

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

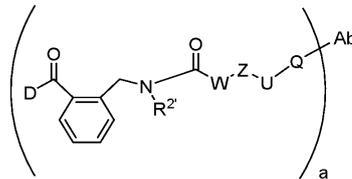
(11) **047756**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.05</p> <p>(21) Номер заявки
202391421</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2021.11.09</p> | <p>(51) Int. Cl. A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

- | | |
|---|---|
| <p>(31) 63/111,478; 63/232,935; 63/250,358</p> <p>(32) 2020.11.09; 2021.08.13; 2021.09.30</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2023.11.20</p> <p>(86) PCT/IB2021/060356</p> <p>(87) WO 2022/097117 2022.05.12</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)</p> <p>(72) Изобретатель:
Су Хи, Ли Хонг Миунг, Арендт
Кристофер (US)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) WO-A1-2018200812
WO-A1-2018195283
WO-A1-2020229982
WO-A1-2021206160</p> |
|---|---|

- (57) В данном изобретении представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие модуляторы STING и характеризующиеся формулой



Также представлены композиции, содержащие конъюгаты антитело-лекарственное средство. Соединения и композиции применимы для стимуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта.

B1**047756****047756****B1**

R^2 выбран из C_1 - C_4 -алкила и $-(CH_2CH_2O)_s-CH_3$, где s является целым числом от 1 до 10;

R^3 и R^3' каждый независимо выбран из водорода и C_1 - C_3 -алкила и

L^1 представляет собой расщепляемый фрагмент линкера.

Во втором варианте реализации первого аспекта данное раскрытие относится к соединению по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли, где D-L представлен формулой (Ia), где

a является целым числом от 1 до 8;

b является целым числом от 1 до 10 и

m равно 0.

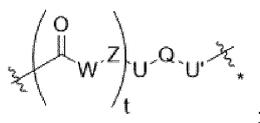
В третьем варианте реализации первого аспекта данное раскрытие относится к соединению по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли, где D-L представлен формулой (Ia), где

m равно 0;

n равно 0 и

R^3 и R^3' , каждый, представляет собой водород.

В третьем варианте реализации первого аспекта данное раскрытие относится к соединению по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли, где D-L представлен формулой (Ia), где L^1 представляет собой



где

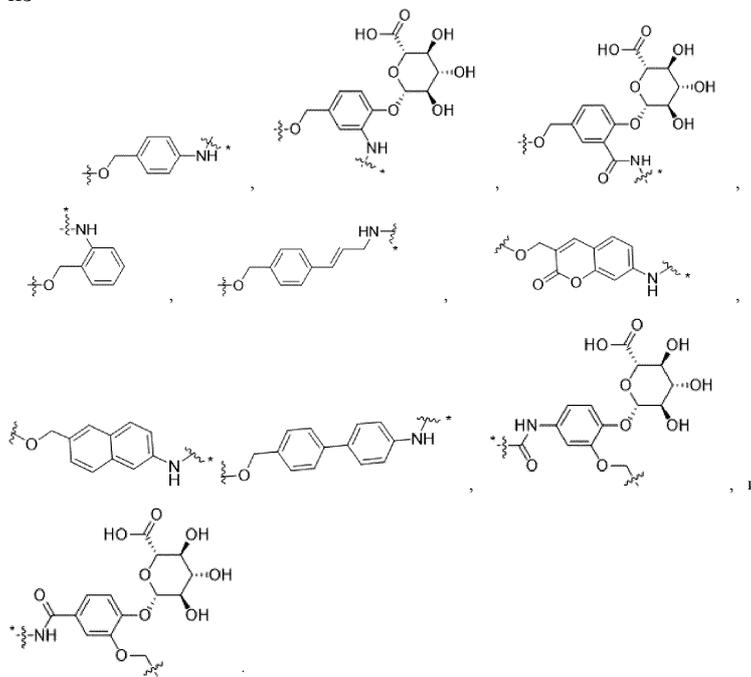
--- представляет собой точку присоединения к атому азота по формуле (Ia);

---^* представляет собой точку присоединения к Ab;

t является целым числом от 1 до 10;

W отсутствует или представляет собой саморасщепляющуюся группу; Z отсутствует или представляет собой пептид из 2-5 аминокислот; U и U' независимо отсутствуют или являются спейсером и Q представляет собой гетеробифункциональную группу; при условии, что W и Z не отсутствуют одновременно.

В четвертом варианте реализации первого аспекта W представляет собой саморасщепляющуюся группу, выбранную из

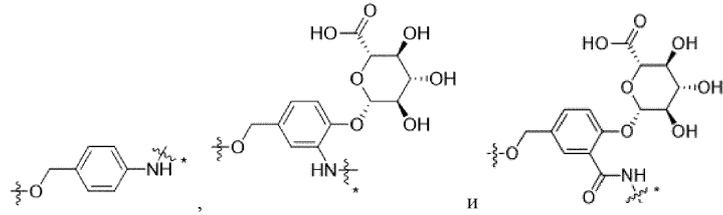


где

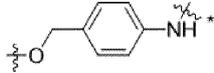
--- представляет собой точку присоединения к карбонильной группе и

--- представляет собой точку присоединения к Z.

В пятом варианте реализации первого аспекта W представляет собой



В шестом варианте реализации первого аспекта W представляет собой



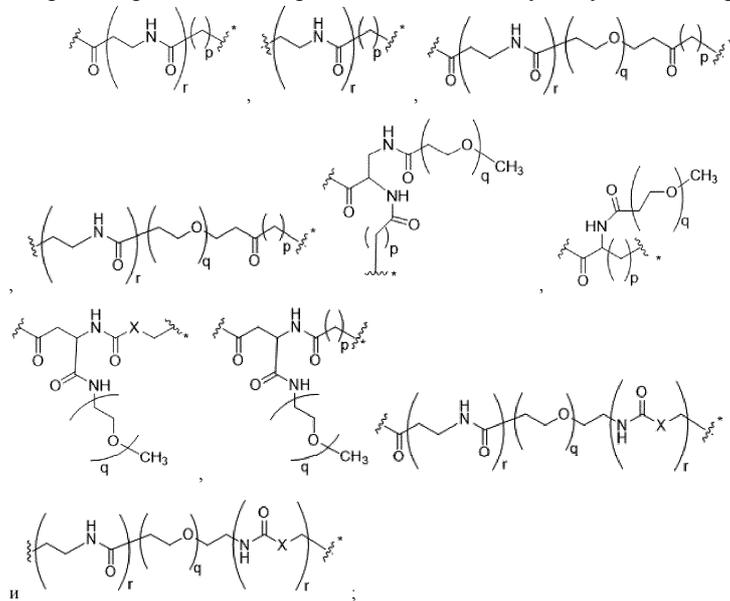
В седьмом варианте реализации первого аспекта Z представляет собой пептид, способный к ферментативному расщеплению.

В восьмом варианте реализации первого аспекта Z является расщепляемым катепсином.

В девятом варианте реализации первого аспекта Z представляет собой пептид из двух аминокислот, выбранный из Val-Cit, Cit-Val, Val-Ala, Ala-Val, Phe-Lys и Lys-Phe.

В десятом варианте реализации первого аспекта Z представляет собой Val-Ala или Ala-Val.

В одиннадцатом варианте реализации первого аспекта U' отсутствует и U выбран из



где

представляет собой точку присоединения к Z;

* представляет собой точку присоединения к Q;

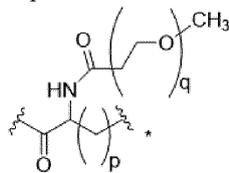
r является целым числом от 1 до 6;

q является целым числом от 1 до 20;

X представляет собой O или -CH₂- и

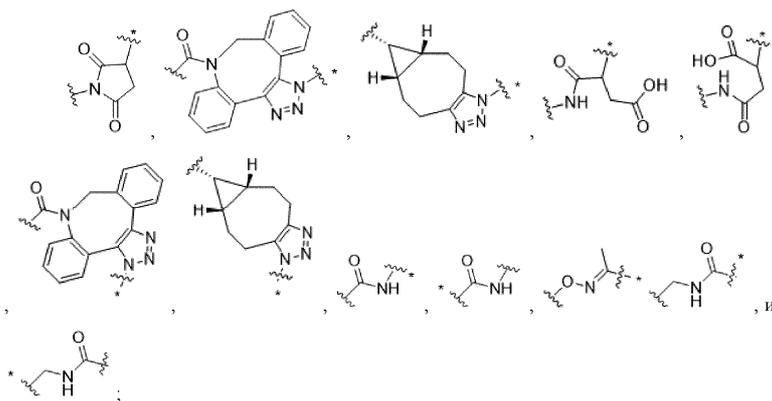
каждый r независимо равен 0 или 1.

В двенадцатом варианте реализации первого аспекта U' отсутствует, а U представляет собой



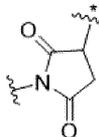
В тринадцатом варианте реализации первого аспекта Q представляет собой гетеробифункциональную группу, которая способна присоединяться к U' или, когда U' отсутствует, присоединяться к Ab посредством химической или ферментно-опосредованной конъюгации.

В четырнадцатом варианте реализации первого аспекта Q выбран из



где \sim представляет собой точку присоединения к U или, когда U отсутствует, точку присоединения к Zi
 \sim^* представляет собой точку присоединения к U' или, когда U' отсутствует, точку присоединения к Ab.

В пятнадцатом варианте реализации первого аспекта Q представляет собой



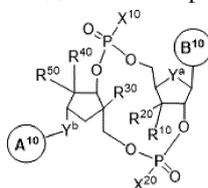
В шестнадцатом варианте реализации первого аспекта t равно 1.

В семнадцатом варианте реализации первого аспекта R² представляет собой -CH₃, и R³ и R^{3'} каждый представляют собой водород.

В восемнадцатом варианте реализации первого аспекта a равно от 2 до 6.

В девятнадцатом варианте реализации первого аспекта b равно 1.

В двадцатом варианте реализации первого аспекта аминокзамещенное соединение, которое модулирует активность STING, представляет собой соединение по формуле (II)



(II),

где

X¹⁰ представляет собой SH или OH;

X²⁰ представляет собой SH или OH;

Y^a представляет собой O, S или CH₂;

Y^b представляет собой O, S, NH или NR^a, причем R^a представляет собой C₁-C₄-алкил;

R¹⁰ представляет собой водород, фтор, OH, NH₂, OR^b или NHR^b;

R²⁰ представляет собой водород или фтор;

R³⁰ представляет собой водород; R⁴⁰ представляет собой водород, фтор, OH, NH₂, OR^b или NHR^b; или R³⁰ и R⁴⁰, взятые вместе с образованием CH₂O;

R⁵⁰ представляет собой водород или фтор;

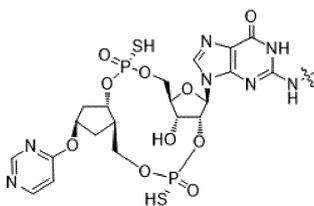
R^b представляет собой C₁-C₆-алкил, галоген(C₁-C₆)алкил или C₃-C₆-циклоалкил;

кольцо A¹⁰ представляет собой необязательно замещенное 5- или 6-членное моноциклическое гетероарильное кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, выбранные из N, O или S, или необязательно замещенное 9- или 10-членное бициклическое гетероарильное кольцо, содержащее 1-5 гетероатомов, выбранных из N, O или S; причем кольцо A¹⁰ содержит по меньшей мере один атом N в кольце и где Y^b присоединен к атому углерода кольца A¹⁰; и

кольцо B¹⁰ представляет собой необязательно замещенное 9- или 10-членное бициклическое гетероарильное кольцо, содержащее 2-5 гетероатомов, выбранных из N, O или S; причем кольцо B¹⁰ содержит по меньшей мере два атома N в кольце;

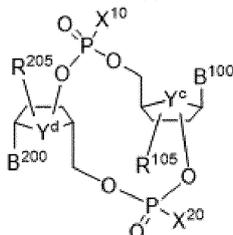
при условии, что кольцо A¹⁰ или кольцо B¹⁰ прикреплено к 'L' по формуле (I) через аминокгруппу.

В двадцать первом варианте реализации первого аспекта аминокзамещенное соединение, которое модулирует активность STING, представляет собой



где \sim представляет собой точку присоединения к 'L' в формуле (I).

В двадцать втором варианте реализации первого аспекта аминозамещенное соединение, которое модулирует активность STING, представляет собой соединение по формуле (III)



(III);

или его фармацевтически приемлемую соль, где

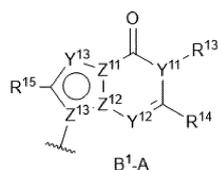
X^{10} представляет собой SH или OH;

X^{20} представляет собой SH или OH;

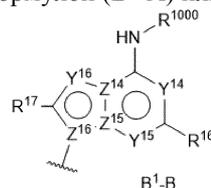
Y^c представляет собой O, S или CH_2 ;

Y^d представляет собой O, S или CH_2 ;

B^{100} представляет собой группу, представленную формулой (B¹-A) или формулой (B¹-B)



или



R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} и R^{17} , каждый независимо, представляет собой атом водорода или заместитель;

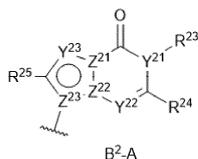
R^{1000} представляет собой водород или связь с карбонильной группой по формуле (I);

Y^{11} , Y^{12} , Y^{13} , Y^{14} , Y^{15} и Y^{16} каждый независимо представляет собой N или CR^{1a} , где R^{1a} представляет собой водород или заместитель;

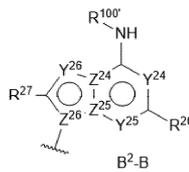
Z^{11} , Z^{12} , Z^{13} , Z^{14} , Z^{15} и Z^{16} каждый независимо представляет собой N или C;

R^{105} представляет собой атом водорода или заместитель;

B^{200} представляет собой группу, представленную формулой (B²-A) или формулой (B²-B)



или



R^{23} , R^{24} , R^{25} , R^{26} и R^{27} каждый независимо представляет собой атом водорода или заместитель;

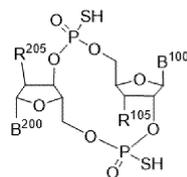
R^{1000} представляет собой водород или связь с карбонильной группой по формуле (I);

Y^{21} , Y^{22} , Y^{23} , Y^{24} , Y^{25} и Y^{26} каждый независимо представляет собой N или CR^{2a} , где R^{2a} представляет собой водород или заместитель;

Z^{21} , Z^{22} , Z^{23} , Z^{24} , Z^{25} и Z^{26} каждый независимо представляет собой N или C и

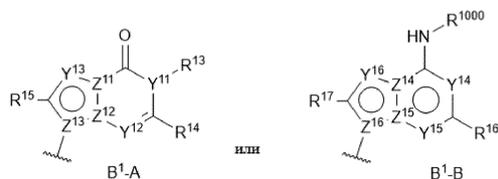
R^{205} представляет собой атом водорода или заместитель; где R^{105} и R^{205} каждый независимо присоединен к 2- или 3-положению 5-членного кольца, к которому они присоединены соответственно; при условии, что один из B^{100} или B^{200} присоединен к 'L' в формуле (I) через аминогруппу.

В двадцать третьем варианте реализации первого аспекта аминозамещенное соединение, которое модулирует активность STING, представляет собой соединение по формуле (IIIa)



(IIIa);

или его фармацевтически приемлемую соль, где B^{100} представляет собой группу, представленную формулой (B¹-A) или формулой (B¹-B)

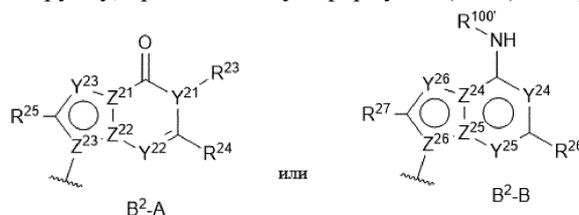


R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} и R^{17} каждый независимо представляет собой атом водорода или заместитель;
 R^{1000} представляет собой водород или связь с карбонильной группой по формуле (I);
 Y^{11} , Y^{12} , Y^{13} , Y^{14} , Y^{15} и Y^{16} каждый независимо представляет собой N или CR^{1a} , где R^{1a} представляет собой водород или заместитель;

Z^{11} , Z^{12} , Z^{13} , Z^{14} , Z^{15} и Z^{16} каждый независимо представляет собой N или C;

R^{105} представляет собой атом водорода или заместитель;

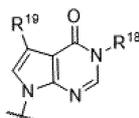
B^{200} представляет собой группу, представленную формулой (B²-A) или формулой (B²-B)



R^{23} , R^{24} , R^{25} , R^{26} и R^{27} каждый независимо представляет собой атом водорода или заместитель;
 $R^{100'}$ представляет собой водород или связь с карбонильной группой по формуле (I);
 Y^{21} , Y^{22} , Y^{23} , Y^{24} , Y^{25} и Y^{26} каждый независимо представляет собой N или CR^{2a} , где R^{2a} представляет собой водород или заместитель;

Z^{21} , Z^{22} , Z^{23} , Z^{24} , Z^{25} и Z^{26} каждый независимо представляет собой N или C; и

R^{205} представляет собой атом водорода или заместитель; где R^{105} и R^{205} каждый независимо присоединен к 2- или 3-положению 5-членного кольца, к которому они присоединены соответственно; при условии, что один из B^{100} или B^{200} представляет собой



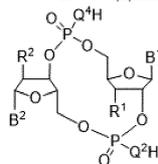
где

R^{18} представляет собой водород или C_{1-6} алкил и

R^{19} представляет собой атом галогена;

а другой присоединен к 'L' группе по формуле (I) через группу -NH-.

В двадцать четвертом варианте реализации первого аспекта аминокзамещенное соединение, которое модулирует активность STING, представляет собой соединение по формуле (IV)

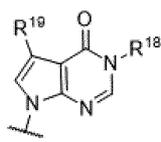


(IV),

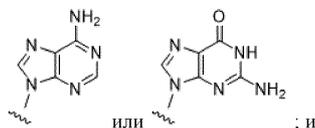
или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^1 и R^2 каждый независимо представляет собой гидроксигруппу или атом галогена;

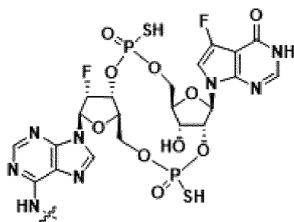
B^1 представляет собой



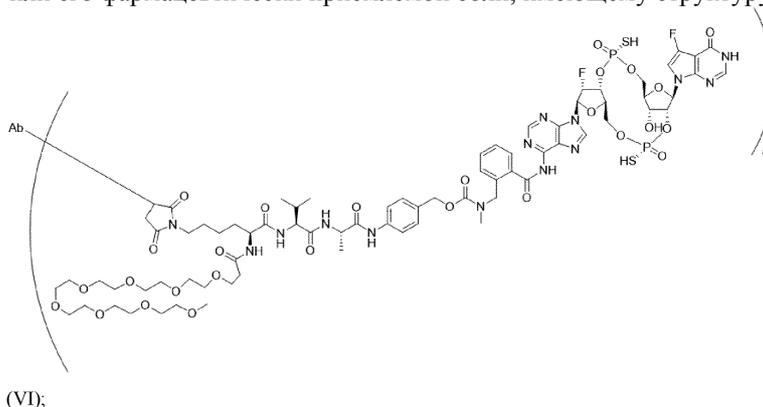
R^{18} представляет собой водород или C_{1-6} алкил;
 R^{19} представляет собой атом галогена;
 B^2 представляет собой



каждый из Q^2 и Q^4 независимо представляет собой атом кислорода или атом серы. В двадцать пятом варианте реализации первого аспекта аминозамещенное соединение, которое модулирует активность STING, представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль, где L представляет собой точку присоединения к L . В двадцать шестом варианте реализации первого аспекта данное раскрытие относится к соединению по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли, имеющему структуру по формуле (VI)



где a является целым числом от 1 до 6.

В двадцать седьмом варианте реализации первого аспекта Ab представляет собой антитело или его фрагмент, которое связывает $CCR2$ человека или его часть и способно блокировать связывание хемокина с $CCR2$ и ингибировать функцию $CCR2$.

В двадцать восьмом варианте реализации первого аспекта антитело выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела 1D9 или антитела, которое может конкурировать с 1D9 за связывание с $CCR2$ человека или частью $CCR2$; MC-21; STI-B020X; UniTI-101 и 4.40A68G.

В двадцать девятом варианте реализации первого аспекта антитело представляет собой моноклональное антитело 1D9 или антитело, которое может конкурировать с 1D9 за связывание с $CCR2$ человека или частью $CCR2$.

В тридцатом варианте реализации первого аспекта антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело, человеческое антитело, мышинное антитело, крысиное антитело, козье антитело или кроличье антитело.

В тридцать первом варианте реализации первого аспекта антитело к $CCR2$, фрагмент антитела к $CCR2$ или антигенсвязывающий фрагмент к $CCR2$ содержит CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислоты 24-39 SEQ ID NO: 1; CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислоты 55-61 SEQ ID NO: 1; CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислоты 94-102 SEQ ID NO: 1; CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислоты 31-35 SEQ ID NO:2; CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислоты 50-68 SEQ ID NO:2; и CDR3 тяжелой цепи, содержащей аминокислоты 101-106 SEQ ID NO:2.

В тридцать втором варианте реализации первого аспекта антитело против $CCR2$, фрагмент антитела против $CCR2$ или антигенсвязывающий фрагмент анти- $CCR2$ содержит вариательную область тяжелой

цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

В тридцать третьем варианте реализации первого аспекта указанное антитело, антитело к CCR2, фрагмент антитела к CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент к CCR2 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В тридцать четвертом варианте реализации первого аспекта антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

В тридцать пятом варианте реализации первого аспекта антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 содержат вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В тридцать шестом варианте реализации первого аспекта антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти- CCR2 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В тридцать седьмом варианте реализации первого аспекта антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти- CCR2 дополнительно содержат константную область тяжелой цепи, выбранную из иммуноглобулинов человека IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, и константные области тяжелой цепи IgA₂.

В тридцать восьмом варианте реализации первого аспекта антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 дополнительно содержат константную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из иммуноглобулинов человека IgGκ и константных областей легкой цепи IgGλ.

В тридцать девятом варианте реализации первого аспекта антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти- CCR2 связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, и вариабельный область легкой цепи SEQ ID NO: 1.

В сороковом варианте реализации первого аспекта антитело против CCR2 содержит участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 3.

В сорок первом варианте реализации первого аспекта антитело против CCR2 содержит область легкой цепи SEQ ID NO: 4.

В сорок втором варианте реализации первого аспекта антитело против CCR2 содержит участок тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и область легкой цепи SEQ ID NO: 4.

Во втором аспекте данное раскрытие относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по формуле (I) или его фармацевтически приемлемую соль и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

В первом варианте реализации второго аспекта фармацевтическая композиция содержит соединение по формуле (I) и антитело, которое связывает программированную гибель клеток 1 (PD-1, CD279, hSLE1 или SLEB2).

Во втором варианте реализации второго аспекта фармацевтическая композиция содержит соединение по формуле (I) и антитело, которое связывает лиганд программируемой гибели клеток 1 (PD-L1, CD274 или B7H1).

В третьем аспекте данное раскрытие обеспечивает способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтически приемлемого количества соединения по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

В первом варианте реализации третьего аспекта способ лечения рака включает введение субъекту фармацевтически приемлемого количества соединения по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли и антитела против PD-1.

Во втором варианте реализации третьего аспекта способ лечения рака включает введение субъекту фармацевтически приемлемого количества соединения по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли и антитела против PD-L1.

В третьем варианте реализации третьего аспекта соединение по формуле (I) или его фармацевтически приемлемую соль и антитело против PD-1 вводят одновременно.

В четвертом варианте реализации третьего аспекта соединение по формуле (I) или его фармацевтически приемлемую соль и антитело против PD-1 вводят последовательно.

В пятом варианте реализации третьего аспекта соединение по формуле (I) или его фармацевтически приемлемую соль и антитело против PD-L1 вводят одновременно.

В шестом варианте реализации третьего аспекта соединение по формуле (I) или его фармацевтически приемлемую соль и антитело против PD-L1 вводят последовательно.

В седьмом варианте реализации третьего аспекта способ дополнительно включает проведение лу-

чевой терапии у субъекта. В восьмом варианте реализации третьего аспекта облучение представляет собой лучевая терапия частиц. В девятом варианте реализации третьего аспекта облучение осуществляется внешним лучевым излучением.

В четвертом аспекте в данном раскрытии предложен способ стимуляции иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтически приемлемого количества соединения по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано получение конъюгатов агонистов Ab-STING через стохастическую конъюгацию цистеина.

На фиг. 2 показано получение конъюгатов агонистов Ab-STING через конъюгацию трансклутаминазы.

На фиг. 3 показано получение конъюгатов агонистов Ab-STING через конъюгацию трансклутаминазы.

На фиг. 4 показан фармакокинетический профиль мышинового конъюгата антитело-лекарственное средство В-14.

На фиг. 5 показан фармакокинетический профиль мышинового конъюгата антитело-лекарственное средство В-15.

На фиг. 6 показан фармакокинетический профиль мышинового конъюгата антитело-лекарственное средство В-16.

На фиг. 7 показан фармакокинетический профиль мышинового конъюгата антитело-лекарственное средство В-17.

