM609, продлевало чувствительность к эрлотинибу в модели ксенотрансплантата EGFR-мутантной аденокарциномы легкого. В настоящей заявке описаны исследования, показывающие, что лечение мышей, несущих опухоль легкого, ингибитором EGFR, эрлотинибом, несмотря на первоначальное подавление роста опухоли, в конечном итоге приводит к ассоциированной с опухолью экспрессии  $\alpha v \beta 3$ , что в свою очередь приводит к прогрессированию опухоли, измеренному по увеличению циркулирующих опухолевых клеток (CTC). Кроме того, мыши, обработанные эрлотинибом, продемонстрировали заметное накопление ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) по сравнению с необработанными опухолями. Системная доставка LM609, моноклонального антитела, нацеленного на  $\alpha v \beta 3$ , разрушает лекарственно-устойчивые CSC в первичной опухоли и уничтожает CTC. Этот противоопухолевый эффект зависит от макрофагов, поскольку мыши, лишённые макрофагов, неспособны отвечать на это антитело. LM609 в комбинации с макрофагами, но не с NK-клетками, разрушает *in vitro* CSC за счет антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Эти результаты показывают, что несмотря на то, что сначала эрлотиниб контролирует рост опухоли, в конечном итоге происходит увеличение стволовости, развитие устойчивости к лекарству, прогрессирование опухоли и накопление TAM. Приведены доказательства того, что LM609, воздействуя на  $\alpha v \beta 3$ , может направлять TAM на разрушение наиболее устойчивых к лекарственным средствам клеток в первичной опухоли, тем самым контролируя прогрессирование опухоли.

Недавно авторами изобретения было опубликовано сообщение о том, что во время развития лекарственной устойчивости на клетках аденокарциномы легкого индуцируется экспрессия интегрина  $\alpha v \beta 3$ , что является необходимым и достаточным для перепрограммирования этих опухолей в стволовоподобное состояние. Учитывая роль, которую играют раковые стволовые клетки в переключении макрофагов с типа M1 на M2 (переключение макрофагов с типа M1 на M2 связано с прогрессированием рака легких), был поставлен вопрос, обуславливает ли экспрессия  $\alpha v \beta 3$  на клетках аденокарциномы легкого превращение макрофагов. Соотношение макрофагов типа M1 к типу M2 в  $\alpha v \beta 3$ -положительных опухолях было заметно ниже, чем у опухолей, в которых отсутствовал  $\alpha v \beta 3$ . Затем мышей, несущих  $\alpha v \beta 3$ -положительные опухоли, лечили моноклональным антителом (LM609), нацеленным на этот рецептор, для оценки его способности менять фенотип макрофагов в этих опухолях. LM609 оказалось способным избирательно уничтожать  $\alpha v \beta 3$ -положительные раковые стволовые клетки через антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), заметно повышая чувствительность этих опухолей к воздействию терапии. Эти результаты показали, что  $\alpha v \beta 3$ -экспрессирующие раковые стволовые клетки способствуют увеличению количества про-опухолевых M2 ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM). Опосредованное ADCC уничтожение  $\alpha v \beta 3$ -положительных раковых стволовых клеток продлевает чувствительность опухоли к терапии.

#### Фармацевтические композиции и составы

В альтернативных вариантах осуществления предоставлены фармацевтические композиции и составы, например, содержащие анти- $\alpha v \beta 3$  (avb3) антитела, и способы уничтожения или уменьшения количества экспрессирующих полипептид  $\alpha v \beta 3$  (avb3) раковых клеток или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума, лечения, ослабления или регрессии, или замедления развития у нуждающегося в этом индивидуума рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha v \beta 3$  (avb3), ослабления или замедления развития рака, вызванного или инициированного, или поддерживаемого раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha v \beta 3$  на своих клеточных поверхностях, манипулирования TAM *in vivo* или повышения чувствительности экспрессирующего полипептид  $\alpha v \beta 3$  (avb3) рака или опухоли к воздействию терапии.

В альтернативных вариантах осуществления композиции, представленные в настоящем описании, и композиции, используемые для практической реализации способов, представленных в настоящем описании, готовят вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В альтернативных вариантах осуществления фармацевтические композиции, используемые для практической реализации способов, представленных в настоящем описании, можно вводить парентерально, местно, перорально или путем локального введения, например в виде аэрозоля, или трансдермально. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены любым способом и могут быть введены в виде различных единичных дозированных форм в зависимости от состояния или заболевания и

степени заболевания, общего состояния здоровья каждого пациента, полученного предпочтительного способа введения и т.п. Подробные сведения о способах приготовления составов и введения хорошо описаны в научной и патентной литературе, см., например, последнее издание Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA («Remington's»).

Терапевтические агенты, представленные в настоящей заявке, например, содержащие анти- $\alpha\text{v}\beta 3$  (avb3) антитела, и антитела, используемые для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке, можно вводить отдельно или в качестве компонента фармацевтического состава (композиции) или одновременно, до и/или после введения другого активного агента, например ингибитора фактора роста, причем ингибитор фактора роста необязательно содержит ингибитор рецепторной тирозинкиназы (RTK), ингибитор Src, ингибитор с антиметаболического действия, гемцитабин, GEMZAR<sup>TM</sup>, митотический яд, паклитаксел, таксол, ABRAXANE<sup>TM</sup>, эрлотиниб, TARCEVA<sup>TM</sup>, лапатиниб, TYKERB<sup>TM</sup>, цетуксамиб, ERBITUX<sup>TM</sup> или ингибитор инсулиноподобного фактора роста.

Фармацевтические композиции и составы, например, содержащие анти- $\alpha\text{v}\beta 3$  (avb3) антитела, могут быть приготовлены для введения любым удобным способом для применения человеком или в ветеринарии. В композициях также могут присутствовать смачивающие агенты, эмульгаторы и лубриканты, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, регулятор скорости высвобождения, агенты для покрытий, подсластители, ароматизаторы и отдушки, консерванты и антиоксиданты.

Составы композиций, представленных в настоящей заявке и используемые для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке, включают составы, подходящие для перорального/назального, местного, парентерального, ректального и/или интравагинального введения. Для удобства составы могут быть представлены в единичной дозированной форме и могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, будет варьировать в зависимости от хозяина, подверженного лечению, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения единичной дозированной формы, обычно представляет собой количество соединения, оказывающее терапевтический эффект.

Фармацевтические составы, представленные в настоящей заявке и используемые для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке, могут быть получены любым способом, известным в данной области для производства фармацевтических препаратов. Такие лекарственные вещества могут содержать подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты. Состав может быть смешан с нетоксичными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, которые пригодны для производства. Составы могут содержать один или более разбавителей,

эмульгаторов, консервантов, буферов, вспомогательных веществ и т.д. и могут быть представлены в таких формах, как жидкости, порошки, эмульсии, лиофилизированные порошки, спреи, кремы, лосьоны, составы с контролируемым высвобождением, таблетки, пилюли, гели, составы на пластырях, в имплантатах и т.д.

Фармацевтические составы для перорального введения могут быть приготовлены с использованием фармацевтически приемлемых носителей, хорошо известных в данной области, в соответствующих и подходящих дозировках. Такие носители позволяют получать фармацевтические составы в единичных дозированных формах в виде таблеток, желатиновых таблеток, пилюль, порошка, драже, капсул, жидкостей, пастилок, гелей, сиропов, кашниц, суспензий и т.д., подходящих для приема пациентом внутрь. В случае твердого вспомогательного вещества фармацевтические препараты для перорального применения могут быть приготовлены путем необязательного измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул, после добавления, при необходимости, подходящих дополнительных соединений для получения ядер таблеток или драже. Подходящие твердые наполнители являются углеводными или белковыми наполнителями, включая, например, сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; крахмал из кукурузы, пшеницы, риса, картофеля или других растений; целлюлозу, такую как метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или натрий-карбоксиметилцеллюлоза; и камеди, включая гуммиарабик и трагакант; и белки, например желатин и коллаген. Могут быть добавлены разрыхлители или солюбилизующие агенты, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или их соли, такие как альгинат натрия.

Ядра драже снабжены подходящими покрытиями, такими как концентрированные растворы сахаров, которые также могут содержать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, гель карбопол, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лака и подходящие органические растворители или смеси растворителей. В покрытия таблеток или драже могут быть добавлены красители или пигменты для идентификации продукта или для характеристики количества активного соединения (т.е. дозировки). Фармацевтические препараты, представленные в настоящей заявке и используемые для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке, также можно использовать перорально путем применения, например, твердых капсул, изготовленных из желатина, а также мягких герметичных капсул, изготовленных из желатина и покрытия, такого как глицерин или сорбит. Твердые капсулы могут содержать активные агенты, смешанные с наполнителем или связующими, такими как лактоза или крахмалы, лубриканты, такие как тальк или стеарат магния, и, необязательно, стабилизаторы. В мягких капсулах активные агенты могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин или жидкий полиэтиленгликоль со стабилизаторами или без них.

Водные суспензии могут содержать активный агент (например, анти- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  (avb3) антитело или полипептид) в смеси с наполнителями, подходящими для приготовления водных суспензий. Такие вспомогательные вещества включают суспендирующий агент,

такой как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и гуммиарабик, а также диспергирующие или увлажняющие агенты, такие как встречающийся в природе фосфатид (например, лецитин), продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой (например, полиоксиэтиленстеарат), продукт конденсации этиленоксида с длинноцепочечным алифатическим спиртом (например, гептадекаэтилен оксидетанол), продукт конденсации этиленоксида с неполным эфиром, полученным из жирной кислоты и гексита (например, полиоксиэтилен сорбитолмоноолеат), или продукт конденсации этиленоксида с неполным сложным эфиром, полученным из жирной кислоты и ангидрида гексита (например, полиоксиэтилен сорбитан моноолеат). Водная суспензия также может содержать один или более консервантов, таких как этил или *n*-пропил *p*-гидроксибензоат, один или более красителей, один или более ароматизаторов и один или более подсластителей, таких как сахароза, аспартам или сахарин. Составы могут быть скорректированы по осмолярности.

Фармацевтические препараты на масляной основе особенно полезны для введения гидрофобных активных агентов (например, анти- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  ( $\text{avb3}$ ) антитела или полипептида), используемых для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке. Суспензии на масляной основе могут быть приготовлены путем суспендирования активного агента в растительном масле, таком как арахисовое масло, оливковое масло, кунжутное масло или кокосовое масло, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин; или их смеси. См., например, патент США № 5716928, в котором описано использование эфирных масел или компонентов эфирных масел для повышения биодоступности и уменьшения межиндивидуальной и внутрииндивидуальной вариабельности перорально вводимых гидрофобных фармацевтических соединений (см. также патент США № 5858401). Масляные суспензии могут содержать загуститель, такой как пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подсластители, такие как глицерин, сорбит или сахароза, могут быть добавлены для получения приятного на вкус перорального препарата. Для сохранности этих составов могут быть добавлены антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота. В качестве примера масляного носителя, пригодного для инъекций, см. Minto (1997) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:93–102. Фармацевтические составы, представленные в настоящей заявке, также могут быть в форме эмульсий масло–в–воде. Масляная фаза может представлять собой растительное масло или минеральное масло, описанное выше, или их смесь. Подходящие эмульгирующие агенты включают природные камеди, такие как гуммиарабик и трагакантовая камедь, природные фосфатиды, такие как соевый лецитин, сложные эфиры или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гексита, такие как сорбитан моноолеат, и продукты конденсации этих неполных эфиров с этиленоксидом, такие как полиоксиэтилен сорбитан моноолеат. Эмульсия также может содержать подсластители и ароматизаторы, как в составе сиропов и эликсиров. Такие составы также могут содержать смягчающее средство, консервант или краситель.

В практическом варианте осуществления, представленном в настоящей заявке, фармацевтические соединения также можно вводить интраназально, интраокулярно и интравагинально, включая суппозитории, инсуффляцию, порошки и аэрозольные составы (примеры стероидных ингалянтов см. Rohatagi (1995) *J. Clin. Pharmacol.* 35:1187–1193; Tjwa (1995) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 75:107–111). Составы для суппозиторий могут быть приготовлены путем смешивания лекарственного средства с подходящим нераздражающим наполнителем, который является твердым при обычных температурах, но жидким при температуре тела и, следовательно, будет плавиться в организме, высвобождая лекарственное средство. Такими материалами являются масло какао и полиэтиленгликоли.

В практических вариантах осуществления, представленных в настоящей заявке, фармацевтические соединения могут доставляться чрескожно, местным путем, в виде аппликаторных палочек, растворов, суспензий, эмульсий, гелей, кремов, мазей, паст, желе, красок, порошков и аэрозолей.

В практических вариантах осуществления, представленных в настоящей заявке, фармацевтические соединения также могут доставляться в виде микросфер для медленного высвобождения в организме. Например, микросферы можно вводить посредством внутрикожной инъекции лекарственного вещества, которое медленно высвобождается подкожно; см. Rao (1995) *J. Biomater Sci. Polym. Ed.* 7:623–645; в виде биоразлагаемых и инъекционных гелевых составов см., например, Gao (1995) *Pharm. Res.* 12:857–863 (1995); или в виде микросфер для перорального введения см., например, Eyles (1997) *J. Pharm. Pharmacol.* 49:669–674.

В практических вариантах осуществления, представленных в настоящей заявке, фармацевтические соединения можно вводить парентерально, например, путем внутривенного (IV) введения или введения в полость тела или просвет органа. Эти составы могут содержать раствор активного агента, растворенного в фармацевтически приемлемом носителе. Приемлемыми носителями и растворителями, которые можно использовать, являются вода и раствор Рингера, изотонический хлорид натрия. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды можно использовать стерильные жирные масла. Для этой цели можно использовать любое мягкое жирное масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, при приготовлении инъекционных препаратов также можно использовать жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Эти растворы являются стерильными и, как правило, не содержат нежелательных веществ. Эти составы могут быть стерилизованы обычными, хорошо известными методами стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые дополнительные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH и буферные агенты, регулирующие токсичность агенты, например ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и т.п. Концентрация активного агента в этих препаратах может варьировать в широких пределах и выбирается в первую очередь на

основе объемов жидкости, вязкости, массы тела и т.п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения и потребностями пациента. Для внутривенного введения состав может представлять собой стерильный инъекционный препарат, такой как стерильная инъекционная водная или масляная суспензия для инъекций. Эта суспензия может быть приготовлена с использованием таких подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов. Стерильный препарат для инъекций также может представлять собой суспензию в нетоксичном приемлемом для парентерального введения разбавителе или растворителе, таком как раствор 1,3-бутандиола. Введение можно осуществлять в виде болюсной или непрерывной инфузии (например, путем, по существу, непрерывного введения в кровеносный сосуд в течение определенного периода времени).

Фармацевтические соединения и составы, представленные в настоящей заявке и используемые для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке, могут быть лиофилизированы. Также предоставляются стабильные лиофилизированные составы, содержащие композицию, представленную в настоящей заявке, которая может быть получена путем лиофилизации раствора, содержащего фармацевтическое средство, представленное в настоящей заявке, и объемобразующий агент, например маннит, трегалозу, рафинозу и сахарозу или их смеси. Способ приготовления стабильного лиофилизированного состава может включать лиофилизацию раствора, содержащего примерно 2,5 мг/мл белка, примерно 15 мг/мл сахарозы, примерно 19 мг/мл NaCl и натрий-цитратный буфер, имеющий pH более 5,5, но менее 6,5. См., например, заявку на патент США № 20040028670.

Композиции и составы, представленные в настоящей заявке и используемые для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке, могут быть доставлены с помощью липосом. Используя липосомы, в частности, когда поверхность липосом несет лиганды, специфичные для клеток-мишеней или иным образом предпочтительно направленные на конкретный орган, можно осуществить целенаправленную доставку *in vivo* активного агента в клетки-мишени. См., например, патенты США № 6063400; 6007839; Al-Muhammed (1996) *J. Microencapsul.* 13:293-306; Chonn (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:698-708; Ostro (1989) *Am. J. Hosp. Pharm.* 46:1576-1587.

Составы, представленные в настоящей заявке и используемые для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В терапевтических применениях композиции вводят субъекту, уже страдающему от состояния, инфекции или заболевания, в количестве, достаточном для лечения, облегчения или частичного купирования клинических проявлений состояния, инфекции или заболевания и его осложнений («терапевтически эффективное количество»). Например, в альтернативных вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящей заявке, вводят в количестве, достаточном для уничтожения или уменьшения количества

экспрессирующих полипептид  $\alpha\beta 3$  ( $\alpha\beta 3$ ) раковых клеток или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума; лечения, ослабления или регрессии, или замедления развития рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta 3$  ( $\alpha\beta 3$ ), у нуждающегося в этом индивидуума; и/или ослабления или замедления развития раковых заболеваний, вызванных или инициированных, или поддерживаемых раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha\beta 3$  на своих клеточных поверхностях. Количество фармацевтической композиции, достаточное для достижения этого, определяется как «терапевтически эффективная доза». Схема дозирования и количества, эффективные для этого применения, т.е. «режим дозирования», будут зависеть от множества факторов, включая стадию заболевания или состояния, тяжесть заболевания или состояния, общее состояние здоровья пациента, физическое состояние пациента, возраст и т.п. При расчете режима дозирования для пациента также учитывается способ введения.

В случае режима дозирования также следует учитывать фармакокинетические параметры, хорошо известные в данной области, т.е. скорость абсорбции активных веществ, биодоступность, метаболизм, клиренс и т.п. (см., например, Hidalgo–Aragones (1996) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58:611–617; Groning (1996) *Pharmazie* 51:337–341; Fotherby (1996) *Contraception* 54:59–69; Johnson (1995) *J. Pharm. Sci.* 84:1144–1146; Rohatagi (1995) *Pharmazie* 50:610–613; Brophy (1983) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:103–108; ссылку на Remington's см. выше). Уровень техники позволяет клиницисту определять режим дозирования для каждого отдельного пациента, активного агента и заболевания или состояния, подверженного лечению. Руководство, предоставленное для аналогичных композиций, используемых в качестве фармацевтических препаратов, могут быть использованы в качестве руководства для определения режима дозирования, т.е. схемы дозирования и уровней доз, вводимых способами, представленными в настоящей заявке, которые являются правильными и подходящими.

Однократное или многократное введение составов можно осуществлять в зависимости от дозы и частоты, требуемых и переносимых пациентом. Составы должны обеспечивать количество активного агента, достаточное для эффективного лечения, профилактики или ослабления состояний, заболеваний или симптомов, раскрытых в настоящем описании. Например, приведенный в качестве примера фармацевтический состав для перорального введения композиций, представленных в настоящей заявке или используемых для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке, может быть представлен в суточном количестве от примерно 0,1 до 0,5 до примерно 20, 50, 100 или 1000 мкг или более на килограмм массы тела в сутки. В альтернативном варианте осуществления используются дозы от примерно 1 мг до примерно 4 мг на кг массы тела пациента в сутки. В отличие от перорального введения, в кровоток, в полость тела или в просвет органа можно вводить более низкие дозы. По существу, более высокие дозы можно использовать при местном или пероральном введении или введении с помощью порошков, спрея или ингаляции. Фактические способы

получения парентерально или непарентерально вводимых составов известны или очевидны специалистам в данной области техники и более подробно описаны в таких публикациях, как Remington's, см. выше.

