

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092270** (13) **A1**

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

**(43)** Дата публикации заявки  
**2021.02.03**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2017.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.03.22**

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО,  
СОДЕРЖАЩИХ АГЕНТЫ, РАЗРУШАЮЩИЕ ТУБУЛИН, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СОЛИДНОЙ  
ОПУХОЛИ**

---

**(31)** 62/647,346; 62/658,276

**(32)** 2018.03.23; 2018.04.16

**(33)** US

**(86)** PCT/US2019/023516

**(87)** WO 2019/183438 2019.09.26

**(71)** Заявитель:

**СИЭТЛ ДЖЕНЕТИКС, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:

**Као Энтони Тоа, Гардай Шира Джейн  
(US)**

**(74)** Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

**(57)** Настоящее изобретение в целом относится к способам лечения солидных опухолей, включающим введение конъюгата лекарственное средство-линкер-антитело, где лекарственное средство представляет собой агент, разрушающий тубулин.

**A1**

**202092270**

**202092270**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564797EA/025

### ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩИХ АГЕНТЫ, РАЗРУШАЮЩИЕ ТУБУЛИН, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СОЛИДНОЙ ОПУХОЛИ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной заявки на патент США № 62/647346, поданной 23 марта 2018 г., и Предварительной заявки на патент № 62/658276, поданной 16 апреля 2018 г., полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

[0002] Настоящее раскрытие в целом относится к способам лечения солидной опухоли, включающим введение терапии конъюгатом лекарственное средство-линкерное звено-антитело, где лекарственное средство представляет собой агент, разрушающий тубулин.

Уровень техники

[0003] Микротрубочки - важные гетеродимерные структуры, участвующие во многих клеточных процессах, таких как деление и транспорт клеток. Нарушение микротрубочек вызывает остановку клеточного цикла в фазе G2/M. Ингибиторы микротрубочек/тубулина можно разделить на две основные категории в соответствии с их механизмами действия: агенты, способствующие полимеризации тубулина и стабилизирующие структуры микротрубочек (например, паклитаксел), и агенты, ингибирующие полимеризацию тубулина и дестабилизирующие структуры микротрубочек (такие как майтанзиноиды, ауристатины, винбластин и винкрестин) (цинкрестин) (Chenetal., Molecules 22: 1281, 2017).

[0004] Агенты, разрушающие тубулин, такие как ММАЕ, использовались в конъюгатах антитело-лекарственное средство для лейкоза. Например, брентуксимаб ведотин представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, состоящий из моноклонального антитела против CD30, конъюгированного с помощью линкера, расщепляемого протеазой, с агентом, разрушающим микротрубочки, монометилауристатином Е. Брентуксимаб ведотин был одобрен для лечения пациентов с классической лимфомой Ходжкина после неудачи трансплантации аутологичных стволовых клеток (ASCT) или после неудачи по меньшей мере двух предыдущих схем мультиагентной химиотерапии у пациентов, не являющихся кандидатами для ASCT, и в качестве закрепления после ASCT для пациентов с лимфомой Ходжкина с повышенным риском рецидива/прогрессирования. См. информацию о назначении ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин) в США и краткое описание характеристик продукта ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин) в ЕС. Он также был одобрен для лечения системной анапластической крупноклеточной лимфомы после неудачи, по меньшей мере, одной предшествующей схемы мультиагентной химиотерапии. Эффективность анти-CD30

ММАЕADC при солидных опухолях не доказана.

Сущность изобретения

[0005] В настоящем раскрытии представлены улучшенные способы лечения солидных опухолей, включающие введение конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего агент, разрушающий тубулин. В настоящем документе раскрывается, что агенты, разрушающие тубулин, влияют на пути белков ER-стресса в клетках солидных опухолей и вызывают секрецию АТФ и другие явления ER-стресса, которые побуждают иммунные клетки мигрировать к участку опухоли и уменьшать рост опухоли.

[0006] В настоящем описании предложен способ лечения солидной опухоли, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгированного агента антитело-лекарственное средство, имеющего формулу лекарственное средство-линкерное звено-антитело (D-LU-Ab), где D представляет собой агент, разрушающий тубулин, в количестве, эффективном для лечения солидной опухоли.

[0007] Также предложен способ модуляции высвобождения АТФ в солидной опухоли, включающий введение конъюгированного агента антитело-лекарственное средство, имеющего формулу лекарственное средство-линкерное звено-антитело (D-LU-Ab), где D представляет собой агент, разрушающий тубулин, в количестве, эффективном для индукции апоптоза в солидной опухоли.

[0008] Далее в описании рассматривается способ индукции миграции иммунных клеток в солидную опухоль, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгированного агента антитело-лекарственное средство, имеющего формулу лекарственное средство-линкерное звено-антитело (D-LU-Ab), где D представляет собой агент, разрушающий тубулин, в количестве, эффективном для индукции инфильтрации иммунных клеток в солидную опухоль.

[0009] В другом аспекте в описании предложен способ индукции гибели иммуногенных клеток (ICD) в солидной опухоли, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгированного агента антитело-лекарственное средство, имеющего формулу лекарственное средство-линкерное звено-антитело (D-LU-Ab), где D представляет собой агент, разрушающий тубулин, в количестве, эффективном для индукции гибели иммуногенных клеток в солидной опухоли.

[0010] Понятно, что лекарственное средство-линкерное звено-антитело (D-LU-Ab) может также называться здесь конъюгатом антитело-лекарственное средство или ADC.

[0011] В различных вариантах осуществления антитело связывается с антигеном на поверхности опухолевой клетки. В различных вариантах осуществления антитело специфично для CD30, CD19, CD70, CD71, CD20, CD52, CD133, EGFR, HER2, VEGF, VEGFR2, PD-1, PDL1, RANKL, CTLA-4, IL-6, SLAMF7, CD3, TNF-альфа, PDGFR-альфа, CD38, GD2, cCLB8, p97, Нектина-4 или EpCAM.

[0012] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, усиливает пути белков ER-стресса, увеличивает секрецию АТФ и увеличивает экспрессию белка группы 1 с высокой подвижностью (HMGB1).

[0013] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, выбран из группы, состоящей из ауристатина, тубулизина, колхицина, алкалоида барвинка, таксана, криптофицина, майтанзиноида, гемиастерлина и других агентов, разрушающих тубулин. Типичные агенты, разрушающие тубулин, предполагаемые для использования в настоящих способах, описаны более подробно в подробном описании.

[0014] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, представляет собой ауристин, выбранный из группы, состоящей из монометилауристатина E (MMAE), монометилауристатина F (MMAF) и долостатина-10.

[0015] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, представляет собой тубулизин, выбранный из группы, состоящей из тубулизина D, тубуфенилаланина и тубутирозина.

[0016] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, представляет собой колхицин, выбранный из группы, состоящей из колхицина и CA-4.

[0017] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, представляет собой алкалоид барвинка, выбранный из группы, состоящей из винбластина (VBL), винорелбина (VRL), винкристина (VCR) и виндезина (VDS).

[0018] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, представляет собой таксан, выбранный из группы, состоящей из паклитаксела и доцетаксела.

[0019] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, представляет собой криптофицин, выбранный из группы, состоящей из криптофицина-1 и криптофицина-52.

[0020] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из майтанзина, майтанзинола, аналогов майтанзина, DM1, DM3 и DM4 и ансаматоцина-2.

[0021] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, представляет собой гемиастерлин, выбранный из группы, состоящей из гемиастерлина и НТИ-286.

[0022] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, выбран из группы, состоящей из таккалонолида A, таккалонолида B, таккалонолида AF, таккалонолида AJ, таккалонолида AI-эпоксида, дискодермолида, эпотилона A, эпотилона B и лаулималида.

[0023] В различных вариантах осуществления солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легких, рака груди, рака яичников, рака шейки матки, рака желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, меланомы, саркомы, рака пищевода, рака поджелудочной железы, метастатического рака поджелудочной железы, метастатической аденокарциномы поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака желудка, фиброзного рака, глиомы, злокачественной глиомы, диффузной глиомы ствола головного мозга, рецидивирующего новообразования головного мозга у детей, почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной метастатической почечно-клеточной карциномы,

рака почки, рака предстательной железы, метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы, рака предстательной железы IV стадии, метастатической меланомы, меланомы, злокачественной меланомы, рецидивирующей меланомы кожи, метастазы меланомы в мозг, меланомы кожи IIIA стадии; меланомы кожи стадии IIIB, меланомы кожи стадии IIIC; меланомы кожи стадии IV, злокачественной меланомы головы и шеи, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рецидивирующего метастатического рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, синдрома Рихтера; макроглобулинемии Вальденстрема, глиобластомы взрослых; глиосаркомы взрослых, рецидивирующей глиобластомы, рецидивирующей рабдомиосаркомы у детей, рецидивирующей саркомы Юинга/периферической примитивной нейроэктодермальной опухоли, рецидивирующей нейробластомы; рецидивирующей остеосаркомы, колоректального рака, MSI-положительного колоректального рака; MSI-отрицательного колоректального рака, неороговевающей карциномы носоглотки; рецидивирующей недифференцированной карциномы носоглотки, аденокарциномы шейки матки; железисто-плоскоклеточной карциномы шейки матки; плоскоклеточного рака шейки матки; рецидивирующей карциномы шейки матки; рака шейки матки IVA стадии; рака шейки матки IVB стадии, плоскоклеточного рака анального канала; метастатической карциномы анального канала; рецидивирующей карциномы анального канала, рецидивирующего рака головы и шеи; плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), карциномы яичников, рака толстой кишки, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта поздней стадии, аденокарциномы желудка; аденокарциномы гастроэзофагеального перехода, новообразования костей, саркомы мягких тканей; саркомы костей, карциномы тимуса, уротелиальной карциномы, рецидивирующей карциномы из клеток Меркеля; карциномы из клеток Меркеля стадии III; карциномы из клеток Меркеля стадии IV, миелодиспластического синдрома и синдрома Сезари. В одном варианте осуществления солидная опухоль представляет собой солидную опухоль, не являющуюся лимфомой. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль может представлять собой множественную миелому.

[0024] В различных вариантах осуществления конъюгат лекарственное средство-линкерное звено-антитело/конъюгат антитело-лекарственное средство содержит линкер, расщепляемый протеазой, линкер, расщепляемый кислотой, или дисульфидный линкер.

[0025] В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый протеазой, включает тиольный реакционноспособный спейсер и дипептид. В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый протеазой, состоит из тиольного реакционноспособного малеимидокапроильного спейсера, дипептида валин-цитруллин и р-аминобензилоксикарбонильного спейсера.

[0026] В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый кислотой, представляет собой гидразиновый линкер или четвертичный аммониевый линкер.

[0027] В различных вариантах осуществления способ дополнительно включает

введение пациенту схемы химиотерапии.

[0028] В различных вариантах осуществления схема химиотерапии состоит в основном из доксорубина, винбластина и дакарбина (AVD) в качестве комбинированной терапии. В других вариантах осуществления схема химиотерапии состоит в основном из циклофосфида, винкристина и преднизона (CHP) в качестве комбинированной терапии.

[0029] В различных вариантах осуществления антитело конъюгата антитело-лекарственное средство представляет собой моноклональное антитело. В различных вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

[0030] В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело против CD30, а конъюгат антитела против CD30 с лекарственным средством содержит: i) CDR1 тяжелой цепи, представленную в SEQIDNO: 4, CDR2 тяжелой цепи, представленную в SEQIDNO: 6, CDR3 цепи, представленную в SEQIDNO: 8; и ii) CDR1 легкой цепи, представленную в SEQIDNO: 12, CDR2 легкой цепи, представленную в SEQIDNO: 14, и CDR13 легкой цепи, представленную в SEQIDNO: 16.

[0031] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело против CD30, а конъюгат антитело против CD30-лекарственное средство содержит: i) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQIDNO: 2, и ii) аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85% идентичную вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQIDNO: 10. Предполагается, что аминокислотная последовательность вариабельной области может быть на 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична SEQIDNO: 2 или SEQIDNO: 10.

[0032] В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело против CD30, а антитело против CD30 из конъюгата антитело-лекарственное средство представляет собой химерное антитело AC10.

[0033] В различных вариантах осуществления конъюгат лекарственное средство-линкерное звено-антитело/конъюгат антитело-лекарственное средство содержит метилауристин Е и линкер, расщепляемый протеазой. В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый протеазой, содержит тиольный реакционноспособный спейсер и дипептид. В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый протеазой, состоит из тиольного реакционноспособного малеимидапроильного спейсера, валин-цитруллин-дипептида и р-аминобензилоксикарбонильного спейсера.

[0034] В различных вариантах осуществления конъюгат антитело против CD30-лекарственное средство представляет собой брентуксимаб ведотин. В различных вариантах осуществления конъюгат антитело против CD30-лекарственное средство вводят один раз в 3 недели.

[0035] В различных вариантах осуществления антитело против CD30 в составе

конъюгата антитело против CD30-лекарственное средство представляет собой моноклональное антитело против CD30. В различных вариантах осуществления изобретения антитело против CD30 в составе конъюгата антитело против CD30-лекарственное средство представляет собой химерное антитело AC10.

[0036] В различных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство содержит монометилауристатин E и линкер, расщепляемый протеазой. В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый протеазой, включает тиольный реакционноспособный спейсер и дипептид. В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый протеазой, состоит из тиольного реакционноспособного малеимидокапроильного спейсера, дипептида валин-цитруллин и п-аминобензилоксикарбонильного спейсера.

[0037] В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG, предпочтительно антитело IgG1 или IgG2.

[0038] Подразумевается, что каждый признак или вариант осуществления, или комбинация, описанные в настоящем документе, являются неограничивающим иллюстративным примером любого из аспектов изобретения и, как таковые, предназначены для комбинирования с любым другим признаком, вариантом осуществления или комбинацией, описанных в настоящем документе. Например, если функции описаны с помощью таких выражений, как «один вариант осуществления», «некоторые варианты осуществления», «определенные варианты осуществления», «дополнительный вариант осуществления», «конкретные иллюстративные варианты осуществления» и/или «другой вариант осуществления», каждый из этих типов вариантов осуществления является неограничивающим примером функции, которая предназначена для объединения с любой другой функцией или комбинацией функций, описанных в настоящем документе, без необходимости перечислять все возможные комбинации. Такие признаки или комбинации признаков применимы к любому из аспектов изобретения. Если раскрыты примеры значений, попадающих в пределы диапазонов, любой из этих примеров рассматривается как возможные конечные точки диапазона, предполагаются любые и все числовые значения между такими конечными точками, и возможны любые и все комбинации верхней и нижней конечных точек.

#### Краткое описание чертежей

[0039] На Фигурах 1A-1C показаны уровни индукции белка ER-стресса после обработки ММАЕ. Вестерн-блоттинг показывает уровни белка и фосфорилирования (Фигура 1A). На Фигуре 1B показаны уровни секреции АТФ, а на Фигуре 1C показаны уровни высвобождения HMGB1 из клеток.

[0040] Фигуры 2A-2B иллюстрируют уровни индукции ER-стресса для агентов, разрушающих тубулин, ММАЕ, винкристина и паклитаксела. На Фигуре 2A показана индукция ER-стресса с помощью анализов люциферазы CHOP, а на Фигуре 2B показана индукция ER-стресса в модели ксенотрансплантата *in vivo*.

[0041] Фигуры 3A-3E демонстрируют секрецию АТФ и другие эффекты в ответ на

агентов, разрушающие тубулин ММАЕ, винкристин и паклитаксел, в клетках поджелудочной железы MiaPac2 (Фигура 3А, АТФ) или опухолевых клетках предстательной железы РС-3 (Фигура 3В, АТФ). Обработка клеток РС-3 с помощью ММАЕ вызывает ER-стресс (фосфорилирование IRE1 и JNK) (Фигура 3С), высвобождение АТФ (Фигура 3D) и высвобождение HMGB1 (Фигура 3Е).

[0042] На Фигурах 4А-Д показано влияние обработки на трансплантированные клетки РС-3 и инфильтрацию иммунных клеток у бестимусных голых мышей. Фигура 4А, дендритные клетки; Фигура 4В, инфильтрация макрофагов; Фигура 4С, презентация антигена дендритных клеток; Фигура 4D, презентация антигена макрофагов.

[0043] На Фигурах 5А-Е показано влияние обработки на продукцию цитокинов/хемокинов, измеренную с помощью ИФА, на трансплантированных клетках РС-3 у бестимусных голых мышей. Фигуры 5А-5С, внутриопухолевые уровни цитокинов МIP-1а, IP-10 и IL-1В, соответственно; Фигуры 5D-5F, уровни периферических циркулирующих цитокинов IP-10, GCSF и IL-6, соответственно.

[0044] На Фигуре 6 показана индукция ER-стресса с помощью вестерн-блоттинга клеток рака шейки матки HeLa после обработки ММАЕ, винкристином и паклитакселом.

[0045] На Фигурах 7А и 7В показано влияние обработки ММАЕ, винкристином и паклитакселом в клеточных линиях солидных опухолей клеток кожи на высвобождение АТФ в виде группы (Фигура 7А) и с разбивкой по типам клеток (Фигура 7В). На Фигуре 7С показано влияние обработки на высвобождение HMGB1 в опухолевых клетках кожи.

[0046] На Фигурах 8А-8С показано, что обработка ММАЕ клеток кожи A2058 (Фигура 8А), SK-MEL-5 (Фигура 8В) и SK-MEL-28 (Фигура 8С) привела к увеличению антигенной презентации в 2/3 клеточных линий опухолевых клеток, которая была более устойчивой, чем при обработке паклитакселом.

[0047] На Фигурах 9А-9В показано влияние обработки опухолевых клеток A2058 (фигура 9А) или SK-MEL-5 (Фигура 9В) ММАЕ, винкристином, паклитакселом или анти-p97-ММАЕ на тестируемые цитокины и хемокины.

[0048] На Фигурах 10А-10В показано влияние ММАЕ, винкристина и паклитаксела на усиление антигенной презентации клеток VхРС3 (Фигура 10А) и НРАFII (Фигура 10В). Фигуры 10С-10D показывают секрецию АТФ и высвобождение HMGB-1, соответственно, в клетках VхРС-3.

[0049] На Фигурах 11А-11В показано влияние обработки опухолевых клеток VхРС3 (Фигура 11А) или НРАFII (Фигура 11В) ММАЕ, винкристином, паклитакселом или анти-p97-ММАЕ на тестируемые цитокины и хемокины.

[0050] На Фигурах 12А-12С показано влияние обработки ММАЕ, винкристина, паклитаксела или p97-ММАЕ клеток Calu-1 (Фигура 12А), НТ1080 (Фигура 12В) и SK-MES-1 (Фигура 12С) на уровни презентации антигена после совместного культивирования с макрофагами. На Фигуре 12D-12F показано высвобождение HMGB-1 для клеток Calu-1 (Фигура 12D), НТ-1080 (Фигура 12Е) и SK-MES-1 (Фигура 12F).

[0051] На Фигуре 13 показаны уровни индукции цитокинов или хемокинов в



клетках Calu-1 после обработки ММАЕ, винкристином, паклитакселом или р97-ММАЕ.

[0052] На Фигурах 14А-14В показано влияние ММАЕ, ММАЕ-содержащего ADC (анти-CD71 ОКТ9), винкристина и паклитаксела на презентацию антигена клеток MCF7 (Фигура 14А) и продукцию цитокинов/хемокинов (Фигура 14В).

[0053] На Фигурах 15А-С показано влияние ММАЕ или ММАЕ-содержащего ADC (ладиратузумаб ведотин, SGN-LIV1А), на индукцию стресса клетками рака молочной железы MCF-7 (Фигура 15А), секрецию АТФ (Фигура 15В) и высвобождение HMGB1 (Фигура 15С).

[0054] На Фигурах 16А-16В показано влияние ММАЕ, эрибулина, паклитаксела, доцетаксела или SGN-LIV1А на индукцию стресса клетками рака молочной железы MCF-7 (Фигура 16А) и секрецию АТФ (Фигура 16В).

[0055] На Фигуре 17А-17Е показано влияние ММАЕ-содержащего ADCSGN-LIV1А или анти-CD71-ММАЕ на иммунную активность в трансплантированных клетках MCF-7 у бестимусных голых мышей: Фигура 17А - инфильтрация дендритных клеток; Фигура 17В - презентация антигена дендритными клетками; Фигура 17С - презентация антигена макрофагами; Фигура 17D, уровни IP10; Фигура 17Е, уровни RANTES.

[0056] На Фигуре 18 показана секреция АТФ клетками MDA-MB-468, обработанными ММАЕ, тапсигаргином или ММАЕ-содержащим ADC (энфортумаб ведотин, ASG-22МЕ).

[0057] На Фигурах 19А-19G показаны уровни секреции АТФ (Фигура 19А, JHH7; Фигура 19В, Nuh7; Фигура 19С, Her3b) и костимуляции (измеренной по экспрессии CD86, JHH7) и презентации антигена (измеренной по частоте экспрессии МНСII клетками) на Her3b (Фигура 19D), Nuh7 (Фигура 19Е) и JHH7 (Фигура 19F-19G), обработанных ММАЕ, тубулизином М, винкристином и паклитакселом.

[0058] На Фигурах 20А-20С показано влияние обработки клеток Her3b (Фигура 20А), Nuh7 (фигура 20В) и JHH7 (Фигура 20С) ММАЕ, тубулизином М, винкристином или паклитакселом на уровни цитокинов и хемокинов.

[0059] На Фигурах 21А-21В показано влияние ММАЕ, ММАЕ-содержащего ADC (энфортумаб ведотин, ASG-22МЕ), винкристина и паклитаксела на секрецию АТФ опухолевыми клетками мочевого пузыря Т-24 (Фигура 21А), презентацию антигена (Фигура 21В) и продукцию цитокинов/хемокинов (Фигура 21С).

[0060] На Фигурах 22А-22В показано влияние ММАЕ, ММАЕ-ADC (SGN-CD48А) и контроля на клетки U-266. На Фигуре 22А показан вестерн-блоттинг, проведенный с использованием фосфо-JNKThr183/Tyr185 (pJNK), PARP, ATF4, AT6, фосфо-IRE-1 Ser274 (pIRE-1); На Фигуре 22В показано окрашивание на цитотоксические маркеры HSP70 и кальретикулин.

Подробное описание

[0061] В настоящем раскрытии представлены способы лечения солидных опухолей, включающие введение конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего агент, разрушающий тубулин. В настоящем документе раскрывается, что агенты, разрушающие

тубулин, влияют на пути белков ER-стресса в клетках солидных опухолей и вызывают секрецию АТФ и другие явления ER-стресса, которые побуждают иммунные клетки мигрировать к участку опухоли и уменьшать рост опухоли.

### **Определения**

[0062] Если не определено иначе, то все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют тот же смысл, который вкладывается в них обычным специалистом области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Следующие ссылки предоставляют специалисту общее определение многих терминов, используемых в этом изобретении: Singleton et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2ded. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker ed., 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5TH ED., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991).

[0063] Каждая публикация, патентная заявка, патент и другие ссылки, цитируемые в настоящем описании, полностью включены в качестве ссылки в той степени, в которой это не противоречит настоящему раскрытию.

[0064] Используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на «производное» включает в себя множество таких производных, а ссылка на «пациента» включает ссылку на одного или более пациентов и так далее.

[0065] Также следует понимать, что там, где в описаниях различных вариантов осуществления используется термин «содержащий», специалисты в данной области техники поймут, что в некоторых конкретных случаях вариант осуществления может быть альтернативно описан с использованием выражения «состоящий по существу из» или «состоящий из».

[0066] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится это раскрытие. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы на практике раскрытых способов и композиций, здесь описаны типичные способы, устройства и материалы.

[0067] «Терапевтически эффективное количество» или «количество, эффективное для» в контексте настоящего описания относится к количеству агента, эффективному для оказания назначенного положительного воздействия на здоровье.

[0068] Используемый в настоящем описании термин «солидная опухоль» относится к аномальной массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких участков. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их образуют. Солидные опухоли включают саркомы и карциномы. Саркомы относятся к опухолям кровеносного сосуда, кости, жировой ткани, связки, лимфатического сосуда, мышцы или

сухожилия. Карциномы относятся к опухолям, которые образуются в эпителиальных клетках. Предполагается, что солидная опухоль не является лимфомой.

[0069] Термин «агент, разрушающий тубулин» относится к агенту, который ингибирует функцию микротрубочек. Агенты, разрушающие тубулин, можно разделить на две основные категории в соответствии с механизмами их действия: агенты, способствующие полимеризации тубулина и стабилизирующие структуры микротрубочек, и агенты, которые ингибируют полимеризацию тубулина и дестабилизируют структуры микротрубочек. Типичные агенты, разрушающие тубулин, более подробно описаны в подробном описании.

[0070] Термин «миграция иммунных клеток» в контексте настоящего описания относится к перемещению иммунных клеток, включая мононуклеарные клетки периферической крови, Т-клетки, В-клетки, клетки-натуральные киллеры, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, гранулоциты и т.п. из участка опухоли.

[0071] Термины «лечить» или «лечение», если иное не указано в контексте, относятся к терапевтическому лечению и профилактическим мерам для предотвращения прогрессирования или рецидива заболевания, цель которых состоит в том, чтобы подавить или замедлить (уменьшить) нежелательные физиологические изменения или расстройство, такое как развитие или распространение рака. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. не ухудшение) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное смягчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), детектируемую или недетектируемую. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет состояние или расстройство, а также тех, кто склонен к этому состоянию или расстройству. Термин «лечение» включает любое или все из: ингибирования роста опухолевых клеток, раковых клеток или опухоли; ингибирование репликации опухолевых клеток или раковых клеток, уменьшение общей опухолевой нагрузки или уменьшение количества раковых клеток и улучшение одного или более симптомов, связанных с заболеванием.

[0072] Примеры «пациента» или «субъекта» включают, но не ограничиваются ими, человека, крысу, мышь, морскую свинку, обезьяну, свинью, козу, корову, лошадь, собаку, кошку, птицу и домашнюю птицу. В иллюстративном варианте осуществления пациентом является человек.

[0073] Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый» относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые, в рамках тщательного медицинского обследования, подходят для контакта с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск. Термин «фармацевтически совместимый

ингредиент» относится к фармацевтически приемлемому разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или носителю, с которым вводят конъюгат антитело-лекарственное средство.

[0074] Термины «специфическое связывание» и «специфически связывается» означают, что антитело против CD30 будет реактивно высокоселективным образом по отношению к своей соответствующей мишени, CD30, а не ко множеству других антигенов.

[0075] Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, которое происходит из клона одной клетки, включая любой клон эукариотических или прокариотических клеток, или клон фага, а не к способу его получения. Таким образом, используемый в настоящем описании термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии.

[0076] Термины «идентичный» или «процент идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются такими же при сравнении и выравнивании для максимального соответствия. Для определения процента идентичности последовательности выравнивают для целей оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислотной или нуклеиновой кислоты могут быть введены пробелы для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеиновой последовательностью). Затем сравниваются аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и в соответствующем положении второй последовательности, то молекулы являются идентичными по этому положению. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е.  $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{количество идентичных положений}}{\text{общее количество положений (например, перекрывающихся положений)}} \times 100$ ). В некоторых вариантах осуществления две последовательности имеют одинаковую длину.

[0077] Термин «практически идентичный» в контексте двух нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75% идентичности; более типично идентичность по меньшей мере 80% или по меньшей мере 85%; и даже более типично по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичности (например, как определено с использованием одного из методов, представленных ниже).

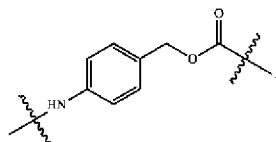
[0078] Определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения

двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, изменено как у Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul, et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410. Поиск нуклеотидов BLAST может быть выполнен с помощью программы NBLAST, оценка=100, длина слова=12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей интересующий белок. Поиск белков BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных интересующему белку. Для получения выравниваний с пробелами в целях сравнения можно использовать GappedBLAST, как описано в Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. В качестве альтернативы, PSI-Blast может использоваться для выполнения повторяющегося поиска, который обнаруживает отдаленные отношения между молекулами (Id.). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Майерса и Миллера, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательности известны в данной области и включают ADVANCE и ADAM, как описано в Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10: 3-5; и FASTA, как описано в Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444-8. Альтернативно, выравнивание белковой последовательности может быть выполнено с использованием алгоритма CLUSTALW, как описано Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266: 383-402.

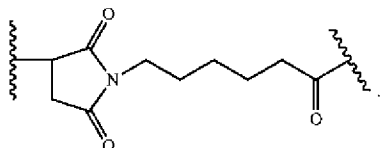
[0079] Аббревиатура «ММАЕ» относится к монометиладельтату Е.

[0080] Аббревиатуры «vc» и «val-cit» относятся к дипептиду валин-цитруллин.

[0081] Аббревиатура «РАВ» относится к самоотщепляющемуся спейсеру:



[0082] Аббревиатура «МС» относится к фрагменту малеимидокапроила:



[0083] сАС10-МС-vc-РАВ-ММАЕ относится к химерному антителу АС10, конъюгированному с лекарственным средством ММАЕ через линкер МС-vc-РАВ.

