(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292464 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.15

(22) Дата подачи заявки
2021.02.26

(51) Int. Cl. ***C07K 19/00*** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/117 (2010.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01)
A61K 47/65 (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

(54) ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНСГЛУТАМИНАЗОЙ КОНЪЮГАЦИЯ

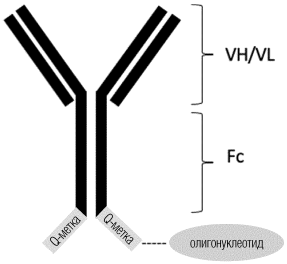
(31) **62/983,463; 63/110,854**
(32) **2020.02.28; 2020.11.06**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/020039**
(87) **WO 2021/174091 2021.09.02**

(71) Заявитель:
ТАЛЛАК ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Понз Хауме, Вань Хун И., Ко Трэйси Чиа-Чиэнь, Брэдшоу Курт У., Лам Сон, Сим Банг Джанет, Ха Эдвард ХенСук, Сакамури Сукумар (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к конъюгатам антитело-олигонуклеотид, способам их получения и способам их применения. Также предложены родственные соединения, композиции и наборы.



202292464 A1

202292464 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575437EA/032

ОПОСРЕДОВАННАЯ ТРАНСГЛУТАМИНАЗОЙ КОНЪЮГАЦИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/983,463, поданной 28 февраля 2020 г., и предварительной заявки на патент США 63/110,854, поданной 6 ноября 2020 г., описание каждой из которых настоящим включено посредством ссылки полностью.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[0002] Содержание следующего представления в текстовом файле ASCII полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (имя файла: 186492000240SEQLIST.TXT, дата записи: 24 февраля 2021 г., размер: 170 КБ).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее описание в целом относится к способам конъюгации олигонуклеотида и полипептида и родственным соединениям, композициям и наборам.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) представляют собой молекулы, связанные с различными патогенами и распознаваемые Toll-подобными рецепторами (TLR) и другими рецепторами распознавания паттернов (PRR), активирующими врожденные иммунные ответы. Способность PAMP рекрутировать иммунную систему в отсутствие патогенов предлагает стратегию лечения различных заболеваний, связанных с разрушением клеток (*например*, противораковую терапию) за счет использования реакции врожденной иммунной системы. Один класс PAMP, который был исследован для различных терапевтических применений, представляет собой иммуностимулирующие полинуклеотиды, такие как олигодезоксинуклеотиды, содержащие неметилированный цитозин-гуаниновый динуклеотид (CpG) (CpG ODN) (*например,* агатолимод). Считается, что CpG ODN опосредуют димеризацию TLR9 в иммунных клетках (*например,* В-клетках, моноцитах и плазмоцитоидных дендритных клетках (pDC)) для активации цитокинов (*например,* интерферона I типа и интерлейкинов), тем самым активируя естественные киллеры.

[0005] Toll-подобный рецептор 9 (TLR9), также обозначаемый как CD289, является важным рецептором, экспрессируемым в клетках иммунной системы, включая дендритные клетки (DC), В-лимфоциты, макрофаги, естественные киллеры и другие антигенпрезентирующие клетки. Активация TLR9 запускает внутриклеточные сигнальные каскады, что приводит к активации, созреванию, пролиферации и продуцированию цитокинов в этих иммунных клетках, тем самым связывая врожденный и адаптивный иммунитет. Martinez-Campos et al., Viral Immunol. 2016, 30, 98-105; Notley et al., Sci. Rep. 2017, 7, 42204. Природные агонисты TLR-9 включают олигодезоксинуклеотиды,

содержащие неметилированный цитозин-гуаниновый динуклеотид (CpG) (CpG ODN).

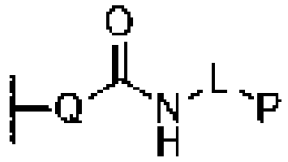
[0006] CpG ODN могут включать, например, олигодезоксинуклеотиды, имеющие поли-G-хвосты с фосфоротиоатными остовами на 3'- и 5'-концах и центральную палиндромную последовательность, включающую фосфатный остов и CpG в его центральной палиндромной последовательности, или олигодезоксинуклеотиды, имеющие полностью фосфоротиоатный остов и последовательность на 5'-конце для активации TLR9, или олигодезоксинуклеотиды, имеющие полностью фосфоротиоатный остов с последовательностью на 3'-конце, обеспечивающей образование дуплекса. Однако ODN CpG часто подвержены деградации в сыворотке, и поэтому фармакокинетика ODN CpG может быть одним из ограничивающих факторов в их разработке в качестве терапевтических агентов. Кроме того, CpG ODN часто обнаруживают неравномерное распределение в тканях in vivo, при этом основные места накопления находятся в печени, почках и селезенке. Такое распределение может вызвать нецелевую активность и местную токсичность, связанную с PAMP.

[0007] Одним из решений является конъюгация иммуномодулирующих полинуклеотидов (*например,* CpG ODN) с нацеливающей группой для специфических целевых тканей или клеток для преодоления неравномерного распределения полинуклеотида. *См.* US 2018/0312536. В частности, реакцию, опосредованную трансглутаминазой, можно использовать для конъюгирования группы, нацеленной на полипептид, содержащей глутаминовый остаток, с CpG ODN, содержащим первичную аминогруппу. Микробная трансглутаминаза (mTG) происходит из вида Streptomyces mobaraensis. mTG катализирует, в водных условиях с контролируемым pH (включая физиологические условия), реакцию трансамидирования между «реакционноспособным» глутамином белка и «реакционноспособным» лизиновым остатком, тогда как последний также может быть простым первичным амином с низкой молекулярной массой, таким как 5-аминопентильная группа. Для распознавания эндогенного глутамина на белке в качестве mTG-субстрата, важными считаются два критерия: 1) наличие гидрофобных аминокислот в пептидной последовательности, примыкающей к глутаминовому остатку, и 2) расположение глутамина на петле с локальной гибкостью цепи, повышающей реакционную способность по отношению к mTG.