Способы, представленные в настоящей заявке, могут дополнительно включать совместное введение с другими лекарственными веществами или фармацевтическими средствами, например, композициями для лечения рака, септического шока, инфекции, лихорадки, боли и связанных с ними симптомов или состояний. Например, способы и/или композиции и составы, представленные в настоящей заявке, могут быть приготовлены в виде одной лекарственной формы и/или могут вводиться вместе с антибиотиками (например, антибактериальными или бактериостатическими пептидами или белками), в частности, такими, которые эффективны против грамотрицательных бактерий, жидкостями, цитокинами, иммунорегуляторными агентами, противовоспалительными агентами, комплемент-активирующими агентами, такими как пептиды или белки, содержащие коллаген-подобные домены или фибриноген-подобные домены (например, фиколин), углеводсвязывающие домены и т.п. и их комбинации.

#### Наночастицы и липосомы

Также предоставлены наночастицы и липосомальные мембраны, содержащие соединения (например, анти- $\alpha v \beta 3$  ( $\alpha v \beta 3$ ) антитела), используемые для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке. В альтернативных вариантах осуществления также предоставлены наночастицы и липосомальные мембраны, нацеленные на опухолевые (раковые) стволовые клетки и нефункциональные стволовые клетки. В одном из аспектов композиции, используемые для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке, главным образом нацелены на раковые клетки или раковые стволовые клетки.

В альтернативных вариантах осуществления также предоставлены наночастицы и липосомальные мембраны, содержащие (дополнительно к соединениям, используемым для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке) молекулы, например пептиды или антитела, которые оказывают направленное селективное воздействие на аномально растущие, больные, инфицированные, нефункциональные и/или раковые (опухолевые) клеточные рецепторы. В альтернативных вариантах осуществления также предоставлены наночастицы и липосомальные мембраны, использующие рецептор  $\text{IL-11}$  и/или рецептор  $\text{GRP78}$  в качестве рецепторов-мишеней на клетках, например опухолевых клетках, например раковых клетках простаты или яичников. См., например, публикацию заявки на патент США №. 20060239968.

Также предоставлены наноячейки для обеспечения последовательной доставки двух разных терапевтических агентов с разными способами действия или разными фармакокинетическими характеристиками, по меньшей мере, одна из которых содержит композицию, используемую для практической реализации способов, представленных в настоящей заявке. Наноячейка образуется путем инкапсулирования наноядра с первым агентом в липидную везикулу, содержащую второй агент; см., например, Sengupta et al.,

публикация патента США № 20050266067. Агент во внешнем липидном компартменте высвобождается первым и может оказывать свое действие до высвобождения агента в наноядре. Система доставки наночейки может быть приготовлена в виде любой фармацевтической композиции для доставки пациентам.

В одном из вариантов осуществления агент, подавляющий или истощающий активность или экспрессию гена ацетилтрансферазы, транскрипта и/или белка, содержится во внешней липидной везикуле наночейки, а антиангиогенный агент, представленный в настоящей заявке, загружают в наноядро. Такая компоновка позволяет активным агентам высвобождаться первыми и быть доставленными в опухоль до прекращения кровоснабжения опухоли, вызываемого композицией, раскрытой в настоящем описании.

Также предоставлены многослойные липосомы, содержащие соединения, используемые для практической реализации представленных в настоящем описании вариантов осуществления, например, для трансдермальной абсорбции, например, как описано в Park et al., публикации патента США № 20070082042. Многослойные липосомы могут быть получены с помощью смеси компонентов масляной фазы, включающей сквалан, стерин, церамиды, нейтральные липиды или масла, жирные кислоты и лецитины, с размером частиц от примерно 200 до 5000 нм, для захвата раскрытой в настоящем описании композиции.

Многослойная липосома, используемая для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, может дополнительно включать антисептик, антиоксидант, стабилизатор, загуститель и т.п. для улучшения стабильности. Можно использовать синтетические и натуральные антисептики, например, в количестве от 0,01 до 20%. Можно использовать антиоксиданты, например, ВНТ, эрисорбат, токоферол, астаксантин, растительный флавоноид и их производные или антиоксидант растительного происхождения. Для стабилизации липосомной структуры можно использовать стабилизатор, например, полиолы и сахара. Типичные полиолы включают бутиленгликоль, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, дипропиленгликоль и этилкарбитол; примерами сахаров являются трегалоза, сахароза, маннит, сорбит и хитозан, или моносахарид, или олигосахарид, или высокомолекулярный крахмал. Для улучшения стабильности дисперсии сконструированных липосом в воде можно использовать загуститель, например, натуральный загуститель или акриламид, или синтетический полимерный загуститель. Типичные загустители включают природные полимеры, такие как гуммиарабик, ксантановую камедь, геллановую камедь, камедь и крахмал из бобов рожкового дерева, производные целлюлозы, такие как гидроксиэтилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза и карбоксиметилцеллюлоза, синтетические полимеры, такие как полиакриловая кислота, полиакриламид или поливинилпиролон, и поливиниловый спирт и его сополимеры или сшитые материалы.

Липосомы могут быть получены любым способом, например, описанным Park et al., публикация патента США № 20070042031, включая способ получения липосомы

путем инкапсулирования терапевтического продукта, где способ включает введение водного раствора в первый резервуар; введение раствора органического липида во втором резервуаре, при этом один из указанного водного раствора и указанного раствора органического липида включает терапевтический продукт; смешивание водного раствора с указанным раствором органического липида в первой области смешивания с получением раствора липосом, при этом раствор органического липида смешивают с указанным водным раствором так, чтобы по существу мгновенно получалась липосома, инкапсулирующая терапевтический продукт; и сразу же после этого раствор липосом смешивают с буферным раствором с получением разбавленного раствора липосом.

Также предоставлены наночастицы, содержащие соединения, используемые для практической реализации представленных в настоящем описании вариантов осуществления (например, анти- $\alpha\nu\beta 3$  ( $\alpha\nu\beta 3$ ) антитела), для доставки композиции в виде наночастицы, содержащей лекарственное средство (например, вторичной наночастицы), описанной, например, в публикации патента США № 20070077286. В одном из вариантов осуществления также предоставлены наночастицы, содержащие жирорастворимое лекарственное средство, раскрытое в настоящем описании, или жирорастворимое водорастворимое лекарственное средство для взаимодействия с солью двухвалентного или трехвалентного металла.

#### *Липосомы*

Композиции (например, анти- $\alpha\nu\beta 3$  ( $\alpha\nu\beta 3$ ) антитела) и составы, используемые для практической реализации представленных в настоящем описании вариантов осуществления, могут быть доставлены с помощью липосом. Используя липосомы, особенно когда поверхность липосом несет лиганды, специфичные по отношению к клеткам-мишеням или иным образом предпочтительно направленные на конкретный орган или клетку, например раковые стволовые клетки, можно осуществить целенаправленную *in vivo* доставку активного агента в клетки-мишени. См., например, патенты США № 6063400; 6007839; Al-Muhamed (1996) J. Microencapsul. 13:293–306; Chonn (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6:698–708; Ostro (1989) Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576–1587. Например, в одном из вариантов осуществления композиции и составы, используемые для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, доставляются с помощью липосом, имеющих твердые липиды, содержащие головные группы и гидрофобные хвосты, например, имеющих связанный с полиэтиленгликолем липид, содержащий боковую цепь, совпадающую по меньшей мере с частью липида, описанного, например, в заявке на патент США № 20080089928. В другом варианте осуществления композиции и составы, используемые для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, доставляются с помощью амфотерных липосом, содержащих смесь липидов, например смесь, содержащую катионный амфифил, анионный амфифил и/или нейтральный амфифил, описанные, например, в публикации заявки на патент США № 20080088046 или 20080031937. В другом варианте осуществления композиции и составы, используемые для

практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, доставляются с помощью липосом, содержащих полиалкиленгликолевый фрагмент, связанный с липосомой через тиоэфирную группу, и антитело, также связанное с липосомой через тиоэфирную группу, как описано, например, в публикации заявки на патент США № 20080014255. В другом варианте осуществления композиции и составы, используемые для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, доставляются с помощью липосом, включающих глицериды, глицеролфосфолипиды, глицерофосфолипиды, глицерофосфонолипиды, сульфолипиды, сфинголипиды, фосфолипиды, изопренолиды, стероиды, стеарины, стеролы и/или углеводы, содержащие липиды, как описано, например, в публикации заявки на патент США № 20070148220.

Антитела и антигенсвязывающие полипептиды в виде фармацевтических композиций

В альтернативных вариантах осуществления также предлагаются композиции и способы, содержащие антитела или их активные фрагменты или  $\alpha\nu\beta 3$ -связывающие полипептиды (например, содержащие CDR, способные специфически связываться с  $\alpha\nu\beta 3$ ), способные специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha\nu\beta 3$  ( $\alpha\nu\beta 3$ ), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC, причем антитело или полипептид имеет Fc-домен или эквивалентный домен или фрагмент, способный связываться с макрофагами и инициировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), уничтожающую клетки, с которыми это антитело специфически связывается (например, анти- $\alpha\nu\beta 3$  ( $\alpha\nu\beta 3$ ) антитела). В альтернативных вариантах осуществления предоставлены композиции для введения этих антител и полипептидов.

В альтернативных аспектах антитело или полипептид для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, может содержать пептид или полипептид, полученный, смоделированный или по существу кодируемый геном иммуноглобулина или генами иммуноглобулина или их фрагментами, способными специфически связываться с антигеном или эпитопом, см. например *Fundamental Immunology*, Third Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) *J. Immunol. Methods* 175:267–273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85–97. В альтернативных аспектах антитело или полипептид для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, включает антигенсвязывающие части, т.е. «антигенсвязывающие участки» (например, фрагменты, подпоследовательности, определяющие комплементарность области (CDR)), которые сохраняют способность связывать антиген, включая (i) Fab фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub> фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент (Ward et al.,

(1989) *Nature* 341:544–546), который состоит из домена VH; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Одноцепочечные антитела также включены в объем термина «антитело» в виде ссылки.

В альтернативных вариантах осуществления способ включает использование любого полипептида, способного специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha\upsilon\beta 3$  ( $\alpha\upsilon\beta 3$ ), включая полипептиды, содержащие  $\alpha\upsilon\beta 3$ -связывающую CDR моноклонального антитела LM609 (Chemicon Int., Temecula, CA) (CVCL\_KS89) (мышинная гибридома с номером доступа ATCC HB 9537) (см., например, патент США № 7,115,261); моноклональное антитело CBL544, полученное из клона 23C6 (MilliporeSigma, Burlington, MA); моноклональное антитело ab7166 (abcam, Cambridge, MA); или моноклональное антитело ab78289 (abcam, Cambridge, MA), которые могут быть легко определены специалистом в данной области.

В альтернативных вариантах осуществления можно использовать «гуманизированные» антитела, включая формы нечеловеческих (например, мышинных) антител, которые представляют собой химерные антитела, содержащие минимальную последовательность (например, антигенсвязывающий фрагмент), полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В альтернативных вариантах осуществления гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины, в которых остатки из гипервариабельной области (HVR) реципиента (например, последовательности человеческого антитела) заменены остатками из гипервариабельной области (HVR) нечеловеческого вида (донорского антитела), такого как мышь, крыса, кролик или примат, не являющийся человеком, имеющими требуемую специфичность, сродство и способность. В альтернативных вариантах осуществления остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками, отличными от человеческих, для улучшения сродства связывания антигена.

В альтернативных вариантах осуществления гуманизированные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или донорском антителе. Эти модификации могут быть сделаны для улучшения сродства или функциональной активности антител. В альтернативных вариантах осуществления гуманизированное антитело может содержать, по существу, все, по меньшей мере один и, как правило, два вариабельных домена, в которых все или по существу все гипервариабельные области соответствуют доменам нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все Ab-каркасные области представляют собой последовательности человеческого иммуноглобулина.

В альтернативных вариантах осуществления гуманизированное антитело, используемое для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно человеческого иммуноглобулина, или может быть получена из человеческого иммуноглобулина.

Однако в альтернативных вариантах осуществления также можно использовать

полностью человеческие антитела для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, включая человеческие антитела, содержащие аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком. Это определение человеческого антитела по существу исключает гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антигенсвязывающие остатки.

В альтернативных вариантах осуществления способ включает использование гуманизированных антител, способных специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha\upsilon\beta3$  ( $\alpha\upsilon\beta3$ ), включая гуманизированные  $\alpha\upsilon\beta3$ -связывающие варианты моноклонального антитела LM609 (Chemicon Int., Temecula, CA) (CVCL\_KS89) (мышинная гибридома с номером доступа ATCC HB 9537) (см., например, патент США № 7,115,261); моноклональное антитело CBL544, полученное из клона 23C6 (MilliporeSigma, Burlington, MA); моноклональное антитело ab7166 (abcam, Cambridge, MA); или моноклональное антитело ab78289 (abcam, Cambridge, MA), причем специалист в данной области может легко определить различные гуманизированные варианты.

В альтернативных вариантах осуществления антитела, используемые для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, включают «аффинно зрелые» антитела, например антитела, содержащие одно или более изменений в одной или более гипервариабельных областях, которые приводят к улучшению сродства антитела к антигену; например, гистонметил- и/или ацетилтрансферазе, по сравнению с родительским антителом, которое не имеет таких изменений. В альтернативных вариантах осуществления антитела, используемые для практической реализации представленных в настоящей заявке вариантов осуществления, представляют собой зрелые антитела, имеющие наномолярное или даже пикомолярное сродство к антигену-мишени, например, гистонметил- и/или ацетилтрансферазе. Аффинно-зрелые антитела могут быть получены с помощью процедур, известных в данной области.

В альтернативных вариантах осуществления антитела, применяемые для осуществления способов, предоставленных в настоящей заявке, представляют собой: моноклональное антитело LM609 (Chemicon Int., Temecula, CA) (CVCL\_KS89) (мышинная гибридома с номером доступа ATCC HB 9537) (см., например, патент США № 7,115,261); моноклональное антитело CBL544, полученное из клона 23C6 (MilliporeSigma, Burlington, MA); моноклональное антитело ab7166 (abcam, Cambridge, MA); или моноклональное антитело ab78289 (abcam, Cambridge, MA) и гуманизированные версии этих антител. Моноклональное антитело LM609 описано, например, в Cheresch et al., J Biol Chem. 1987; 262 (36):17703–11; и патентах США № (USPN) 5,753,230 и USPN 6,590,079. LM609 представляет собой мышинное моноклональное антитело, специфичное к интегрину  $\alpha\upsilon\beta3$ , см., например, Cheresch, D.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6471–6475 (1987) и Cheresch et al., J. Biol. Chem. 262:17703–17711 (1987). LM609 было получено для воздействия на рецептор адгезии клеток M21, теперь известный как интегрин  $\alpha\upsilon\beta3$ . LM609 ингибирует

прикрепление клеток M21 к  $\alpha\beta 3$ -лигандам, таким как витронектин, фибриноген и фактор фон Виллебранда (Cheresh and Spigo, см. выше), а также является ингибитором  $\alpha\beta 3$ -опосредованных патологий, таких как опухолевый ангиогенез (Brooks et al. Cell 79:1157–1164 (1994)), развитие грануляционной ткани при ранах на коже (Clark et al., Am. J. Pathology, 148:1407–1421 (1996)) и миграция клеток гладких мышц, происходящая во время рестеноза (Choi et al. J. Vascular Surg., 19:125–134 (1994); Jones et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:2482–2487 (1996)).

#### Наборы и инструкции

Также предоставлены наборы, содержащие композиции (например, антитела) для практической реализации способов и применений, представленных в настоящей заявке, необязательно также включающие инструкции по их применению. В альтернативных вариантах осуществления также предоставлены наборы, содержащие моноклональные антитела или полипептиды, способные специфически связываться с  $\alpha\beta 3$ , как описано в настоящем документе.

Изобретение дополнительно описано со ссылкой на приведенные ниже примеры; однако следует понимать, что приведенные в настоящем описании примеры вариантов осуществления или изобретение не ограничены такими примерами.

#### ПРИМЕРЫ

##### ПРИМЕР 1: Иммунологическое нацеливание на лекарственно-устойчивый рак легких

Этот пример и данные, представленные в настоящем описании, демонстрируют эффективность композиций и способов, предоставляемых в настоящей заявке, для лечения рака. В настоящем описании представлены композиции и способы лечения опухолей, которые адаптированы к терапевтическому действию и стали очень агрессивными и инвазивными. В этом примере описан подход, способный предотвратить этот процесс, разработанный с учетом двух явлений, возникающих во время приобретения лекарственной устойчивости. Во-первых, EGFR-мутантные опухоли легких, обработанные ингибитором RTK, эрлотинибом, приобретают способность экспрессировать интегрин  $\alpha\beta 3$ , и этот маркер тесно связан с увеличением количества циркулирующих опухолевых клеток. Во-вторых, в опухолях, обработанных эрлотинибом, наблюдается накопление связанных с опухолью макрофагов M2, что демонстрирует, каким образом опухоль может манипулировать иммунной системой для поддержания своей пролиферации и метастазирования. В то время как каждое из этих событий стимулирует развитие опухоли с более агрессивным и устойчивым к лекарствам фенотипом, их сосуществование создает уникальную возможность. Авторы изобретения показывают, что системная доставка анти- $\alpha\beta 3$  моноклонального антитела LM609 не только разрушает лекарственно-устойчивые клетки в первичной опухоли, но и уничтожает циркулирующие опухолевые клетки. С точки зрения механики действия, уничтожение опухолевых клеток происходит за счет антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), для которой макрофаги являются

эффекторными клетками *in vitro* и *in vivo*. Несмотря на то, что эрлотиниб сначала способен ограничивать рост, терапия с помощью эрлотиниба в конечном итоге приводит к развитию более агрессивной опухоли за счет увеличения количества клеток, экспрессирующих  $\alpha\upsilon\beta 3$ /ALDH1A1, и привлечения связанных с опухолью макрофагов. За счет направленного воздействия на  $\alpha\upsilon\beta 3$ , композиции и способы, предлагаемые в настоящей заявке, включая использование LM609, в качестве примера, задействуют манипуляцию опухоли иммунной системой для разрушения наиболее устойчивых к лекарственным средствам клеток и остановки прогрессирования опухоли.

Ранее группой авторов изобретения уже сообщалось о существенном увеличении экспрессии интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$ , наблюдаемом у пациентов с аденокарциномой легкого, прогрессирующей при лечении эрлотинибом; об экспрессии  $\alpha\upsilon\beta 3$ , наблюдаемой у мышей с  $\alpha\upsilon\beta 3$ -отрицательными опухолями легких по мере того, как они становились устойчивыми к эрлотинибу (2); и об очень высоком уровне  $\alpha\upsilon\beta 3$  при метастатических поражениях по сравнению с первичными опухолями у тех же пациентов (3). Фактически, было установлено, что интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$  является необходимым и достаточным для инициирования развития не только устойчивости к эрлотинибу, но и развития агрессивного фенотипа стволовоподобных клеток (2–4). Таким образом, терапевтическое воздействие на  $\alpha\upsilon\beta 3$  может не только уменьшить прогрессирование опухоли, но также может уничтожить большую часть лекарственно-устойчивых клеток в популяции.

На молекулярном уровне была определена роль  $\alpha\upsilon\beta 3$  в этом процессе, которая не зависела от его функции как рецептора адгезии (5). Таким образом, стратегии блокирования канонической функции интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$  с помощью циклических RGD-пептидов или аналогичных антагонистов интегрин, которые конкурируют за связывание интегрин-лиганд, не влияют на его способность управлять стволовостью и устойчивостью к лекарственным веществам (2). Вместо этого было отмечено, что нарушение передачи сигналов TANK-связывающей киназы 1 (TBK1)/NF- $\kappa$ B, управляемой  $\alpha\upsilon\beta 3$ , способно вернуть прежний фенотип этих агрессивных опухолевых клеток (2). Поскольку этот подход обрезает только один из нижележащих каскадов реакций, были рассмотрены альтернативные подходы для прямого нацеливания на опухолевые клетки, экспрессирующие интегрин  $\alpha\upsilon\beta 3$ , и их уничтожения.

