



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112189020 A

(43) 申请公布日 2021.01.05

(21) 申请号 201980033040.7

(22) 申请日 2019.03.22

(30) 优先权数据

62/647,346 2018.03.23 US

62/658,276 2018.04.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/023516 2019.03.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/183438 EN 2019.09.26

(71) 申请人 西雅图基因公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 A·T·曹 S·J·嘉代

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书27页

序列表5页 附图36页

(54) 发明名称

包含微管蛋白破坏剂的抗体药物缀合物用于
治疗实体瘤的用途

(57) 摘要

本公开文本总体上涉及用于治疗实体瘤的
方法,所述方法包括给予药物-接头-抗体缀合
物,其中所述药物是微管蛋白破坏剂。

1. 一种用于治疗实体瘤的方法,所述方法包括以对治疗所述实体瘤有效的量向有需要的受试者给予具有药物-接头单元-抗体(D-LU-Ab)化学式的抗体药物缀合物药剂,其中D是微管蛋白破坏剂。

2. 一种用于调节实体瘤中ATP释放的方法,所述方法包括以对诱导所述实体瘤中凋亡有效的量给予具有药物-接头单元-抗体(D-LU-Ab)化学式的抗体药物缀合物药剂,其中D是微管蛋白破坏剂。

3. 一种用于诱导免疫细胞迁移到实体瘤的方法,所述方法包括以对诱导免疫细胞浸润至所述实体瘤中有效的量向有需要的受试者给予具有药物-接头单元-抗体(D-LU-Ab)化学式的抗体药物缀合物药剂,其中D是微管蛋白破坏剂。

4. 一种用于诱导实体瘤中免疫原性细胞死亡(ICD)的方法,所述方法包括以对诱导所述实体瘤中免疫原性细胞死亡有效的量向有需要的受试者给予具有药物-接头单元-抗体(D-LU-Ab)化学式的抗体药物缀合物药剂,其中D是微管蛋白破坏剂。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述抗体对CD30、CD19、CD70、CD71、CD20、CD52、CD133、EGFR、HER2、VEGF、VEGFR2、PD-1、PDL1、RANKL、CTLA-4、IL-6、SLAMF7、CD3、TNF- α 、PDGFR- α 、CD38、GD2、cCLB8、p97、结合素4、或EpCAM具有特异性。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂增加了ER应激蛋白通路,增加了ATP分泌并且增加了高迁移率族1号(HMGB1)蛋白。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂选自澳瑞他汀、微管溶素、秋水仙碱、长春花生物碱、紫杉烷、念珠藻素、美登木素生物碱、哈密特林和其他微管蛋白破坏剂。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂是选自一甲基澳瑞他汀E(MMAE)、一甲基澳瑞他汀F(MMAF)和多洛他汀10的澳瑞他汀。

9. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂是选自微管溶素D、微管苯丙氨酸和微管酪氨酸的微管溶素。

10. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂是选自秋水仙碱和CA-4的秋水仙碱。

11. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂是选自长春碱(VBL)、长春瑞滨(VRL)、长春新碱(VCR)和长春地辛(VDS)的长春花生物碱。

12. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂是选自紫杉醇和多西紫杉醇的紫杉烷。

13. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂是选自念珠藻素1和念珠藻素52的念珠藻素。

14. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂是选自美登素、美登醇、美登素类似物、DM1、DM3和DM4、以及安丝菌素2的美登木素生物碱。

15. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂是选自哈密特林和HTI-286的哈密特林。

16. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述微管蛋白破坏剂选自根薯酮内酯A、根薯酮内酯B、根薯酮内酯AF、根薯酮内酯AJ、根薯酮内酯AI-环氧化物、圆皮海绵内酯、埃博霉素A、埃博霉素B和莱利霉素。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述实体瘤选自肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃肠道癌、头颈癌、黑色素瘤、肉瘤、食道癌、胰腺癌、转移性胰腺癌、胰腺转移性腺癌、膀胱癌、胃癌、纤维化癌、神经胶质瘤、恶性神经胶质瘤、弥漫性内生性桥脑胶质瘤、复发性儿童脑肿瘤、肾细胞癌、透明细胞转移性肾细胞癌、肾癌、前列腺癌、转移性去势难治性前列腺癌、IV期前列腺癌、转移性黑色素瘤、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、复发性皮肤黑色素瘤、黑色素瘤脑转移、IIIA期皮肤黑色素瘤;IIIB期皮肤黑色素瘤、IIIC期皮肤黑色素瘤;IV期皮肤黑色素瘤、头颈部恶性黑色素瘤、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状细胞非小细胞肺癌、乳腺癌、复发性转移性乳腺癌、肝细胞癌、里氏综合征;华氏巨球蛋白血症、成人胶质母细胞瘤;成人神经胶质肉瘤、复发性胶质母细胞瘤、复发性儿童横纹肌肉瘤、复发性尤因肉瘤/周围原始神经外胚层肿瘤、复发性神经母细胞瘤;复发性骨肉瘤、大肠癌、MSI阳性大肠癌;MSI阴性结直肠癌、鼻咽非角化癌;复发性鼻咽未分化细胞癌、宫颈腺癌;宫颈腺鳞癌;宫颈鳞状细胞癌;复发性宫颈癌;IVA期宫颈癌;IVB期宫颈癌、肛管鳞状细胞癌;转移性肛管癌;复发性肛管癌、复发性头颈癌;头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌、结肠癌、胃癌、晚期胃肠道癌、胃腺癌;胃食管接合处腺癌、骨肿瘤、软组织肉瘤;骨肉瘤、胸腺癌、尿路上皮癌、复发性梅克尔细胞癌;III期梅克尔细胞癌;IV期梅克尔细胞癌、骨髓增生异常综合征和塞扎里综合征。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体药物缀合物包含蛋白酶可切割的接头、酸可切割的接头或二硫化物接头。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述蛋白酶可切割的接头包含硫醇反应性间隔子和二肽。

20. 根据权利要求18或19所述的方法,其中所述蛋白酶可切割的接头由硫醇反应性马来酰亚胺基己酰基间隔子、缬氨酸-瓜氨酸二肽和对氨基苄氧羰基间隔子组成。

21. 根据权利要求18所述的方法,其中所述酸可切割的接头是胍接头或季铵接头。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法进一步包括给予化疗方案。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述化疗方案基本由作为组合疗法的阿霉素、长春碱和达卡巴嗪(AVD)组成。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述化疗方案基本由作为组合疗法的环磷酰胺、长春新碱和泼尼松(CHP)组成。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体药物缀合物的所述抗体是单克隆抗体。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD30抗体,并且所述抗CD30抗体药物缀合物包含

i) SEQ ID NO:4所示的重链CDR1、SEQ ID NO:6所示的重链CDR2、SEQ ID NO:8所示的重链CDR3;和

ii) SEQ ID NO:12所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:14所示的轻链CDR2、和SEQ ID NO:16所示的轻链CDR13。

27. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述抗体是抗CD30抗体,并且所述抗CD30抗体药物缀合物包含

i) 与SEQ ID NO:2所示的重链可变区至少85%相同的氨基酸序列,和

ii) 与SEQ ID NO:10所示的轻链可变区至少85%相同的氨基酸序列。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述抗体是抗CD30抗体, 并且所述抗体药物缀合物的所述抗CD30抗体是嵌合AC10抗体。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述抗体药物缀合物包含一甲基澳瑞他汀E和蛋白酶可切割的接头。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中所述蛋白酶可切割的接头包含硫醇反应性间隔子和二肽。

31. 根据权利要求29或30所述的方法, 其中所述蛋白酶可切割的接头由硫醇反应性马来酰亚胺基己酰基间隔子、缬氨酸-瓜氨酸二肽和对氨基苄氧羰基间隔子组成。

32. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述抗CD30抗体药物缀合物是维汀-本妥昔单抗。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述抗体药物缀合物诱导免疫细胞迁移到所述肿瘤的部位。

包含微管蛋白破坏剂的抗体药物缀合物用于治疗实体瘤的用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求于2018年3月23日提交的美国临时专利申请号62/647,346和2018年4月16日提交的美国临时专利申请号62/658,276的优先权,将上述申请通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0002] 本公开文本总体上涉及用于治疗实体瘤的方法,所述方法包括给予药物-接头单元-抗体缀合物疗法,其中所述药物是微管蛋白破坏剂。

背景技术

[0003] 微管是诸如细胞分裂和细胞转运的许多细胞过程中涉及的重要的异二聚体结构。在G2/M期破坏微管诱导细胞周期停滞。根据微管/微管蛋白抑制剂的作用机制,可以将其分为两大类:促进微管蛋白聚合并稳定微管结构的药剂(例如紫杉醇)和抑制微管蛋白聚合并使微管结构失稳的药剂(诸如美登木素生物碱、澳瑞他汀、长春碱和长春新碱)(Chen等人, *Molecules*22:1281,2017)。

[0004] 微管蛋白破坏剂诸如MMAE已用于针对白血病的抗体药物缀合物。例如,维汀-本妥昔单抗(Brentuximab vedotin)是一种由抗CD30单克隆抗体通过蛋白酶可切割的接头与微管破坏剂一甲基澳瑞他汀E缀合而组成的抗体-药物缀合物。维汀-本妥昔单抗已被批准用于治疗自体造血干细胞移植(ASCT)失败后的典型霍奇金淋巴瘤患者或至少2种先前多药剂化疗方案失败后的非ASCT候选者的典型霍奇金淋巴瘤患者,并且作为复发/进展风险增加的霍奇金淋巴瘤患者的ASCT后巩固治疗。参见ADCETRIS®(维汀-本妥昔单抗)美国处方信息和ADCETRIS®(维汀-本妥昔单抗)欧盟产品特性摘要。维汀-本妥昔单抗还被批准用于在至少一种先前多药剂化疗方案失败后的全身间变性大细胞淋巴瘤。尚未显示抗CD30 MMAE ADC在实体瘤中有效。

发明内容

[0005] 本公开文本提供了改进的用于治疗实体瘤的方法,所述方法包括给予包含微管蛋白破坏剂的抗体药物缀合物。本文公开了微管蛋白破坏剂影响实体瘤细胞中的ER应激蛋白通路,并诱导ATP分泌和其他诱导免疫细胞迁移到肿瘤部位并降低肿瘤生长速度的ER应激现象。

[0006] 本文提供了一种用于治疗实体瘤的方法,所述方法包括以对治疗所述实体瘤有效的量向有需要的受试者给予具有药物-接头单元-抗体(D-LU-Ab)化学式的抗体药物缀合物药剂,其中D是微管蛋白破坏剂。

[0007] 还提供了一种用于调节实体瘤中ATP释放的方法,所述方法包括以对诱导所述实体瘤中凋亡有效的量给予具有药物-接头单元-抗体(D-LU-Ab)化学式的抗体药物缀合物药

剂,其中D是微管蛋白破坏剂。

[0008] 本公开文本进一步考虑了一种用于诱导免疫细胞迁移到实体瘤的方法,所述方法包括以对诱导免疫细胞浸润至所述实体瘤中有效的量向有需要的受试者给予具有药物-接头单元-抗体(D-LU-Ab)化学式的抗体药物缀合物药剂,其中D是微管蛋白破坏剂。

[0009] 在另一方面,本公开文本内容提供了一种用于诱导实体瘤中免疫原性细胞死亡(ICD)的方法,所述方法包括以对诱导所述实体瘤中免疫原性细胞死亡有效的量,向有需要的受试者给予具有药物-接头单元-抗体(D-LU-Ab)化学式的抗体药物缀合物药剂,其中D是微管蛋白破坏剂。

[0010] 应当理解,所述药物-接头单元-抗体(D-LU-Ab)在本文中也可以称为抗体药物缀合物或ADC。

[0011] 在各个实施方案中,所述抗体与癌细胞表面上的抗原结合。在各个实施方案中,所述抗体对CD30、CD19、CD70、CD71、CD20、CD52、CD133、EGFR、HER2、VEGF、VEGFR2、PD-1、PDL1、RANKL、CTLA-4、IL-6、SLAMF7、CD3、TNF- α 、PDGFR- α 、CD38、GD2、cCLB8、p97、结合素4、或EpCAM具有特异性。

[0012] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂增加了ER应激蛋白通路,增加了ATP分泌并且增加了高迁移率族1号(HMGB1)蛋白。

[0013] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂选自澳瑞他汀(Auristatin)、微管溶素(Tubulysin)、秋水仙碱、长春花生物碱、紫杉烷、念珠藻素、美登木素生物碱、哈密特林(Hemiasterlin)和其他微管蛋白破坏剂。在具体实施方式中更详细地描述了考虑用于本方法的示例性微管蛋白破坏剂。

[0014] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂是选自一甲基澳瑞他汀E(MMAE)、一甲基澳瑞他汀F(MMAF)和多洛他汀10的澳瑞他汀。

[0015] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂是选自微管溶素D、微管苯丙氨酸和微管酪氨酸的微管溶素。

[0016] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂是选自秋水仙碱和CA-4的秋水仙碱。

[0017] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂是选自长春碱(VBL)、长春瑞滨(VRL)、长春新碱(VCR)和长春地辛(VDS)的长春花生物碱。

[0018] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂是选自紫杉醇和多西紫杉醇的紫杉烷。

[0019] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂是选自念珠藻素1和念珠藻素52的念珠藻素。

[0020] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂是选自美登素、美登醇、美登素类似物、DM1、DM3和DM4、以及安丝菌素2(Ansamatocin-2)的美登木素生物碱。

[0021] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂是选自哈密特林和HTI-286的哈密特林。

[0022] 在各个实施方案中,所述微管蛋白破坏剂选自根薯酮内酯A、根薯酮内酯B、根薯酮内酯AF、根薯酮内酯AJ、根薯酮内酯AI-环氧化物、圆皮海绵内酯、埃博霉素A、埃博霉素B和莱利霉素。

[0023] 在各个实施方案中,所述实体瘤选自肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃肠道癌、头颈癌、黑色素瘤、肉瘤、食道癌、胰腺癌、转移性胰腺癌、胰腺转移性腺癌、膀胱癌、胃癌、纤维化癌、神经胶质瘤、恶性神经胶质瘤、弥漫性内生性桥脑胶质瘤、复发性儿童脑肿瘤、肾细胞

癌、透明细胞转移性肾细胞癌、肾癌、前列腺癌、转移性去势难治性前列腺癌、IV期前列腺癌、转移性黑色素瘤、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、复发性皮肤黑色素瘤、黑色素瘤脑转移、IIIA期皮肤黑色素瘤；IIIB期皮肤黑色素瘤；IIIC期皮肤黑色素瘤；IV期皮肤黑色素瘤、头颈部恶性黑色素瘤、肺癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、鳞状细胞非小细胞肺癌、乳腺癌、复发性转移性乳腺癌、肝细胞癌、里氏综合征；华氏巨球蛋白血症、成人胶质母细胞瘤；成人神经胶质肉瘤、复发性胶质母细胞瘤、复发性儿童横纹肌肉瘤、复发性尤因肉瘤/周围原始神经外胚层肿瘤、复发性神经母细胞瘤；复发性骨肉瘤、大肠癌、MSI阳性大肠癌；MSI阴性结直肠癌、鼻咽非角化癌；复发性鼻咽未分化细胞癌、宫颈腺癌；宫颈腺鳞癌；宫颈鳞状细胞癌；复发性宫颈癌；IVA期宫颈癌；IVB期宫颈癌、肛管鳞状细胞癌；转移性肛管癌；复发性肛管癌、复发性头颈癌；头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、卵巢癌、结肠癌、胃癌、晚期胃肠道癌、胃腺癌；胃食管接合处腺癌、骨肿瘤、软组织肉瘤；骨肉瘤、胸腺癌、尿路上皮癌、复发性梅克尔细胞癌；III期梅克尔细胞癌；IV期梅克尔细胞癌、骨髓增生异常综合征和塞扎里综合征。在一实施方案中，所述实体瘤是非淋巴瘤实体瘤。在一些实施方案中，所述实体瘤可以是多发性骨髓瘤。

[0024] 在各个实施方案中，所述药物-接头单元-抗体缀合物/抗体药物缀合物包含蛋白酶可切割的接头、酸可切割的接头或二硫化物接头。

[0025] 在各个实施方案中，所述蛋白酶可切割的接头包含硫醇反应性间隔子和二肽。在各个实施方案中，所述蛋白酶可切割的接头由硫醇反应性马来酰亚胺基己酰基间隔子、缬氨酸-瓜氨酸二肽和对氨基苄氧羰基间隔子组成。

[0026] 在各个实施方案中，所述酸可切割的接头是胍接头或季铵接头。

[0027] 在各个实施方案中，所述方法进一步包括向所述受试者给予化疗方案。

[0028] 在各个实施方案中，所述化疗方案基本由作为组合疗法的阿霉素、长春碱和达卡巴嗪 (AVD) 组成。在其他实施方案中，所述化疗方案基本由作为组合疗法的环磷酰胺、长春新碱和泼尼松 (CHP) 组成。

[0029] 在各个实施方案中，所述抗体药物缀合物的所述抗体是单克隆抗体。在各个实施方案中，所述抗体是人或人源化抗体。

[0030] 在各个实施方案中，所述抗体是抗CD30抗体并且所述抗CD30抗体药物缀合物包含：i) SEQ ID NO:4所示的重链CDR1、SEQ ID NO:6所示的重链CDR2、SEQ ID NO:8所示的重链CDR3链；和ii) SEQ ID NO:12所示的轻链CDR1、SEQ ID NO:14所示的轻链CDR2、和SEQ ID NO:16所示的轻链CDR13。

[0031] 在某些实施方案中，所述抗体是抗CD30抗体并且所述抗CD30抗体药物缀合物包含：i) 与SEQ ID NO:2所示的重链可变区至少85%相同的氨基酸序列，和ii) 与SEQ ID NO:10所示的轻链可变区至少85%相同的氨基酸序列。可以考虑的是，氨基酸可变区序列可以与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:10 90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0032] 在各个实施方案中，所述抗体是抗CD30抗体，并且所述抗体药物缀合物的所述抗CD30抗体是嵌合AC10抗体。

[0033] 在各个实施方案中，所述药物-接头单元-抗体缀合物/抗体药物缀合物包含一甲基澳瑞他汀E和蛋白酶可切割的接头。在各个实施方案中，所述蛋白酶可切割的接头包含硫醇反应性间隔子和二肽。在各个实施方案中，所述蛋白酶可切割的接头由硫醇反应性马来

酰亚胺基己酰基间隔子、缬氨酸-瓜氨酸二肽和对氨基苄氧羰基间隔子组成。

[0034] 在各个实施方案中,所述抗CD30抗体药物缀合物是维汀-本妥昔单抗。在各个实施方案中,将所述抗CD30抗体药物缀合物每3周给予一次。

[0035] 在各个实施方案中,所述抗CD30抗体药物缀合物的抗CD30抗体是单克隆抗CD30抗体。在各个实施方案中,所述抗CD30抗体药物缀合物的抗CD30抗体是嵌合AC10抗体。

[0036] 在各个实施方案中,所述抗体药物缀合物包含一甲基澳瑞他汀E和蛋白酶可切割的接头。在各个实施方案中,所述蛋白酶可切割的接头包含硫醇反应性间隔子和二肽。在各个实施方案中,所述蛋白酶可切割的接头由硫醇反应性马来酰亚胺基己酰基间隔子、缬氨酸-瓜氨酸二肽和对氨基苄氧羰基间隔子组成。

[0037] 在各个实施方案中,所述抗体是IgG抗体,优选IgG1或IgG2抗体。

[0038] 应当理解,本文所述的每个特征或实施方案、或组合是本发明的任何方面的非限制性的说明性例子,因此,意在与本文所述的任何其他特征或实施方案、或组合相结合。例如,在用诸如“一个实施方案”、“一些实施方案”、“某些实施方案”、“其他实施方案”、“特定示例性实施方案”和/或“另一个实施方案”的语言描述特征的情况下,这些类型的实施方案中的每一个是旨在与本文描述的任何其他特征或特征的组合相结合的特征的非限制性例子,而不必列出每一种可能的组合。此类特征或特征的组合适用于本发明的任何方面。在公开了落入范围内的值的例子的情况下,可以将任何这些例子视为范围的可能端点,可以考虑此类端点之间的任何和所有数值,并且可以设想上端点和下端点的任何和所有组合。

附图说明

[0039] 图1A-图1C显示了用MMAE处理后的ER应激蛋白诱导水平。蛋白质印迹指示蛋白质和磷酸化的水平(图1A)。图1B显示了ATP分泌水平,并且图1C显示了细胞的HMGB1释放水平。

[0040] 图2A-图2B示出了微管蛋白破坏剂MMAE、长春新碱和紫杉醇的ER应激诱导水平。图2A显示了通过CHOP萤光素酶测定得到的ER应激诱导,并且图2B显示了体内异种移植模型中的ER应激诱导。

[0041] 图3A-图3E显示了MiaPac2胰腺细胞(图3A,ATP)或PC-3前列腺肿瘤细胞(图3B,ATP)中响应于微管蛋白破坏剂MMAE、长春新碱和紫杉醇的ATP分泌和其他作用。用MMAE处理PC-3细胞引发了ER应激(IRE1和JNK磷酸化)(图3C)、ATP释放(图3D)和HMGB1释放(图3E)。

[0042] 图4A-图4D显示了处理对无胸腺裸鼠中移植的PC-3细胞和免疫细胞浸润的影响。图4A,树突细胞;图4B,巨噬细胞浸润;图4C,树突细胞抗原呈递;图4D,巨噬细胞抗原呈递。

[0043] 图5A-图5E显示了ELISA测量的处理对无胸腺裸鼠中移植的PC-3细胞的细胞因子/趋化因子产生的影响。图5A-图5C,分别为MIP-1a、IP-10和IL-1B的肿瘤内细胞因子水平;图5D-图5F,分别为IP-10、GCSF和IL-6的外周循环细胞因子水平。

[0044] 图6显示了用MMAE、长春新碱和紫杉醇处理后通过HeLa宫颈癌细胞的蛋白质印迹得到的ER应激诱导。

[0045] 图7A和图7B显示了在皮肤细胞实体瘤系中用MMAE、长春新碱和紫杉醇处理以组的形式(图7A)和按细胞类型拆分时(图7B)对ATP释放的影响。图7C显示了处理对皮肤癌细胞中HMGB1释放的影响。

[0046] 图8A-图8C显示了对A2058(图8A)、SK-MEL-5(图8B)和SK-MEL-28(图8C)皮肤细胞

进行MMAE处理导致2/3肿瘤细胞中的抗原呈递增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著。

[0047] 图9A-图9B显示了用MMAE、长春新碱、紫杉醇或抗p97-MMAE处理A2058(图9A)或SK-MEL-5(图9B)肿瘤细胞对所测试的细胞因子和趋化因子的影响。

[0048] 图10A-图10B显示了MMAE、长春新碱和紫杉醇对BxPC3(图10A)和HPAFII(图10B)细胞的抗原呈递增加的影响。图10C-图10D分别显示了BxPC-3细胞中的ATP分泌和HMGB-1释放。

[0049] 图11A-图11B显示了用MMAE、长春新碱,紫杉醇或抗p97-MMAE处理BxPC3(图11A)或HPAFII(图11B)肿瘤细胞后对所测试的细胞因子和趋化因子的影响。

[0050] 图12A-图12C显示了对Calu-1(图12A)、HT1080(图12B)和SK-MES-1(图12C)细胞进行MMAE、长春新碱、紫杉醇或p97-MMAE处理对在与巨噬细胞共培养后的抗原呈递水平的影响。图12D-图12F显示了Calu-1(图12D)、HT-1080(图12E)和SK-MES-1细胞(图12F)的HMGB-1释放。

[0051] 图13显示了用MMAE、长春新碱、紫杉醇或p97-MMAE处理后Calu-1细胞中细胞因子或趋化因子的诱导水平。

[0052] 图14A-图14B显示了MMAE、含MMAE的ADC(抗CD710KT9)、长春新碱和紫杉醇对MCF7细胞抗原呈递(图14A)和细胞因子/趋化因子产生(图14B)的影响。

[0053] 图15A-图15C显示了MMAE或含MMAE的ADC(Ladiratuzumab vedotin,SGN-LIV1A)对MCF-7乳腺癌细胞应激诱导(图15A)、ATP分泌(图15B)和HMGB1释放(图15C)的影响。

[0054] 图16A-图16B显示了MMAE、艾日布林(Eribulin)、紫杉醇、多西紫杉醇或SGN-LIV1A对MCF-7乳腺癌细胞应激诱导(图16A)和ATP分泌(图16B)的影响。