[0084] Конъюгат анти-CD30 vc-РАВ-ММАЕантитело-лекарственное средство относится к антителу против CD30, конъюгированному с лекарственным средством ММАЕ через линкер, содержащий дипептид валин цитруллин и самоотщепляющийся спейсер РАВ, как показано в формуле (I) патента США. № 9211319.

#### **Антитела**

[0085] Антитела по настоящему описанию предпочтительно являются моноклональными и могут быть полиспецифическими, человеческими, гуманизированными или химерными антителами, одноцепочечными антителами, фрагментами Fab, фрагментами F(ab'), фрагментами, продуцируемыми библиотекой экспрессии Fab, и антигенсвязывающими фрагментами любого из вышеперечисленных. Используемый в настоящем описании термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, то есть молекулам, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывается с CD30. Молекулы иммуноглобулина согласно настоящему описанию могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

[0086] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитела представляют собой фрагменты человеческих антигенсвязывающих антител по настоящему раскрытию и включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab'и F(ab')<sub>2</sub>, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфидно-связанные Fv (sdFv) и фрагменты, содержащие либо VL, либо VH домен. Фрагменты антигенсвязывающих антител, включая одноцепочечные антитела, могут включать переменную область(области) отдельно или в комбинации с целым или частью из следующего: шарнирная область, домены CH1, CH2, CH3 и CL. В раскрытие также включены

антигенсвязывающие фрагменты, также содержащие любую комбинацию вариабельной области (областей) с шарнирной областью, доменами CH1, CH2, CH3 и CL. Предпочтительно антитела представляют собой человеческие, мышьиные (например, мыши и крысы), ослиные, овечьи, кроличьи, козьи, морских свинок, верблюжьи, лошадиные или куриные. В данном контексте «человеческие» антитела включают антитела, имеющие аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и включают антитела, выделенные из библиотек иммуноглобулинов человека, из В-клеток человека или от животных, трансгенных по одному или более иммуноглобулинам человека, как описано ниже и, например, в Пат. США № 5939598 Kucherlapati et al.

[0087] Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими или обладать большей полиспецифичностью. Полиспецифические антитела могут быть специфичными для разных эпитопов CD30 или могут быть специфичными как для CD30, так и для гетерологического белка. См., например, публикации PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Пат. США No. 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148: 1547-1553.

[0088] Антитела по настоящему изобретению могут быть описаны или указаны в терминах конкретных CDR, которые они содержат. Раскрытие охватывает антитело или его производное, содержащее вариабельный домен тяжелой или легкой цепи, указанный вариабельный домен содержит (a) набор из трех CDR, причем указанный набор CDR происходит из желаемого моноклонального антитела, и (b) набор четырех каркасных областей, причем указанный набор каркасных областей отличается от набора каркасных областей в желаемом моноклональном антителе, и где указанное антитело или его производное иммуноспецифически связывается с антигеном-мишенью.

[0089] В различных вариантах осуществления антитело связывается с антигеном на поверхности опухолевой клетки. В различных вариантах осуществления антитело специфично для CD30, CD19, CD70, CD71, CD20, CD52, CD133, EGFR, HER2, VEGF, VEGFR2, PD-1, PDL1, RANKL, CTLA-4, IL-6, SLAMF7, CD3, TNF-альфа, PDGFR-альфа, CD38, GD2, cCLB8, p97, Нектина-4 или EpCAM.

[0090] Антитела против CD19, предназначенные для использования в настоящем документе, раскрыты, например, в Патенте США 9073993. Антитела против CD19, предназначенные для использования в настоящем документе, раскрыты, например, в Патенте США 9345785. Другие антитела, которые связываются с опухолеассоциированными антигенами, известны в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, ритуксимаб, адалимумаб, алемтузумаб, трастузумаб, алемтузумаб, ибритумомаб тиуксетан, цетуксимаб, бевацизумаб, панитумумабу, офатумумаб, ипилимумаб, брентуксимаб ведотин, пертузумаб, адо-трастузумаб, эмтанзин, обинутузумаб, рамуцирумаб, пембролизумаб, тозитумомаб, ниволумабдинутуксимаб, даратумумаб, нецитумумаб, элотузумаб и атезолизумаб.

[0091] Мышиные mAb против CD30, известные в данной области, были получены путем иммунизации мышей клеточными линиями болезни Ходжкина (HD) или очищенным антигеном CD30. AC10, первоначально обозначенный как C10 (Bowenetal., 1993, J. Immunol. 151: 5896 5906), отличается тем, что это mAb против CD30, которое было получено против человеческой NK-подобной клеточной линии, YT (Bowenetal., 1993, J. Immunol. 151: 5896 5906). Первоначально сигнальная активность этого mAb проявлялась в отрицательной регуляции экспрессии молекул CD28 и CD45 на клеточной поверхности, положительной регуляции экспрессии CD25 клеточной поверхности и индукции гомотипической адгезии после связывания C10 с клетками YT. Последовательности антитела AC10 представлены в SEQIDNO: 1-16 и в Таблице А ниже. См. также патент США № 7090843, включенный сюда в качестве ссылки, который раскрывает химерное антитело AC10.

[0092] В одном аспекте антитела согласно настоящему описанию иммуноспецифически связываются с CD30 и оказывают цитостатическое и цитотоксическое действие на злокачественные клетки. В некоторых вариантах осуществления антитела по раскрытию содержат одну или более CDRAC10.

[0093] В конкретном варианте осуществления раскрытие охватывает антитело против CD30 или его производное, содержащее переменный домен тяжелой цепи, причем указанный переменный домен содержит (a) набор из трех CDR, где указанный набор CDR включает SEQIDNO: 4, 6 или 8 и (b) набор из четырех каркасных областей, где указанный набор каркасных областей отличается от набора каркасных областей в моноклональном антителе AC10, и где указанное антитело или его производное иммуноспецифически связывается с CD30.

[0094] В различных вариантах осуществления изобретение охватывает антитело или его производное, содержащее переменный домен легкой цепи, указанный переменный домен содержит (a) набор из трех CDR, где указанный набор CDR включает SEQIDNO: 12, 14 или 16, и (b) набор из четырех каркасных областей, где указанный набор каркасных областей отличается от набора каркасных областей в моноклональном антителе AC10, и где указанное антитело или его производное иммуноспецифически связывается с CD30.

[0095] Кроме того, антитела по настоящему изобретению также могут быть описаны или указаны в терминах их первичных структур. Антитела, имеющие по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности (рассчитанной с использованием методов, известных в данной области и описанных в настоящем документе) переменным областям известного антитела, например AC10, также включены в настоящие методы. Антитела по настоящему изобретению также могут быть описаны или указаны с точки зрения их аффинности связывания с антигеном-мишенью. Предпочтительные аффинности связывания включают



те, у которых константа диссоциации или  $K_d$  составляет менее чем  $5 \times 10^2 M$ ,  $10^2 M$ ,  $5 \times 10^3 M$ ,  $10^3 M$ ,  $5 \times 10^4 M$ ,  $10^4 M$ ,  $5 \times 10^5 M$ ,  $10^5 M$ ,  $5 \times 10^6 M$ ,  $10^6 M$ ,  $5 \times 10^7 M$ ,  $10^7 M$ ,  $5 \times 10^8 M$ ,  $10^8 M$ ,  $5 \times 10^9 M$ ,  $10^9 M$ ,  $5 \times 10^{10} M$ ,  $10^{10} M$ ,  $5 \times 10^{11} M$ ,  $10^{11} M$ ,  $5 \times 10^{12} M$ ,  $10^{12} M$ ,  $5 \times 10^{13} M$ ,  $10^{13} M$ ,  $5 \times 10^{14} M$ ,  $10^{14} M$ ,  $5 \times 10^{15} M$  или  $10^{15} M$ .

[0096] Антитела также включают производные, которые модифицированы, то есть путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, так что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с антигеном-мишенью. Например, но не в качестве ограничения, производные антитела включают антитела, которые были модифицированы, например, гликозилированием, ацетилированием, ПЭГилированием, фосфорилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, связыванием с клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть проведена известными методами, включая, помимо прочего, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т. д. Кроме того, производное может содержать одну или более неклассических аминокислот.

[0097] Антитела, предназначенные для использования в настоящем изобретении, могут быть получены любым подходящим способом, известным в данной области.

[0098] В раскрытии также предлагаются нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, включая, но не ограничиваясь этим, белок по раскрытию и его фрагменты. Рассматриваемые в настоящем описании нуклеиновые кислоты предпочтительно кодируют одну или более CDR антител, которые связываются с CD30 и оказывают цитотоксическое или цитостатическое действие на клетки HD. Типичные нуклеиновые кислоты по изобретению включают SEQIDNO: 3, SEQIDNO: 5, SEQIDNO: 7, SEQIDNO: 11, SEQIDNO: 13 или SEQIDNO: 15. Нуклеиновые кислоты вариабельной области по изобретению включают SEQIDNO: 1 или SEQIDNO: 9. (См. Таблицу А).

**Таблица А**

МОЛЕКУЛА	НУКЛЕОТИД ИЛИ АМИНОКИСЛОТА	SEQ ID NO
АС 10, ВАРИАБЕЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ	НУКЛЕОТИД	1
АС 10, ВАРИАБЕЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ	АМИНОКИСЛОТА	2
АС 10, CDR1 ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ (H1)	НУКЛЕОТИД	3
АС 10, CDR1 ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ (H1)	АМИНОКИСЛОТА	4
АС 10, CDR2 ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ (H2)	НУКЛЕОТИД	5
АС 10, CDR2 ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ (H2)	АМИНОКИСЛОТА	6

АС 10, CDR3ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ (H3)	НУКЛЕОТИД	7
АС 10, CDR3ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ (H3)	АМИНОКИСЛОТА	8
АС 10, ВАРИАБЕЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ	НУКЛЕОТИД	9
АС 10, ВАРИАБЕЛЬНАЯ ОБЛАСТЬ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ	АМИНОКИСЛОТА	10
АС 10, CDR1 ЛЕГКОЙ ЦЕПИ (L1)	НУКЛЕОТИД	11
АС 10, CDR1 ЛЕГКОЙ ЦЕПИ (L1)	АМИНОКИСЛОТА	12
АС 10, CDR2 ЛЕГКОЙ ЦЕПИ (L2)	НУКЛЕОТИД	13
АС 10, CDR2 ЛЕГКОЙ ЦЕПИ (L2)	АМИНОКИСЛОТА	14
АС 10, CDR3 ЛЕГКОЙ ЦЕПИ (L3)	НУКЛЕОТИД	15
АС 10, CDR3 ЛЕГКОЙ ЦЕПИ (L3)	АМИНОКИСЛОТА	16

[0099] В различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG, например антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно антитело IgG1.

#### **Конъюгаты антитело-лекарственное средство**

[0100] В настоящем описании предполагается использование конъюгатов лекарственное средство-линкерное звено-антитело или конъюгатов антитело-лекарственное средство, содержащих агенты, разрушающие тубулин, для лечения солидных опухолей.

[0101] В данной области известно несколько различных категорий агентов, разрушающих тубулин, включая ауристатины, тубулизины, колхицин, алкалоиды барвинка, таксаны, криптофицины, майтанзиноиды, гемиастерлины и другие агенты, разрушающие тубулин.

[0102] Ауристатины являются производными натурального продукта доластатина. Примеры ауристатинов включают долостатин-10, ММАЕ (N-метилвалин-валин-долаизолейцин-долапролин-норэфедрин) и ММАF (N-метилвалин-валин-долаизолейцин-долапролин-фенилаланин) и AFP. В WO 2015/057699 описаны ПЭГилированные ауристатины. Дополнительные производные доластатина, предназначенные для использования, описаны в Патенте США 9345785, включенном сюда в качестве ссылки.

[0103] Тубулизины включают, но не ограничиваются ими, тубулизин D, тубулизин M, тубуфенилаланин и тубутирозин. WO 2017-096311 и WO 2016-040684 описывают аналоги тубулизина, включая тубулизин M.

[0104] Колхицины включают, но не ограничиваются ими, колхицин и СА-4.

[0105] Алкалоиды барвинка включают, но не ограничиваются ими, винбластин (VBL), винорелбин (VRL), винкристин (VCR) и виндезин (VDS).

[0106] Таксаны включают, но не ограничиваются ими, паклитаксел и доцетаксел.

[0107] Криптофицины включают, но не ограничиваются ими, криптофицин-1 и

криптофицин-52.

[0108] Майтанзиноиды включают, но не ограничиваются ими, майтанзин, майтанзиол, аналоги майтанзина, DM1, DM3 и DM4 и ансаматоцин-2. Типичные майтанзиноидные лекарственные группы включают те, которые имеют модифицированное ароматическое кольцо, такие как: С-19-дехлоро (Пат. США № 4256746) (полученный восстановлением ансамитоцина Р2 алюмогидридом лития); С-20-гидрокси (или С-20-деметил) +/- С-19-дехлор (Пат. США No. 4361650 и 4307016) (получен деметилированием с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорированием с использованием ЛАН); и С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/- дехлоро (Пат. США No. 4294757) (получено ацилированием с помощью ацилхлоридов) и те, которые имеют модификации в других положениях.

[0109] Фрагменты майтанзиноидного лекарственного средства также включают те, которые имеют модификации, такие как: С-9-SH (Пат. США US 4424219) (полученный реакцией майтанзиола с  $H_2S$  или  $P_2S_5$ ); С-14-алкоксиметил (деметокси/ $CH_2OR$ ) (Пат. США № 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил ( $CH_2OH$  или  $CH_2OAc$ ) (Пат. США № 4450254) (получен из *Nocardia*); С-15-гидрокси/ацилокси (Пат. США № 4364866) (полученный превращением майтанзиола *Streptomyces*); С-15-метокси (Пат. США No. 4313946 и 4315929) (выделено из *Trewianudflora*); С-18-N-деметил (Пат. США No. 4362663 и 4322348) (полученный деметилированием майтанзиола *Streptomyces*); и 4,5-дезоксид (Пат. США № 4371533) (полученный восстановлением трихлоридом титана/ЛАН майтанзиола). Цитотоксичность конъюгата ТА.1-майтанзиноид, который связывает HER-2 (Charietal., *CancerResearch* 52: 127-131 (1992), тестировали *invitro* на линии клеток рака молочной железы человека SK-BR-3. Конъюгат лекарственного средства достигший уровня цитотоксичности, схожего с уровнем свободного майтанзиноида, который может быть повышен увеличением числа молекул майтанзиноида на молекулу антитела.

[0110] Гемиастерлины включают, но не ограничиваются ими, гемиастерлин и НТИ-286.

[0111] Другие агенты, разрушающие тубулин, включают таккалонолид А, таккалонолид В, таккалонолид АF, таккалонолид АJ, таккалонолид АI-эпоксид, дискодермолид, эпотилон А, эпотилон В и лаулималид.

[0112] Лекарственное средство-линкерное звено-антитело или конъюгаты антитело-лекарственное средство, предназначенные для использования в способах, описанных в настоящем документе, содержат линкерные звенья. Обычно ADC или производное ADC содержит линкерную область между терапевтическим агентом и антителом или его производным. Линкер может быть линкером, расщепляемым протеазой, линкером, расщепляемым кислотой, дисульфидным линкером, самостабилизирующимся линкером. В различных вариантах осуществления линкер может расщепляться во внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера высвобождает терапевтический агент из антитела во внутриклеточной среде.

[0113] Например, в некоторых вариантах осуществления линкер может

расщепляться расщепляющим агентом, который присутствует во внутриклеточной среде (например, в лизосоме, эндосоме или кавеоле). Линкер может быть, например, пептидным линкером который расщепляют внутриклеточная пептидаза или фермент-протеаза, включая, без ограничения перечисленным, лизосомную или эндосомную протеазу. Обычно пептидный линкер имеет длину по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин, каждый из которых известен как гидролизующее дипептидное лекарственное производное, что приводит к высвобождению активного лекарственного средства внутри клеток-мишеней (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Наиболее типичными являются пептидные линкеры, которые расщепляются ферментами, присутствующими в антиген-экспрессирующих клетках. Например, можно использовать пептидный линкер, который расщепляется тиол-зависимой протеазой катепсин-В, которая высоко экспрессируется в ткани опухоли (например, линкер Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly). Другие такие линкеры описаны, например, в Пат. США № 6214345. В конкретных вариантах осуществления пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, представляет собой линкер Val-Cit или линкер Phe-Lys (см., например, Пат. США № 6214345, в котором описан синтез доксорубина с линкером val-cit). Одно из преимуществ применения внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического агента, заключается в том, что агент, как правило, ослаблен при конъюгации, а сывороточные стабильности конъюгатов, как правило, являются высокими. См. также патент США 9345785.

[0114] Термины «внутриклеточно расщепляемый» и «внутриклеточное расщепление» относятся к метаболическому процессу или реакции внутри клетки на конъюгате антитело-лекарственное средство, в результате чего нарушается ковалентное связывание, например, линкера, между лекарственным компонентом (D) и единицей антитела, в результате чего свободное лекарственное средство или другой метаболит конъюгата диссоциируют от антитела внутри клетки. Таким образом, расщепленные фрагменты конъюгата лекарственное средство-линкерное звено-Ab являются внутриклеточными метаболитами.

[0115] В различных вариантах осуществления расщепляемый линкер является чувствительным к рН, то есть чувствительным к гидролизу при определенных значениях рН. Как правило, рН-чувствительный линкер является гидролизующим в кислых условиях. Например, можно использовать чувствительный к кислотам линкер, который гидролизуется в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь и т.п.). (См., например, Пат. США №. 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661.). Такие линкеры являются относительно стабильными при нейтральных значениях рН, таких как в крови, но являются нестабильными при рН ниже 5,5 или 5,0, примерных значениях рН в лизосоме. В

некоторых вариантах осуществления гидролизуемый линкер представляет собой тиоэфирный линкер (такой как, например, простой тиоэфир, присоединенный к терапевтическому агенту через ацилгидразоновую связь (см., например, Пат.США № 5622929)).

[0116] В различных вариантах осуществления линкер расщепляется в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). Известны различные дисульфидные линкеры, включая, например, те, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-5-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа(2-пиридилдитио)толуол)-, SPDB и SMPT (см., например, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C. W. Vogeled., Oxford U. Press, 1987. См. также Пат. США № 4880935.)

[0117] В различных вариантах осуществления линкер представляет собой малонатный линкер (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15: 1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304), или 3'-N-амидный аналог (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12).

[0118] В некоторых вариантах осуществления линкерное звено не расщепляется, и лекарственное средство высвобождается в результате разложения антитела. См. Публикацию США № 2005/0238649).

[0119] В различных вариантах осуществления линкер по существу не чувствителен к внеклеточной среде. Используемый в настоящем описании термин «по существу не чувствителен к внеклеточной среде» в контексте линкера означает, что не более чем примерно 20%, обычно не более чем примерно 15%, более типично не более чем примерно 10% и даже более типично не более чем примерно 5%, не более чем примерно 3% или не более чем примерно 1% линкеров в образце ADC или производного ADC расщепляются, когда производное ADC или ADC присутствует во внеклеточной среде (например, в плазме). Можно ли определить, является ли линкер в значительной степени чувствительным к внеклеточной среде, например, путем независимой инкубации с плазмой как (а) ADC, так и производного ADC («образец ADC») и (b) равного молярного количества неконъюгированного антитела или терапевтического агента («контрольный образец») в течение заданного периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 часа), а затем сравнивая количество неконъюгированного антитела или терапевтического агента, присутствующего в образце ADC, с количеством, присутствующим в контрольном образце, измеренном, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0120] В различных вариантах осуществления линкер способствует интернализации клеток. В некоторых вариантах осуществления линкер способствует интернализации клеток при конъюгации с терапевтическим агентом (т.е. в среде

фрагмента ADC в виде линкерно-терапевтического агента или производного ADC, как описано в настоящем документе). Еще в других вариантах осуществления линкер способствует интернализации клеток при конъюгации как с лекарственным средством, так и с антиген-специфическим антителом или его производным (т.е. в среде ADC или производного ADC, как описано в настоящем документе).

[0121] Разнообразные линкеры, которые можно использовать с настоящими композициями и способами, описаны в WO 2004010957, озаглавленном «Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease», поданном в июле, 31, 2003.

[0122] В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый протеазой, включает тиольный реакционноспособный спейсер и дипептид. В некоторых вариантах осуществления линкер, расщепляемый протеазой, состоит из тиольного реакционноспособного малеимидокапроильного спейсера, дипептида валин-цитруллин и п-аминобензилоксикарбонильного спейсера.

[0123] В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый кислотой, представляет собой гидразиновый линкер или четвертичный аммониевый линкер.

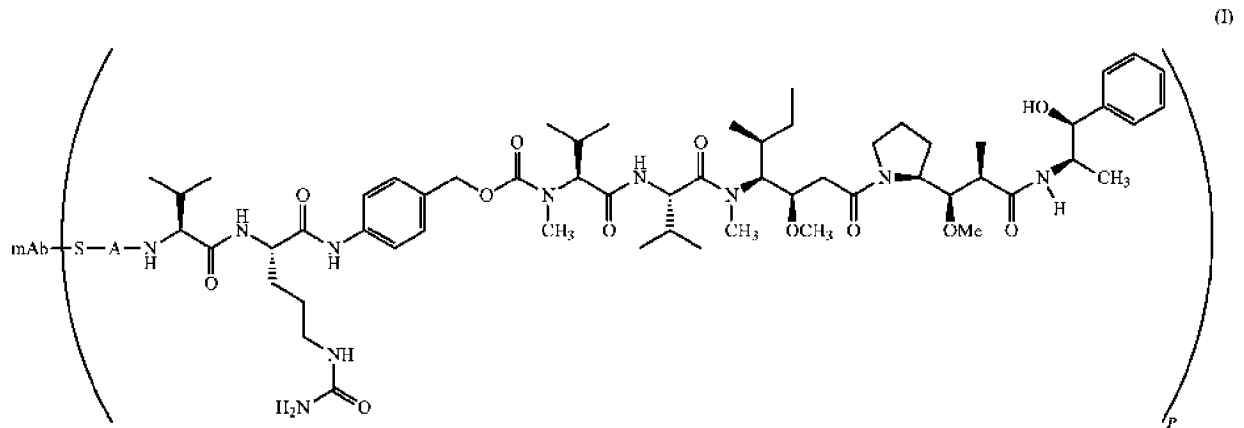
[0124] Самостабилизирующиеся линкеры, содержащие малеимидную группу, описаны в Патенте США 9504756, включенном в настоящее описание в качестве ссылки.

[0125] В различных вариантах осуществления агент, разрушающий тубулин, такой как ауристатин, конъюгирован с линкером с помощью С-концевой карбоксильной группы, которая образует амидную связь с линкером, как описано в Патенте 9463252, включенном в настоящее описание в качестве ссылки. В различных вариантах осуществления линкерное звено содержит по меньшей мере одну аминокислоту. Конъюгаты связывающее средство-лекарство (ADC) N, N-диалкилауристатинов раскрыты в Патенте США 8992932.

[0126] В различных вариантах осуществления линкер также содержит звено вставки и/или аминокислотное звено. Примеры звеньев вставки и аминокислотных звеньев описаны в Патенте США 9345785 и в Патенте США 9078931, каждый из которых включен сюда в качестве ссылки.

[0127] В различных вариантах осуществления в настоящем описании предусмотрено использование конъюгатов антитело-лекарственное средство, содержащих антитело против CD30, ковалентно связанное с MMAE через линкер vc-PAV. Конъюгаты антитело-лекарственное средство доставляют пациенту в виде фармацевтической композиции. Конъюгаты антитело против CD30-лекарственное средство описаны в Патенте США № 9211319, включенном сюда в качестве ссылки.

[0128] В различных вариантах осуществления конъюгаты лекарственное средство-линкерное звено-антитело/антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению имеют следующую формулу:



или его фармацевтически приемлемая соль; где: mAb представляет собой моноклональное антитело, такое как антитело против CD30 или антитело против CD19, S представляет собой атом серы антитела, А- представляет собой звено вставки, р составляет от примерно 3 до примерно 5.

[0129] Загрузка лекарственного средства представлена р, средним числом молекул лекарственного средства на антитело в фармацевтической композиции. Например, если р составляет примерно 4, средняя нагрузка лекарственного средства с учетом всех антител, присутствующих в фармацевтической композиции, составляет примерно 4. Р находится в диапазоне от примерно 3 до примерно 5, более предпочтительно от примерно 3,6 до примерно 4,4, даже более предпочтительно от примерно 3,8 до примерно 4,2. Р может составлять примерно 3, примерно 4 или примерно 5. Среднее количество молекул лекарственного средства на антитело в продуктереакции конъюгации может быть определено обычными средствами, такими как масс-спектропия, анализ ИФА, и ВЭЖХ. Также можно определить количественное распределение конъюгатов антитело-лекарственное средство с точки зрения р. В некоторых случаях разделение, очистка и характеристика гомогенных конъюгатов антитело-лекарственное средство, где р представляет собой определенное значение, из конъюгатов антитело-лекарственное средство с другими нагрузками лекарственного средства могут быть достигнуты с помощью таких средств, как ВЭЖХ с обращенной фазой или электрофорез.

[0130] Звено вставки (А) способно связывать звено антитела с аминокислотным звеном валин-цитруллин через сульфгидрильную группу антитела. Сульфгидрильные группы могут быть получены, например, путем восстановления межцепочечных дисульфидных связей антиген-специфического антитела. Например, звено вставки может быть связано с антителом через атомы серы, образующиеся при восстановлении межцепочечных дисульфидных связей антитела. В некоторых вариантах осуществления звенья вставки связаны с антителом исключительно через атомы серы, образующиеся в результате восстановления межцепочечных дисульфидных связей антитела. В некоторых вариантах осуществления сульфгидрильные группы могут быть получены реакцией

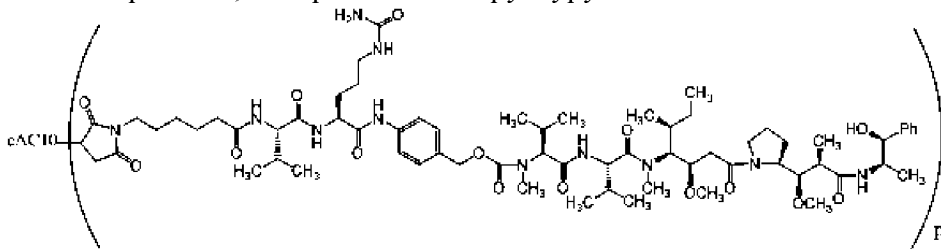
аминогруппы лизиновой части антитела с 2-иминотиолоном (реагент Траута) или другими реагентами, образующими сульфгидрил. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой рекомбинантное антитело и сконструировано для переноса одного или более лизинов. В некоторых других вариантах осуществления рекомбинантное антитело сконструировано так, чтобы нести дополнительные сульфгидрильные группы, например, дополнительные цистеины.

[0131] Синтез и структура MMAE описаны в Пат. США № 6884869, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме и для всех целей. Синтез и структура типичных звеньев вставки и способы получения конъюгатов антитело-лекарственное средство описаны, например, в публикациях США № 2006/0074008 и 2009/0010945, каждая из которых полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

[0132] Типичные звенья вставки описаны в квадратных скобках формул IIIa и IIIb в патенте США 9211319 и включены в настоящее описание в качестве ссылки.

[0133] В различных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство содержит монометилауристин E и линкер, расщепляемый протеазой. Предполагается, что линкер, расщепляемый протеазой, содержит тиольный реакционноспособный спейсер и дипептид. В различных вариантах осуществления линкер, расщепляемый протеазой, состоит из тиольного реакционноспособного малеимидокапроильного спейсера, дипептида валин-цитруллин и р-аминобензилоксикарбонильного спейсера.

[0134] В предпочтительном варианте осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой брентуксимаб ведотин, конъюгат антитело-лекарственное средство, который имеет структуру:



[0135] Брентуксимаб ведотин представляет собой конъюгат антитело против CD30-лекарственное средство, состоящий из трех компонентов: (i) химерное антитело IgG1 сAC10, специфичное для человеческого CD30, (ii) агент, разрушающий микротрубочки, MMAE, и (iii) линкер, расщепляемый протеазой, который ковалентно присоединяет MMAE к сAC10. Отношение лекарственного средства к антителам или нагрузка лекарственного средства обозначается с помощью «р» в структуре брентуксимаб ведотина и колеблется в виде целых значений от 1 до 8. Средняя нагрузка препарата брентуксимаб ведотин в фармацевтической композиции составляет примерно 4.

### Способы Применения

[0136] В настоящем описании предложены способы лечения солидной опухоли,



включающие введение конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего агент, разрушающий тубулин, для лечения солидной опухоли. В различных вариантах осуществления предполагается, что с помощью способов по настоящему изобретению подвергают лечению солидные опухоли путем индукции путей ER-стресса после нарушения функции микротрубочек. В различных вариантах осуществления агент конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащий агент, разрушающий тубулин, индуцирует апоптоз в солидной опухоли.