В дополнение к блокирующим функции свойствам, определенные антитела могут маркировать опухолевые клетки, которые должны быть уничтожены под воздействием антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Этот процесс запускается, когда антитело связывается с антигенами опухолевых клеток и одновременно распознается Fc $\gamma$ R на иммунных эффекторных клетках (6). С учетом сообщений других групп о накоплении ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM) в устойчивых к эрлотинибу опухолях (2, 7, 8), в настоящем описании предлагается стратегия использования этого состояния повышенной экспрессии  $\alpha\upsilon\beta 3$  и обогащения макрофагов в качестве тактики для устранения агрессивных  $\alpha\upsilon\beta 3$ -экспрессирующих опухолевых клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предыдущие исследования на мышах и людях показали, что устойчивость рака легких к ингибиторам EGFR приводит к усилению регуляции  $\alpha\beta3$  и приобретению фатальной устойчивости к лекарственным веществам и фенотипа стволовоподобных клеток (2). Для оценки этого пути приобретения устойчивости, мышей с подкожными ксенотрансплантатами  $\alpha\beta3$ -отрицательного EGFR-мутантного немелкоклеточного рака легкого (HCC827) обрабатывали носителем или эрлотинибом и измеряли скорость роста опухоли в течение определенного периода времени (фиг. 1A). Хотя эрлотиниб вызывал ожидаемое ингибирование роста опухоли в течение нескольких дней, в конечном итоге через несколько недель опухоли снова начали расти (фиг. 1B). Как ранее наблюдалось у пациентов, устойчивых к эрлотинибу (2), в устойчивых к эрлотинибу опухолях экспрессия интегрин  $\alpha\beta3$  была выше по сравнению с группой носителя, а клетки, экспрессирующие  $\alpha\beta3$ , были положительными в отношении альдегиддегидрогеназы 1A1 (ALDH1A1), маркера стволовых клеток (фиг. 1B-D). HCC827-ErlR, клеточная линия, созданная из устойчивой к эрлотинибу опухоли, сохраняла устойчивость к эрлотинибу *in vitro*, а также была устойчивой к ингибитору EGFR третьего поколения, осимертинибу (фиг. 1E-F). Важно отметить тот факт, что эти результаты были подтверждены с помощью  $\alpha\beta3$ -отрицательных EGFR-мутантных ксенотрансплантатов PC9.

Учитывая, что интегрин  $\alpha\beta3$  связан с прогрессированием опухоли и метастазированием некоторых видов рака (3, 9), был сделан вывод, что индуцированная эрлотинибом экспрессия  $\alpha\beta3$  может способствовать усилению инвазии опухоли. Для оценки этой возможности определяли количество циркулирующих опухолевых клеток (СТС) у животных, несущих ортотопическую опухоль HCC827, во время системного лечения эрлотинибом (фиг. 1A). Хотя ингибирование роста опухоли в легком сохранялось через 30 дней после начала лечения эрлотинибом, в группе, получавшей эрлотиниб было обнаружено резкое увеличение количества СТС (фиг. 1G-H), что свидетельствует о повышенном распространении опухолевых клеток в кровотоке до приобретения первичной опухолевой массой устойчивости к лекарственному средству. Важно отметить, что подавляющее большинство СТС, обнаруженных после лечения эрлотинибом, оказалось  $\alpha\beta3$ -положительными (фиг. 1G-H). Эти результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на контроль роста первичной опухоли, наблюдаемый в начале лечения, эрлотиниб обладает способностью превращать клетки в  $\alpha\beta3$ /ALDH1A1-положительные клетки, обладающие способностью к интравазации и выживающие в кровотоке, что подчеркивает необходимость в направленном воздействии на эту популяцию стволовоподобных лекарственно-устойчивых опухолевых клеток, которые появляются до возможности детектирования прогрессирования заболевания.

Связанные с опухолью макрофаги (ТАМ), в частности M2-тип (10), секретируют факторы роста, про-онкогенные цитокины и иммуносупрессивные ферменты, способствующие прогрессированию опухоли через индукцию ангиогенеза, метастазирования и подавления иммунитета (11-14). Соответственно, появление

большого количества TAM в опухолевых тканях связано с плохим прогнозом при различных типах рака, включая аденокарциному легких (7). Как наблюдалось для опухолей у пациентов с аденокарциномой легкого, устойчивой к ингибиторам EGFR (7, 8), в опухолях, устойчивых к эрлотинибу, было обнаружено более высокое количество TAM (CD11b-положительных, Ly-6G-отрицательных), в частности M2-типа (CD206-положительные или CD206- и MHCII-отрицательные в популяции TAM), по сравнению с опухолями у мышей, получавших контрольный носитель (фиг. 1I).

Вышеприведенные результаты позволяют предположить, что среда устойчивой к эрлотинибу опухоли может идеально подходить для терапевтического подхода, в котором используется инфильтрация макрофагов для нацеливания на  $\alpha\beta3$ -экспрессирующие опухолевые клетки. В качестве стратегии для достижения этой цели было использовано человеческое анти- $\alpha\beta3$  (LM609) антитело, которое было ранее разработано и охарактеризовано авторами изобретения как противоопухолевое/антиангиогенное средство в доклинических моделях (15). Фактически, гуманизованная и аффинно-зрелая форма LM609, этарацизумаб, также показала клиническую активность у некоторых пациентов с солидными опухолями (16–19), хотя гетерогенность в экспрессии  $\alpha\beta3$  может объяснять недостаточную эффективность у других пациентов. Поскольку сообщалось, что этарацизумаб опосредует антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) *in vitro* (19), LM609 рассматривали как уникальную возможность задействовать TAM для нацеливания на популяцию, обогащенную  $\alpha\beta3$ -экспрессирующими опухолевыми клетками, которые появляются во время приобретения устойчивости к эрлотинибу *in vitro*.

Хотя эрлотиниб один приводил к обогащению по  $\alpha\beta3$  и к возобновлению роста опухоли и появлению СТС, комбинация эрлотиниба и LM609 обеспечивала сохранение чувствительности к эрлотинибу (фиг. 2A). LM609 не только уничтожало  $\alpha\beta3$ -положительные опухолевые клетки (фиг. 2B), но и предотвращало увеличение  $\alpha\beta3$ -положительных СТС (фиг. 2C–E), что позволило предположить, что LM609 предотвращает как развитие устойчивости к эрлотинибу, так и интравазацию/выживание циркулирующих  $\alpha\beta3$ -положительных опухолевых клеток во время курса терапии. Хотя интегрин  $\alpha\beta3$  функционирует в качестве молекулы клеточной адгезии (15), лечение только LM609 не влияло на жизнеспособность  $\alpha\beta3$ -положительных или отрицательных клеток. Это открытие согласуется с другими исследованиями, которые показали, что роль интегрин  $\alpha\beta3$  в опухолевых клетках не зависит от его функционирования в качестве молекулы адгезии, а скорее индуцирует свободный рост клеток (2, 3). Вместо этого было обнаружено, что LM609 увеличивает гибель  $\alpha\beta3$ -положительных клеток за счет ADCC, и также было определено, что этот процесс опосредован макрофагами, а не NK-клетками (фиг. 3A и 3B).

Действительно, блокирование Fc $\gamma$  рецепторов на макрофагах уменьшала *in vitro* эффект LM609 (фиг. 3C). Хотя LM609 подавлял *in vivo* рост  $\alpha\beta3$ -положительных опухолей, истощение макрофагов с помощью клодронатных липосом приводило к

исчезновению этого эффекта (фиг. 3D). Вместе, эти исследования указывают на макрофаг–опосредованную ADCC в качестве основного механизма активности LM609 как *in vitro*, так и *in vivo*.

Данное исследование демонстрирует, как терапия эрлотинибом изменяет опухоль за счет усиления экспрессии  $\alpha\beta3$ , и указывает на то, каким образом опухоль может манипулировать иммунной системой хозяина для поддержания лекарственно–устойчивого фенотипа. Хотя эти адаптации могут способствовать прогрессированию опухоли во время лечения эрлотинибом, они также предоставляют уникальную возможность для использования этого сценария. Действительно, анти– $\alpha\beta3$  антитело стимулирует макрофаги на селективное разрушение лекарственно–устойчивых  $\alpha\beta3$ /ALDH1A1–экспрессирующих опухолевых клеток в первичной опухоли, а также CTC, задерживая при этом появление приобретенной резистентности (фиг. 2A). Поскольку LM609 распознает только человеческий интегрин  $\alpha\beta3$ , модель ксенотрансплантата, разработанная авторами изобретения, позволяет отделить его роль в ADCC от любого воздействия на ассоциированные с опухолью эндотелиальные клетки, которым этот интегрин необходим для ангиогенеза (20, 21). Учитывая, что ангиогенез способствует росту опухоли и что LM609 и этарацизумаб являются антителами IgG1 с более высоким сродством к человеческим, а не мышинным Fc $\gamma$ –рецепторам макрофагов (22), эффективность этой терапевтической стратегии в отношении устойчивых к эрлотинибу опухолей у людей может оказаться недооцененной в доклинической оценке авторов изобретения. Кроме того, учитывая, что не только эрлотиниб, но и другие противоопухолевые средства увеличивают экспрессию интегрин  $\beta3$  в клетках эпителиального рака (фиг.6), терапию с помощью анти– $\alpha\beta3$  антитела можно применять с различными терапевтическими средствами. В заключение, в настоящем описании представлены комбинации анти– $\alpha\beta3$  антитела с ингибиторами EGFR и/или другими противораковыми лекарственными средствами в качестве уникального терапевтического подхода, который можно применять для лечения пациентов с эпителиальным раком, прогрессирующим в случае стандартной терапии.

## МЕТОДЫ

### Клеточные линии и реагенты

Клетки аденокарциномы легкого (HCC827 в RPMI) получали из ATCC. Клеточная линия меланомы, M21, была подарена доктором D.L. Morton (Университет Калифорнии, Лос–Анджелес, США). Клеточная линия аденокарциномы легкого, PC9, была подарена доктором Joan Massague (Институт Слоан–Кеттеринг, США). ATCC аутентификацию клеточной линии выполняли с помощью профилей коротких tandemных повторов ДНК. После получения каждую клеточную линию размножали, криоконсервировали в виде клеточных штаммов низких пассажей и регулярно тестировали на микоплазм. Для эктопической экспрессии и генетического нокдауна клетки трансфицировали контрольным вектором (маркированным GFP), интегрином  $\beta3$  или люциферазой с помощью лентивирусной системы, описанной ранее (1). Уровни интегрин  $\alpha\beta3$

тестировали проточной цитометрией, как описано ниже.

Каптизол получали из Cydex™ (NC0604701) и разбавляли в воде до 6%. Эрлотиниб получали из SellekChem™ (S1023) и разбавляли в ДМСО для *in vitro* экспериментов или в каптизоле для *in vivo* экспериментов. LM609 получали в лаборатории, как описано ранее (2). Активность подтверждали анализом на адгезию, как описано ниже. Растворы контрольных и клодронатных липосом получали от ClodronateLiposome.com.

#### Анализ на адгезию

Клетки ( $\alpha\text{v}\beta 3+$ ) M21 высевали на покрытую витронектином или коллагеном чашку с LM609 и без него. Прилипшие клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым, и выполняли количественное определение поглощения в видимой части спектра (600 нм) в каждой лунке с помощью микропланшетного ридера.

#### Модель ксенотрансплантата устойчивой к эрлотинибу аденокарциномы легкого

Устойчивую к эрлотинибу модель ксенотрансплантата аденокарциномы легкого использовали, как описано ранее (3). Вкратце, клетки HCC827 ( $5 \times 10^6$  опухолевых клеток в 100 мкл RPMI) вводили подкожно в правый бок самкам мышей nu/nu (8–10 недель). Опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля (объем опухоли ( $\text{мм}^3$ ) = длина  $\times$  ширина  $\times$  ширина/2). Животных с объемом опухоли 250–700  $\text{мм}^3$  распределяли случайным образом на группы, получавшие каптизол (перорально, шесть раз в неделю) и PBS (внутрибрюшинно, два раза в неделю), каптизол и LM609 (внутрибрюшинно, 10 мг/кг, два раза в неделю), эрлотиниб (перорально, 6,25 мг/кг, шесть раз в неделю) и PBS или эрлотиниб и LM609. Мышей в группах, получавших каптизол, умерщвляли на 15 день из-за большого размера опухоли. Группы эрлотиниба умерщвляли на 50 день. Опухолевые ткани делили на три части: для мгновенной заморозки, для заморозки в соединении OCT (VWR, 25608–930) или для фиксации в 10% формалине (Fisher Scientific, 23–313095) для дальнейшего анализа.

#### Количественная оценка TAM

TAM выделяли из опухолевой ткани, как описано ранее (4). Мгновенно замороженные опухолевые ткани оттаивали, измельчали и диссоциировали в HBSS, содержащем коллагеназу IV (Sigma, C5138, 0,5 мг/мл), гиалуронидазу (Sigma, H2654, 0,1 мг/мл), диспазу II (Roche, 04942078001, 0,6 ед./мл) и ДНКазу IV (Millipore, 260913–10MU, 5 ед./мл), при 37°C в течение 15 минут. Клеточные суспензии фильтровали через 70 мкм сито для клеток и промывали PBS. Суспензии из одиночных клеток ( $10^6$  клеток/100 мкл в 5% BSA в PBS) инкубировали с Mouse BD Fc Block™ (BD Biosciences, 553142, 1:50) в течение 10 минут при 4°C и с флуоресцентно мечеными антителами, CD11b (eBioscience, 17–0112–81, 1:100), Ly-6G (eBioscience, 25–5931, 1:100), CD206 (BioRad, MCA2235PET) и МНСII (BD Biosciences, 562928) в течение одного часа при 4°C. Проточную цитометрию выполняли на BD LSRFortessa™, и с помощью программы для анализа данных проточной цитометрии FlowJo™ (Treestar) вычисляли соотношение TAM (CD11b–положительные, Ly-6G–отрицательные), M1 (CD206–отрицательные, МНСII–положительные среди TAM) и M2 (не являющиеся M1–популяцией среди TAM) в опухолевой ткани.

### Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимическое окрашивание выполняли на неокрашенных FFPE препаратах в соответствии с рекомендациями производителей для набора VECTASTAIN Elite ABC HRP (Vector Laboratories, PK-6100). Использовали антитело к интегрину  $\beta 3$  (Cell Signaling, 13166, 1:200) и биотинилированное козье антикроличье антитело (Vector Laboratories, BA-1000, 1:200). Окрашенные ткани визуализировали с помощью системы NanoZoomer Slide Scanning System<sup>TM</sup> (Hamamatsu), и с помощью ImageJ (НИН) вычисляли долю  $\beta 3$ -положительной области относительно опухолевой ткани (5).

### Модель ортотопической аденокарциномы легкого и выделение CTC

Клетки HCC827, положительные по люциферазе и GFP ( $5 \times 10^6$  клеток в 50 мкл PBS), инъецировали в правые легкие самок мышей nu/nu (8–10 недель). Рост опухоли отслеживали с помощью IVIS SPECTRUM<sup>TM</sup> (PerkinElmer) каждые четыре недели. Через восемь недель после инъекции мышей случайным образом разделили на три группы: до обработки, обработки эрлотинибом (перорально, 6,25 мг/кг, шесть раз/неделя) и обработки комбинацией эрлотиниба с LM609 (внутрибрюшинно, 10 мг/кг, два раза в неделю). Мышей группы до обработки умерщвляли на 8-й неделе для анализа CTC. Мышам групп обработки давали эрлотиниб и/или LM609 в течение четырех недель перед их умерщвлением. Цельную кровь (0,5 мл/мышь) собирали в пробирки EDTA, и с помощью Lymphoprep<sup>TM</sup> (STEMCELL Technologies, 85415) и SepMate<sup>TM</sup> (STEMCELL Technologies, 07801) выделяли PBMC, включая CTC, в соответствии с протоколом производителя. Выделенные клетки промывали PBS, высевали на покрытые поли-L-лизинном (Sigma, P1399) 8-луночные камерные планшеты, фиксировали 4% PFA (VWR, AA43368-9M) и окрашивали с помощью DAPI (Life Technologies, D1306, 1 мкг/мл в 1% BSA в PBS), LM609 (5 мкг/мл в 1% BSA в PBS) и флуоресцентно меченного вторичного антитела (Thermo, A21235, 1:500). Клетки анализировали с использованием конфокального микроскопа Nikon Eclipse C2<sup>TM</sup> (Nikon). CTC определяли как клетки, положительные как по DAPI, так и по GFP. Для каждой мыши подсчитывали количество  $\alpha \beta 3$ -положительных и  $\alpha \beta 3$ -отрицательных CTC. После умерщвления мышей также измеряли объем опухолевой массы в легких с использованием системы флуоресцентной визуализации OV100<sup>TM</sup> (Olympus).

### Создание эрлотиниб-индуцированных $\alpha \beta 3$ -положительных клеточных линий

Клетки HCC827 (HCC827-R), устойчивые к эрлотинибу, и клетки PC9 (PC9-R) создавали, как описано ранее (3). Устойчивость к ингибиторам EGFR (эрлотинибу и AZD9291) подтверждали анализами МТТ (фиг. 1B).

### Анализ МТТ

Клетки высевали в 96-луночные планшеты и после соответствующей обработки клетки инкубировали в растворе МТТ (Sigma, M2128, 0,5 мг/мл питательной среды) в течение двух часов при 37°C. Затем раствор МТТ удаляли, и в каждой лунке растворяли синий кристаллический осадок в ДМСО. Для каждой лунки выполняли количественное определение поглощения в видимой части спектра при 560 нм с помощью

микропланшетного ридера.

#### Выделение макрофагов, полученных из костного мозга (BMDM)

BMDM собирали в асептических условиях у самок мышей C57BL/6 в возрасте от 8 до 10 недель путем промывания костей ног мышей, умерщвленных с помощью RPMI, фильтрования клеток через 70 мкм сито и инкубации в буфере для лизиса красных кровяных клеток Hybri-Max™ (Sigma, R7757).

#### Выделение NK-клеток

Спленоциты собирали в асептических условиях у самок мышей C57BL/6 в возрасте 8–10 недель путем измельчения селезенки мышей, умерщвленных с помощью PBS, содержащего 2% FBS и 1 mM EDTA, фильтрования через 40 мкм сита и инкубации в буфере для лизиса красных кровяных клеток Hybri-Max™ (Sigma, R7757). NK-клетки выделяли из спленоцитов с помощью набора для выделения NK-клеток NK Cell Isolation Kit II™ (Miltenyi, 130–096–892).

#### Анализ ADCC

Клетки-мишени, окрашенные с помощью набора CFSE Cell Division Tracker Kit™ (BioLegend, 423801) или CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit™ (ThermoFisher, C34564), совместно культивировали с BMDM или NK-клетками с изотипом IgG или LM609 или без них в течение пяти часов при 37°C. После инкубации клетки окрашивали PI (Sigma, P4864, 1:1000), и выполняли цитометрию на устройстве BD LSRFortessa™. Отношение мертвых клеток-мишеней (PI-положительных) к общей популяции клеток-мишеней (CFSE-положительные или положительные по дальнекрасной области спектра) определяли, как описано ранее (6).