[0055] 图17A-图17E显示了含MMAE的ADC SGN-LIV1A或抗CD71-MMAE对无胸腺裸鼠中移植的MCF-7细胞中免疫活性的影响:图17A,树突细胞浸润;图17B,树突细胞抗原呈递;图17C,巨噬细胞抗原呈递;图17D,IP10水平;图17E,RANTES水平。

[0056] 图18显示了用MMAE、毒胡萝卜素或含MMAE的ADC(维汀-恩诺单抗(Enfortumab vedotin),ASG-22ME)处理的MDA-MB-468细胞的ATP分泌。

[0057] 图19A-图19G显示了用MMAE、微管溶素M(Tubulysin M)、长春新碱和紫杉醇处理的Hep3b(图19D)、Huh7(图19E)和JHH7(图19F-图19G)的ATP分泌水平(图19A, JHH7;图19B, Huh7;图19C, Hep3b)和共刺激水平(如通过CD86表达测量的, JHH7)和抗原呈递水平(如通过表达MHCII的细胞的频率测量的)。

[0058] 图20A-图20C显示了用MMAE、微管溶素M(Tubulysin M)、长春新碱或紫杉醇处理Hep3b(图20A)、Huh7(图20B)和JHH7(图20C)细胞对细胞因子和趋化因子水平的影响。

[0059] 图21A-图21B显示了MMAE、含MMAE的ADC(维汀-恩诺单抗,ASG-22ME)、长春新碱和紫杉醇对T-24膀胱肿瘤细胞的ATP分泌(图21A)、抗原呈递(图21B)和细胞因子/趋化因子的产生(图21C)的影响。

[0060] 图22A-图22B显示了MMAE、MMAE-ADC(SGN-CD48A)和对照对U-266细胞的影响。图22A显示了使用磷酸化JNK Thr183/Tyr185(pJNK)、PARP、ATF4、AT6、磷酸化IRE-1Ser274(pIRE-1)进行的蛋白质印迹分析;图22B显示了针对细胞毒性标记物HSP70和钙网蛋白的染色。

具体实施方式

[0061] 本公开文本提供了用于治疗实体瘤的方法,所述方法包括给予包含微管蛋白破坏剂的抗体药物缀合物。本文公开了微管蛋白破坏剂影响实体瘤细胞中的ER应激蛋白通路,并诱导ATP分泌和其他诱导免疫细胞迁移到肿瘤部位并降低肿瘤生长速度的ER应激现象。

定义

[0062] 除非另外定义,否则在此使用的所有技术和科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。下列参考文献为技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (第2版.1994);THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker编辑,1988);THE GLOSSARY OF GENETICS,第5版,R.Rieger等人(编辑),Springer Verlag (1991);以及Hale和Marham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991)。

[0063] 本文引用的每个出版物、专利申请、专利和其他参考文献在不与本公开文本相矛盾的情况下,均通过引用以其整体并入。

[0064] 如本文和所附权利要求所用,单数形式“一个/一种(a、an)”和“所述(the)”包括复数指代物,除非上下文另外明确地指示。因此,例如提及“一种衍生物”包括多个此类衍生物,并且提及“一个受试者”包括提及一个或多个受试者等。

[0065] 需要进一步理解的是,在使用术语“包括”描述各个实施方案的情况下,本领域技术人员将理解,在一些特定情况下,可以可替代地使用语言“基本由.....组成”或“由.....组成”来描述实施方案。

[0066] 除非另外定义,本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本公开文本所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管与本文所述的方法和材料类似或等同的那些方法和材料可以用于所公开的方法和物质组成的实践中,但本文描述了示例性的方法、装置和材料。

[0067] 如本文所用,“治疗有效量”或“对.....有效的量”是指有效产生对健康的预期有益作用的药剂的量。

[0068] 如本文所用,术语“实体瘤”是指通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性的或恶性的。不同类型的实体瘤以形成它们的细胞类型命名。实体瘤包括肉瘤和癌。肉瘤是指血管、骨骼、脂肪组织、韧带、淋巴管、肌肉或肌腱中的肿瘤。癌是指在上皮细胞中形成的肿瘤。可以考虑的是,实体瘤是非淋巴瘤实体瘤。

[0069] 术语“微管蛋白破坏剂”是指抑制微管功能的药剂。根据微管蛋白破坏剂的作用机制,可以将微管蛋白破坏剂分为两大类:促进微管蛋白聚合并稳定微管结构的药剂和抑制微管蛋白聚合并使微管结构失稳的药剂。具体实施方式中更详细地描述了示例性的微管蛋白破坏剂。

[0070] 如本文所用,术语“免疫细胞迁移”是指免疫细胞移动至肿瘤部位或从肿瘤部位移动,所述免疫细胞包括外周血单核细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞等。

[0071] 除非上下文另外指出,否则术语“处理”是指预防疾病进展或复发的治疗性处理和预防性措施,其中目的在于抑制或减缓(减轻)不希望的生理变化或障碍,诸如癌症的发生或扩散。有益或期望的临床结果包括但不限于症状缓解、疾病程度减轻、疾病状态稳定(即

不恶化)、疾病进展延迟或减缓、疾病状态改善或缓和、和无论是可检测的还是不可检测的缓解(无论是部分缓解还是全部缓解)。“治疗”还可以意指与未接受治疗的预期生存期相比,延长生存期。需要治疗的患者包括已经患有病症或障碍的患者,以及易于患有病症或障碍的患者。术语“治疗”包括以下任一项或全部:抑制肿瘤细胞、癌细胞或肿瘤的生长;抑制肿瘤细胞或癌细胞的复制、减轻总体肿瘤负荷或减少癌细胞的数量,以及改善与疾病相关的一种或多种症状。

[0072] “患者”或“受试者”的例子包括但不限于人、大鼠、小鼠、豚鼠、猴子、猪、山羊、牛、马、狗、猫、鸟和家禽。在示例性实施方案中,患者是人。

[0073] 如本文所用,术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适合与人类或动物的组织接触,而不产生过多毒性、刺激、过敏反应或者其他问题或并发症,与合理的效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。术语“药学上相容的成分”是指与抗体药物缀合物一起给予的药学上可接受的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。

[0074] 术语“特异性结合”和“特异性地结合”是指抗CD30抗体将以高度选择性的方式与其相应的靶标CD30反应,而不与大量的其他抗原反应。

[0075] 术语“单克隆抗体”是指源自单一细胞克隆(包括任何真核或原核细胞克隆、或噬菌体克隆)的抗体,而不是产生它的方法。因此,如本文所用,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。

[0076] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同”或“同一性百分比”是指在针对最大一致性(maximum correspondence)进行比较或比对时,两个或更多个序列或子序列相同,或者具有指定百分比的相同的核苷酸或氨基酸残基。为了确定同一性百分比,出于最佳比较目的比对所述序列(例如,可在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入空位,以实现与第二氨基酸或核酸序列的最佳比对)。然后比较相应的氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,那么分子在所述位置处是相同的。两个序列之间的同一性百分比是所述序列共有的相同位置的数量的函数(即,同一性% = 相同位置的数量/位置总数(例如,重叠位置) x 100)。在某些实施方案中,两个序列具有相同长度。

[0077] 在两个核酸或多肽的上下文中,术语“基本相同”是指两个或更多个序列或子序列具有至少70%或至少75%的同一性;更典型地,至少80%或至少85%的同一性;并且甚至更典型地,至少90%、至少95%或至少98%的同一性(例如,如使用下面列出的其中一种方法所确定的)。

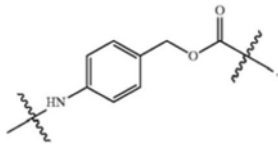
[0078] 两个序列之间的同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的优选的非限制性例子是Karlin和Altschul, 1990, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268中的算法,所述算法在Karlin和Altschul, 1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877中进行了修改。这种算法被并入Altschul等人, 1990, J.Mol.Biol. 215:403-410的NBLAST和XBLAST项目中。BLAST核苷酸搜索可用NBLAST程序来进行,得分=100,字长=12,以获得与编码目标蛋白质的核酸同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可用XBLAST程序来进行,得分=50,字长=3,以获得与目标蛋白质同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以如Altschul等人, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402中所描述的使用空位BLAST(Gapped BLAST)。可替代地,可使用

PSI-Blast来进行迭代搜索,其检测分子之间的远距离关系(同上)。用于比较序列的数学算法的另一个优选的非限制性例子是Myers和Miller,CABIOS(1989)的算法。这种算法已并入到ALIGN程序(2.0版)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。本领域中已知其他用于序列分析的算法,所述算法包括Torellis和Robotti,1994,Comput. Appl. Biosci. 10:3-5中描述的ADVANCE和ADAM;和Pearson和Lipman,1988,Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8中描述的FASTA。可替代地,可使用Higgins等人,1996,Methods Enzymol. 266:383-402中描述的CLUSTAL W算法进行蛋白质序列比对。

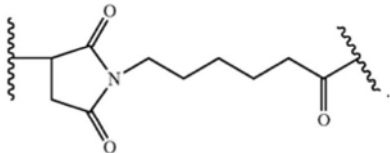
[0079] 缩写“MMAE”是指一甲基澳瑞他汀E。

[0080] 缩写“vc”和“val-cit”是指二肽缬氨酸-瓜氨酸。

[0081] 缩写“PAB”是指自杀式间隔子:



[0082] 缩写“MC”是指马来酰亚胺基己酰基延伸子:



[0083] “cAC10-MC-vc-PAB-MMAE”是指通过MC-vc-PAB接头与药物MMAE缀合的嵌合AC10抗体。

[0084] “抗CD30 vc-PAB-MMAE抗体-药物缀合物”是指经由包含二肽缬氨酸瓜氨酸和自杀式间隔子PAB的接头与药物MMAE缀合的抗CD30抗体,如美国专利号9,211,319的式(I)所示。

抗体

[0085] 本公开文本的抗体优选地是单克隆的,并且可以是多特异性抗体、人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、由Fab表达文库产生的片段以及上述任一者的抗原结合片段。如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即,包含免疫特异性结合CD30的抗原结合部位的分子。本公开文本的免疫球蛋白分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或子类。

[0086] 在本公开文本的某些实施方案中,抗体是本公开文本的人抗原结合抗体片段并且包括但不限于Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)和包含VL或VH结构域的片段。包含单链抗体的抗原结合抗体片段可以包含单独的或与以下全部或部分组合的一个或多个可变区:铰链区、CH1、CH2、CH3和CL结构域。本公开文本还包括抗原结合片段,所述抗原结合片段还包含一个或多个可变区与铰链区、CH1、CH2、CH3和CL结构域的任何组合。优选地,抗体是人、鼠(例如,小鼠和大鼠)、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡的抗体。如本文所用,“人”抗体包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白文库、从人B细胞或从一种或多种人免疫球蛋白的转基因动物分离的抗体,如下文以及例如Kucherlapati等人的美国专利号5,939,598中所述。

[0087] 本公开文本的抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性或具有更大的多特异性。

多特异性抗体可以对CD30的不同表位具有特异性,或者可以对CD30以及异源蛋白二者均具有特异性。参见例如,PCT公开W093/17715;WO 92/08802;WO 91/00360;WO 92/05793;Tutt等人,1991,J.Immunol.147:60 69;美国专利号4,474,893;4,714,681;4,925,648;5,573,920;5,601,819;Kostelny等人,1992,J.Immunol.148:1547 1553。

[0088] 本公开文本的抗体可以根据它们所包含的特定CDR来描述或详细说明。本公开文本涵盖包含重链或轻链可变结构域的抗体或其衍生物,所述可变结构域包含(a)三个CDR的组,其中所述CDR组来自所需的单克隆抗体,和(b)四个框架区的组,其中所述框架区组不同于所需的单克隆抗体中的框架区组,并且其中所述抗体或其衍生物免疫特异性地结合靶抗原。

[0089] 在各个实施方案中,所述抗体与癌细胞表面上的抗原结合。在各个实施方案中,所述抗体对CD30、CD19、CD70、CD71、CD20、CD52、CD133、EGFR、HER2、VEGF、VEGFR2、PD-1、PDL1、RANKL、CTLA-4、IL-6、SLAMF7、CD3、TNF- α 、PDGFR- α 、CD38、GD2、cCLB8、p97、结合素4、或EpCAM具有特异性。

[0090] 例如,在美国专利9,073,993中披露了考虑用于本文的抗CD19抗体。例如,在美国专利9,345,785中披露了考虑用于本文的抗CD70抗体。本领域中已知其他结合癌症相关抗原的抗体,所述抗体包括但不限于利妥昔单抗、阿达木单抗、阿仑单抗、曲妥珠单抗、阿仑单抗、替伊莫单抗、西妥昔单抗、贝伐单抗、帕尼单抗、奥法木单抗、易普利单抗、维汀-本妥昔单抗、帕妥珠单抗、曲妥珠单抗(Ado-trastuzumab emtansine)、奥滨尤妥珠单抗、雷莫芦单抗、派姆单抗、托西莫单抗、纳武单抗、地努图希单抗、达雷木单抗、妥珠单抗、艾洛珠单抗和阿特朱单抗。

[0091] 已通过用霍奇金病(HD)细胞系或纯化的CD30抗原对小鼠进行免疫产生了本领域已知的鼠抗CD30 mAb。最初称为C10(Bowen等人,1993,J.Immunol.151:5896 5906)的AC10的独特之处在于,这种抗CD30 mAb是针对人NK类细胞系YT制备的(Bowen等人,1993,J.Immunol.151:5896 5906)。最初,这种mAb的信号传导活性是通过下调CD28和CD45分子的细胞表面表达、上调细胞表面CD25表达、以及在C10与YT细胞结合后诱导同型粘附来证明的。AC10抗体的序列显示于SEQ ID NO:1-16和下表A中。另参见美国专利号7,090,843,将其通过引用并入本文,所述专利披露了嵌合AC10抗体。

[0092] 一方面,本公开文本的抗体免疫特异性地结合CD30并对恶性细胞发挥细胞抑制和细胞毒性作用。在某些实施方案中,本公开文本的抗体包含AC10的一个或多个CDR。

[0093] 在一具体实施方案中,本公开文本涵盖包含重链可变结构域的抗CD30抗体或其衍生物,所述可变结构域包含(a)三个CDR的组,其中所述CDR组包含SEQ ID NO:4、6、或8,和(b)四个框架区的组,其中所述框架区组不同于单克隆抗体AC10中的框架区组,并且其中所述抗体或其衍生物免疫特异性地结合CD30。

[0094] 在各个实施方案中,本发明涵盖包含轻链可变结构域的抗体或其衍生物,所述可变结构域包含(a)三个CDR的组,其中所述CDR组包含SEQ ID NO:12、14、或16,和(b)四个框架区的组,其中所述框架区组不同于单克隆抗体AC10中的框架区组,并且其中所述抗体或其衍生物免疫特异性地结合CD30。

[0095] 另外,本公开文本的抗体也可以根据其一级结构来描述或详细说明。与已知抗体(例如AC10)的可变区具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、

至少80%、至少85%、至少90%、至少95%和最优选至少98% (如使用本领域中已知的和本文所述的方法计算) 同一性的抗体也包括在本发明的方法中。本公开文本的抗体也可以根据其与其靶抗原的结合亲和力来描述或详细说明。优选的结合亲和力包括解离常数或Kd小于 $5 \times 10^2 \text{M}$ 、 10^{-2}M 、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 10^{-3}M 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10^{-4}M 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 10^{-5}M 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 10^{-6}M 、 $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 10^{-7}M 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 10^{-8}M 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 、 10^{-9}M 、 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 10^{-10}M 、 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、 10^{-11}M 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$ 、 10^{-12}M 、 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 10^{-13}M 、 $5 \times 10^{-14} \text{M}$ 、 10^{-14}M 、 $5 \times 10^{-15} \text{M}$ 、或 10^{-15}M 的那些。

[0096] 抗体还包括经修饰的衍生物,所述修饰即通过任何类型的分子与抗体共价附接,使得共价附接不会阻止抗体与靶抗原结合。例如但非限制性地,抗体衍生物包括已经例如通过以下方式修饰的抗体:糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白质连接等。可以通过已知技术进行多种化学修饰中的任何一种,所述已知技术包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,衍生物可以含有一种或多种非经典氨基酸。

[0097] 考虑用于本发明的抗体可以通过本领域已知的任何合适的方法来产生。

[0098] 本公开文本进一步提供了包含编码蛋白质的核苷酸序列的核酸,所述蛋白质包括但不限于本公开文本的蛋白质及其片段。本文考虑的核酸优选编码与CD30结合并对HD细胞发挥细胞毒性或细胞抑制作用的抗体的一个或多个CDR。本发明的示例性核酸包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、或SEQ ID NO:15。本发明的可变区核酸包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:9。(参见表A)。

表A

分子	核苷酸或氨基酸	SEQ ID NO
AC 10重链可变区	核苷酸	1
AC 10重链可变区	氨基酸	2
AC 10重链-CDR1 (H1)	核苷酸	3
AC 10重链-CDR1 (H1)	氨基酸	4
AC 10重链-CDR2 (H2)	核苷酸	5
AC 10重链-CDR2 (H2)	氨基酸	6
AC 10重链-CDR3 (H3)	核苷酸	7
AC 10重链-CDR3 (H3)	氨基酸	8
AC 10轻链可变区	核苷酸	9

AC 10轻链可变区	氨基酸	10
AC 10轻链-CDR1 (L1)	核苷酸	11
AC 10轻链-CDR1 (L1)	氨基酸	12
AC 10轻链-CDR2 (L2)	核苷酸	13
AC 10轻链-CDR2 (L2)	氨基酸	14
AC 10轻链-CDR3 (L3)	核苷酸	15
AC 10轻链-CDR3 (L3)	氨基酸	16

[0099] 在各个实施方案中,抗体是IgG抗体,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体,优选IgG1抗体。

抗体-药物缀合物

[0100] 本文考虑了包含微管蛋白破坏剂的药物-接头单元-抗体缀合物或抗体药物缀合物用于治疗实体瘤的用途。

[0101] 几种不同类别的微管蛋白破坏剂是本领域已知的,包括澳瑞他汀 (Auristatin)、微管溶素 (Tubulysin)、秋水仙碱、长春花生物碱、紫杉烷、念珠藻素、美登木素生物碱、哈密特林 (Hemiasterlin) 和其他微管蛋白破坏剂。

[0102] 澳瑞他汀是天然产物多拉他汀 (Dolastatin) 的衍生物。示例性的澳瑞他汀包括多拉他汀10、MMAE (N-甲基缬氨酸-缬氨酸-多拉异亮氨酸-多拉丙氨酸-去甲麻黄碱) 和MMAF (N-甲基缬氨酸-缬氨酸-多拉异亮氨酸-多拉丙氨酸-苯丙氨酸) 和AFP。WO 2015/057699描述了包含MMAE的聚乙二醇化的澳瑞他汀。美国专利9,345,785中披露了考虑使用的其他多拉司他汀衍生物,所述专利通过引用并入本文。

[0103] 微管溶素包括但不限于微管溶素D、微管溶素M、微管苯丙氨酸和微管酪氨酸。WO 2017-096311和WO 2016-040684描述了包含微管溶素M的微管溶素类似物。

[0104] 秋水仙碱包括但不限于秋水仙碱和CA-4。

[0105] 长春花生物碱包括但不限于长春碱 (VBL)、长春瑞滨 (VRL)、长春新碱 (VCR) 和长春地辛 (VDS)。

[0106] 紫杉烷包括但不限于紫杉醇和多西紫杉醇。

[0107] 念珠藻素包括但不限于念珠藻素1和念珠藻素52。

[0108] 美登木素生物碱包括但不限于美登素、美登醇、美登素类似物、DM1、DM3和DM4、以及安丝菌素2 (Ansamycin-2)。示例性的美登木素生物碱药物部分包括具有经修饰的芳环的那些,诸如:C-19-脱氯 (美国专利号4,256,746) (通过氢化铝锂还原安丝菌素P2制备的); C-20-羟基 (或C-20-脱甲基) +/-C-19-脱氯 (美国专利号US 4,361,650和US 4,307,016) (使用链霉菌或放线菌通过脱甲基制备的或使用LAH通过脱氯制备的); 和C-20-脱甲氧基、C-20-酰氧基 (—OCOR), +/-脱氯 (美国专利号4,294,757) (使用酰氯通过酰化制备的), 以及其他位置具有修饰的那些。

[0109] 美登木素生物碱药物部分还包括具有修饰的那些,例如:C-9-SH (美国专利号4,424,219) (通过美登木醇与H.sub.25或P.sub.2S.sub.5的反应制备的); C-14-烷氧基甲基

(脱甲氧基/CH.sub.2OR) (美国专利号4,331,598);C-14-羟甲基或酰氧基甲基(CH.sub.2OH或CH.sub.2OAc) (美国专利号4,450,254) (由Nocardia制备的);C-15-羟基/酰氧基(美国专利号4,364,866) (通过链霉菌转化美登木醇制备的);C-15-甲氧基(美国专利号4,313,946和4,315,929) (从Trewia nudiflora分离得到);C-18-N-脱甲基(美国专利号4,362,663和4,322,348) (通过链霉菌素对美登木醇的脱甲基化制备的);和4,5-脱氧(美国专利号4,371,533) (通过三氯化钛/LAH还原美登醇制备的)。对人乳腺癌细胞系SK-BR-3在体外测试了结合HER-2的TA.1-美登木素生物碱缀合物的细胞毒性(Chari等人,Cancer Research 52:127-131 (1992))。所述药物缀合物达到了类似于游离美登木素生物碱药物的细胞毒性程度,所述细胞毒性程度可以通过增加每个抗体分子中的美登木素生物碱分子数来增加。

[0110] 哈密特林包括但不限于哈密特林和HTI-286。

[0111] 其他微管蛋白破坏剂包括根薯酮内酯A、根薯酮内酯B、根薯酮内酯AF、根薯酮内酯AJ、根薯酮内酯AI-环氧化物、圆皮海绵内酯、埃博霉素A、埃博霉素B和莱利霉素。

[0112] 考虑用于本文的方法中的药物-接头单元-抗体或抗体药物缀合物包含接头单元。通常,ADC或ADC衍生物在治疗剂与抗体或其衍生物之间包含接头区域。接头可以是蛋白酶可切割的接头、酸可切割的接头、二硫化物接头和自稳定接头。在各个实施方案中,接头在细胞内条件下是可切割的,使得接头的切割在细胞内环境中从抗体释放治疗剂。

[0113] 例如,在一些实施方案中,接头可由存在于细胞内环境(例如,在溶酶体或核内体或胞膜窖中)中的切割剂切割。接头可以是例如由细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶)切割的肽接头。通常,肽接头为至少两个氨基酸长或至少三个氨基酸长。切割剂可以包括组织蛋白酶B和D和纤溶酶,所有这些都已知可水解二肽药物衍生物,导致在靶细胞内部释放活性药物(参见例如Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics83:67-123)。最典型的是可被表达抗原的细胞中存在的酶切割的肽接头。例如,可以使用可以被在癌组织中高表达的硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B切割的肽接头(例如,Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly接头)。例如在美国专利号6,214,345中描述了其他此类接头。在具体实施方案中,可由细胞内蛋白酶切割的肽接头是Val-Cit接头或Phe-Lys接头(参见例如美国专利号6,214,345,其描述了用val-cit接头合成阿霉素。使用细胞内蛋白水解释放治疗剂的一个优点是,药剂通常在缀合时衰减,并且缀合物的血清稳定性通常很高。另参见美国专利9,345,785。

[0114] 术语“细胞内切割的”和“细胞内切割”是指抗体药物缀合物在细胞内的代谢过程或反应,借此破坏药物部分(D)与抗体单元之间的共价附接(例如接头),形成游离的药物,或从细胞内部抗体上解离的缀合物的其他代谢物。因此,药物-接头单元-Ab缀合物的被切割的部分是细胞内代谢物。

[0115] 在各个实施方案中,可切割的接头是pH敏感的,即,在某些pH值下对水解敏感。通常,pH敏感的接头在酸性条件下可水解。例如,可以使用在溶酶体中可水解的酸不稳定接头(例如脘、半卡巴脘、胺苯硫脘、顺式-乌头酰胺、原酸酯、乙缩醛、缩酮等)。(参见例如,美国专利号5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker,1999,Pharm.Therapeutics83:67-123;Neville等人,1989,Biol.Chem.264:14653-14661。)此类接头在中性pH条件(诸如在血液中的那些)下相对稳定,但是在低于pH 5.5或5.0(与溶酶体近似的pH)时不稳定。在某些实施方案中,可水解的接头是硫醚接头(诸如,经由酰基脘键附