На фиг. 8 показан фармакокинетический профиль мышинового конъюгата антитело-лекарственное средство В-18.

На фиг. 9 показано изменение массы тела с течением времени у мышей, которым вводили ADC В-17.

На фиг. 10 показано изменение массы тела с течением времени у мышей, которым вводили ADC В-20.

На фиг. 11 показана противоопухолевая активность конъюгата антитело-лекарственное средство В-21 по сравнению с противоопухолевой активностью только его полезной нагрузки.

На фиг. 12 показано изменение экспрессии CCR2 и CD80 в моноцитах и MDSC у приматов, отличных от человека, после введения дозы конъюгата антитело-лекарственное средство В-17.

На фиг. 13 показано изменение сывороточных IL-1RA, IL-6, TNF- α и IFN- γ у приматов, отличных от человека, после введения дозы конъюгата антитело-лекарственное средство В-17.

На фиг. 14 показан фармакокинетический профиль конъюгата антитело-лекарственное средство В-17 у приматов, отличных от человека.

Подробное описание

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится это раскрытие. Все патенты и публикации, упомянутые в данном документе, полностью включены в качестве ссылки.

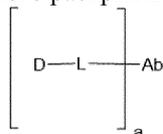
Формы единственного числа включают в себя ссылки во множественном числе, если явно не указано иное.

Используемый в данном документе термин "или" является логическим разделением (т.е. и/или) и не указывает на исключительное разделение, если явно не указано иное, например, с помощью терминов "либо", "кроме", "альтернативно" и слов с аналогичным эффектом.

Используемый в данном документе термин "около" относится к $\pm 10\%$.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

В некоторых вариантах реализации данного раскрытия предлагается соединение по формуле (I)



(I),

или его фармацевтически приемлемая соль, где

a является целым числом от 1 до 20;

Ab представляет собой антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2;

D представляет собой модулятор активности STING, содержащий аминокгруппу на основании гуанина, производном основания гуанина, основании аденина или производном основания аденина; и

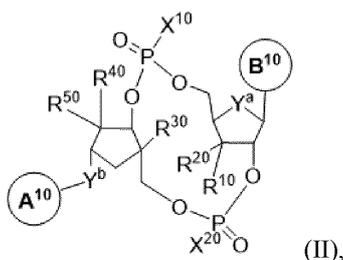
L представляет собой линкер, ковалентно связанный с Ab; a также ковалентно связанный с указан-

ной аминогруппой на D.

STING модулятор сегмент

Данное раскрытие относится к соединениям, содержащим модуляторы активности STING. В определенных вариантах реализации модулятор STING представляет собой соединение, которое воздействует на путь STING в качестве антагониста или агониста. В некоторых вариантах реализации модулятор STING представляет собой агонист. В определенных вариантах реализации модулятор STING содержит аминогруппу на основании гуанина, производном основания гуанина, основании аденина или производном основания аденина. В некоторых вариантах реализации модулятор STING представляет собой циклический динуклеотид или циклическое динуклеотидоподобное соединение (каждое, CDN).

В некоторых вариантах реализации модулятор STING представляет собой соединение по формуле (II)



или его фармацевтически приемлемую соль, где

X^{10} представляет собой -SH или -OH;

X^{20} представляет собой -SH или -OH;

Y^a представляет собой -O-, -S- или $-CH_2-$;

Y^b представляет собой -O-, -S-, -NH- или $-NR^a$, где R^a представляет собой C_1 - C_4 -алкил;

R^{10} представляет собой водород, фтор, -OH, $-NH_2$, $-OR^b$ или $-NHR^b$;

R^{20} представляет собой водород или фтор;

R^{30} представляет собой водород;

R^{40} представляет собой водород, фтор, -OH, $-NH_2$, $-OR^b$ или $-NHR^b$ или

R^{30} и R^{40} , взятые вместе, образуют $-CH_2O-$;

R^{50} представляет собой водород или фтор;

R^b представляет собой C_1 - C_6 -алкил, галогено(C_1 - C_6)-алкил или C_3 - C_6 -циклоалкил;

кольцо A^{10} представляет собой необязательно замещенное 5- или 6-членное моноциклическое гетероарильное кольцо, содержащее 1-4 гетероатома, выбранные из N, O или S, или необязательно замещенное 9- или 10-членное бициклическое гетероарильное кольцо, содержащее 1-5 гетероатомов, выбранных из N, O или S; причем кольцо A^{10} содержит по меньшей мере один атом N в кольце, и где Y^b присоединен к атому углерода кольца A^{10} ; и

кольцо B^{10} представляет собой необязательно замещенное 9- или 10-членное бициклическое гетероарильное кольцо, содержащее 2-5 гетероатомов, выбранных из N, O или S; причем кольцо B^{10} содержит по меньшей мере два атома N в кольце;

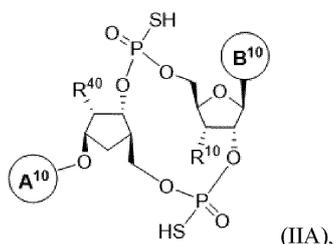
при условии, что кольцо A^{10} или кольцо B^{10} прикреплено к 'L' по формуле (I) через -NH-группу.

Как описано в данном документе, кольцо A^{10} и кольцо B^{10} могут содержать один или более заместителей и, таким образом, могут быть необязательно замещены. Подходящие заместители у ненасыщенного атома углерода гетероарильной группы включают и обычно выбираются из галогена, $-NO_2$, $-CN$, $-R^+$, $-C(R^+)=C(R^+)_2$, $-C\equiv C-R^+$, $-OR^+$, $-SR^+$, $-S(O)R^+$, $-SO_2R^+$, $-SO_3R^+$, $-SO_2N(R^+)_2$, $-N(R^+)_2$, $-NR^+C(O)R^+$, $-NR^+C(S)R^+$, $-NR^+C(O)N(R^+)_2$, $-NR^+C(S)N(R^+)_2$, $-N(R^+)C(=NR^+)-N(R^+)_2$, $-N(R^+)C(=NR^+)-R^+$, $-NR^+CO_2R^+$, $-NR^+SO_2R^+$, $-NR^+SO_2N(R^+)_2$, $-O-C(O)R^+$, $-O-CO_2R^+$, $-OC(O)N(R^+)_2$, $-C(O)R^+$, $-C(S)R^+$, $-CO_2R^+$, $-C(O)-C(O)R^+$, $-C(O)N(R^+)_2$, $-C(S)N(R^+)_2$, $-C(O)N(R^+)-OR^+$, $-C(O)N(R^+)C(=NR^+)-N(R^+)_2$, $-N(R^+)C(=NR^+)-N(R^+)-C(O)R^+$, $-C(=NR^+)-N(R^+)_2$, $-C(=NR^+)-OR^+$, $-N(R^+)-N(R^+)_2$, $-C(=NR^+)-N(R^+)-OR^+$, $-C(R^+)=N-OR^+$, $-P(O)(R^+)_2$, $-P(O)(OR^+)_2$, $-O-P(O)-OR^+$ и $-P(O)(NR^+)-N(R^+)_2$, где R^+ независимо представляет собой водород или необязательно замещенную алифатическую, арильную, гетероарильную, циклоалифатическую или гетероциклическую группу, или два независимых присутствия R^+ взяты вместе с их промежуточным атомом (ами) с образованием необязательно замещенного 5-7-членного арила, гетероарила, циклоалифатической группы или гетероцикла. В некоторых вариантах реализации R^+ независимо представляет собой водород, C_{1-6} алифатическую группу или C_{3-6} циклоалифатическую группу. Каждый R^+ независимо представляет собой необязательно замещенную алифатическую, арильную, гетероарильную, циклоалифатическую или гетероциклическую группу.

Как подробно описано выше, в некоторых вариантах реализации два независимых присутствия R^+ (или любой другой переменной, аналогично определенной в описании и формуле изобретения), взяты вместе с их промежуточным атомом (ами) с образованием моноциклического или бициклического кольца, выбранного из 3-13-членного циклоалифатического кольца, 3-12-членного гетероциклического, име-

ющего 1-5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы, 6-10-членного арила или 5-10-членного гетероарила, имеющего 1-5 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода или серы.

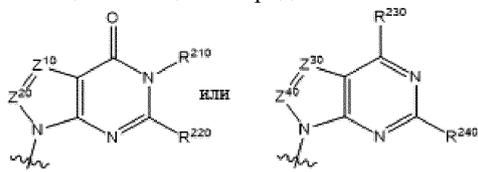
В некоторых вариантах реализации модулятор STING представляет собой соединение по формуле (IIA)



или его фармацевтически приемлемую соль, где R^{10} и R^{40} каждый независимо представляют собой водород, фтор, -ОН или $-OCH_2CF_3$ и кольца A^{10} и B^{10} имеют значения, указанные для соединения по формуле (II), при условии, что кольцо A^{10} или кольцо B^{10} присоединено к 'L' через -NH-группу.

В некоторых вариантах реализации кольцо A^{10} представляет собой необязательно замещенное 6-членное моноциклическое гетероарильное кольцо, содержащее 1, 2 или 3 атома азота.

В некоторых вариантах реализации кольцо B^{10} представляет собой



где

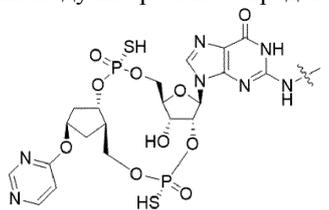
Z^{10} , Z^{20} , Z^{30} и Z^{40} каждый независимо представляют собой N или CR^{200} ;

R^{210} представляет собой водород или C_1 - C_6 -алкил, галогено(C_1 - C_6)алкил или C_3 - C_6 -циклоалкил;

R^{230} представляет собой водород или $-NH_2$ и

R^{200} , R^{220} и R^{240} каждый независимо представляет собой водород, галоген, -ОН, $-NH_2$, -CN, C_1 - C_6 алкил, галогено(C_1 - C_6)алкил или C_3 - C_6 циклоалкил.

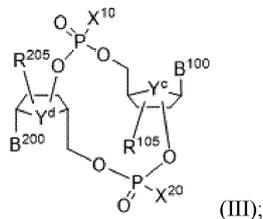
В некоторых вариантах реализации модулятор STING представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль, где

представляет собой точку присоединения к 'L' группе исходного молекулярного фрагмента.

В некоторых вариантах реализации модулятор STING представляет собой соединение по формуле (III)



или его фармацевтически приемлемую соль, где

X^{10} представляет собой SH или OH;

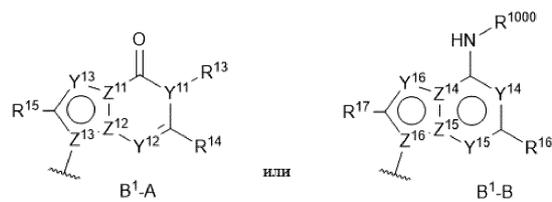
X^{20} представляет собой SH или OH;

Y^c представляет собой O, S или CH_2 ;

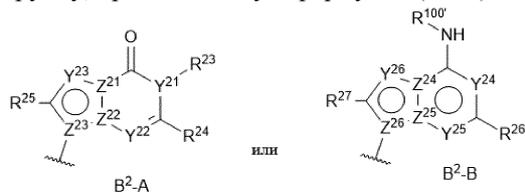
Y^d представляет собой O, S или CH_2 ;

R^{105} и R^{205} каждый независимо представляют собой водород или заместитель, где R^{105} и R^{205} каждый независимо присоединены ко 2- или 3-положению 5-членного кольца, к которому они присоединены соответственно;

B^{100} представляет собой группу, представленную формулой (B¹-A) или формулой (B¹-B)



R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} и R^{17} каждый независимо представляет собой атом водорода или заместитель;
 R^{1000} представляет собой водород или связь с карбонильной группой по формуле (I);
 Y^{11} , Y^{12} , Y^{13} , Y^{14} , Y^{15} и Y^{16} каждый независимо представляет собой N или CR^{1a} ;
 Z^{11} , Z^{12} , Z^{13} , Z^{14} , Z^{15} и Z^{16} каждый независимо представляет собой N или C;
 R^{1a} представляет собой атом водорода или заместитель;
 B^{200} представляет собой группу, представленную формулой (B^2-A) или формулой (B^2-B)



R^{23} , R^{24} , R^{25} , R^{26} и R^{27} , каждый независимо, представляет собой атом водорода или заместитель;
 R^{1000} представляет собой водород или связь с карбонильной группой по формуле (I);
 Y^{21} , Y^{22} , Y^{23} , Y^{24} , Y^{25} и Y^{26} каждый независимо представляет собой N или CR^{2a} ;
 Z^{21} , Z^{22} , Z^{23} , Z^{24} , Z^{25} и Z^{26} каждый независимо представляет собой N или C и
 R^{2a} представляет собой атом водорода или заместитель;

при условии, что один из B^{100} или B^{200} присоединен к карбонильной группе по формуле (I) через -NH-группу.

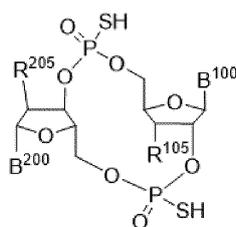
Как описано в данном документе, соединения по формуле (III) и по формуле (IIIa) (ниже) содержат заместители в определенных положениях. Подходящие заместители включают атом галогена, циано-группу, нитрогруппу, необязательно замещенную углеводородную группу, необязательно замещенную гетероциклическую группу, ацильную группу, необязательно замещенную аминогруппу, необязательно замещенную карбамоильную группу, необязательно замещенную тиокарбамоильную группу, необязательно замещенную сульфоамильную группу, необязательно замещенную гидроксигруппу, необязательно замещенную сульфанильную (SH) группу и необязательно замещенную силильную группу, где необязательно замещенные группы имеют один или несколько заместителей, выбранных из заместителей группы А:

"Заместитель группы А:"

- (1) атом галогена,
- (2) нитрогруппа,
- (3) цианогруппа,
- (4) оксогруппа,
- (5) гидроксигруппа,
- (6) необязательно галогенированную C_{1-6} алкоксигруппу,
- (7) C_{6-14} арилоксигруппу (например, фенокси, нафтокси),
- (8) C_{7-16} аралкилоксигруппу (например, бензилокси),
- (9) 5-14-членную ароматическую гетероциклилокси группу (например, пиридилокси),
- (10) 3-14-членную неароматическую гетероциклилокси группу (например, морфолинолокси, пиперидинолокси),
- (11) C_{1-6} алкилкарбонилксигруппу (например, ацетокси, пропаноилокси),
- (12) C_{6-14} арилкарбонилксигруппу (например, бензоилокси, 1-нафтоилокси, 2-нафтоилокси),
- (13) C_{1-6} алкоксикарбонилксигруппу (например, метоксикарбонилкси, этоксикарбонилкси, пропоксикарбонилкси, бутоксикарбонилкси),
- (14) моно- или ди- C_{1-6} алкилкарбамоилоксигруппу (например, метилкарбамоилокси, этилкарбамоилокси, диметилкарбамоилокси, диэтилкарбамоилокси),
- (15) C_{6-14} арилкарбамоилоксигруппу (например, фенолкарбамоилокси, нафтилкарбамоилокси),
- (16) 5-14-членную ароматическую гетероциклилкарбонилксигруппу (например, никотиноилокси),
- (17) 3-14-членную неароматическую гетероциклилкарбонилксигруппу (например, морфолинилкарбонилкси, пиперидинилкарбонилкси),
- (18) необязательно галогенированную C_{1-6} алкилсульфонилоксигруппу (например, метилсульфонилокси, трифторметилсульфонилокси),
- (19) C_{6-14} арилсульфонилокси группу, необязательно замещенную C_{1-6} алкильной группой (например, фенолсульфонилокси, толуолсульфонилокси)

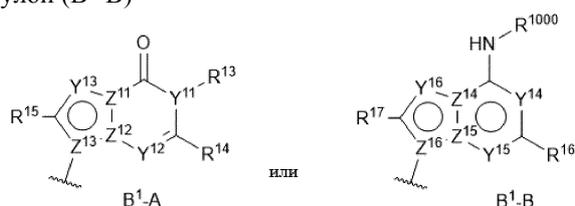
- (20) необязательно галогенированную C_{1-6} алкилтиогруппу,
- (21) 5-14-членную ароматическую гетероциклическую группу,
- (22) 3-14-членную неароматическую гетероциклическую группу,
- (23) формильную группу,
- (24) карбоксигруппу,
- (25) необязательно галогенированную C_{1-6} алкилкарбонильную группу,
- (26) C_{6-14} арилкарбонильную группу,
- (27) 5-14-членную ароматическую гетероциклическую карбонильную группу,
- (28) 3-14-членную неароматическую гетероциклическую карбонильную группу,
- (29) C_{1-6} алкоксикарбонильную группу,
- (30) C_{6-14} арилоксикарбонильную группу (например, фенилоксикарбонил, 1-нафтилоксикарбонил, 2-нафтилоксикарбонил),
- (31) C_{7-16} аралкилоксикарбонильную группу (например, бензилоксикарбонил, фенетилоксикарбонил),
- (32) карбамоильную группу,
- (33) тиокарбамоильную группу,
- (34) моно- или ди- C_{1-6} алкилкарбамоильную группу,
- (35) C_{6-14} арилкарбамоильную группу (например, фенилкарбамоил),
- (36) 5-14-членную ароматическую гетероциклическую карбамоильную группу (например, пиридилкарбамоил, тиенилкарбамоил),
- (37) 3-14-членную неароматическую гетероциклическую карбамоильную группу (например, морфолинилкарбамоил, пиперидинилкарбамоил),
- (38) необязательно галогенированную C_{1-6} алкилсульфонильную группу,
- (39) C_{6-14} арилсульфонильную группу,
- (40) 5-14-членную ароматическую гетероциклическую сульфонильную группу (например, пиридилсульфонил, тиенилсульфонил),
- (41) необязательно галогенированную C_{1-6} алкилсульфинильную группу,
- (42) C_{6-14} арилсульфинильную группу (например, фенилсульфинил, 1-нафтилсульфинил, 2-нафтилсульфинил),
- (43) 5-14-членную ароматическую гетероциклическую сульфонильную группу (например, пиридилсульфинил, тиенилсульфинил),
- (44) аминогруппу,
- (45) моно- или ди- C_{1-6} алкиламиногруппу (например, метиламино, этиламино, пропиламино, изопропиламино, бутиламино, диметиламино, диэтиламино, дипропиламино, дибутиламино, N-этил-N-метиламино),
- (46) моно- или ди- C_{6-14} ариламиногруппу (например, фениламино),
- (47) 5-14-членную ароматическую гетероциклическую аминаминогруппу (например, пиридиламино),
- (48) C_{7-16} аралкиламиногруппу (например, бензиламино),
- (49) формиламиногруппу,
- (50) C_{1-6} алкилкарбониламиногруппу (например, ацетиламино, пропаноиламино, бутаноиламино),
- (51) (C_{1-6} алкил)(C_{1-6} алкиларбонил) аминогруппу (например, N-ацетил-N-метиламино),
- (52) C_{6-14} арилкарбониламиногруппу (например, фенилкарбониламино, нафтилкарбониламино),
- (53) C_{1-6} алкоксикарбониламиногруппу (например, метоксикарбониламино, этоксикарбониламино, пропоксикарбониламино, бупоксикарбониламино, трет-бупоксикарбониламино),
- (54) C_{7-16} аралкилоксикарбониламиногруппу (например, бензилоксикарбониламино),
- (55) C_{1-6} алкилсульфониламиногруппу (например, метилсульфониламино, этилсульфониламино),
- (56) C_{6-14} арилсульфониламиногруппу, необязательно замещенную C_{1-6} алкильной группой (например, фенилсульфониламино, толуолсульфониламино),
- (57) необязательно галогенированную C_{1-6} алкильную группу,
- (58) C_{2-6} алкенильную группу,
- (59) C_{2-6} алкинильную группу,
- (60) C_{3-10} циклоалкильную группу,
- (61) C_{3-10} циклоалкенильную группу,
- (62) C_{6-14} арильную группу.

В некоторых вариантах реализации модулятор STING представляет собой соединение по формуле (IIIa) или его фармацевтически приемлемую соль

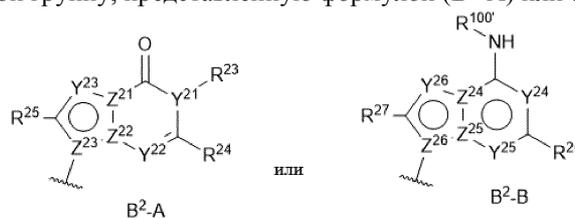


(IIIa);

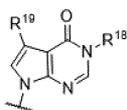
или его фармацевтически приемлемую соль, где B^{100} представляет собой группу, представленную формулой (B¹-A) или формулой (B¹-B)



R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} и R^{17} , каждый независимо, представляет собой атом водорода или заместитель;
 R^{1000} представляет собой водород или связь с карбонильной группой по формуле (I);
 Y^{11} , Y^{12} , Y^{13} , Y^{14} , Y^{15} и Y^{16} каждый независимо представляет собой N или CR^{1a} , где R^{1a} представляет собой водород или заместитель;
 Z^{11} , Z^{12} , Z^{13} , Z^{14} , Z^{15} и Z^{16} каждый независимо представляет собой N или C;
 R^{105} представляет собой атом водорода или заместитель;
 B^{200} представляет собой группу, представленную формулой (B²-A) или формулой (B²-B)



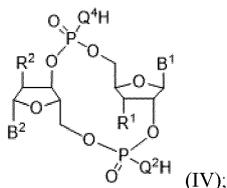
R^{23} , R^{24} , R^{25} , R^{26} и R^{27} каждый независимо представляет собой атом водорода или заместитель;
 R^{1000} представляет собой водород или связь с карбонильной группой по формуле (I);
 Y^{21} , Y^{22} , Y^{23} , Y^{24} , Y^{25} и Y^{26} каждый независимо представляет собой N или CR^{2a} , где R^{2a} представляет собой водород или заместитель;
 Z^{21} , Z^{22} , Z^{23} , Z^{24} , Z^{25} и Z^{26} каждый независимо представляет собой N или C и
 R^{205} представляет собой атом водорода или заместитель; где R^{105} и R^{205} каждый независимо присоединен к 2- или 3-положению 5-членного кольца, к которому они присоединены соответственно;
при условии, что
один из B^{100} или B^{200} представляет собой



где

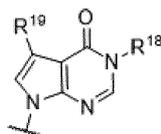
 R^{18} представляет собой водород или C_{1-6} алкил и R^{19} представляет собой атом галогена;

а другой присоединен к карбонильной группе по формуле (I) через группу -NH-. В некоторых вариантах реализации модулятор STING представляет собой соединение по формуле (IV) или его фармацевтически приемлемую соль

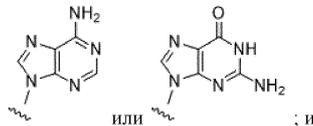


или его фармацевтически приемлемую соль, где

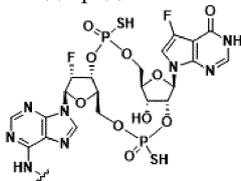
 R^1 и R^2 каждый независимо представляет собой гидроксигруппу или атом галогена; B^1 представляет собой



R^{18} представляет собой водород или C_{1-6} алкил;
 R^{19} представляет собой атом галогена;
 B^2 представляет собой



каждый из Q^2 и Q^4 независимо представляет собой атом кислорода или атом серы. В некоторых вариантах реализации циклический бинуклеотид представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль, где L представляет собой точку 'L'.

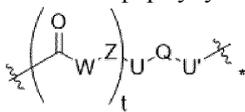
Линкерная часть

Группа "L" представляет собой линкер. Используемый в данном документе термин "линкер" относится к любому химическому фрагменту, способному связывать антитело, фрагмент антитела или антигенсвязывающий фрагмент (Ab) с фрагментом, содержащим лекарственное средство, в соединениях по формуле (I) и (IV). Линкер может быть разветвленным и может быть замещен от 1 до 20 фрагментами, содержащими лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации линкер может быть замещен от 1 до 10 фрагментами, содержащими лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации линкер может быть замещен от 1 до 5 фрагментами, содержащими лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации линкер может быть замещен одним или двумя фрагментами, содержащими лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации линкер может быть замещен одним фрагментом, содержащим лекарственное средство.

В некоторых вариантах реализации линкер "L" представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах реализации линкер может быть чувствительным к кислотно-индуцированному расщеплению, фотоиндуцированному расщеплению, ферментативному расщеплению и т.п. в условиях, при которых лекарственное средство и/или антитело могут оставаться активными. В некоторых вариантах реализации расщепляемый линкер можно расщеплять ферментативно. В некоторых вариантах реализации расщепляемый линкер может расщепляться протеазой, пептидазой, эстеразой, гликозидазой, фосфодиэстеразой, фосфатазой или липазой. В некоторых вариантах реализации расщепляемый линкер может расщепляться протеазой. Примеры протеаз включают, но не ограничиваются ими, катепсин В, тетрапептид VAGP и т.п.

В некоторых вариантах реализации линкер может быть любым из линкеров, раскрытых в публикациях PCT WO 2018/200812, WO 2018/100558, которые полностью включены посредством ссылки.

В некоторых вариантах реализации "L" имеет формулу

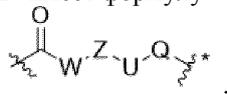


где

\sim представляет собой точку присоединения к атому азота и

\sim^* представляет собой точку присоединения к Ab.