#### Модель ксенотрансплантата аденокарциномы легкого с истощением по макрофагам

Клетки HCC827-β3 ( $5 \times 10^6$  опухолевых клеток в 100 мкл RPMI) подкожно инъецировали в правый бок самкам мышей nu/nu (8–10 недель). Опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля. Животных с объемом опухоли 30–110 мм<sup>3</sup> случайным образом распределяли по группам, получавшим контрольную липосому (внутрибрюшинно, 200 мкл, два раза в неделю) и PBS (внутрибрюшинно, два раза в неделю, n=5), контрольную липосому (внутрибрюшинно, 200 мкл, два раза в неделю) и LM609 (внутрибрюшинно, 10 мг/кг, два раза в неделю, n=6), клодронатную липосому (внутрибрюшинно, 200 мкл, два раза в неделю) и PBS (внутрибрюшинно, два раза в неделю, n=5) или клодронатную липосому (внутрибрюшинно, 200 мкл, два раза в неделю) и LM609 (внутрибрюшинно, 10 мг/кг, два раза в неделю, n=6). После 15 дней лечения опухолевые ткани фиксировали и замораживали в соединении OCT.

#### Иммунофлюоресценция

Иммунофлуоресцентное окрашивание выполняли на неокрашенных OCT препаратах. Препараты подвергали пермеабиллизации, используя 0,1% TritonX-100 (Bio-Rad, 1610407) в PBS, в течение одной минуты, блокировали 10% NGS (Jackson ImmunoResearch, 005–000–121) в PBS в течение двух часов и инкубировали с DAPI (Life

Technologies, D1306, 1 мкг/мл в 1% BSA в PBS) и антимышиным антителом F4/80 (eBioscience, 14–4801, конъюгированное с флуорокором TexasRed в OneWorldLab) в течение двух часов при комнатной температуре. Фотографии конфокальной микроскопии получали с помощью конфокального микроскопа Nikon Eclipse C2<sup>TM</sup> (Nikon). F4/80–положительную долю вычисляли по отношению к опухолевой ткани с помощью ImageJ<sup>TM</sup> (NIH) (5).

#### Проточная цитометрия для интегрина $\alpha\beta3$

Клеточные осадки промывали, блокировали 1% BSA в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре и окрашивали LM609 (5 мкг/мл в 1% BSA в PBS) и флуоресцентно меченным вторичным антителом (Thermo, A21235, 1:500). После окрашивания клетки инкубировали с PI (Sigma, P4864, 1:1000), и выполняли проточную цитометрию на BD LSRFortessa<sup>TM</sup>. Уровни интегрина  $\alpha\beta3$  анализировали с помощью программы для анализа данных проточной цитометрии FlowJo<sup>TM</sup> (TreeStar).

#### Экспрессия генов

Общую РНК собирали с помощью набора для очистки РНК RNeasy<sup>TM</sup> (Qiagen). кДНК синтезировали с помощью обратной транскриптазы MultiScribe<sup>TM</sup>, используя случайные праймеры (Thermo), и выполняли ПЦР с обратной транскрипцией на LightCycler<sup>TM</sup> с зондами SYBR Green (Roche). Экспрессию относительно эталонных генов определяли методом 2–ddCT.

#### Одобрение исследования

Все исследования проводили в соответствии с протоколом S05018, и их проведение было одобрено Комитетом по уходу и использованию животных UCSD. Все исследования соответствуют рекомендациям NIH по уходу и использованию лабораторных животных.

#### Статистический анализ

Для сравнения независимых выборочных групп использовали тест Стьюдента, U–критерий Манна–Уитни или ANOVA. Оценку Каплана–Мейера выполняли для измерения выживаемости без признаков устойчивости. Для статистического анализа использовали Excel (Microsoft) и SPSS (IBM Analytics).

#### Описание чертежей

##### Фиг. 1. Устойчивость к эрлотинибу влияла на первичную опухоль, CTC и строму.

Фиг. 1A: схематическое изображение модели устойчивого к эрлотинибу ксенотрансплантата.

Фиг. 1B–D: устойчивые к эрлотинибу ткани демонстрируют увеличение клеток, экспрессирующих  $\alpha\beta3$ /ALDH1A1. Мышей HCC827 с ( $\beta3$ )–ксенотрансплантатом обрабатывали носителем (Носит., n=5) или эрлотинибом (ErlR, n=9). Измеряли рост опухоли (фиг. 1B). Опухолевые ткани окрашивали на  $\beta3$  (фиг. 1C). Черта соответствует 10 мкм. Клетки, выделенные из устойчивых к эрлотинибу тканей, окрашивали на  $\alpha\beta3$  и ALDH1A1 для проточной цитометрии (фиг. 1D). График построен для двух мышей.

Фиг. 1E–F: устойчивые к эрлотинибу  $\alpha\beta3$ –положительные клетки оказались устойчивыми к ингибитору EGFR третьего поколения, осимертинибу. Опухолевые клетки,

выделенные из мышцы, обработанной носителем (Носит.), и мышцы, обработанной эрлотинибом (ErlR), окрашивали на  $\alpha v\beta 3$  для проточной цитометрии (фиг. 1E). Графики представляют результаты трех экспериментов. Клетки обрабатывали эрлотинибом или осимертинибом в течение 72 часов, и измеряли жизнеспособность клеток (фиг. 1F).

Фиг. 1G–H: Эрлотиниб увеличивает количество СТС, в то время как первичные опухоли все еще отвечают на лечение. Через восемь недель после введения ( $\beta 3^-$ , GFP+, люцифераза+) клеток НСС827 в легкие, мышцей обрабатывали эрлотинибом в течение 30 дней до выделения СТС. СТС окрашивали на  $\alpha v\beta 3$ . У мышцей подсчитывали  $\alpha v\beta 3^-$  положительные ( $\beta 3^+$ ) и отрицательные ( $\beta 3^-$ ) СТС до (до лечения, n=3) и после лечения (после лечения, n=5) (фиг. 1G). Первичные массы визуализировали (фиг. 1H). GFP, опухолевая ткань; черта соответствует 5 мм.

Фиг. 1I: графическое представление данных, показывающих, насколько увеличилось количество M2 TAM в устойчивых к эрлотинибу тканях ксенотрансплантата; процентное содержание M1 (темно-серый) и M2 TAM (светло-серый) в опухолевых тканях сравнивали у групп обработки носителем (n=9) и эрлотинибом (n=9) через 50 дней лечения. Для определения статистической значимости (\*P < 0,05 по сравнению с контролем) использовали двусторонний критерий Стьюдента. Планки погрешности указывают на стандартные ошибки.

#### Фиг 2. LM609 давало менее агрессивный фенотип.

Фиг. 2A: LM609 ингибировало развитие устойчивости к эрлотинибу. Мышей НСС827 с ( $\beta 3^-$ )-ксенотрансплантатом обрабатывали эрлотинибом (Эрлотиниб, n=9) или эрлотинибом и LM609 (Эрлотиниб+LM609, n=10). Рост опухоли измеряли два раза в неделю. Выживаемость без прогрессирования проанализировали с помощью оценки Каплана Мейера.

Фиг. 2B: LM609 уничтожает  $\beta 3^-$ -положительные клетки. Мышей НСС827 с ( $\beta 3^-$ )-ксенотрансплантатом обрабатывали каптизолом и PBS (контроль, n=5), каптизолом и LM609 (LM609, n=5), эрлотинибом и PBS (эрлотиниб, n=9) или эрлотинибом и LM609 (Эрл+LM609, n=10) в течение 50 дней. Опухолевые ткани окрашивали на интегрин  $\beta 3$ , и выполняли количественное определение  $\beta 3^-$ -положительной площади в тканях (n=9 полей на группу) (верхняя панель). Приведены изображения (нижняя панель). Черта соответствует 10 мкм. Для определения статистической значимости (\*P < 0,05) использовали двухсторонний критерий Стьюдента. Планки погрешности указывают стандартные отклонения.

Фиг. 2C–E: LM609 уменьшал количество СТС, индуцированных эрлотинибом. Через восемь недель после инъекции НСС827 ( $\beta 3^-$ , GFP+, люцифераза+) клеток в правое легкое мышам вводили эрлотиниб или комбинацию эрлотиниба и LM609 (эрлотиниб+LM609) в течение четырех недель до выделения СТС. С помощью биолюминесценцию на аппарате IVIS Spectrum измеряли объем опухоли до обработки (до обработки, n=14) и после обработки эрлотинибом (после эрлотиниба, n=4) или комбинацией эрлотиниба и LM609 (после Эрл+LM609, n=5), и выполняли

количественную оценку (фиг. 2С). Представлены изображения (фиг. 2D). CTC окрашивали на  $\alpha\beta3$  для количественной оценки  $\alpha\beta3$ -положительных ( $\beta3+$ ) и отрицательных ( $\beta3-$ ) CTC (фиг. 2E). Показан пример  $\alpha\beta3$ -положительных CTC (нижняя правая панель). Для определения статистической значимости использовали двусторонний критерий Стьюдента (\*P <0,05 по сравнению с данными до обработки). Планки погрешности указывают стандартные ошибки (верхняя панель) и стандартные отклонения (нижняя панель). Черта соответствует 5 мм (верхняя панель); или соответствует 10 мкм (нижняя панель); синий цвет – DAPI; зеленый цвет – GFP; красный цвет –  $\alpha\beta3$ .

Фиг. 3. LM609 уничтожал  $\alpha\beta3$ -положительные клетки через макрофаг-опосредованную ADCC.

Фиг. 3А–С: LM609 уничтожал  $\alpha\beta3$ -положительные клетки через макрофаг-опосредованную ADCC *in vitro*. Анализы ADCC с макрофагами (BMDC), полученными из костного мозга, или NK-клетками выполняли с раковыми клетками с интегрином  $\alpha\beta3$  и без него, обработанными изотипом IgG или LM609 (10 мкг/мл) и/или блокатором Fc. Процент гибели раковых клеток определяли количественно, используя йодид пропидия, методом проточной цитометрии. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней составляло 5:1. Для определения статистической значимости использовали двусторонний критерий Стьюдента (\*P <0,05 по сравнению с контрольными группами изотипа IgG). Планки погрешностей указывают на стандартные ошибки. Пустой вектор соответствует EV;  $\beta3$  – плазида,  $\beta3$ ; Носит. – клетки, выделенные из ткани, обработанной носителем; EriR – клетки, выделенные из ткани, устойчивой к эрлотинибу.

Фиг. 3D–E: LM609 устраняет рост  $\alpha\beta3$ -положительной опухоли только у мышей, имеющих макрофаги. Мышам Nude подкожно инъецировали клетки HCC827, эктопически экспрессирующие  $\beta3$ , и обрабатывали контрольной липосомой и PBS (фиг. 3D левая панель, контроль, n=5), контрольной липосомой и LM609 (фиг. 3D, левая панель, LM609, n=6), клодронатной липосомой и PBS (правая панель, контроль, n=5) или клодронатной липосомой и LM609 (фиг. 3D, правая панель, LM609, n=6). Рост опухоли отслеживали в течение 15 дней, и после обработки выполняли количественную оценку окрашивания F4/80 в опухолевых тканях (правая панель на фиг. 3D, n=10 полей на группу). Двусторонний критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости (\*P <0,05 по сравнению с контролем). Планки погрешностей указывают на стандартные ошибки.

Фиг. 4: Опухолевые клетки, устойчивые к эрлотинибу, содержали интегрин  $\alpha\beta3$  и были устойчивыми к осимертинибу.

Фиг. 4А: обработанная эрлотинибом опухоль приобрела устойчивость. Мышей с подкожно введенным ( $\beta3-$ )ксенотрансплантатом PC9, обрабатывали носителем (Носит.) (n=1) или эрлотинибом (EriR, n=1). Рост опухоли измеряли еженедельно.

Фиг. 4В: клетки из устойчивой к эрлотинибу ткани стали  $\alpha\beta3$ -положительными, в отличие от клеток, полученных от животного, обработанного носителем. Уровни  $\alpha\beta3$  в клетках, выделенных от животных, получавших носитель (Носит.), и животных,

получавших эрлотиниб (ErlR), измеряли проточной цитометрией. Синий цвет – вторичный контроль; красный цвет – окрашенное LM609.

Фиг. 4С: устойчивые к эрлотинибу клетки оказались устойчивыми к осимертинибу. Клетки, полученные от животных, обработанных носителем (Носит.), и животных, обработанных эрлотинибом (ErlR), обрабатывали эрлотинибом или осимертинибом в указанных дозах, и выполняли анализ МТТ для измерения жизнеспособности клеток.

Двусторонний критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости (\*P < 0,05 по сравнению с контролем). Планки погрешностей указывают стандартные отклонения.

Фиг. 5: LM609 ингибировал связывание лиганда с интегрином  $\alpha v \beta 3$ , но не подавлял жизнеспособность клеток.

Фиг. 5А: LM609 ингибировал связывание лиганда с интегрином  $\alpha v \beta 3$ . Клетки ( $\alpha v \beta 3+$ ) M21 высевали на коллаген или витронектин (лиганд  $\alpha v \beta 3$ ) с указанными дозами LM609. Измеряли количество прилипших клеток.

Фиг. 5В: LM609 не влиял на жизнеспособность клеток.  $\alpha v \beta 3$ –Положительные ( $\beta 3+$ ) и  $\alpha v \beta 3$ –отрицательные ( $\beta 3-$ ) клетки параллельно обрабатывали указанными дозами LM609, и для измерения жизнеспособности клеток выполняли анализ МТТ.

Двухсторонний критерий Стьюдента использовали для определения статистической значимости. Планки погрешностей указывают стандартные отклонения. EV – пустой вектор;  $\beta 3$  –  $\beta 3$  плаزمид; Носит. – клетки, выделенные из группы носителя (чувствительной к эрлотинибу); ErlR – клетки, выделенные из ткани, устойчивой к эрлотинибу.

На фиг. 6 приведено графическое представление данных, демонстрирующих, что противораковые терапевтические средства обогащают клетки эпителиального рака интегрином  $\beta 3$ : метод количественной ПЦР использовали для обнаружения экспрессии мРНК субъединиц  $\alpha$ - и  $\beta$ -интегрин в ответ на увеличение дозы перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) в течение 72 часов, выраженное в виде кратности относительно контроля (носителя). Планки погрешности указывают стандартные отклонения. \*P < 0,05 по сравнению с контролем.

#### Литература:

1. Holohan et al., Cancer drug resistance: an evolving paradigm. Nat Rev Cancer. 2013; 13 (10): 714–26.
2. Seguin et al., An integrin beta (3) –KRAS–RalB complex drives tumor stemness and resistance to EGFR inhibition. Nat Cell Biol. 2014; 16 (5): 457–68.
3. Desgrosellier et al., An integrin alpha (v) beta (3) –c–Src oncogenic unit promotes anchorage–independence and tumor progression. Nat Med. 2009; 15 (10): 1163–9.
4. Desgrosellier et al., Integrin alphavbeta3 drives slug activation and stemness in the pregnant and neoplastic mammary gland. Dev Cell. 2014; 30 (3): 295–308.
5. Smith JW, and Cheresch DA. Integrin (alpha v beta 3) –ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor. J Biol Chem. 1990; 265 (4):

2168–72.

6. Carter P. Improving the efficacy of antibody–based cancer therapies. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1 (2): 118–29.

7. Chung et al., Tumor–associated macrophages correlate with response to epidermal growth factor receptor–tyrosine kinase inhibitors in advanced non–small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2012; 131 (3): E227–35.

8. Zhang et al., M2–polarized macrophages contribute to the decreased sensitivity of EGFR–TKIs treatment in patients with advanced lung adenocarcinoma. *Med Oncol*. 2014; 31 (8): 127.

9. Knowles et al., Integrin alphavbeta3 and fibronectin upregulate Slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2013; 73 (20): 6175–84.

10. Biswas SK, and Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010; 11 (10): 889–96.

11. Riabov et al., Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol*. 2014; 5 (75).

12. Trikha et al., E2f3 in tumor macrophages promotes lung metastasis. *Oncogene*. 2016; 35 (28): 3636–46.

13. Noy R, and Pollard JW. Tumor–associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014; 41 (1): 49–61.

14. Kaneda et al., PI3 Kgamma is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature*. 2016; 539 (7629): 437–42.

15. Cheresch DA. Human endothelial cells synthesize and express an Arg–Gly–Asp–directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84 (18): 6471–5.

16. Delbaldo et al.,. Phase I and pharmacokinetic study of etaracizumab (Abegrin), a humanized monoclonal antibody against alphavbeta3 integrin receptor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 2008; 26 (1): 35–43.

17. McNeel et al., Phase I trial of a monoclonal antibody specific for alphavbeta3 integrin (MEDI–522) in patients with advanced malignancies, including an assessment of effect on tumor perfusion. *Clin Cancer Res*. 2005; 11 (21): 7851–60.

18. Hersey et al., A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin alpha (v) beta (3), + or – dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer* 2010; 116 (6): 1526–34.

19. Mulgrew et al., Direct targeting of alphavbeta3 integrin on tumor cells with a monoclonal antibody, Abegrin. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5 (12): 3122–9.

20. Brooks et al., Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*. 1994; 264 (5158): 569–71.

21. Brooks et al., Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 1994; 79 (7): 1157–64.

22. Guilliams et al., The function of Fcgamma receptors in dendritic cells and

macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14 (2): 94–108.

Дополнительная литература

1. Seguin L, Kato S, Franovic A, Camargo MF, Lesperance J, Elliott KC, Yebra M, Mielgo A, Lowy AM, Husain H, et al. An integrin beta3–KRAS–RalB complex drives tumor stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nat Cell Biol.* 2014; 16 (5): 457–68.

2. Cheresh DA, and Spiro RC. Biosynthetic and functional properties of an Arg–Gly–Asp–directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 1987; 262 (36): 17703–11.

3. Seguin L, Kato S, Franovic A, Camargo MF, Lesperance J, Elliott KC, Yebra M, Mielgo A, Lowy AM, Husain H, et al. An integrin beta (3) –KRAS–RalB complex drives tumor stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nat Cell Biol.* 2014; 16 (5): 457–68.

4. Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem CJ, Gorjestani S, Woo G, Nguyen AV, Figueiredo CC, Foubert P, et al. PI3Kgamma is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature.* 2016; 539 (7629): 437–42.

5. Shu JQ, G.; Mohammad, I. A Semi–Automatic Image Analysis Tool for Biomarker Detection in Immunohistochemistry Analysis. *Seventh International Conference on Image and Graphics.* 2013: 937–42.

6. Bracher M, Gould HJ, Sutton BJ, Dombrowicz D, and Karagiannis SN. Three–color flow cytometric method to measure antibody–dependent tumor cell killing by cytotoxicity and phagocytosis. *J Immunol Methods.* 2007; 323 (2): 160–71.