接至治疗剂的硫醚) (参见例如,美国专利号5,622,929)。

[0116] 在各个实施方案中,接头(例如二硫化物接头)在还原条件下是可切割的。已知多种二硫化物接头,包括例如可以使用以下物质形成的那些:SATA(N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)、SPDB和SMPT(参见例如Thorpe等人,1987,Cancer Res.47:5924-5931; Wawrzynczak等人,In Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimager y and Therapy of Cancer(C.W.Vogel编辑,Oxford U.Press,1987。另参见美国专利号4,880,935。)

[0117] 在各个实施方案中,接头是丙二酸酯接头(Johnson等人,1995,Anticancer Res.15:1387-93)、马来酰亚胺基苯甲酰基接头(Lau等人,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1299-1304)、或3'-N-酰胺类似物(Lau等人,1995,Bioorg-Med-Chem.3(10):1305-12)。

[0118] 在一些实施方案中,接头单元是不可切割的,并且药物是通过抗体降解释放的。(参见美国公开号2005/0238649)。

[0119] 在各个实施方案中,接头对细胞外环境基本不敏感。如本文所用,在接头的上下文中,“对细胞外环境基本不敏感”是指当细胞外环境(例如在血浆中)中存在ADC或ADC衍生物时,在ADC或ADC衍生物样品中,不超过约20%、通常不超过约15%、更通常不超过约10%、并且甚至更通常不超过约5%、不超过约3%、或者不超过约1%的接头被切割。可以例如通过以下方式确定接头是否对细胞外环境基本不敏感:用血浆培养(a)ADC或ADC衍生物(“ADC样品”)和(b)等摩尔量的未缀合的抗体或治疗剂(“对照样品”)二者预定时间段(例如2、4、8、16或24小时),然后对例如通过高效液相色谱法测得的ADC样品中存在的未缀合的抗体或治疗剂的量与对照样品中存在的量进行比较。

[0120] 在各个实施方案中,接头促进了细胞内化。在某些实施方案中,当与治疗剂缀合时(即,在如本文所述的ADC或ADC衍生物的接头-治疗剂部分的环境中),接头促进了细胞内化。在又其他实施方案中,当接头与药物和抗原特异性抗体或其衍生物二者缀合时(即,在如本文所述的ADC或ADC衍生物的环境中),接头促进细胞内化。

[0121] 在2003年7月31日提交的标题为“药物缀合物及其用于治疗癌症、自身免疫疾病或感染性疾病的用途”(“Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer,An Autoimmune Disease or an Infectious Disease”)的WO 2004010957中描述了可以与本发明的组合物和方法一起使用的各种接头。

[0122] 在各个实施方案中,所述蛋白酶可切割的接头包含硫醇反应性间隔子和二肽。在一些实施方案中,蛋白酶可切割的接头由硫醇反应性马来酰亚胺基己酰基间隔子、缬氨酸-瓜氨酸二肽和对氨基苄氧羰基间隔子组成。

[0123] 在各个实施方案中,所述酸可切割的接头是胍接头或季铵接头。

[0124] 在美国专利9,504,756中描述了包含马来酰亚胺基团的自稳定接头,所述专利通过引用并入本文。

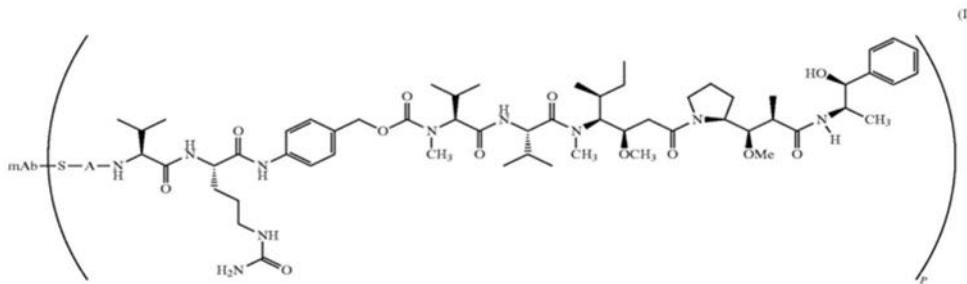
[0125] 在各个实施方案中,微管蛋白破坏剂诸如澳瑞他汀通过C末端羧基与接头缀合,所述C末端羧基与接头单元形成酰胺键,如美国专利9,463,252中所述,所述专利通过引用并入本文。在各个实施方案中,接头单元包含至少一种氨基酸。在美国专利8,992,932中披露

了N,N--二烷基溴瑞他汀的结合物-药物缀合物(ADC)。

[0126] 在各个实施方案中,接头还包含延伸子单元和/或氨基酸单元。在美国专利9,345,785和美国专利9,078,931中描述了示例性的延伸子单元和氨基酸单元,上述专利各自通过引用并入本文。

[0127] 在各个实施方案中,本文提供了包含抗CD30抗体的抗体药物缀合物的用途,所述抗CD30抗体通过vc-PAB接头与MMAE共价连接。抗体药物缀合物以药物组合物的形式递送至受试者。美国专利号9,211,319中描述了CD30抗体药物缀合物,所述专利通过引用并入本文。

[0128] 在各个实施方案中,本发明的药物-接头单元-抗体/抗体药物缀合物具有以下化学式:



或其药学上可接受的盐;其中:mAb是单克隆抗体(诸如抗CD30或抗CD19抗体),S是抗体的硫原子,A-是延伸子单元,p是约3至约5。

[0129] 载药率由p表示,即药物组合物中每个抗体的平均药物分子数。例如,如果p为约4,那么在将药物组合物中存在的所有抗体考虑进来的情况下平均载药率为约4。P的范围是约3至约5、更优选约3.6至约4.4、甚至更优选约3.8至约4.2。P可以是约3、约4或约5。在准备缀合反应中,每个抗体的平均药物量可以通过诸如质谱法、ELISA测定法和HPLC之类的常规方法表征。还可以根据p确定抗体药物缀合物的定量分布。在某些情况下,在p是一定值的情况,可以通过诸如反相HPLC或电泳法之类的方法,从具有其他载药率的抗体药物缀合物中分离、纯化和表征同质抗体药物缀合物。

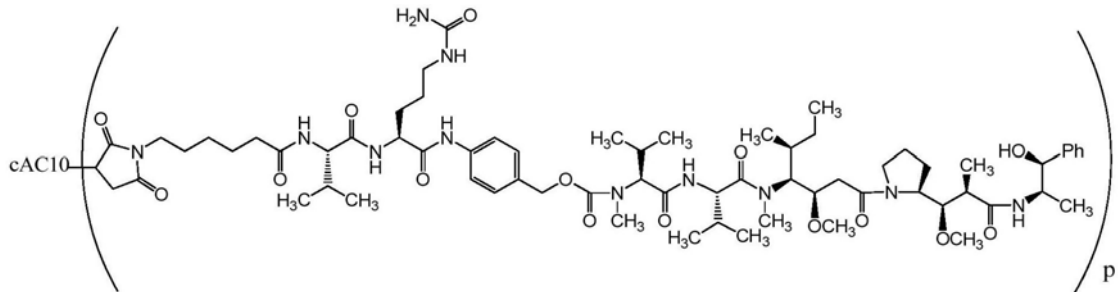
[0130] 延伸子单元(A)可以经由抗体的巯基基团将抗体单元与缬氨酸-瓜氨酸氨基酸单元连接。巯基基团可以例如通过还原抗原特异性抗体的链间二硫化物键而产生。例如,延伸子单元可以经由从还原抗体的链间二硫化物键产生的硫原子与抗体连接。在一些实施方案中,延伸子单元仅经由从还原抗体的链间二硫化物键产生的硫原子与抗体连接。在一些实施方案中,巯基基团可以通过使抗体的赖氨酸部分的氨基基团与2-亚氨基硫杂环戊烷(Traut's试剂)或其他巯基生成试剂反应而生成。在某些实施方案中,抗体是重组抗体并且被工程化为携带一种或多种赖氨酸。在某些其他实施方案中,重组抗体被工程化为携带其他的巯基基团,例如其他的半胱氨酸。

[0131] 在美国专利号6,884,869中描述了MMAE的合成和结构,将所述专利通过引用以其整体并入本文并用于所有目的。例如,在美国公开号2006/0074008和2009/0010945中描述了示例性的延伸子单元的合成和结构以及用于制备抗体药物缀合物的方法,上述公开的全部内容通过引用并入本文。

[0132] 在通过引用并入本文的美国专利9,211,319的式IIIa和式IIIb的方括号内描述了代表性的延伸子单元。

[0133] 在各个实施方案中,所述抗体药物缀合物包含一甲基澳瑞他汀E和蛋白酶可切割的接头。可以考虑的是,蛋白酶可切割的接头包含硫醇反应性间隔子和二肽。在各个实施方案中,所述蛋白酶可切割的接头由硫醇反应性马来酰亚胺基己酰基间隔子、缬氨酸-瓜氨酸二肽和对氨基苄氧羰基间隔子组成。

[0134] 在一优选实施方案中,抗体药物缀合物是维汀-本妥昔单抗,所述维汀-本妥昔单抗是具有以下结构的抗体药物缀合物:



[0135] 维汀-本妥昔单抗是一种CD30定向的抗体药物缀合物,由三部分组成:(i) 对人CD30特异的嵌合IgG1抗体cAC10,(ii) 微管破坏剂MMAE,和(iii) 将MMAE共价附接至cAC10的蛋白酶可切割的接头。药物与抗体的比率或载药率在维汀-本妥昔单抗的结构中以“p”表示,并且范围为1至8的整数值。药物组合物中维汀-本妥昔单抗的平均载药率为约4。

使用方法

[0136] 本文提供了用于治疗实体瘤的方法,所述方法包括给予包含微管蛋白破坏剂的抗体药物缀合物以治疗实体瘤。在各个实施方案中,可以考虑的是,本公开文本的方法通过在破坏微管功能后诱导ER应激通路来治疗实体瘤。在各个实施方案中,包含微管蛋白破坏剂的抗体药物缀合物药剂在实体瘤中诱导细胞凋亡。

[0137] 在各个实施方案中,包含微管蛋白破坏剂的抗体药物缀合物药剂增加免疫细胞向实体瘤的迁移。

[0138] 在实施例中证明,微管蛋白破坏剂增加了ER应激蛋白通路,诸如增加了ATP分泌并提高了高迁移率族1号(HMGB1)蛋白水平,这使得细胞凋亡增加,继而可以将免疫细胞引入细胞凋亡和细胞应激的部位。

[0139] 可以考虑的是,本文的方法减少了受试者体内的肿瘤大小或肿瘤负荷,和/或减少了受试者体内的转移。在各个实施方案中,受试者体内的肿瘤大小减少了约25%-50%、约40%-70%或约50%-90%或更多。在各个实施方案中,所述方法将肿瘤大小减小了10%、20%、30%或更多。在各个实施方案中,所述方法将肿瘤大小减小了10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0140] 可以考虑的是,本文的方法减轻了肿瘤负荷,并且在癌症已经得到缓解后,还可减少或预防肿瘤复发。

[0141] 本文所考虑的示例性实体瘤包括肺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃肠道癌、头颈癌、黑色素瘤、肉瘤、食道癌、胰腺癌、转移性胰腺癌、胰腺转移性腺癌、膀胱癌、胃癌、纤维化癌、神经胶质瘤、恶性神经胶质瘤、弥漫性内生性桥脑胶质瘤、复发性儿童脑肿瘤、肾细胞癌、透明细胞转移性肾细胞癌、肾癌、前列腺癌、转移性去势难治性前列腺癌、IV期前列腺癌、转移性黑色素瘤、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、复发性皮肤黑色素瘤、黑色素瘤脑转移、

IIIA期皮肤黑色素瘤;IIIB期皮肤黑色素瘤;IIIC期皮肤黑色素瘤;IV期皮肤黑色素瘤、头颈部恶性黑色素瘤、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状细胞非小细胞肺癌、乳腺癌、复发性转移性乳腺癌、肝细胞癌、里氏综合征;华氏巨球蛋白血症、成人胶质母细胞瘤;成人神经胶质肉瘤、复发性胶质母细胞瘤、复发性儿童横纹肌肉瘤、复发性尤因肉瘤/周围原始神经外胚层肿瘤、复发性神经母细胞瘤;复发性骨肉瘤、大肠癌、MSI阳性大肠癌;MSI阴性结直肠癌、鼻咽非角化癌;复发性鼻咽未分化细胞癌、宫颈腺癌;宫颈腺鳞癌;宫颈鳞状细胞癌;复发性宫颈癌;IVA期宫颈癌;IVB期宫颈癌、肛管鳞状细胞癌;转移性肛管癌;复发性肛管癌、复发性头颈癌;头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、卵巢癌、结肠癌、胃癌、晚期胃肠道癌、胃腺癌;胃食管接合处腺癌、骨肿瘤、软组织肉瘤;骨肉瘤、胸腺癌、尿路上皮癌、复发性梅克尔细胞癌;III期梅克尔细胞癌;IV期梅克尔细胞癌、骨髓增生异常综合征和塞扎里综合征。在一实施方案中,所述实体瘤是非淋巴瘤实体瘤。在一些实施方案中,所述实体瘤可以是多发性骨髓瘤。

[0142] 在各个实施方案中,ADC可以和一种或多种化疗药物一起给予。下表中公开了示例性的化学治疗剂,其可以单独使用或与一种或多种其他化学治疗剂组合使用,所述化学治疗剂又可以和抗体药物缀合物组合给予。

化学治疗剂

<p><u>烷化剂</u></p> <p><u>氮芥</u></p> <p>二氯甲基二乙胺</p> <p>环磷酰胺</p> <p>异环磷酰胺</p> <p>美法仑</p> <p>苯丁酸氮芥</p> <p><u>亚硝基脲</u></p> <p>卡莫斯汀 (BCNU)</p> <p>洛莫司汀 (CCNU)</p> <p>司莫司汀 (甲基-CCNU)</p> <p><u>乙亚胺/甲基-三聚氰胺</u></p> <p>三乙撑蜜胺 (TEM)</p> <p>三亚乙基硫代磷酰胺 (噻替派)</p> <p>六甲基三聚氰胺 (HMM, 六甲蜜胺)</p>	<p><u>天然产物</u></p> <p><u>抗有丝分裂药</u></p> <p><u>紫杉烷</u></p> <p>紫杉醇</p> <p>长春花生物碱</p> <p>长春碱 (VLB)</p> <p>长春新碱</p> <p>长春地辛</p> <p>长春瑞滨</p> <p>Taxotere® (多西他赛)</p> <p>雌莫司汀</p> <p>磷酸雌莫司汀</p> <p><u>表鬼臼毒素</u></p> <p>依托泊苷</p> <p>替尼泊苷</p> <p><u>抗生素</u></p>
---	--

<u>烷基磺酸盐类</u>	放线菌素D
白消安	道诺霉素 (红比-霉素)
	阿霉素 (亚德里亚-霉素)
	米托蒽醌
<u>三嗪类</u>	伊达比星
达卡巴嗪 (DTIC)	表柔比星
	戊柔比星
<u>抗代谢物</u>	博来霉素
<u>叶酸类似物</u>	丝普卡霉素 (光神霉素)
甲氨蝶呤	丝裂霉素C
三甲曲沙	放线菌素
培美曲塞	阿非迪霉素
(多靶抗叶酸剂)	
<u>嘧啶类似物</u>	<u>酶</u>
5-氟尿嘧啶	L-天冬酰胺酶
氟脱氧尿苷	L-精氨酸酶
吉西他滨	
胞嘧啶阿拉伯糖苷	<u>放射增敏剂</u>
(AraC, 阿糖胞苷)	甲硝唑
5-氟杂胞苷	米索硝唑
2,2'-二氟脱氧-胞苷	去甲基米索硝唑
	哌莫硝唑
<u>嘌呤类似物</u>	依他硝唑
6-巯嘌呤	尼莫拉唑
6-硫鸟嘌呤	RSU 1069
硫唑嘌呤	EO9
2'-脱氧助间型霉素	RB 6145
(喷司他丁)	SR4233
赤型羟基壬基-腺嘌呤 (EHNA)	烟酰胺
磷酸氟达拉滨	5-溴脱氧尿苷
	5-碘脱氧尿苷

2-氯脱氧腺苷 (克拉屈滨, 2-CdA)	溴脱氧胞苷
<u>I型拓扑异构酶抑制剂</u>	<u>其他药剂</u>
喜树碱	双膦酸盐类
拓扑替康	<u>RANKL抑制剂</u>
伊立替康	地诺单抗
<u>生物反应调节剂</u>	<u>铂类配合物</u>
G-CSF	顺铂
GM-CSF	卡铂
<u>分化剂</u>	奥沙利铂
视黄酸衍生物	葱二酮
<u>激素和拮抗剂</u>	米托葱醌
<u>肾上腺皮质类固醇/拮抗剂类</u>	<u>取代脲</u>
降钙素	羟基脲
泼尼松和等效物-	<u>甲基胍衍生物</u>
地塞米松	N-甲基胍 (MIH)
氨鲁米特 (Ainoglutethimide)	丙卡巴胍
<u>孕激素</u>	<u>肾上腺皮质抑制剂</u>
己酸羟孕酮	米托坦 (<i>o,p'</i> -DDD)
醋酸甲羟孕酮	氨鲁米特
醋酸甲地孕酮	<u>细胞因子</u>
<u>雌激素</u>	干扰素 (α 、 β 、 γ)
己烯雌酚	白介素-2
乙炔雌二醇/等同物	<u>光敏剂</u>

<u>抗雌激素</u>	血卟啉衍生物
他莫昔芬	光卟啉 (Photofrin®)
	苯并卟啉衍生物
<u>雄激素</u>	Npe6
丙酸睾酮	锡初卟啉 (SnET2)
氟甲睾酮/等同物	苯博瑞德a (pheoboride-a)
	细菌叶绿素-a
<u>抗雄激素</u>	茶酞菁
氟他胺	酞菁类
促性腺激素-释放激素	酞菁锌
激素类似物	
亮丙瑞林	<u>辐射</u>
	X光
<u>非甾体类抗雄激素</u>	紫外光
氟他胺	γ辐射
	可见光
<u>组蛋白脱乙酰基酶抑制剂</u>	红外辐射
伏立诺他	微波辐射
罗米地辛	

[0143] 在各个实施方案中,以周期为基础给予疗法,例如每周两次、每周一次、每2周一次、每3周一次、每月一次、每两个月一次或更长时间间隔。在相关的实施方案中,在示例性治疗中,以0.1至15mg/kg的剂量范围给予抗体药物缀合物。

[0144] 一方面,本公开文本的方法包括给予药物组合物的步骤。在某些实施方案中,药物组合物是无菌组合物。

[0145] 本公开文本的方法使用用于将治疗剂直接或间接引入哺乳动物受试者中的任何医学上可接受的方法进行,所述医学上可接受的方法包括但不限于注射、口服、鼻内、局部、透皮、肠胃外、吸入喷雾、阴道或直肠给予。如本文所用,术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌肉内和脑池内注射,以及导管或输注技术。也考虑通过皮内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射和/或特定部位外科植入的方式给予。

[0146] 在一实施方案中,在癌症部位或需要治疗的受影响的组织处,通过直接注射到所述部位进行给予,或者经由可以在内部递送配制品的缓送或缓释机制进行给予。例如,能够持续递送组合物(例如,可溶性多肽、抗体或小分子)的可生物降解的微球或胶囊或其他可生物降解的聚合物构型可以包括在本公开文本的植入癌症部位或其附近的配制品中。

[0147] 治疗组合物也可以在多个部位递送至患者。多次给予可以同时进行或者可以在一段时间内给予。在某些情况下,提供连续流动的治疗组合物是有益的。

[0148] 本公开文本中还考虑了给予多种药剂,诸如抗体组合物与本文所述的另一种药剂(包括但不限于化学治疗剂)相结合。

[0149] 给定剂量的抗体药物缀合物组合物的量可以根据要为其给予立法偶发的个体的体型以及所治疗的障碍的特征而变化。在示例性处理中,可能需要给予约1mg/天、5mg/天、10mg/天、20mg/天、50mg/天、75mg/天、100mg/天、150mg/天、200mg/天、250mg/天、500mg/天或1000mg/天。这些浓度可以作为单一剂型或作为多剂量给予。首先在动物模型中然后在临床测试中进行的标准剂量反应研究揭示了针对特定疾病状态和患者群体的最佳剂量。

[0150] 还考虑了一种包含任何前述抗体药物缀合物的组合物,或其在制备用于治疗实体瘤的药物中的用途。还考虑了注射器例如一次性使用或预填充的注射器,无菌密封的容器例如包含任何前述抗体或组合物的小瓶、瓶、容器和/或试剂盒或包装,这些可选地具有合适的使用说明书。

配制品

[0151] 可以使用各种递送系统给予药物-接头单元-抗体缀合物/抗体药物缀合物。在本公开文本的某些实施方案中,通过静脉内输注或通过皮下注射给予抗体药物缀合物。在一些实施方案中,通过30分钟、1小时或2小时的静脉内输注进行给予。

[0152] 抗体药物缀合化合物可以作为包含一种或多种药学上相容的成分的药物组合物来给予。例如,药物组合物通常包含一种或多种药学上可接受的载体,例如水基载体(例如无菌液体)。当静脉内给予药物组合物时,水是更典型的载体。

[0153] 如果需要,所述组合物还可以包含例如盐溶液、缓冲液、盐、非离子型洗涤剂和/或糖。合适的药物载体的例子由E.W.Martin描述于“Remington’s Pharmaceutical Sciences”中。所述配制品与给予方式相对应。

[0154] 例如,本公开文本提供了药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的抗体药物缀合物、缓冲剂,可选地冷冻保护剂,可选地填充剂,可选地盐,以及可选地表面活性剂。可以将其他药剂添加到组合物中。单一药剂可提供多种功效。例如,糖诸如海藻糖既可以用作冷冻保护剂,也可以用作填充剂。根据本发明,可以使用任何合适的药学上可接受的缓冲剂、表面活性剂、冷冻保护剂和填充剂。

[0155] 除了提供用于治疗血液学癌症的方法之外,本发明还提供了抗体药物缀合物配制品,所述抗体药物缀合物配制品包括经过冻干或其他蛋白质保存方法的药物缀合物配制品,以及未经冻干的抗体药物配制品。

[0156] 在一些实施方案中,抗体药物缀合物配制品包含:(i) 约1-25mg/ml、约3至约10mg/ml的抗体药物缀合物,或者约5mg/ml(例如,式I的抗体药物缀合物或其药学上可接受的盐);(ii) 约5-50mM,优选约10mM至约25mM的缓冲液,所述缓冲液选自柠檬酸盐、磷酸盐或组氨酸缓冲液或其组合,优选柠檬酸钠、磷酸钾、组氨酸、组氨酸盐酸盐或其组合;(iii) 约3%至约10%的蔗糖或海藻糖或其组合;(iv) 可选地约0.05至2mg/ml的表面活性剂,所述表面活性剂选自聚山梨酯20或聚山梨酯80或其组合;和(v) 水,其中组合物的pH为约5.3至约7,优选约6.6。

[0157] 在一些实施方案中,抗体药物缀合物配制品将包含:(i) 约1-25mg/ml、约3至约

10mg/ml、优选约5mg/ml的抗体药物缀合物，(ii) 约10mM至约25mM的缓冲液，所述缓冲液选自柠檬酸钠、磷酸钾、组氨酸、组氨酸盐酸盐或其组合，(iii) 约3%至约7%的海藻糖或蔗糖或其组合，可选地(iv) 约0.05至约1mg/ml的表面活性剂，所述表面活性剂选自聚山梨酯20或聚山梨酯80，和(v) 水，其中所述组合物的pH为约5.3至约7，优选约6.6。

[0158] 在一些实施方案中，抗体药物缀合物配制品将包含：(i) 约5mg/ml的抗体药物缀合物，(ii) 约10mM至约25mM的缓冲液，所述缓冲液选自柠檬酸钠、磷酸钾、组氨酸、组氨酸盐酸盐或其组合，(iii) 约3%至约7%的海藻糖，可选地(iv) 约0.05至约1mg/ml的表面活性剂，所述表面活性剂选自聚山梨酯20或聚山梨酯80，和(v) 水，其中所述组合物的pH为约5.3至约7，优选约6.6。

[0159] 上述任何配制品都可以以液体或冷冻形式储存，并且可以可选地进行保存过程。在一些实施方案中，将上述配制品冻干，即，对其进行冻干。在一些实施方案中，使上述配制品经历保存过程，例如冻干，并用合适的液体例如水重构。冻干是指组合物已在真空下冷冻干燥。冻干通常通过冷冻特定的配制品以使溶质与一种或多种溶剂分离来完成。然后通过升华(即，初次干燥)并接着进行解吸(即，二次干燥)来去除溶剂。