[0137] В различных вариантах осуществления конъюгированный агент антитело-лекарственное средство, содержащий агент, разрушающий тубулин, увеличивает миграцию иммунных клеток к солидной опухоли.

[0138] В примерах показано, что агенты, разрушающие тубулин, увеличивают пути белков ER-стресса, как например, увеличение секреции ATF и повышение уровня белка группы 1 с высокой подвижностью (HMGB1), что приводит к усилению апоптоза клеток, что, в свою очередь, может направить иммунные клетки к участку апоптоза и клеточного стресса.

[0139] Предполагается, что описанные в настоящем документе способы уменьшают размер опухоли или опухолевую нагрузку у пациента и/или уменьшают метастазирование у пациента. В различных вариантах осуществления размер опухоли у пациента уменьшается примерно на 25-50%, примерно на 40-70% или примерно на 50-90% или более. В различных вариантах осуществления способы уменьшают размер опухоли на 10%, 20%, 30% или более. В различных вариантах осуществления способы уменьшают размер опухоли на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75. %, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

[0140] Предполагается, что способы, описанные в настоящем документе, уменьшают опухолевую нагрузку, а также уменьшают или предотвращают рецидив опухолей после того, как рак перешел в ремиссию.

[0141] Примеры солидных опухолей, рассматриваемых в настоящем документе, включают рак легких, рак груди, рак яичников, рак шейки матки, рак желудочно-кишечного тракта, рак головы и шеи, меланому, саркому, рак пищевода, рак поджелудочной железы, метастатического рак поджелудочной железы, метастатическую аденокарциному поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак желудка, фиброзного рак, глиому, злокачественную глиому, диффузную глиому ствола головного мозга, рецидивирующее новообразование головного мозга у детей, почечно-клеточную карциному, светлоклеточную метастатическую почечно-клеточную карциному, рак почки, рак предстательной железы, метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы, рак предстательной железы IV стадии, метастатическую меланому, меланому, злокачественную меланому, рецидивирующую меланому кожи, метастазы меланомы в мозг, меланому кожи IIIA стадии; меланому кожи стадии IIIB, меланому кожи стадии IIIC; меланому кожи стадии IV, злокачественную меланому головы и шеи, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), плоскоклеточный

немелкоклеточныйрак легкого, рак молочной железы, рецидивирующий метастатическийрак молочной железы, гепатоцеллюлярную карциному, синдрома Рихтера; макроглобулинемию Вальденстрема, глиобластома взрослых; глиосаркому взрослых, рецидивирующую глиобластома, рецидивирующую рабдомиосаркому у детей, рецидивирующую саркому Юинга/периферическую примитивную нейроэктодермальную опухоль, рецидивирующую нейробластома; рецидивирующую остеосаркому, колоректальныйрак, MSI-положительный колоректальныйрак; MSI-отрицательныйколоректальныйрак, неороговевающую карциному носоглотки; рецидивирующую недифференцированную карциному носоглотки, аденокарциному шейки матки; железисто-плоскоклеточную карциному шейки матки; плоскоклеточныйрак шейки матки; рецидивирующую карциному шейки матки; рак шейки матки IVA стадии; рак шейки матки IVB стадии, плоскоклеточныйрак анального канала; метастатическую карциному анального канала; рецидивирующую карциному анального канала, рецидивирующийрак головы и шеи; плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), карциному яичников, рак толстой кишки, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта поздней стадии, аденокарциному желудка; аденокарциному гастроэзофагеального перехода, новообразование костей, саркому мягких тканей; саркому костей, карциному тимуса, уротелиальную карциному, рецидивирующую карциному из клеток Меркеля; карциному из клеток Меркеля стадии III; карциному из клеток Меркеля стадии IV, миелодиспластический синдром и синдром Сезари. В одном варианте осуществления солидная опухоль представляет собой солидную опухоль, не являющуюся лимфомой. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль может представлять собой множественную миелому.

[0142] В различных вариантах осуществления ADC можно вводить с одним или более химиотерапевтическими средствами. Типичные химиотерапевтические агенты раскрыты в следующей таблице, и их можно использовать отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными химиотерапевтическими агентами, которые, в свою очередь, также можно вводить в комбинации с конъюгатом антитело-лекарственное средство.

<u>Алкилирующие агенты</u>	<u>Натуральные продукты</u>
<u>Азотистый иприт</u>	<u>Антимитотические лекарственные средства</u>
мехлорэтамин	<u>Таксаны</u>
циклофосфамид	паклитаксел
ифосфамид	алкалоиды барвинка
мелфалан	винбластин (VLB)
хлорамбуцил	винкристин
<u>Нитрозомочевины</u>	виндезин
кармустин (BCNU)	

ломустин (CCNU)	винорельбин
семустин (метил CCNU)	Таксотер® (доцетаксел)
<u>Этиленимин/метилмеламин</u>	эстрамустин
триэтиленмеламин (ТЕМ)	эстрамустин фосфат
триэтилентиофосфорамид	<u>Эпиподофилотоксины</u>
(тиотепа)	этопозид
гексаметилмеламин	тенипозид
(НММ, альтретамин)	<u>Антибиотики</u>
<u>Алкилсульфонаты</u>	актимомицин D
бусульфан	дауномицин (рубидо мицин)
<u>Триазины</u>	доксорубицин (адрия мицин)
дакарбазин (DTIC)	митоксантрон
<u>Антиметаболиты</u>	идарубицин
<u>Аналоги фолиевой кислоты</u>	эпирубицин
метотрексат	валрубицин
Триметрексат	блеомицин
Пеметрексед	спликамицин (митрамицин)
(антитело против фолата со множеством мишеней)	митомицин С
<u>Аналоги пиримидина</u>	дактиномицин
5 фторурацил	афидиколин
фтордезоксифуридин	<u>Ферменты</u>
гемцитабин	L аспарагиназа
цитозин арабинозид	L-аргиназа
(АгаС, цитарабин)	<u>Радиосенсибилизаторы</u>
5 азациитидин	метронидазол
2,2' дифтордезоксифуридин	мизонидазол
<u>Аналоги пурина</u>	десметилмизонидазол
6 меркаптопурин	пимонидазол
6 тиогуанин	этанидазол
азатиоприн	ниморазол
2' дезоксиформидин	RSU 1069
(пентостатин)	EO9
эритрогидроксинониладенин (EHNA)	RB 6145
флударабин фосфат	SR4233
	никотинамид

2 хлордезоксаденозин (кладрибин, 2 CdA)	5 бромдезоксуридин 5 йоддезоксуридин бромдезоксцитидин
<b><u>Ингибиторы топоизомеразы типа I</u></b>	<b><u>Разные агенты</u></b>
камптотецин	бисфосфонаты
топотекан	<b><u>Ингибитор RANKL</u></b>
иринотекан	деносуаб
<b><u>Модификаторы биологической реакции</u></b>	<b><u>Платиновые координационные комплексы</u></b>
GCSF	цисплатин
GMCSF	карбоплатин
<b><u>Агенты дифференцировки</u></b>	оксалиплатин
производные ретиноевой кислоты	нтрацендион
<b><u>Гормоны и антагонисты</u></b>	митоксантрон
<b><u>Адреностероиды/антагонисты</u></b>	<b><u>Замещенная мочевины</u></b>
кальцитонин	гидроксимочевина
преднизон и его эквиваленты	<b><u>Производные метилгидразина</u></b>
дексаметазон	N-метилгидразин (МН)
аминоглутетимид	прокарбазин
<b><u>Прогестины</u></b>	<b><u>Супрессивное средство надпочечников</u></b>
гидроксипрогестерона капроат	митотан (o, p' DDD)
медроксипрогестерона ацетат	аминоглутетимид
мегестрола ацетат	<b><u>Цитокины</u></b>
<b><u>Эстрогены</u></b>	интерферон ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )
диэтилстильбестрол	интерлейкин 2
этинилэстрадиол/эквиваленты	<b><u>Фотосенсибилизаторы</u></b>
<b><u>Антиэстроген</u></b>	производные гематопопорфирина
тамоксифен	Фотофрин®
<b><u>Андрогены</u></b>	производные бензопорфирина
пропионат тестостерона	Nre6
флуоксиместерон/эквиваленты	этиопорфирин олова (SnET2)
<b><u>Антиандрогены</u></b>	феоборид а
флутамид	бактериохлорофилл а
аналоги гонадотропин-высвобождающих	нафталоцианины
гормонов	фталоцианины
лейпролид	фталоцианины цинка
<b><u>Нестероидные антиандрогены</u></b>	

флутамид	<b><u>Излучение</u></b>
<b><u>Ингибиторы гистон-деацетилазы</u></b>	Рентгеновская
Вориностат	ультрафиолетовое излучение
Ромидепсин	гамма-излучение
	видимый свет
	инфракрасное излучение
	микроволновое излучение

[0143] В различных вариантах осуществления терапию проводят на периодической основе, например, дважды в неделю, еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели, ежемесячно, один раз в два месяца или с более длительным интервалом. В родственном воплощении в иллюстративных вариантах лечения конъюгат антитело-лекарственное средство вводят в диапазоне доз от 0,1 до 15 мг/кг.

[0144] В одном аспекте способы настоящего раскрытия включают стадию введения фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой стерильную композицию.

[0145] Способы настоящего раскрытия осуществляются с использованием любых приемлемых с медицинской точки зрения средств для введения терапевтических средств прямо или косвенно субъекту-млекопитающему, включая, помимо прочего, инъекции, пероральный прием, интраназальное введение, местное, трансдермальное, парентеральное, ингаляционное введение, вагинальное или ректальное введение. Термин «парентеральный», используемый в настоящем описании, включает подкожные, внутривенные, внутримышечные и внутрицистернальные инъекции, а также методы с использованием катетера или инфузии. Также предполагается введение путем внутрикожной, интрамаммарной, внутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной, внутривенной инъекции и/или хирургической имплантации в конкретный участок.

[0146] В одном варианте осуществления введение осуществляется в участке опухоли или пораженной ткани, нуждающейся в лечении, путем прямой инъекции в участок или через механизм непрерывной доставки или замедленного высвобождения, который может доставлять состав внутрь. Например, биоразлагаемые микросферы или капсулы или другие конфигурации биоразлагаемого полимера, способные к длительной доставке композиции (например, растворимого полипептида, антитела или низкомолекулярного соединения), могут быть включены в составы по раскрытию, имплантированные рядом с участком опухоли или в участке опухоли.

[0147] Терапевтические композиции также могут быть доставлены пациенту в несколько участков. Множественные введения могут проводиться одновременно или могут проводиться в течение определенного периода времени. В некоторых случаях полезно обеспечить непрерывный поток терапевтической композиции.

[0148] В настоящем раскрытии также предполагается введение множества агентов, таких как композиции антител, в сочетании с другим агентом, как описано в настоящем

документе, включая, но не ограничиваясь этим, химиотерапевтический агент.

[0149] Количества композиции конъюгата антитело-лекарственное средство в данной дозировке могут варьироваться в зависимости от размера индивидуума, которому назначается терапия, а также от характеристик заболевания, которое подвергают лечению. В иллюстративных схемах лечения может потребоваться введение примерно 1 мг/день, 5 мг/день, 10 мг/день, 20 мг/день, 50 мг/день, 75 мг/день, 100 мг/день, 150 мг/день, 200 мг/день, 250 мг/день, 500 мг/день или 1000 мг/день. Эти концентрации можно вводить в виде разовой лекарственной формы или в виде нескольких доз. Стандартные исследования зависимости доза-ответ сначала на животных моделях, а затем в ходе клинических испытаний, выявляют оптимальные дозировки для конкретных болезненных состояний и групп пациентов.

[0150] Также рассматривается композиция, содержащая любой из вышеуказанных конъюгатов антитело-лекарственное средство, или их применение при приготовлении лекарственного средства для лечения солидной опухоли. Также предусмотрены шприцы, например, одноразовые или предварительно заполненные шприцы, стерильные герметичные контейнеры, например флаконы, бутылка, сосуд и/или наборы или упаковки, содержащие любые из вышеуказанных антител или композиций, необязательно с подходящими инструкциями по применению.

#### **Составы**

[0151] Для введения конъюгата лекарственное средство-линкерное звено-антитело /конъюгатов антитело-лекарственное средство можно использовать различные системы доставки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения введение соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство осуществляется путем внутривенной инфузии или подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется путем внутривенной инфузии в течение 30 минут, 1 часа или двух часов.

[0152] Конъюгатное соединение антитело-лекарственное средство можно вводить в виде фармацевтической композиции, содержащей один или более фармацевтически совместимых ингредиентов. Например, фармацевтическая композиция обычно включает один или более фармацевтически приемлемых носителей, например, носители на водной основе (например, стерильные жидкости). Вода является более типичным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции.

[0153] При желании композиция также может содержать, например, физиологические соли, буферы, соли, неионные детергенты и/или сахара. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences» E. W. Martin. Составы соответствуют способу введения.

[0154] В настоящем описании представлены, например, фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство, буферный агент, необязательно криопротектор, необязательно

наполнитель, необязательно соль и необязательно поверхностно-активное вещество. В композицию могут быть добавлены дополнительные агенты. Один агент может выполнять несколько функций. Например, сахар, такой как трегалоза, может действовать как криопротектор, так и как наполнитель. Любые подходящие фармацевтически приемлемые буферные агенты, поверхностно-активные вещества, криопротекторы и наполнители могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением.

[0155] В дополнение к способам лечения гемобластоза настоящее изобретение относится к составам конъюгата антитело-лекарственный препарат, включая составы конъюгата лекарственного средства, которые подверглись лиофилизации, или другим способам сохранения белка, а также к лекарственным составам антител, которые не подвергались лиофилизации.

[0156] В некоторых вариантах осуществления состав конъюгата антитело-лекарственное средство содержит (i) примерно 1-25 мг/мл, примерно от 3 до примерно 10 мг/мл конъюгата антитело-лекарственное средство или примерно 5 мг/мл (например, конъюгата антитело-лекарственное средство формулы I или его фармацевтически приемлемой соли), (ii) от примерно 5 до 50 мМ, предпочтительно от примерно 10 до примерно 25 мМ буфера, выбранного из цитратного, фосфатного или гистидинового буфера или их комбинаций, предпочтительно цитрата натрия, фосфата калия, гистидина, гидрохлорида гистидина или их комбинации, (iii) от примерно 3% до примерно 10% сахарозы или трегалозы или их комбинации, (iv) необязательно от примерно 0,05 до 2 мг/мл поверхностно-активного вещества, выбранного из полисорбата 20 или полисорбата 80 или их комбинации; и (v) воды, где pH композиции составляет от примерно 5,3 до примерно 7, предпочтительно примерно 6,6.

[0157] В некоторых вариантах осуществления состав конъюгата антитело-лекарственное средство будет содержать примерно 1-25 мг/мл, примерно от 3 до примерно 10 мг/мл, предпочтительно примерно 5 мг/мл конъюгата антитело-лекарственное средство, (ii) от примерно 10 мМ до примерно 25 мМ буфера, выбранного из цитрата натрия, фосфата калия, гистидина, гидрохлорида гистидина или их комбинаций, (iii) от примерно 3% до примерно 7% трегалозы или сахарозы или их комбинаций, необязательно (iv) от примерно 0,05 до примерно 1 мг/мл поверхностно-активного вещества, выбранного из полисорбата 20 или полисорбата 80, и (v) воды, где pH композиции составляет от примерно 5,3 до примерно 7, предпочтительно примерно 6,6.

[0158] В некоторых вариантах осуществления состав конъюгата антитело-лекарственное средство будет содержать примерно 5 мг/мл конъюгата антитело-лекарственное средство, (ii) от примерно 10 мМ до примерно 25 мМ буфера, выбранного из цитрата натрия, фосфата калия, гистидина, гидрохлорида гистидина или их комбинаций из них (iii) от примерно 3% до примерно 7% трегалозы, необязательно (iv) от примерно 0,05 до примерно 1 мг/мл поверхностно-активного вещества, выбранного из полисорбата 20 или полисорбата 80, и (v) воды, при этом pH композиции составляет от примерно 5,3 до примерно 7, предпочтительно примерно 6,6.

[0159] Любой из описанных выше составов может храниться в жидкой или замороженной форме и может быть необязательно подвергнут процессу консервации. В некоторых вариантах осуществления описанные выше составы лиофилизированы, т.е. они подвергаются лиофилизации. В некоторых вариантах осуществления описанные выше составы подвергаются процессу консервации, например лиофилизации, и впоследствии восстанавливаются подходящей жидкостью, например водой. Под лиофилизацией подразумевается, что композиция была высушена вымораживанием в вакууме. Лиофилизация обычно осуществляется путем замораживания конкретного состава, так что растворенные вещества отделяются от растворителя (ей). Затем растворитель удаляют сублимацией (т.е. первичной сушкой), а затем десорбцией (т.е. вторичной сушкой).

[0160] Композиции по настоящему изобретению можно использовать с описанными в настоящем описании способами или с другими способами лечения заболевания. Составы конъюгата антитело-лекарственное средство можно дополнительно разбавить перед введением пациенту. В некоторых вариантах осуществления составы будут разбавлены физиологическим раствором и помещены в пакеты для внутривенного введения или шприцы перед введением пациенту. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способы лечения гемобластоза у пациента будут включать введение пациенту, нуждающемуся в этом, еженедельной дозы фармацевтической композиции, содержащей конъюгаты антитело-лекарственное средство формулы I, где вводимая доза конъюгатов антитело-лекарственное средство составляет от примерно 1,8 мг/кг или 1,2 мг/кг массы тела пациента до 0,9 мг/кг массы тела пациента, и фармацевтическую композицию вводят в течение поменьшей мере трех недель, при этом конъюгаты антитело-лекарственное средство перед введением пациенту присутствовали в составе, содержащем (i) примерно 1-25 мг/мл, предпочтительно примерно от 3 до примерно 10 мг/мл конъюгата антитело-лекарственное средство (ii) примерно 5-50 мМ, предпочтительно от примерно 10 до примерно 25 мМ буфера, выбранного из цитрата натрия, фосфата калия, гистидина, гидрохлорида гистидина или их комбинаций, (iii) от примерно 3% до примерно 10% сахарозы или трегалозы или их комбинаций, (iv) необязательно от примерно 0,05 до 2 мг/мл поверхностно-активного вещества, выбранного из полисорбата 20 или полисорбата 80 или их комбинаций; и (v) воду, где pH композиции составляет от примерно 5,3 до примерно 7, предпочтительно примерно 6,6.

[0161] Для использования в настоящем описании могут быть предусмотрены составы химиотерапевтических средств, включая доксорубин, винбластин, дакарбазин, циклофосфамид, винкрестин или преднизон, которые обычно используются при лечении онкологических заболеваний. Например, доксорубин, винбластин, дакарбазин, циклофосфамид, винкрестин и преднизон коммерчески доступны и одобрены FDA США и другими регулирующими органами для использования при лечении пациентов с несколькими типами онкологических заболеваний.

[0162] Настоящее изобретение также относится к наборам для лечения солидной опухоли. Набор может включать (a) контейнер, содержащий конъюгат антитело-



лекарственное средство, и, необязательно, контейнеры, содержащие один или более химиотерапевтических препаратов. Такие наборы могут дополнительно включать, если желательно, один или более из различных традиционных фармацевтических компонентов набора, таких как, например, контейнеры с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные контейнеры и т. д., что будет очевидно для специалистов в данной области. Печатные инструкции, либо в виде вкладышей, либо в виде этикеток, с указанием количества компонентов для введения, руководства по применению и/или руководства по смешиванию компонентов также могут быть включены в набор.

#### Примеры

Пример 1. Действие агентов, разрушающих тубулин, на солидную опухоль.

[0163] Оценивали действие агентов, разрушающих тубулин, на клеточные линии солидных опухолей. Опухолевые клетки обрабатывали MMAE и оценивали по следующим характеристикам иммуногенной гибели клеток (ICD); ER-стресс, секреция ATF и уровни внеклеточного HMGB1.

[0164] Клетки рака молочной железы MCF7 обрабатывали 100 нМ MMAE в течение 16 часов и собирали в буфере RIPA для вестерн-блоттинга. Обработка MMAE активировала все 3 пути ответа на ER-стресс, на что указывает фосфорилирование IRE1 и eIF2a (Фигура 1A), а также расщепление полноразмерного ATF6. Тяжелый ER-стресс является предварительным условием воздействия проапоптотических сигналов на поверхность опухолевых клеток и вызывается MMAE, на что указывает активация передачи сигналов JNK с помощью фосфорилированного IRE1 и экспрессия CHOP.

[0165] Индукция ICD также характеризуется секрецией ATF и HMGB1. Внеклеточный ATF служит сильным хемотаксическим сигналом, способствующим миграции иммунных клеток к месту опухоли. По прибытии внеклеточный HMGB1 передает сигналы через различные провоспалительные рецепторы (TLR2, TLR4, RAGE) для активации антигенпрезентирующих клеток, тем самым способствуя иммунной активности в опухоли. Обработка клеток MCF7 MMAE приводит к увеличению секреции ATF и HMGB1 (Фигуры 1B, 1C).

[0166] Тяжелый ER-стресс приводит к активации CHOP и инициирует митохондриальный апоптоз. Опухолевые клетки поджелудочной железы MiaPaca2 были сконструированы для экспрессии CHOP-управляемой репортерной системы люциферазы (приобретенной у Signosis, Inc.), которая позволяет количественно контролировать тяжелый ER-стресс. Клетки MiaPaca-CHOP-люцифераза обрабатывали MMAE, винкристином и паклитакселом, и анализировали на экспрессию люциферазы через 16 часов. Обработка MMAE и винкристином демонстрировала дозозависимое увеличение сигнала люциферазы как показатель индукции тяжелого ER-стресса, тогда как паклитаксел индуцировал умеренный сигнал люциферазы при пиковых дозах (Фигура 2A).

[0167] Клетки MiaPaca-CHOP-люцифераза подкожно трансплантировали мышам с

дефицитом NOD/SCID/гамма-цепи. Подкожные опухоли обрабатывали внутриопухолевым введением MMAE (0,36 мг/кг), винкристина (1,0 мг/кг) и паклитаксела (10 мг/кг), и сигнал опухолевой люциферазы отслеживали с течением времени. Как видно, обработка MMAE и винкристином быстро вызывала тяжелый ER-стресс в трансплантированных опухолях, тогда как паклитаксел не вызывал ER-стресс (Фигура 2B).

[0168] Клетки MiaPaca2 обрабатывали MMAE, винкристином или паклитакселом. Супернатант собирали после 16 часов обработки и анализировали на секрецию АТФ. Обработка MMAE вызывала сильную секрецию АТФ, тогда как обработка паклитакселом приводила к умеренной секреции АТФ (Фигура 3A).

[0169] Клетки опухоли предстательной железы PC-3 также обрабатывали MMAE, винкристином или паклитакселом. Супернатант собирали после 16 часов обработки и анализировали на секрецию АТФ. Обработка MMAE и винкристином вызывала устойчивую секрецию АТФ, тогда как обработка паклитакселом приводило к умеренной секреции АТФ (Фигура 3B). Клетки PC-3 обрабатывали в течение 24 часов MMAE-содержащим ADC (SGN-LIV1A) или MMAE и собирали в буфере RIPA для вестерн-блоттинга (Фигура 3C). Обработка MMAE вызывала ER-стресс (фосфорилирование IRE1 и JNK) и высвобождение АТФ и HMGB1, что приводило к индукции гибели иммуногенных клеток (Фигура 3D-3E).

[0170] Бестимусным голым мышам подкожно трансплантировали клетки PC-3. При достижении 200 мм<sup>3</sup> мыши получали однократную внутрибрюшинную дозу MMAE-содержащего ADC (SGN-LIV1A или анти-CD71-MMAE). Через 8 дней после обработки ADC опухоли иссекали и оценивали инфильтрацию и состав иммунных клеток с помощью проточной цитометрии. Опухоли, обработанные MMAE-ADC, демонстрировали повышенную инфильтрацию иммунных клеток, которая, кроме того, демонстрировала усиленную активацию (Фигуры 4A-D).

[0171] В другом исследовании бестимусным голым мышам подкожно трансплантировали клетки PC-3. При достижении 200 мм<sup>3</sup> мыши получали однократную внутрибрюшинную дозу MMAE-содержащего ADC (SGN-LIV1A или анти-CD71-MMAE). Через 8 дней после обработки ADC опухоли иссекали и гомогенизировали в буфере RIPA, а продукцию цитокинов/хемокинов измеряли с помощью ИФА. Уровни периферических цитокинов также измеряли в сыворотке с помощью ИФА. В дополнение к увеличению количества иммунных клеток в опухоли, наблюдается усиление иммунной активности, о чем свидетельствует повышенная продукция цитокинов и хемокинов этими иммунными клетками (Фигура 5A-F).

[0172] Клетки рака шейки матки HeLa обрабатывали 1000 нМ или 100 нМ MMAE, винкристином или паклитакселом в течение 16 часов и собирали для вестерн-блоттинга. Каждая обработка активировала ответ на ER-стресс, на что указывало фосфорилирование IRE1. Однако MMAE вызывал более сильный ответ на ER-стресс, которая поддерживалась уменьшением доз, о чем свидетельствует дальнейшее фосфорилирование JNK. Устойчивого фосфорилирования JNK не наблюдалось при более низких дозах

паклитаксела (Фигура 6).

[0173] Клеточные линии опухолей кожи A2058, SK-MEL-5 и SK-MEL-28, Calu-1 (легкое), HT-1080 (фибросаркома), SK-MES-1 (легкое) и ВХРС3 (поджелудочная железа) обрабатывали ММАЕ, винкристином и паклитакселом. Супернатант собирали после 17 часов обработки и анализировали на секрецию АТФ. Обработка ММАЕ и винкристином вызывала секрецию АТФ в большинстве проанализированных клеточных линий (6/7) и была способна вызвать более устойчивый ответ, чем в случае паклитаксела, во всех проанализированных клеточных линиях (Фигура 7А). Обработка ММАЕ вызвала сильную секрецию АТФ из всех 3 клеточных линий A2058, SK-MEL-5, SK-MEL-28 (кожа), тогда как паклитаксел вызывал секрецию АТФ только в одной из трех клеточных линий (Фигура 7В).

[0174] Клетки A2058, SK-MEL-5, SK-MEL-28 (кожа), Calu-1, HT-1080, SK-MES-1 (легкие), а также клетки ВХРС3 и НРАФII (поджелудочная железа) обрабатывали ММАЕ-содержащим ADC (например, анти-p97-ММАЕ или анти-CD71-ММАЕ) или паклитакселом. Супернатант собирали после одной ночи обработки и анализировали на высвобождение НМGB1 с помощью ИФА. Обработка ММАЕ-содержащим ADC или паклитакселом вызвала высвобождение НМGB1 в большинстве проанализированных клеточных линий (5/7) и была способна вызывать более устойчивый ответ, чем паклитаксел, во всех проанализированных клеточных линиях. Обработка анти-CD71-ММАЕ вызвала сильное высвобождение НМGB1 из 2 из 3 линий клеток кожи. См., например, Фигуру 7С и дополнительное описание ниже.

[0175] В дополнительных экспериментах клеточные линии, обработанные ММАЕ, будут совместно культивироваться или «скармливаться» иммунным клеткам, полученным из мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) здоровых доноров, и будет оцениваться влияние обработанных клеток на функцию иммунных клеток.

Пример 2 - Анализ агентов, разрушающих тубулин, на активацию иммунных клеток

[0176] Чтобы определить влияние агентов, разрушающих тубулин, на способность опухолевых клеток индуцировать активацию иммунных клеток, клетки, обработанные агентами, разрушающими тубулин, и находящиеся в процессе ER-стресса и потенциальной гибели клеток, скармливали антигенпрезентирующим клеткам и измеряли эффекты в отношении индукции APC.

[0177] Макрофаги были обогащены из РВМС от 2 здоровых доноров путем прикрепления РВМС к пластику, пригодному для культивирования клеток. Неприкрепленные клетки удаляли через 24 часа, оставляя популяцию клеток, обогащенную макрофагами.

[0178] Клетки A2058, SK-MEL-5 и SK-MEL-28 (кожа) обрабатывали ММАЕ, винкристином и паклитакселом в течение 24 часов. Клетки промывали и собирали, а затем совместно культивировали с обогащенными макрофагами, полученными выше. Макрофаги собирали через 4 дня после совместного культивирования и анализировали на

иммунную активацию с помощью проточной цитометрии. Уровень антигенной презентации (измеренный по частоте клеток, экспрессирующих МНСII) количественно оценивали и нормализовали для макрофагов, которые культивировали совместно с необработанными опухолевыми клетками. Обработка опухолевых клеток ММАЕ приводила к увеличению антигенной презентации в 2/3 линий опухолевых клеток, что было более устойчивым, чем при обработке паклитакселом (Фигуры 8А-8С).