В некоторых вариантах реализации "L" имеет формулу



где

\sim представляет собой точку присоединения к атому азота;

* представляет собой точку присоединения к антителу.

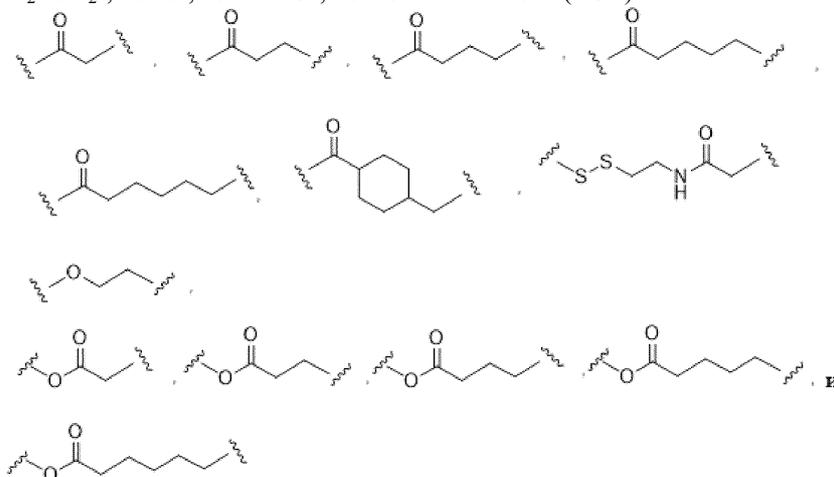
Группа "W" отсутствует или представляет собой саморасщепляющуюся группу. Используемый в данном документе термин "саморасщепляющаяся" относится к группе, которая подвергается электронному каскаду, приводящему к высвобождению группы, к которой она присоединена. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющаяся группа включает одну или более групп, которые могут подвергаться 1,4-элиминированию, 1,6-элиминированию, 1,8-элиминированию, 1,6-циклизации-элиминированию, 1,5-циклизации-элиминированию, 1,3-циклизации-элиминированию, внутримолекулярной 5-экзотриггерной циклизации и/или 6-экзотриггерной циклизации. В некоторых вариантах реализации саморасщепляющаяся группа может быть любой из тех, что раскрыты в публикациях PCT WO 2018/200812, WO 2018/100558, которые полностью включены посредством ссылки.

Группа "Z" отсутствует или представляет собой пептид из 2-5 аминокислот. В некоторых вариантах реализации пептид представляет собой участок расщепления линкера, что способствует высвобождению лекарственного средства при воздействии внутриклеточных протеаз, таких как лизосомальные ферменты (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784). Примеры пептидов, содержащих две аминокислоты, включают, но не ограничиваются ими, аланин-аланин (Ala-Ala), валин-аланин (VA или Val-Ala), валин-цитруллин (VC или Val-Cit), аланин-фенилаланин (AF или Ala-Phe); фенилаланин-лизин (FK или Phe-Lys); фенилаланин-гомолизин (Phe-Homolys); и N-метил-валин-цитруллин (Me-Val-Cit). Примеры пептидов, содержащих три аминокислоты, включают, но не ограничиваются ими, глицин-валин-цитруллин (Gly-Val-Cit) и глицин-глицин-глицин (Gly-Gly-Gly). Комбинации аминокислот, указанные выше, также могут присутствовать в обратном порядке (т.е. Cit-Val).

Пептиды по данному раскрытию могут содержать природные и/или не природные аминокислотные остатки. Термин "природная аминокислота" относится к Ala, Asp, Cys, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp и Tyr. "Неприродные аминокислоты" (т.е. аминокислоты, не встречающиеся в природе) включают, в качестве неограничивающего примера, гомосерин, гомоаргинин, цитруллин, фенилглицин, таурин, йодтирозин, селеноцистеин, норлейцин ("Me"), норвалин ("Nva"), бета-аланин, L- или D-нафталанин, орнитин ("Orn") и т.п. Пептиды могут быть сконструированы и оптимизированы для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, ассоциированной с опухолью протеазой, катепсином B, C и D или протеазой плазмينا.

Аминокислоты также включают D-формы природных и неприродных аминокислот. "D-" обозначает аминокислоту, имеющую "D" (правовращающую) конфигурацию, в отличие от конфигурации в встречающихся в природе ("L-") аминокислотах. Природные и неприродные аминокислоты можно приобрести коммерчески (Sigma Chemical Co., Advanced Chemtech) или синтезировать с использованием способов, известных в данной области.

Группы "U" и "U'" независимо отсутствуют или являются спейсером. Используемый в данном документе термин "спейсер" относится к химическому фрагменту, который служит соединителем. В данном раскрытии спейсер может соединять антитело, фрагмент антитела или фрагмент антигена с гетеробифункциональной группой и/или соединять гетеробифункциональную группу с пептидом "Z" или, когда "Z" отсутствует, с группой "W". Не-ограничивающие примеры спейсеров включают -NH-, -S-, -O-, -NHC(=O)CH₂CH₂-, -S(=O)₂-CH₂CH₂-, -C(=O)NHNH-, -C(=O)O-, -C(=O)NH-, -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂=CH₂-, -C=C-, -CH=N-O-, полиэтиленгликоль (ПЭГ)

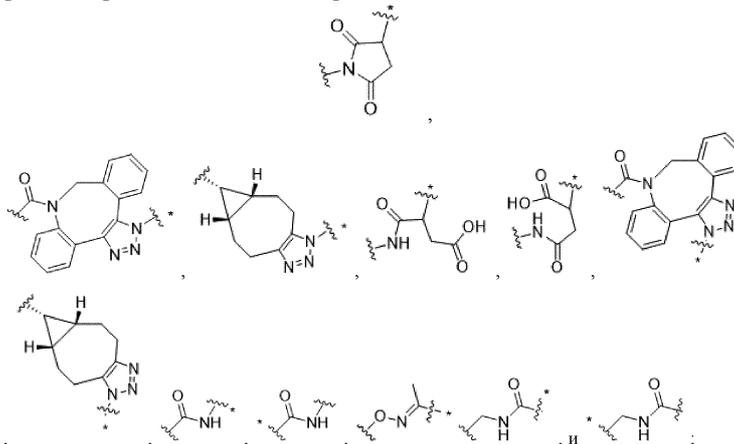


В соединениях данного раскрытия, когда "U" присутствует, то может быть разветвленной группой, замещенной от 1 до 10 "-C(O)-W-Z-" группами. В некоторых вариантах реализации "U" замещена от 1 до 5 "-C(O)-W-Z-" группами. В некоторых вариантах реализации "U" замещена от 1 до 2 "-C(O)-W-Z-" группами. В некоторых вариантах реализации "U" замещена 1 "-C(O)-W-Z-" группой. В некоторых вари-

антах реализации спейсер может быть любым из спейсеров, раскрытых в публикациях РСТ WO 2018/200812, WO 2018/100558, которые полностью включены посредством ссылки.

Группа "Q" представляет собой гетеробифункциональную группу. В данном раскрытии термин "гетеробифункциональная группа" относится к химическому фрагменту, который соединяет линкер, частью которого он является, с антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим фрагментом. См., например, WO 2017/191579. Гетеробифункциональные группы характеризуются наличием разных реакционноспособных групп на обоих концах химического фрагмента. Гетеробифункциональная группа может быть присоединена непосредственно к "Ab" или, в альтернативном варианте, может соединяться через линкер "U". Присоединение к "Ab" может осуществляться химическими или ферментативными методами. Химическая конъюгация включает контролируемую реакцию доступных аминокислотных остатков на поверхности антитела с меткой реакции на "Q" или "U". Примеры химической конъюгации включают, но не ограничиваются ими, связывание лизин-амида, связывание цистеина и связывание с помощью не природной аминокислоты, введенной с помощью геной инженерии, где не природные аминокислотные остатки с желаемой реакционной меткой устанавливаются на "Ab". При ферментативной конъюгации фермент опосредует связывание линкера с доступным аминокислотным остатком на антителе, фрагменте антитела или антигенсвязывающем фрагменте. Примеры ферментативной конъюгации включают, но не ограничиваются ими, транспептидацию с использованием сортазы, транспептидацию с использованием микробной трансклутаминазы и инженерии N-гликанов. Химическая конъюгация и ферментативная конъюгация также могут использоваться последовательно. Например, ферментативная конъюгация также может быть использована для установки уникальных маркеров реакции на "Ab", которые будут использоваться в последующей химической конъюгации. В некоторых вариантах реализации гетеробифункциональная группа может быть любой из тех, что раскрыты в публикациях РСТ WO 2018/200812, WO 2018/100558, которые полностью включены посредством ссылки.

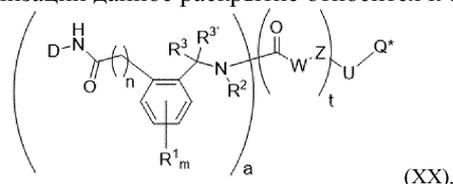
В некоторых вариантах реализации "Q" выбран из



где \sim представляет собой точку присоединения к U или, когда U отсутствует, точку присоединения к Z и

\sim^* представляет собой точку присоединения к U' или, когда U' отсутствует, точку присоединения к Ab.

В некоторых вариантах реализации данное раскрытие относится к соединению по формуле (XX)



или его фармацевтически приемлемой соли, где n, m, a, t, D-NH-, R¹, R², R³, R^{3'}, W, Z и U имеют значения, указанные в данном документе, и где Q* представляет собой реакционноспособную функциональную группу, способную к конъюгированию с антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим фрагментом. Примеры подходящих групп Q* включают, но не ограничиваются ими, группы активированных карбоновых кислот, такие как хлорангидрид -C(O)-Cl и ангидриды кислот, галогенацетамид, малеимид, алкин, циклоалкин, такой как циклооктин, оксаноборадиен, норборнен, азид, диарилтетразин, моноарилтетразин, альдегид, кетон, гидроксилламин, винилсульфон и азиридины. В некоторых вариантах реализации реакционноспособная функциональная группа может быть любой из тех, что раскрыты в публикациях РСТ WO 2018/200812, WO 2018/100558, которые полностью включены посредством ссылки.

Антитела против CCR2, фрагменты антител и антигенсвязывающие фрагменты

Группа "Ab" представляет собой антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2. Антитело представляет собой белок, вырабатываемый иммунной системой, который способен распознавать и связываться с конкретным антигеном. Антиген-мишень обычно имеет множество сайтов связывания, также называемых эпитопами, распознаваемых CDR на множестве антител. Каждое антитело, которое специфически связывается с разными эпитопами, имеет разную структуру. Таким образом, один антиген может иметь более одного соответствующего антитела. Термин "антитело" в данном документе используется в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела, однодоменные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность. Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, химерными или происходить от других видов. (Janeway C, Travers P., Walport M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York).

Полезные антитела против CCR2, фрагменты антител и антигенсвязывающие фрагменты включают антитело (иммуноглобулин) или его функциональный фрагмент (например, антигенсвязывающий фрагмент), которое связывается с СС-хемокиновым рецептором 2 млекопитающих (также обозначаемым как CCR2, СКR-2, CD192, MCP-1RA или MCP-1RB) или частью рецептора. В одном варианте реализации антитело или его фрагмент обладают специфичностью в отношении CCR2 человека или резуса или его части. В другом варианте реализации антитело или его фрагмент блокирует связывание лиганда (например, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4) с рецептором и ингибирует функцию, связанную со связыванием лиганда с рецептором (например, транспорт лейкоцитов). Например, как описано в данном документе, антитела и их фрагменты, применимые в данном раскрытии, связывают CCR2 человека или резуса или его часть и могут блокировать связывание хемокина (например, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4) к рецептору и ингибируют функцию, связанную со связыванием хемокина с рецептором. В одном варианте реализации антитело представляет собой моноклональное антитело (mAb) LS132.1D9 (1D9) или антитело, которое может конкурировать с 1D9 за связывание с CCR2 человека или частью CCR2 человека. Предусмотрены также функциональные фрагменты вышеуказанных антител.

В некоторых вариантах реализации используется гуманизированный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью связывания в отношении CCR2, причем указанный иммуноглобулин содержит антигенсвязывающую область нечеловеческого происхождения (например, грызуна) и по меньшей мере часть иммуноглобулина человеческого происхождения (например, каркасная область человека, константная область человека гамма-типа). В одном варианте реализации гуманизированный иммуноглобулин или его фрагмент могут конкурировать с 1D9 за связывание с CCR2. В одном варианте реализации антигенсвязывающая область гуманизированного иммуноглобулина получена из моноклонального антитела 1D9 (например, иммуноглобулина, содержащего вариабельные области легкой и тяжелой цепей, как показано ниже).

Например, гуманизированный иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать антигенсвязывающую область, содержащую по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) нечеловеческого происхождения, и каркасную область (FR), полученную из каркасной области человека. В одном аспекте гуманизированный иммуноглобулин, обладающий специфичностью связывания в отношении CCR2, содержит легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну CDR, полученную из антитела нечеловеческого происхождения, которое связывает CCR2, и FR, полученную из легкой цепи человеческого происхождения (например, из HF-21/28), и тяжелую цепь, содержащую CDR, полученную из антитела нечеловеческого происхождения, которое связывает CCR2, и FR, полученную из тяжелой цепи человеческого происхождения (например, из 4B4'CL). В другом аспекте легкая цепь содержит три CDR, полученных из легкой цепи антитела 1D9, а тяжелая цепь содержит три CDR, полученных из тяжелой цепи антитела 1D9.

В одном варианте реализации гуманизированный иммуноглобулин, обладающий специфичностью связывания в отношении CCR2, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела 1D9 и FR легкой цепи человека и содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела 1D9, и FR тяжелой цепи человека. В одном варианте реализации гуманизированный иммуноглобулин содержит гуманизированные тяжелую и легкую цепи, описанные в настоящем документе (например, гуманизированная легкая цепь, содержащая вариабельную область легкой цепи, показанную ниже, гуманизированная тяжелая цепь, содержащая вариабельную область тяжелой цепи, показанную ниже). Также охватываются гуманизированные иммуноглобулины, содержащие одну или несколько гуманизированных легких и/или тяжелых цепей.

Ниже показана аминокислотная последовательность вариабельной области легкой каппа-цепи (VL) гуманизированного антитела 1D9.

CDR выделены жирным шрифтом

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTFLNW FQQRPGQSPR
 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP
 YTFGQGTRLE IK. (SEQ ID NO: 1)

Ниже показана аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи (VH) гуманизированного антитела 1D9. CDR выделены жирным шрифтом

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **AYAMNWVRQA** PGKGLEWVGR
IRTKNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCTT
 FYGNGVWGQG TLVTVSS. (SEQ ID NO: 2)

В некоторых вариантах реализации антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 содержит CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислоты 24-39 SEQ ID NO: 1; CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислоты 55-61 SEQ ID NO: 1; CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислоты 94-102 SEQ ID NO: 1; CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислоты 31-35 SEQ ID NO:2; CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислоты 50-68 SEQ ID NO:2; и CDR3 тяжелой цепи, содержащей аминокислоты 101-106 SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 содержат вариательную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 содержат вариательную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации антитело к CCR2, фрагмент антитела к CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 содержат вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, где вариательная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 содержат вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, причем вариательная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 содержат вариательную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариательную область легкой цепи, где вариательная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах реализации антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 дополнительно содержат константную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах реализации константная область тяжелой цепи выбрана из константных областей тяжелой цепи иммуноглобулинов IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂.

В некоторых вариантах реализации антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 дополнительно содержат константную область легкой цепи. В некоторых вариантах реализации константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей легкой цепи иммуноглобулинов IgGκ и IgGλ.

В некоторых вариантах реализации антитело против CCR2, фрагмент антитела против CCR2 или антигенсвязывающий фрагмент анти-CCR2 связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее вариательную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, и вариательную область легкой цепи SEQ ID NO: 1.

"Процентная идентичность" относится к степени идентичности между двумя последовательностями (например, последовательностями аминокислот или последовательностями нуклеиновых кислот). Процентная идентичность может быть определена путем выравнивания двух последовательностей с введением промежутков для максимизации идентичности между последовательностями. Совмещения могут быть созданы с использованием программ, известных в данной области техники. Для целей данного документа выравнивание нуклеотидных последовательностей может быть выполнено с помощью программы blastp с параметрами по умолчанию, а выравнивание аминокислотных последовательностей может быть выполнено с помощью программы blastp с параметрами по умолчанию (см. Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети, ncbi.nlm.nih.gov).

Антитело CCR2, которое "связывается с тем же эпитопом", что и эталонное антитело CCR2, относится к антителу, которое связывается с теми же аминокислотными остатками CCR2, что и эталонное антитело CCR2. Способность антитела CCR2 связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело CCR2, определяют с помощью анализа обмена водорода/дейтерия (см. Coales et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009; 23: 639-647).

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связывается с CCR2 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, и содержит VH, содержащую последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности VH SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую последовательность, по меньшей

SEQ ID NO: 1, и связывается с CCR2 человека, яванского макака, крысы и/или мыши.

В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связывается с CCR2 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 (т.е. три VH CDR SEQ ID NO: 2, и три VL CDR SEQ ID NO: 1) и содержит VH, содержащую последовательность, по меньшей мере на 96% идентичную последовательности VH SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую последовательность, по меньшей мере на 96% идентичную последовательности VL SEQ ID NO: 1, и связывается с CCR2 человека, яванского макака, крысы и/или мыши. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связывается с CCR2 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 (т.е. три VH CDR SEQ ID NO: 2, и три VL CDR SEQ ID NO: 1) и содержит VH, содержащую последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную последовательности VH SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую последовательность, по меньшей мере на 97% идентичную последовательности VL SEQ ID NO: 1, и связывается с CCR2 человека, яванского макака, крысы и/или мыши. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связывается с CCR2 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 (т.е. три VH CDR SEQ ID NO: 2, и три VL CDR SEQ ID NO: 1) и содержит VH, содержащую последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности VH SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую последовательность, по меньшей мере на 98% идентичную последовательности VL SEQ ID NO 1, и связывается с CCR2 человека, яванского макака, крысы и/или мыши. В некоторых вариантах реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, связывается с CCR2 человека, содержит шесть CDR антитела, перечисленных в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 (т.е. три VH CDR SEQ ID NO: 2, и три VL CDR SEQ ID NO: 1) и содержит VH, содержащую последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности VH SEQ ID NO: 2, и VL, содержащую последовательность, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности VL SEQ ID NO 1, и связывается с CCR2 человека, яванского макака, крысы и/или мыши.

В некоторых вариантах реализации соединение по формуле (I) комбинируют с антителом, фрагментом антитела или антигенсвязывающим фрагментом антитела, которое связывает PD-1, и/или антителом, фрагментом антитела и/или антигенсвязывающим фрагментом антитела который связывает PD-L1. PD-1 представляет собой белок контрольной точки иммунного ответа, экспрессируемый на активированных Т-клетках, В-клетках и моноцитах, который при связывании своего лиганда PD-L1 регулирует иммунную систему, например, стимулируя апоптоз антиген-специфических Т-клеток и уменьшая апоптоз регуляторных Т-клеток. PD-L1 может экспрессироваться опухолями, чтобы помочь опухолям избежать обнаружения и устранения иммунной системой. Антагонистическое ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 благоприятно увеличивает активацию Т-клеток и усиливает распознавание и элиминацию опухолевых клеток иммунной системой. В определенных вариантах реализации антитело против PD-1 выбрано из группы, состоящей из пембролизумаба, ниволумаба, цемиплимаба, пимивалимаба, спартализумаба, камрелизумаба, синтилимаба, тислелизумаба, торипалимаба, достарлимаба, эзабенлимаба, INCMGA0012, AMP-224, AMP-514, SYM-021, LZM-009, CS-1003, SYN-125, GNR-051, MW-11, TY-101, BAT-1306, F520, сасанлимаба, пенпулимаба, пукотенлимаба, CX-188, зимберелимаба и теботелимаба, или антителом, которое может конкурировать с пембролизумабом, ниволумабом, цемиплимабом, пимивалимабом, спартализумабом, камрелизумабом, синтилимабом, тислелизумабом, торипалимабом, достарлимабом, эзабенлимабом, INCMGA0012, AMP-224, AMP-514, SYM-021, LZM-009, CS-1003, SYN-125, GNR-051, MW-11, TY-101, BAT-1306, F520, сасанлимабом, пенпулимабом, пукотенлимабом, CX-188, зимберелимабом или теботелимабом для связывания с человеческим PD-1 или частью PD-1.

В некоторых вариантах реализации антитело против PD-1 представляет собой пембролизумаб.

В определенных вариантах реализации антитело против PD-L1 выбрано из группы, состоящей из атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, косибелимаба, MSB-2311, ZKAB-001, FAZ-053, MDX-1105, CBT-502, IMC-001, RC-98, KL-A167, GR-1405, лодаполимаба, сугемалимаба, энвафолимаба, опуколимаба и гаривулимаба, или антитела, которое может конкурировать с атезолизумабом, авелумабом, дурвалумабом, косибелимабом, MSB-2311, ZKAB-001, FAZ-053, MDX -1105, CBT-502, IMC-001, RC-98, KL-A167, GR-1405, лодаполимабом, сугемалимабом, энвафолимабом, опуколимабом или гаривулимабом для связывания с PD-L1 человека или частью PD-L1.

В некоторых вариантах реализации антитело против PD-L1 представляет собой атезолизумаб.

Другими антителами против PD-1, применимыми в комбинации с соединением по формуле (I), являются NAT 105 (abcam ab5287); CAL20 (abcam ab237728); EPR20665 (abcam ab214421); NAT105-chimeric (abcam ab216352); EPR4877(2) (abcam ab137132); EP23119-111 (abcam ab 243644); SP269 (abcam ab227681); PDCD1/1410R (abcam ab218475); EH12.22H7 (abcam ab 223562); PDCD1/922 (abcam ab216037); J43 (abcam ab95789); J43.1 (abcam ab 218768); SPM597 (abcam ab218474); J116 (abcam ab171267); RMP1-14 (abcam ab171265); EPR18017-203 (abcam ab242810); EPR18017-253 (abcam ab242562); EPR22234-127 (abcam ab259656); EPR22234-42 (abcam ab259655); MAB10861 (R&D Systems); MAB10864 (R&D Systems); MAB1086 (R&D Systems); MAB10863 (R&D Systems); MAB8578 (R&D Systems); MAB77381 (R&D Systems); MAB7738 (R&D Systems); MAB10866 (R&D Systems); MAB10865

(R&D Systems); MAB10867 (R&D Systems); SJ01-91 (HUABIO); 1F2 (HUABIO); 3A11 PD-1 blocking Ab (HUABIO); J43 (MyBioSource); RMP1-30 (MyBioSource); 8A1 (BIOSS Inc.); BSR1 (Abeomics); PDCD1/922 (Abeomics); PD1.3.1.3 (Miltenyi Biotec); abx174170 (Abxexa); PDCD1 (Fitzgerald Industries Intl.); J116 (United States Biological); BSR1 (Nordic BioSite); PDCD1 (BosterBio); 10B3 (ProSci Inc.); 4C7 (ProSci Inc.); mhT28 blocking (Sino Biological Inc.); HF06 neutralizing (Sino Biological Inc.); или ТК12-02 (Creative Diagnostics) или антитело, которое может конкурировать с любым из вышеуказанных антител за связывание с PD-1 или частью PD-1.

Другими антителами против PD-L1, применимыми в комбинации с соединением по формуле (I), являются 28-8 (abcam ab205921); EPR19759 (abcam ab213524); CAL10 (abcam ab237726); 73-10 (abcam ab228415); EPR20529 (abcam ab213480); SP142 (abcam ab228462); BLR020E (abcam ab243877); RM1012 (abcam ab282458); EPR23546-160 (abcam ab252436); ABM4E54 (abcam ab210931); PDL1/2744 (abcam ab269674); MIH5 (abcam ab269253); 29E.2A3 (abcam ab259283); MIH6 (abcam ab80276); BMS-5-28 (abcam ab278010); EPR23939-25 (abcam ab278009); MAB1561 (R&D Systems); MAB90871 (R&D Systems); MAB1562 (R&D Systems); MAB90783 (R&D Systems); MAB10348 (R&D Systems); MAB1561R (R&D Systems); MAB9078 (R&D Systems); MAB10355 (R&D Systems); MIH1 (Invitrogen); MIH5 (Invitrogen); RM320 (Invitrogen); JJ08-95 (Invitrogen); 485 (Invitrogen); MA5-37856 (Invitrogen); 10D4 (Invitrogen); 15 (Invitrogen); 1-111A (Invitrogen); 2B11D11 (Proteintech); OTI2C7 (OriGene); UMAB228 (OriGene); OR-5H8 (OriGene); OTI9E12 (OriGene); UMAB229 (OriGene); OTI11G4 (OriGene); OTI2C11 (OriGene); OTI14H4 (OriGene); OTI7D4 (OriGene); OTI9E1 (OriGene); OTI11G4 (OriGene); OTI2F5 (OriGene); OTI9A5 (OriGene); OTI3F5 (OriGene); OTI4G4 (OriGene); OTI9E5 (OriGene); OTI13G7 (OriGene); OTI9E10 (OriGene); OTI20G10 (OriGene); OR-5E3 (OriGene); OTI4D4 (OriGene); OTI13D11 (OriGene); OTI8C8 (OriGene); OTI16H9 (OriGene); OTI12G7 (OriGene); OTI1B12 (OriGene); OTI2E3 (OriGene); OTI2B12 (OriGene); OR-5E4 (OriGene); BLR020E (Bethyl Laboratories); 3F2 (Abnova); 3D2 (Abnova); 2E6 (Abnova); 2E11 (Abnova); 1H3 (Abnova); 2C4 (Abnova); Ac10 (Abnova); 3C10 (Abnova); или 4C11 (Abnova) или антитело, которое может конкурировать с любым из вышеуказанных антител за связывание с PD-L1 или частью PD-L1.