[0160] 本发明的配制品可以和本文所述的方法或用于治疗疾病的其他方法一起使用。抗体药物缀合物配制品可以在给予受试者之前进一步稀释。在一些实施方案中，在给予于受试者之前，用盐水稀释配制品并将其保持在IV袋或注射器中。因此，在一些实施方案中，用于治疗受试者的血液学癌症的方法包括：以周剂量向有需要的受试者给予包含式I的抗体药物缀合物的药物组合物，其中所述抗体药物缀合物的给予剂量为：每千克受试者体重约1.8mg或1.2mg至每千克受试者体重0.9mg，并且给予所述药物组合物至少三周；并且其中在给予受试者之前，所述抗体药物缀合物存在于包含以下各项的配制品中：(i) 约1-25mg/ml、优选约3至约10mg/ml抗体药物缀合物，(ii) 约5-50mM、优选约10mM至约25mM的缓冲液，所述缓冲液选自柠檬酸钠、磷酸钾、组氨酸、组氨酸盐酸盐或其组合，(iii) 约3%至约10%的蔗糖或海藻糖或其组合，(iv) 可选地约0.05至2mg/ml的表面活性剂，所述表面活性剂选自聚山梨酯20或聚山梨酯80或其组合；和(v) 水，其中组合物的pH为约5.3至约7，优选约6.6。

[0161] 可以考虑将化疗药物的配制品用于本文，所述化疗药物的配制品包括通常用于治疗癌症的阿霉素、长春碱、达卡巴嗪、环磷酰胺、长春新碱或泼尼松。例如，阿霉素、长春碱、达卡巴嗪、环磷酰胺、长春新碱和泼尼松是可商购的并且由美国FDA和其他监管机构批准用于治疗多种类型的癌症患者。

[0162] 本发明还提供了用于治疗实体瘤的试剂盒。所述试剂盒可以包含(a) 含有抗体药物缀合物的容器，以及可选地，包含一种或多种化疗药物的容器。如果需要的话，此类试剂盒还可以包括一种或多种各种常规药物试剂盒组分，诸如像具有一种或多种药学上可接受的载体的容器、另外的容器等，这对于本领域技术人员来说是清楚的。所述试剂盒中还可以包含作为插页或作为标签的印刷说明书，其指示待给予的组分的量、给予指南和/或混合组分的指导。

实施例

实施例1-微管蛋白破坏剂对实体瘤的影响

[0163] 评估微管蛋白破坏剂对实体瘤细胞系的影响。用MMAE处理癌细胞，并评估以下免疫原性细胞死亡(ICD)特征；ER应激、ATP分泌和细胞外HMGB1水平。

[0164] 用100nM MMAE处理MCF7乳腺癌细胞16小时,并将其收获于RIPA缓冲液中进行蛋白质印迹分析。用MMAE进行处理激活了ER应激反应的全部3个通路,如通过IRE1和eIF2a的磷酸化(图1A)以及全长ATF6的切割所表明的。严重的ER应激是使促吞噬信号在肿瘤细胞表面暴露的先决条件,并且是由MMAE引发的,如通过磷酸化的IRE1的JNK信号传导的激活和CHOP的表达所表明的。

[0165] ICD的诱导的特征还在于ATP和HMGB1的分泌。细胞外ATP作为强趋化信号,促进免疫细胞迁移到肿瘤部位。到达后,细胞外HMGB1通过各种促炎受体(TLR2、TLR4、RAGE)发出信号以激活抗原呈递细胞,从而促进肿瘤内的免疫活性。用MMAE处理MCF7细胞会导致ATP和HMGB1的分泌增加(图1B、图1C)。

[0166] 严重的ER应激导致CHOP上调并引发线粒体凋亡。MiaPaca2胰腺肿瘤细胞被工程化为表达CHOP驱动的萤光素酶报告系统(购自Signosis, Inc.),所述系统允许对严重的ER应激进行可量化的监测。用MMAE、长春新碱和紫杉醇处理MiaPaca-CHOP-萤光素酶细胞,并在16小时后测定萤光素酶表达。用MMAE和长春新碱处理展现出代表严重ER应激诱导的萤光素酶信号的剂量依赖性增加,而紫杉醇在峰值剂量下诱导了适度的萤光素酶信号(图2A)。

[0167] 将MiaPaca-CHOP萤光素酶细胞皮下移植到NOD/SCID/ γ 链缺陷小鼠中。用MMAE(0.36mg/kg)、长春新碱(1.0mg/kg)和紫杉醇(10mg/kg)在瘤内处理皮下肿瘤,并随时间监测肿瘤萤光素酶信号。如所证明的,用MMAE和长春新碱处理后在植入的肿瘤中迅速引发了严重的ER应激,而紫杉醇没有诱导ER应激(图2B)。

[0168] 用MMAE、长春新碱或紫杉醇处理MiaPaca2细胞。处理16小时后收集上清液,并分析ATP的分泌。用MMAE进行处理引发了大量的ATP分泌,而用紫杉醇处理产生适度的ATP分泌(图3A)。

[0169] 将PC-3前列腺肿瘤细胞也用MMAE、长春新碱或紫杉醇进行处理。处理16小时后收集上清液,并分析ATP的分泌。用MMAE和长春新碱进行处理引发了大量的ATP分泌,而紫杉醇处理产生适度的ATP分泌(图3B)。将PC-3细胞用含MMAE的ADC(SGN-LIV1A)或MMAE处理24小时,并收获在RIPA缓冲液中以进行蛋白质印迹分析(图3C)。用MMAE进行处理引发了ER应激(IRE1和JNK磷酸化)以及ATP和HMGB1的释放,导致诱导免疫原性细胞死亡(图3D-图3E)。

[0170] 无胸腺裸鼠皮下植入PC-3细胞。达到200立方毫米后,小鼠接受腹膜内单一剂量的含MMAE的ADC(SGN-LIV1A或抗CD71-MMAE)。ADC处理后8天,切除肿瘤并通过流式细胞术评估免疫细胞浸润和组成。用MMAE-ADC处理的肿瘤展现出免疫细胞浸润增加,这进一步表明增强的激活(图4A-图4D)。

[0171] 在另一项研究中,无胸腺裸鼠皮下植入PC-3细胞。达到200立方毫米后,小鼠接受腹膜内单一剂量的含MMAE的ADC(SGN-LIV1A或抗CD71-MMAE)。ADC处理后8天,切除肿瘤并在RIPA缓冲液中进行匀浆化,并通过ELISA测量细胞因子/趋化因子产生。还通过ELISA测量了血清中的外周细胞因子水平。除了肿瘤内免疫细胞得到增加外,还增强了免疫活性,如通过这些免疫细胞的细胞因子和趋化因子产生的增加所证明的(图5A-图5F)。

[0172] 用1000nM或100nM MMAE、长春新碱或紫杉醇处理HeLa宫颈癌细胞16小时,并收获以进行蛋白质印迹分析。每种处理都激活了ER应激反应,如通过IRE1的磷酸化所表明的。但是,MMAE引发了更严重的ER应激反应,这种反应在剂量降低的情况下持续,如通过JNK的进一步磷酸化所证明的。在紫杉醇剂量较低的情况下未见显著的JNK磷酸化(图6)。

[0173] 用MMAE、长春新碱和紫杉醇处理皮肤肿瘤细胞系A2058、SK-MEL-5和SK-MEL-28、Calu-1(肺)、HT-1080(纤维肉瘤)、SK-MES-1(肺)和BXPC3(胰腺)细胞。处理17小时后收集上清液,并分析ATP的分泌。用MMAE和长春新碱进行处理在大多数被测细胞系(6/7)中引发了ATP分泌,并且与紫杉醇相比,能够在所有被测细胞系中诱导更显著的反应(图7A)。用MMAE进行处理从A2058、SK-MEL-5、SK-MEL-28(皮肤)所有3种细胞系中引发了有效的ATP分泌,而紫杉醇仅从3种细胞系中的1种引发ATP分泌(图7B)。

[0174] 用含MMAE的ADC(例如抗p97-MMAE或抗CD71-MMAE)或紫杉醇处理A2058、SK-MEL-5、SK-MEL-28(皮肤)、Calu-1、HT-1080、SK-MES-1(肺)以及BXPC3和HPAFII(胰腺)细胞。处理一夜后收集上清液,并通过ELISA分析HMGB1的释放。用含MMAE的ADC或紫杉醇进行处理在大多数被测细胞系(5/7)中引发了HMGB1释放,并且与紫杉醇相比,能够在所有被测细胞系中诱导更显著的反应。用抗CD71-MMAE进行处理从3种皮肤细胞系中的2种引发了有效的HMGB1释放。参见例如图7C和以下附加描述。

[0175] 在另外的实验中,将用MMAE处理的细胞系与从健康供体的外周血单核细胞(PBMC)衍生的免疫细胞共培养或“进料”至所述从健康供体的外周血单核细胞(PBMC)衍生的免疫细胞,并评估处理后的细胞对免疫细胞功能的影响。

实施例2-微管蛋白破坏剂的免疫细胞激活分析

[0176] 为了确定微管蛋白破坏剂对肿瘤细胞诱导免疫细胞激活能力的影响,将用微管蛋白破坏剂处理的且在经历ER应激和潜在细胞死亡的过程中的细胞进料至抗原呈递细胞,并测量对APC诱导的影响。

[0177] 通过将来自2名健康供体的PBMC粘附到细胞培养级塑料上,从PBMC中富集巨噬细胞。24小时后去除未粘附的细胞,保留富集了巨噬细胞的细胞群体。

[0178] 用MMAE、长春新碱和紫杉醇处理A2058、SK-MEL-5和SK-MEL-28(皮肤)细胞24小时。洗涤并收获细胞,并且之后将其与以上制备的富集的巨噬细胞共培养。共培养4天后收获巨噬细胞,并通过流式细胞术进行免疫激活测定。对抗原呈递水平(通过表达MHCII的细胞的频率测得)进行量化,并针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。对肿瘤细胞进行MMAE处理导致2/3的肿瘤细胞系中的抗原呈递的增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图8A-图8C)。

[0179] 24小时后,收获来自巨噬细胞与垂死的A2058和SK-MEL-5肿瘤细胞的共培养物的上清液,并通过ELISA测定细胞因子和趋化因子的产生水平,并针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。用MMAE或含MMAE的ADC(抗p97-MMAE)处理肿瘤细胞导致所指示的细胞因子和趋化因子增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图9A-图9B)。与未处理的细胞相比,A2058细胞显示GM-CSF、IFN γ 、MCP-3、IL-1RA、IL-7、MIP-1a、MIP-1b升高,而SK-MEL-5细胞显示GM-CSF、INF α 2、IFN γ 、MCP-3、IL-12p70、IL-17A、IL-1a、IL-1b、MCP-1、MIP-1a、MIP-1b升高。

实施例3

用微管蛋白破坏剂处理后抗原呈递的另外的分析

[0180] 通过将来自2名健康供体的PBMC粘附到细胞培养级塑料上,从PBMC中富集巨噬细胞。24小时后去除未粘附的细胞,保留富集了巨噬细胞的细胞群体。

[0181] 用MMAE、长春新碱和紫杉醇处理BxPC3和HPAFII(胰腺)细胞24小时。洗涤并收获细

胞,并且之后将其与以上制备的富集的巨噬细胞共培养。共培养4天后收获巨噬细胞,并通过流式细胞术进行免疫激活测定。对抗原呈递水平(通过表达MHCII的细胞的频率测得)进行量化,并针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。MMAE和长春新碱对肿瘤细胞的处理导致了1/2肿瘤细胞系中的抗原呈递增加,而用紫杉醇进行的处理没有导致巨噬细胞抗原呈递的变化(图10A-图10B)。将BxPC-3细胞用MMAE、长春新碱和紫杉醇处理17小时,并分析ATP分泌。用所有3种微管蛋白结合剂进行的处理均能引发同等水平的ATP分泌(图10C)。

[0182] 用紫杉醇或含MMAE的ADC(抗p97-MMAE)处理24小时后,通过ELISA评估了BxPC-3细胞的HMGB1释放。与紫杉醇处理相比,MMAE驱动力的细胞死亡导致HMGB1释放适度地增加(图10D)。

[0183] 24小时后,收获来自巨噬细胞与垂死的肿瘤细胞的共培养物的上清液,并通过ELISA测定细胞因子和趋化因子的产生水平,并针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。用MMAE或抗p97-MMAE处理肿瘤细胞导致所指示的细胞因子和趋化因子增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图11A-图11B)。

[0184] 与上述巨噬细胞共培养后,测试其他细胞系[Calu-1(肺)、HT1080(纤维肉瘤)和SK-MES-1(皮肤)]的抗原呈递水平。对共刺激水平(通过表达CD86的巨噬细胞的频率测得,Calu-1)或抗原呈递水平(通过表达MHCII的巨噬细胞的频率测得,HT1080和SK-MES-1)进行量化,并针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。对肿瘤细胞进行MMAE处理后导致3/3的肿瘤细胞系中的免疫激活增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图12A-图12C)。Calu-1、HT-1080和SK-MES-1细胞用含MMAE的ADC(抗p97-MMAE)、长春新碱或紫杉醇处理24小时,并通过ELISA分析HMGB1的释放。用抗p97-MMAE进行处理从3种细胞系中的2种引发了有效的HMGB1释放(图12D-图12F)。

[0185] 24小时后,收获来自巨噬细胞与垂死的肿瘤细胞的共培养物的上清液,并通过ELISA测定细胞因子和趋化因子的产生水平,并如上所述针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。用MMAE或含MMAE的ADC处理Calu-1细胞导致所指示的细胞因子和趋化因子增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图13)。

[0186] 将MCF7(三阴性乳腺癌)细胞用MMAE、含MMAE的ADC(抗CD71 OKT9-1006)、长春新碱和紫杉醇处理24小时。洗涤并收获细胞,并且之后将其与以上制备的富集的巨噬细胞共培养。共培养4天后收获巨噬细胞,并通过流式细胞术进行免疫激活测定。用MMAE或含MMAE的ADC处理肿瘤细胞导致巨噬细胞抗原呈递增加(通过表达MHCII的巨噬细胞的频率测得),所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图14A)。24小时后,收获来自巨噬细胞与垂死的MCF7细胞的共培养物的上清液,并通过ELISA测定细胞因子和趋化因子的产生水平,并针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。用MMAE或含MMAE的ADC处理MCF7细胞导致所指示的细胞因子和趋化因子增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图14B)。

[0187] 将MCF7细胞用MMAE和含MMAE的ADC(SGN-LIV1A)处理16小时,并收获在RIPA缓冲液中以进行蛋白质印迹分析。用MMAE进行处理激活了ER应激反应的全部3个通路,如通过IRE1和eIF2a的磷酸化以及全长ATF6的切割所表明的。严重的ER应激是使促吞噬信号在肿瘤细胞表面暴露的先决条件,并且是由MMAE引发的,如通过磷酸化的IRE1的JNK信号传导的激活和CHOP的表达所表明的(图15A)。ICD的诱导的特征还在于ATP和HMGB1的分泌。细胞外ATP作

为趋化信号,促进免疫细胞迁移到肿瘤部位。到达后,细胞外HMGB1通过各种促炎受体(TLR2、TLR4、RAGE)发出信号以激活抗原呈递细胞,从而促进肿瘤内的免疫活性。用MMAE和SGN-LIV1A处理MCF7细胞会导致ATP和HMGB1的分泌增加(图15B-图15C)。

[0188] 用SGN-LIV1A或艾日布林处理MCF7会引发严重的ER应激(IRE1和JNK的磷酸化),而紫杉醇和多西紫杉醇不会引发JNK磷酸化。用SGN-LIV1A或艾日布林处理48小时后,ATP分泌也明显增加,这表明由于破坏微管导致了强烈的ICD诱导,而紫杉醇和多西紫杉醇均未引发ATP分泌(图16A-图16B)。

[0189] SCID小鼠皮下植入MCF7细胞。达到200立方毫米后,小鼠接受腹膜内单一剂量的含MMAE的ADC(SGN-LIV1A或抗CD71-MMAE)。ADC处理后8天,切除肿瘤并通过流式细胞术评估免疫细胞组成。由于MMAE驱动力的细胞死亡和免疫原性,MMAE-ADC处理的肿瘤显示出由肿瘤浸润的免疫细胞导致的免疫激活水平升高(图17A-图17E)。

[0190] 用MMAE或含MMAE的ADC(ASG-22ME)处理MDA-MB-468细胞。处理48小时后收集上清液,并分析ATP的分泌。用MMAE或ASG-22ME进行处理引发了与毒胡萝卜素(一种已知的ER应激和自噬诱导剂)相当的显著的ATP分泌(图18)。

[0191] 用MMAE、微管溶素M、长春新碱和紫杉醇处理肝肿瘤细胞系Hep3b、Huh7和JHH7细胞24小时,并分析ATP分泌。用MMAE或微管溶素M进行处理从3种细胞系中的3种引发了有效的ATP分泌(图19A-图19C)。洗涤并收获细胞,并且之后将其与如上制备的富集的巨噬细胞共培养。共培养4天后收获巨噬细胞,并通过流式细胞术进行免疫激活测定。对共刺激水平(通过CD86表达测得,JHH7)和抗原呈递水平(通过表达MHCII的细胞的频率测得,Hep3b、Huh7和JHH7)进行量化,并针对与用紫杉醇处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。对肿瘤细胞进行MMAE处理导致3/3的肿瘤细胞系中的免疫激活增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图19D-图19G)。24小时后,收获来自巨噬细胞与垂死的肝肿瘤细胞的共培养物的上清液,并通过ELISA测定细胞因子和趋化因子的产生水平,并针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。用MMAE或微管溶素M处理Hep3b、Huh7、和JHH7细胞导致所指示的细胞因子和趋化因子增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图20A-图20C)。

[0192] 将T-24(膀胱)细胞用MMAE和含MMAE的ADC(ASG-22ME)处理48小时,并分析ATP分泌。用MMAE或ASG-22ME进行的处理引发的强烈的ATP分泌(图21A)。将T-24细胞也用MMAE、含MMAE的ADC(ASG22ME,维汀-恩诺单抗)、长春新碱和紫杉醇处理24小时。洗涤并收获细胞,并且之后将其与如上的富集的巨噬细胞共培养。共培养4天后收获巨噬细胞,并通过流式细胞术进行免疫激活测定。对抗原呈递水平(通过表达MHCII的巨噬细胞的频率测得)进行量化,并针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。用MMAE或含MMAE的ADC处理T-24细胞导致巨噬细胞抗原呈递增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图21B)。24小时后,收获来自巨噬细胞与垂死的T-24肿瘤细胞的共培养物的上清液,并通过ELISA测定细胞因子和趋化因子的产生水平,并针对与未处理的肿瘤细胞共培养的巨噬细胞进行归一化。用MMAE或含MMAE的ADC处理T-24细胞导致所指示的细胞因子和趋化因子增加,所述增加比紫杉醇导致的增加更显著(图21C)。

[0193] 用游离的MMAE(492nM)、含MMAE的ADC(SGN-CD48A,10ng/ml)和非结合的MMAE-ADC(10ng/ml)处理U-266多发性骨髓瘤细胞24和48小时。在每个时间点收获细胞并制备全细胞裂解物。将每个样品的裂解物在SDS-Page上处理并转移到硝酸纤维素膜上。使用磷酸化JNK

Thr183/Tyr185 (pJNK)、PARP、ATF4、AT6、磷酸化IRE-1Ser274 (pIRE-1) 进行蛋白质印迹分析。 β -肌动蛋白用作负载对照。多发性骨髓瘤细胞(例如U-266)展现出较高的内源性ER应激水平,如通过检测到的基础pJNK和pIRE-1染色所表明的(图22A)。然而,用MMAE和SGN-CD48A进行的处理进一步增加了ER应激反应,如通过ATF4表达的升高和JNK的磷酸化所表明的。PARP(低分子量带)的切割是正在凋亡的细胞的指示物。重要的是,MMAE在U-266细胞中诱导ER应激足以引发ICD的标记物。

[0194] 用游离的MMAE (492nM)、含MMAE的ADC (SGN-CD48A, 10ng/ml) 和非结合性MMAE-ADC (10ng/ml) 处理U-266细胞48小时,持续48小时。收获细胞,在流动的缓冲液中洗涤,并且之后将其针对膜联蛋白V(细胞凋亡的标记物)和HSP70进行染色。将细胞也用膜联蛋白V和钙网蛋白染色。在两种情况下,均选择对膜联蛋白V呈阴性的细胞,并确定对HSP70或钙网蛋白呈阳性的群体百分比。在死亡前用SGN-CD48A和游离的MMAE处理后,细胞表面上的ICD标记物的百分比明显增加(图22B),这提供了有效的促吞噬信号以增强抗肿瘤免疫力。

[0195] 本领域技术人员预期会想到对以上示例性实施例所述的本发明的诸多修改和变化。因此,本发明应仅受到所附权利要求书中出现的此类限制。

序列表

<110> 西雅图基因公司

<120> 包含微管蛋白破坏剂的抗体药物缀合物用于治疗实体瘤的用途

<130> 32850/52785

<160> 16

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (351)

<400> 1

```

cag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag gtg gtg aag cct ggg gct 48
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act gac tac 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
           20           25           30
tat ata acc tgg gtg aag cag aag cct gga cag gga ctt gag tgg att 144
Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc 192
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60
aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aca tcc tcc agc aca gcc ttc 240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65           70           75           80
atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt 288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
           85           90           95
gcg aac tat ggt aac tac tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act cag 336
Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
           100          105          110
gtc act gtc tct gca 351
Val Thr Val Ser Ala
           115

```

<210> 2
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 2
 Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ala
 115
 <210> 3
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 3
 gactactata taacc 15
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 4
 Asp Tyr Tyr Ile Thr
 1 5
 <210> 5
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 5

tggatttatc ctggaagcgg taatactaag tacaatgaga agttcaagg c 51
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 6
 Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 7
 tatggtaact actggtttgc ttac 24
 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <400> 8
 Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 9
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (333)
 <400> 9
 gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 cag agg gcc acc atc tcc tgc aag gcc agc caa agt gtt gat ttt gat 96
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
 20 25 30
 ggt gat agt tat atg aac tgg tac caa cag aaa cca gga cag cca ccc 144
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

aaa gtc ctc atc tat gct gca tcc aat cta gaa tct ggg atc cca gcc 192
 Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag caa agt aat 288
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

gag gat ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 333
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 10

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
 20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 11

aaggccagcc aaagtgtga ttttgatggt gatagttata tgaac 45

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 12

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 13

gctgcatcca atctagaatc t 21

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 14

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 15

cagcaaagta atgaggatcc gtggacg 27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 16