[0179] Супернатант совместной культуры макрофагов и умирающих опухолевых клеток A2058 и SK-MEL-5 собирали через 24 часа и анализировали на предмет уровня продуцирования цитокинов и хемокинов с помощью ИФА и нормализовали к макрофагам, которые культивировали совместно с необработанными опухолевыми клетками. Обработка опухолевых клеток ММАЕ или ММАЕ-содержащим ADC (анти-p97-ММАЕ) приводила к увеличению указанных цитокинов и хемокинов, что было более устойчивым, чем при обработке паклитакселом (Фигура 9А-9В). Клетки A2058 показали увеличение GM-CSF, IFN $\gamma$ , MCP-3, IL-1RA, IL-7, MIP-1a, MIP-1b по сравнению с необработанными клетками, тогда как клетки SK-MEL-5 показали увеличение GM-CSF, INF $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , MCP-3, IL-12p70, IL-17A, IL-1a, IL-1b, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b).

### Пример 3

Дополнительный анализ антигенной презентации после обработки агентами, разрушающими тубулин

[0180] Макрофаги были обогащены из PBMC от 2 здоровых доноров путем прикрепления PBMC к пластику, пригодному для культивирования клеток. Неприкрепленные клетки удаляли через 24 часа, оставляя популяцию клеток, обогащенную макрофагами.

[0181] Клетки ВхРС3 и НРАFII (поджелудочная железа) обрабатывали ММАЕ, винкристином и паклитакселом в течение 24 часов. Клетки промывали и собирали, а затем совместно культивировали с обогащенными макрофагами, полученными выше. Макрофаги собирали через 4 дня после совместного культивирования и анализировали на иммунную активацию с помощью проточной цитометрии. Уровень антигенной презентации (измеренный по частоте клеток, экспрессирующих МНСII) количественно определяли и нормализовали по отношению к макрофагам, которые культивировали совместно с необработанными опухолевыми клетками. Обработка опухолевых клеток ММАЕ и винкристином приводила к увеличению антигенной презентации в 1/2 опухолевых клеточных линиях, тогда как обработка паклитакселом не приводила к изменениям в макрофагальной антигенной презентации (Фигуры 10А-10В). Клетки ВхРС-3 обрабатывали ММАЕ, винкристином или паклитакселом в течение 17 часов и анализировали на секрецию АТФ. Обработка всеми тремя тубулинсвязывающими агентами позволила вызвать эквивалентные уровни секреции АТФ (Фигура 10С).

[0182] После 24 часов обработки паклитакселом или ММАЕ-содержащим ADC (анти-p97-ММАЕ) высвобождение НМGB1 из клеток ВхРС-3 оценивали с помощью ИФА. Гибель клеток, вызванная ММАЕ, привела к умеренному увеличению

высвобождения HMGB1 по сравнению с обработкой паклитакселом (Фигура 10D).

[0183] Супернатант совместной культуры макрофагов и умирающих опухолевых клеток собирали через 24 часа и анализировали на уровни продуцирования цитокинов и хемокинов с помощью ИФА и нормализовали по отношению к макрофагам, которые культивировали совместно с необработанными опухолевыми клетками. Обработка опухолевых клеток MMAE или анти-p97-MMAE приводила к увеличению указанных цитокинов и хемокинов, что было более устойчивым, чем обработка паклитакселом (Фигуры 11A-11B).

[0184] Дополнительные клеточные линии [Calu-1 (легкие), HT1080 (фибросаркома) и SK-MES-1 (кожа)] тестировали на уровень антигенной презентации после совместного культивирования с макрофагами, как указано выше. Уровни костимуляции (измеренные по частоте макрофагов, экспрессирующих CD86, Calu-1) или антигенной презентации (измеренные по частоте макрофагов, экспрессирующих МНСII, HT1080 и SK-MES-1), были количественно определены и нормализованы для макрофагов, которые совместно культивировали с необработанными опухолевыми клетками. Обработка опухолевых клеток MMAE приводила к увеличению иммунной активации в 3/3 линий опухолевых клеток, что было более устойчивым, чем при обработке паклитакселом (Фигуры 12A-12C). Клетки Calu-1, HT-1080 и SK-MES-1 обрабатывали MMAE-содержащим ADC (анти-p97-MMAE), винкристином или паклитакселом в течение 24 часов и анализировали на высвобождение HMGB1 с помощью ИФА. Обработка анти-p97-MMAE вызвала сильное высвобождение HMGB1 из 2 из 3 клеточных линий (Фигуры 12D-12F).

[0185] Супернатант совместной культуры макрофагов и умирающих опухолевых клеток собирали через 24 часа и анализировали на уровни продукции цитокинов и хемокинов с помощью ИФА и нормализовали по отношению к макрофагам, которые культивировали совместно с необработанными опухолевыми клетками, как описано выше. Обработка клеток Calu-1 MMAE или MMAE-содержащим ADC приводила к увеличению указанных цитокинов и хемокинов, что было более устойчивым, чем при обработке паклитакселом (Фигура 13).

[0186] Клетки MCF7 (трижды негативный рак молочной железы) обрабатывали MMAE, MMAE-содержащим ADC (анти-CD71 ОКТ9-1006), винкристином и паклитакселом в течение 24 часов. Клетки промывали и собирали, а затем совместно культивировали с обогащенными макрофагами, полученными выше. Макрофаги собирали через 4 дня после совместного культивирования и анализировали на иммунную активацию с помощью проточной цитометрии. Обработка опухолевых клеток MMAE или MMAE-содержащим ADC приводила к увеличению антигенной презентации макрофагов, что измерялось по частоте макрофагов, экспрессирующих МНСII, что было более устойчивым, чем при обработке паклитакселом (Фигура 14A). Супернатант совместной культуры макрофагов и умирающих клеток MCF7 собирали через 24 часа и анализировали на уровни продуцирования цитокинов и хемокинов с помощью ИФА и нормализовали для макрофагов, которые культивировались совместно с необработанными опухолевыми

клетками. Обработка клеток MCF7 MMAE или MMAE-содержащим ADC приводила к увеличению указанных цитокинов и хемокинов, что было более устойчивым, чем при обработке паклитакселом (Фигура 14B).

[0187] Клетки MCF7 обрабатывали MMAE или MMAE-содержащим ADC (SGN-LIV1A) в течение 16 часов и собирали в буфере RIPA для вестерн-блоттинга. Обработка MMAE активировала все 3 пути ответа на ER-стресс, на что указывает фосфорилирование IRE1 и eIF2a, а также расщепление полноразмерного ATF6. Тяжелый ER-стресс является предварительным условием воздействия профагоцитарных сигналов на поверхность опухолевых клеток и вызывается MMAE, на что указывает активация передачи сигналов JNK фосфорилированным IRE1 и экспрессия CHOP (Фигура 15A), также характеризуется секрецией ATF и HMGB1. Внеклеточный ATF служит сильным хемотаксическим сигналом, способствующим миграции иммунных клеток к месту опухоли. По прибытии внеклеточный HMGB1 передает сигналы через различные провоспалительные рецепторы (TLR2, TLR4, RAGE) для активации антигенпрезентирующих клеток, тем самым способствуя иммунной активности в опухоли. Обработка клеток MCF7 MMAE и SGN-LIV1A приводит к увеличению секреции ATF и HMGB1 (Фигуры 15B-15C).

[0188] Обработка MCF7 SGN-LIV1A или эрибулином вызывает тяжелый ER-стресс (фосфорилирование IRE1 и JNK), тогда как паклитаксел и доцетаксел не вызывают фосфорилирования JNK. Повышенная секреция ATF также была очевидна после 48 часов обработки SGN-LIV1A или эрибулином, что указывает на сильную индукцию ICD в результате разрушения микротрубочек, тогда как ни паклитаксел, ни доцетаксел не вызывали секрецию ATF (Фигуры 16A-16B).

[0189] Мышам SCID подкожно трансплантировали клетки MCF7. При достижении 200 кубических миллиметров мыши получали однократную внутрибрюшинную дозу MMAE-содержащего ADC (SGN-LIV1A или анти-CD71-MMAE). Через 8 дней после обработки ADC опухоли иссекали и оценивали состав иммунных клеток с помощью проточной цитометрии. В результате гибели клеток и иммуногенности, вызванной MMAE, опухоли, обработанные MMAE-ADC, демонстрировали повышенный уровень иммунной активации за счет инфильтрующих опухоль иммунных клеток (фигуры 17A-17E).

[0190] Клетки MDA-MB-468 обрабатывали MMAE или MMAE-содержащим ADC (ASG-22ME). Супернатант собирали через 48 часов обработки и анализировали на секрецию ATF. Обработка MMAE или ASG-22ME вызывала устойчивую секрецию ATF, которая была сопоставима с тапсигаргином, известным индуктором ER-стресса и аутофагии (Фигура 18).

[0191] Клеточные линии опухоли печени Hep3b, Huh7 и JHH7 обрабатывали MMAE, тубулизином М, винкристином и паклитакселом в течение 24 часов и анализировали на секрецию ATF. Обработка MMAE или тубулизином М вызвала сильную секрецию ATF из 3/3 оцениваемых клеточных линий (Фигуры 19A-C). Клетки промывали и собирали, а затем совместно культивировали с обогащенными макрофагами,

полученными, как указано выше. Макрофаги собирали через 4 дня после совместного культивирования и анализировали на иммунную активацию с помощью проточной цитометрии. Уровни костимуляции (измеренные по экспрессии CD86, JHH7) и антигенной презентации (измеренные по частоте МНСII-экспрессирующих клеток, Her3b, Nuh7 и JHH7) количественно определяли и нормализовали для макрофагов, которые совместно культивировали с опухолевыми клетками, обработанными паклитакселом. Обработка опухолевых клеток ММАЕ привела к увеличению иммунной активации в 3/3 линий опухолевых клеток, что было более устойчивым, чем при обработке паклитакселом (Фигура 19D-19G). Супернатант от совместной культуры макрофагов и умирающих опухолевых клеток печени собирали через 24 часа и анализировали на уровни продуцирования цитокинов и хемокинов с помощью ИФА и нормализовали по отношению к макрофагам, которые культивировали совместно с необработанными опухолевыми клетками. Обработка клеток Her3b, Nuh7 и JHH7 ММАЕ или тубулизином М приводила к увеличению указанных цитокинов и хемокинов, что было более устойчивым, чем при обработке паклитакселом (Фигура 20A-20C).

[0192] Клетки Т-24 (мочевой пузырь) обрабатывали ММАЕ или ММАЕ-содержащим ADC (ASG-22ME) в течение 48 часов и анализировали на секрецию АТФ. Обработка ММАЕ или ASG-22ME вызывала сильную секрецию АТФ (Фигура 21A). Клетки Т-24 также обрабатывали ММАЕ, ММАЕ-содержащим ADC (ASG22ME, энфортумаб ведотин), винкристином и паклитакселом в течение 24 часов. Клетки промывали и собирали, а затем совместно культивировали с обогащенными макрофагами, как указано выше. Макрофаги собирали через 4 дня после совместного культивирования и анализировали на иммунную активацию с помощью проточной цитометрии. Уровень антигенной презентации (измеренный по частоте макрофагов, экспрессирующих МНСII) количественно оценивали и нормализовали для макрофагов, которые совместно культивировали с необработанными опухолевыми клетками. Обработка клеток Т-24 ММАЕ или ММАЕ-содержащим ADC приводила к увеличению антигенной презентации макрофагов, которая была более устойчивой, чем при обработке паклитакселом (Фигура 21B). Супернатант от совместной культуры макрофагов и умирающих опухолевых клеток Т-24 собирали через 24 часа и анализировали на уровни продукции цитокинов и хемокинов с помощью ИФА и нормализовали для макрофагов, которые культивировались совместно с необработанными опухолевыми клетками. Обработка клеток Т-24 ММАЕ или ММАЕ-содержащим ADC приводила к увеличению указанных цитокинов и хемокинов, что было более устойчивым, чем при обработке паклитакселом (Фигура 21C).

[0193] Клетки множественной миеломы U-266 обрабатывали свободным ММАЕ (492 нМ), ММАЕ-содержащим ADC (SGN-CD48A, 10 нг/мл) и несвязывающим ММАЕ-ADC (10 нг/мл) в течение 24 и 48 часов. Клетки собирали в каждый момент времени и готовили лизаты цельных клеток. Лизаты для каждого образца обрабатывали на SDS-Page и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Вестерн-блоттинг выполняли с использованием фосфо-JNKThr183/Tyr185 (pJNK), PARP, ATF4, AT6, фосфо-IRE-1 Ser274

(pIRE-1).β-актин служит регулятором нагрузки. Клетки множественной миеломы, такие как U-266, демонстрируют высокие уровни эндогенного ER-стресса, на что указывает обнаружение окрашивания базального JNK и pIRE-1 (Фигура 22A). Однако обработка MMAE и SGN-CD48A дополнительно увеличивала ответ на ER-стресс, на что указывало повышение экспрессии ATF4, а также фосфорилирование JNK. Расщепление PARP (полоса более низкой молекулярной массы) является индикатором клеток, претерпевающих апоптоз. Важно отметить, что индукции ER-стресса с помощью MMAE в клетках U-266 было достаточно, чтобы выявить маркеры ICD.

[0194] Клетки U-266 обрабатывали в течение 48 часов свободным MMAE (492 нМ), MMAE-содержащим ADC (SGN-CD48A, 10 нг/мл) и несвязывающим MMAE-ADC (10 нг/мл) в течение 48 часов. Клетки собирали, промывали в проточном буфере и затем окрашивали как на аннексин V, маркер апоптоза, так и на HSP70. Клетки также окрашивали как аннексином V, так и кальретикулином. В обоих условиях отбирали клетки, которые были отрицательными по Аннексину V, и определяли процент популяции, положительный по HSP70 или кальретикулину. Увеличение процента маркеров ICD очевидно на поверхности клетки после обработки SGN-CD48A и свободным MMAE до клеточной смерти (Фигура 22B), обеспечивая мощные профагоцитарные сигналы для повышения противоопухолевого иммунитета.

[0195] Ожидается, что специалистам в данной области техники будут очевидны многочисленные модификации и варианты изобретения, изложенные в приведенных выше иллюстративных примерах. Следовательно, на изобретение следует накладывать только такие ограничения, которые указаны в прилагаемой формуле изобретения.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения солидной опухоли, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгированного агента антитело-лекарственное средство, имеющего формулу лекарственное средство-линкерное звено-антитело (D-LU-Ab), где D представляет собой агент, разрушающий тубулин, в количестве, эффективном для лечения солидной опухоли.

2. Способ модуляции высвобождения АТФ в солидной опухоли, включающий введение конъюгированного агента антитело-лекарственное средство, имеющего формулу лекарственное средство-линкерное звено-антитело (D-LU-Ab), где D представляет собой агент, разрушающий тубулин, в количестве, эффективном для индукции апоптоза в солидной опухоли.

3. Способ индукции миграции иммунных клеток в солидную опухоль, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгированного агента антитело-лекарственное средство, имеющего формулу лекарственное средство-линкерное звено-антитело (D-LU-Ab), где D представляет собой агент, разрушающий тубулин, в количестве, эффективном для индукции инфильтрации иммунных клеток в солидную опухоль.

4. Способ индукции гибели иммуногенных клеток (ICD) в солидной опухоли, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгированного агента антитело-лекарственное средство, имеющего формулу лекарственное средство-линкерное звено-антитело (D-LU-Ab), где D представляет собой агент, разрушающий тубулин, в количестве, эффективном для индукции гибели иммуногенных клеток в солидной опухоли.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что антитело специфично для CD30, CD19, CD70, CD71, CD20, CD52, CD133, EGFR, HER2, VEGF, VEGFR2, PD-1, PDL1, RANKL, CTLA-4, IL-6, SLAMF7, CD3, TNF-альфа, PDGFR-альфа, CD38, GD2, cCLB8, p97, Нектина-4 или ЕpCAM.

6. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, усиливает пути белка ER-стресса, увеличивает секрецию АТФ и увеличивает экспрессию белка группы с высокой подвижностью В1 (HMGB1).

7. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, выбран из группы, состоящей из ауристатина, тубулизина, колхицина, алкалоида барвинка, таксана, криптофицина, майтанзиноида, гемиастерлина и других агентов, разрушающих тубулин.

8. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, представляет собой ауристатин, выбранный из группы, состоящей из монометилауристатина E (ММАЕ), монометилауристатина F (ММАF) и долостатина-10.

9. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, представляет собой тубулизин, выбранный из группы, состоящей из тубулизина

D, тубуфенилаланина и тубутирозина.

10. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, представляет собой колхицин, выбранный из группы, состоящей из колхицина и СА-4.

11. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, представляет собой алкалоид барвинка, выбранный из группы, состоящей из винбластина (VBL), винорелбина (VRL), винкристина (VCR) и виндезина (VDS).

12. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, представляет собой таксан, выбранный из группы, состоящей из паклитаксела и доцетаксела.

13. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, представляет собой криптофицин, выбранный из группы, состоящей из криптофицина-1 и криптофицина-52.

14. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из майтанзина, майтанзинола, аналогов майтанзина, DM1, DM3 и DM4 и ансаматоцина-2.

15. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, представляет собой гемиастерлин, выбранный из группы, состоящей из гемиастерлина и НТИ-286.

16. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что агент, разрушающий тубулин, выбран из группы, состоящей из таккалонолида А, таккалонолида В, таккалонолида АF, таккалонолида АJ, таккалонолида АI-эпоксида, дискодермолида, эпотилона А, эпотилона В и лаулималида.

17. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что солидная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака легких, рака груди, рака яичников, рака шейки матки, рака желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, меланомы, саркомы, рака пищевода, рака поджелудочной железы, метастатического рака поджелудочной железы, метастатической аденокарциномы поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака желудка, фиброзного рака, глиомы, злокачественной глиомы, диффузной глиомы ствола головного мозга, рецидивирующего новообразования головного мозга у детей, почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной метастатической почечно-клеточной карциномы, рака почки, рака предстательной железы, метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы, рака предстательной железы IV стадии, метастатической меланомы, меланомы, злокачественной меланомы, рецидивирующей меланомы кожи, метастазы меланомы в мозг, меланомы кожи IIIA стадии; меланомы кожи стадии IIIB, меланомы кожи стадии IIIC; меланомы кожи стадии IV, злокачественной меланомы головы и шеи, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), плоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рецидивирующего метастатического рака молочной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, синдрома Рихтера; макроглобулинемии Вальденстрема, глиобластомы

взрослых; глиосаркомы взрослых, рецидивирующей глиобластомы, рецидивирующей рабдомиосаркомы у детей, рецидивирующей саркомы Юинга/периферической примитивной нейроэктодермальной опухоли, рецидивирующей нейробластомы; рецидивирующей остеосаркомы, колоректального рака, MSI-положительного колоректального рака; MSI-отрицательного колоректального рака, неороговевающей карциномы носоглотки; рецидивирующей недифференцированной карциномы носоглотки, аденокарциномы шейки матки; железисто-плоскоклеточной карциномы шейки матки; плоскоклеточного рака шейки матки; рецидивирующей карциномы шейки матки; рака шейки матки IVA стадии; рака шейки матки IVB стадии, плоскоклеточного рака анального канала; метастатической карциномы анального канала; рецидивирующей карциномы анального канала, рецидивирующего рака головы и шеи; плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), карциномы яичников, рака толстой кишки, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта поздней стадии, аденокарциномы желудка; аденокарциномы гастроэзофагеального перехода, новообразования костей, саркомы мягких тканей; саркомы костей, карциномы тимуса, уротелиальной карциномы, рецидивирующей карциномы из клеток Меркеля; карциномы из клеток Меркеля стадии III; карциномы из клеток Меркеля стадии IV, миелодиспластического синдрома и синдрома Сезари.

18. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство содержит линкер, расщепляемый протеазой, линкер, расщепляемый кислотой, или дисульфидный линкер.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что линкер, расщепляемый протеазой, включает тиольный реакционноспособный спейсер и дипептид.

20. Способ по п. 18 или 19, отличающийся тем, что линкер, расщепляемый протеазой, состоит из тиольного реакционноспособного малеимидокапроильного спейсера, дипептида валин-цитруллин и р-амино-бензилоксикарбонильного спейсера.

21. Способ по п.18, отличающийся тем, что линкер, расщепляемый кислотой, представляет собой гидразиновый линкер или линкер в виде четвертичного аммония.

22. Способ по любому из предыдущих пп., дополнительно включающий введение схемы химиотерапии.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что схема химиотерапии в основном состоит из доксорубина, винбластина и дакарбазина (AVD) в качестве комбинированной терапии.

24. Способ по п.22, отличающийся тем, что схема химиотерапии в основном состоит из циклофосфида, винкристина и преднизона (CHP) в качестве комбинированной терапии.

25. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что конъюгат «антитело-лекарственное средство» представляет собой моноклональное антитело.

26. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что антитело

представляет собой антитело против CD30, а конъюгат антитело против CD30-лекарственное средство содержит

i) CDR1 тяжелой цепи, представленную в SEQIDNO: 4, CDR2 тяжелой цепи, представленную в SEQIDNO: 6, CDR3 тяжелой цепи, представленную в SEQIDNO: 8; и

ii) CDR1 легкой цепи, представленную в SEQIDNO: 12, CDR2 легкой цепи, представленную в SEQIDNO: 14, и CDR13 легкой цепи, представленную в SEQIDNO: 16.

27. Способ по любому из пп.1-25, отличающийся тем, что антитело представляет собой антитело против CD30, а конъюгат антитело против CD30-лекарственное средство содержит

i) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQIDNO: 2, и

ii) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQIDNO: 10.

28. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что антитело представляет собой антитело против CD30, а антитело против CD30 из конъюгата антитело-лекарственное средство представляет собой химерное антитело AC10.

29. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство содержит монометилауристатин E и линкер, расщепляемый протеазой.

30. Способ по п.29, отличающийся тем, что линкер, расщепляемый протеазой, включает тиольный реакционноспособный спейсер и дипептид.

31. Способ по п. 29 или 30, отличающийся тем, что линкер, расщепляемый протеазой, состоит из тиольного реакционноспособного малеимидокапроильного спейсера, дипептида валин-цитруллин и p-амино-бензилоксикарбонильного спейсера.

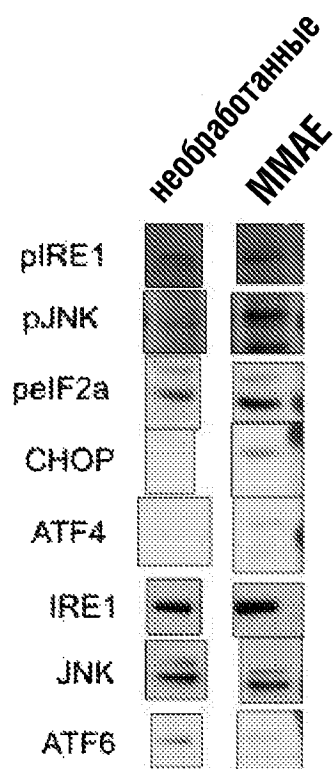
32. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что конъюгат антитело против CD30-лекарственное средство представляет собой брентуксимаб ведотин.

33. Способ по любому из предыдущих пп., отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство индуцирует миграцию иммунных клеток к месту опухоли.