Описан ряд примерных вариантов осуществления. Тем не менее, будет понятно, что могут быть сделаны различные модификации без отклонения от сущности и объема изобретения. Соответственно, другие варианты осуществления находятся в пределах объема приведенной ниже формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

### 1. Способ для:

– уничтожение или уменьшение количества раковых клеток, экспрессирующих полипептид  $\alpha\upsilon\beta 3$  ( $\alpha\upsilon\beta 3$ ), или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума,

– лечения, ослабления или регрессии, или замедления развития рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\upsilon\beta 3$  ( $\alpha\upsilon\beta 3$ ), у нуждающегося в этом индивидуума,

– ослабления или замедления развития онкологических заболеваний, вызванных или индуцированными, или поддерживаемых раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha\upsilon\beta 3$  на своих клеточных поверхностях,

– увеличения популяции макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли *in vivo*, причем необязательно популяция макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли, включает ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM) или популяцию M1 макрофагов,

– повышения чувствительности рака или опухоли, экспрессирующих полипептид  $\alpha\upsilon\beta 3$  ( $\alpha\upsilon\beta 3$ ), к воздействию терапии, необязательно химиотерапии, необязательно терапии ингибитором фактора роста,

причем способ включает:

(a) введение нуждающемуся в этом индивидууму антитела или полипептида, способного специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha\upsilon\beta 3$  ( $\alpha\upsilon\beta 3$ ), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC, или

(b) (i) предоставление антитела или полипептида, способного специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha\upsilon\beta 3$  ( $\alpha\upsilon\beta 3$ ), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC,

причем антитело или полипептид имеет Fc-домен или эквивалентный домен или фрагмент, способный связываться с макрофагами и инициировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), уничтожающую клетку, с которой специфически связывается антитело,

(ii) введение антитела или полипептида нуждающемуся в этом индивидууму,

приводящее к:

уничтожению или уменьшению количества экспрессирующих полипептид  $\alpha\upsilon\beta 3$  ( $\alpha\upsilon\beta 3$ ) раковых клеток или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума,

– лечению, ослаблению или регрессии или замедлению развития рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\upsilon\beta 3$  ( $\alpha\upsilon\beta 3$ ), у нуждающегося в этом индивидуума,

– ослаблению или замедлению развития онкологических заболеваний, вызванных или инициированных, или поддерживаемых раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha\upsilon\beta 3$  на своих клеточных поверхностях,

– увеличению популяции макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли *in vivo*, причем необязательно популяция макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли, включает ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM) или популяцию M1 макрофагов,

– повышению чувствительности рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta 3$  (*avb3*), к воздействию терапии.

2. Способ по п.1, в котором антитело или полипептид представляет собой или содержит гуманизованное антитело, необязательно гуманизованное мышинное антитело.

3. Способ по п.1, в котором антитело или полипептид представляет собой рекомбинантное или сконструированное антитело или полипептид.

4. Способ по п.1, в котором антитело представляет собой человеческое антитело или человеческий полипептид.

5. Способ по п.1, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело или поликлональное антитело.

6. Способ по п.5, в котором антитело или полипептид представляет собой моноклональное антитело LM609 (Chemicon Int., Temecula, CA) (CVCL\_KS89) (мышиную гибридому с номером доступа ATCC HB 9537) (см., например, патент США № 7,115,261); моноклональное антитело CBL544, полученное из клона 23C6 (MilliporeSigma, Burlington, MA); моноклональное антитело ab7166 (abcam, Cambridge, MA); или моноклональное антитело ab78289 (abcam, Cambridge, MA) или любой их гуманизованный вариант, или любой полипептид, содержащий  $\alpha\beta 3$ -связывающий CDR LM609, CBL544, ab7166 или ab78289.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором макрофаг является человеческим макрофагом или ассоциированным с опухолью макрофагом (TAM).

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором рак представляет собой эпителиальный рак или эпителиальную опухолевую клетку.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором рак представляет собой лекарственно-устойчивый рак, и лекарственное средство необязательно представляет собой ингибитор фактора роста или ингибитор киназы, причем ингибитор фактора роста необязательно содержит ингибитор рецепторной тирозинкиназы (RTK), необязательно эрлотиниб.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело или полипептид вводят нуждающемуся в этом индивидууму внутривенно, внутримышечно или подкожно.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело или полипептид готовят в виде стерильной фармацевтической композиции или препарата или готовят для внутривенного, внутримышечного или подкожного введения.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором доза антитела или полипептида основана на фиксированной дозе или дозе на основе массы тела, или

фиксированной дозе от примерно 100 до 1200 мг в месяц, или дозе от примерно 0,3 до 10 мг/кг.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий введение ингибитора фактора роста, причем ингибитор фактора роста необязательно включает ингибитор рецепторной тирозинкиназы (RTK), ингибитор Src, ингибитор антиметаболического действия, гемцитабин, GEMZAR™, митотический яд, паклитаксел, таксол, ABRAXANE™, эрлотиниб, TARCEVA™, лапатиниб, ТУКЕРВ™, цетуксамиб, ERBITUX™ или ингибитор инсулиноподобного фактора роста.

14. Применение антитела или полипептида, способного специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha\beta3$  (avb3), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC; или антитела или полипептида, способного специфически связываться с полипептидом интегрина  $\alpha\beta3$  (avb3), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC, где антитело или полипептид имеет Fc-домен или эквивалентный домен или фрагмент, способный связываться с макрофагом и инициировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), уничтожающую клетку, с которой специфически связывается антитело или полипептид, при получении лекарственного средства для:

- уничтожения или уменьшения количества экспрессирующих полипептид  $\alpha\beta3$  (avb3) раковых клеток или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума,
- лечения, ослабления или регрессии или замедления развития рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta3$  (avb3), у нуждающегося в этом индивидуума,
- ослабления или замедления развития онкологических заболеваний, вызванных или инициированных, или поддерживаемых раковыми или опухолевыми клетками или раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha\beta3$  на своих клеточных поверхностях,
- увеличения популяции макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли *in vivo*, причем необязательно популяция макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли, включает ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM) или популяцию M1 макрофагов,
- повышения чувствительности рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta3$  (avb3), к воздействию терапии.

15. Фармацевтическая композиция или состав для применения в способе:

- уничтожения или уменьшения количества экспрессирующих полипептид  $\alpha\beta3$  (avb3) раковых клеток или раковых стволовых клеток (CSC) у нуждающегося в этом индивидуума,
- лечения, ослабления или регрессии, или замедления развития рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\beta3$  (avb3), у нуждающегося в этом индивидуума,
- ослабления или замедления развития онкологических заболеваний, вызванных или инициированных, или поддерживаемых раковыми или опухолевыми клетками или

раковыми стволовыми клетками (CSC), экспрессирующими полипептиды  $\alpha\nu\beta 3$  на своих клеточных поверхностях,

– увеличения популяции макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли *in vivo*, причем необязательно популяция макрофагов, способных вызывать воспалительный ответ и подавлять рост опухоли, включает ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM) или популяцию M1 макрофагов,

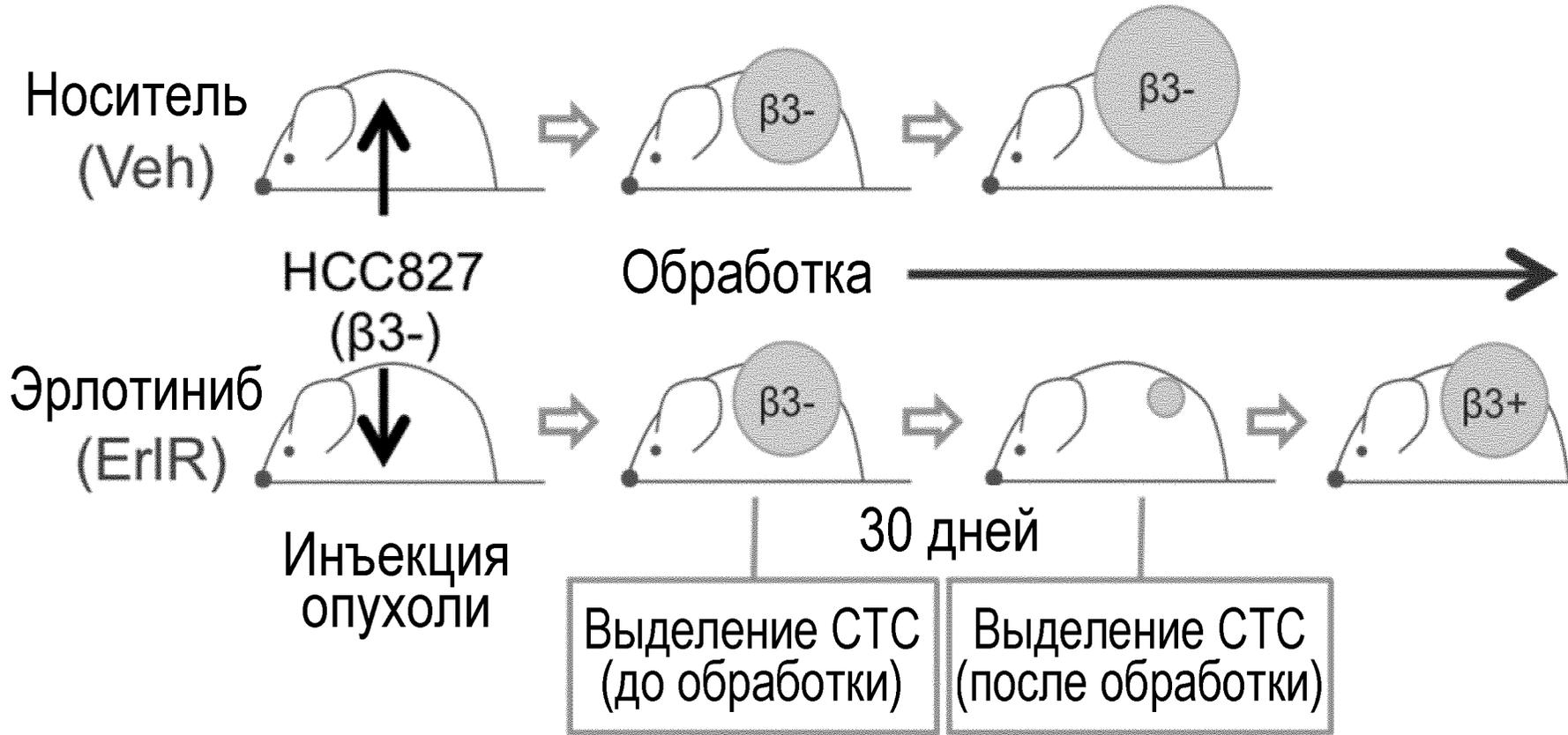
– повышения чувствительности рака или опухоли, экспрессирующей полипептид  $\alpha\nu\beta 3$  ( $\alpha\nu\beta 3$ ), к воздействию терапии,

причем фармацевтическая композиция или состав содержит:

антитело или полипептид, способный специфически связываться с полипептидом интегрин  $\alpha\nu\beta 3$  ( $\alpha\nu\beta 3$ ), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC; или антитело или полипептид, способный специфически связываться с полипептидом интегрин  $\alpha\nu\beta 3$  ( $\alpha\nu\beta 3$ ), экспрессируемым на раковой или опухолевой клетке или на CSC, где антитело или полипептид имеет Fc-домен или эквивалентный домен или фрагмент, способный связываться с макрофагами и инициировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), уничтожающую клетку, с которой специфически связывается антитело или полипептид.

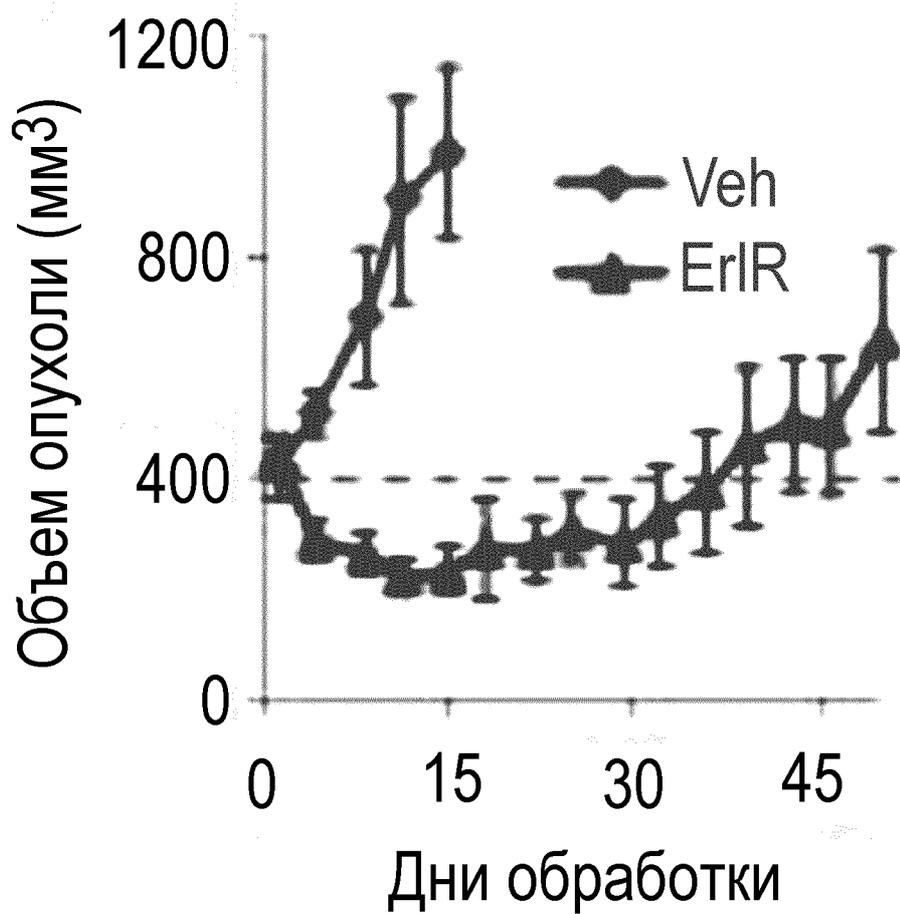
16. Набор, включающий фармацевтическую композицию или состав по п.15.