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

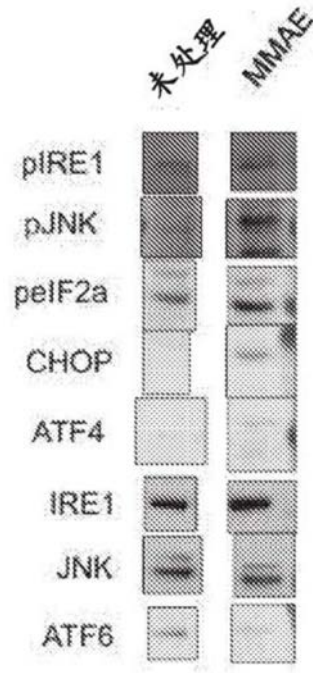


图1A

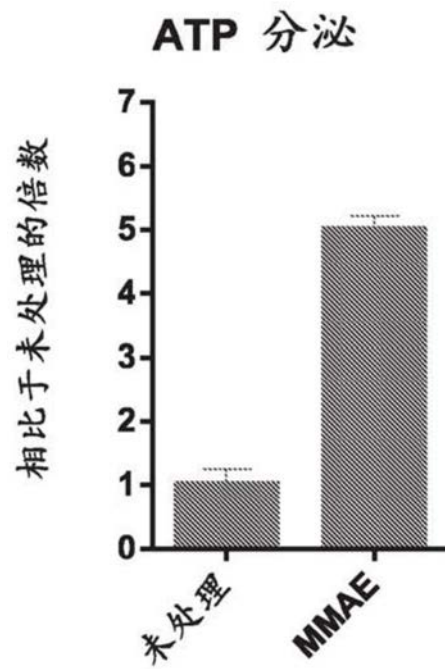


图1B

HMGB1 释放

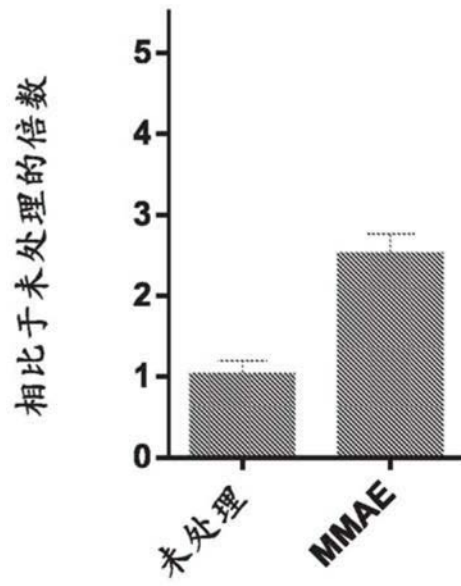


图1C

ER应激诱导-CHOP荧光素酶

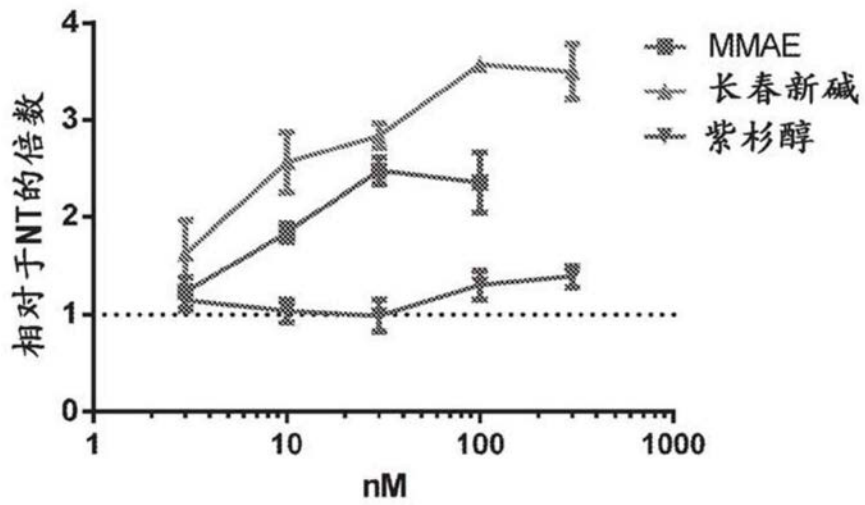


图2A

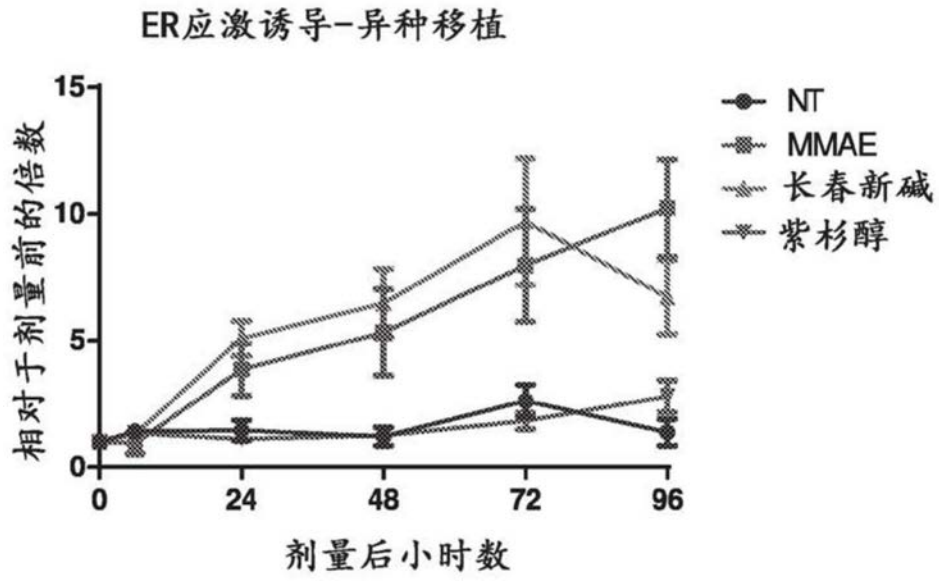


图2B

MiaPac2 细胞

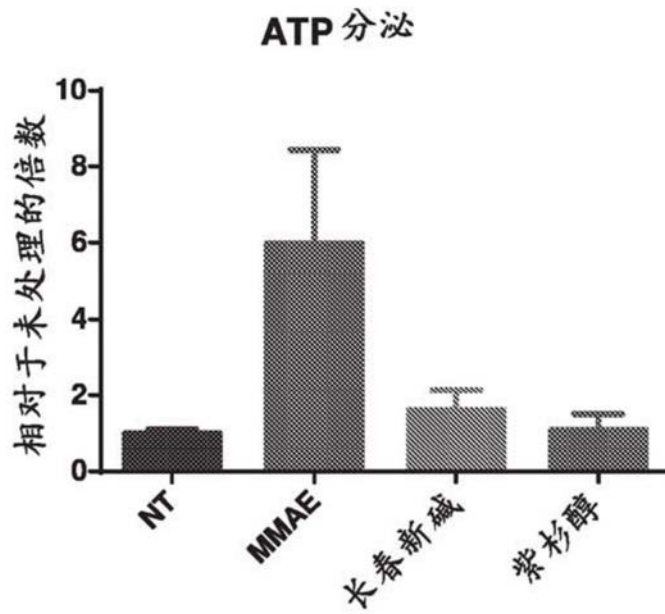


图3A

PC-3 细胞

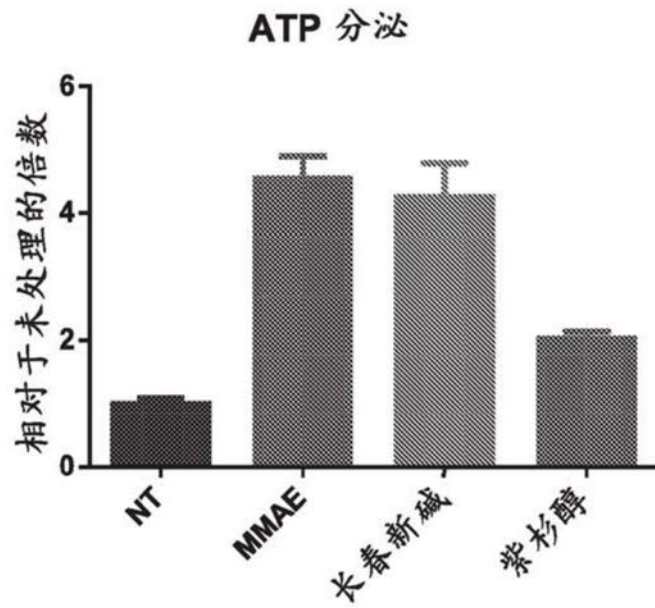


图3B

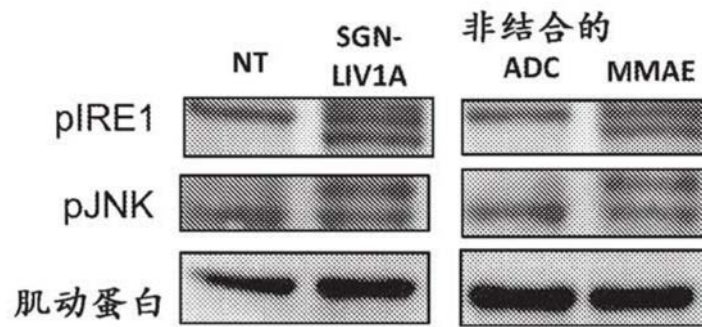


图3C

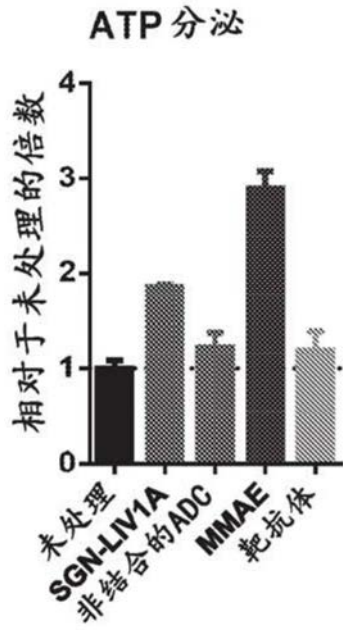


图3D

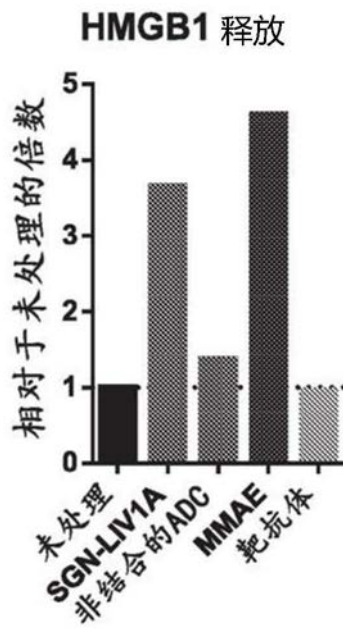


图3E

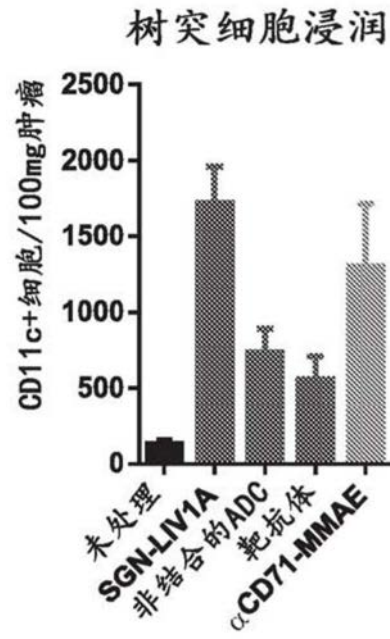


图4A

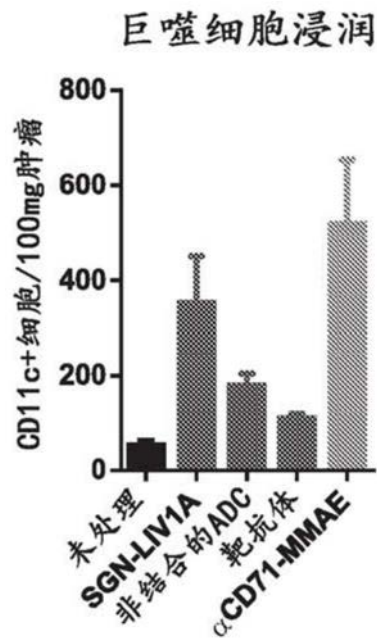


图4B

树突细胞抗原呈递

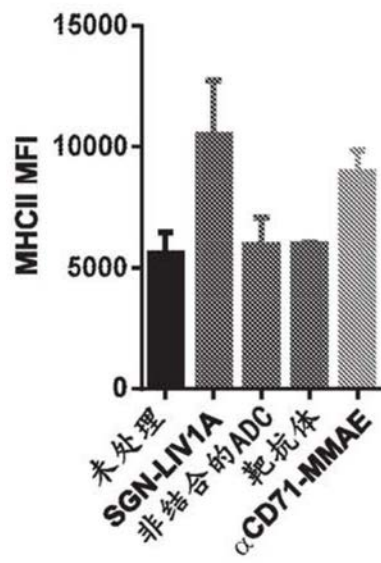


图4C

巨噬细胞抗原呈递

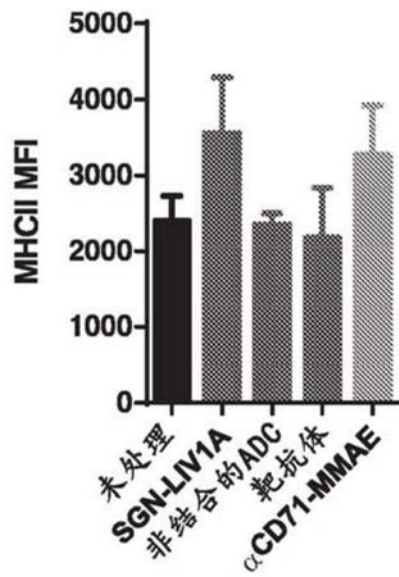


图4D

瘤内细胞因子水平

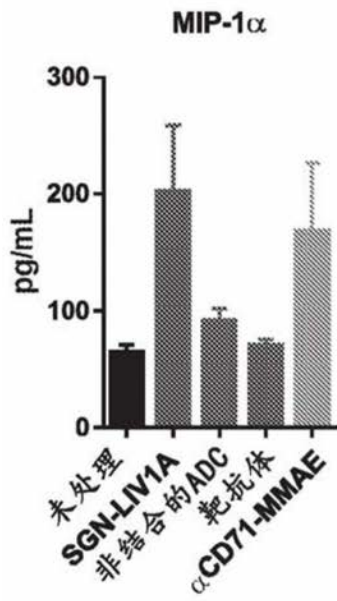


图5A

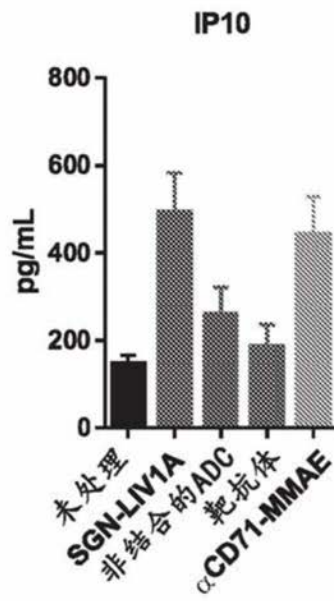


图5B