Используемый в данном документе термин "антитело" также относится к полноразмерной молекуле иммуноглобулина или иммунологически активной части полноразмерной молекулы иммуноглобулина, то есть к молекуле, которая содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывает антиген мишени, представляющие интерес или его часть, такие мишени, включая, но не ограничиваясь ими, раковые клетки или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, связанные с аутоиммунным заболеванием. Раскрытый в данном документе иммуноглобулин может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина. Иммуноглобулины могут происходить от любого вида. Однако в одном аспекте иммуноглобулин имеет человеческое, мышинное или кроличье происхождение.

Термин "однодоменное антитело", также известный как нанотело, представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного варибельного домена антитела с молекулярной массой от около 12 кДа до около 15 кДа. Антитела одного тела могут быть основаны на варибельных доменах тяжелой цепи или легких цепях. Примеры однодоменных антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты V_H и фрагменты V_{NAR} . (См., например, Harmsen M.M. et al. Applied Microbiology and Biotechnology 77 (1): 13-22).

"Фрагменты антител" включают часть интактного антитела, обычно его антигенсвязывающую или варибельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab').sub.2 и Fv; диатела; линейные антитела; фрагменты, продуцируемые библиотекой экспрессии Fab, антиидиотипическими (анти-Id) антителами, CDR (определяющей комплементарную область) и эпитоп-связывающими фрагментами любого из вышеперечисленных, которые иммуноспецифически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами, одиночные - цепные молекулы антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

"Интактное антитело" представляет собой антитело, которое включает антигенсвязывающую варибельную область, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут быть константными доменами нативной последовательности (например, константными доменами нативной последовательности человека) или их вариантом аминокислотной последовательности.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, содержащие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты антигена. В дополнение к их специфичности моноклональные антитела имеют то преимущество, что они могут быть синтезированы без загрязнения другими антителами. Модификатор "моноклональное" указывает на характер антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующий получе-

ния антитела каким-либо конкретным методом. Например, моноклональные антитела, которые будут использоваться в соответствии с данным раскрытием, могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler et al (1975) Nature 256: 495, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см. патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием методик, описанных в Clackson et al (1991) Nature, 352: 624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597; например.

Моноклональные антитела, описанные в данном документе, в частности, включают "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, а остальная часть цепи (цепей) идентичны или гомологичны соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567 и Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Представляющие интерес химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменного домена, полученные от приматов, не являющихся человеком (например, обезьяны Старого Света, обезьяны и т.д.), и последовательности константных областей человека.

Для получения моноклональных антител (MAb) применялись различные методы. Технология гибридом, которая относится к клонированной клеточной линии, которая продуцирует один тип антитела, использует клетки различных видов, включая мышей (мышинных), хомяков, крыс и людей. Другой метод получения MAb использует генную инженерию, включая методы рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела, полученные с помощью этих методов, включают, среди прочего, химерные антитела и гуманизированные антитела. Химерное антитело объединяет кодирующие области ДНК более чем одного типа видов. Например, химерное антитело может быть получено переменной областью от мыши и константной областью от человека. Гуманизированное антитело происходит преимущественно от человека, даже если оно содержит нечеловеческие части. Подобно химерному антителу, гуманизированное антитело может содержать полностью человеческую константную область. Но в отличие от химерного антитела переменная область может частично происходить от человека. Нечеловеческие синтетические части гуманизированного антитела часто происходят из CDR в мышинных антителах. В любом случае эти области имеют решающее значение для того, чтобы антитело могло распознавать специфический антиген и связываться с ним. Хотя мышинные антитела полезны для диагностики и краткосрочной терапии, их нельзя вводить людям в течение длительного времени без увеличения риска вредного иммуногенного ответа. Этот ответ, называемый человеческим антимышинным антителом (НАМА - англ.: Human Anti-Mouse Antibody), возникает, когда иммунная система человека распознает мышинное антитело как чужеродное и атакует его. Реакция НАМА может вызвать токсический шок или даже смерть.

Химерные и гуманизированные антитела снижают вероятность ответа НАМА за счет минимизации нечеловеческих частей вводимых антител. Кроме того, химерные и гуманизированные антитела могут иметь дополнительное преимущество активации вторичных иммунных ответов человека, таких как антителозависимая клеточная цитотоксичность.

Интактное антитело может иметь одну или несколько "эффекторных функций", которые относятся к биологическим активностям, присущим Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или Fc-области с вариантами аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; подавление рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т.д.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей интактные антитела можно отнести к разным "классам". Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на "подклассы" (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, называются альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Полезные неиммунореактивные белковые, полипептидные или пептидные антитела включают, помимо прочего, трансферрин, эпидермальные факторы роста ("EGF"), бомбезин, гастрин, гастрин-рилизинг пептид, фактор роста тромбоцитов, IL-2, IL-6, трансформирующие факторы роста ("TGF"), такие как TGF- α и TGF- β , фактор роста коровьей оспы ("VGF"), инсулин и инсулиноподобные факторы роста I и II, лектины и апопротеин из липопротеинов низкой плотности.

Подходящие поликлональные антитела представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, полученных из сывороток иммунизированных животных. Для получения поликлональных антител к представляющему интерес антигену можно использовать различные процедуры, хорошо известные в данной области. Например, для продуцирования поликлональных антител различные домашние животные можно иммунизировать путем инъекции представляющего интерес антигена или его производного,

включая, но не ограничиваясь ими, кроликов, мышей, крыс и морских свинок. Различные адъюванты могут использоваться для усиления иммунологического ответа в зависимости от вида хозяина, включая, помимо прочего, адъювант Фрейнда (полный и неполный), минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плурононовые полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианины лимфы улитки, динитрофенол и потенциально полезные адъюванты для человека, такие как БЦЖ (бацилла Кальметта-Герена) и *corynebacterium parvum*. Такие адъюванты также хорошо известны в данной области.

Подходящие моноклональные антитела представляют собой гомогенные популяции антител к определенной антигенной детерминанте (например, антигену раковых клеток, вирусному антигену, микробному антигену, белку, пептиду, углеводу, химическому веществу, нуклеиновой кислоте или их фрагментам). Моноклональное антитело (mAb) к представляющему интерес антигену может быть получено с использованием любой методики, известной в данной области, которая обеспечивает продукцию молекул антитела непрерывными клеточными линиями в культуре. К ним относятся, но не ограничиваются ими, метод гибридомы, первоначально описанный Kohler и Milstein (1975, Nature 256, 495-497), метод гибридомы В-клеток человека (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72), и метод EBV-гибридомы (Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., стр. 77-96). Такие антитела могут относиться к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA и IgD и любой их подкласс. Гибридома, продуцирующая mAb, используемая в этом раскрытии, может культивироваться *in vitro* или *in vivo*.

Подходящие моноклональные антитела включают, но не ограничиваются ими, человеческие моноклональные антитела, гуманизированные моноклональные антитела, фрагменты антител или химерные моноклональные антитела человека и мыши (или других видов). Моноклональные антитела человека могут быть получены любым из многочисленных методов, известных в данной области (например, Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4, 72-79 и Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92, 3-16).

Антитело также может быть биспецифическим антителом. Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционное получение полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, где две цепи имеют разные специфичности (Milstein et al., 1983, Nature 305:537-539). Из-за случайного набора тяжелых и легких цепей иммуноглобулина эти гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь 10 различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно проводят с использованием стадий аффинной хроматографии, довольно обременительна, а выход продукта низок. Подобные процедуры раскрыты в WO 93/08829 и в Trautnecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991).

Согласно другому подходу переменные домены антител с желаемой специфичностью связывания (сайты объединения антитело-антиген) сливаются с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. Слияние может происходить с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим, по меньшей мере, часть шарнирной, CH2 и CH3 областей. Первая константная область тяжелой цепи (CH1) может содержать сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующий по меньшей мере в одном из слияний. Нуклеиновые кислоты с последовательностями, кодирующими слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, если желательно, легкую цепь иммуноглобулина, вставляют в отдельные векторы экспрессии и котрансфицируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает большую гибкость в регулировании взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в вариантах реализации, когда неравные соотношения трех полипептидных цепей, используемых в конструкции, обеспечивают оптимальные выходы. Однако возможно вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам или когда соотношения не имеют особого значения.

Биспецифические антитела могут иметь гибридную тяжелую цепь иммуноглобулина с первой специфичностью связывания в одном плече и пару гибридных тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина (обеспечивающую вторую специфичность связывания) в другом плече. Эта асимметричная структура облегчает отделение желаемого биспецифического соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулина, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифической молекулы обеспечивает легкий способ разделения (WO 94/04690; Suresh et al., Methods in Enzymology, 1986, 121:210; Rodrigues et al., 1993, J. of Immunology 151:6954-6961; Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167; Carter et al., 1995, J. of Hematotherapy 4:463-470; Merchant et al., 1998, Nature Biotechnology 16:677-681). Используя такие методы, биспецифические антитела могут быть получены для конъюгации в качестве ADC при лечении или профилактике заболевания, как определено в данном документе.

Гибридные или бифункциональные антитела могут быть получены либо биологическим путем, то есть методами слияния клеток, либо химическим путем, особенно с помощью сшивающих агентов или реагентов, образующих дисульфидный мостик, и могут включать целые антитела или их фрагменты (EP

105360; WO 83/03679; EP 217577).

Антитело может быть функционально активным фрагментом, производным или аналогом антитела, которое иммуноспецифически связывается с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами или другими антителами, связанными с опухолевыми клетками или матрицей. В этом отношении "функционально активный" означает, что фрагмент, производное или аналог способен вызывать анти-антиидиотипические антитела, которые распознают тот же антиген, что и антитело, из которого получен фрагмент, производное или аналог. В частности, в примерном варианте осуществления антигенность идиотипа молекулы иммуноглобулина может быть усилена делецией последовательностей каркаса и CDR, которые являются С-концевыми по отношению к последовательности CDR, которая специфически распознает антиген. Чтобы определить, какие последовательности CDR связывают антиген, синтетические пептиды, содержащие последовательности CDR, можно использовать в анализах связывания с антигеном любым методом анализа связывания, известным в данной области (например, анализ ядра BIA) (см., например, Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md.; Kabat E et al., 1980, *J. of Immunology* 125 (3):961-969).

Другие полезные антитела включают фрагменты антител, такие как, но не ограничиваясь ими, фрагменты F(ab')₂, которые содержат вариабельную область, константную область легкой цепи и домен СН1 тяжелой цепи, которые могут быть получены путем расщепления пепсином молекулы антитела и фрагменты Fab, которые могут быть получены путем восстановления дисульфидных мостиков фрагментов F(ab')₂. Другими полезными антителами являются димеры тяжелых и легких цепей антител или любые их минимальные фрагменты, такие как Fv или одноцепочечные антитела (SCA) (например, как описано в патенте США № 4946778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 и Ward et al., (1989) *Nature* 334:544-54), или любую другую молекулу с такой же специфичностью, как и у антитела.

Кроме того, рекомбинантные антитела, такие как химерные и гуманизированные моноклональные антитела, содержащие как человеческие, так и нечеловеческие части, которые могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, являются полезными антителами. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части происходят от разных видов животных, например, имеющих вариабельную область, полученную из константных областей мышинного моноклонального и человеческого иммуноглобулина. См., например, Cabilly et al., патент США № 4816567; и Boss et al., патент США № 4816397). Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител из нечеловеческих видов, имеющих одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) из нечеловеческих видов и каркасную область из молекулы иммуноглобулина человека. (См., например, Queen, патент США № 5585089) Такие химерные и гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, известными в данной области, например, с использованием способов, описанных в WO 87/02671; EP 184187; EP 171496; EP 173494; WO 86/01533; патент США №4816567; EP 12023; Berter et al., 1988, *Science* 240:1041-1043; Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura et al., 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005; Wood et al., 1985, *Nature* 314:446-449; и Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4: 214; патент США № 5225539; Jones et al., 1986, *Nature* 321:552-525; Verhoevan et al. (1988) *Science* 239:1534 и Beidler et al., 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Полностью человеческие антитела можно получить с использованием трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать гены тяжелой и легкой цепей эндогенного иммуноглобулина, но которые могут экспрессировать гены тяжелой и легкой цепей человека. Трансгенных мышей иммунизируют обычным способом выбранным антигеном, например, всем полипептидом по раскрытию или его частью. Моноклональные антитела, направленные против антигена, можно получить с использованием общепринятой гибридомной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, содержащиеся в трансгенных мышцах, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток, а затем претерпевают переключение классов и соматические мутации. Таким образом, используя такой метод, можно получить терапевтически полезные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Для обзора этой технологии получения человеческих антител см. Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Для подробного обсуждения этой технологии производства человеческих антител и человеческих моноклональных антител и протоколов получения таких антител. См., например, патенты США №№ 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806. Другие человеческие антитела можно получить коммерчески, например, от Abgenix, Inc. (Фримонт, Калифорния) и Genpharm (Сан-Хосе, Калифорния).

Полностью человеческие антитела, распознающие выбранный эпитоп, можно получить с использованием метода, называемого "управляемый отбор". В этом подходе выбранное моноклональное антитело нечеловеческого происхождения, например мышинное антитело, используется для выбора полностью человеческого антитела, распознающего тот же эпитоп. (Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12:899-903). Человеческие антитела также могут быть получены с использованием различных методов, известных в данной области, включая библиотеки фагового дисплея (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)).

Антитело может быть слитым белком антитела или его функционально активным фрагментом, например, в котором антитело слито посредством ковалентной связи (например, пептидной связи) либо на N-конце, либо на C-конце с аминокислотной последовательностью другого белка (или его части, например, по меньшей мере 10, 20 или 50 аминокислотной части белка), которая не является антителом. Антитело или его фрагмент могут быть ковалентно связаны с другим белком на N-конце константного домена.

Антитела включают аналоги и производные, которые также модифицированы, то есть ковалентным присоединением любого типа молекулы, при условии, что такое ковалентное присоединение позволяет антителу сохранять свою антигенсвязывающую иммуноспецифичность. Например, но не в качестве ограничения, производные и аналоги антител включают те, которые были дополнительно модифицированы, например, гликозилированием, ацетилированием, пегилированием, фосфорилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, присоединением к единице клеточного антитела или другому белку и т.д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть проведена известными методами, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез в присутствии туникамицина и т.д. Кроме того, аналог или производное могут содержать одну или более не природных аминокислот.

Антитела в конъюгатах антитело-лекарственное средство включают антитела, имеющие модификации (например, замены, делеции или добавления) в аминокислотных остатках, которые взаимодействуют с рецепторами Fc. В частности, антитела включают антитела, имеющие модификации аминокислотных остатков, идентифицированных как участвующие во взаимодействии между доменом анти-Fc и рецептором FcRn (см., например, WO 97/34631). Иммуноспецифические антитела к антигену раковых клеток можно получить коммерчески, например, от Genentech (Сан-Франциско, Калифорния) или получить любым способом, известным специалисту в данной области, таким как, например, химический синтез или методы рекомбинантной экспрессии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитела, иммуноспецифические к антигену раковых клеток, может быть получена, например, из базы данных GenBank или подобной базы данных, литературных публикаций или путем рутинного клонирования и секвенирования.

Антитело ADC может быть моноклональным антителом, например, мышинным моноклональным антителом, химерным антителом или гуманизированным антителом. Антитело может быть фрагментом антитела, например, фрагментом Fab.

Известные антитела против CCR2 для лечения или профилактики рака могут быть конъюгированы в виде ADC. Иммуноспецифические антитела к антигену раковых клеток можно получить коммерчески или получить любым способом, известным специалисту в данной области, таким как, например, методы рекомбинантной экспрессии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитела, иммуноспецифические к антигену раковых клеток, может быть получена, например, из базы данных GenBank или подобной базы данных, литературных публикаций или путем рутинного клонирования и секвенирования. Примеры антител, доступных для лечения рака, включают, но не ограничиваются ими, STI-B020X (моноклональные антитела против CCR2, Sorrento Therapeutics), MC-21 (гуманизированные антитела против CCR2, University of Regensburg/MRC; описано в EP патент № 2004692, который включен в данный документ в качестве ссылки), 4.40A68G (Pfizer/Amgen; описан в патенте США № 8710191, который включен в данный документ в качестве ссылки), UniTI-101 (биспецифические антитела CSF-1R x CCR2, Elstar Therapeutics), и те, что описаны в WO 97/31949, который включен в данный документ в качестве ссылки.

Термин "вариант аминокислотной последовательности" относится к полипептидам, имеющим аминокислотные последовательности, которые в некоторой степени отличаются от полипептида с нативной последовательностью. Обычно варианты аминокислотной последовательности будут обладать по меньшей мере около 70% идентичностью последовательности по меньшей мере с одним рецепторсвязывающим доменом нативного антитела или по меньшей мере с одним лигандсвязывающим доменом нативного рецептора, и обычно они будут по меньшей мере около 80%, более типично по меньшей мере около 90% гомологичны по последовательности таким доменам связывания рецептора или лиганда. Варианты аминокислотной последовательности содержат замены, делеции и/или вставки в определенных положениях в аминокислотной последовательности нативной аминокислотной последовательности. Аминокислоты обозначают условными названиями, однобуквенным и трехбуквенным кодами.

"Идентичность последовательностей" определяется как процент остатков в варианте аминокислотной последовательности, которые идентичны после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны специалистам в данной области. Одной из таких компьютерных программ является "Align 2", автором которой является Genentech, Inc., которая была зарегистрирована вместе с пользовательской документацией в Бюро регистрации авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, 10 декабря 1991 г.

Термины "рецептор Fc" или "FcR" используются для описания рецептора, который связывается с областью Fc антитела. Иллюстративный FcR представляет собой человеческий FcR с нативной последо-

вательностью. Более того, FcR может быть таким, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы Fc.гамма.RI, Fc.гамма.RII и Fc.гамма. Подклассы RIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы Fc.гамма.RII включают Fc.гамма.RIIA ("активирующий рецептор") и Fc.гамма.RIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, которые отличаются главным образом их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc.гамма.RIIA содержит иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор Fc.гамма.RIIB содержит иммунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ITIM) в своем цитоплазматическом домене. (См. обзор М. в Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). FcR рассмотрены в Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, охватываются в данном документе термином "FcR". Термин также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

"Комплемент-зависимая цитотоксичность" или "КЗЦ" относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом) в комплексе с родственным антигеном. Для оценки активации комплемента анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996), может быть выполнен.

"Нативные антитела" обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины около 150 000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как количество дисульфидных связей варьируется между тяжелыми цепями разных изоформ иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет симметрично расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце варибельный домен (VH), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет варибельный домен на одном конце (VL) и константный домен на другом конце. Константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а варибельный домен легкой цепи выровнен с варибельным доменом тяжелой цепи. Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между варибельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Термин "варибельный" относится к тому факту, что определенные части варибельных доменов сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако варибельность неравномерно распределена по варибельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гиперварибельными областями, как в легкой цепи, так и в варибельных доменах тяжелой цепи. Более высококонсервативные участки варибельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из варибельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR, в основном имеющих конфигурацию β -листа, соединенных тремя гиперварибельными участками, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть структуры β -листа. Гиперварибельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR и вместе с гиперварибельными областями из другой цепи вносят вклад в формирование антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но обладают различными эффекторными функциями, такими как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

Термин "гиперварибельная область" при использовании в данном документе относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гиперварибельная область обычно содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в варибельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в варибельном домене тяжелой цепи; Kabat et al. выше) и/или эти остатки из "гиперварибельной петли" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в варибельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в варибельном домене тяжелой цепи; Chothia и Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-917). Остатки "каркасной области" или "FR" представляют собой остатки варибельного домена, отличные от остатков гиперварибельной области, как определено в данном документе.

Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим сайтом, и остаточный "Fc"-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')₂, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все еще способен перекрестно связывать антиген.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распо-

знавания антигена и связывания антигена. Эта область состоит из димера одной тяжелой цепи и одного варибельного домена легкой цепи в тесной нековалентной связи. Именно в этой конфигурации три гиперварибельные области каждого варибельного домена взаимодействуют для определения антигенсвязывающего сайта на поверхности димера VH-VL. В совокупности шесть гиперварибельных областей придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже один варибельный домен (или половина Fv, содержащая только три гиперварибельные области, специфичные для антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем весь сайт связывания.

Фрагмент Fab также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab добавлением нескольких остатков на карбокси-конце домена CH1 тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет обозначение в данном документе для Fab', в котором остаток (остатки) цистеина константных доменов несут по меньшей мере одну свободную тиольную группу. Фрагменты антитела F(ab')₂ первоначально были продуцированы как пары фрагментов Fab', между которыми расположены шарнирные цистеины. Также известны другие химические связывания фрагментов антител.

"Легкие цепи" антител любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Фрагменты антител "одноцепочечный Fv" или "scFv" содержат домены VH и VL антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Полипептид Fv может дополнительно содержать полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv формировать желаемую структуру для связывания антигена. Для обзора scFv см. Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Фрагменты scFv антитела против ErbB2 описаны в WO 93/16185; патентах США №№ 5571894 и 5587458.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, причем эти фрагменты содержат варибельный домен тяжелой цепи (VH), связанный с варибельным доменом легкой цепи (VL) в той же полипептидной цепи (VH-VL). При использовании линкера, который слишком короткий для образования пары между двумя доменами в одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела более полно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Hollinger et al (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

"Гуманизированные" формы нечеловеческих антител (например, грызунов) представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Гуманизация представляет собой метод передачи информации о связывании мышинового антигена на неиммуногенный акцептор человеческого антитела, результатом которого стали многие терапевтически полезные лекарства. Метод гуманизации обычно начинается с переноса всех шести определяющих комплементарность областей (CDR) мыши на каркас человеческого антитела (Jones et al., (1986) *Nature* 321:522-525). Эти антитела с привитыми CDR обычно не сохраняют свою первоначальную аффинность к связыванию антигена, и фактически аффинность часто сильно нарушена. Помимо CDR, для поддержания надлежащей конформации CDR также должны быть включены выбранные остатки каркасной области нечеловеческого антитела (Chothia et al. (1989) *Nature* 342:877). Было показано, что перенос ключевых остатков каркаса мыши на человеческий акцептор для поддержания структурной конформации привитых CDR восстанавливает связывание антигена и аффинность (Riechmann et al., (1992) *J. Mol. Biol.* 224, 487-499; Foote и Winter, (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; Presta et al., (1993) *J. Immunol.* 151, 2623-2632; Werther et al., (1996) *J. Immunol. Methods* 157:4986-4995 и Presta et al (2001) *Thromb. Haemost.* 85:379-389). По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентные антитела), в которых остатки гиперварибельной области реципиента заменены остатками гиперварибельной области не относящегося к человеку вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или отличный от человека примат, имеющий желаемую специфичность, аффинность и способность. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяются соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет в антителе-реципиенте или в антителе-доноре. Эти модификации сделаны для дальнейшего улучшения характеристик антител. В целом, гуманизированное антитело будет включать практически все по меньшей мере из одного, а обычно из двух варибельных доменов, в которых все или практически все гиперварибельные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина, и все или практически все FR являются последовательностями человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно также будет включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Дополнительную информацию см. в патенте США № 6407213; Jones et al. (1986) *Nature*, 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-329; и Presta, (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596.

"Родительское антитело" представляет собой антитело, содержащее аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков заменены одним или более остатками

цистеина. Родительское антитело может содержать последовательность природного или дикого типа. Родительское антитело может иметь ранее существовавшие модификации аминокислотной последовательности (такие как добавления, делеции и/или замены) по сравнению с другими нативными, дикими типами или модифицированными формами антитела. Родительское антитело направлено против интересующего антигена-мишени. Антитела, направленные против неполипептидных антигенов (таких как опухолассоциированные гликолипидные антигены; см. патент США № 5091178) также рассматриваются.

"Изолированное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено из компонента его естественного окружения. Загрязняющие компоненты его естественной окружающей среды представляют собой материалы, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому использованию антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В конкретных вариантах реализации антитело будет очищено (1) до более чем 95% по массе антитела, как определено методом Лоури, или до более чем 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием газофазного белкового секвенатора или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием кумасси синего или окрашивания серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по крайней мере один компонент естественного окружения антитела не будет присутствовать. Однако обычно выделенное антитело получают по меньшей мере с помощью одной стадии очистки.

Антитело, "которое связывает" молекулярную мишень или интересующий антиген, способно связывать этот антиген с достаточной аффинностью, так что антитело может быть использовано для нацеливания на клетку, экспрессирующую антиген.

Термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, цель которых состоит в том, чтобы предотвратить или замедлить (уменьшить) нежелательное физиологическое изменение или нарушение, такое как развитие или распространение рака. Для целей данного раскрытия полезные 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 ослабление болезненного состояния и ремиссии (частичной или полной), обнаруживаемой или необнаружимой. "Лечение" также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет состояние или расстройство, а также тех, кто склонен к состоянию или расстройству, или тех, у которых состояние или расстройство необходимо предотвратить.

"Фаговый дисплей" представляет собой метод, с помощью которого варианты полипептиды отображаются в виде слитых белков с белком оболочки на поверхности частиц фага, например нитчатого фага. Одно из преимуществ фагового дисплея заключается в том, что большие библиотеки рандомизированных вариантов белков могут быть быстро и эффективно отсортированы по тем последовательностям, которые связываются с целевой молекулой с высоким сродством. Отображение библиотек пептидов и белков на фаге использовалось для скрининга миллионов полипептидов на предмет тех, которые обладают специфическими связывающими свойствами. Методы поливалентного фагового дисплея использовались для отображения небольших случайных пептидов и небольших белков, обычно посредством слияния с Р11 или РV11 нитчатого фага. Wells и Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:355-362 (1992), и цитируемые там ссылки. При моновалентном фаговом дисплее библиотека белков или пептидов сливается с белком оболочки фага или его частью и экспрессируется на низких уровнях в присутствии белка дикого типа. Эффекты avidности снижаются по сравнению с поливалентным фагом, так что сортировка осуществляется на основе внутренней аффинности лиганда, и используются фагмидные векторы, которые упрощают манипуляции с ДНК. Lowman и Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:205-0216 (1991). Фаговый дисплей включает методы получения антителоподобных молекул (Janeway, C, Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, p 627-628).

"Фагмида" представляет собой плазмидный вектор, имеющий бактериальную природу репликации, например ColE1, и копию межгенной области бактериофага. Фагмида может использоваться на любом известном бактериофаге, включая нитчатый бактериофаг и лямбдоидный бактериофаг. Плазмида также обычно будет содержать селективируемый маркер устойчивости к антибиотикам. Сегменты ДНК, клонированные в эти векторы, можно размножить как плазмиды. Когда клетки, несущие эти векторы, снабжены всеми генами, необходимыми для продуцирования фаговых частиц, режим репликации плазмиды изменится на репликацию по методу катящегося круга для создания копий одной цепи плазмидной ДНК и упаковки фаговых частиц. Фагмида может образовывать инфекционные или неинфекционные фаговые частицы. Этот термин включает фагмиды, которые содержат ген белка оболочки фага или его фрагмент, связанный с геном гетерологичного полипептида в виде слияния генов, так что гетерологичный полипептид отображается на поверхности фаговой частицы. Описанные в данном документе соединения мо-

гут быть в форме фармацевтически или фармацевтически приемлемых солей. В некоторых вариантах реализации такие соли получают из неорганических или органических кислот или оснований. Для обзоров подходящих солей см., например, Berge et al, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19 и Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., A. Gennaro (ed.), Lippincott Williams & Wilkins (2000).

В данном раскрытии группа "Ab" (т.е. антитела, фрагменты антител и/или фрагменты антигена) может быть конъюгирована с более чем одной составляющей, содержащей лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации "Ab" можно конъюгировать с 1-20 фрагментами, содержащими лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации "Ab" можно конъюгировать с 1-10 фрагментами, содержащими лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации "Ab" можно конъюгировать с 1-5 фрагментами, содержащими лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации "Ab" может быть сопряжен с 1 или 2 фрагментами, содержащими лекарственное средство. В некоторых вариантах реализации "Ab" может быть сопряжен с одной группой, содержащей лекарственное средство.

В некоторых аспектах данного раскрытия ADC сочетают с антителом, связывающим PD-1, и/или антителом, связывающим PDL-1.

Описанные в данном документе соединения могут быть в форме фармацевтически или фармацевтически приемлемых солей. В некоторых вариантах реализации такие соли получают из неорганических или органических кислот или оснований. Для обзоров подходящих солей см., например, Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19 и Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., A. Gennaro (ed.), Lippincott Williams & Wilkins (2000).

Примеры подходящих кислотно-аддитивных солей включают ацетат, адипат, альгинат, аспарат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, люкогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат и ундеканат.

Примеры подходящих основно-аддитивных солей включают соли аммония; соли щелочных металлов, такие как соли натрия и калия; соли щелочно-земельных металлов, такие как соли кальция и магния; соли с органическими основаниями, такие как соли дициклогексилламина, N-метил-D-глюкамин; и соли с аминокислотами, такими как аргинин, лизин и т.п.

Например, Berge перечисляет следующие коммерчески продаваемые соли, одобренные FDA: анионы ацетат, бензилат (бензолсульфонат), бензоат, бикарбонат, битартрат, бромид, эдетат кальция (этилендиаминтетраацетат), камзилат (камфорсульфонат), карбонат, хлорид, цитрат, дигидрохлорид, эдетат (этилендиаминтетраацетат), эдисилат (1,2-этандисульфат), эстолат (лаурилсульфат), эзилат (этансульфонат), фумарат, глюкоплат (глюкогептонат), глюконат, глутамат, гликоллиларсанилат (гликоламидофениларсонат), гексилрезорцинат, гидрабамин (N, N'-ди(дегидроабетирил)этилендиамин), гидробромид, гидрохлорид, гидроксинафтоат, йодид, изетионат (2-гидроксиэтансульфонат), лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат (метансульфонат), метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, мукат, напсилат (2-нафталинсульфонат), нитрат, памоат (эмбонат), пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, таннат, тартрат, теоклат (8-хлортеофиллинат) и триэтиодид; органические катионы бензатин (N, N'-добензилэтилендиамин), хлорпрокаин, холин, диэтанолламин, этилендиамин, меглумин (N-метилглюкамин) и прокаин; и катионы металлов алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия и цинка.

Berge дополнительно перечисляет следующие не одобренные FDA коммерчески продаваемые (за пределами США) соли: анионы адипат, альгинат, аминсалицилат, ангидрометиленцитрат, ареколин, аспарат, бисульфат, бутилбромид, камфорат, диглюконат, дигидробромид, дисукцинат, глицерофосфат, гемисульфат, гидрофторид, гидроиодид, метиленбис(салицилат), нападисилат (1,5-нафталиндисульфат), оксалат, пектинат, персульфат, фенилэтилбарбитурат, пикрат, пропионат, тиоцианат, тозилат и ундеканат; органические катионы бенетамин (N-бензилфенэтиламин), клемизол (-п-хлорбензил-2-пирролилдин-1'-илметилбензимидазол), диэтиламин, пиперазин и трометамин (трис(гидроксиметил)аминометан) и катионы металлов бария и висмута.

Описанные в данном документе соединения могут также включать подходящие носители, наполнители и вспомогательные средства, которые могут различаться в зависимости от способа введения.

В некоторых вариантах реализации фармацевтические композиции могут быть составлены в виде подходящей лекарственной формы для парентерального введения. Указанные составы могут быть приготовлены различными способами, известными в данной области техники. Фармацевтические композиции можно вводить непосредственно в кровоток, в мышцу или непосредственно в орган. Подходящие способы парентерального введения включают внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, интра-текальное, внутрижелудочковое, внутриуретральное, внутригрудинное, внутричерепное, внутримышечное и подкожное. Подходящие устройства для парентерального введения включают игольчатые инъекторы, безыгольные инъекторы и методы инфузии.

Композиции для парентерального введения обычно представляют собой водные растворы, которые могут содержать вспомогательные вещества, такие как соли, углеводы и буферные агенты. Однако ком-

позиция также может быть приготовлена в виде стерильного неводного раствора или в виде высушенной формы для использования в сочетании с подходящим носителем, таким как стерильная апиrogenная вода.

Приготовление парентеральных композиций в стерильных условиях, например, путем лиофилизации, может быть легко выполнено с использованием стандартных методик, хорошо известных специалистам в данной области.

Композиции для парентерального введения могут быть составлены с немедленным и/или модифицированным высвобождением. Составы с модифицированным высвобождением включают отсроченное, замедленное, импульсное, контролируемое, целевое и запрограммированное высвобождение. Таким образом, композиции могут быть составлены в виде твердой, полутвердой или тиксотропной жидкости для введения в виде имплантированного депо, обеспечивающего модифицированное высвобождение активного агента.

Парентеральные составы могут быть смешаны с другими подходящими фармацевтически приемлемыми наполнителями, используемыми в парентеральных лекарственных формах, такими как, но не ограничиваясь ими, консерванты.

В другом варианте реализации фармацевтические композиции могут быть составлены в виде подходящих пероральных лекарственных форм, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, суспензии, растворы, эмульсии и тому подобное. Могут присутствовать другие подходящие носители, такие как разрыхлители, разбавители, хелатирующие агенты, связующие, глиданты, смазывающие вещества, наполнители, наполнители, антиадгезирующие агенты и тому подобное.

Препараты для перорального введения могут также содержать другие подходящие фармацевтические эксципиенты, такие как подсластители, несущие среды/смачивающие агенты, красители, ароматизаторы, консерванты, повышающие вязкость/загустители и т.п.

Доза фармацевтических композиций по данному раскрытию может быть адаптирована к индивидуальному пациенту.

Термин "лучевая терапия" относится к фотонному излучению или излучению частиц. В некоторых вариантах реализации лучевая терапия может представлять собой фотонное излучение (рентгеновское излучение и гамма-излучение). В таких вариантах реализации фотоны могут генерироваться в виде пучка фотонов высокой энергии из радиоактивных источников, таких как кобальт или линейный ускоритель. В некоторых вариантах реализации лучевая терапия может быть излучением частиц (таких как электроны, протоны, нейтроны, ионы углерода, альфа-частицы и бета-частицы). Излучение частиц может быть получено с помощью линейных ускорителей. В некоторых вариантах реализации лучевая терапия может представлять собой электронный пучок. В некоторых вариантах реализации лучевая терапия может представлять собой протонный пучок. В некоторых вариантах реализации лучевая терапия может представлять собой пучок нейтронов.

В некоторых вариантах реализации лучевая терапия может представлять собой пучок нейтронов. В некоторых вариантах реализации внешнее лучевое облучение может представлять собой трехмерную конформную лучевую терапию (3D-CRT). В некоторых вариантах реализации внешнее лучевое излучение может представлять собой лучевую терапию с модулированной интенсивностью (IMRT). В некоторых вариантах реализации внешнее лучевое облучение может представлять собой лучевую терапию под визуальным контролем (IGRT). В некоторых вариантах реализации внешнее лучевое излучение может представлять собой протонную терапию с модулированной интенсивностью (IMPT). В некоторых вариантах реализации внешнее лучевое облучение может быть стереотаксическим радиохирургическим (SRS). В некоторых вариантах реализации дистанционная лучевая терапия может представлять собой фракционированную стереотаксическую лучевую терапию. В некоторых вариантах реализации дистанционная лучевая терапия может представлять собой фракционированную стереотаксическую лучевую терапию. Примерами аппаратов, выполняющих SBRT, являются Gamma Knife®, X-Knife®, CyberKnife® и Ciproac®. В некоторых вариантах реализации облучение можно вводить с использованием трехмерной конформной или стереотаксической телесной лучевой терапии.

В некоторых вариантах реализации облучение может быть доставлено посредством внутренней лучевой терапии (брахитерапии). В таких вариантах реализации внутренняя лучевая терапия может представлять собой внутритканевое облучение, например, с использованием небольших гранул, семян, проводов или трубок, помещенных близко к раку или месту опухоли. В таких вариантах реализации внутренняя лучевая терапия может представлять собой внутрисполостное облучение, например, с использованием контейнера с радиоактивным материалом, который можно поместить в полость тела.

Способ применения соединений и композиций

Некоторые описанные в данном документе соединения являются агонистами STING и, таким образом, полезны для стимуляции иммунного ответа у их субъектов. Композиции можно использовать при лечении рака.

Соединения по данному раскрытию проявляют модулирующую/агонистическую активность в отношении STING. Некоторые соединения по данному раскрытию могут быть лучше с точки зрения эф-

фективности, фармакокинетики (например, абсорбции, распределения, метаболизма, экскреции), растворимости (например, растворимости в воде), взаимодействия с другими лекарственными средствами (например, ингибирующего действия ферментов, метаболизирующих лекарственные средства), безопасности (например, острая токсичность, хроническая токсичность, генетическая токсичность, репродуктивная токсичность, кардиотоксичность, канцерогенность, центральная токсичность) и/или стабильности (например, химическая стабильность, устойчивость к ферменту) и могут быть полезны в качестве лекарственного средства.

Соединение по данному раскрытию можно использовать для увеличения активности STING у млекопитающего (например, мыши, крысы, хомяка, кролика, кошки, собаки, коровы, овцы, обезьяны, человека).

Соединение по данному раскрытию может быть использовано в качестве лекарственного средства, такого как средство для профилактики или лечения заболеваний, на которые может влиять STING (в настоящем описании, иногда сокращенно обозначается как "заболевания, связанные с STING"), например, раковые заболевания, например, колоректальный рак (например, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак заднего прохода, семейный колоректальный рак, наследственный непוליпозный колоректальный рак, стромальная опухоль желудочно-кишечного тракта), рак легких (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, злокачественная мезотелиома), мезотелиома, рак поджелудочной железы (например, протоковая карцинома поджелудочной железы, эндокринная опухоль поджелудочной железы), рак глотки, рак гортани, рак пищевода, рак желудка (например, папиллярная аденокарцинома, муцинозная аденокарцинома, аденосквамозная карцинома), рак двенадцатиперстной кишки, рак тонкого кишечника, рак груди (например, инвазивная карцинома протоков, неинвазивная карцинома протоков, воспалительный рак молочной железы), рак яичников (например, эпителиальный рак яичников, опухоль внегонадных зародышевых клеток, опухоль зародышевых клеток яичников, опухоль яичников с низким потенциалом злокачественности), опухоль яичка, рак простаты (например, гормонозависимый рак простаты, негормонозависимый рак простаты, устойчивый к кастрации рак простаты), рак печени (например, гепатоцеллюлярный рак, первичный рак печени, рак внепеченочных желчных протоков), рак щитовидной железы (например, медуллярная карцинома щитовидной железы), рак почек (например, почечно-клеточный рак (например, светлоклеточный рак почечных клеток), переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника), рак матки (например, рак шейки матки, рак тела матки, саркома матки), гестационная хориокарцинома, опухоли мозга (например, медуллобластома, глиома, астроцитарные опухоли пинеальной железы, пилоцитарная астроцитома, диффузная астроцитома, анапластическая астроцитома), ретинобластома, рак кожи (например, базалиома, злокачественная меланома), саркомы (например, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, саркома мягких тканей, веретено-клеточная саркома), злокачественная опухоль костей, рак мочевого пузыря, рак крови (например, множественная миелома, лейкоз (например, острый миелогенный лейкоз), злокачественная лимфома, болезнь Ходжкина, хроническое миелопролиферативное заболевание), первичный рак неизвестной формы; ингибитор роста рака; ингибитор метастазирования рака; промотор апоптоза; средство для лечения предраковых поражений (например, миелодиспластических синдромов) и тому подобное.

В некоторых вариантах реализации соединения по данному раскрытию можно использовать в качестве лекарственного средства от колоректального рака, рака молочной железы, рака кожи, злокачественной лимфомы или рака легких.

В определенных вариантах реализации соединения по данному раскрытию можно применять одновременно с терапией антителами. В некоторых вариантах реализации терапия антителами включает антитело против PD-1. В некоторых вариантах реализации терапия антителами включает антитело против PD-L1.

В определенных вариантах реализации соединения по данному раскрытию можно применять одновременно с терапией антителами и лучевой терапией. В некоторых вариантах реализации лучевая терапия может представлять собой фотонную лучевую терапию. В некоторых вариантах реализации лучевая терапия может представлять собой лучевую терапию частицами.

Кроме того, соединение по данному раскрытию можно использовать одновременно с немедикаментозной терапией. Точнее, соединение по данному раскрытию или комбинированный агент по данному раскрытию можно комбинировать с немедикаментозной терапией, такой как: (1) хирургическое вмешательство, (2) гипертоническая химиотерапия с использованием ангиотензина II и т.д., (3) генная терапия, (4) термотерапия, (5) криотерапия, (6) лазерное прижигание и (7) лучевая терапия.

Например, при использовании соединения по данному раскрытию до или после вышеупомянутой хирургической операции и т.п., или до или после комбинированного лечения двумя или тремя их видами, можно получить такие эффекты, как предотвращение появления резистентности, продление безболезненной выживаемости, подавление метастазов или рецидивов рака, продление жизни и т.п.

В некоторых вариантах реализации данное раскрытие относится к способу лечения рака у пациента путем введения пациенту, нуждающемуся в указанном лечении, комбинации соединения по формуле (I) или его фармацевтически приемлемой соли и облучения.

В некоторых вариантах реализации данное раскрытие относится к способу лечения рака у пациента

фракцию.

Кроме того, можно сочетать лечение соединением по данному раскрытию или комбинированным агентом по данному раскрытию с поддерживающей терапией: (i) введение антибиотика (например, β -лактаманного типа, такого как панспорин и т.п., макролидного типа, такого как кларитромицин и т.п.) при осложнениях с различными инфекционными заболеваниями, (ii) введение высококалорийной трансфузии, препарата аминокислоты или витаминного препарата общего назначения для улучшения недостаточного/неправильного питания, (iii) введение морфина для уменьшения боли, (iv) введение фармацевтического агента для облегчения побочных эффектов, таких как тошнота, рвота, анорексия, диарея, лейкопения, тромбоцитопения, снижение концентрации гемоглобина, выпадение волос, гепатопатия, ренопатия, ДВС-синдром, лихорадка и т.п. и (v) введение фармацевтического агента для подавления множественной лекарственной устойчивости рака и т.п.

Примеры Определения

- [5] Ab - антитело
- [6] ACN - ацетонитрил
- [7] ADA - антилекарственное антитело
- [8] ADC - конъюгат антитело-лекарственное средство
- [9] НПКО - ниже предела количественного определения
- [10] С - Цельсия
- [11] CCR2 - Хемокиновый рецептор 2 с мотивом СС
- [12] CR - полный ответ
- [13] CD - кластер дифференцировки
- [14] DAR - соотношение лекарственного средства и антитела
- [15] DMA - N,N-диметилацетамид
- [16] ДМСО - диметилсульфоксид
- [17] DTT - дитиотреитол
- [18] s - коэффициент экстинкции
- [19] E 0.1% - 0.1% раствор коэффициент экстинкции
- [20] EC₅₀ - половина максимальной эффективной концентрации
- [21] EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота
- [22] ч - часы
- [23] HIC - хроматография гидрофобного взаимодействия
- [24] hIgG - человеческий иммуноглобулин G
- [25] ВЭЖХ - жидкостная хроматография высокого давления
- [26] IACUC - Институциональный комитет по уходу и использованию животных
- [27] IFN - интерферон
- [28] IgG - иммуноглобулин G
- [29] IgM - иммуноглобулин M
- [30] IL - интерлейкин
- [31] IP - белок, индуцированный гамма-интерфероном IP
- [32] ЖХ - жидкостная хроматография
- [33] ЖХМС - жидкостная хроматография, масс-спектрометрия.
- [34] μ M - микромолярный
- [35] MCP - хемоаттрактантный белок моноцитов
- [36] MDSC - супрессорные клетки миелоидного происхождения
- [37] мл - миллилитры
- [38] MC - масс-спектр
- [39] MTD - максимально переносимая доза
- [40] NA - отсутствует
- [41] OAc - ацетат
- [42] PBS - Фосфатно-солевой буферный раствор
- [43] PEG - ПЭГ полиэтиленгликоль
- [44] QTOF - квадрупольный время пролетный
- [45] кт - комнатная температура
- [46] SEC - Эксклюзионная хроматография по размеру
- [47] STING - стимулятор генов интерферона
- [48] TCEP - (трис(2-карбоксииэтил)фосфин)
- [49] TNF - фактор некроза опухоли
- [50] TPPTS - тринатриевая соль 3,3',3''-фосфанитрилтрис(бензолсульфокислоты)
- [51] Tris - трис(гидроксиметил)аминометан
- [52] UFLC - сверхбыстрый жидкостный хроматограф

[53] UV - УФ-ультрафиолет

Аналитические методы

Аналитические условия SEC:

Спектры SEC регистрировали на системах ЖХ Hewlett-Packard HP1100 или Agilent 1100 Series с детектором на диодной матрице с использованием колонки SEC (обычно Tosoh Biosep TSK Gel, G3000SWx1; P/N 8541; 250Å; 5 мкм; 7,8 мм × 300 мм) при 280 нм. Подвижная фаза представляла собой 100 мМ фосфат натрия, 300 мМ хлорид натрия, pH 6,8, 10% ацетонитрил (об./об.) или 1xPBS. Типичный цикл является изократическим при скорости потока 1 мл/мин в течение 20 мин.

Аналитические условия HIC:

Спектры HIC записывали на системе ЖХ HewlettPackard HP1100 или Agilent серии 1100 с детектором на диодной матрице с использованием колонки HIC (обычно Tosoh Butyl-NPR, 4,6×35 мм, 2,5 мкм, P/N: 14947) при 280 нм. Подвижная фаза А представляла собой 25 мМ фосфат натрия, 1,5 М сульфат аммония, pH 7, а подвижная фаза В представляла собой 75% 25 мМ фосфата натрия, pH 7, 25% изопропанол. Для типичного 20-минутного пробега между начальным и конечным интервалами изократического потока будет использоваться 12-минутный линейный градиент от 95%/5% А/В до 100% В.

Условия ЖХ-QTOF:

Спектры ЖХМС регистрировали на системе ВЭЖХ Agilent 1260 Bioinert Series, подключенной к масс-спектрометру Agilent 6545 QTOF, с использованием обращенно-фазовой колонки, нагретой до 80°C (обычно Agilent, PLRP-S, 5 мкм, 1000 Å, 2,1 мм × 50 мм). Были выбраны различные градиенты и время анализа, чтобы наилучшим образом охарактеризовать соединения. Подвижные фазы были основаны на градиентах ACN/вода и содержали 0,1% муравьиной кислоты. Одним из примеров градиента растворителя, который был использован, был от 95% подвижной фазы А (подвижная фаза А=99% воды+1% ACN+0,1% муравьиной кислоты) до 100% подвижной фазы В (подвижная фаза В=95% ACN+5% вода+0,1% муравьиной кислоты) с условиями, указанными в табл. 1.

Таблица 1

Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А	%В
0	0,35	82	18
1	0,35	82	18
2	0,35	70	30
19	0,5	50	50
19,5	0,5	10	90
21	0,5	10	90
21,1	0,5	82	18
22	0,5	82	18

Образцы были либо нативными, либо уменьшенными (20 мкл раствора ADC 1~5 мг/мл обрабатывали 4 мкл 0,5 М раствора DTT при 37°C в течение 30 мин). Необработанные данные были деконволютированы в соответствующем диапазоне масс с использованием программного обеспечения Agilent BioCon-firm для получения молекулярной массы белка, а для расчета DAR использовался калькулятор Agilent DAR.

Условия ЖХ/МС/МС:

Анализ ЖХ/МС/МС выполняли с использованием бинарного насоса Shimadzu UFLC LC-20AD XR и системы автоматического пробоотборника SIL-30AC MP и масс-спектрометрии AB SCIEX Triple Quad 4500 ESI.

Обычно аликвоты 5 мкл вводили в ЖХ/МС/МС после прохождения через колонку Waters Xselect C18 CSH 3,5u 2,1 мм ID × 30 мм. Подвижная фаза А содержала 0,1% муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В содержала 0,1% муравьиной кислоты в 5% воды с 95% ацетонитрила. Общее время пробега составляло 3 мин при 1,5 мл/мин с линейным градиентом от 100% А до 100% В за 1,5 мин скорости потока. Первоначально прибор работал со 100% водным растворителем подвижной фазы в течение 0,5 мин, а затем он был увеличен до 100% органического растворителя в следующие 1,5 мин.

Препаративная SEC:

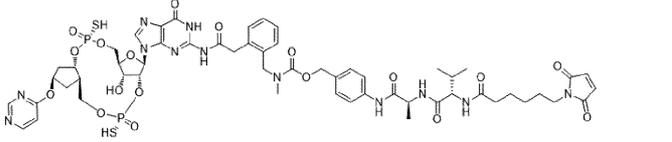
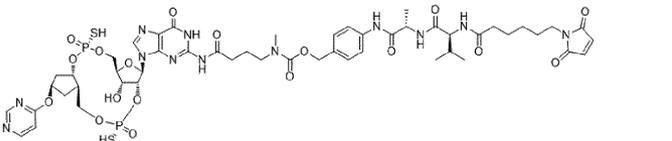
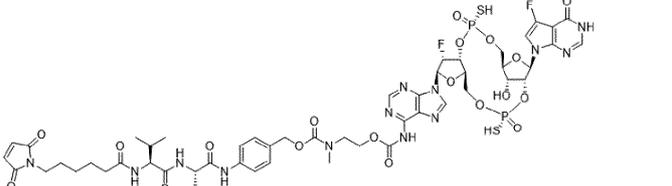
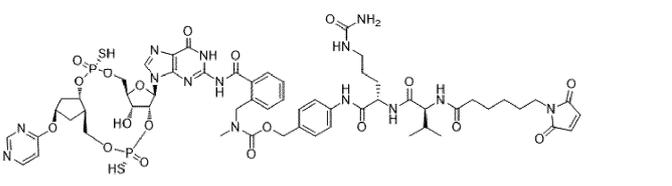
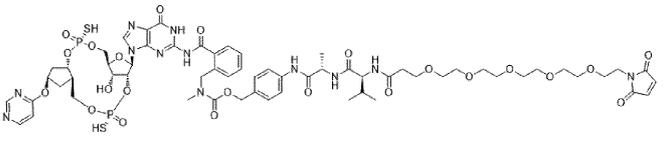
Очистку препаративной SEC проводили в системе Gilson Preparative HPLC с УФ-детектором с использованием колонки SEC (обычно GE Superdex 200 Increase 10/300 GL). Подвижная фаза - 1xPBS (pH 7,4). Типичный цикл является изократическим при скорости потока 1 мл/мин в течение 30 мин. Сбор фракций запускали на основании УФ-порога (при 214 и 280 нм).