ФИГ.1А



ФИГ.1В

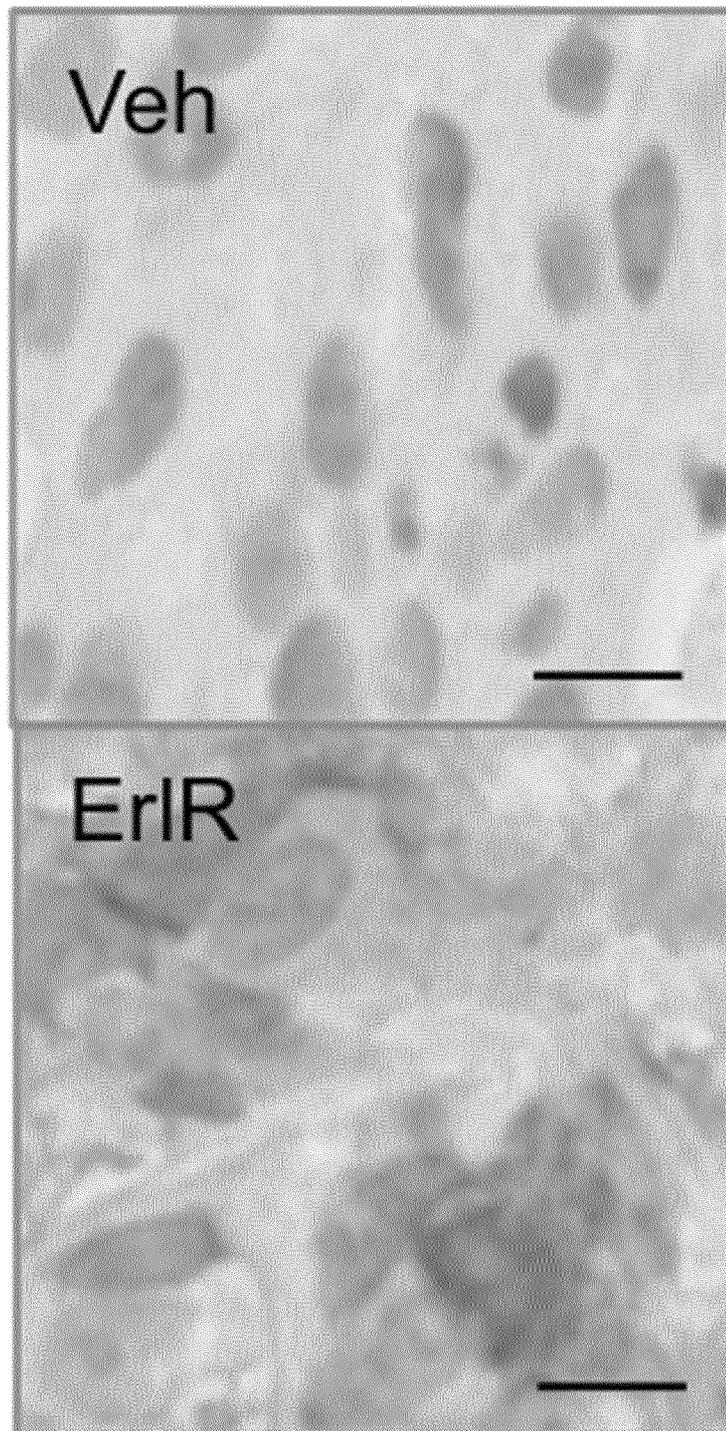
Ксенотрансплантат HCC827



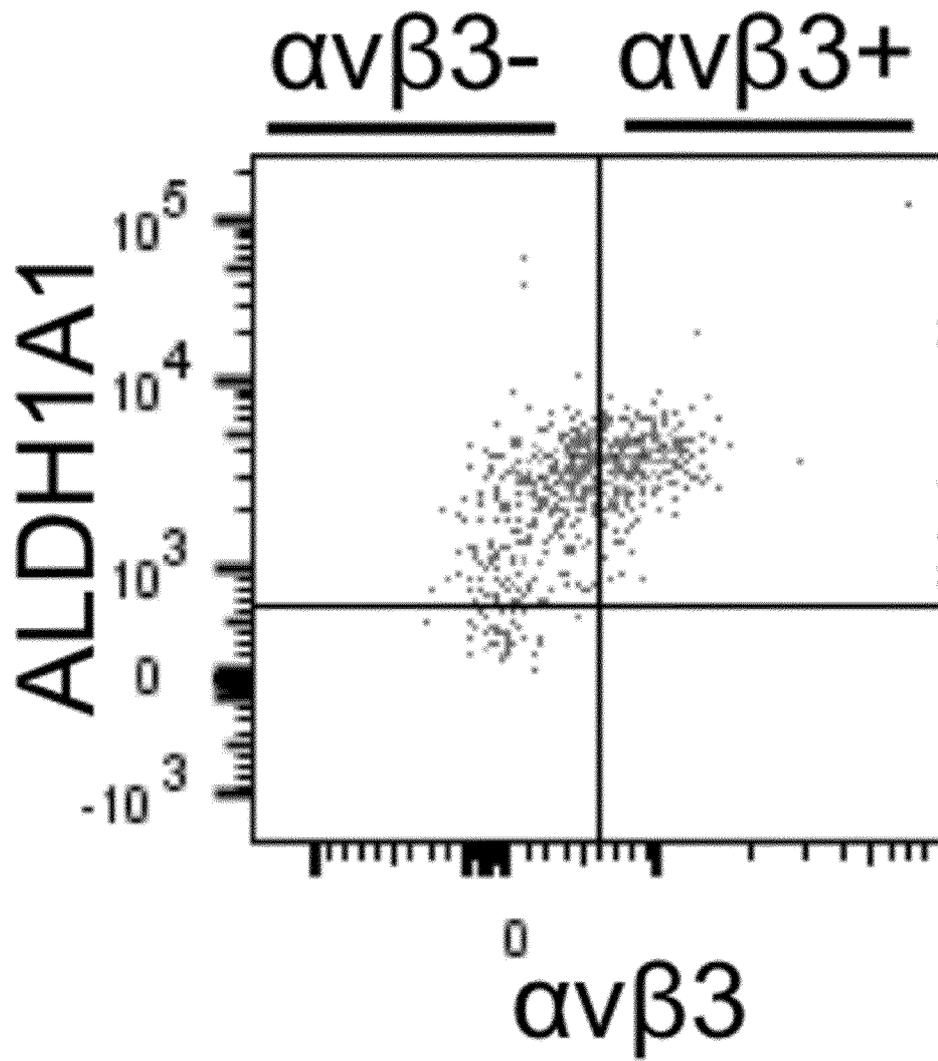
3/25

ФИГ.1С

IHC  $\beta 3$



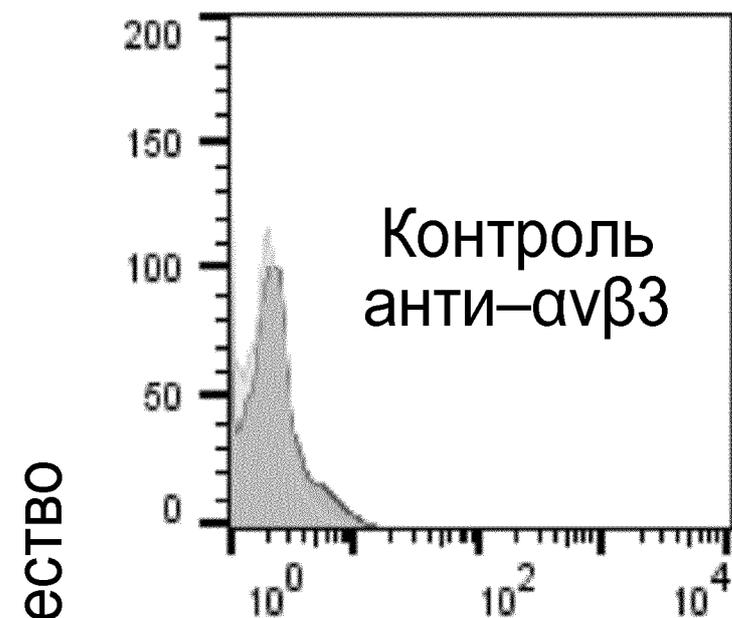
ΦΙΓ.1D



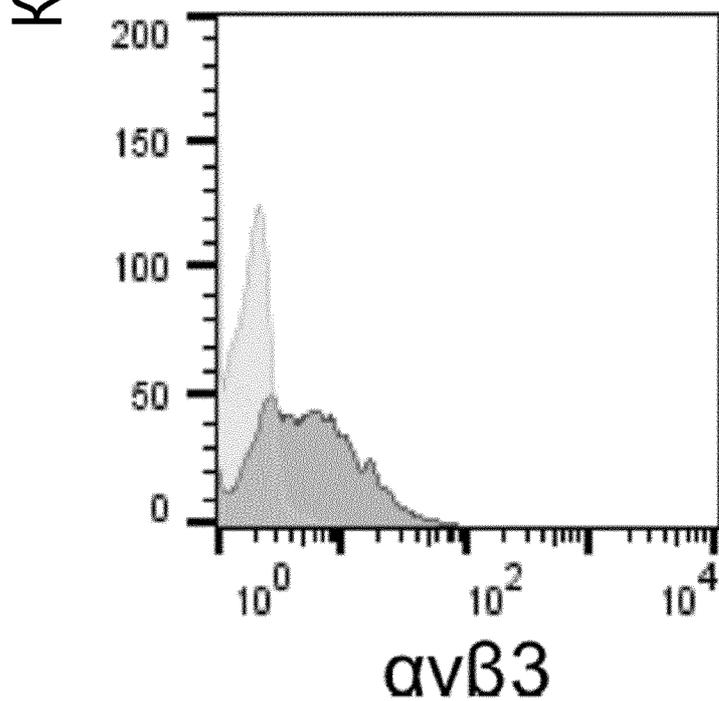
5/25

ФИГ.1Е

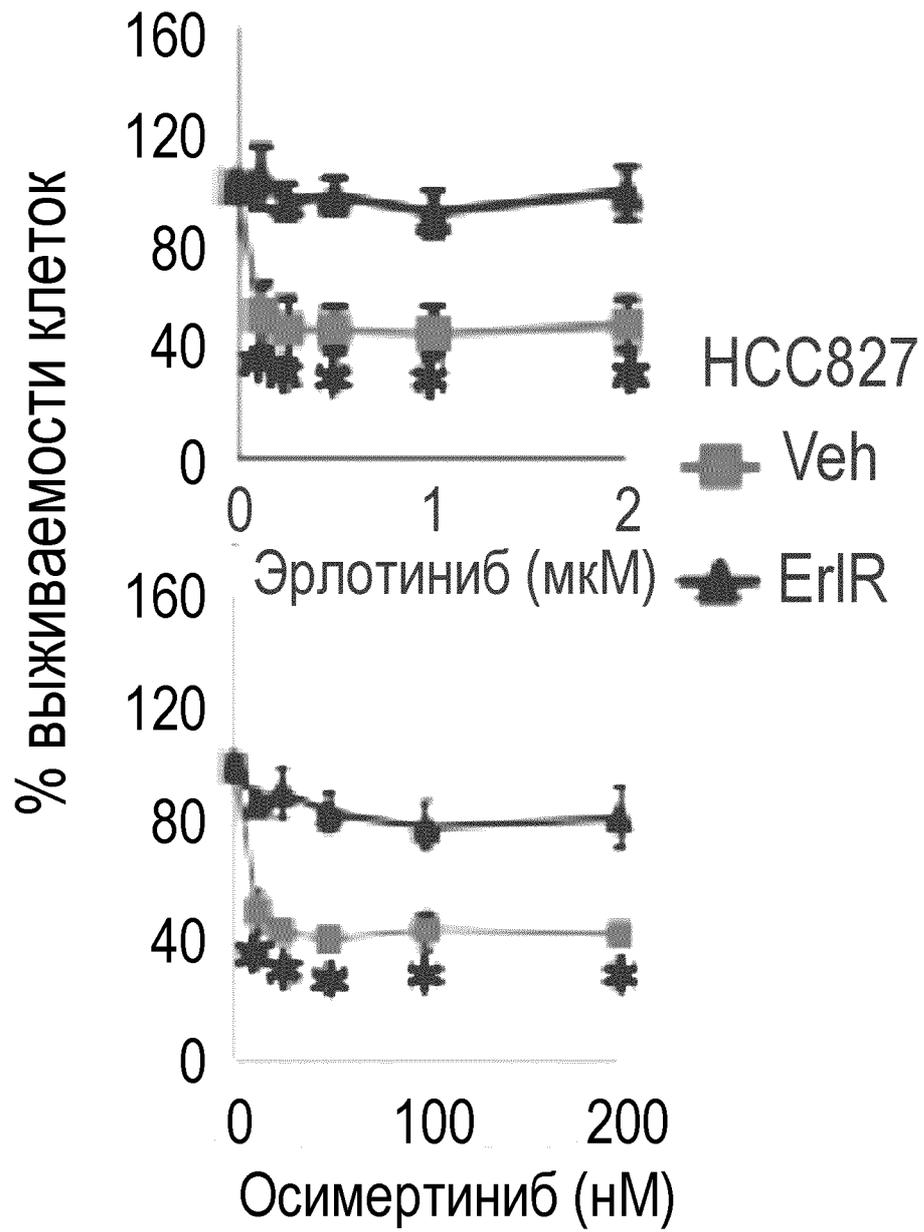
HCC827-Veh



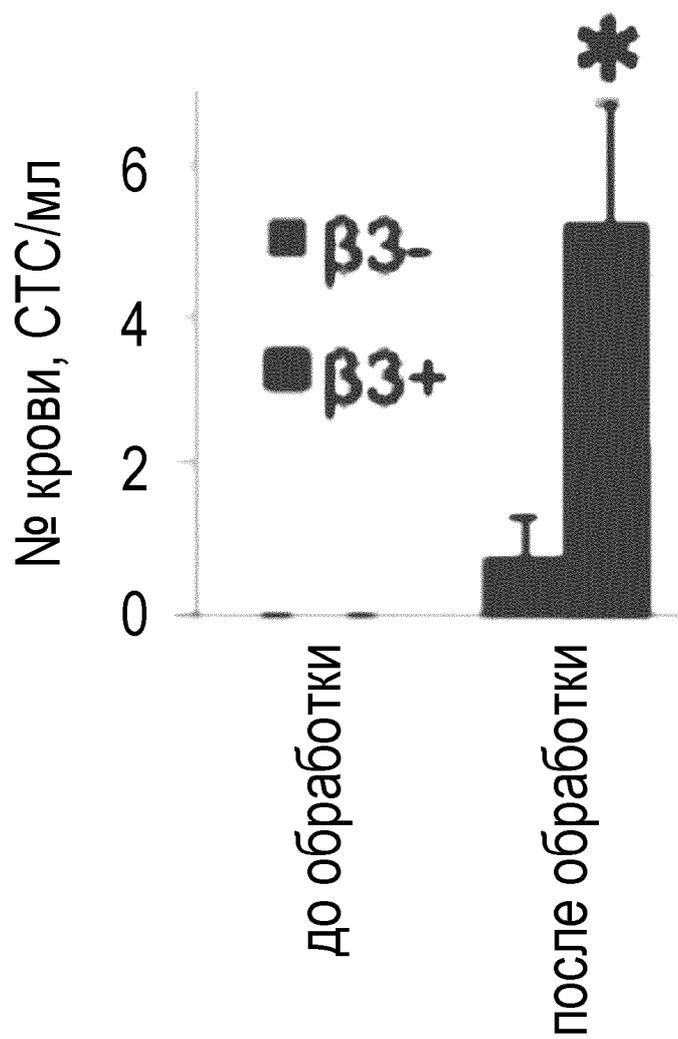
HCC827-ErIR



ФИГ.1F



ФИГ.1G

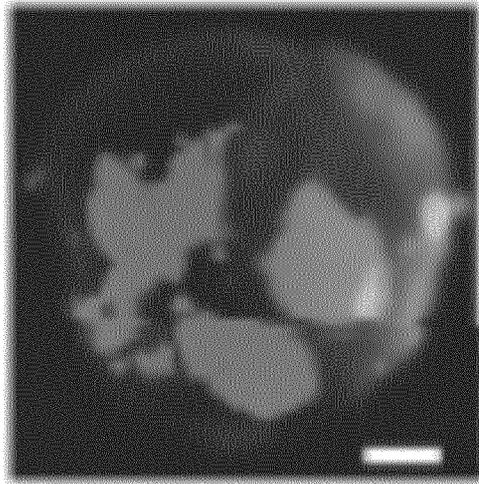


8/25

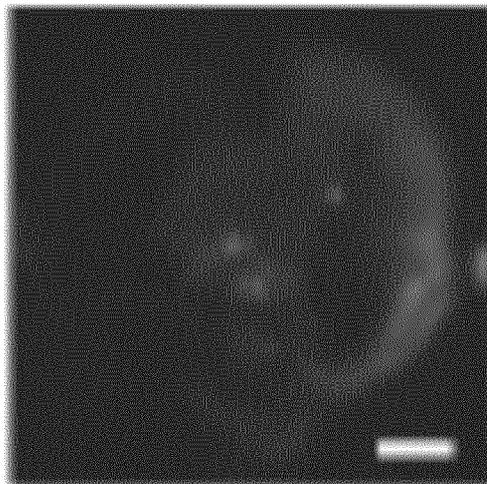
ФИГ.1Н

Первичная опухоль

до обработки



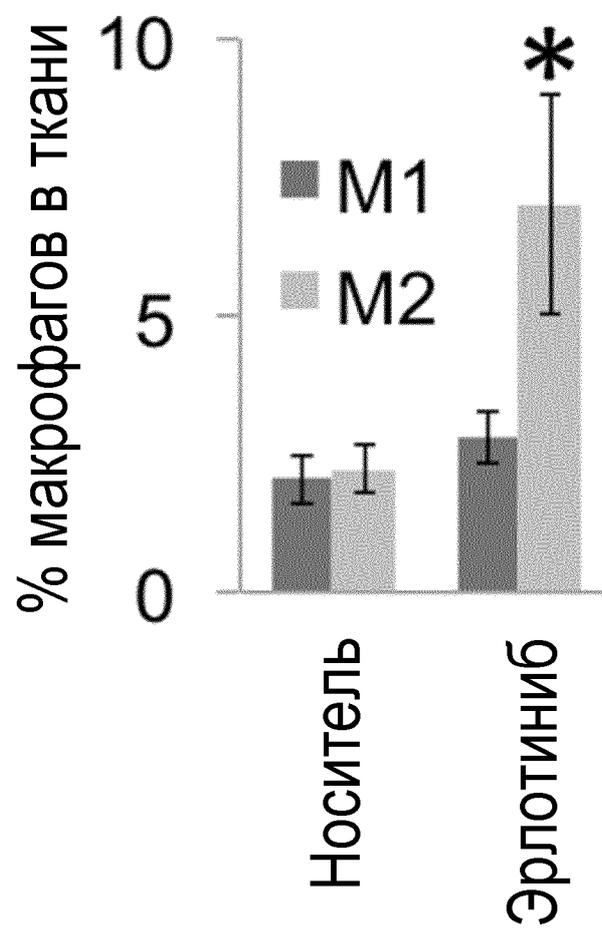
после обработки



9/25

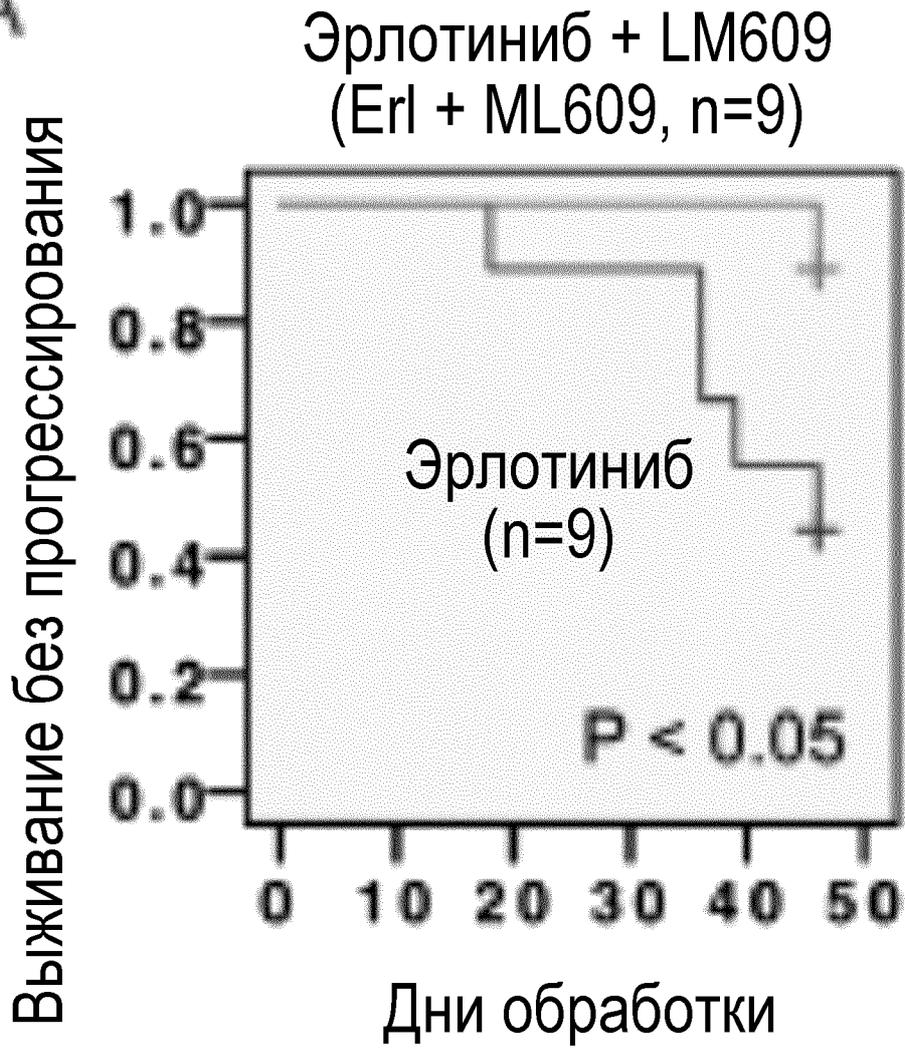
ФИГ.11

TAM

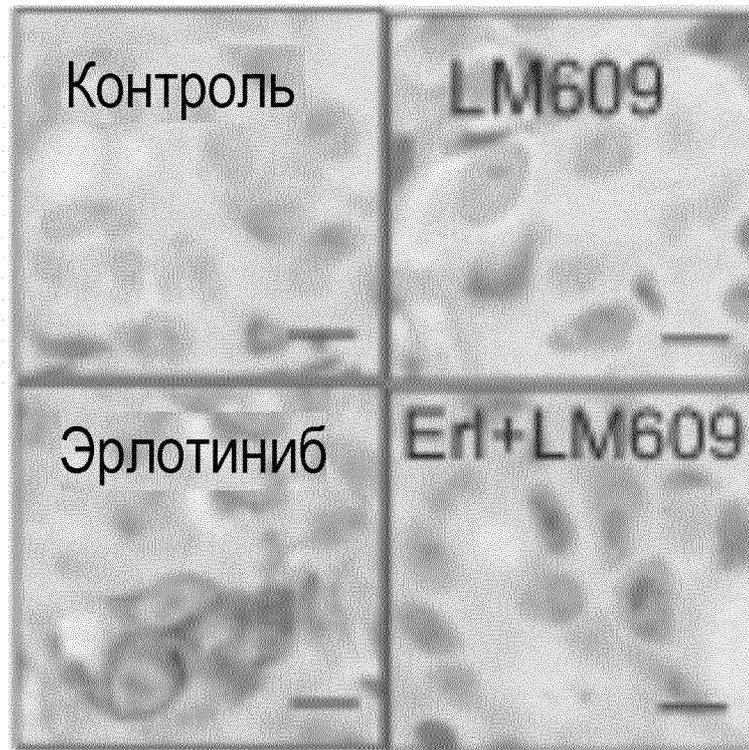
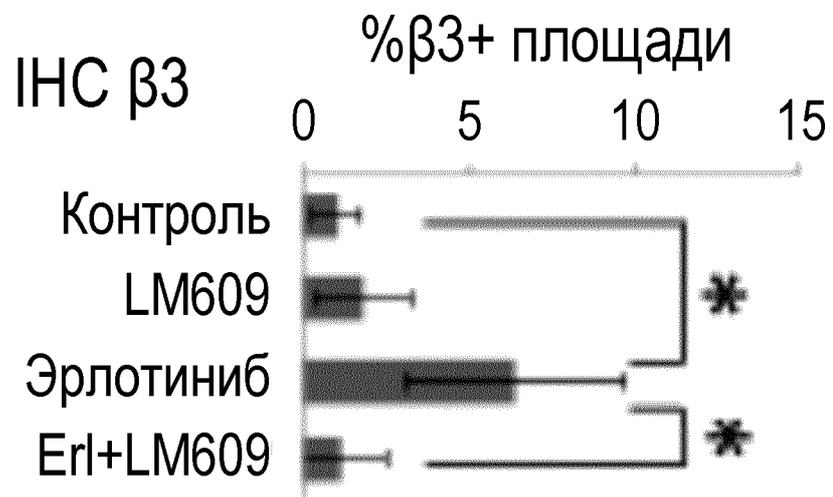