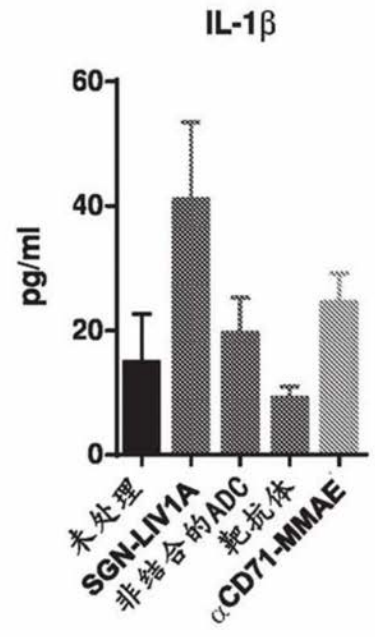


图5C

外周循环细胞因子水平

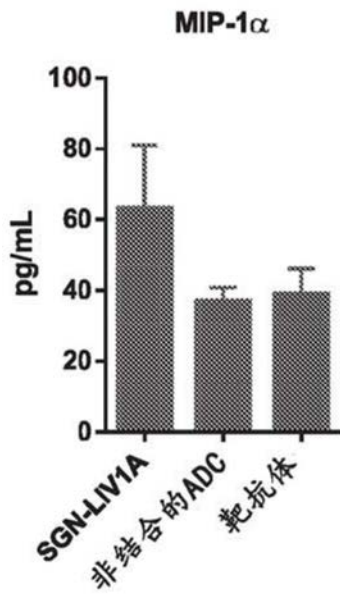


图5D

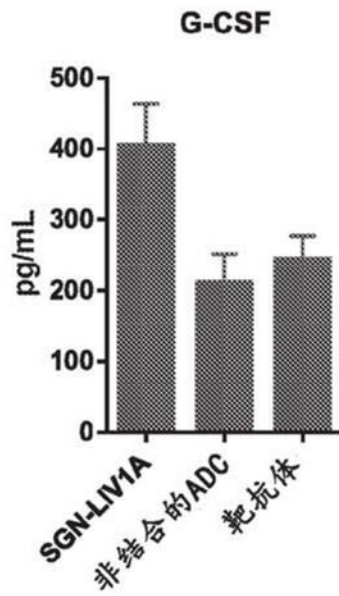


图5E

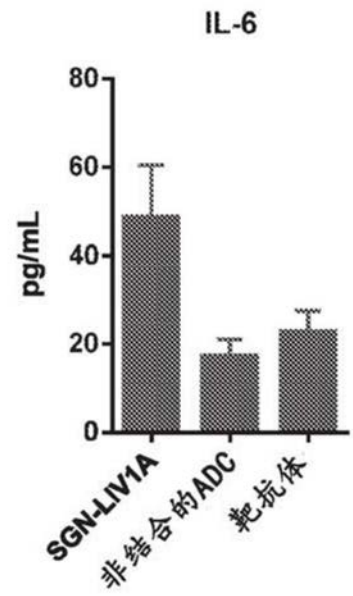


图5F

HeLa 细胞

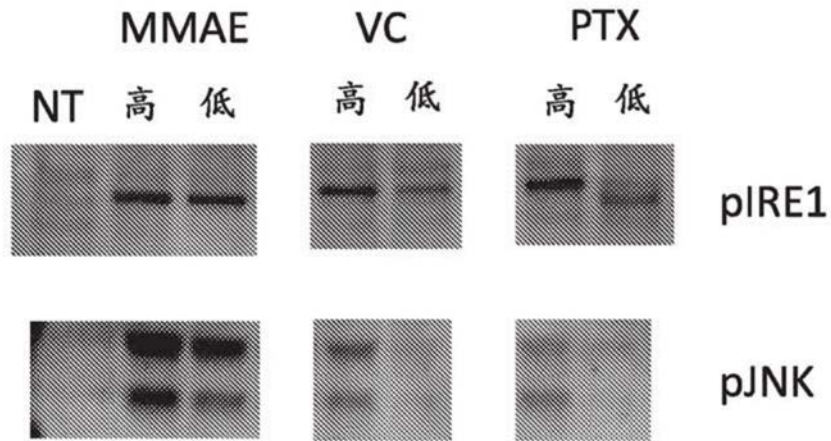


图6

ATP 释放

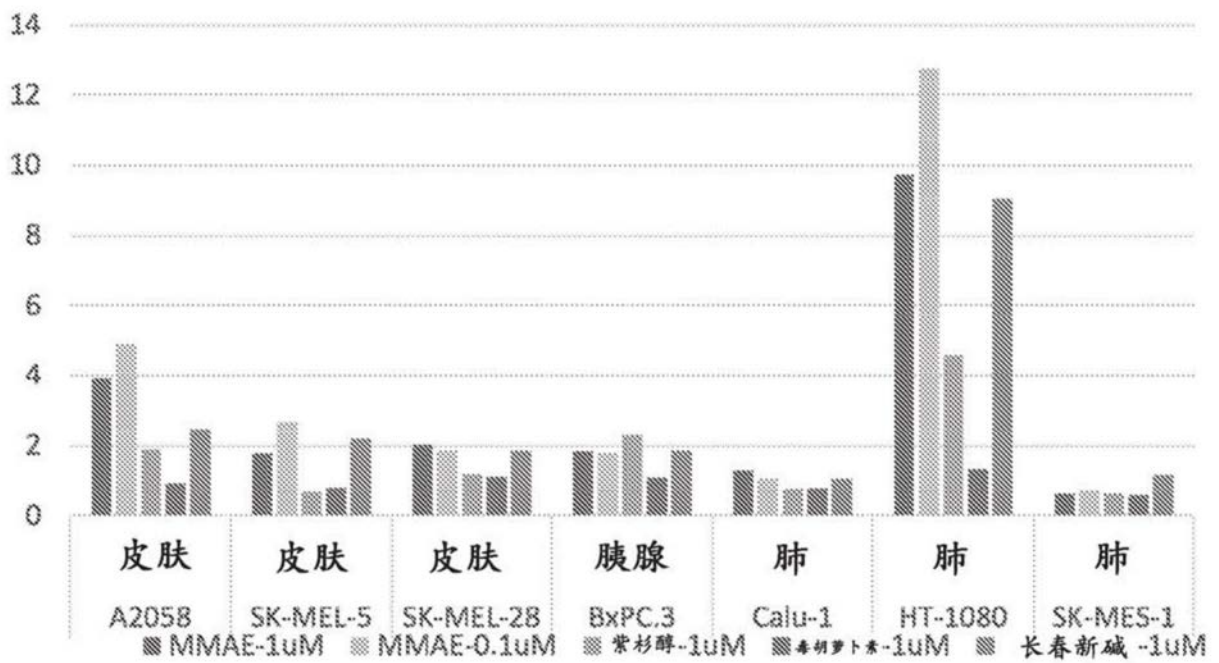


图7A

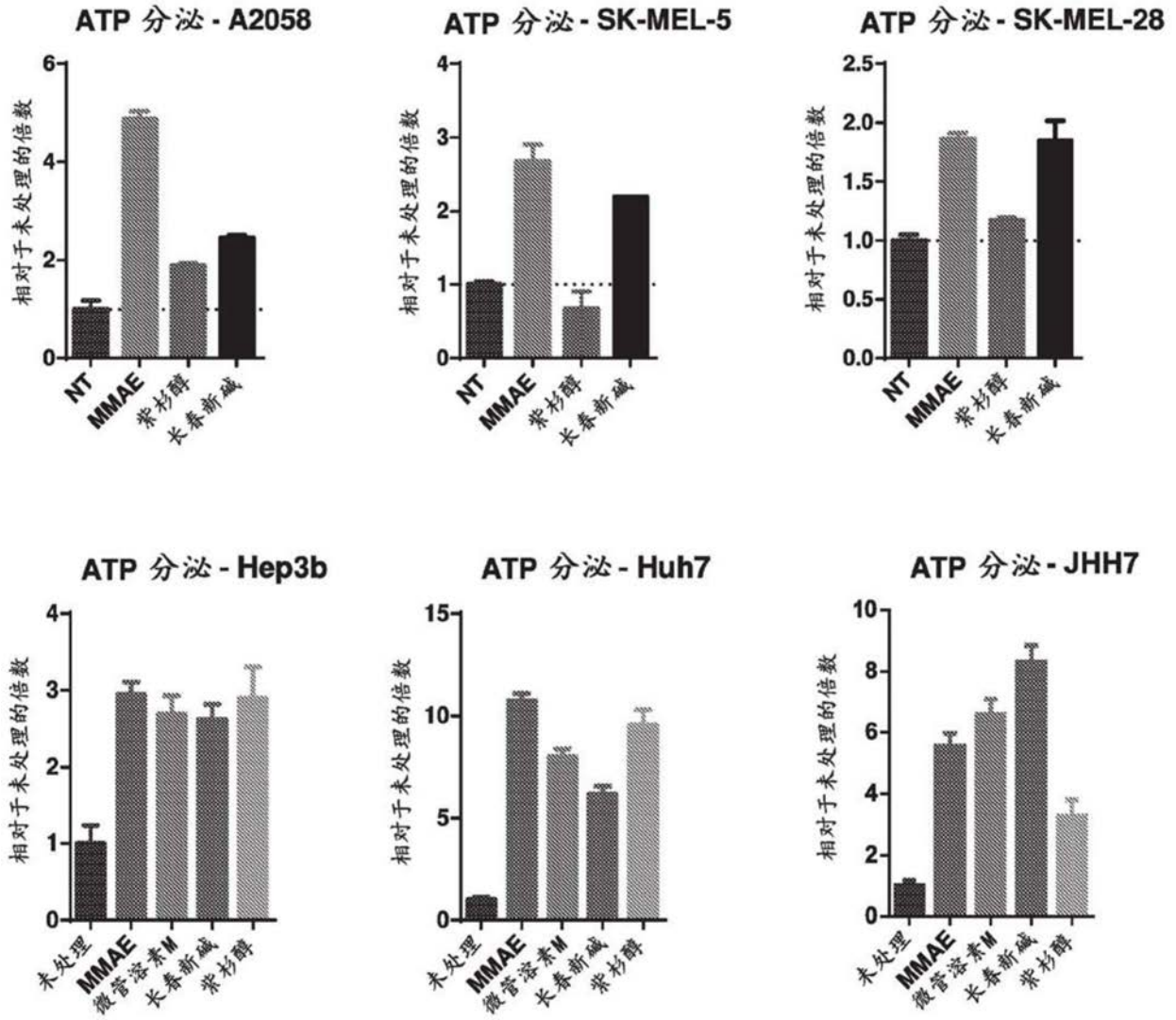


图7B

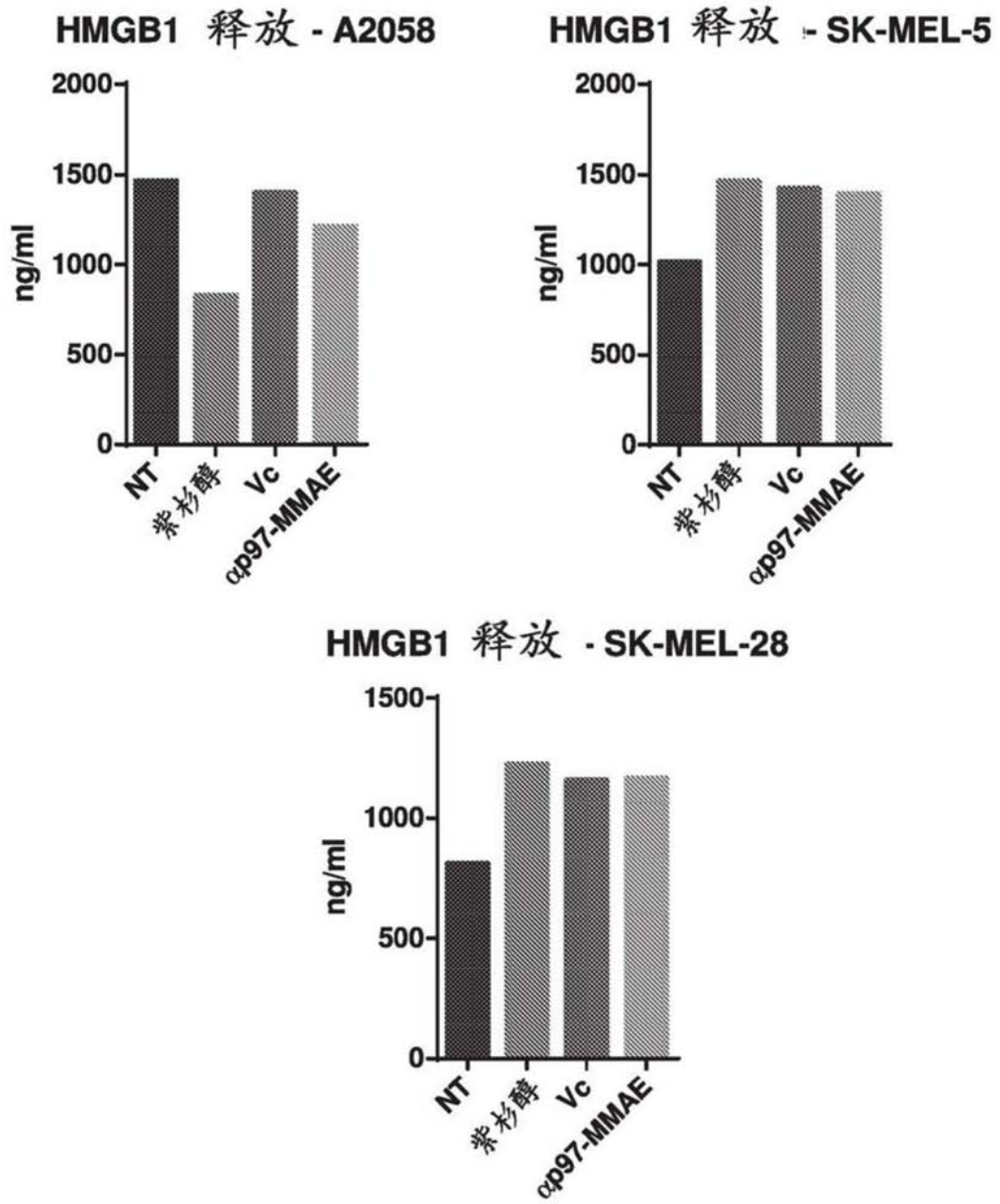


图7C

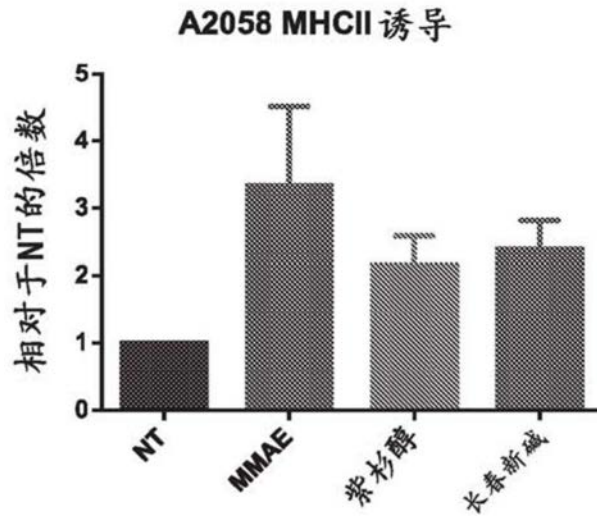


图8A

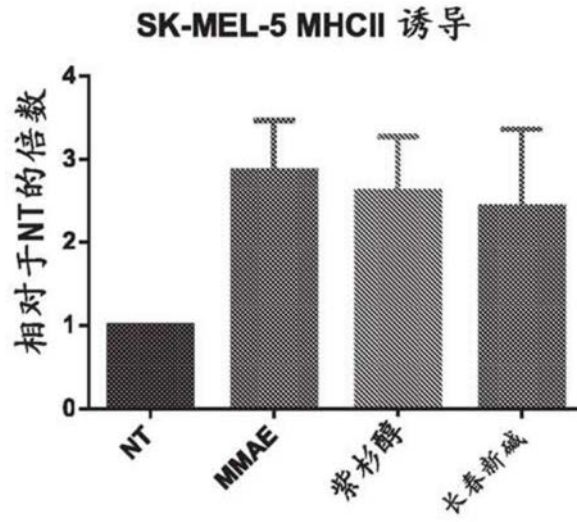


图8B

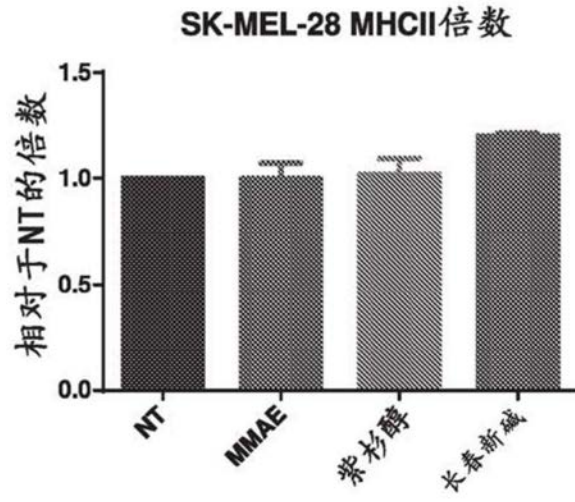


图8C

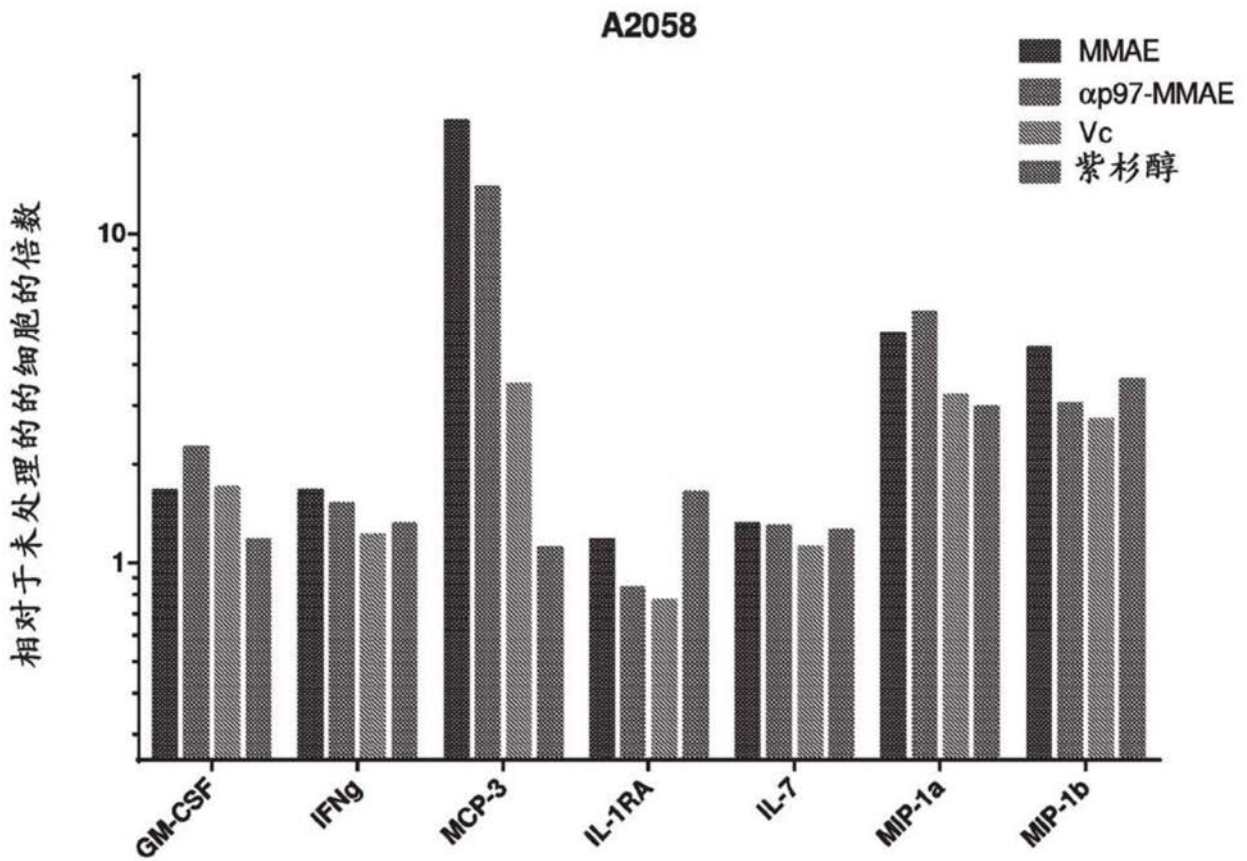


图9A

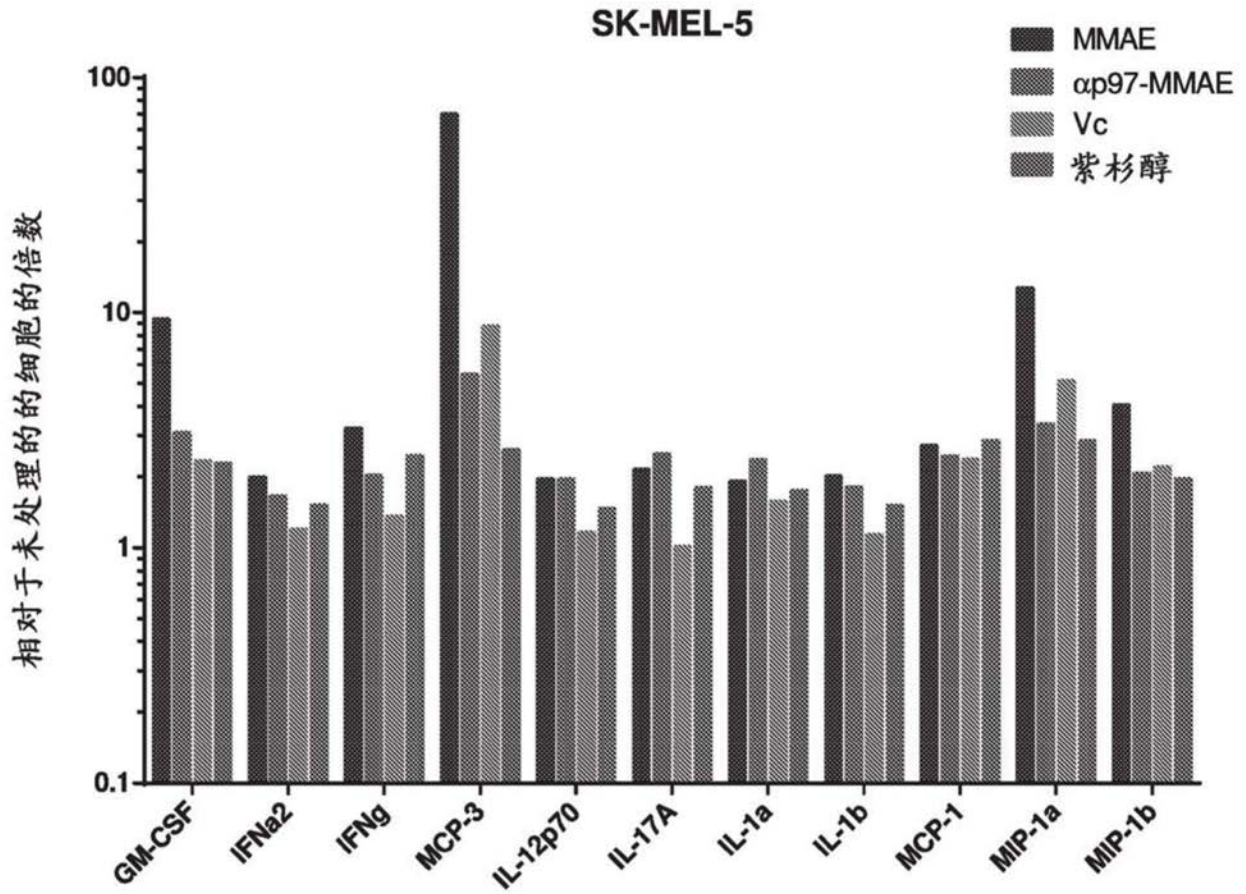


图9B

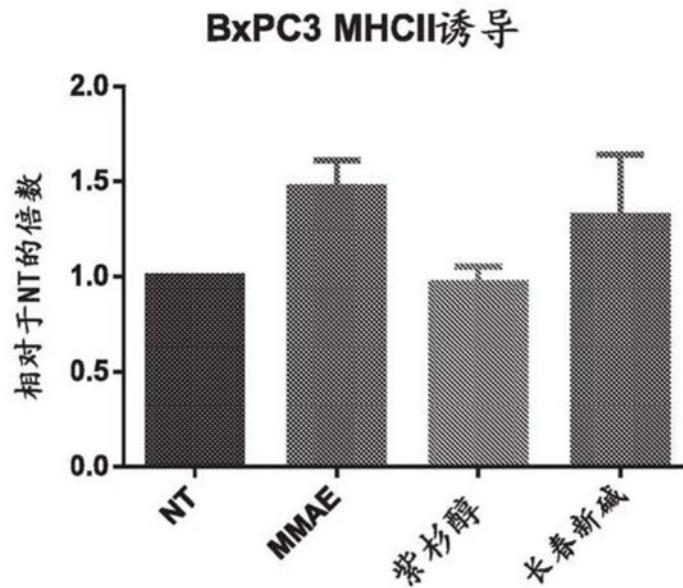


图10A

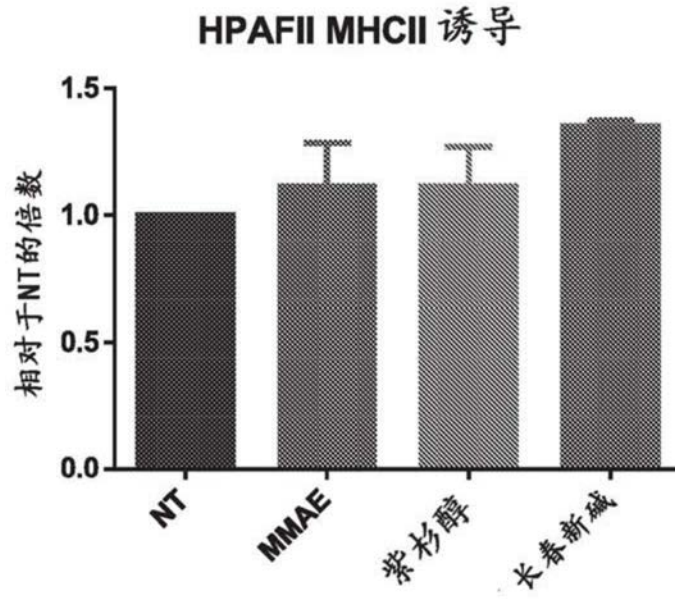


图10B

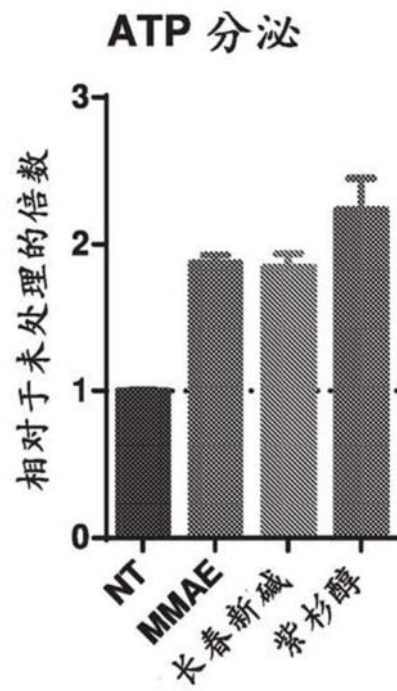


图10C

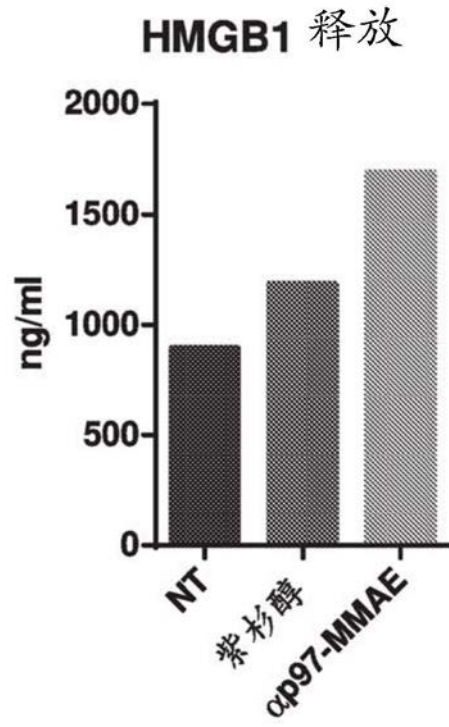


图10D

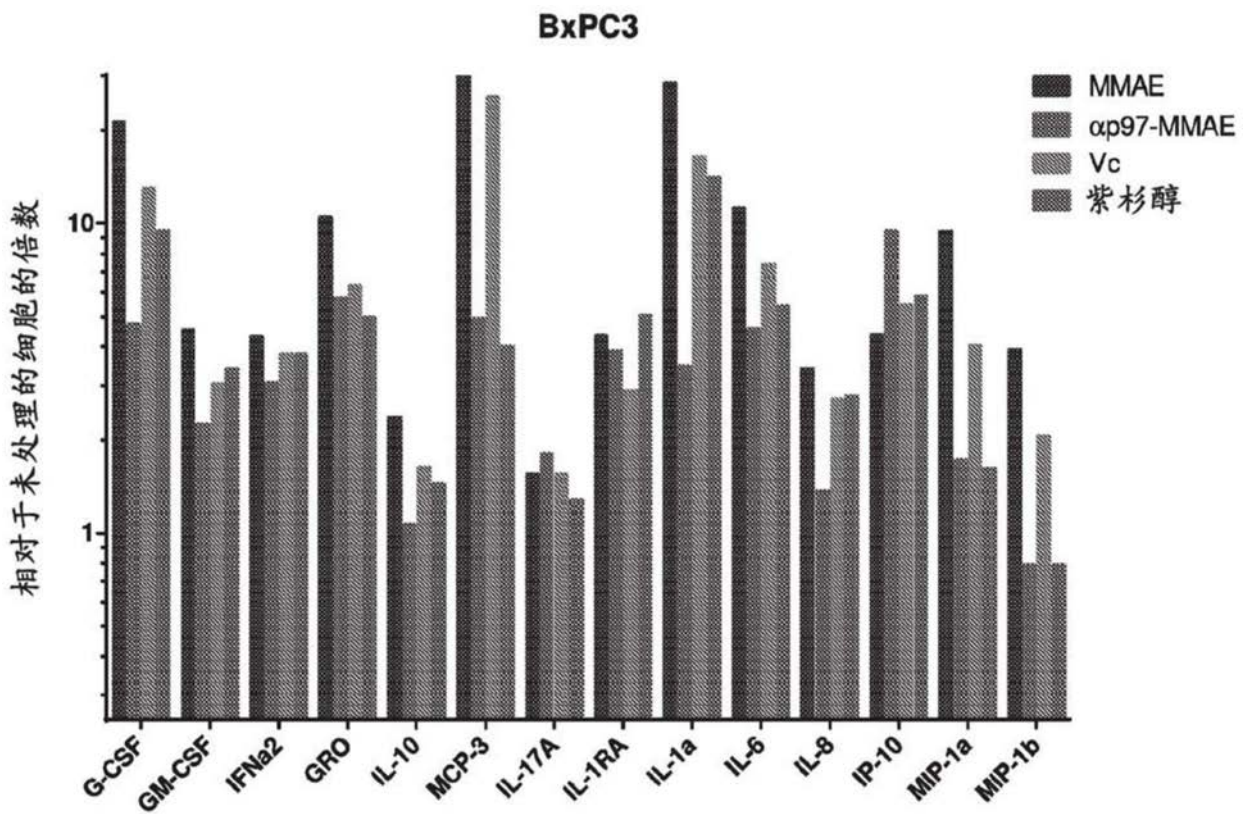


图11A