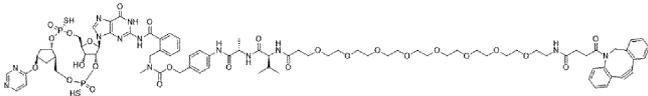
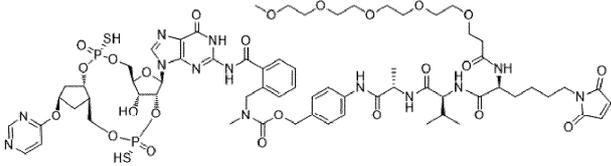
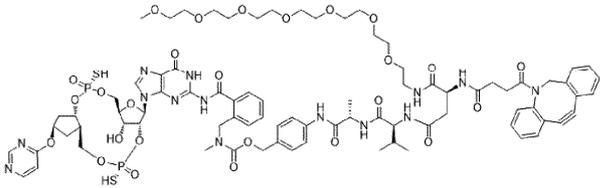
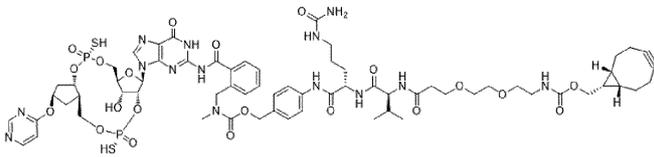
Концентрация ADC:

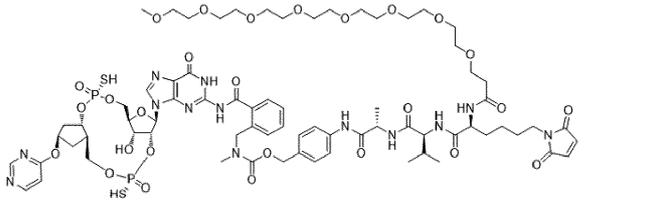
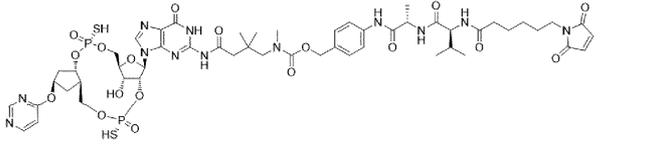
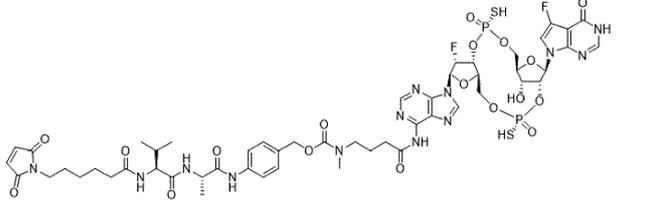
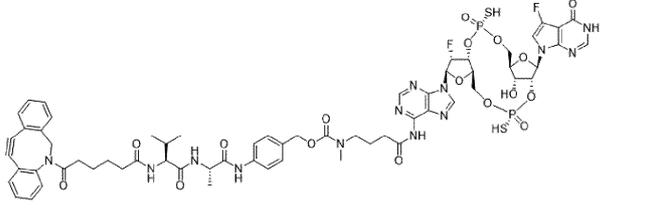
Концентрацию ADC рассчитывали по поглощению УФ-излучения при 280 нм, измеренному с помощью коэффициента NanoDrop (2000c; Fisher Scientific) после вычитания УФ-поглощения из соответствующих конструкций линкер-полезная нагрузка.

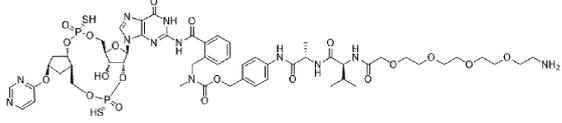
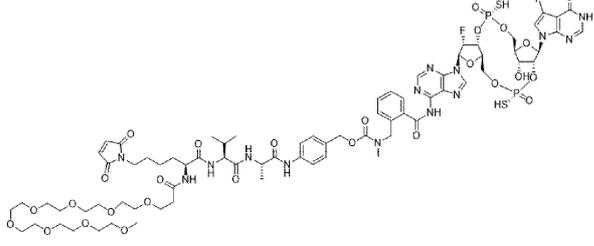
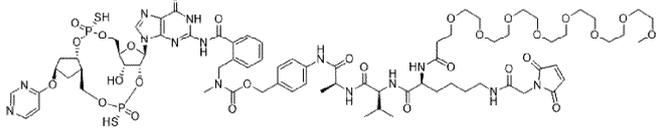
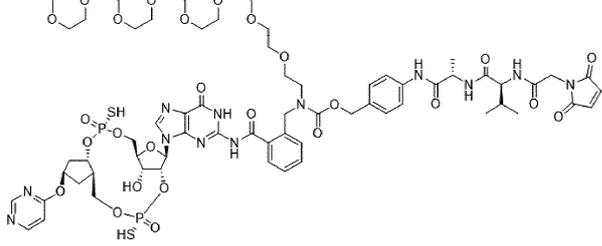
В табл. 2 перечислены конструкции компоновщика полезных нагрузок, которые использовались для приготовления ADC. Соединения содержат либо Соединение № 14 (описанное в WO 2018/100558A2), либо Соединение I-5с (описанное в WO 2019/092660) в качестве полезной нагрузки. Синтезы конструкций компоновщика полезных нагрузок описаны в заявке РСТ/В 2020/054400.

Таблица 2

Конструкция компоновщика полезных нагрузок	Структура
C-2	
C-3	
C-4	
C-5	
C-8	

C-9	 <p>Chemical structure of C-9, a complex molecule featuring a nucleoside core with a phosphate group, a pyridine ring, and a long polyether chain terminating in a fluorenyl group.</p>
C-10	 <p>Chemical structure of C-10, a complex molecule featuring a nucleoside core with a phosphate group, a pyridine ring, and a long polyether chain terminating in a fluorenyl group.</p>
C-13	 <p>Chemical structure of C-13, a complex molecule featuring a nucleoside core with a phosphate group, a pyridine ring, and a long polyether chain terminating in a fluorenyl group.</p>
C-15	 <p>Chemical structure of C-15, a complex molecule featuring a nucleoside core with a phosphate group, a pyridine ring, and a long polyether chain terminating in a fluorenyl group.</p>

C-18	
C-20	
C-21	
C-22	

C-30	
C-38	
C-39	
C-41	

Моноклональное антитело против CCR2 человека, состоящее из гуманизированных переменных доменов тяжелой и легкой цепей мышиноного моноклонального антитела 1D9 и константных доменов тяжелой цепи и легкой каппа-цепи человеческого IgG1 (гуманизированное 1D9, также называемое TAK-202, может также упоминаться как изотип hIgG1 в данном документе ниже) было получено, как описано в US 7473421 B2. Изотип hIgG4 гуманизированного 1D9 получали способом, аналогичным способу, описанному в Anticancer Research March-April 2006 vol. 26 № 2A 1057-1063.

Последовательность гуманизированного 1D9

Тяжелая цепь:

```

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS AYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRTKNNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNT LYLQMNSLKT EDTAVYYCTT
FYGNGVWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SSLGTQTYIC
NVNHNKPSNTK VDKKVEPKSC DKHTHTCPPC APELAGAPSV FLFPPKPKDT
LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYV
LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDL
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

```

Легкая цепь:

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLD DSDGKTFLNW FQQRPGQSPR
 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
 YTFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSSLTLSKAD YEKHKVYACE
 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)

Последовательность гуманизованного 1D9 hIgG4 изотипа

Тяжелая цепь:

EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSAYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRT
 KNNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTFYGNVWGQG
 TLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPPAPE
 FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSQEEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT
 VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO: 5)

Легкая цепь:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTFLNWFQQRPGQSPRRLIYLV
 SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTRLEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 6)

Пример 1. Процедура получения конъюгатов Ab-STING агонистов посредством стохастической конъюгации с цистеином

К раствору анти-CCR2-антитела (гуманизованное 1D9, 10 мг/мл) в 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина и буфере с pH 6,1 добавляли TCEP (1 мМ раствор в H₂O, 2-3 экв.). Реакционную смесь продували аргоном и инкубировали при комнатной температуре или 37°C в течение 1-3 ч при легком встряхивании. Затем к указанной выше смеси медленно добавляли желаемую конструкцию линкер-полезная нагрузка (5 мМ раствор в DMA, 6-9 экв.). Реакционную смесь продували аргоном и инкубировали при комнатной температуре или °C в течение еще 1-2 ч при легком встряхивании. Реакционную смесь очищали, следуя описанному в данном документе препаративному методу SEC, с получением ADC. Концентрацию ADC, процент агрегации и DAR определяли с помощью УФ-поглощения, аналитического SEC и ЖХ-QTOF соответственно, как описано в аналитических методах.

Схема этой процедуры показана на фиг. 1

Процедуру, аналогичную описанной выше, использовали для получения других конъюгатов антител.

Пример 2. Получение конъюгатов Ab-STING агонистов посредством стохастической конъюгации с цистеином

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, перечисленные в табл. 3, получали, как описано в примере 1, с использованием исходных конструкций линкер-полезная нагрузка, показанных в качестве исходного материала.

Таблица 3

ADC продукт	Линкер-полезная нагрузка	изотип гуманизированного 1D9	Полезная нагрузка	DAR	Агрегация %	Выход %
ADC-B1	C-3	hIgG4	Соединение I-5c	3,7	НПКО	75
ADC-B2	C-21	hIgG4	Соединение № 14	4,3	НПКО	80
ADC-B3	C-20	hIgG4	Соединение I-5c	2,4	НПКО	40
ADC-B5	C-4	hIgG4	Соединение № 14	3,4	НПКО	100
ADC-B6	C-5	hIgG4	Соединение I-5c	3,1	НПКО	56
ADC-B7	C-2	hIgG4	Соединение I-5c	3,2	НПКО	92
ADC-B8	C-10	hIgG4	Соединение I-5c	3,9	НПКО	50
ADC-B13	C-8	hIgG4	Соединение I-5c	3,9	НПКО	44
ADC-B14	C-18	hIgG1	Соединение I-5c	4,0	НПКО	74
ADC-B16	C-41	hIgG1	Соединение I-5c	4,1	НПКО	51
ADC-B17	C-38	hIgG1	Соединение № 14	3,8	НПКО	74

Пример 3. Процедура получения конъюгатов Ab-STING агонистов посредством конъюгации с транслглютаминазой

Дегликозилирование:

Раствор антитела против CCR2 (гуманизированного 1D9, полученного, как описано в US 7473421 B2, 60 мг/мл) в 50 мМ гистидина, 125 мМ аргинина, буфер с pH 6,1 разбавляли равным объемом PBS с pH 7,2. К раствору добавляли N-гликозидазу F (New England Biolabs, P0704S, 500 000 единиц/мл, 300 единиц на 1 мг антитела) и реакционную смесь нагревали до 37°C при осторожном перемешивании в течение ночи. Полученный дегликозилированный гуманизированный 1D9 подвергали буферному обмену с PBS pH 7,2.

Конъюгация транслглютаминазы:

К дегликозилированному гуманизированному раствору 1D9 (10-20 мг/мл) в PBS, полученному выше, добавляли 0,1 М раствор амин-ПЭГ-азид в ДМСО (40 экв.), а затем транслглютаминазу (ACTIVA™, Ajinomoto, 5-10 мг на 1 мг антитела) Реакционную смесь нагревали до 37°C при осторожном перемешивании в течение ночи. Продукт очищали описанным в данном документе препаративным методом SEC с получением гуманизированного 1D9-NH-PEG-азид.

Промотирированное штаммом азид-алкиновое циклоприсоединение:

К раствору гуманизированного конъюгата 1D9-NH-ПЭГ-азид, полученному выше (2~15 мг/мл в PBS), добавляли 4~10 мМ раствор ДМСО конструкций штамм-алкин, содержащих линкер-полезную нагрузку (3-5 экв., в которых ДМСО <10% от общего объема растворителя). Реакционную смесь осторожно

перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Продукт очищали описанным в данном документе препаративным методом SEC, чтобы получить ADC. Концентрацию ADC, процент агрегации и DAR определяли с помощью УФ-поглощения, аналитического SEC и ЖХ-QTOF соответственно, как описано в аналитических методах.

Схема этой процедуры показана на фиг. 2 (RG=N₃). Процедуру, аналогичную описанной выше, использовали для получения других конъюгатов антител.

Пример 4. Получение конъюгатов Ab-STING агонистов посредством конъюгации с транслугутинамизой

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, перечисленные в табл. 4, получали, как описано в примере 3, с использованием исходных конструкций линкер-полезная нагрузка, показанных в качестве исходного материала в таблице.

Таблица 4

ADC продукт	Линкер-полезная нагрузка	изотип гуманизированного ID9	Длина ПЭГ	Полезная нагрузка	DAR	Агрегация %	Выход %
ADC-B4	C-22	hIgG4	2	Соединение № 14	1,8	НПКО	70
ADC-B9	C-15	hIgG4	35	Соединение I-5c	2,0	НПКО	42
ADC-B10	C-15	hIgG4	23	Соединение I-5c	2,1	НПКО	70
ADC-B11	C-13	hIgG4	23	Соединение I-5c	2,0	НПКО	80
ADC-B12	C-9	hIgG4	9	Соединение I-5c	1,7	НПКО	50

Пример 5. Процедура получения конъюгатов Ab-STING агонистов посредством конъюгации с транслугутинамизой

Конъюгация транслугутинамизы (в соответствии с процедурой, описанной в Tumeu, L.N. et al. Mol. Pharmaceutics 2019, 16, 6, 2795-2807 после модификации): К раствору транслугутинамизы (ACTIVA™, Ajinomoto, 50 мг на 1 мг антитела) в фосфатном буфере с pH 6,1 добавляли раствор дегликозилированного гуманизированного ID9 (10~20 мг/мл, полученный в соответствии с процедурой дегликозилирования, описанной в примере 3) в PBS., затем раствор 30 мМ цистамина.2HCl (50 экв.) в фосфатном буфере с pH 6,1. Реакционную смесь нагревали до 37°C при осторожном перемешивании в течение ночи. Продукт очищали с использованием колонки Hi Trap Protein A HP (GE Healthcare, 17-0402-01), сначала промывая раствором 20 мМ фосфата, pH 7,0, а затем элюируя ADC 0,1 М лимонной кислотой, pH 4,0. Дальнейшая очистка описанным в данном документе препаративным методом SEC дает гуманизированный ID9-NH-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-NH₂.

Добавление малеимида:

К раствору гуманизированного конъюгата ID9-NH-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-NH₂, полученному выше (2~15 мг/мл в 20 мМ буфере NaOAc с pH 5), добавляли 5 мМ раствор TPPTS в воде (5 экв.) при 0°C. Полученный раствор инкубировали при 0°C в течение ночи. После удаления малых молекул диализом раствор инкубировали еще 24 ч при 0°C. Желаемую конструкцию линкер-полезная нагрузка (5 мМ раствор в ДМА, 2,05 экв.) затем медленно добавляли в указанную выше смесь. Реакцию инкубировали при 0°C в течение 1,5-2 ч при осторожном встряхивании. Реакционную смесь очищали, следуя описанному в данном документе препаративному методу SEC, с получением ADC. Концентрацию ADC, процент агрегации и DAR определяли с помощью УФ-поглощения, аналитического SEC и ЖХ-QTOF соответственно, как описано в аналитических методах.

Схема этой процедуры показана на фиг. 2 (RG=SH). Процедуру, аналогичную описанной выше, использовали для получения других конъюгатов антител.

Пример 6. Получение конъюгатов Ab-STING агонистов посредством конъюгации с транслугутинамизой

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, перечисленные в табл. 5, получали, как описано в примере 5, с использованием исходных конструкций линкер-полезная нагрузка, показанных в качестве исходного материала в таблице.

Таблица 5

ADC продукт	Линкер-полезная нагрузка	изотип гуманизированного ID9	Полезная нагрузка	DAR	Агрегация %	Выход %
ADC-B18	C-18	hIgG1	Соединение I-5c	2,0	НПКО	80
ADC-B19	C-39	hIgG1	Соединение I-5c	2,0	НПКО	89
ADC-B20	C-38	hIgG1	Соединение № 14	1,9	НПКО	80

Пример 7. Получение конъюгатов Ab-STING агонистов посредством конъюгации с транслугутинамизой

К дегликозилированному раствору ID9 (10~20 мг/мл, полученному в соответствии с процедурой дегликозилирования, описанной в примере 3) в PBS добавляли 1 М Tris, 5 М NaCl, буфер pH 8,0 (10-20% от общего объема), чтобы довести pH до 8,0. К раствору добавляли 10 мМ раствор DMSO первичных аминокислотных конструкций линкер-полезная нагрузка (20 экв.), а затем транслугутиминазу (ACTIVA™, Ajinomoto, 100-150 мг на 1 мг антитела). Реакционную смесь нагревали до 37°C при осторожном перемешивании в течение ночи. Продукт очищали с использованием колонки HiTrap Protein A HP (GE Healthcare, 17-0402-01), сначала промывая раствором 20 мМ фосфата, pH 7,0, а затем элюируя ADC 0,1 М лимонной кислотой, pH 4,0. Продукт дополнительно очищали, следуя описанному в данном документе препаративному методу SEC, с получением ADC. Концентрацию ADC, процент агрегации и DAR определяли с помощью УФ-поглощения, аналитического SEC и ЖХ-QTOF соответственно, как описано в аналитических методах.

Схема этой процедуры показана на фиг. 3. Процедуру, аналогичную описанной выше, использовали для получения других конъюгатов антител.

Пример 8. Получение конъюгатов Ab-STING агонистов посредством конъюгации с транслугутинамизой

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, перечисленные в табл. 6, получали, как описано в примере 7, с использованием исходных конструкций линкер-полезная нагрузка, показанных в качестве исходного материала в таблице.

Таблица 6

ADC продукт	Линкер-полезная нагрузка	изотип гуманизированного ID9	Полезная нагрузка	DAR	Агрегация %	Выход %
ADC-B15	C-30	hIgG1	Соединение I-5c	1,6	НПКО	64

Пример 9. Процедура получения конъюгатов Ab-STING агонистов посредством стохастической конъюгации с цистеином

К раствору антитела против mCCR2 MC-21 (Университетская клиника Регенсбурга, Регенсбург, Германия; описано у Mask, M. et al. J. Immunol. 2001, 166, 4697-4704 и WO 2007/115713) (mIgG2a с мутацией L235A-G237A-E318A в тяжелой цепи) в буфере 25 мМ цитрата натрия, pH 5,5 (3,4 мг/мл), добавляли 0,5 М tris, 25 мМ ЭДТА, раствор pH 8 (10% от общего объема) и TCEP (10 мМ раствор в H₂O, 20 экв.). Реакционную смесь продували аргоном и инкубировали при 37°C в течение 1,5 ч при легком встряхивании. Реакционную смесь очищали, следуя описанному в данном документе препаративному методу SEC. Очищенный раствор восстановленного антитела охлаждали до 4°C. Добавляли раствор дегидроаскорбиновой кислоты в ДМСО (2 мМ, 3 экв. по отношению к восстановленному антителу) и полученную смесь хранили при 4°C в течение ночи. Раствор нагревали до комнатной температуры, а затем медленно добавляли желаемую конструкцию линкер-полезная нагрузка (5 мМ раствор в ДМА, 7 экв. по отношению к восстановленному антителу). Реакцию инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5-2 ч при осторожном встряхивании. Реакционную смесь очищали, следуя описанному в данном документе препаративному методу SEC, с получением ADC. Концентрацию ADC, процент агрегации и DAR определяли с помощью УФ-поглощения, аналитического SEC и ЖХ-QTOF соответственно, как описано в аналитических методах.

Схема этой процедуры показана на фиг. 1.

Пример 10. Получение дополнительных конъюгатов мышиных Ab-STING агонистов посредством стохастической конъюгации с цистеином

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, перечисленные в табл. 7, получали, как описано в примере 9, с использованием конструкций линкер-полезная нагрузка и антитела, показанных в качестве

исходных материалов.

Таблица 7

ADC продукт	Линкер-полезная нагрузка	mAb	Полезная нагрузка	DAR	Агрегация %	Выход %
ADC-B21	C-38	MC-21	Соединение № 14	3,6	НПКО	63

Пример 11. Условия анализа стабильности плазмы

Тестируемые соединения вносили в 1 мл плазмы при концентрации 10 мкг/мл, а затем 5 аликвот равного объема распределяли в 2 мл микроцентрифужные пробирки Eppendorf (обозначенные 0, 24, 48, 72 и 96 ч). Для точки времени 0 ч пробирки сразу же хранили при -80°C, а остальные пробирки инкубировали при 37°C при умеренном встряхивании. Аликвоты удаляли из инкубатора в соответствующий момент времени и хранили при -80°C. После того, как все образцы были собраны, их оттаивали при комнатной температуре и помещали на влажный лед. 50 мкл каждого образца распределяли в трех повторностях в 96-луночный планшет для микротитрования. Образцы гасили 200 мкл ледяного метанола, содержащего 50 нМ внутреннего стандарта. Образцы встряхивали в течение 2 мин, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. 185 мкл супернатанта переносили на чистый планшет для инъекций, затем сушили в атмосфере азота при 40°C. Экстракты высушенных образцов восстанавливали 100 мкл воды класса ЖХМС, затем встряхивали в течение 1 мин для подготовки к анализу ЖХ-МС/МС.

Каждый образец разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием колонки Synergi 2.5µ Polar-RP 100A C18 (2,0 мм X 30 мм) (Phenomenex®) при 40°C с использованием градиента, состоящего из 0,1% муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель В). Аналиты были обнаружены с помощью распыления положительных ионов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) с использованием прибора SCIEX API 4500 QTRAP. Процент потери полезной нагрузки в плазме человека, приматов и мышей в различные моменты времени представлен в табл. 8.

Таблица 8

ADC	Потеря полезной нагрузки (%) в плазме человека				Потеря полезной нагрузки (%) в плазме обезьяны				Потеря полезной нагрузки (%) в плазме мышей			
	1д	2д	3д	4д	1д	2д	3д	4д	1д	2д	3д	4д
ADC-B2	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	4,5	9,9	15,6	21,7	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
ADC-B5	1,0	1,8	2,8	3,3	0,7	0,9	2,2	1,4	2,2	3,9	6,4	7,6
ADC-B6	0,3	1,0	1,6	2,4	0,6	1,0	1,8	2,1	1,4	2,0	3,1	3,9
ADC-B7	2,5	6,2	11,0	16,0	4,8	10,2	16,9	22,6	3,2	6,5	9,6	13,3
ADC-B14	1,8	3,4	4,9	5,9	1,4	3,0	3,9	5,5	4,5	6,8	16,0	19,4
ADC-B17	0,7	1,1	1,6	2,2	0,6	0,8	1,4	1,7	2,7	4,1	11,1	9,9

Пример 12. Условия анализа репортерного гена THP1 Dual Lucia

Клетки THP1-Dual™ KI-hSTING-R232 (InvivoGen # thpd-r232) были получены из линии моноцитов человека THP-1 путем стабильного двуаллельного нокаута эндогенного гена STING человека HAQ и нокаута варианта R232 человеческого STING. Эти клетки также стабильно экспрессируют индуцибельный секретируемый репортерный ген люциферазы Lucia под контролем минимального промотора ISG54 (интерферон-стимулированный ген) в сочетании с пятью IFN-стимулированными ответными элементами (ISRE). Экспрессия репортерного гена позволяет изучить путь регулирующего фактора IFN (IRF) путем оценки активности люциферазы Lucia. В дополнение к человеческому STING и люциферазе, эти клетки были сконструированы так, чтобы стабильно экспрессировать человеческий CCR2, чтобы можно было изучить опосредованную мишенью активацию пути IRF. Клетки THP-1 экспрессируют эндогенный CCR2 человека с гораздо меньшей плотностью по сравнению с плотностью клеток, сконструированных для сверхэкспрессии CCR2 человека. Следовательно, пустые векторные клетки все же можно использовать в качестве отрицательного контроля.

В день эксперимента клетки высевали на белый 384-луночный планшет (Corning 356661) при плот-

ности 15000 клеток/25 мкл на лунку в питательной среде (RPMI 1640, 2 mM L-глутамин, 25 mM HEPES, 10% термоинактивированная фетальная бычья сыворотка, 100 мкг/мл Normocin™, 100 U/мл-100 мкг/мл Pen-Strep, 10 мкг/мл бластицидина, 100 мкг/мл зеоцина и 1 мкг/мл пуромицина). В планшеты с клетками добавляли по 5 мкл образцов ADC, нацеленных на hCCR2, или образцов соединения, а затем инкубировали при 37°C в течение 20 ч. В конце инкубации добавляли 10 мкл/лунку QUANTI-Luc™ (InvivoGen # гер-q1c1) и сразу же измеряли люминесценцию с помощью LeadSeeker.