По доверенности

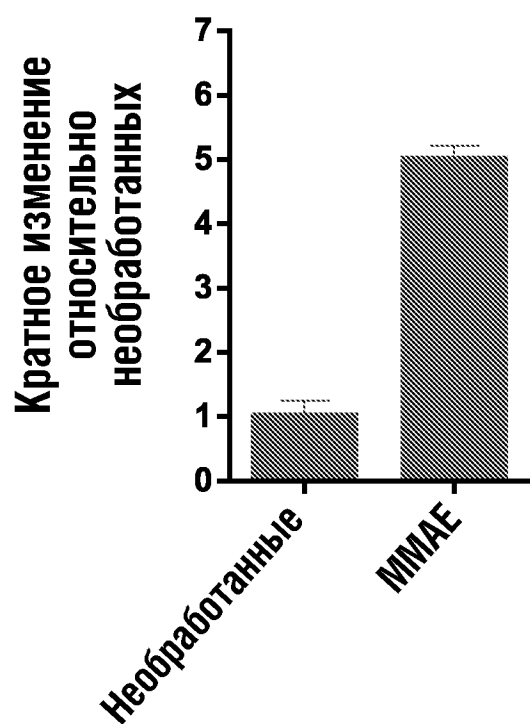
1/31

ФИГ.1А



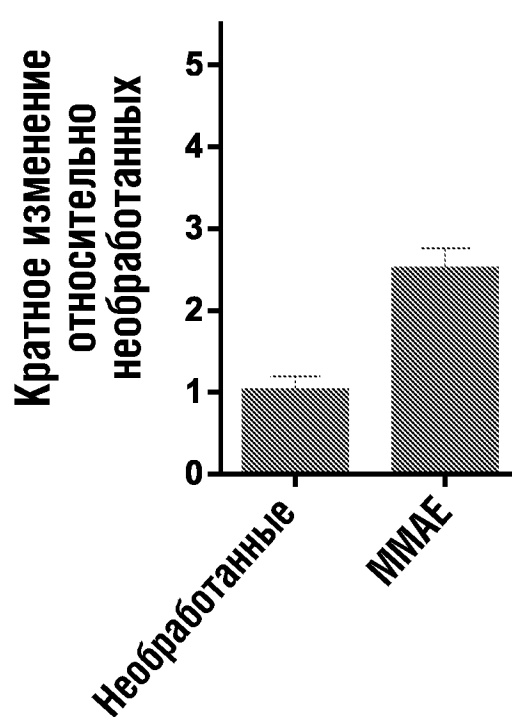
ФИГ.1В

Секреция АТФ

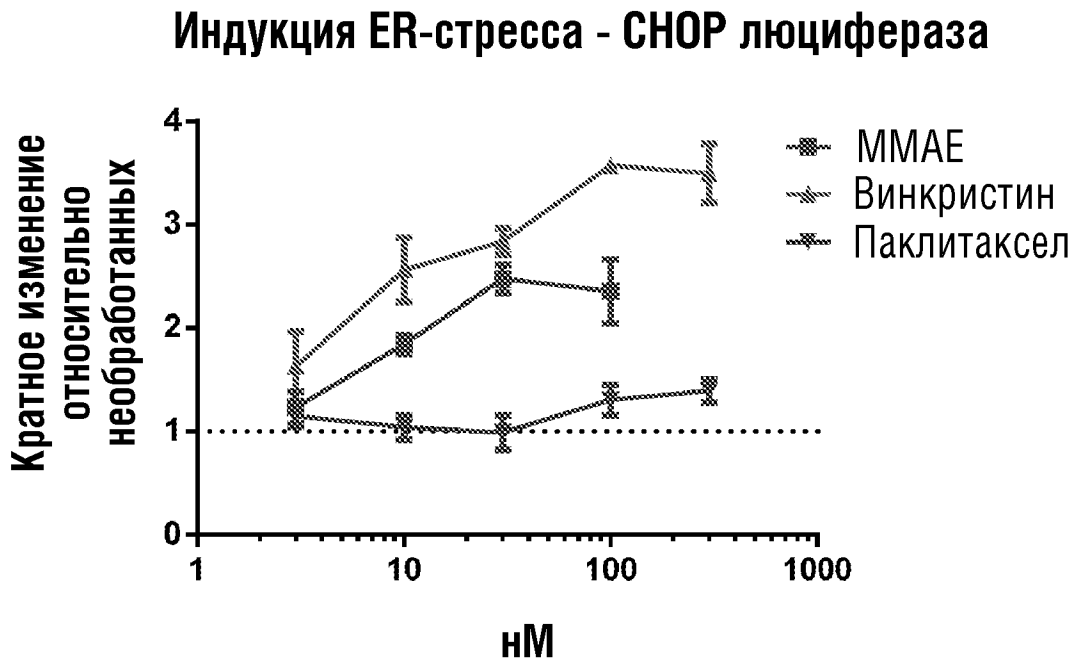


ФИГ.1С

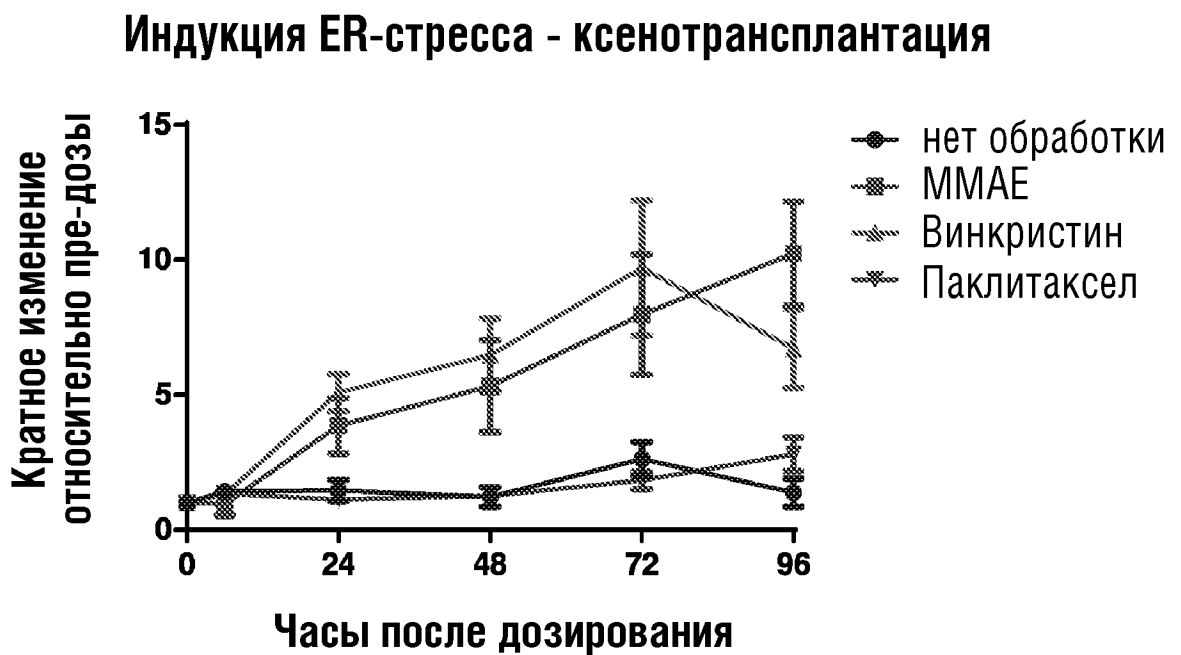
Высвобождение HMBG1



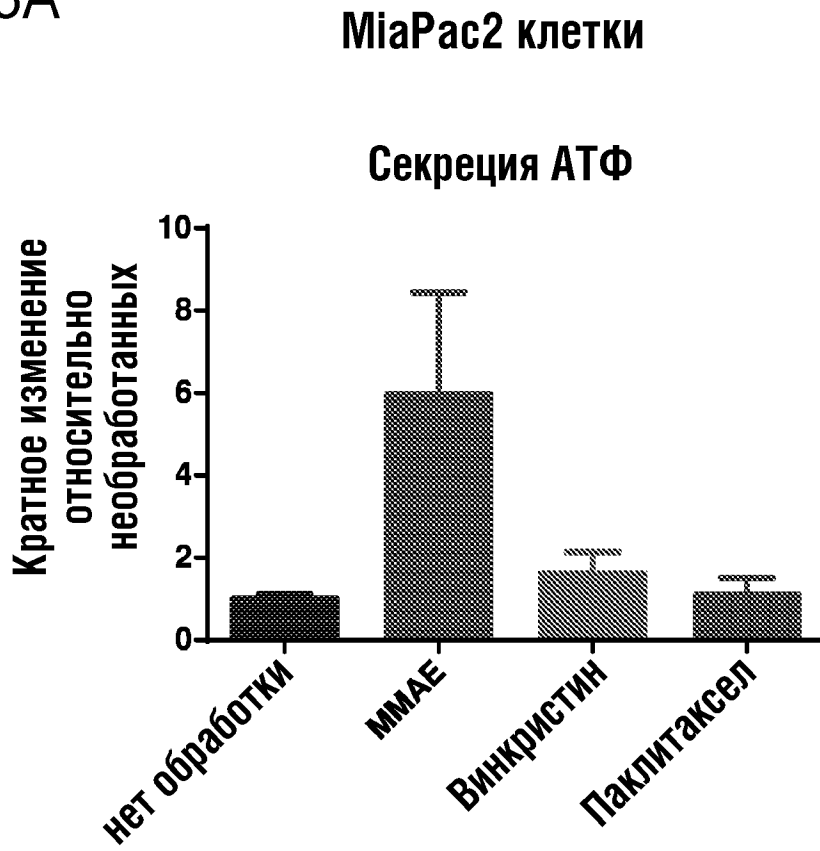
ФИГ.2А



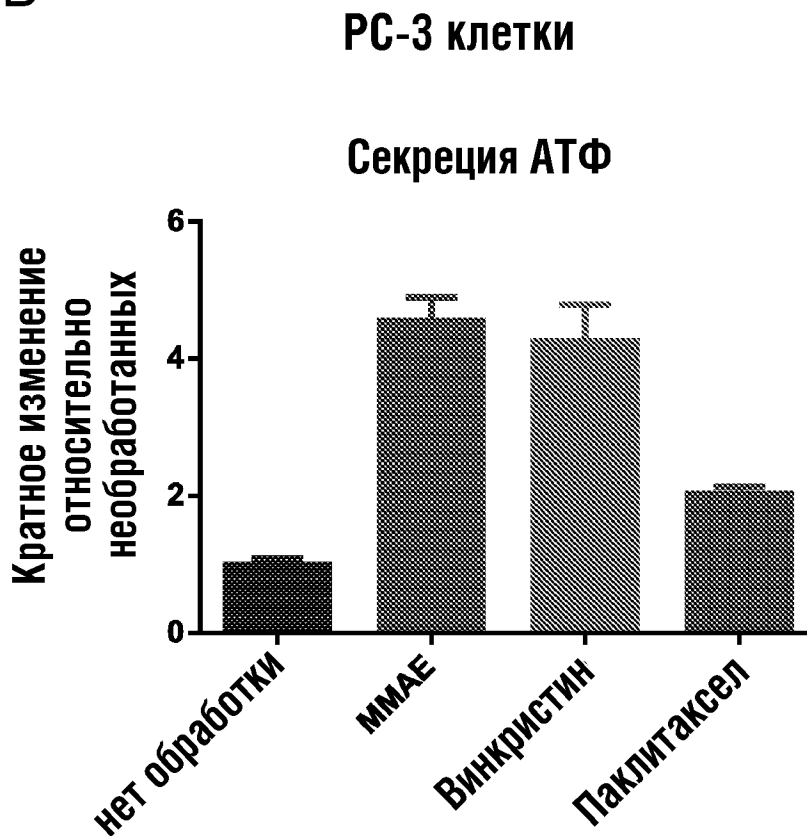
ФИГ.2В



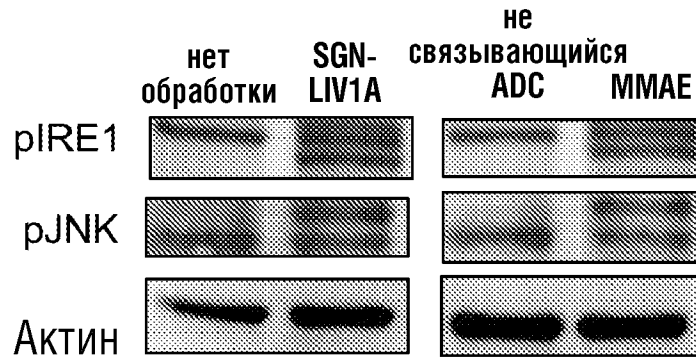
ФИГ.3А



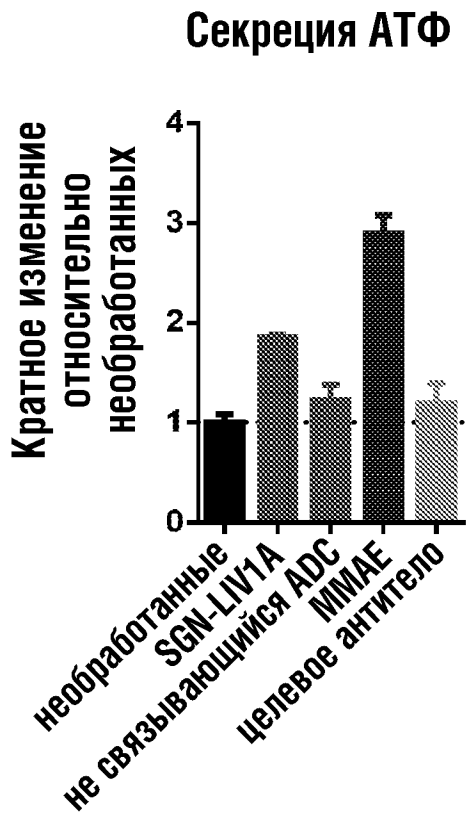
ФИГ.3В



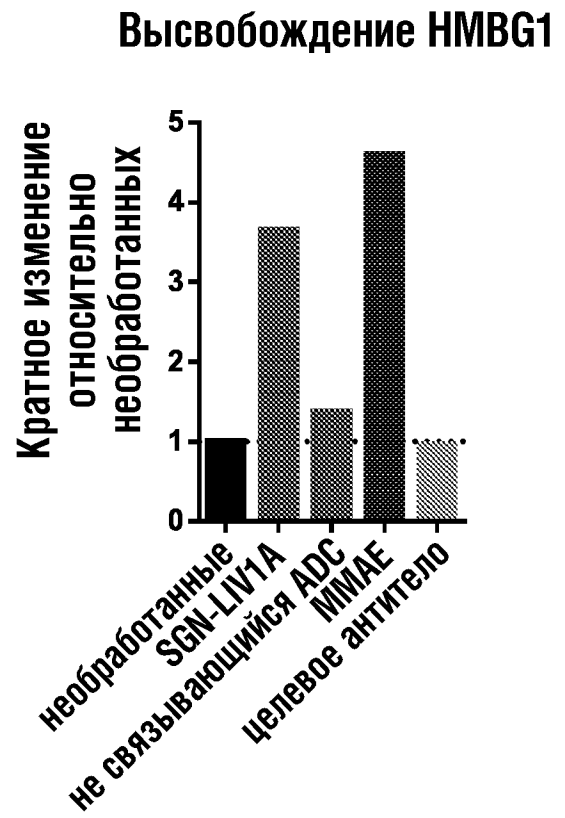
ФИГ.3С



ФИГ.3D

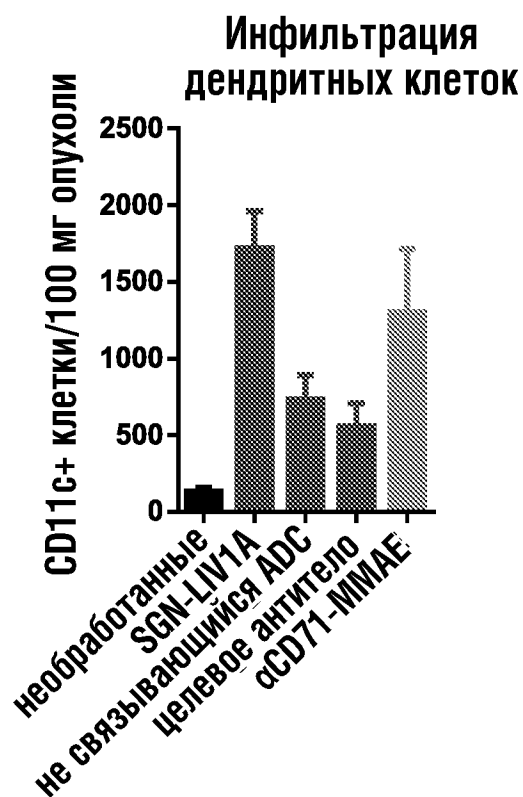


ФИГ.3Е

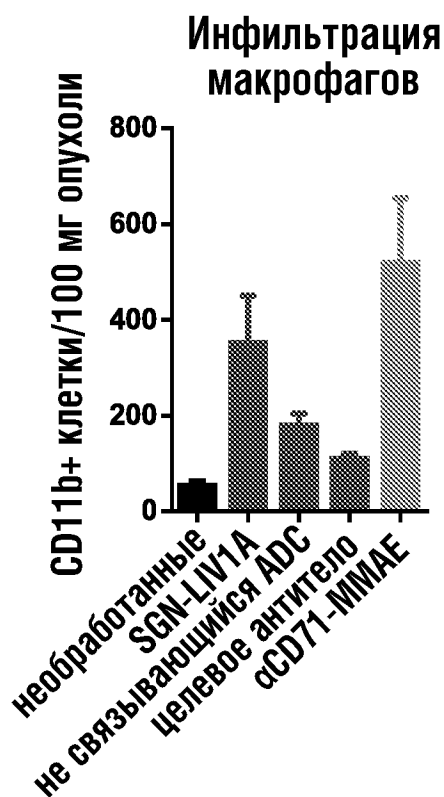




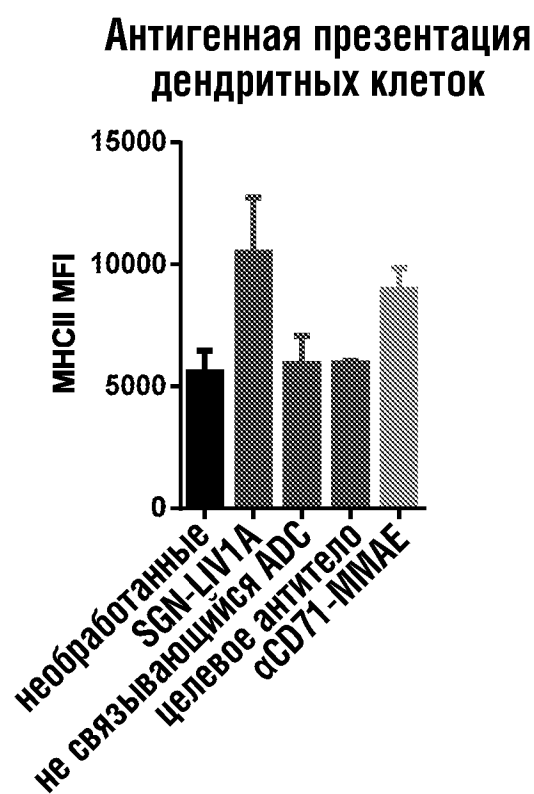
ФИГ.4А



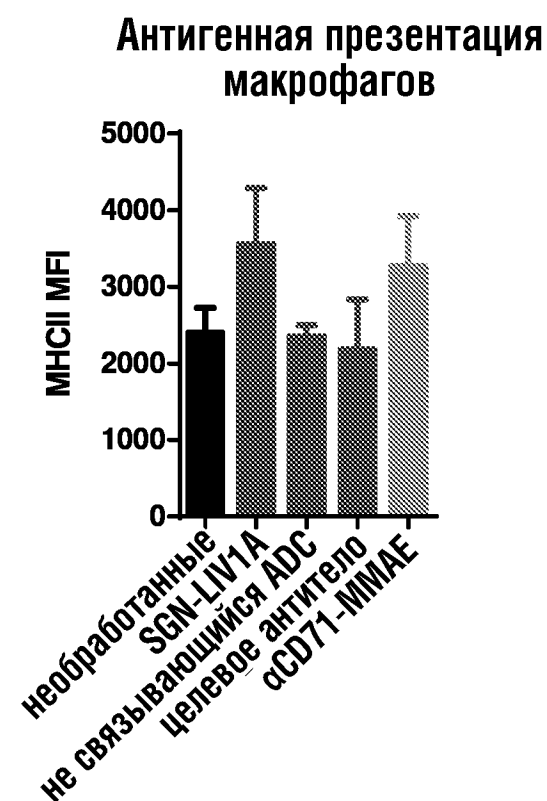
ФИГ.4В



ФИГ.4С

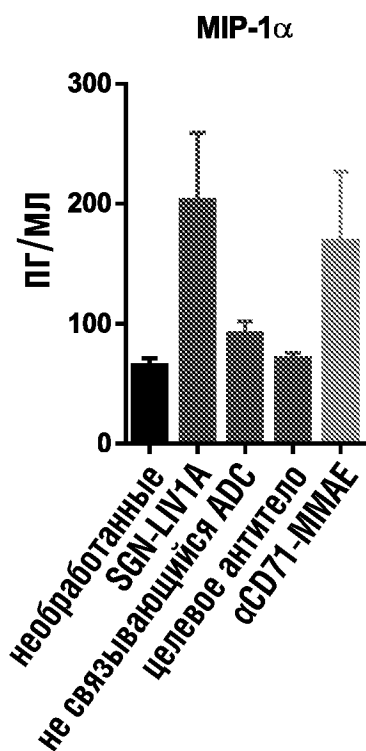


ФИГ.4D

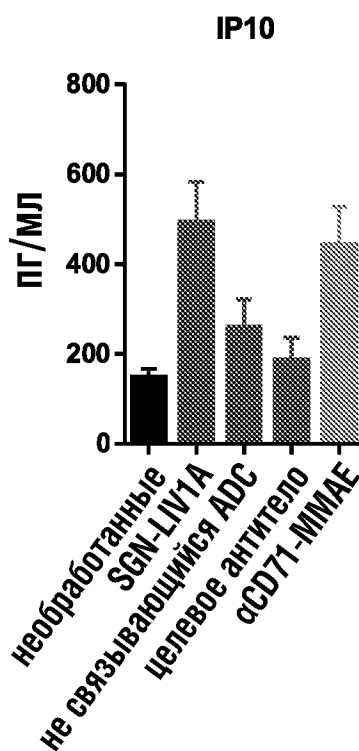


Уровень цитокинов внутри опухоли

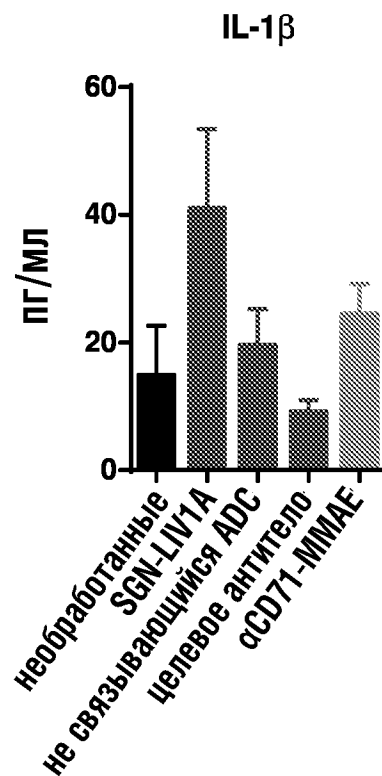
ФИГ.5А



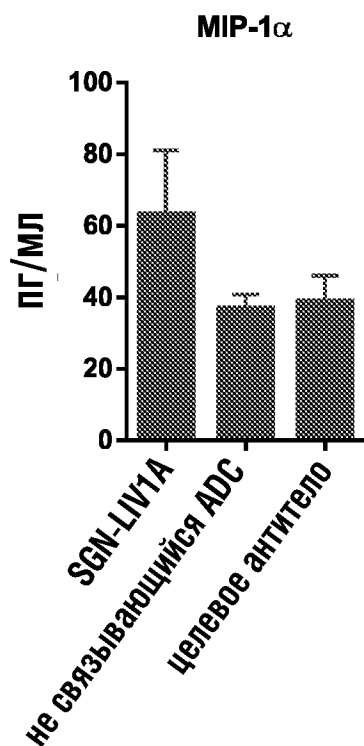
ФИГ.5В



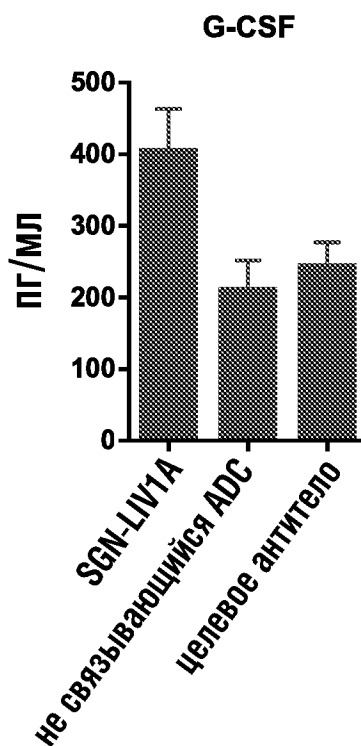
ФИГ.5С

Уровень циркулирующих цитокинов в периферической крови

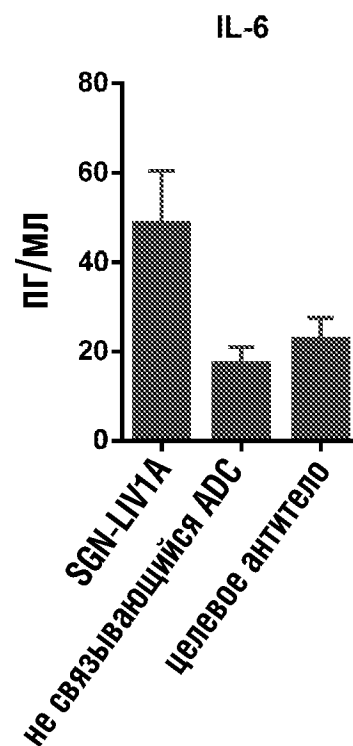
ФИГ.5D



ФИГ.5Е

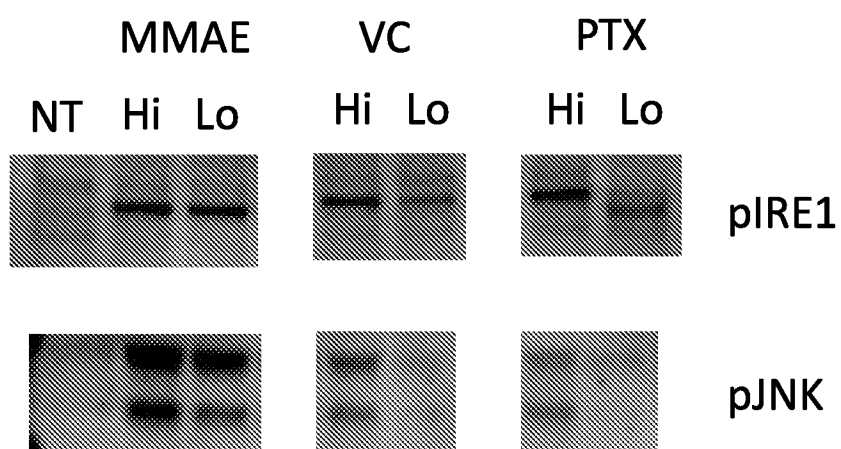


ФИГ.5F



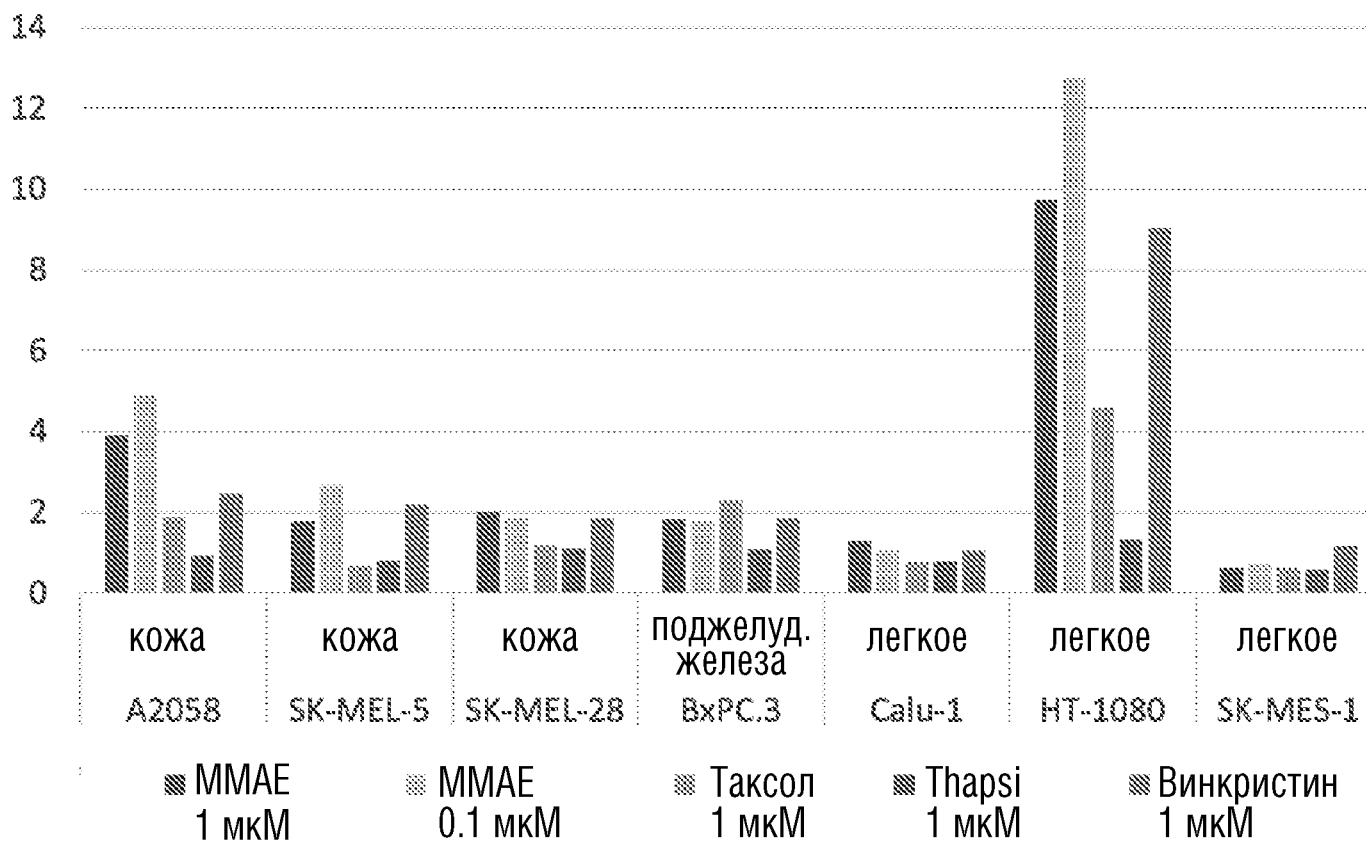
## ФИГ.6

## HeLa клетки

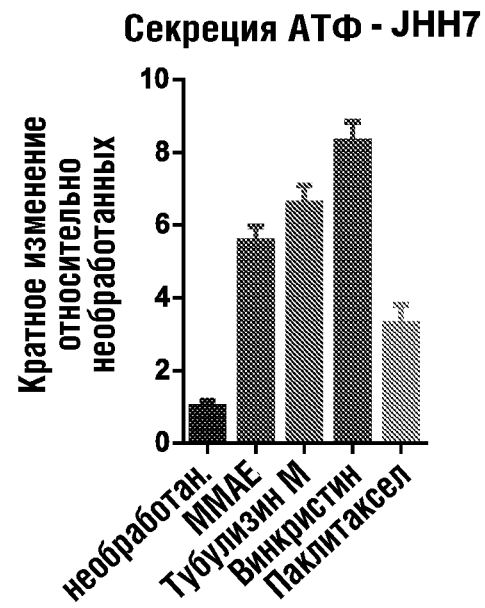
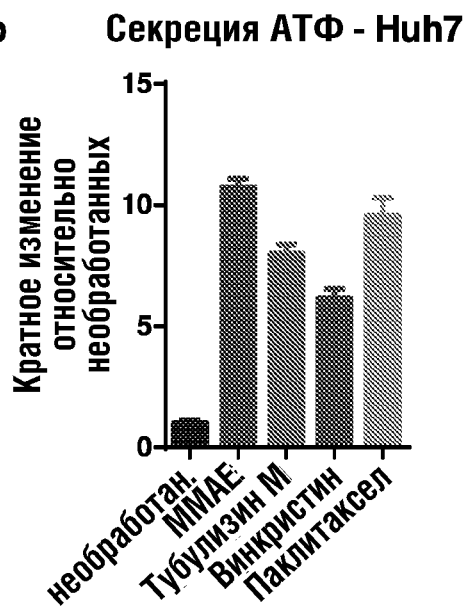
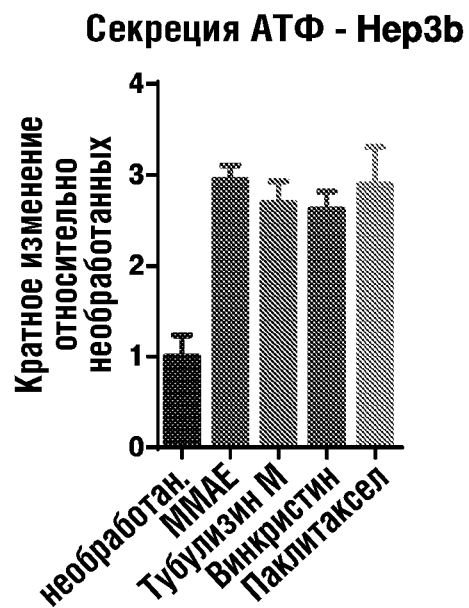
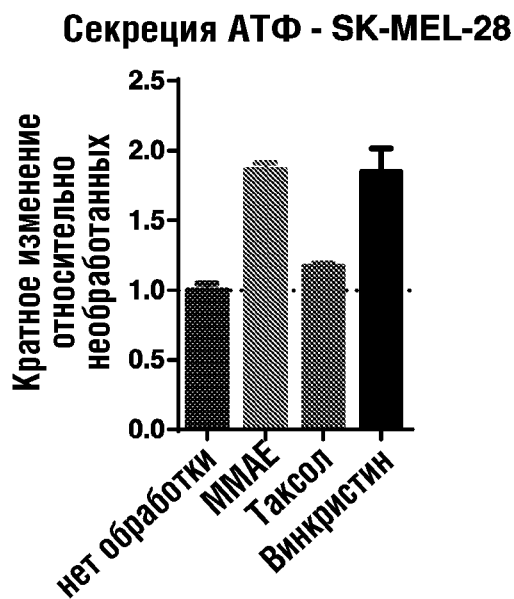
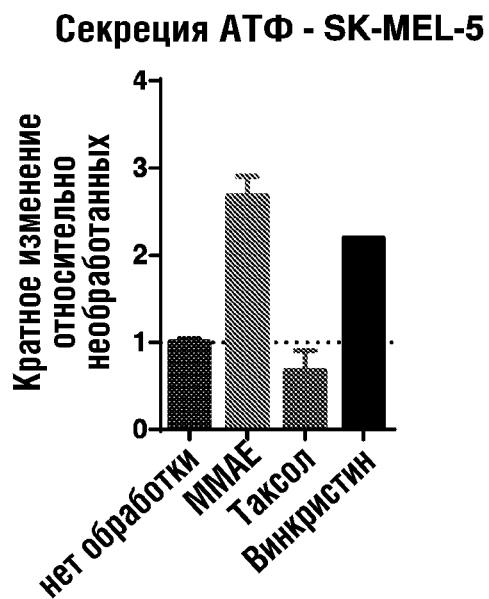
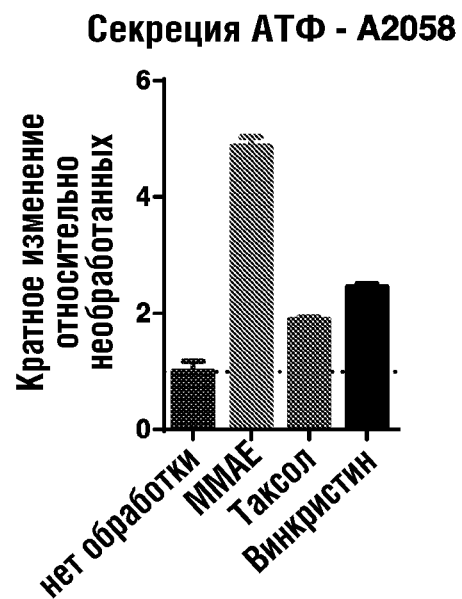