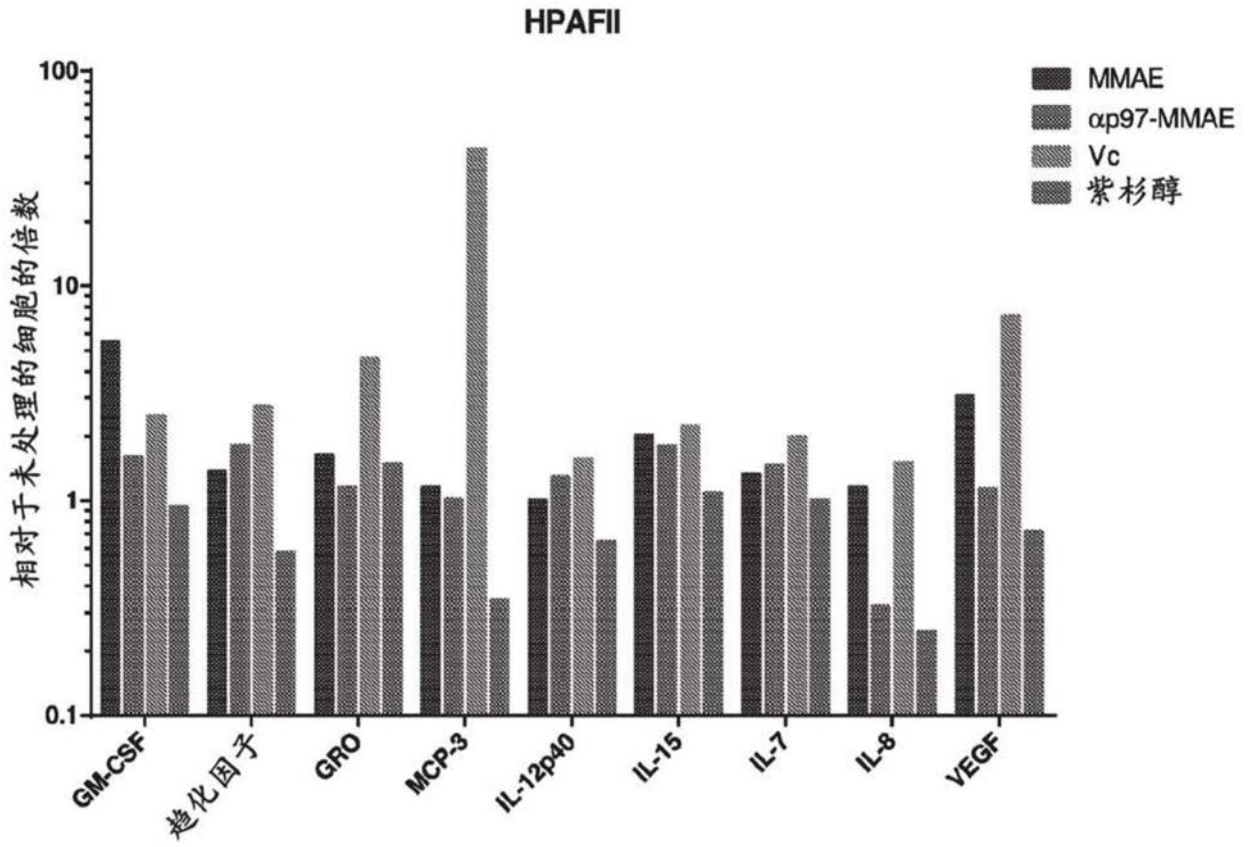


图11B

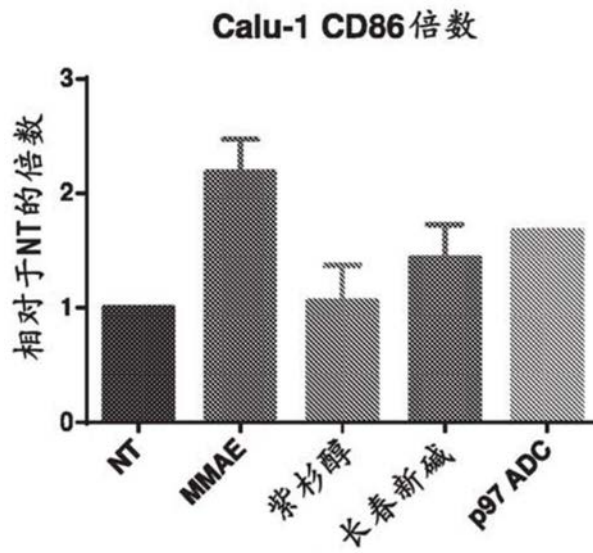


图12A

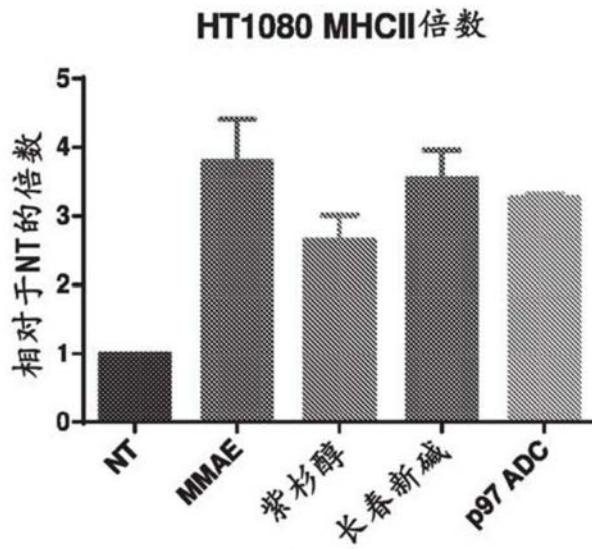


图12B

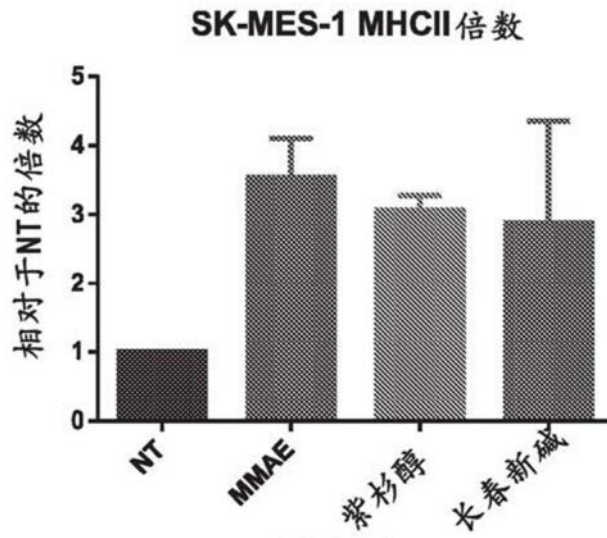


图12C

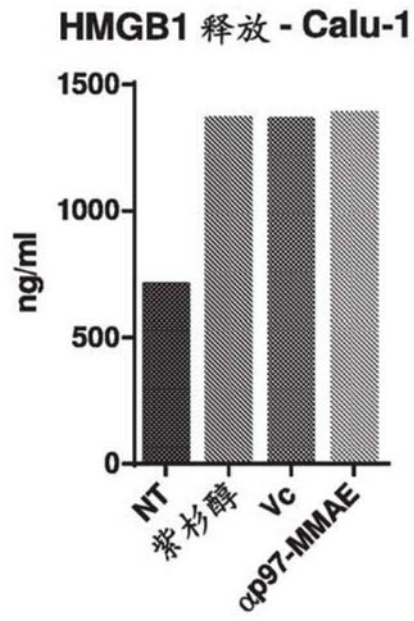


图12D

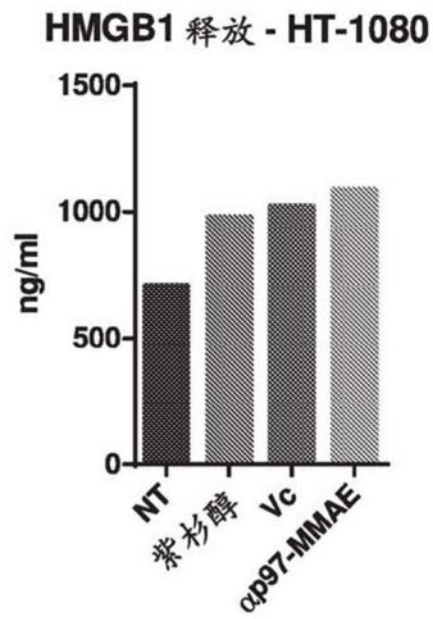


图12E

HMGB1 释放 - SK-MES-1

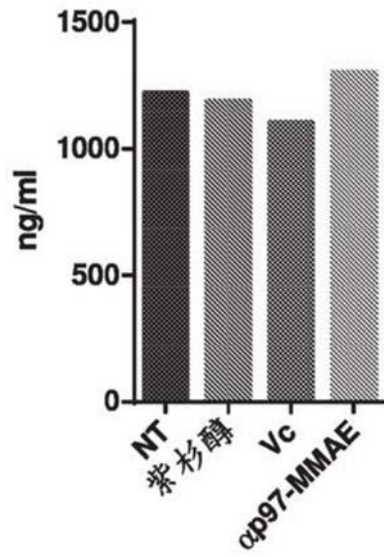


图12F

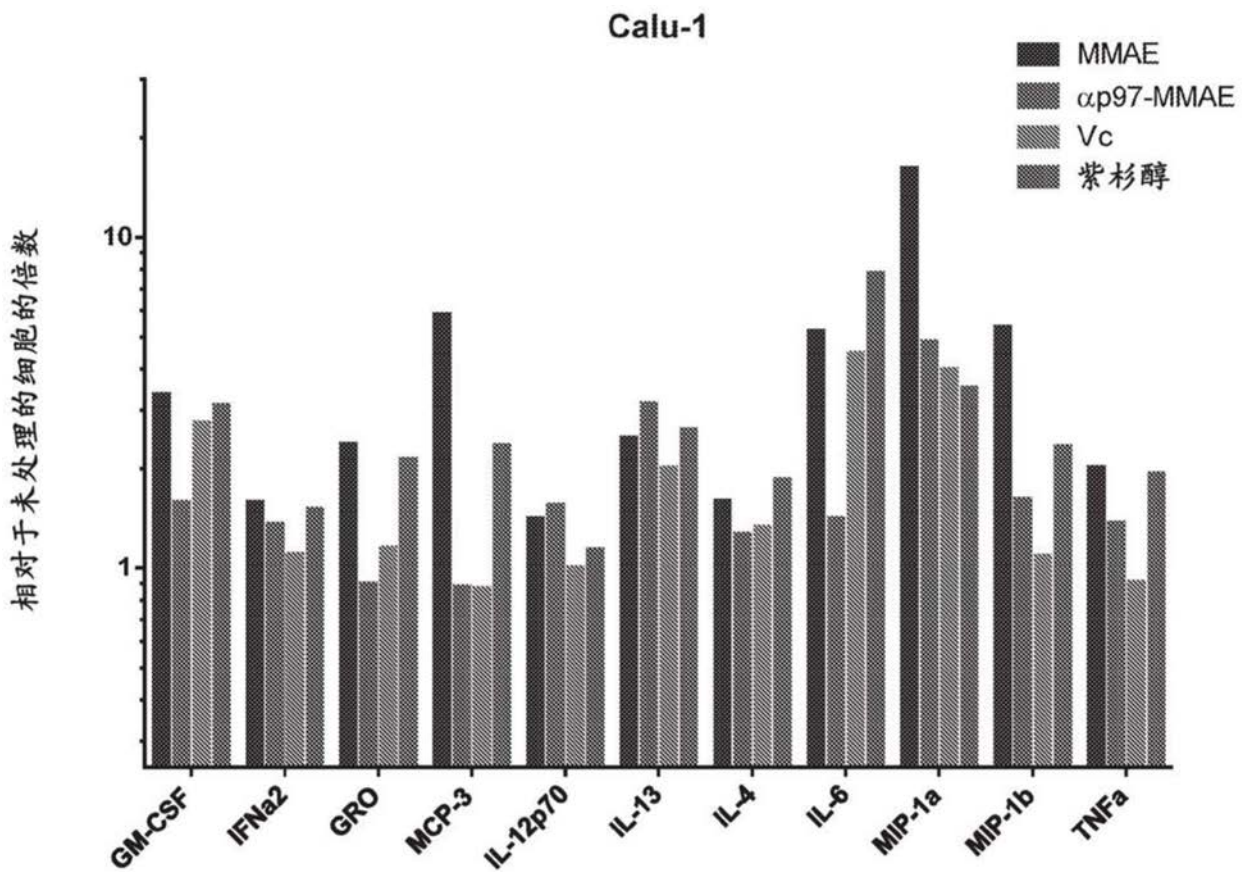


图13

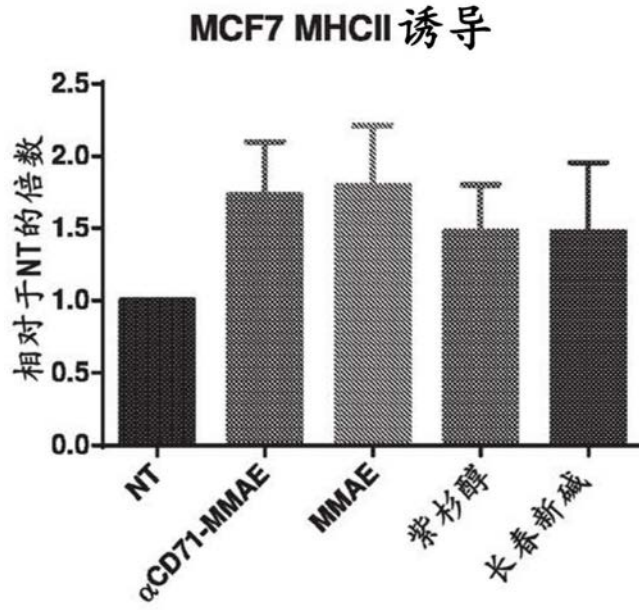


图14A

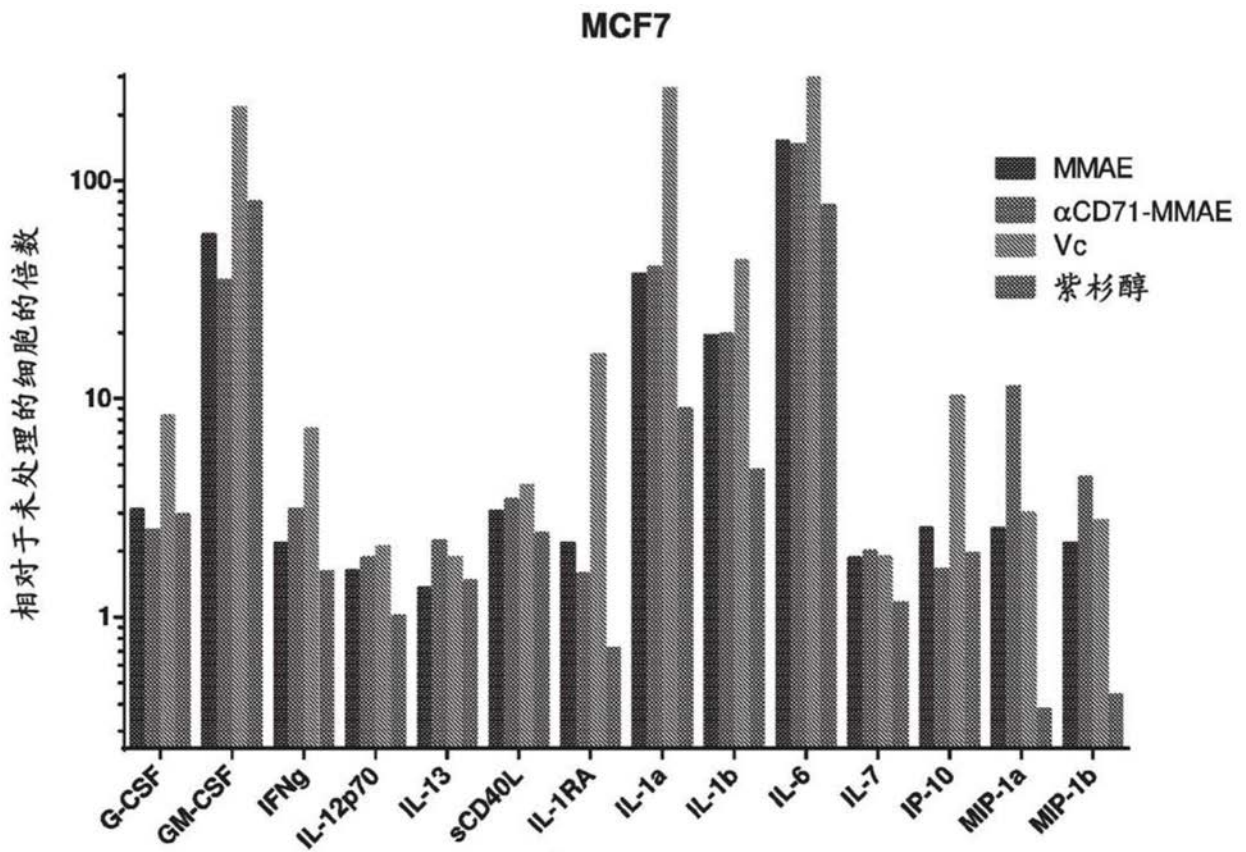


图14B

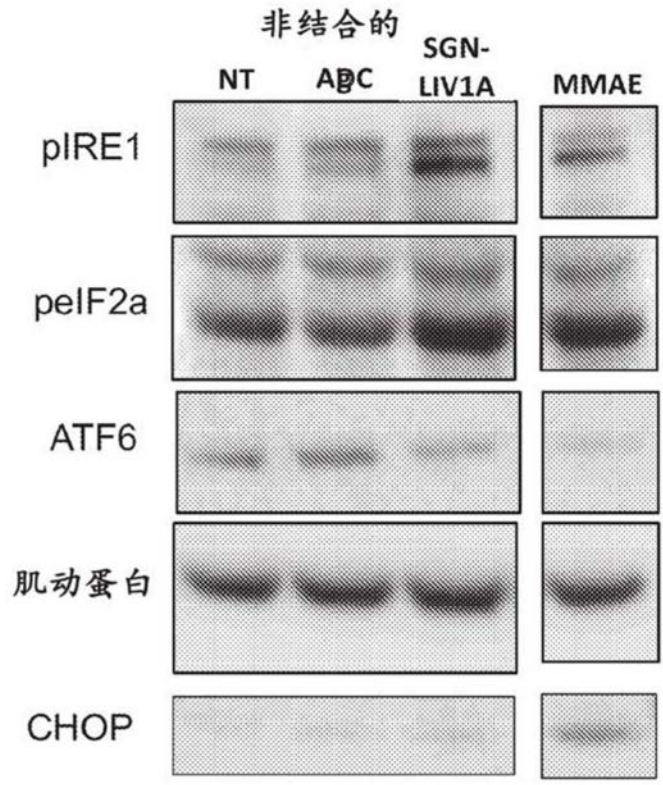


图15A

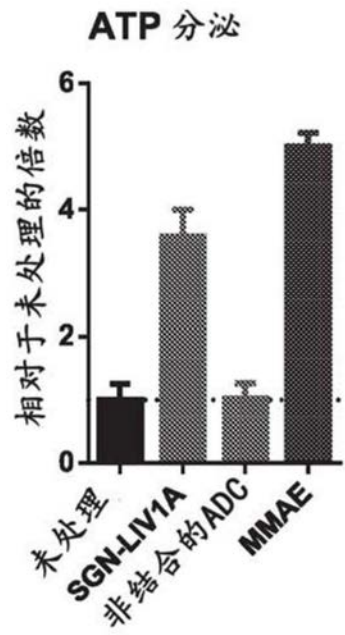


图15B

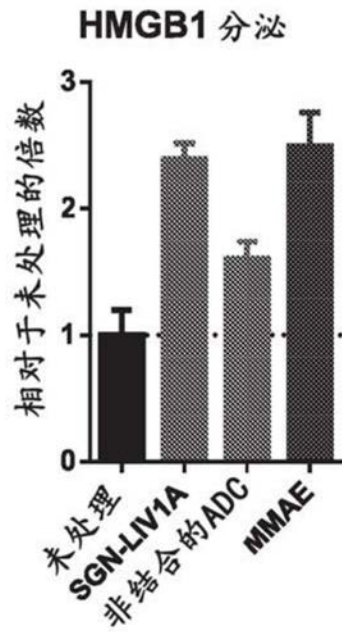


图15C

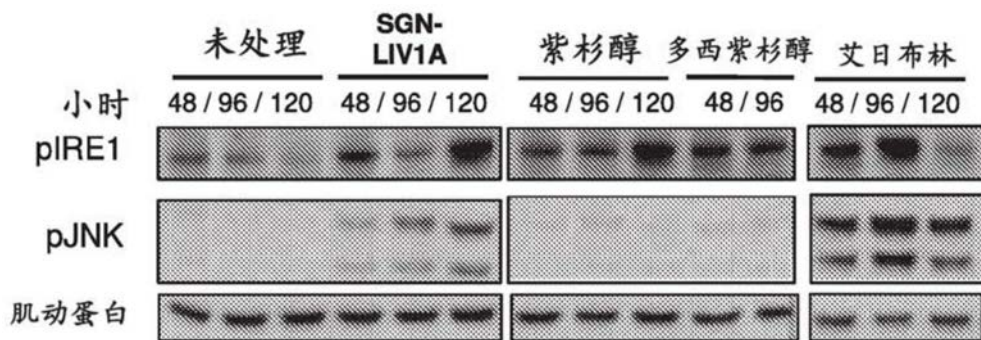


图16A

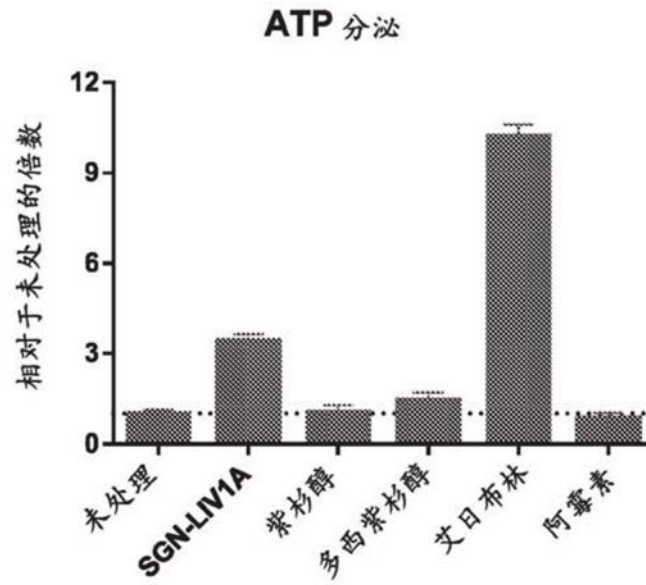


图16B

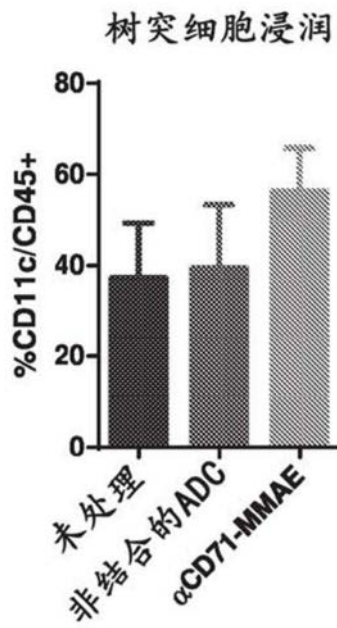


图17A

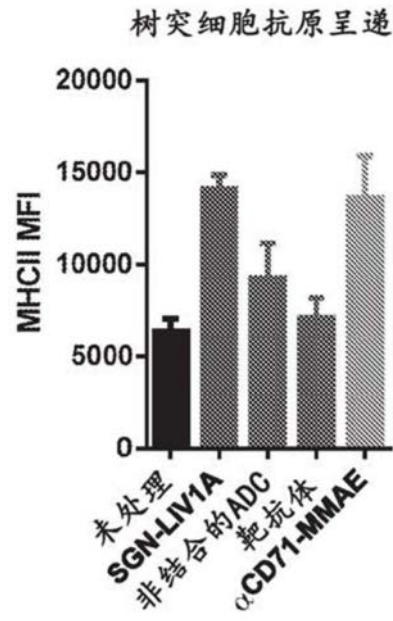


图17B

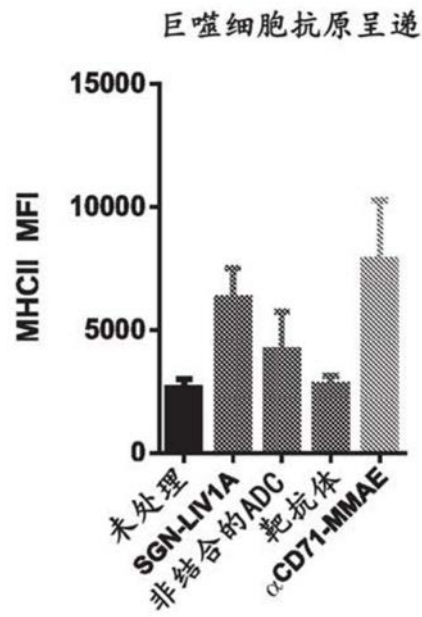