ФИГ.2А

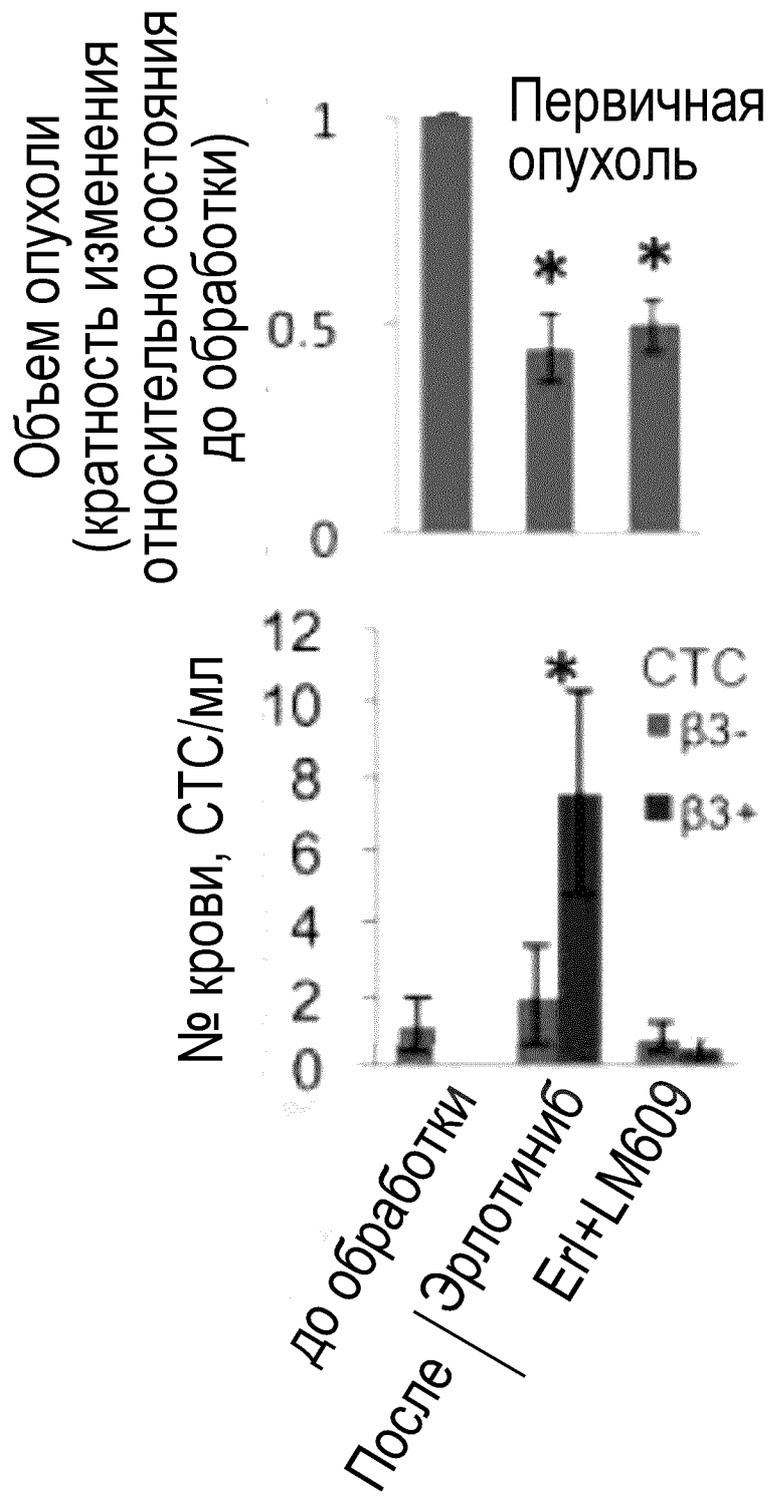
А



ФИГ.2В



ФИГ.2С



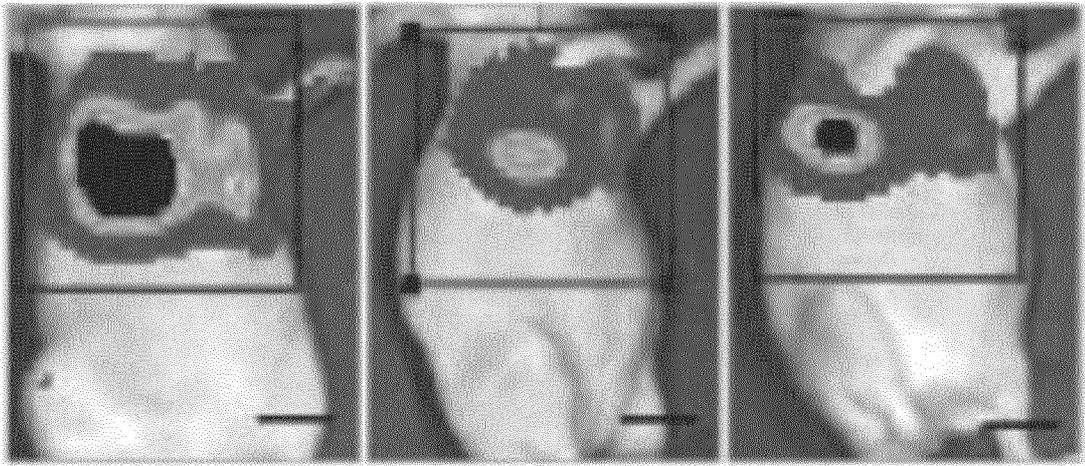
ФИГ.2D

После

До обработки

Эрлотиниб

Erl+LM609



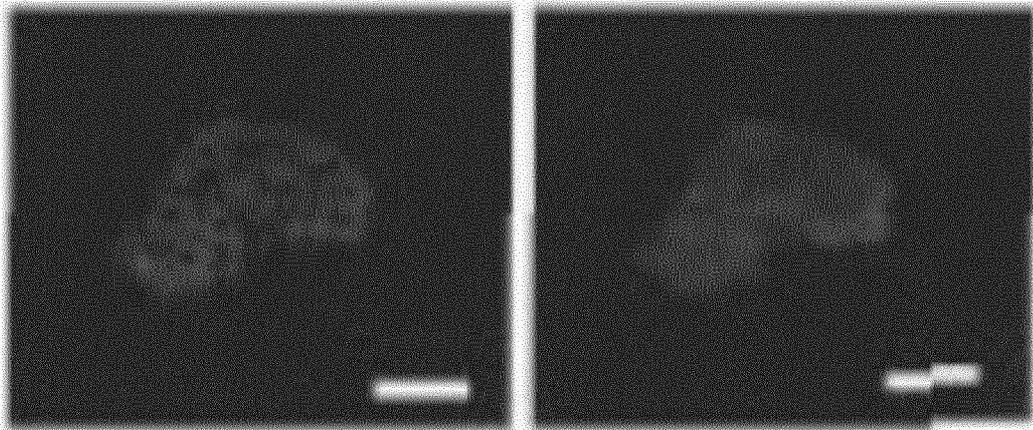
14/25

ФИГ.2Е

СТС

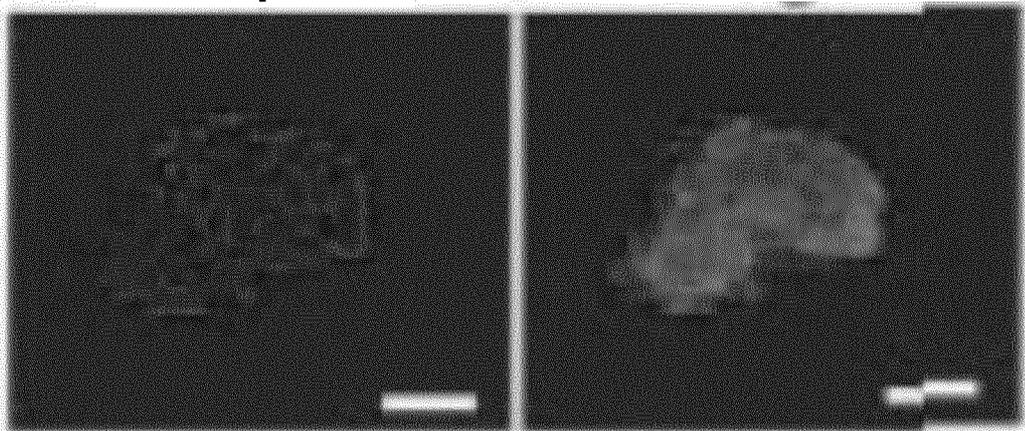
DAPI

GFP



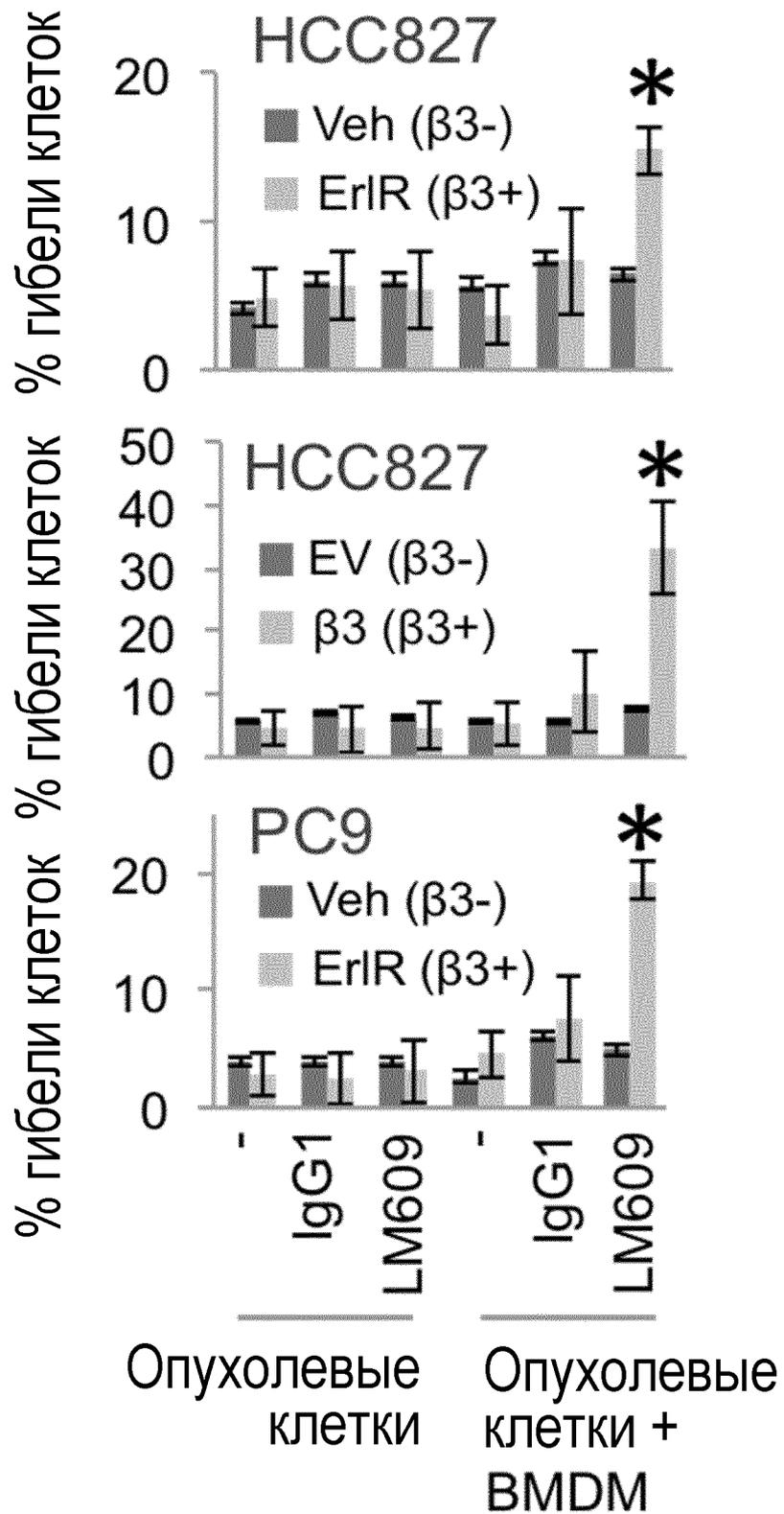
$\alpha v \beta 3$

Наложение

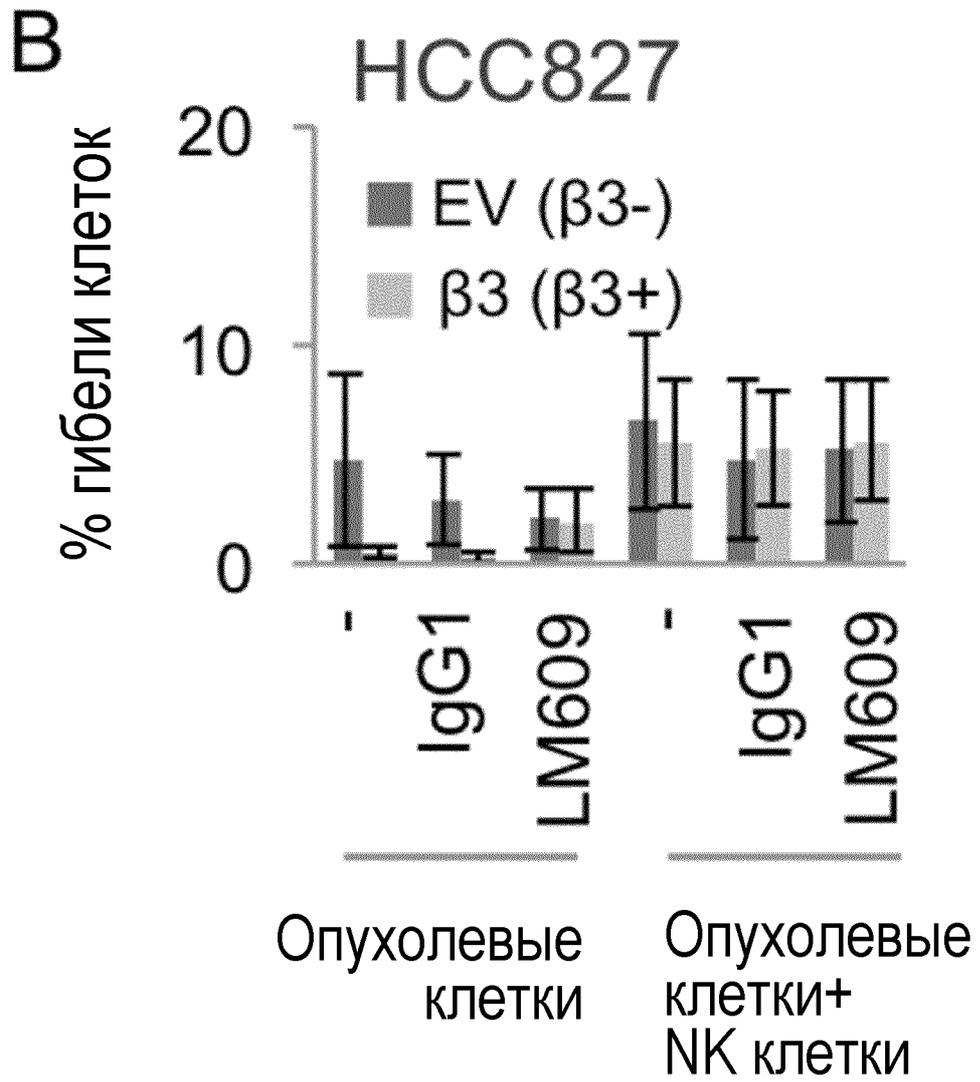


ФИГ.3А

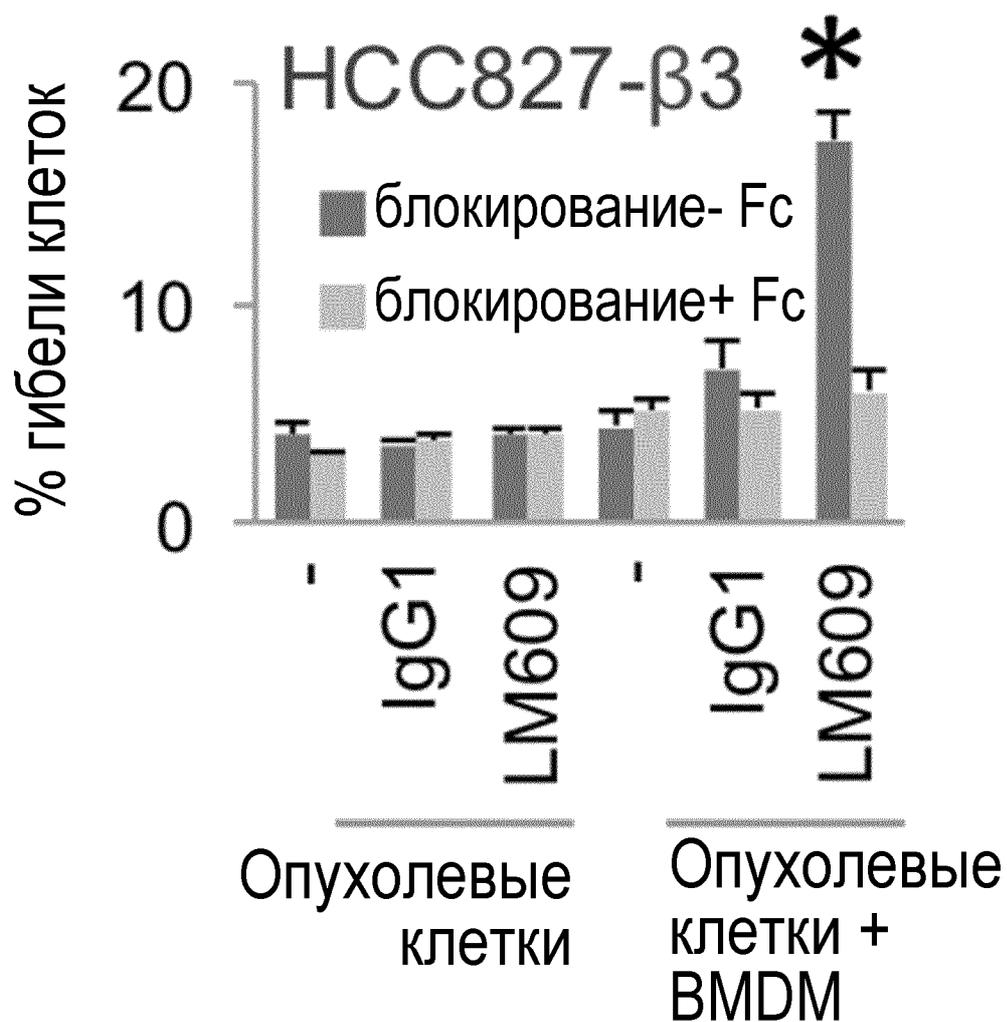