Для метода анализа, описанного выше, процент индукции сигнала люминесценции для каждого тестируемого ADC или тестируемого соединения в различных концентрациях рассчитывали относительно необработанных и контрольных обработанных образцов. Кривые зависимости концентрации соединения от процента индукции сигнала были подогнаны для получения значений EC₅₀. Специалист в данной области техники поймет, что значения, полученные как значения EC₅₀, могут изменяться в эксперименте. Наблюдаемые EC₅₀ и E_{max} представлены в табл. 9. Данные в табл. 9 ясно показывают, что конъюгация либо Соединения № 14, либо Соединения I-5c с гуманизированным 1D9 или его изотипом IgG4 резко увеличивает эффективность *in vitro* в клеточной линии THP1 со сверхэкспрессией hCCR2.

Таблица 9

ADC/Соединение	hCCR2-сверхэкспрессирующий THP1		Вектор THP 1	
	EC ₅₀ нМ	E _{max}	EC ₅₀ нМ	E _{max}
ADC-B1	Нет данных	Нет данных	>370	0,6
ADC-B2	2,63	75,1	193	61,8
ADC-B3	Нет данных	Нет данных	>160	4,6
ADC-B4	Нет данных	Нет данных	>214	5,3
ADC-B5	Нет данных	Нет данных	98,6	24,5
ADC-B14	0,53	102	366	48,5
ADC-B15	302	59,2	>1000	1,28
ADC-B16	2,46	107	>1000	34,5
ADC-B17	1,14	97,8	>1000	25,8
ADC-B18	48,2	56,1	>1000	1,52
ADC-B19	3,09	78,3	>200	2,19
Соединение № 14	760	97	710	129
Соединение I-5c	850	100	790	126

Пример 13. Фармакокинетическая оценка на мышах

Для оценки ADC *in vivo* у интактных мышей Balb/C использовали самок мышей Balb/C в возрасте 6-8 недель (приобретенных в Jackson Laboratory). Мышей кормили обычным рационом и помещали в помещение для животных SPF в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных и правилами Институционального комитета по уходу и использованию животных. Животных содержали при температуре 18-26°C, относительной влажности 50±20% и периодических световых и темных циклах продолжительностью 12 ч с пищей и водой, доступными *ad libitum*.

Фармакокинетику ADC изучали после инъекции ADC мышам Balb/C. Образцы сыворотки отбирали в различные моменты времени и хранили в замороженном виде для анализа.

Уровни общих антител и конъюгированных полезных нагрузок в плазме мышей измеряли с помощью анализа ЖХ/МС на основе иммунозахвата 2-в-1 в системе Shimadzu UHPLC, сопряженной с масс-спектрометром Sciex 6500 QTRAP. Вкратце, образцы плазмы мышей инкубировали с магнитными шариками, покрытыми антителами против человеческого IgG, в течение 45 мин при комнатной температуре, затем неспецифически связанные белки удаляли промыванием магнитных шариков PBST (буфер PBS при pH 7,4, содержащий 0,05% Твин 20) и буфером PBS последовательно. После этого как голые антитела (DAR=0), так и ADC (DAR≥1) элюировали с магнитных шариков 0,1% трифторуксусной кислотой. После нейтрализации элюентов и добавления внутренних стандартов, меченых стабильным изотопом, пипеткой отбирали одну аликвоту образца и расщепляли папаином в течение 1 ч при 37°C, а затем использовали для анализа конъюгированных полезных нагрузок методом ЖХ/МС. Оставшиеся образцы подвергали расщеплению трипсином/лиз-С в течение 1 ч при 70 °C, затем использовали для анализа общего количества антител методом ЖХ/МС.

Свободную полезную нагрузку в кровотоке также измеряли с помощью ЖХ/МС после выполнения преципитации белков плазмы. Короче говоря, плазму мыши смешивали с 8 объемами метанола, содержащего внутренний стандарт, меченый стабильным изотопом, затем супернатанты выпаривали досуха при 40°C в слабом потоке азота. Наконец, остатки восстанавливали в воде для ЖХ/МС перед анализом ЖХ/МС.

Профиль ФК ADC-B14, ADC-B15, ADC-B16, ADC-B17 и ADC-B18 представлен в табл. 10. Графи-

ческое изображение ФК плазмы показано на фиг. 4-8.

Таблица 10

ADC (доза полезной нагрузки)		Время полураспада (час)	AUC (последняя) (ч*нМ)
ADC-B14 (0,05 мг/кг)	Конъюгированная полезная нагрузка	41	47600
	Антитело	68	14370
ADC-B15 (0,05 мг/кг)	Конъюгированная полезная нагрузка	53	37282
	Антитело	73	13434
ADC-B16 (0,05 мг/кг)	Конъюгированная полезная нагрузка	44	39200
	Антитело	58	12300
ADC-B17 (0,05 мг/кг)	Конъюгированная полезная нагрузка	36	58200
	Антитело	59	20400
ADC-B18 (0,05 мг/кг)	Конъюгированная полезная нагрузка	49	65400
	Антитело	60	39300

Пример 14. Фармакокинетическая оценка на мышах

Переносимость ADC оценивали на наивных мышах C57BL/6. В день исследования 0 животных взвешивали, а затем внутривенно вводили указанные количества ADC (по концентрации полезной нагрузки). Затем животных регулярно взвешивали (не более 3 дней между каждым измерением) в течение по меньшей мере 14 дней после введения дозы и после каждого измерения рассчитывали потерю массы тела на основе начальной массы перед введением дозы. Любые животные с потерей массы тела более чем на 20%, а также те, которые кажутся умирающими или иным образом проявляют признаки дистресса, превышающие гуманные конечные точки исследования, исключались из исследования и подвергались эвтаназии в соответствии с рекомендациями протокола IACUC. Максимально переносимая доза (MTD) может быть рассчитана как самая высокая доза (по концентрации полезной нагрузки), при которой ни одно животное не было обнаружено мертвым или его необходимо удалить из исследования либо из-за потери массы более чем на 20% или иным образом превысившим гуманную конечную точку. MTD ADC-B17 составлял 200 мкг/кг (по концентрации полезной нагрузки, фиг. 9), а MTD ADC-B20 составлял 250 мкг/кг (по концентрации полезной нагрузки, фиг. 10).

Пример 15. Оценка противоопухолевой активности у мышей

[94] Эффективность ADC-B21 по сравнению с Соединением № 14 оценивали на мышинной модели C57BL/6 с опухолью MC38 (мышинная аденокарцинома толстой кишки). Для имплантации опухоли мышам C57BL/6 подкожно инъецировали 1×10^6 клеток MC38, после чего мышей контролировали на предмет роста опухоли. Когда объемы опухоли достигали в среднем около 100 мм³, животных рандомизировали по объему опухоли и внутривенно вводили 100 мкл либо носущей среды, либо Соединения № 14 в дозе 2000 мкг/кг, либо ADC-B21 в дозе 50 мкг/кг. Первый день дозирования считался Днем исследования 0. Соединение № 14 и носущую среду снова вводили в Дни исследования 3 и 6, тогда как ADC-B21 вводили однократно в День исследования 0. Объемы опухоли и измерения массы тела можно проводить по крайней мере два раза в неделю до конца исследования, и животные могут быть исключены из исследования в случае потери массы тела более чем на 20% от исходной массы тела или объемов опухоли, превышающих 2000 мм³. К 63 дню исследования у животных, получавших Соединение № 14, наблюдался в общей сложности 1 из 6 полных ответов, по сравнению с лечением ADC-B21, у которых в общей сложности наблюдалось 4 из 6 полных ответов.

Графическое представление наблюдаемой противоопухолевой активности показано на фиг. 11, демонстрируя значительно повышенную эффективность анти-CCR2 ADC при гораздо более низком уровне дозы по сравнению с его полезной нагрузкой.

Пример 16. Оценка токсичности/фармакодинамики у нечеловекообразных приматов

2 варианта ADC оценивали в исследованиях токсичности на яванских макаках.

Исследование однократной дозы проводили с внутривенным введением ADC-B2 в дозах 0,15, 0,5, 1,5 или 5 мг/кг (2 обезьяны/пол/группа) (доза белка). Введение 5 мг/кг ADC-B2 ассоциировалось с ранней смертностью у двух животных на 2-й день из-за легочной токсичности, которая была аналогична предыдущим исследованиям с неконъюгированной полезной нагрузкой (Соединение № 14) (клинические признаки уменьшения бледности слизистых оболочек тела, и ослабление сердечных тонов, а также гис-

тологические признаки легкого застоя в легочных сосудах и острого альвеолярного кровоизлияния, которые коррелировали с макроскопическим изменением цвета, внутриаальвеолярным отеком и фибрином, увеличением альвеолярных макрофагов и нейтрофильных инфильтратов, а у одного животного - плевральным и перикардиальным выпотом). Другие признаки, характерные для этих животных с ранней гибелью, были обнаружены в костном мозге (снижение гематопозитической клеточности, некроз единичных клеток и увеличение количества гистиоцитов), печени (множественные случайные очаги некроза) и лимфоидных тканях (снижение клеточности и/или некроз зародышевых центров в селезенке, миндалин и некроз одиночных клеток в тимусе). При клиническом патологоанатомическом анализе и анализе цитокинов у одного животного с ранней гибелью, образцы которого были доступны, были обнаружены признаки провоспалительной/острой фазы ответа и повышения уровней цитокинов IP-10, IL-6, MCP 1 и TNF- α , которые были аналогичны признакам животных, доживших до терминальной эвтазии. Гистологические данные у животных, выживших после терминальной эвтаназии, ограничивались повышенной клеточностью лимфатических узлов (из-за увеличения количества лимфоцитов и гистиоцитарных клеток) при $\geq 1,5$ мг/кг и некрозом зародышевого центра лимфатических узлов у одного животного при дозе 5 мг/кг. Фармакологические конечные точки, добавленные к исследованию, включали проточную цитометрию для оценки популяций моноцитов и идентифицированное дозозависимое снижение относительного процента классических, промежуточных и неклассических моноцитов, а также супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) в День 1: через 6 и 24 ч после введения дозы с частичным восстановлением к 1-му дню: через 48 ч после введения.

Исследование с повторными дозами проводили с внутривенным введением ADC-B17 каждые запланированные 2 недели, всего 3 дозы по 0,3, 1 или 3 мг/кг (доза белка) (2 обезьяны/пол/группа); однако из-за ранней гибели 2 животных из группы, получавшей дозу 3 мг/кг, после введения второй дозы на 15-й день, оставшиеся 2 животных в группе 4 получали уменьшенную дозу 2 мг/кг на 29-й день (третья/последняя доза). Повторное введение $\geq 0,3$ мг/кг ADC-B17 ассоциировалось с развитием антилекарственных антител (ADA) у 10 из 12 животных в 1 или более временных точках после 15-го дня (увеличение соотношения сигнал/шум на 1-3 порядка), направленное главным образом против иммуностимулирующей полезной нагрузки ADC, с некоторым ADA, также наблюдаемым в конце временного курса к компоненту антител ADC. Эти ADA были связаны со снижением воздействия (C_{max}) после третьей дозы у большинства ADA-положительных животных. Ранняя смертность, связанная с ADC-B17, наблюдалась при дозе ≥ 1 мг/кг. Одно животное при дозе 1 мг/кг было подвергнуто эвтаназии в умирающем состоянии на 29-й день, через около 7 ч после введения дозы. При дозе 3 мг/кг 1 животное было обнаружено мертвым через около 6 ч после введения дозы на 15-й день, и 1 животное было умерщвлено в умирающем состоянии на 15-й день, через около 7 ч после введения дозы. Клинические признаки, связанные с ADC-B17, у этих животных перед смертью включали покраснение кожи (лица), снижение активности, сутулость, потерю массы тела, чрезмерное слюноотделение, частично закрытые глаза, запавшие глазные яблоки, повышение температуры тела, шумы в сердце и/или повышенные частота сердечных сокращений и/или частота дыхания. Причина смертности была связана с иммунологическими эффектами, которые считались вероятными из-за реакций иммуногенности/гиперчувствительности, хотя нельзя было исключать прямого воздействия ADC-B17. Данные химического анализа сыворотки от всех 3 ранних умерших в целом были сходны с животными, которые дожили до терминальной эвтаназии, и соответствовали системной провоспалительной реакции и мышечному и/или гепатоцеллюлярному повреждению. Параметры гематологии и коагуляции оценивали у умерщвленных умирающих животных на 29-й день, но не у животных на 15-й день; было минимальное снижение лимфоцитов и эозинофилов, связанное со стрессом, и никаких изменений параметров свертывания крови. Наблюдаемые изменения иммунофенотипа были аналогичны таковым у выживших животных, описанным ниже. Большинство микроскопических признаков у умерших животных на 15-й день были сходными, но более серьезными, чем у животных, доживших до терминальной эвтаназии, и состояли из минимального гепатоцеллюлярного некроза и системных признаков, соответствующих иммуноопосредованным эффектам (инфильтраты иммунных клеток в синусоидах печени, надпочечниках, интерстиция легкого и селезенки; тромбоз капилляров легкого; некроз/отложение фибрина в селезенке; дегенерация миокарда; и микрокровоизлияния в надпочечниках и эпикардиальном жире). Дополнительные данные, уникальные для рано умерших, считались вторичными по отношению к стрессу или состоянию умирания (снижение клеточности тимуса, коррелирующее со снижением веса тимуса и дегенерацией ацинарных клеток поджелудочной железы). У умирающего животного, умерщвленного на 29-й день, единственным признаком было минимальное кровоизлияние в надпочечники.

У животных, выживших после терминальной эвтаназии, при дозе $\geq 0,3$ мг/кг на 3-й день наблюдались признаки клинической патологии, состоящие из легкого или умеренного увеличения 1 или более из аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, глутаматдегидрогеназы и креатинкиназы. Эти данные соответствовали мышечному и/или гепатоцеллюлярному происхождению и не имели четких гистологических коррелятов. Другие данные, полученные на 3-й день, соответствовали системному провоспалительному ответу/реакции острой фазы (повышение уровня глобулина и С-реактивного белка от минимального до легкого и снижение уровня общего белка, альбумина и соотношения альбумин/глобулин

от минимального до легкого), что гистологически коррелировало с воспалительными клеточными инфильтратами во многих тканях или обезвоживанием (небольшое повышение уровня мочевины, креатинина и фосфора) без гистологических коррелятов. Каждое из этих изменений частично или полностью восстанавливается к 30 дню. Дополнительные изменения химического состава сыворотки на 14-й и/или 30-й день у мужчин состояли только из умеренного повышения уровня глобулинов и умеренного повышения общего билирубина, оба из которых соответствовали продолжающейся острой фазе воспалительного ответа. Результаты гематологии и коагуляции у отдельных животных при дозе $\geq 0,3$ мг/кг при терминальной эвтаназии на 30-й День, включающие легкое увеличение количества лейкоцитов, нейтрофилов, фибриногена и активированного частичного тромбопластинового времени, а также легкое снижение количества эритроцитов, гемоглобина, гематокрита. Эти данные соответствовали системному провоспалительному ответу/ответу острой фазы.

Изменения моноцитов и MDSC в образцах плазмы оценивали с использованием панели проточной цитометрии, предназначенной для оценки количества моноцитов и MDSC, а также экспрессии CCR2, CD80 и CD86 на моноцитах. Данные этой оценки согласовывались с ожидаемой фармакологией $\geq 0,3$ мг/кг ADC-B17 и состояли из дозозависимого от легкой до тяжелой степени снижения абсолютного количества классических моноцитов, неклассических моноцитов и клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSC) после каждой дозы при восстановлении до или выше исходного уровня перед каждой последующей дозой, как измерено с помощью проточной цитометрии. Экспрессия CCR2 в классических моноцитах снижалась после введения дозы с восстановлением почти до исходного уровня при всех дозах перед последующими дозами (фиг. 12, вверху). Кроме того, было обнаружено, что экспрессия CD80 как в классических моноцитах, так и в MDSC увеличивается после каждой дозы, а затем восстанавливается до исходного уровня или ниже перед последующим введением дозы (фиг. 12, середина и низ соответственно).

Изменения в цитокинах также оценивали в образцах плазмы и показали, что при $\geq 0,3$ мг/кг ADC-B17 состоял из независимого от дозы увеличения концентрации IP-10 и MCP-1 в сыворотке, потенциальных биомаркеров фармакологии, которые достигли пика через 6 ч после введения дозы и вернулись или имели тенденцию к возвращению к исходным значениям через 24 ч после введения дозы. Наблюдалось дополнительное повышение уровней IL-1RA, IL-6, TNF- α и IFN- γ в сыворотке, которое достигало максимума через 6 ч после введения дозы и возвращалось или имело тенденцию к возвращению к исходным значениям через 24 ч после введения дозы или до введения следующей дозы (фиг. 13).

Гистологические данные у животных при терминальной эвтаназии состояли из многоочагового гепатоцеллюлярного некроза без клинической патологии, коррелирующей при $\geq 0,3$ мг/кг. При дозе ≥ 1 мг/кг наблюдалось снижение клеточности как эритроидных, так и миелоидных предшественников в костном мозге от минимального до легкого (что соответствует гематологическим данным умеренного снижения эритроцитов и у 1 животного заметного снижения лимфоцитов), спорадически наблюдались смешанные клеточные инфильтраты внутри синусоидов надпочечников и печени, повышенная клеточность (смешанные клетки) красной пульпы селезенки, что коррелирует с небольшим увеличением массы селезенки, и минимальное очаговое кровоизлияние в двенадцатиперстной кишке или сердце. Эти органы с воспалительными клеточными инфильтратами/кровоизлияниями считались, вероятно, частью системной провоспалительной реакции и не считались прямой токсичностью органов-мишеней. Иммуногистохимию для IgG человека, IgG обезьяны и IgM, C3 и/или C9 проводили для того, чтобы определить, присутствовало ли образование иммунных комплексов и отложение тканей в областях инфильтратов иммунных клеток и/или повреждения тканей. Зернистых отложений, свидетельствующих об образовании иммунных комплексов, обнаружено не было.

Пример 17. Оценка фармакокинетики у нечеловекообразных приматов

Образцы сыворотки брали у приматов, отличных от человека, которым вводили ADC-B17, описанный в примере 16, в различные моменты времени и хранили в замороженном виде для анализа. Уровни общих антител и конъюгированных полезных нагрузок в плазме обезьян измеряли с помощью анализа ЖХ/МС на основе иммунозахвата 2-в-1 в системе Shimadzu UHPLC, сопряженной с масс-спектрометром Sciex 6500+QTRAP. Вкратце, образцы плазмы обезьян инкубировали с магнитными шариками, покрытыми антиидиотипическими антителами, в течение 60 мин при комнатной температуре, затем неспецифически связанные белки удаляли путем трехкратной промывки магнитных шариков буфером PBS. После этого как голые антитела (DAR=0), так и ADC (DAR \geq 1) элюировали с магнитных шариков 0,1% трифторуксусной кислотой. После нейтрализации элюентов и добавления меченых стабильными изотопами внутренних стандартов одну аликвоту образца отбирали пипеткой и расщепляли трипсином/лиз-С в течение 1 ч при 60°C, затем использовали для ЖХ/МС-анализа общих антител. Оставшиеся образцы подвергали расщеплению папаином в течение 1 ч при 37°C, а затем использовали для ЖХ/МС анализа конъюгированных полезных нагрузок.

Свободную полезную нагрузку в кровотоке также измеряли с помощью ЖХ/МС после выполнения преципитации белков плазмы. Вкратце, в обезьянью плазму сначала добавляли меченое стабильным изотопом соединение № 14 с последующим осаждением белка с использованием метанола, затем суперна-

танты выпаривали досуха в слабом потоке азота. Наконец, остатки восстанавливали раствором ацетата аммония перед анализом ЖХ/МС.

ФК-профиль ADC-B17 обобщен в табл. 11. Графическое изображение ФК плазмы показано на фиг. 14.

Таблица 11

Доза белка ADC-B17		Время полураспада (час)	AUC (последняя) (ч*нМ)
3 мг/кг	Конъюгированная полезная нагрузка	25	33310
	Антитело	40	14470
1 мг/кг	Конъюгированная полезная нагрузка	17	9648
	Антитело	52	4092
0,3 мг/кг	Конъюгированная полезная нагрузка	11	2220
	Антитело	18	885

Пример 18 (Пророческий). Комбинированная терапия с использованием антител PD-1/PD-L1. Переносимость ADC в комбинации с антителом против PD-1 и/или против PD-L1 можно оценить на наивных мышах C57BL/6.

Комбинации ADC и анти-PD-1/анти-PD-L1, которые можно использовать, показаны в табл. 12.

Таблица 12

ADC продукт	Конструкция компоновщика полезных нагрузок	Изотип гуманизированного 1D9	Полезная нагрузка	Антитело
ADC-B2	C-21	hIgG4	Соединение № 14	PD-1
ADC-B5	C-4	hIgG4	Соединение № 14	PD-1
ADC-B17	C-38	hIgG1	Соединение № 14	PD-1
ADC-B4	C-22	hIgG4	Соединение № 14	PD-1
ADC-B20	C-38	hIgG1	Соединение № 14	PD-1
ADC-B21	C-38	MC-21	Соединение № 14	PD-1
ADC-B2	C-21	hIgG4	Соединение № 14	PD-L1
ADC-B5	C-4	hIgG4	Соединение № 14	PD-L1
ADC-B17	C-38	hIgG1	Соединение № 14	PD-L1
ADC-B4	C-22	hIgG4	Соединение № 14	PD-L1
ADC-B20	C-38	hIgG1	Соединение № 14	PD-L1
ADC-B21	C-38	MC-21	Соединение № 14	PD-L1

Для исследований переносимости ADC, как показано в табл. 12, можно вводить в дозе 0,05 мг/кг и антитела против PD-1 и против PD-L1 можно вводить в дозе 0,5, 5 или 50 мг/кг. Поскольку пембролизумаб-антитело против PD-1 не дает перекрестной реакции с PD-1 грызунов, мыши будут получать крысиное антитело J43 против мышинного PD-1 и крысиное антитело M1H5 против мышинного PD-L1, каждое в дозе 0,5, 5 и 50 мг/кг.

В день исследования 0 животных можно взвесить, а затем внутривенно ввести указанные количества ADC в комбинации с указанными количествами антител против PD-1 и/или против PD-L1. Затем животных регулярно взвешивают (не более 3 дней между каждым измерением) в течение по меньшей мере 14 дней после введения дозы, и после каждого измерения можно рассчитать потерю массы тела на основе исходной массы перед введением дозы. Любые животные с потерей массы тела более чем на 20%, а также те, которые кажутся умирающими или иным образом проявляют признаки дистресса, превышающие гуманные конечные точки исследования, могут быть исключены из исследования и подвергнуты эвтаназии в соответствии с рекомендациями протокола IACUC. Максимально переносимая доза (MTD) может быть рассчитана как самая высокая доза (по концентрации полезной нагрузки+концентрация антител PD-1/PD-L1), при которой ни одно животное не может быть обнаружено мертвым или его необходимо удалить из исследования либо из-за потеря веса более чем на 20% или иным образом превысившим гуманную конечную точку. Если достигается удовлетворительная переносимость с ADC и антителами либо против PD-1 либо против PD-L1, комбинированная терапия с ADC и антителами против PD-1 и против PD-L1 может быть проведена аналогичным образом.

Исследование эффективности комбинации с лучевой терапией на мышах

Эффективность ADC, как показано в табл. 12, в комбинации с антителом против PD-1 J43 или против PD-L1 M1H5 можно протестировать на мышинной модели C57BL/6 с опухолью MC38 (аденокарцинома толстой кишки мышей). Для имплантации опухоли мышам C57BL/6 можно подкожно инъецировать 1×10^6 клеток MC38, после чего мышам можно контролировать на предмет роста опухоли. Когда объемы опухоли достигают в среднем около 100 мм^3 , животных можно рандомизировать по объему опухоли и внутривенно ввести 100 мкл любой несущей среды, соответствующий ADC из табл. 12 в дозе 50 мкг/кг и J43 в дозе 0,5, 5 или 50 мг/кг или M1H5 в дозе 0,5, 5 или 50 мг/кг. Первый день дозирования можно считать днем исследования 0. Объемы опухоли и измерения массы тела можно проводить по крайней мере два раза в неделю до конца исследования и животные могут быть исключены из исследования в случае потери массы тела более чем на 20% от исходной массы тела или объемов опухоли, превышающих 2000 мм^3 . Животных можно оценить на 63-й день исследования в отношении полных и частичных ответов. Если удовлетворительное уменьшение объема опухоли не достигается с помощью комбинации ADC и антителами против PD-1 или против PD-L1, комбинированная терапия с ADC и антителами против PD-1 и против PD-L1 может быть проведена аналогичным образом.

Исследование эффективности комбинации с лучевой терапией у нечеловекообразных приматов

ADC в комбинации с анти-PD-1 антителом пембролизумабом или анти-PD-L1 антителом атезолизумабом можно вводить после лучевой терапии внутривенно яванским макакам каждые 2 недели (с 1 по 29 день) всего 3 дозы по 0,3, 0,5 или 1 мг/кг (доза белка) (2 обезьяны/пол/группа). Пембролизумаб можно вводить в дозе 0,5 или 15 мг/кг, и атезолизумаб можно вводить в дозе 0,5 или 15 мг/кг. Животных можно оценивать по гематологическим параметрам и параметрам коагуляции, общему химическому составу сыворотки, а в конце исследования можно провести гистологическую оценку.