ФИГ.7А

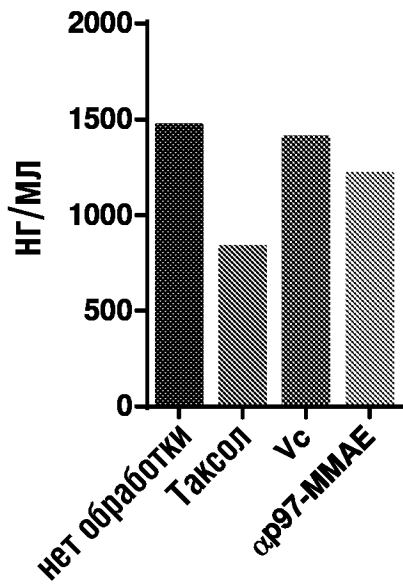
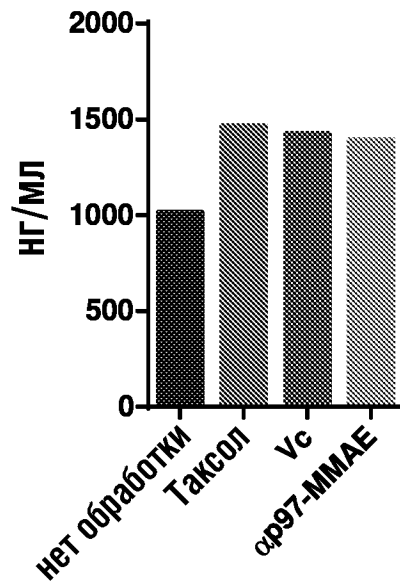
Высвобождение АТФ