А



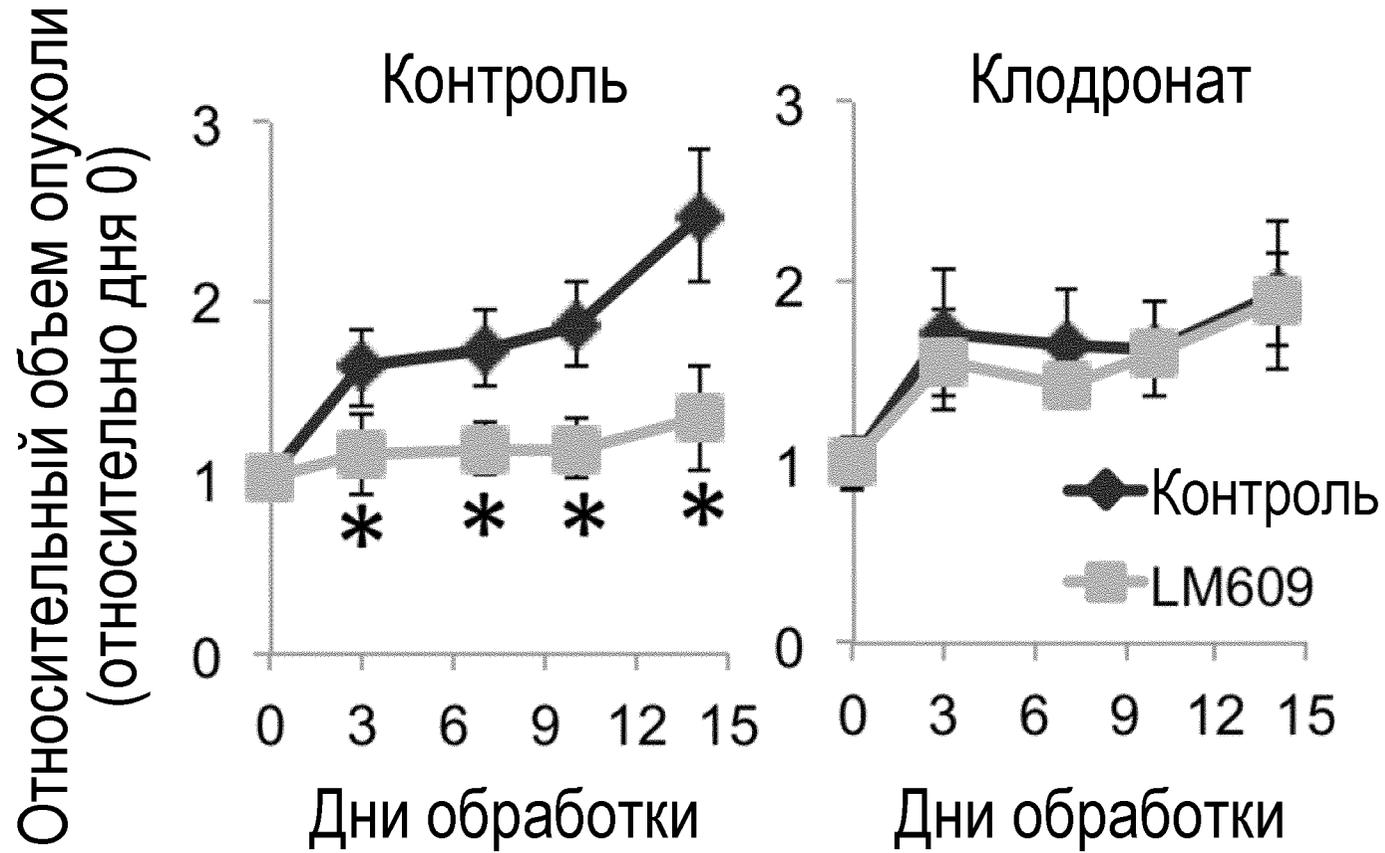
ФИГ.3В



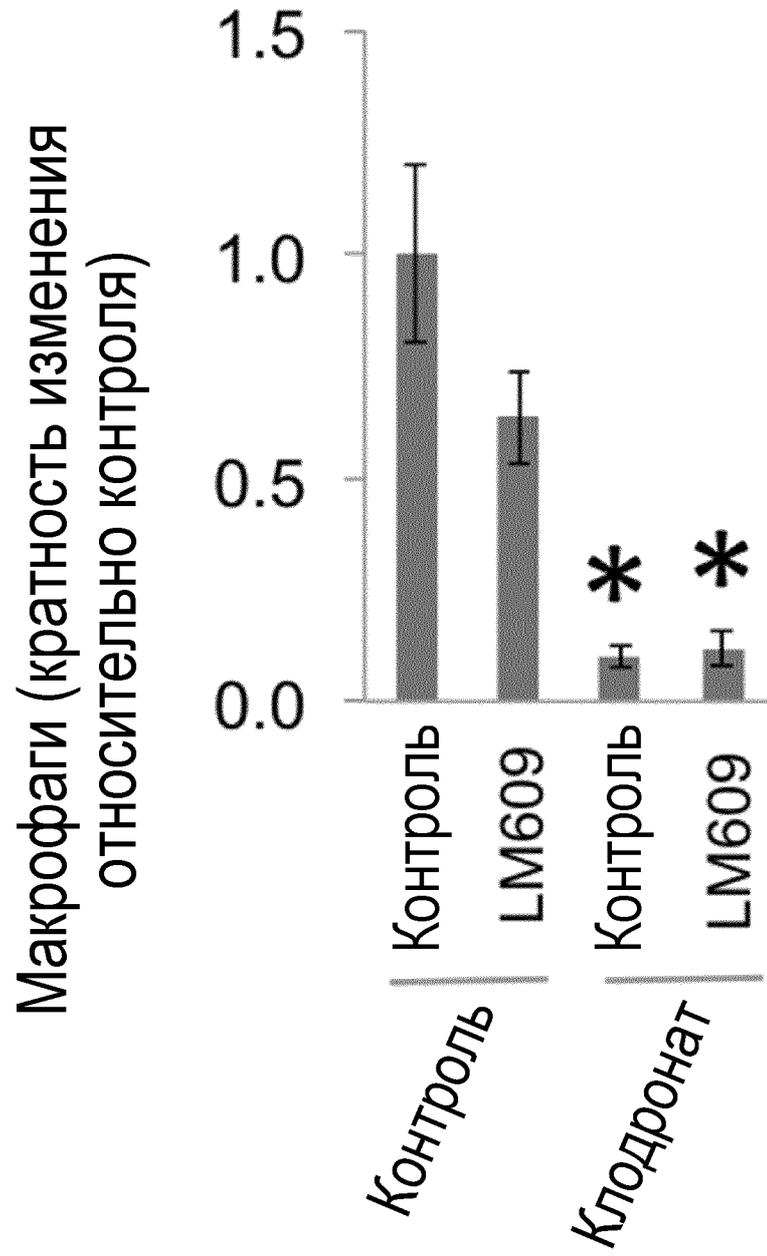
ФИГ.3С



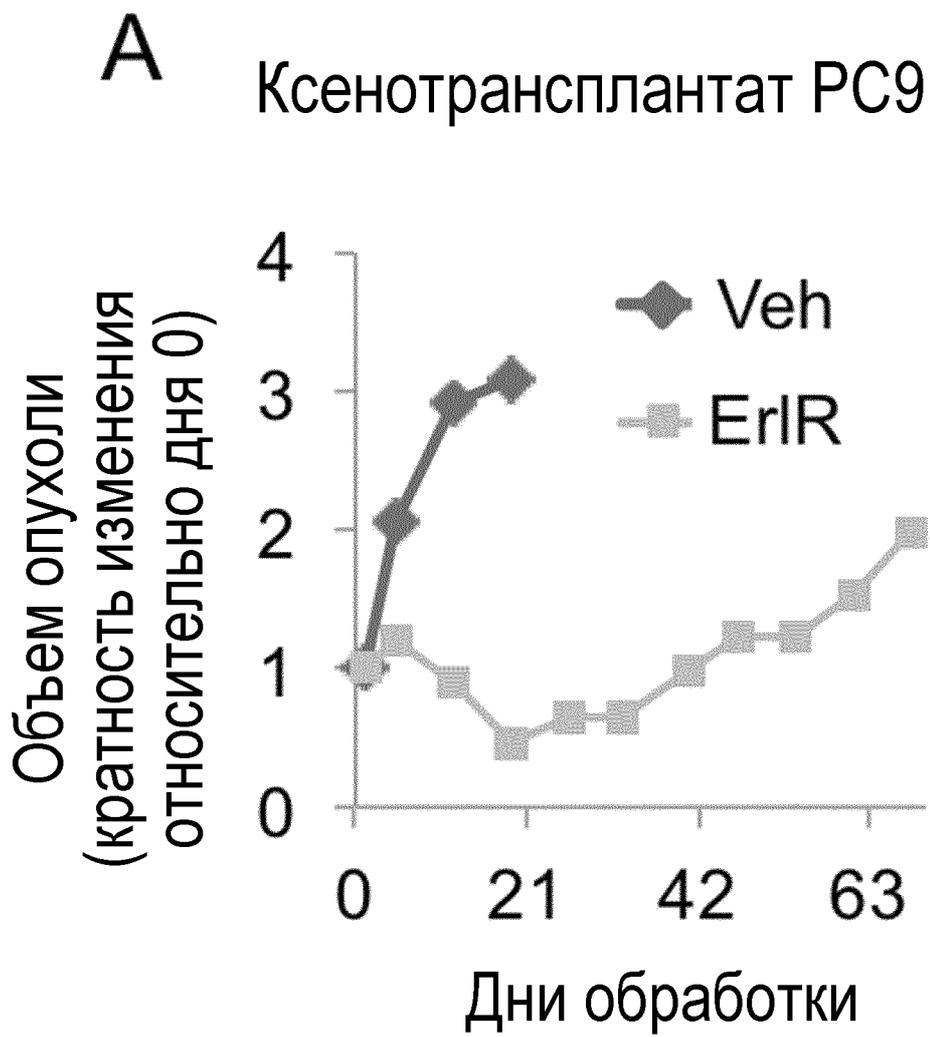
ФИГ.3D



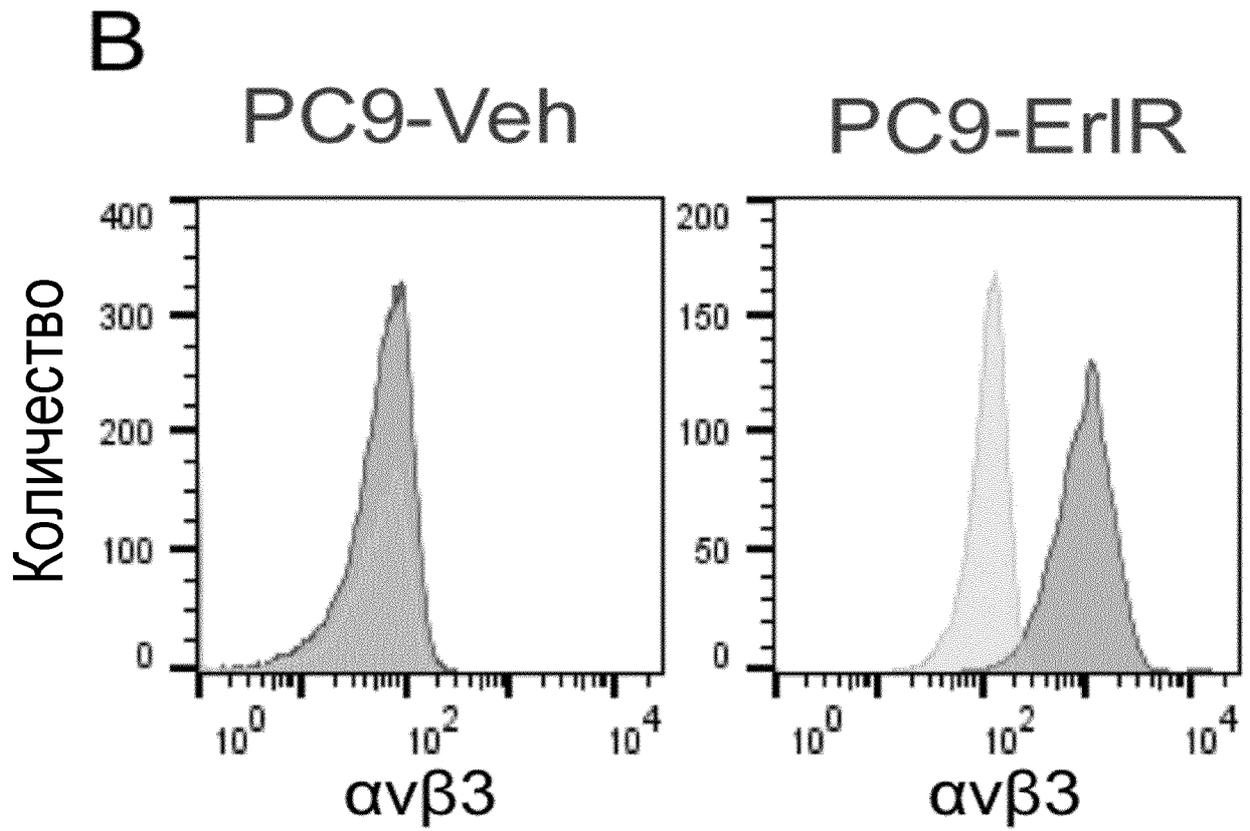
ФИГ.3Е



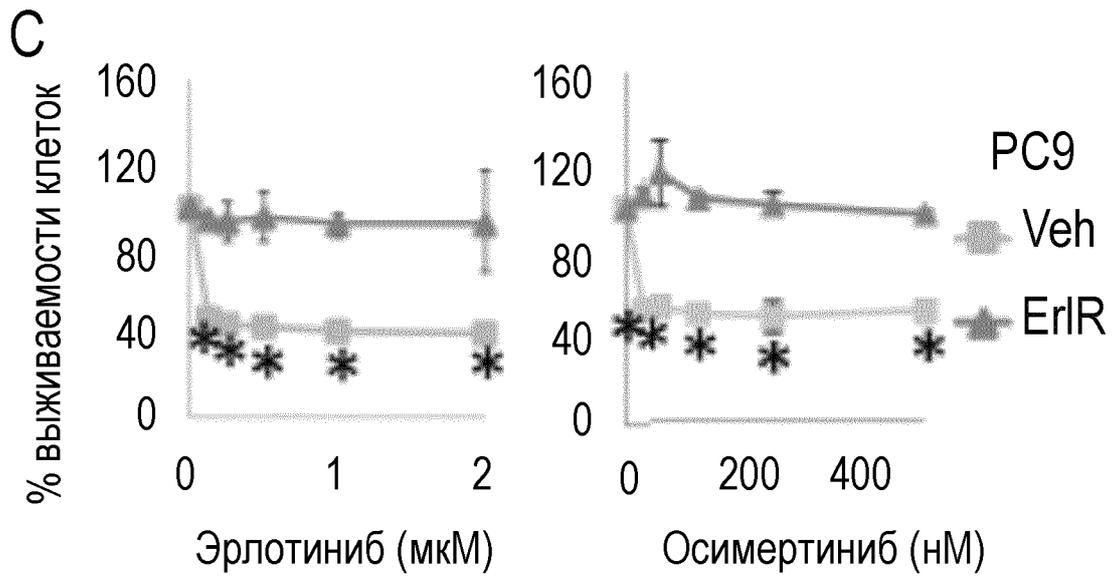
ФИГ.4А



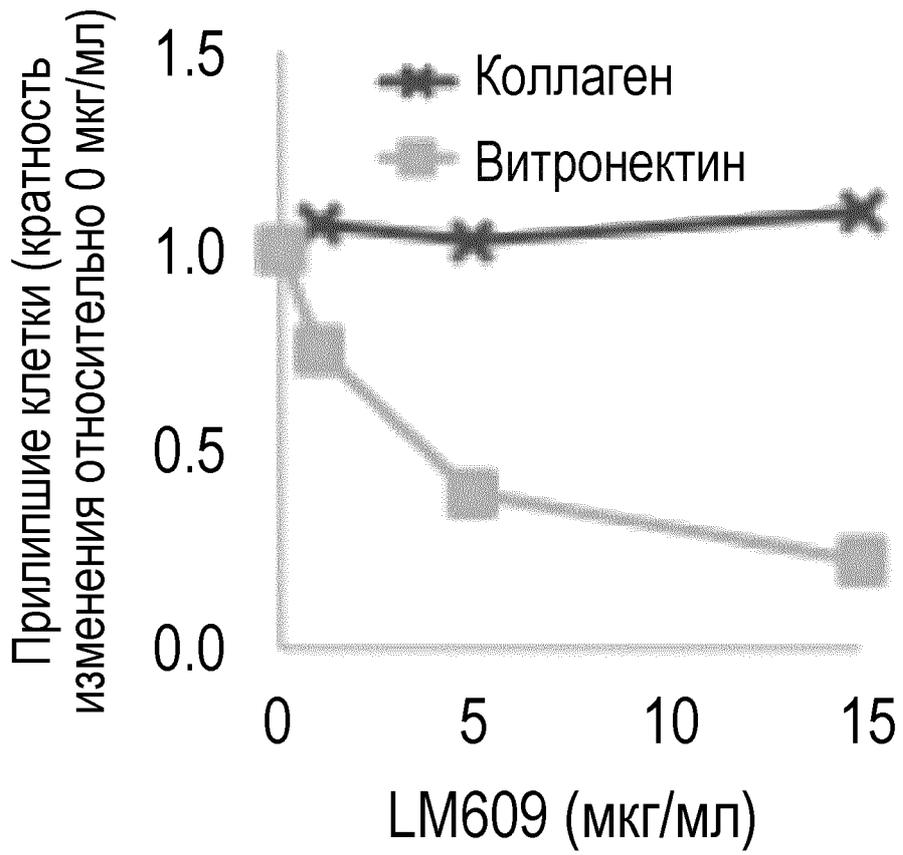
ΦΙΓ.4B



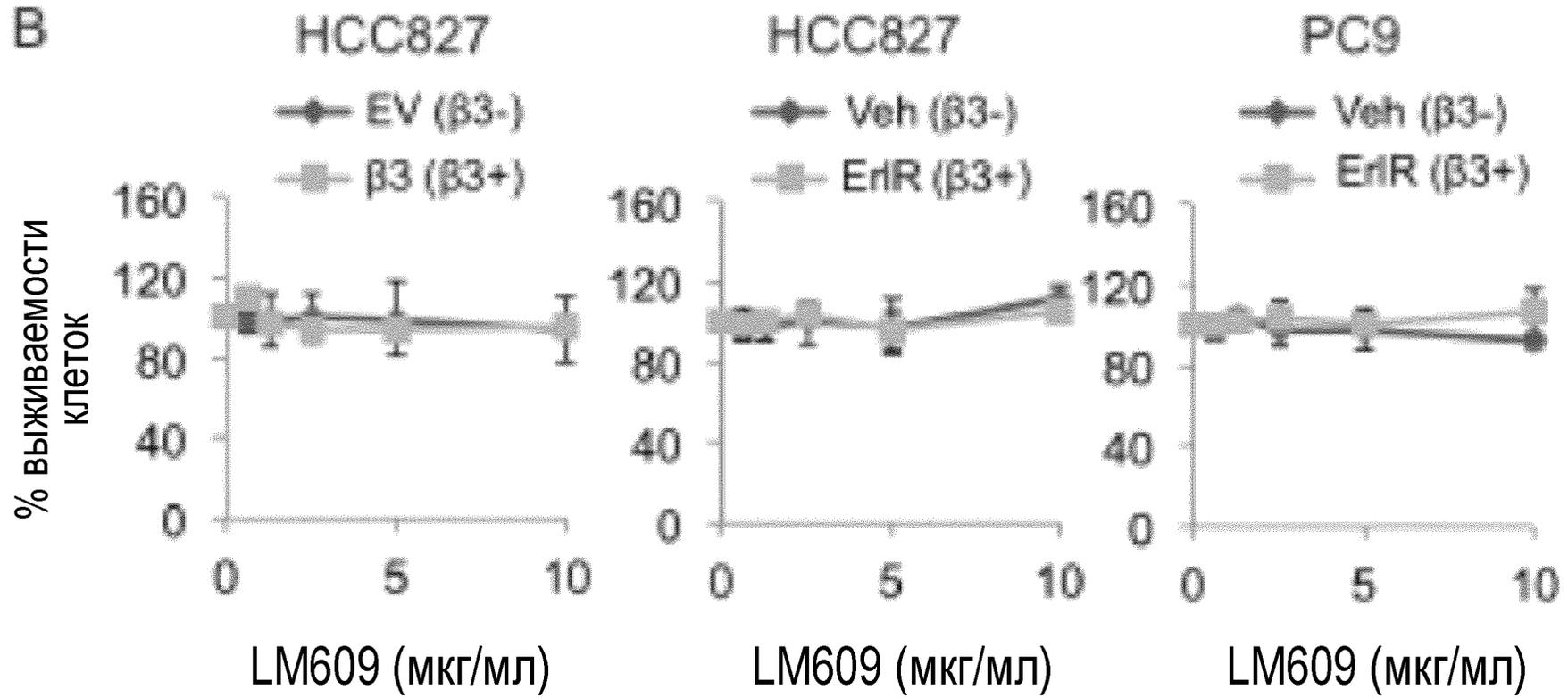
ФИГ.4С



ФИГ.5А



ФИГ.5В



мРНК β3 (кратность изменения  
относительно контроля)

ФИГ.6