图17C

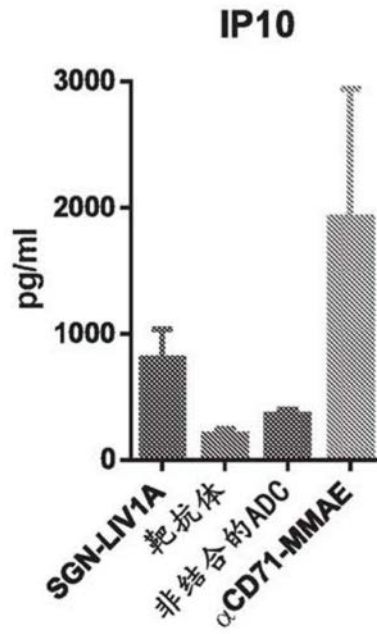


图17D

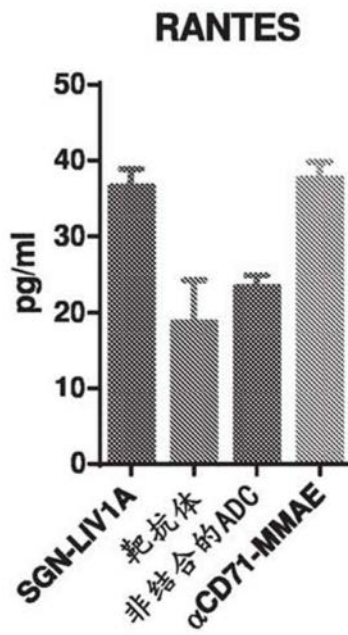


图17E

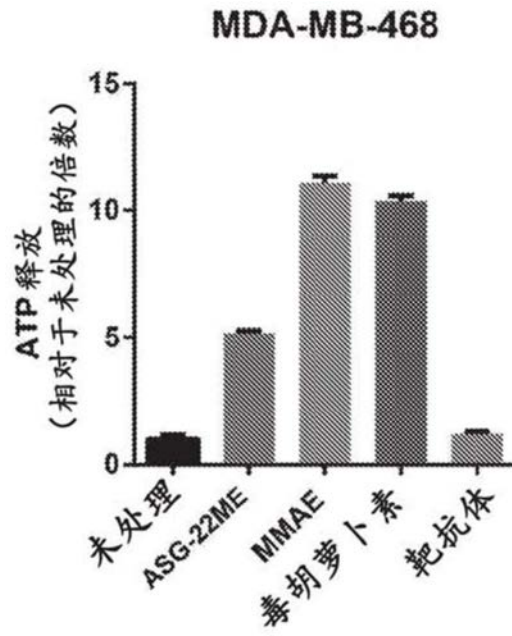


图18

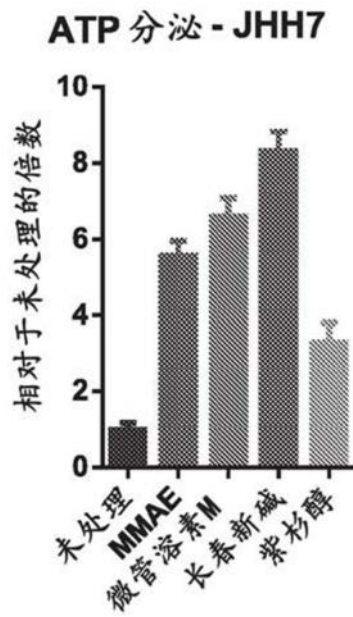


图19A

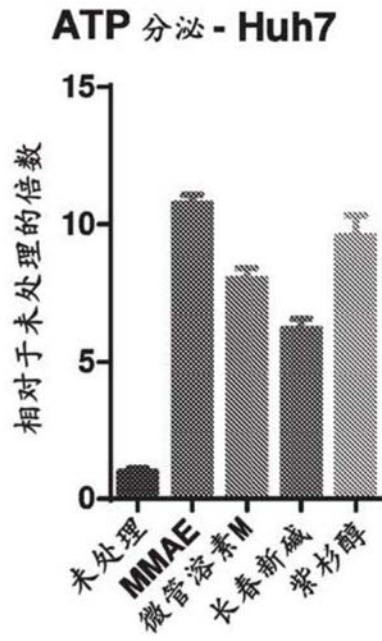


图19B

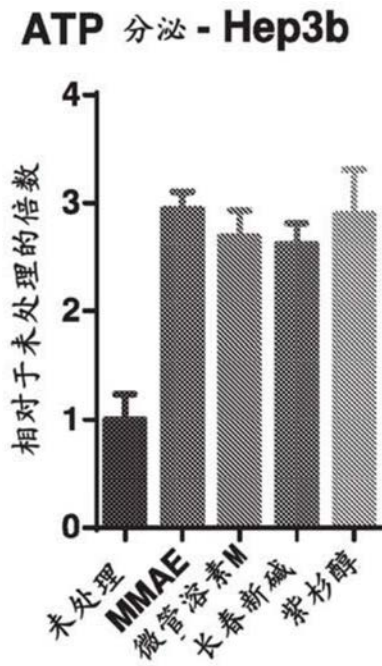


图19C

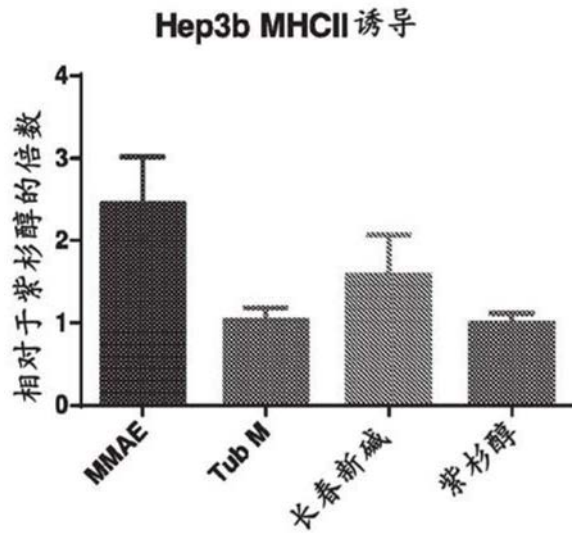


图19D

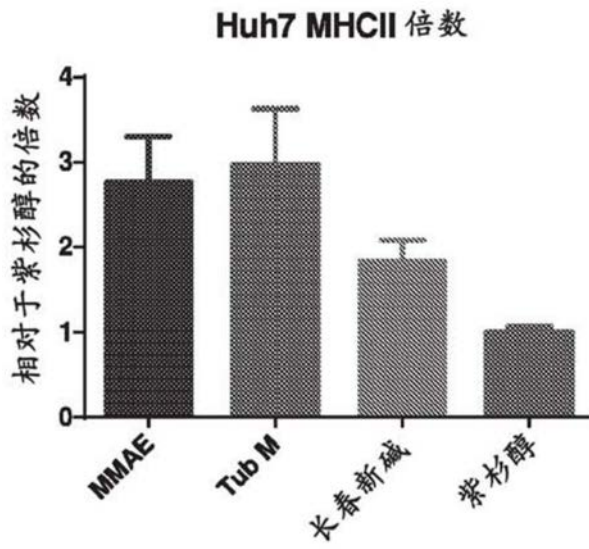


图19E

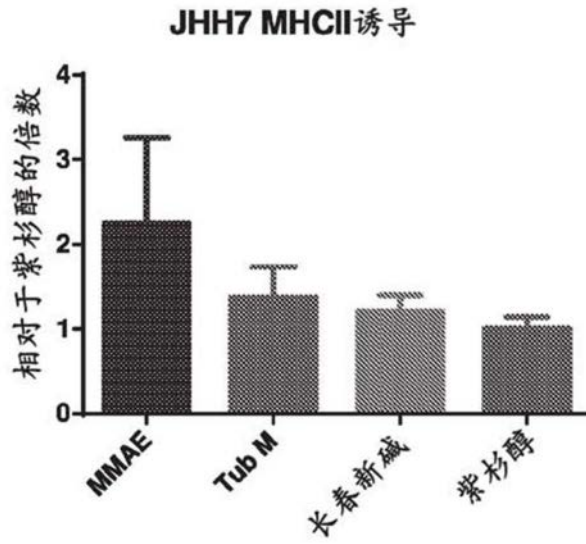


图19F

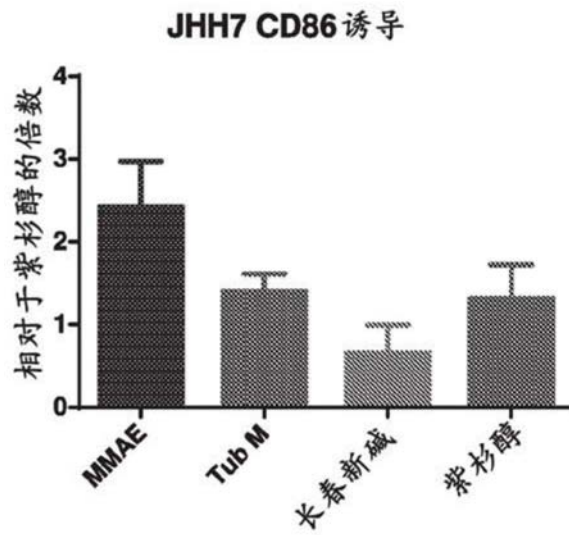


图19G

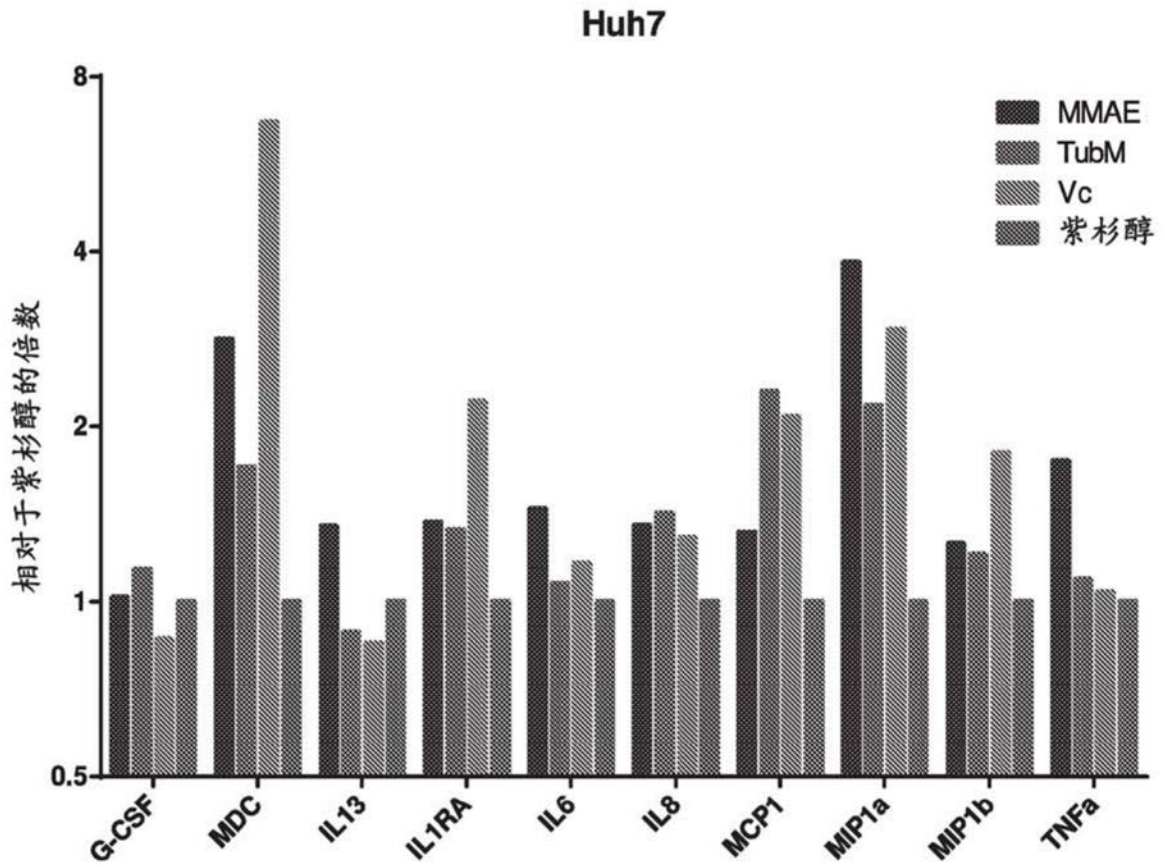


图20A

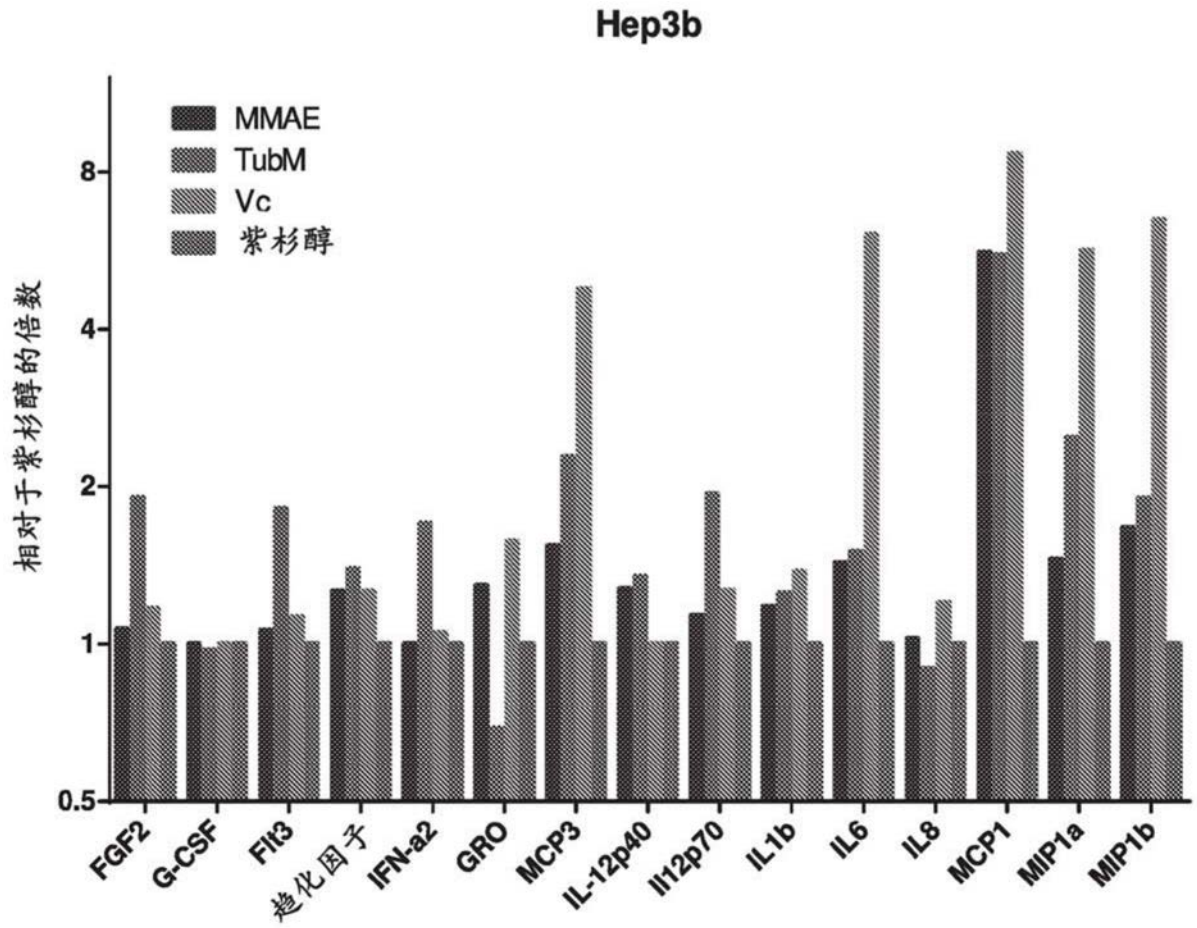


图20B

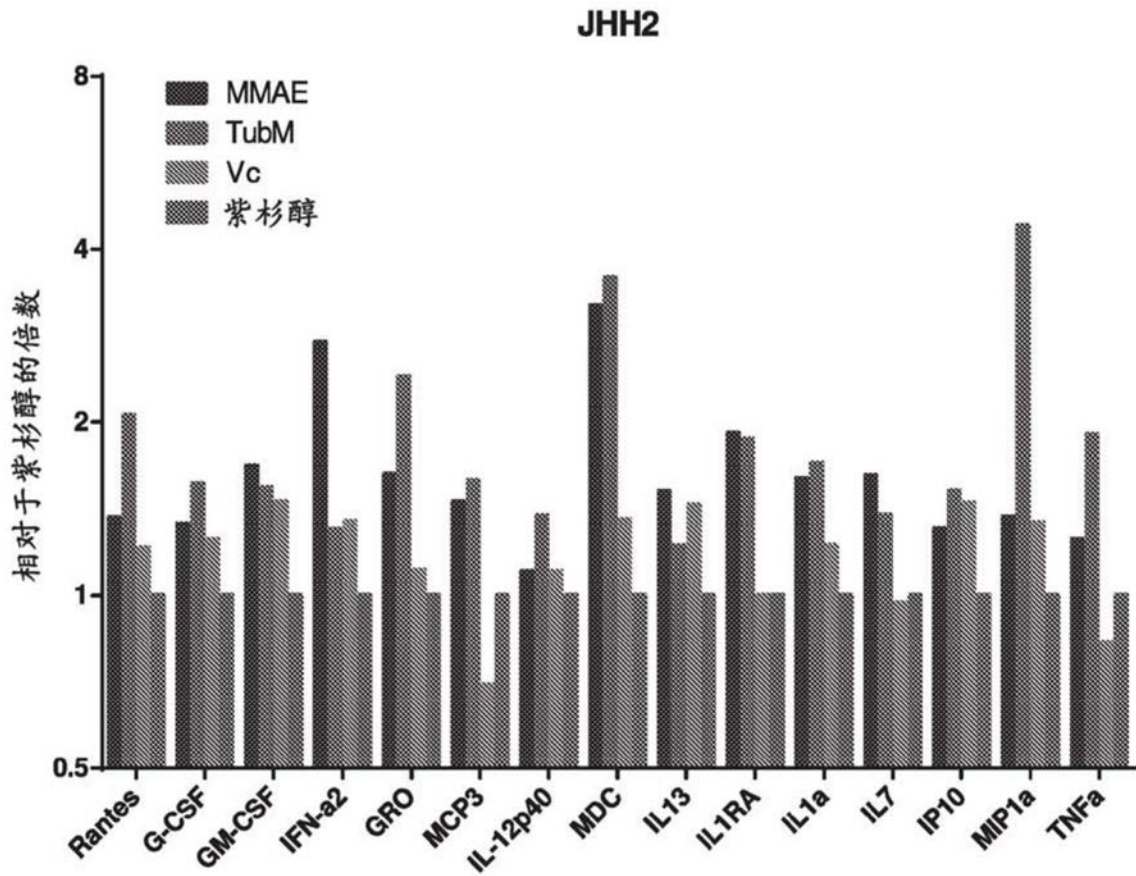


图20C

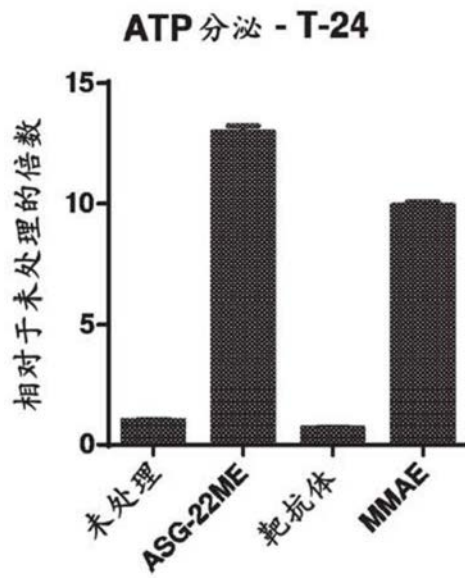


图21A

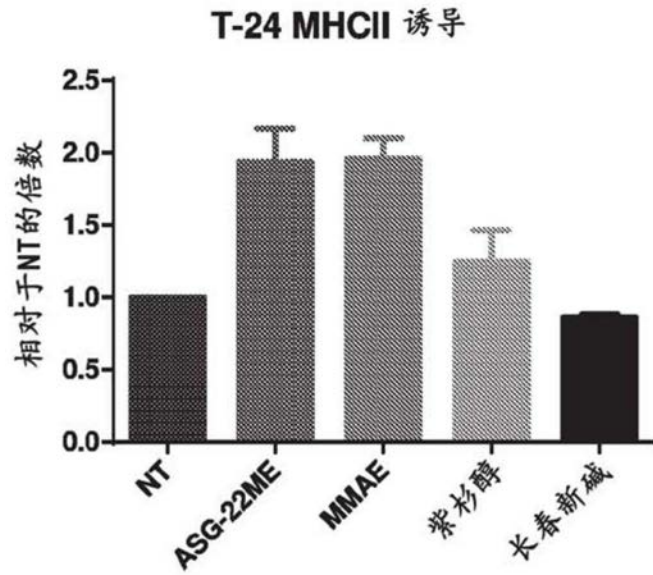


图21B

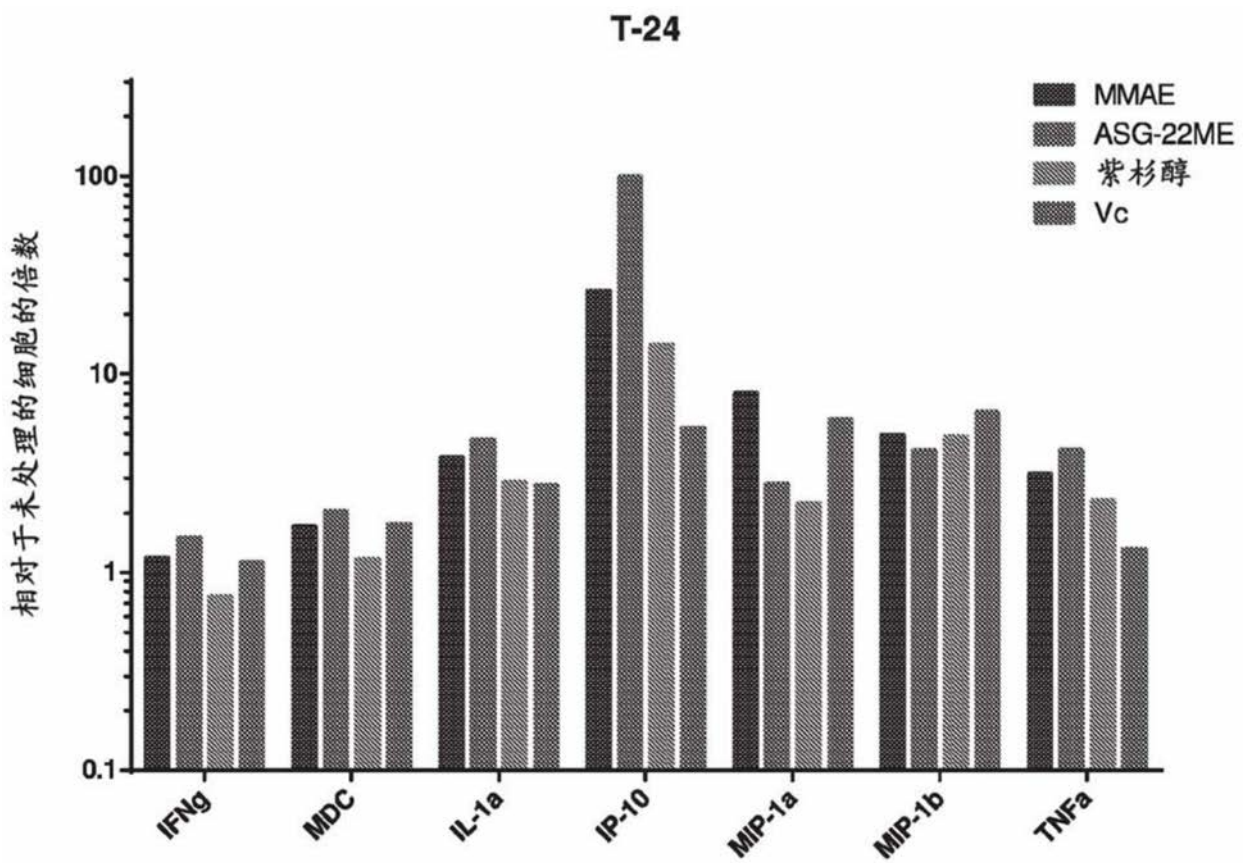


图21C

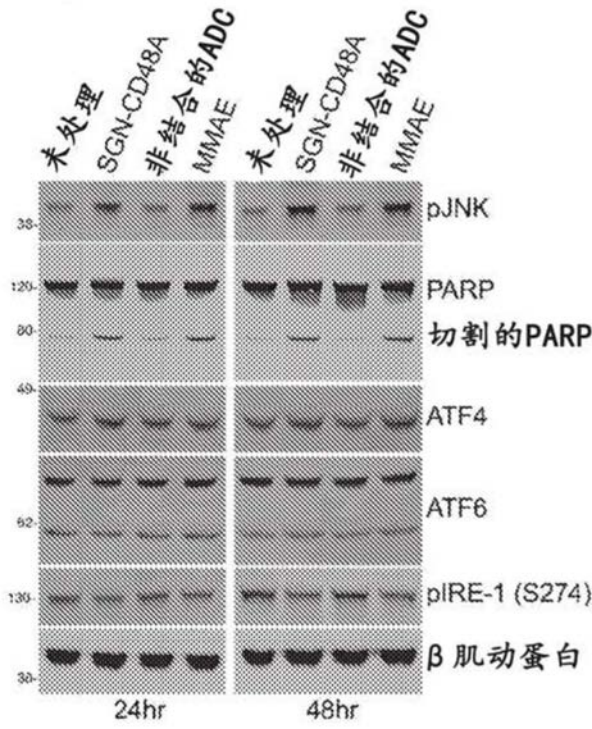


图22A

细胞表面Hsp70, 钙网蛋白

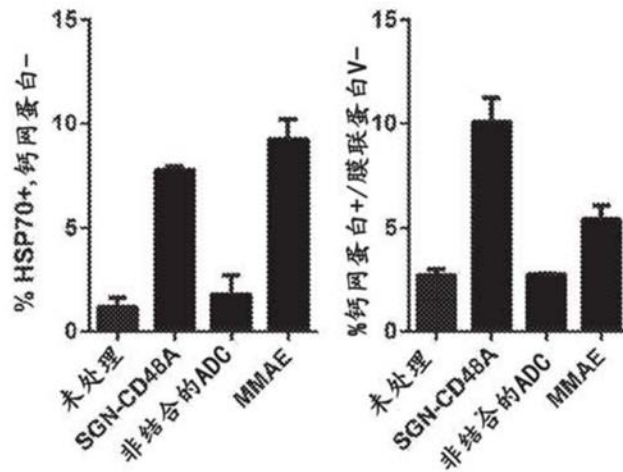


图22B