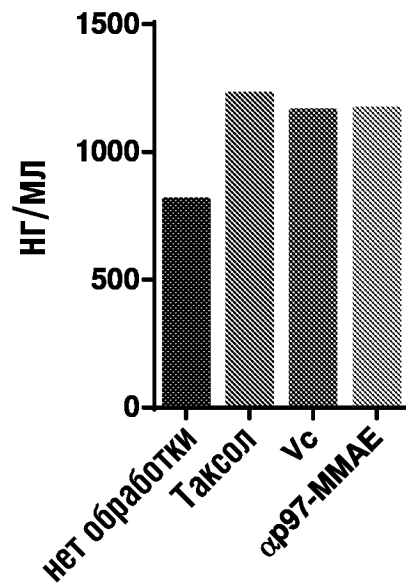
ФИГ.7В



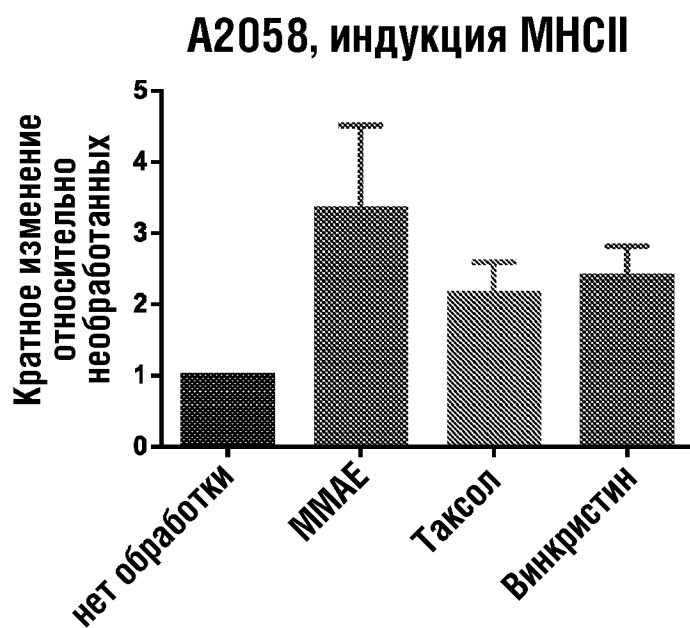
ФИГ.7С

Высвобождение HMBG1 -  
A2058Высвобождение HMBG1 -  
SK-MEL-5

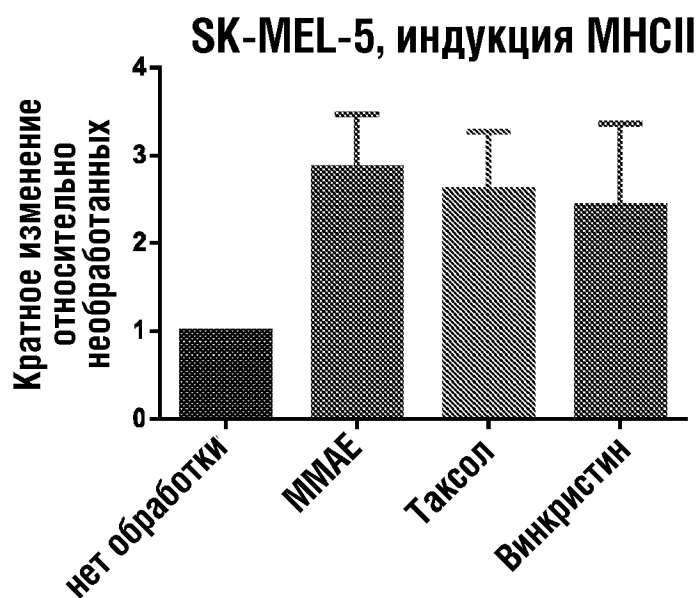
Высвобождение HMBG1 - SK-MEL-28



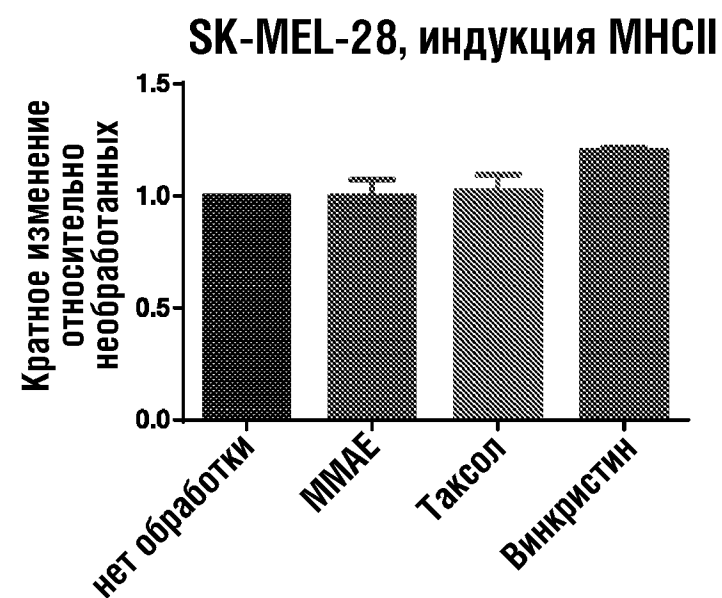
ФИГ.8А



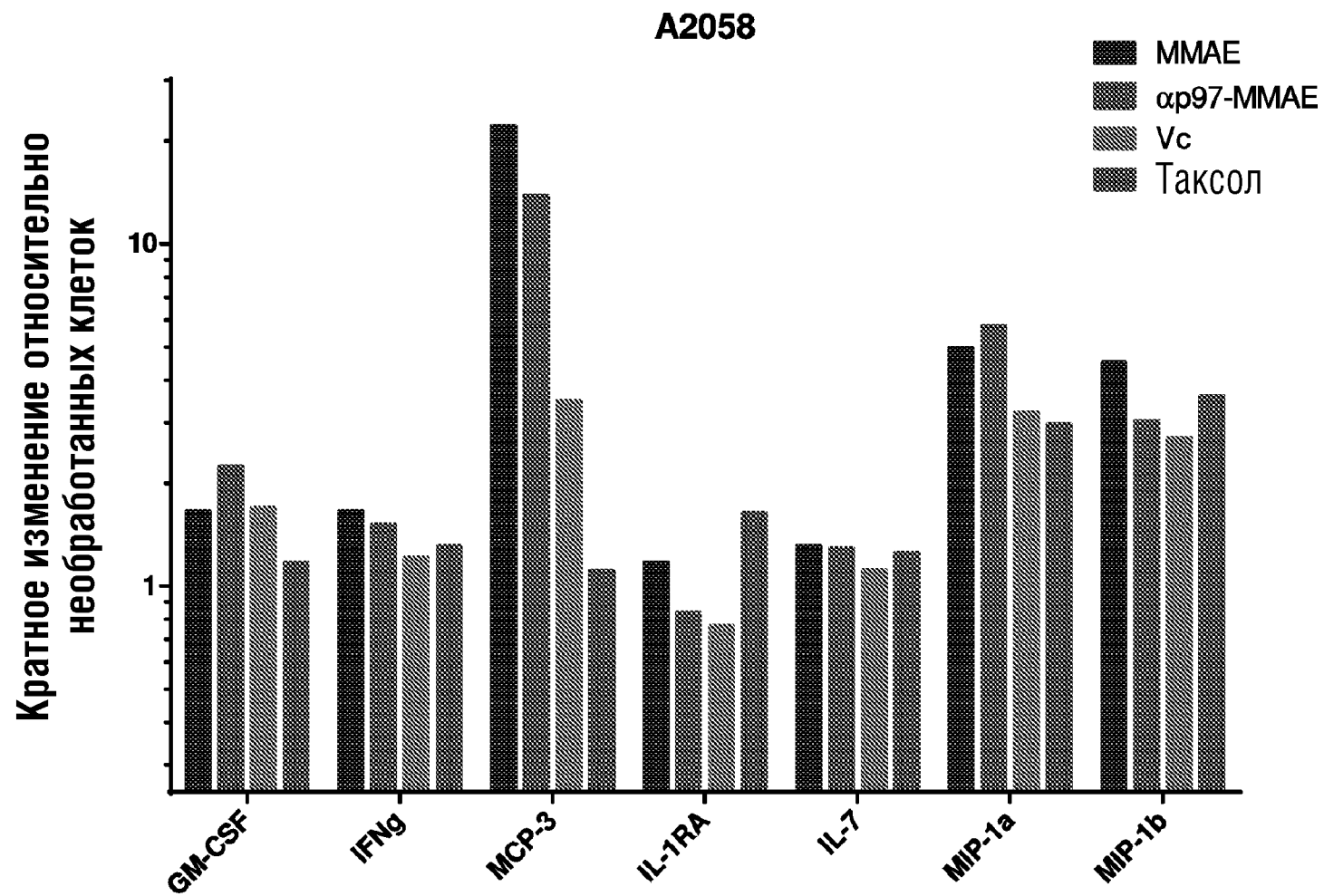
ФИГ.8В



ФИГ.8С

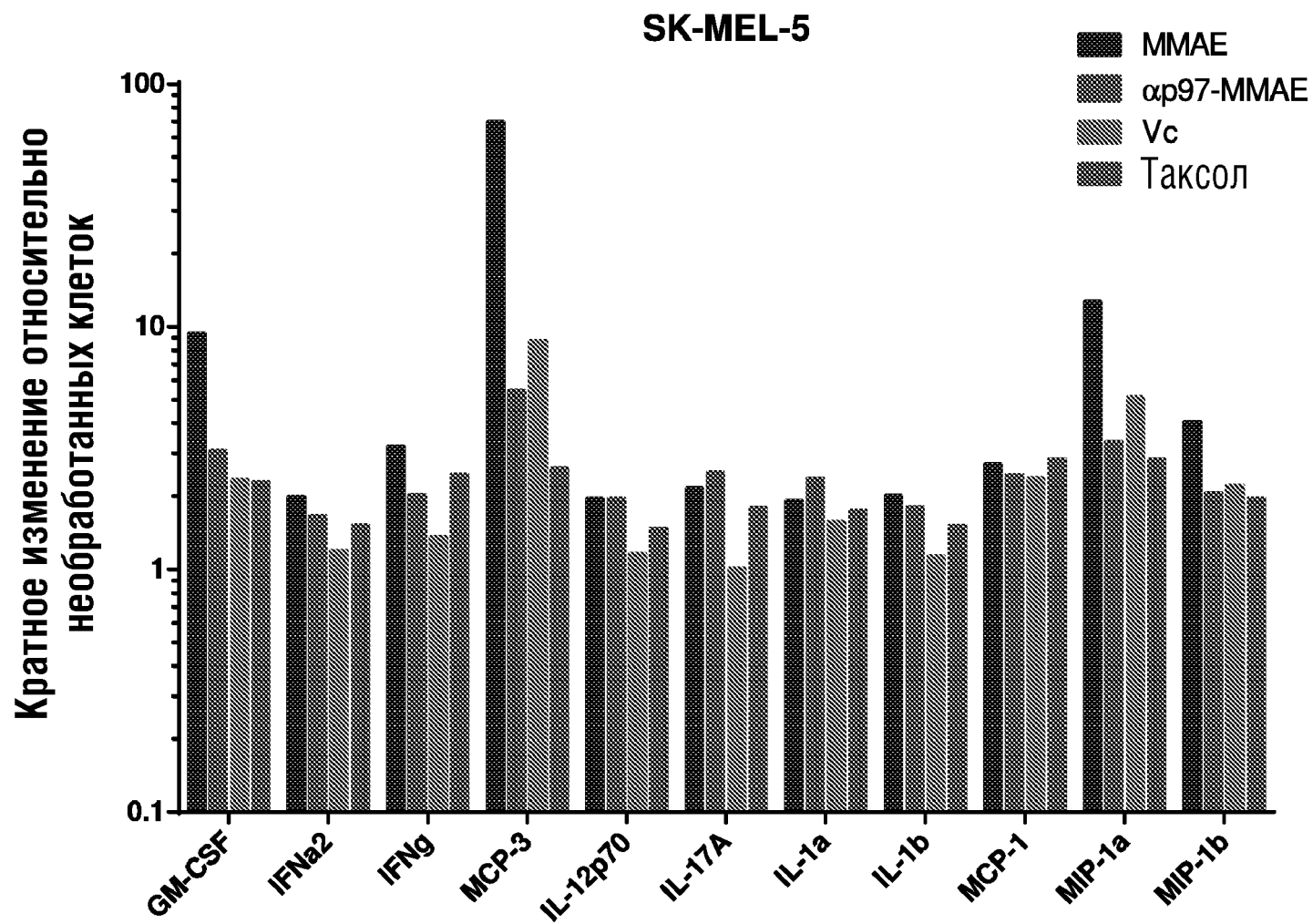


ФИГ.9А

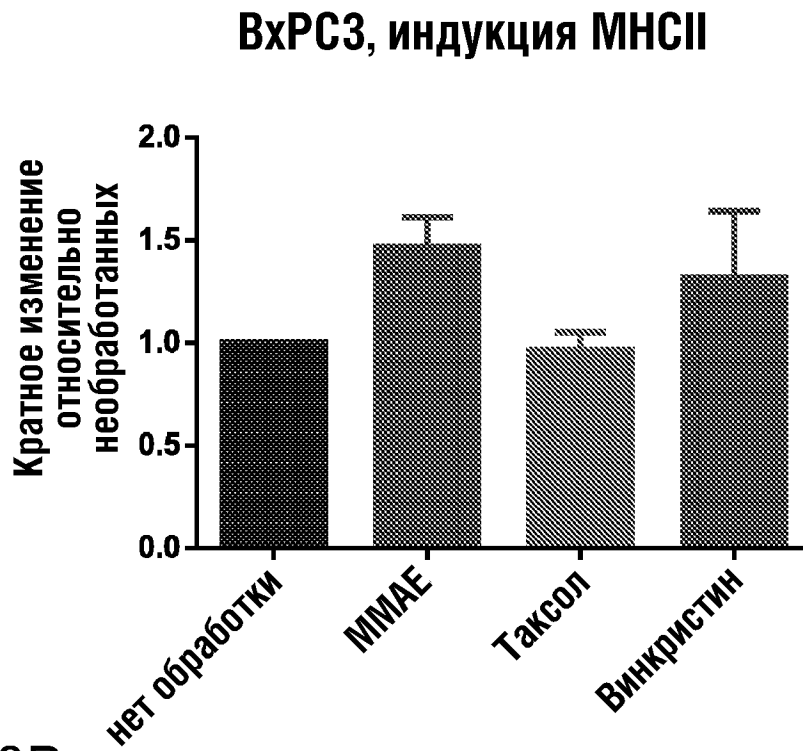




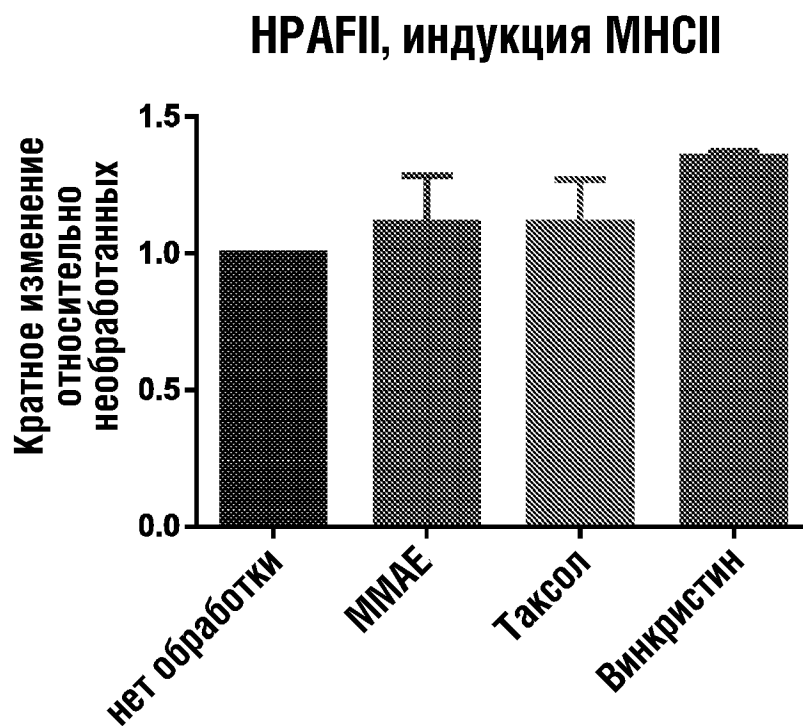
ФИГ.9В



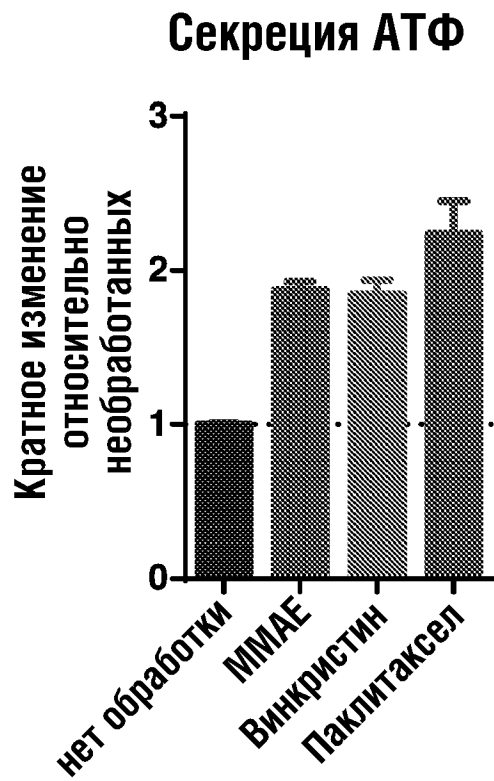
ФИГ.10А



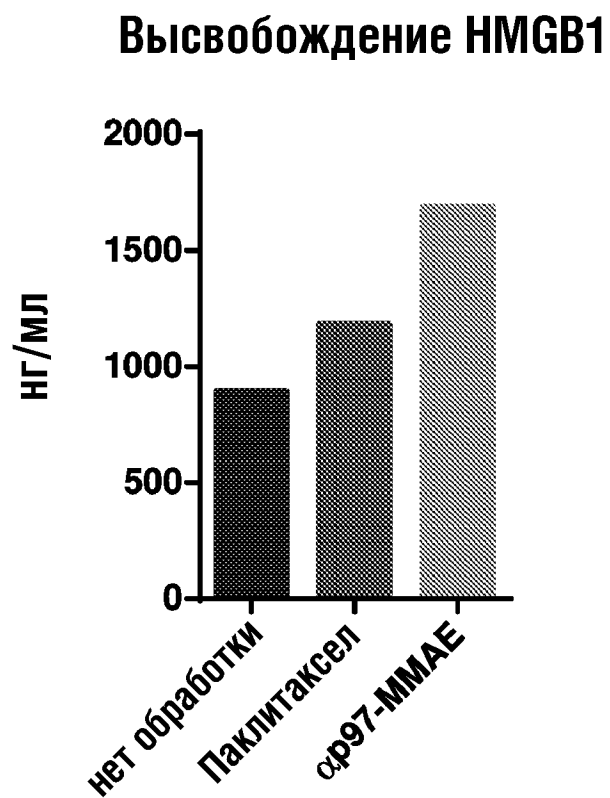
ФИГ.10В



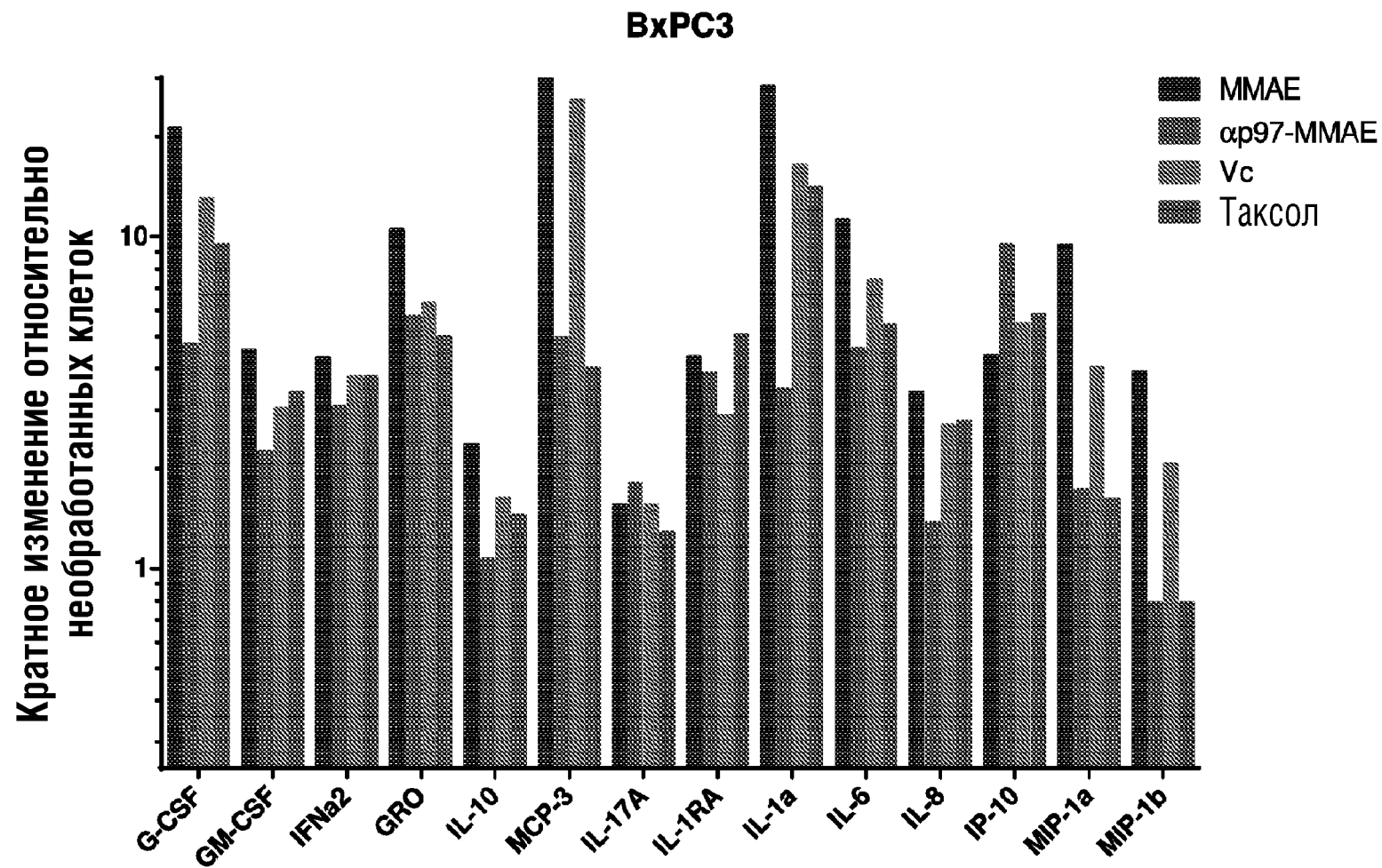
ФИГ.10С



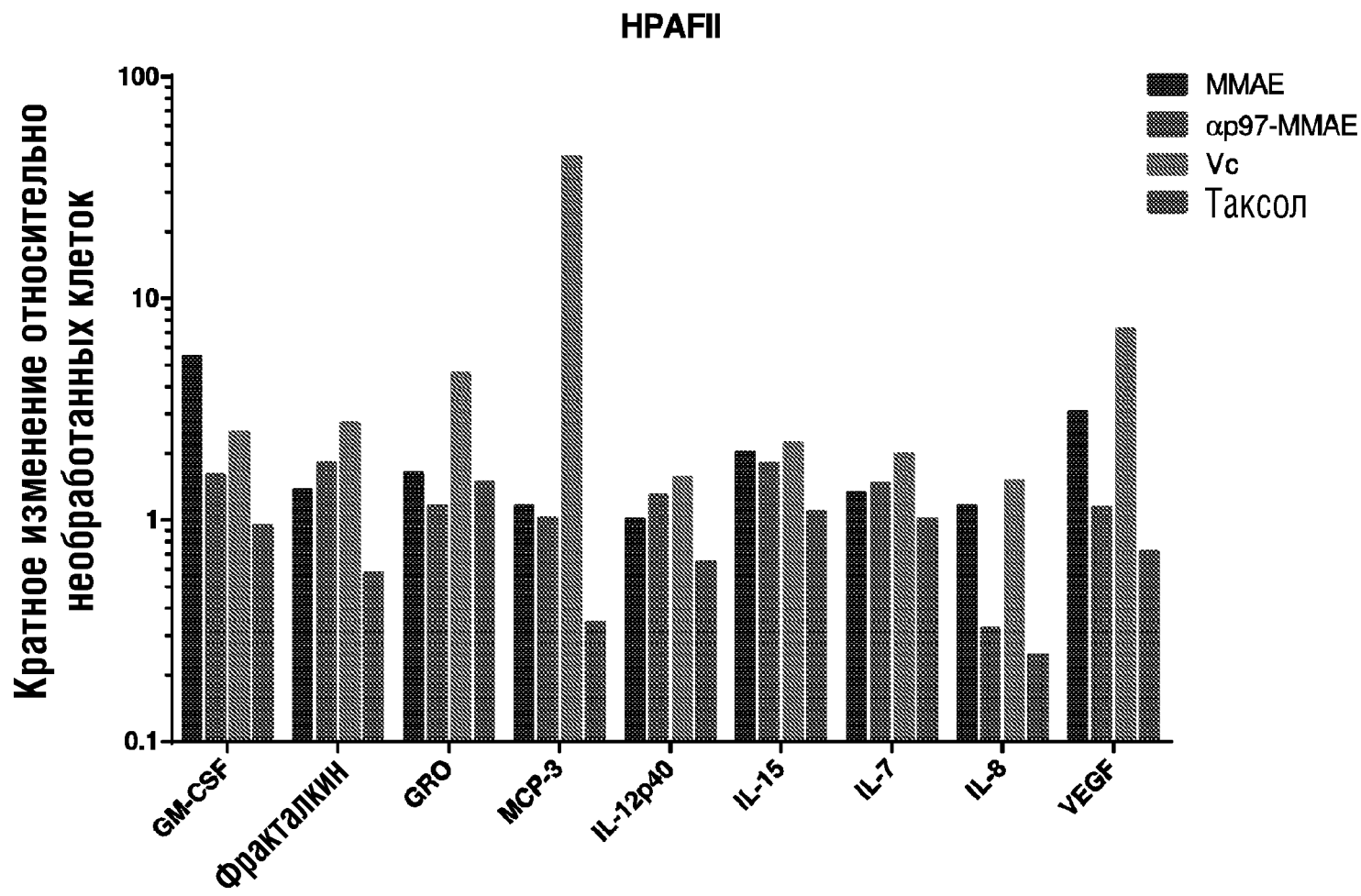
ФИГ.10D



ФИГ.11А

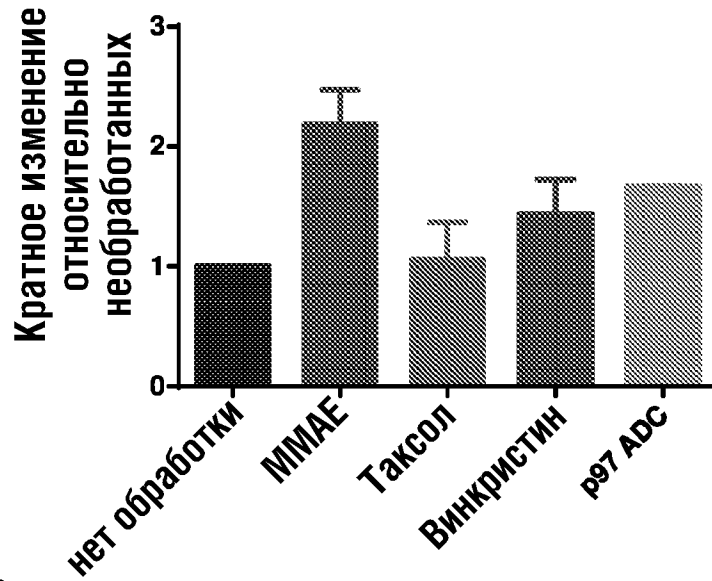


ФИГ.11В



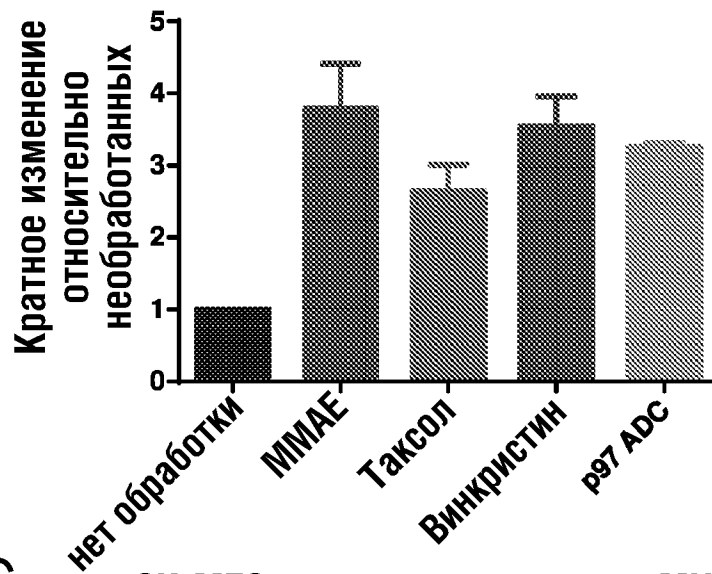
ФИГ.12А

Calu-1, кратное изменение CD86



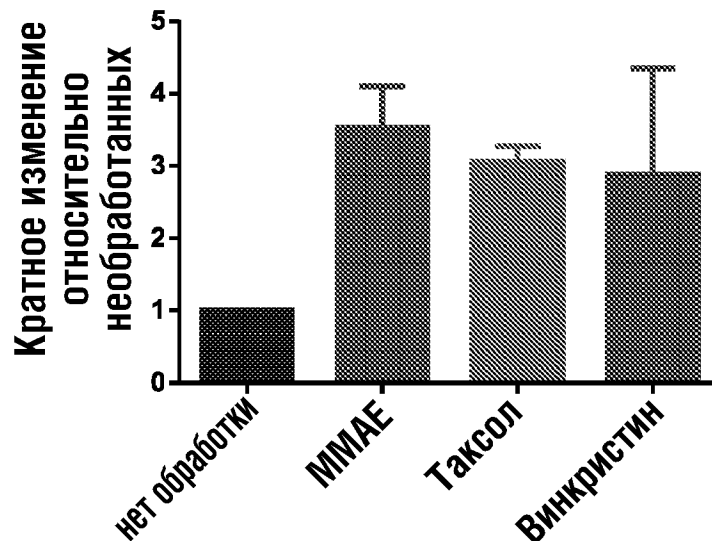
ФИГ.12В

HT1080, кратное изменение МНСII

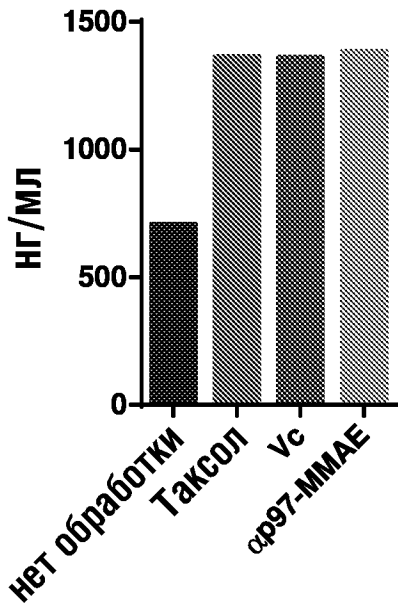


ФИГ.12С

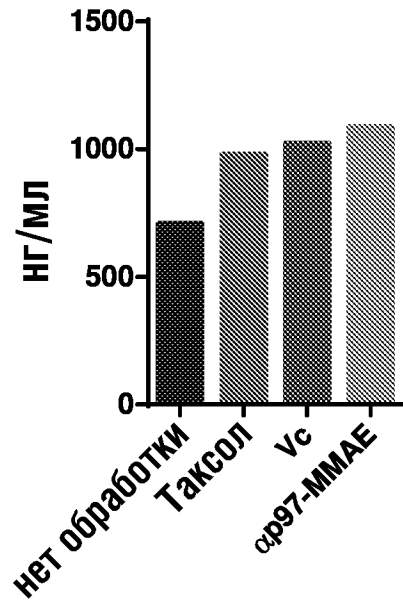
SK-MES-1, кратное изменение МНСII



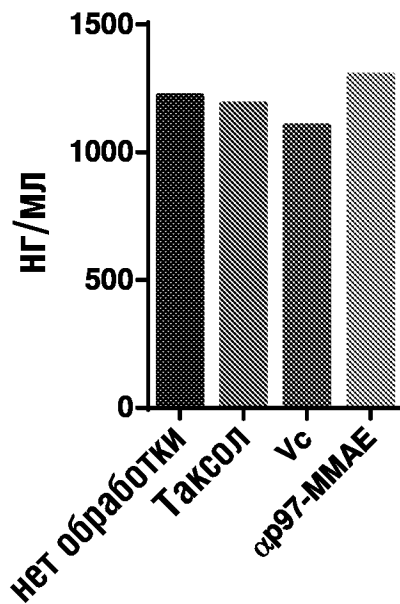
ФИГ.12D

Высвобождение HMGB1 -  
Calu-1

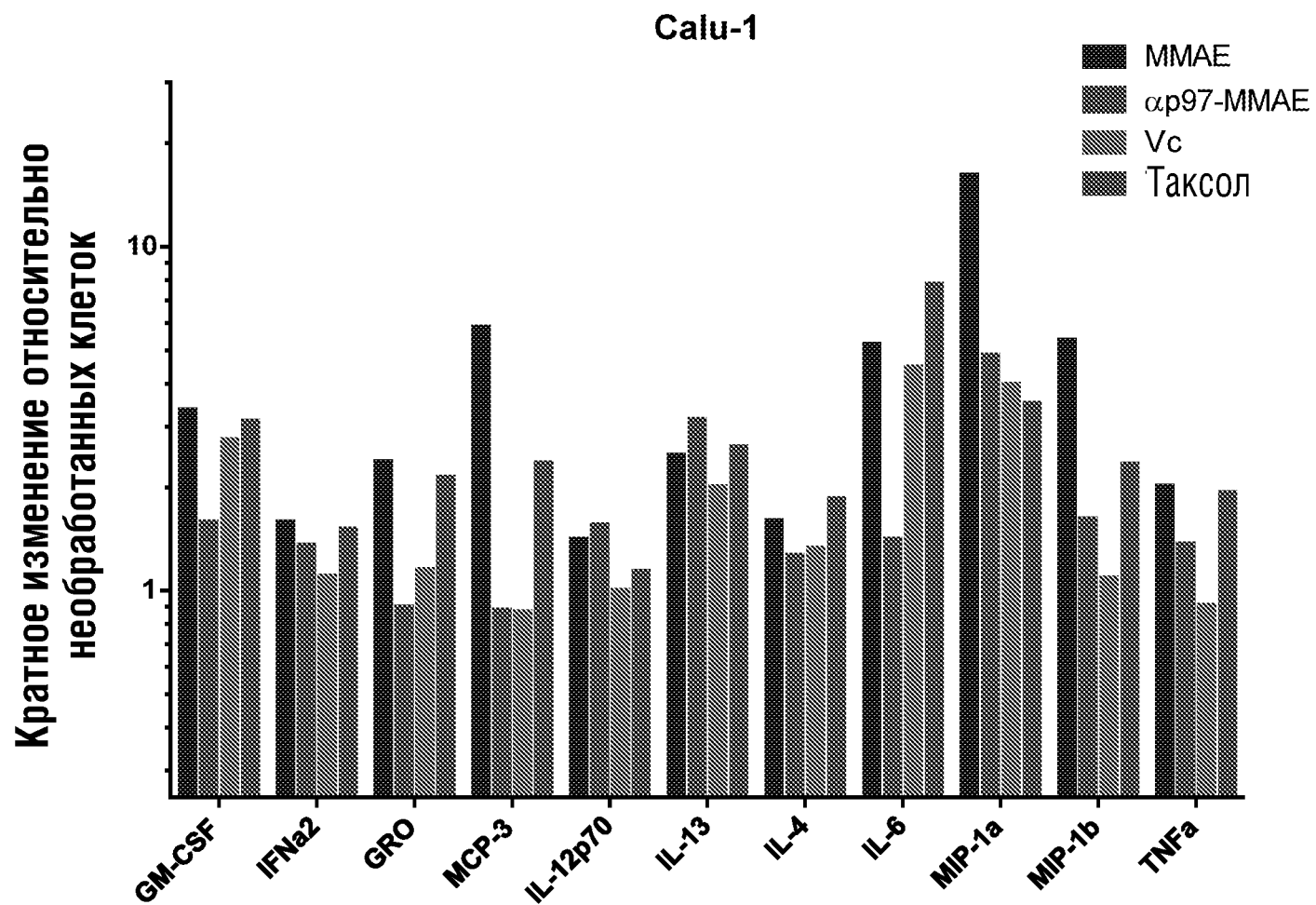
ФИГ.12E

Высвобождение HMGB1 -  
HT-1080

ФИГ.12F

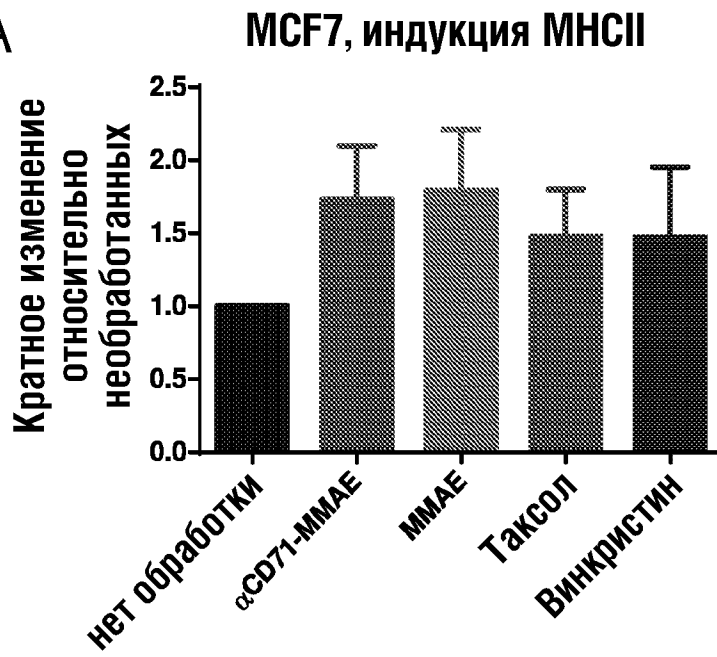
Высвобождение HMGB1 -  
SK-MES-1

ФИГ.13

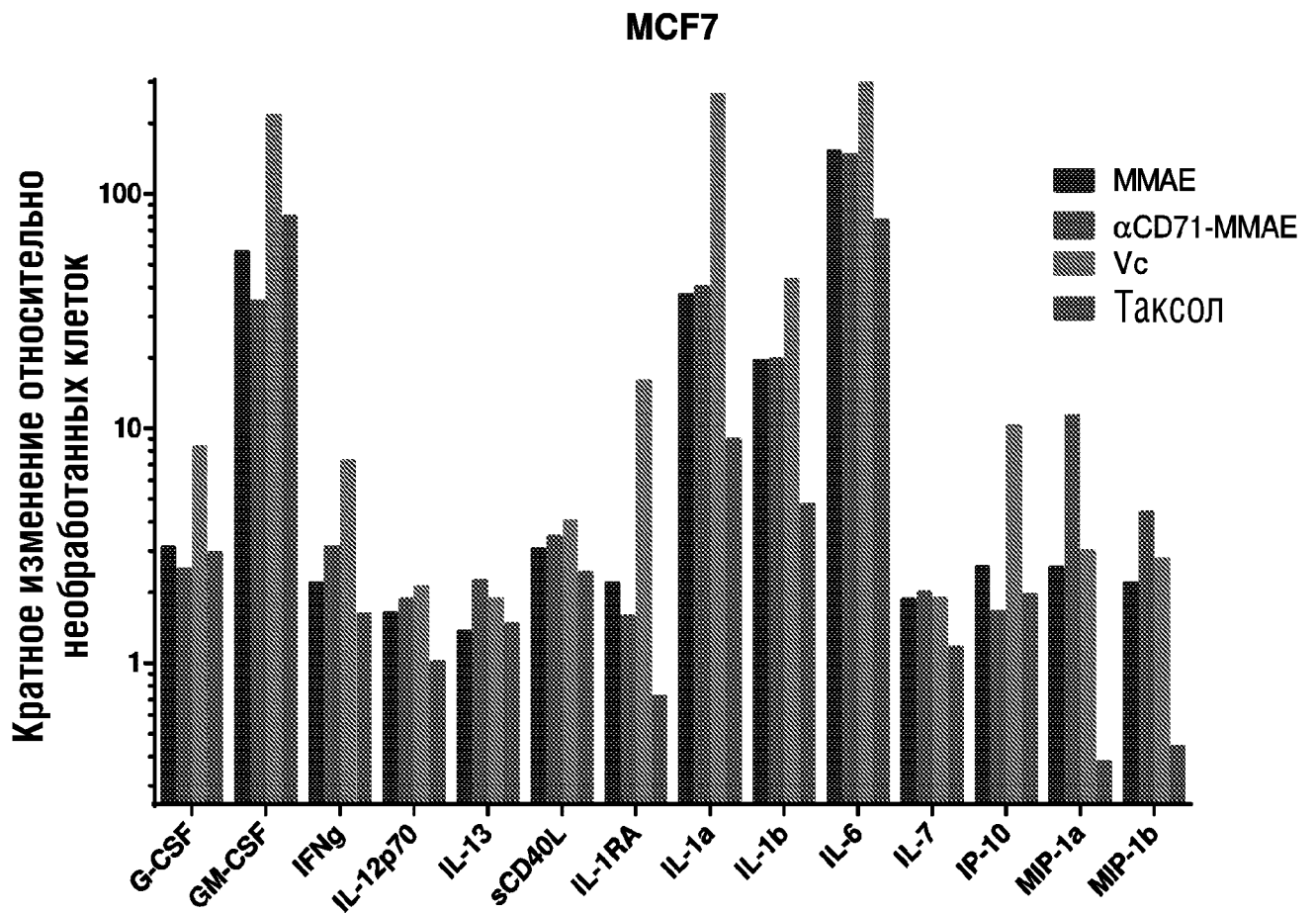




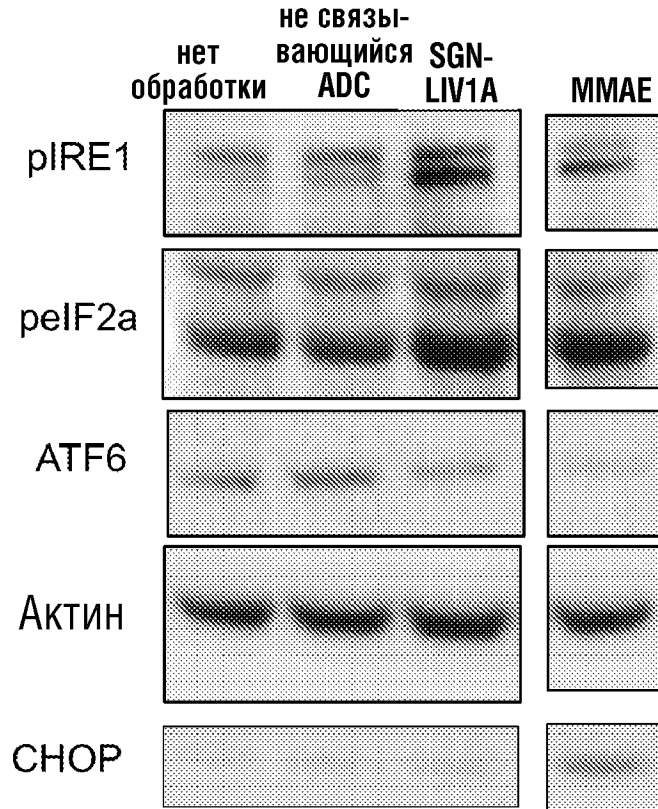
ФИГ.14А



ФИГ.14В

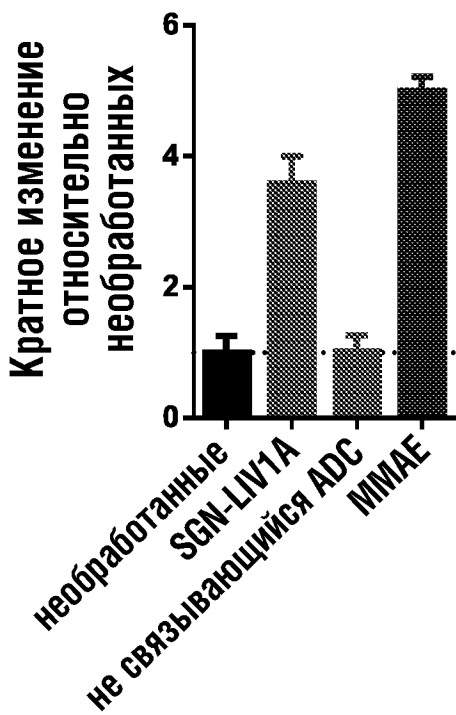


ФИГ.15А



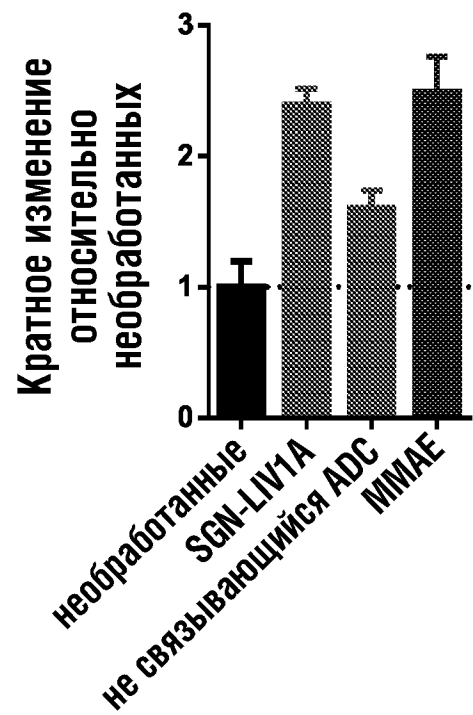
ФИГ.15В

## Секреция АТФ

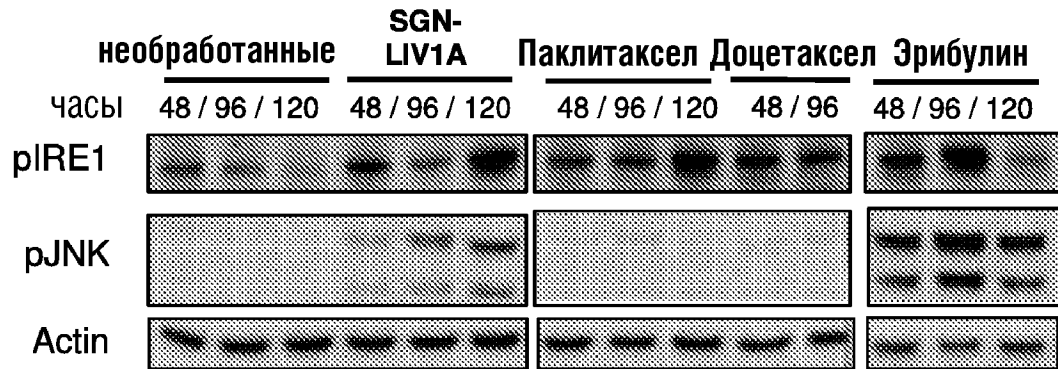


ФИГ.15С

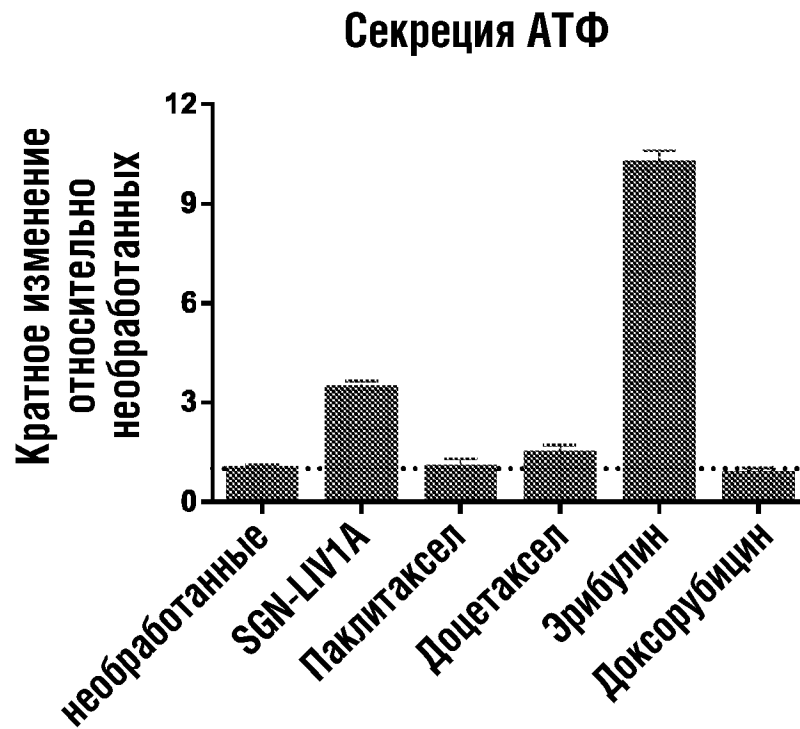
## Высвобождение НМВГ1



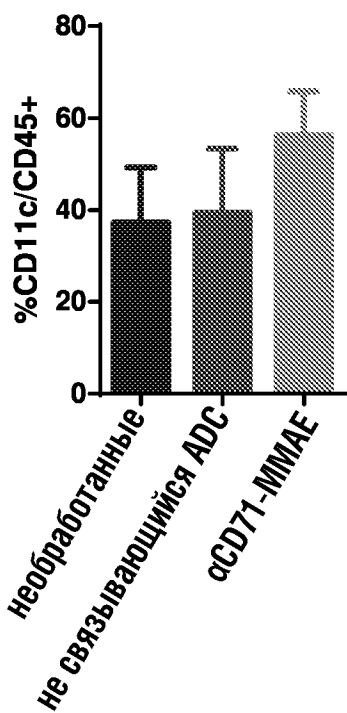
ФИГ.16А



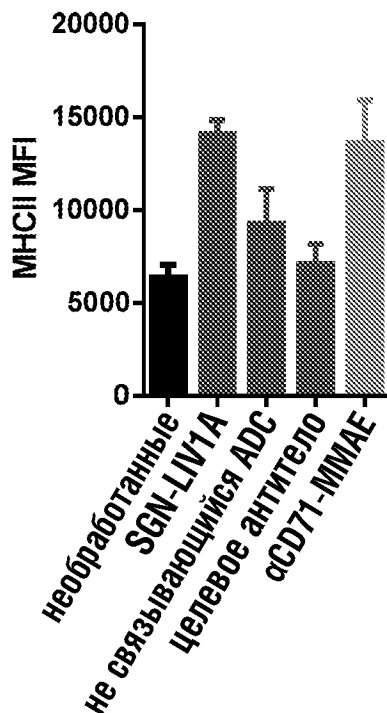
ФИГ.16В



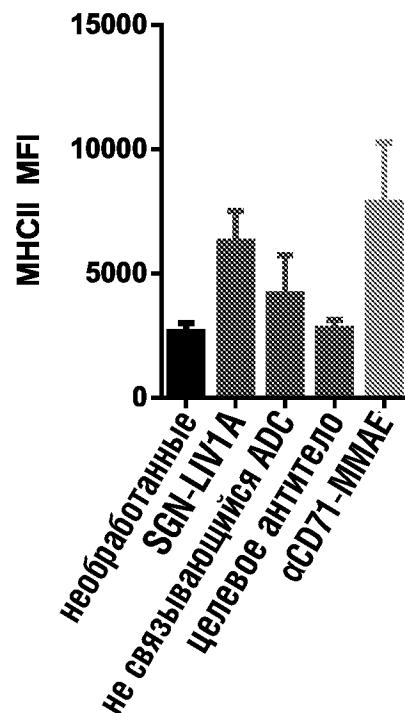
ФИГ.17А

Инфильтрация  
дендритных клеток

ФИГ.17В

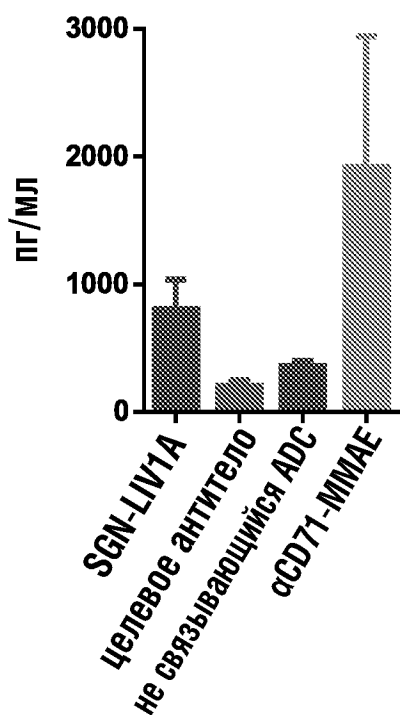
Антигенная презентация  
дендритных клеток