Образцы крови могут быть взяты у нечеловеческих приматов в различные моменты времени, а уровни общих антител и конъюгированных полезных нагрузок в плазме обезьян могут быть измерены с помощью анализа ЖХ/МС на основе иммунозахвата 2-в-1 в системе УВЭЖХ Shimadzu, сопряженной с масс-спектрометром Sciex 6500+QTRAP, как описано выше. Свободная полезная нагрузка в кровотоке также может быть измерена с помощью ЖХ/МС после проведения преципитации белков плазмы, как описано выше.

Пример 19 (пророческий). Комбинированная терапия с облучением

Исследование переносимости

Переносимость ADC в комбинации с антителом против PD-1 и/или против PD-L1 и облучением можно оценить на наивных мышах C57BL/6.

ADC, антитела против PD-1 и/или против PD-L1 и комбинации облучения, которые можно использовать, показаны в табл. 13.

Таблица 13

ADC продукт	Антитело	Облучение
ADC-B2	PD-1	0,5 Гр
ADC-B5	PD-1	0,5 Гр
ADC-B17	PD-1	0,5 Гр

ADC-B4	PD-1	0,5 Гр
ADC-B20	PD-1	0,5 Гр
ADC-B21	PD-1	0,5 Гр
ADC-B2	PD-L1	0,5 Гр
ADC-B5	PD-L1	0,5 Гр
ADC-B17	PD-L1	0,5 Гр
ADC-B4	PD-L1	0,5 Гр
ADC-B20	PD-L1	0,5 Гр
ADC-B21	PD-L1	0,5 Гр
ADC-B2	PD-1	1 Гр
ADC-B5	PD-1	1 Гр
ADC-B17	PD-1	1 Гр
ADC-B4	PD-1	1 Гр
ADC-B20	PD-1	1 Гр
ADC-B21	PD-1	1 Гр
ADC-B2	PD-L1	1 Гр
ADC-B5	PD-L1	1 Гр
ADC-B17	PD-L1	1 Гр
ADC-B4	PD-L1	1 Гр
ADC-B20	PD-L1	1 Гр
ADC-B21	PL-L1	1 Гр

Для исследований переносимости ADC можно вводить в дозе 0,05 мг/кг, антитела против PD-1 и против PD-L1 можно вводить в дозе 0,5, 5 или 50 мг/кг, а облучение можно вводить в дозе 0,5 мг/кг и 1 Гр.

В день исследования 0 животных можно взвесить, облучение ввести примерно за 5 ч до внутривенного введения указанных количеств ADC в сочетании с указанными количествами антител против PD-1 J43 и/или против PD-L1 MН5. Затем животных регулярно взвешивают (не более 3 дней между каждым измерением) в течение по меньшей мере 14 дней после введения дозы, и после каждого измерения можно рассчитать потерю массы тела на основе исходной массы перед введением дозы. Любые животные с потерей массы тела более чем на 20%, а также те, которые кажутся умирающими или иным образом проявляют признаки дистресса, превышающие гуманные конечные точки исследования, могут быть исключены из исследования и подвергнуты эвтаназии в соответствии с рекомендациями протокола IACUC. Максимально переносимая доза (MTD) может быть рассчитана как самая высокая доза облучения в режиме комбинированной терапии, при которой ни одно животное не может быть обнаружено мертвым или не подлежит исключению из исследования либо из-за потери массы тела более чем на 20%, либо из-за превышения гуманной конечной точки по другим причинам. Если удовлетворительное уменьшение объема опухоли достигается с помощью ADC, антителами против PD-1 или против PD-L1 и облучением, комбинированная терапия с ADC, антителами против PD-1 и против PD-L1 и облучением может быть проведена аналогичным образом.

Исследование эффективности комбинации с лучевой терапией на мышах

Эффективность ADC в комбинации с анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 антителами и облучением, как показано в табл. 13, может быть проверена на мышинной модели C57BL/6, несущей опухоль MC38 (мышинная аденокарцинома толстой кишки). Для имплантации опухоли мышам C57BL/6 можно подкожно инъецировать 1×10^6 клеток MC38, после чего мышам можно контролировать на предмет роста опухоли. Когда объемы опухоли достигают в среднем около 100 мм^3 , животных можно рандомизировать по объему опухоли и облучать либо 0,5 Гр, либо 1 Гр и внутривенно вводить 100 мкл любого несущей среды, соответствующий ADC из табл. 13 в дозе 50 мкг/кг и анти-PD1-антитело J43 в дозах 0,5, 5 или 50 мг/кг или анти-PD-L1-антитело MН5 в дозах 0,5, 5 или 50 мг/кг. Первый день дозирования можно считать днем исследования 0. Объемы опухоли и измерения массы тела можно проводить по крайней мере два раза в неделю до конца исследования, и животные могут быть исключены из исследования в случае потери массы тела более чем на 20% от исходной массы тела или объемов опухоли, превышающих 2000 мм^3 . Животных можно оценить на 63-й день исследования в отношении полных и частичных ответов. Если удовлетворительное уменьшение объема опухоли не достигается с помощью комбинации ADC с облучением и антителами против PD-1 или против PD-L1, комбинированная терапия с ADC и облучением и антителами против PD-1 и против PD-L1 может быть проведена аналогичным образом.

Исследование эффективности комбинации с лучевой терапией у нечеловекообразных приматов

Яванских макаков можно лечить дозами 0,8 и 1,2 Гр перед введением ADC и антител против PD-1 и/или против PD-L1. ADC в комбинации с анти-PD-1 антителом пембролизумабом или анти-PD-L1 антителом атезолизумабом можно вводить после лучевой терапии внутривенно яванским макакам каждые 2 недели (с 1 по 29 день) всего 3 дозы по 0,3, 0,5 или 1 мг/кг (доза белка) (2 обезьяны/пол/группа). Пембролизумаб можно вводить в дозе 0,5 или 15 мг/кг и атезолизумаб можно вводить в дозе 0,5 или 15 мг/кг. Животных можно оценивать по гематологическим параметрам и параметрам коагуляции, общему химическому составу сыворотки, а в конце исследования можно провести гистологическую оценку.

Образцы крови могут быть взяты у нечеловеческих приматов в различные моменты времени, а уровни общих антител и конъюгированных полезных нагрузок в плазме обезьян могут быть измерены с помощью анализа ЖХ/МС на основе иммунозахвата 2-в-1 в системе УВЭЖХ Shimadzu, сопряженной с масс-спектрометром Sciex 6500+QTRAP, как описано выше. Свободная полезная нагрузка в кровотоке также может быть измерена с помощью ЖХ/МС после проведения преципитации белков плазмы, как описано выше. Гематологическое восстановление после облучения и экстрамедуллярной токсичности можно оценить у животных.

Следует понимать, что раздел "Подробное описание", а не разделы "Сущность изобретения" и "Реферат", предназначен для использования для интерпретации по формуле изобретения. Разделы "Сущность изобретения" и "Реферат" могут излагать один или более, но не все примерные варианты реализации данного раскрытия, как предполагается изобретателем(ми), и, таким образом, никоим образом не предназначены для ограничения данного раскрытия и прилагаемой по формуле изобретения.

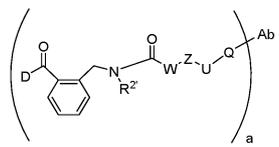
Данное раскрытие было описано выше с помощью функциональных строительных блоков, иллюстрирующих реализацию определенных функций и их взаимосвязи. Границы этих функциональных строительных блоков были определены в данном документе произвольно для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены при условии, что указанные функции и их взаимосвязи выполняются надлежащим образом.

Вышеприведенное описание конкретных вариантов реализации будет настолько полно раскрывать общий характер раскрытия, что другие могут, применяя знания в пределах квалификации в данной области, легко модифицировать и/или адаптировать для различных приложений такие конкретные варианты реализации, без излишнего экспериментирования, без отклонения от общей концепции данного раскрытия. Следовательно, предполагается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов реализации, основанных на идее и руководстве, представленных в данном документе. Следует понимать, что фразеология или терминология в данном документе предназначена для описания, а не ограничения, так что терминология или фразеология данного описания должна интерпретироваться квалифицированным специалистом в свете идей и руководств к действию.

Охват и объем данного раскрытия не должны ограничиваться каким-либо из описанных выше примерных вариантов реализации, а должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и ее эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы



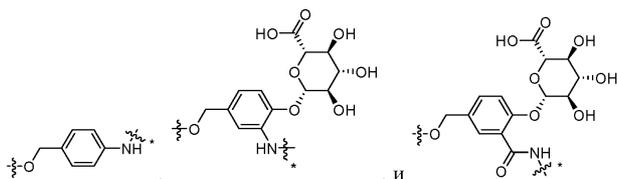
или его фармацевтически приемлемая соль, где

a является целым числом от 1 до 8;

Ab представляет собой антитело против CCR2 или его антигенсвязывающий фрагмент;

R² представляет собой C₁-C₄ алкил;

W выбран из



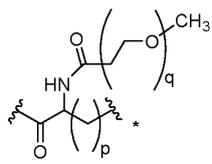
где

~~~~~ обозначает точку присоединения к карбонильной группе и

\* обозначает точку присоединения к Z;

Z представляет собой Ala-Val или Val-Ala;

U представляет собой



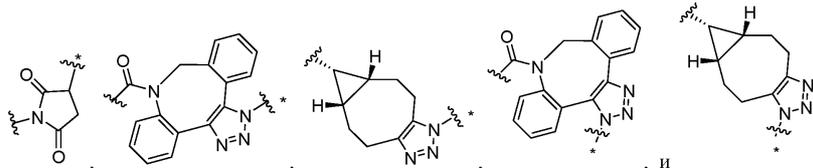
где  $p$  является целым числом от 1 до 6;

$q$  является целым числом от 1 до 20;

~~~~~ обозначает точку присоединения к Z;

~~~~~\* обозначает точку присоединения к Q;

Q выбран из

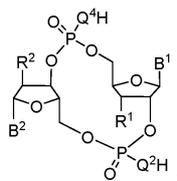


где

~~~~~ обозначает точку присоединения к U;

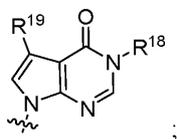
~~~~~\* обозначает точку присоединения к Ab и

D представляет собой



где  $R^1$  и  $R^2$  каждый независимо представляет собой гидроксигруппу или атом галогена;

$B^1$  представляет собой

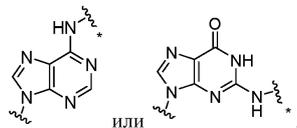


где  $R^{18}$  представляет собой водород или  $C_{1-6}$ алкил;

$R^{19}$  представляет собой атом галогена и

~~~~~ обозначает точку присоединения к D и

B^2 представляет собой



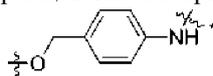
где ~~~~~ обозначает точку присоединения к D;

~~~~~\* обозначает точку присоединения к части исходного молекулярного фрагмента и

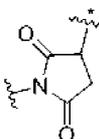
$Q^2$  и  $Q^4$  каждый независимо представляет собой атом кислорода или атом серы.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $R^2$  представляет собой  $CH_3$ .

3. Соединение по п.1 или 2 или его фармацевтически приемлемая соль, где W представляет собой

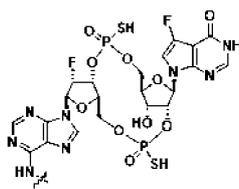


4. Соединение по любому из пп.1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где Q представляет собой



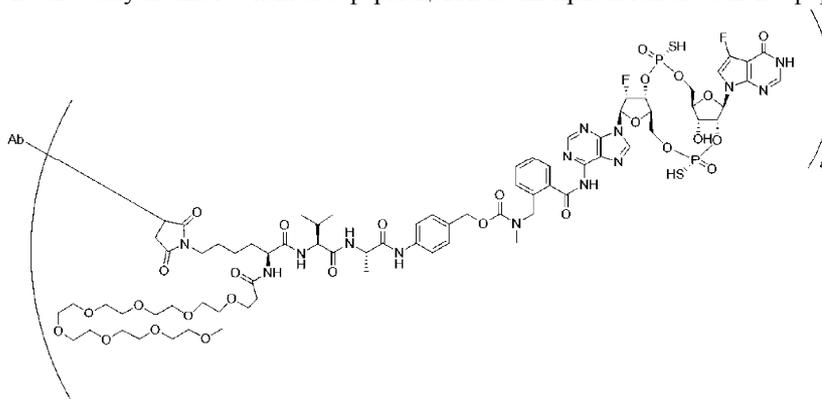
5. Соединение по любому из пп.1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, где  $a$  равно от 2 до 6.

6. Соединение по любому из пп.1-5 или его фармацевтически приемлемая соль, причем D представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль, где  представляет собой точку присоединения к части исходного молекулярного фрагмента.

7. Соединение по любому из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемая соль по формуле (VI)



(VI);

где а является целым числом от 1 до 8.

8. Соединение по любому из пп.1-6 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело 1D9 или антитело, которое может конкурировать с 1D9 за связывание с CCR2 человека или частью CCR2.

9. Соединение по п.8 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что антитело против CCR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислоты 24-39 SEQ ID NO: 1; CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислоты 55-61 SEQ ID NO: 1; CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислоты 94-102 SEQ ID NO: 1; CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислоты 31-35 SEQ ID NO:2; CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислоты 50-68 SEQ ID NO:2; и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислоты 101-106 SEQ ID NO: 2.

10. Соединение по п.8 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что антитело к CCR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

11. Соединение по п.8 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что антитело против CCR2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из константных областей тяжелой цепи иммуноглобулинов человека IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub> и константную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из константных областей легкой цепи иммуноглобулинов человека IgGκ и IgGλ.

12. Соединение по п.10 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что антитело против CCR2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из константных областей тяжелой цепи иммуноглобулинов человека IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub> и константную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из константных областей легкой цепи иммуноглобулинов человека IgGκ и IgGλ.

13. Соединение по п.8 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что антитело против CCR2 содержит область тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и область легкой цепи SEQ ID NO: 4.

14. Соединение по п.7 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что антитело против CCR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислоты 24-39 SEQ ID NO: 1; CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислоты 55-61 SEQ ID NO: 1; CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислоты 94-102 SEQ ID NO: 1; CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислоты 31-35 SEQ ID NO:2; CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислоты 50-68 SEQ ID NO:2; и CDR3 тяжелой цепи, содержащей аминокислоты 101-106 SEQ ID NO:2.

15. Соединение по п.7 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что антитело против CCR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и вариабельную область легкой цепи,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

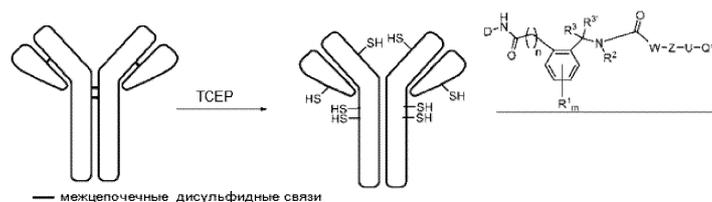
16. Соединение по п.7 или его фармацевтически приемлемая соль, отличающееся тем, что антитело против CCR2 содержит область тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и область легкой цепи SEQ ID NO: 4.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-16 или его фармацевтически приемлемую соль и один или более фармацевтически приемлемых носителей.

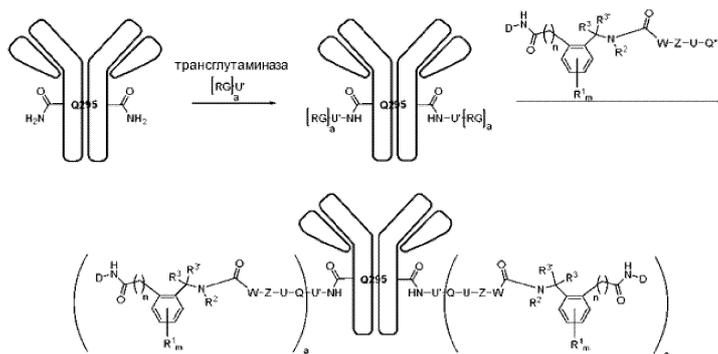
18. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтически приемлемого количества соединения по любому из пп.1-16.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что рак выбран из колоректального рака, рака молочной железы, рака кожи, злокачественной лимфомы или рака легких.

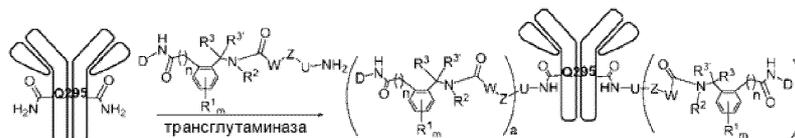
20. Способ стимуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтически приемлемого количества соединения по любому из пп.1-16.



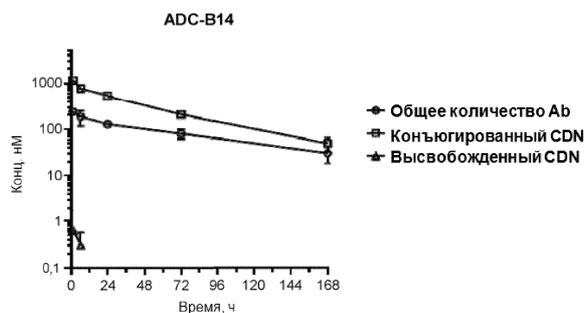
Фиг. 1



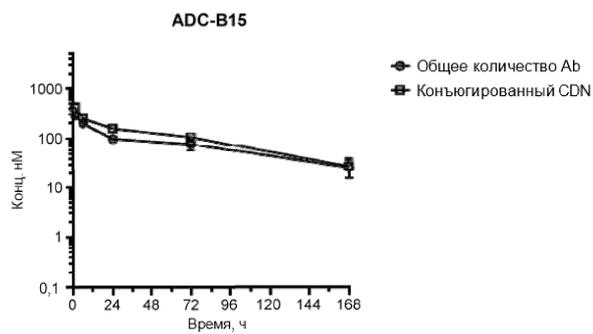
Фиг. 2



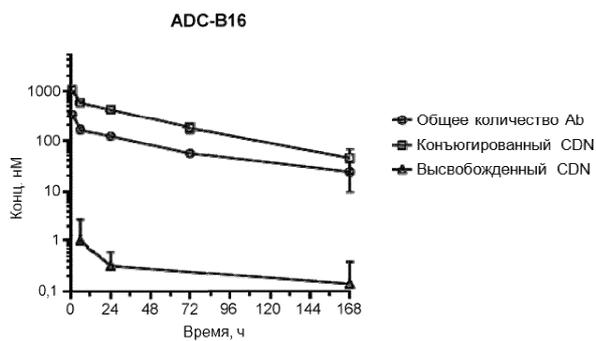
Фиг. 3



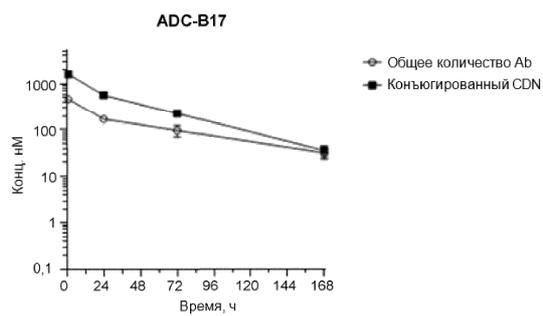
Фиг. 4



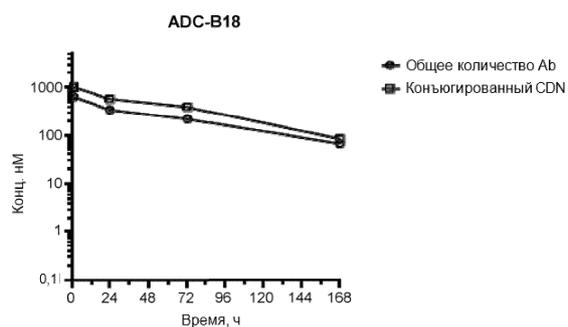
Фиг. 5



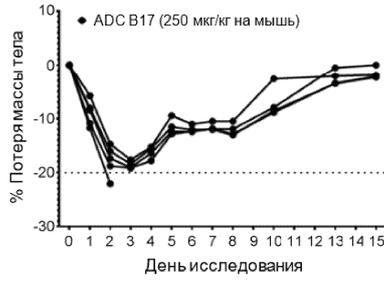
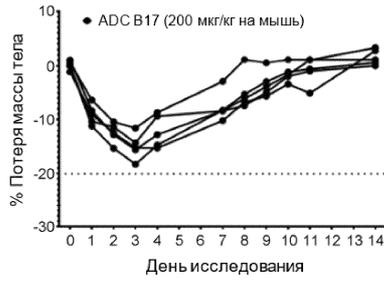
Фиг. 6



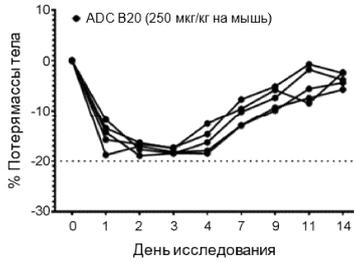
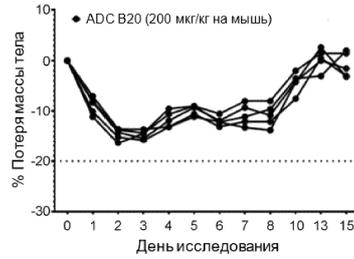
Фиг. 7



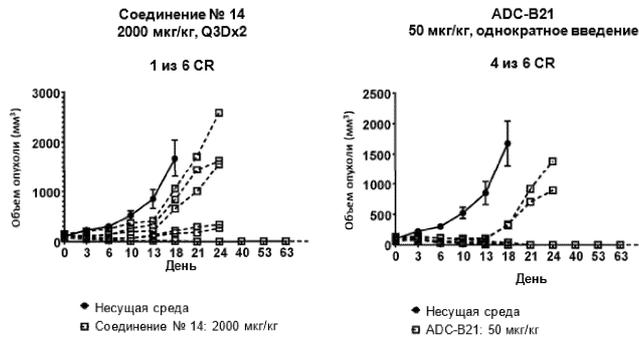
Фиг. 8



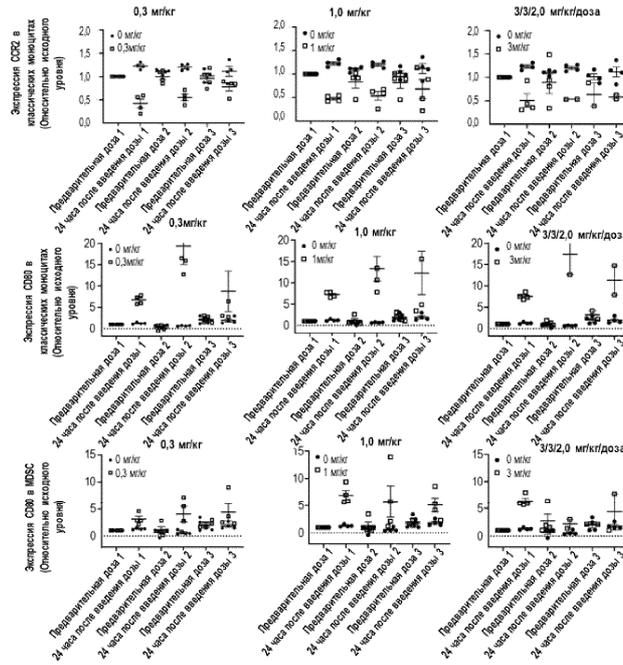
Фиг. 9



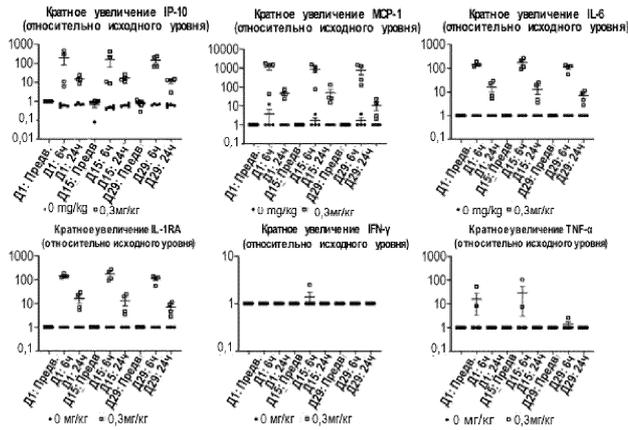
Фиг. 10



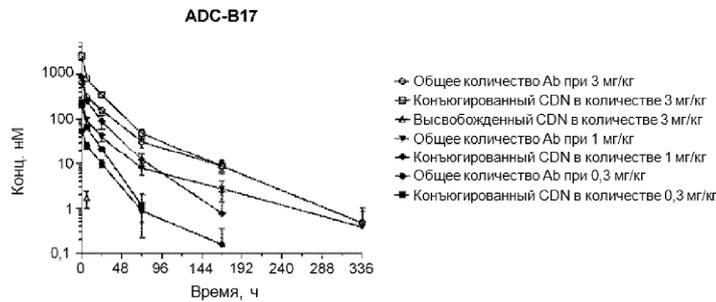
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14