ФИГ.17С

Антигенная презентация  
макрофагов

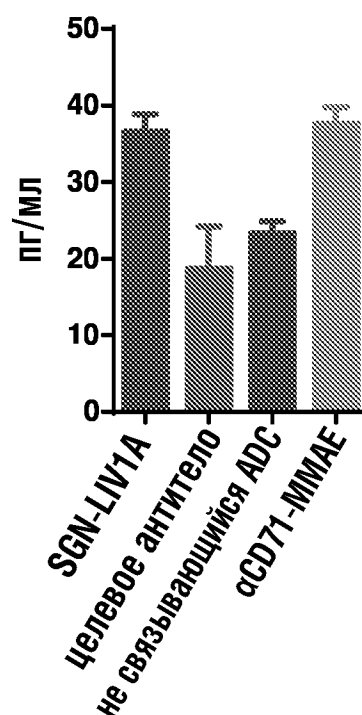
ФИГ.17D

IP10

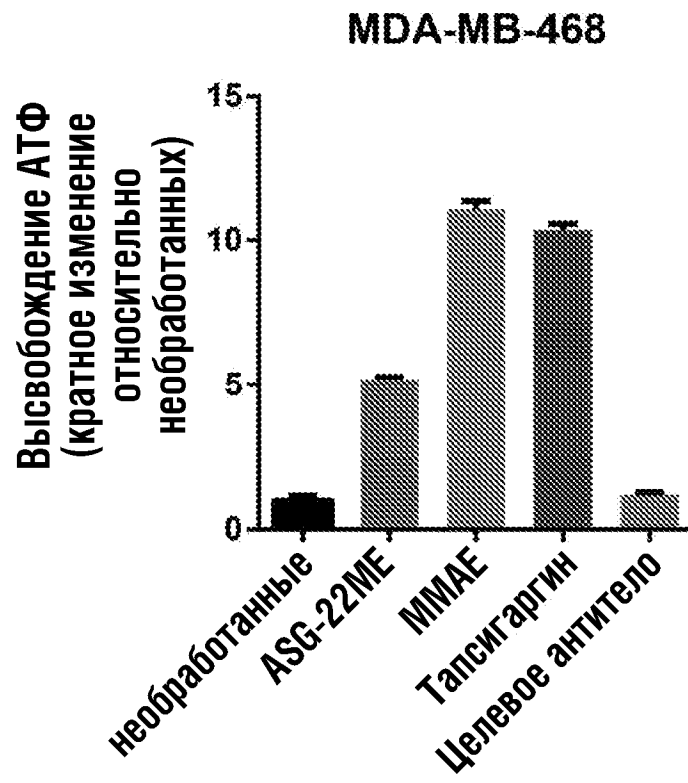


ФИГ.17Е

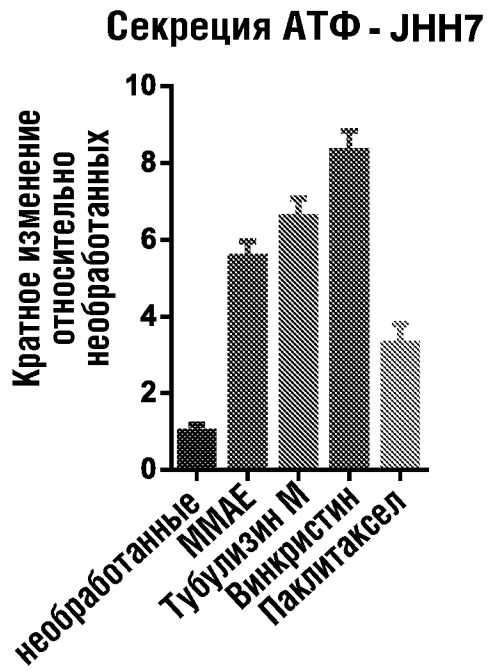
RANTES



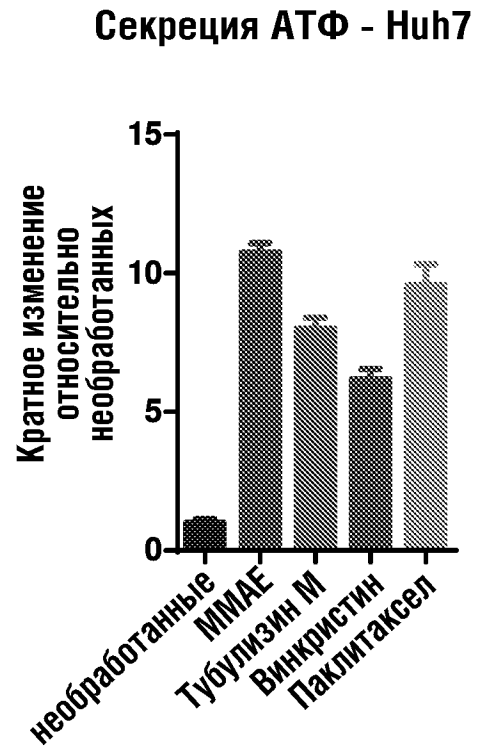
ФИГ.18



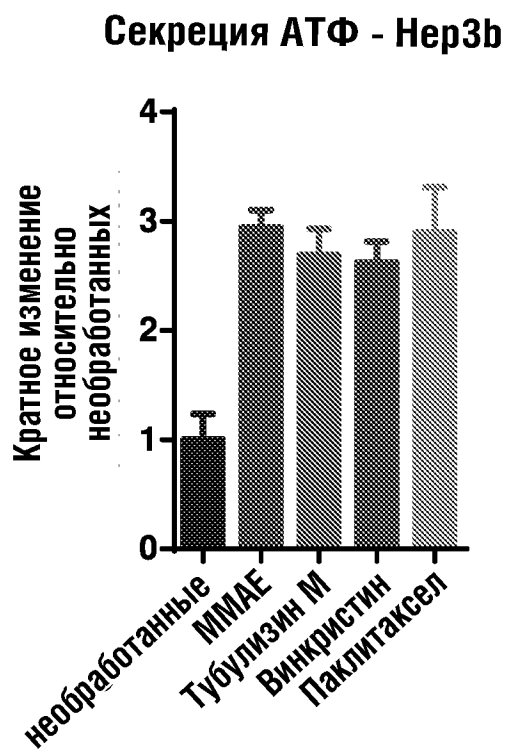
ФИГ.19А



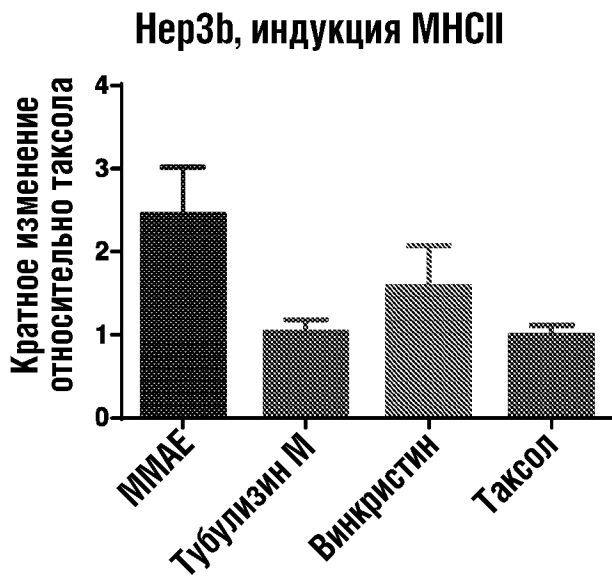
ФИГ.19В



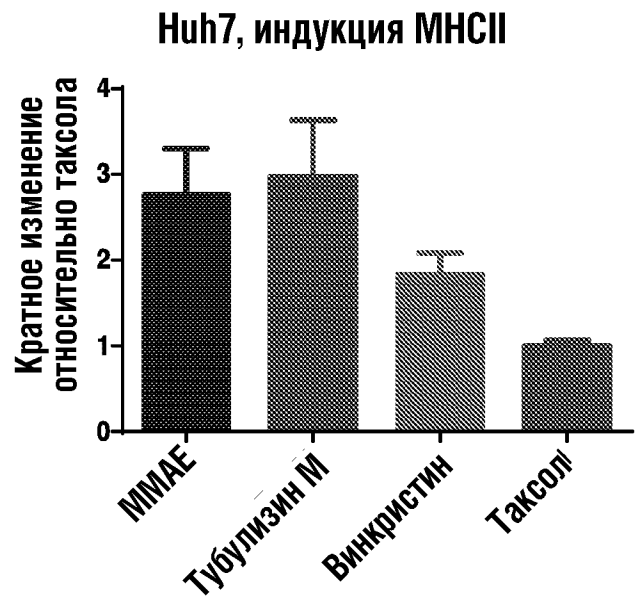
ФИГ.19С



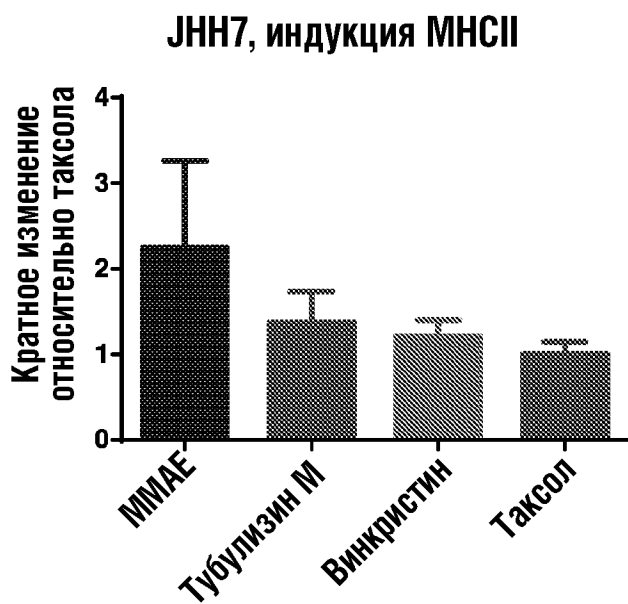
ФИГ.19D



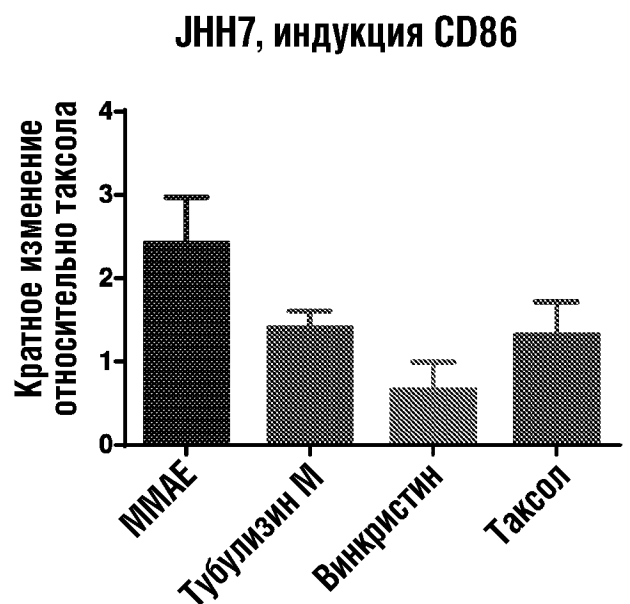
ФИГ.19Е



ФИГ.19F

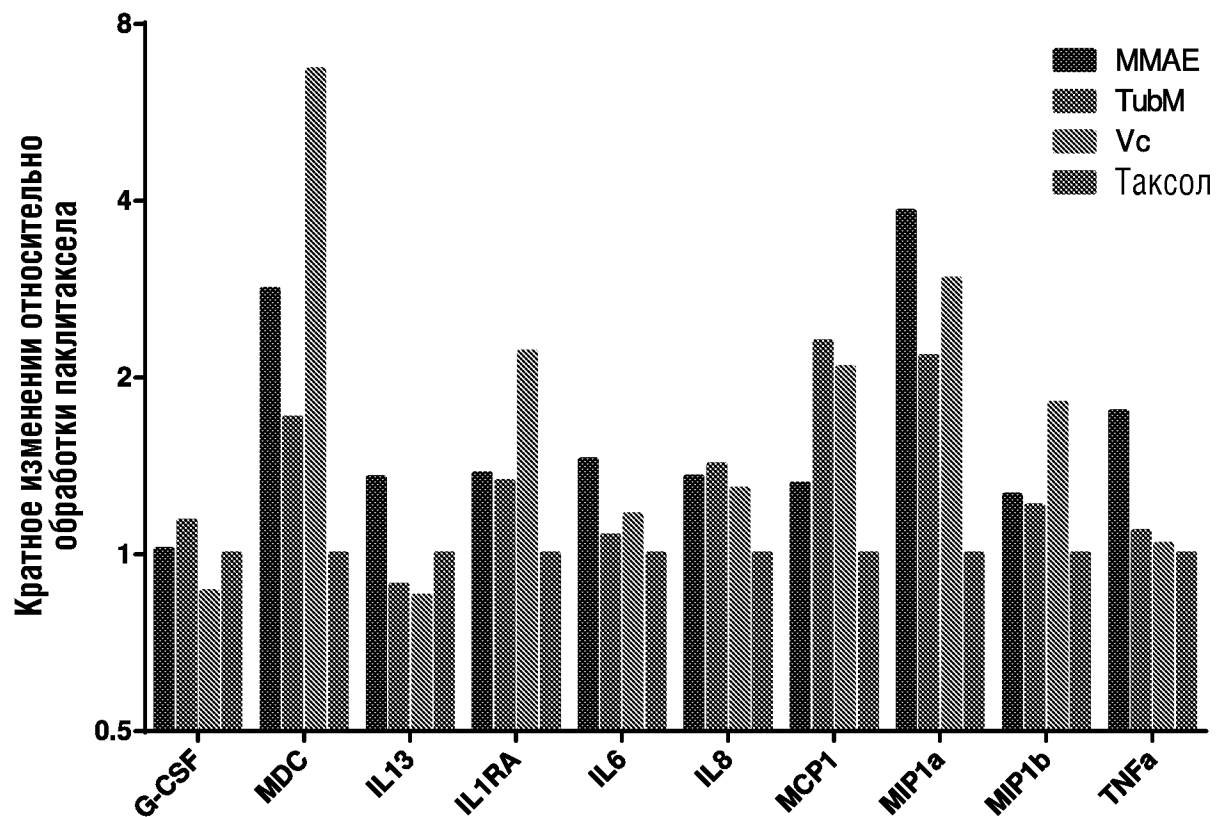


ФИГ.19G



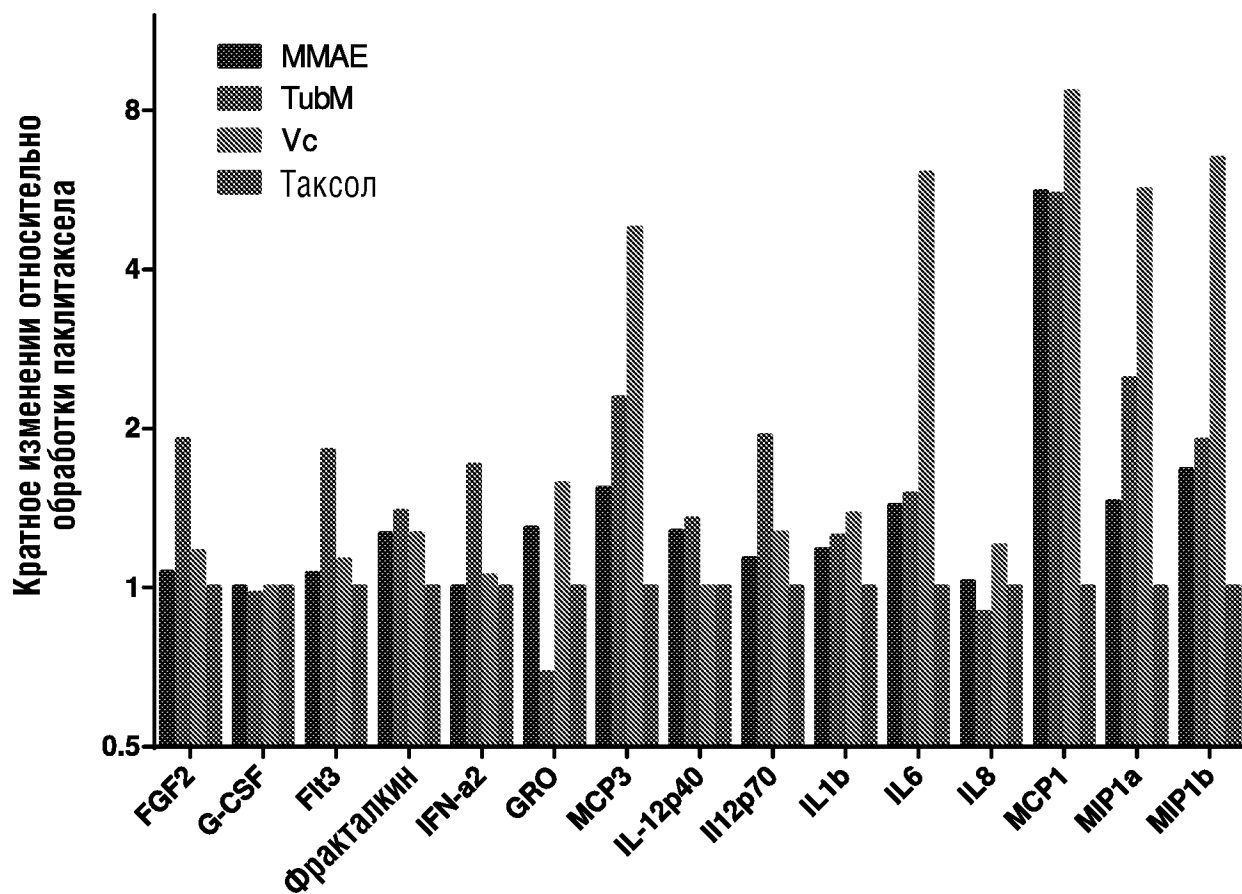
ФИГ.20А

Huh7



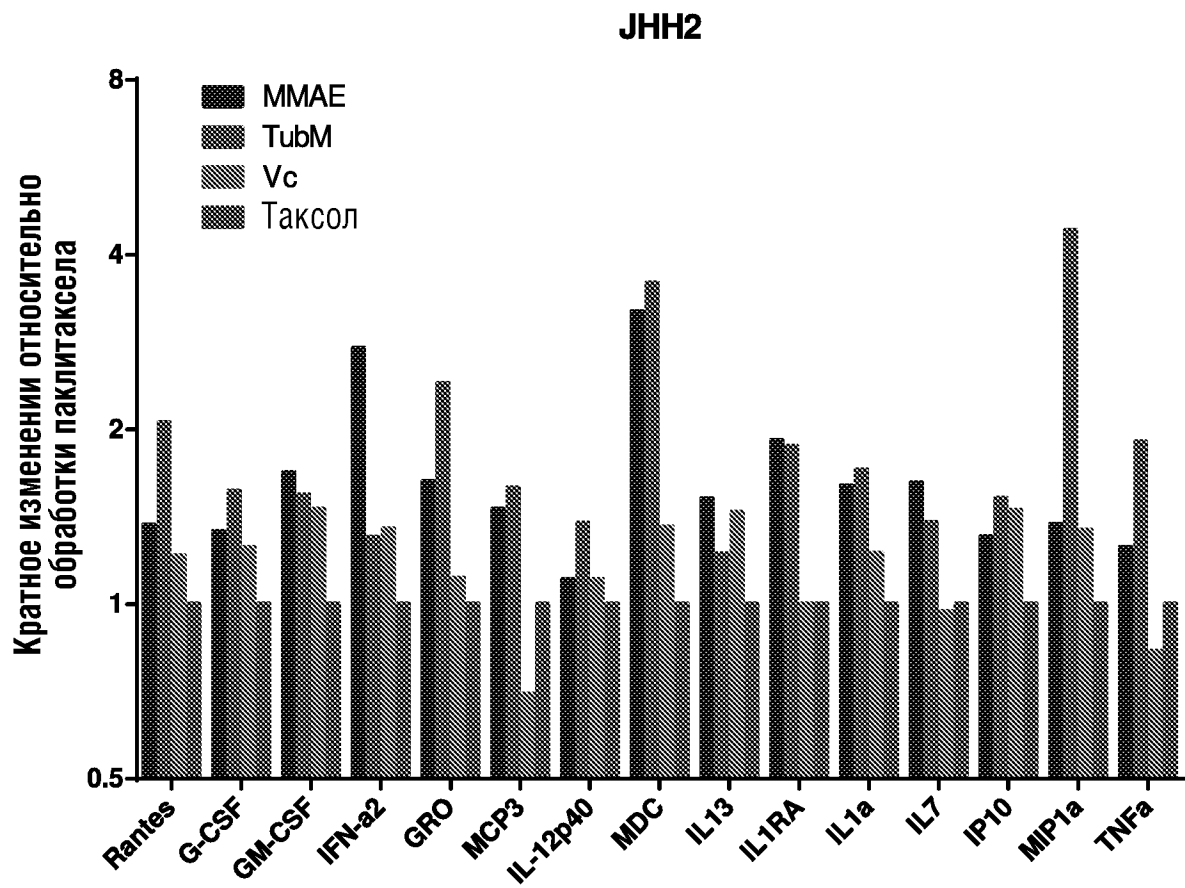
ФИГ.20В

Hep3b

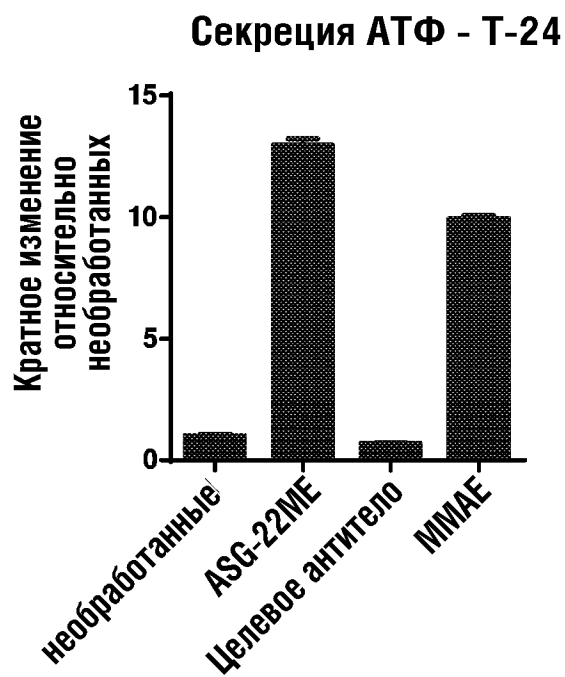




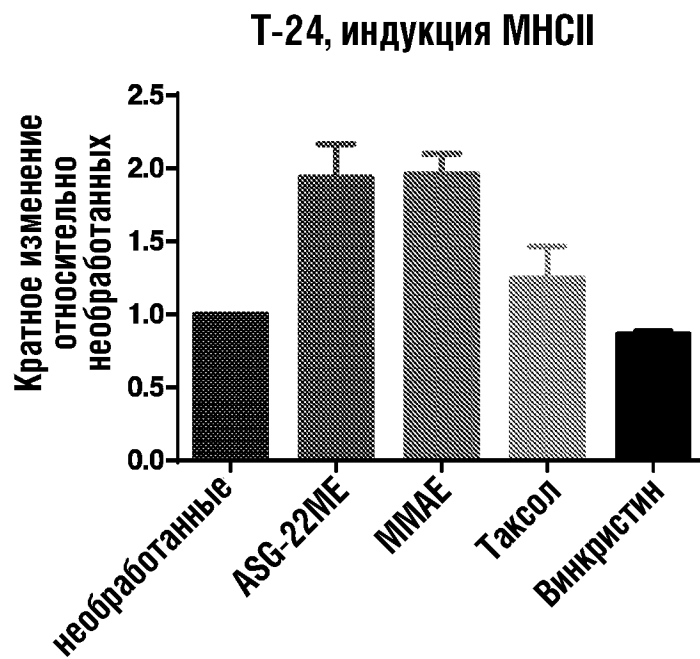
## ФИГ.20С



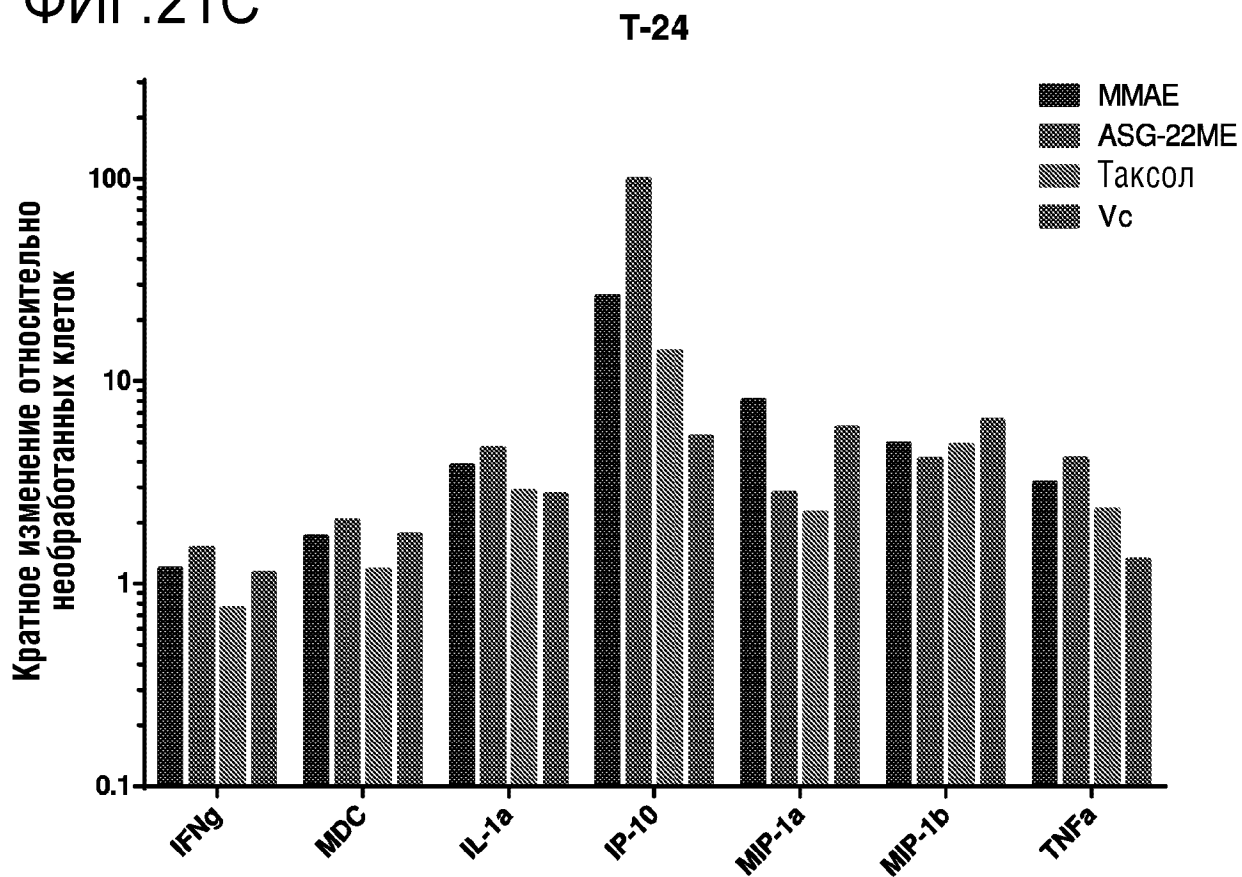
ФИГ.21А



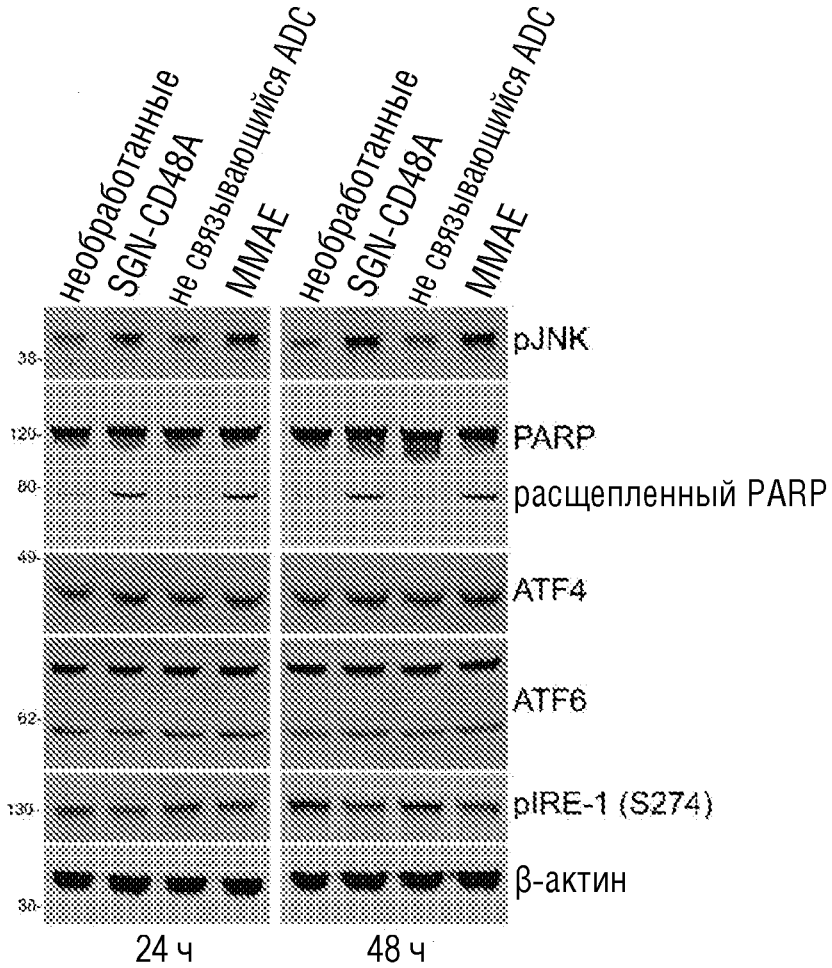
ФИГ.21А



ФИГ.21С



ФИГ.22А



ФИГ.22В