[0008] Хотя конъюгация этих иммуномодулирующих полинуклеотидов может привести к улучшенной стабильности и распределению, остается потребность в иммуномодулирующих полинуклеотидах с улучшенной стабильностью и селективностью с или без конъюгированием с нацеливающими группами, и в способах их получения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

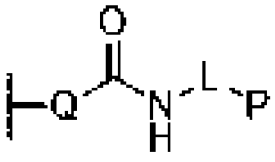
[0009] В одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан амидной связью с глутаминовым остатком (Q) антитела или его фрагмента и линкером (L), как показано в формуле (A):



(A),

где 〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab). В некоторых вариантах осуществления, глутаминовый остаток является частью пептида Q-метки, связанного с антителом, *например,* с С-концом Fc области антитела. В некоторых вариантах осуществления, глутаминовый остаток является частью антитела (*например,* частью Fc области, такой как остаток Q295). В некоторых вариантах осуществления, антитело дополнительно содержит мутацию N297A. Типовые пептидные последовательности Q-метки представлены, *например,* в ***таблице 3.*** Примеры иммуномодулирующих олигонуклеотидов описаны в настоящем документе и представлены, *например,* в ***Таблицах 2*** и **9-12.** В некоторых вариантах осуществления, 1-4 иммуномодулирующих олигонуклеотида конъюгированы с антителом. Примеры линкеров (L) описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит группу полиэтиленгликоля.

[0010] В одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), которые содержат аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A):



(A),

где 〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab).

[0011] В некоторых вариантах осуществления, антитело связано с 2 пептидами Q-метки, и один из пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, антитело связано с 2 пептидами Q-метки, и каждый из 2 пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент. В дополнительном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело или его фрагмент представляют собой Fab, F(ab')2, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное антитело, антитело с одной тяжелой цепью или одной легкой

цепью или его фрагмент. В еще одном варианте осуществления этого аспекта, который может быть объединен с любым из предыдущих вариантов осуществления, антитело или его фрагмент представляют собой гуманизированное, человеческое или химерное антитело или его фрагмент. В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело или его фрагмент специфически связываются с опухолеассоциированным антигеном.

[0012] В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело или его фрагмент специфически связывается с CD22 человека. В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH, выбранной из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG GGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64),

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAY WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) и

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPPGKGLEWIAYISSGGG TTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO:67). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из домена VH, показанного в **таблице 8.** В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116; или CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:114, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:189, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116. В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116, и VL домен, содержащий CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR -L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120. В еще одном

варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG GGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64),

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAY WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) и

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPPGKGLEWIAYISSGGG TTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO: 67). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательность SEQ ID NO: 65, и VL домен содержит последовательность SEQ ID NO:87. В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL, выбранной из группы, состоящей из:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 68),

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 69),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:70),

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWYQQKPGQAPRLLIYYTSILHS GIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 71) и

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWYQQKPGQSPQLLIYYTSILHS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 72). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 68-91. В еще одном варианте

осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из домена VL, показанного в **таблице 8.** В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120; или CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:118, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:177, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120. В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену в остатке N92. В некоторых вариантах осуществления, где VL домен содержит аминокислотную замену в остатке N92, аминокислотная замена в остатке N92 выбрана из группы, состоящей из N92A, N92L и N92S. В других вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 68),

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 69),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 70),

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWYQQKPGQAPRLLIYYTSILHS GIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 71) и

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWYQQKPGQSPQLLIYYTSILHS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 72). В других вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF AFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65), и VL домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:

68),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGATLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 73),

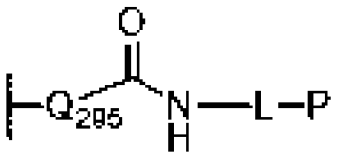
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGLTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 82) и

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGSTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 87).

[0013] В других вариантах осуществления, антитело или его фрагмент специфически связывается с Her2 человека. В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168) и/или где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL домена DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:169). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168) и VL домен содержит последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:169). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT DYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170) и/или где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL домена

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:171). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDY

TMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170) и VL домен содержит последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:171). В некоторых вариантах осуществления, анти-Her2 антитело представляет собой трастузумаб или пертузумаб.

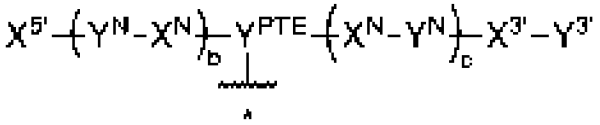
[0014] В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, который может быть объединен с любым из предыдущих аспектов, антитело содержит Fc область. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, выбранную из группы, состоящей из Fc области IgG1, Fc области IgG2 и Fc области IgG4. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область IgG1, IgG2 или IgG4 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают одну или несколько эффекторных функций по сравнению с эффекторной(ыми) функцией(ями) Fc области человека, в которой отсутствует аминокислотная(ые) замена(ы). В других вариантах осуществления, Fc область представляет собой: (a) Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; (b) Fc область IgG2 человека, содержащую замены A330S и/или P331S, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или (c) Fc область IgG4 человека, содержащую замены S228P и/или L235E, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В еще одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит константный домен тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 92-107 и 178. В некоторых вариантах осуществления, где Fc область содержит замену N297A, конъюгат дополнительно содержит иммуномодулирующий олигонуклеотид P, присоединенный к остатку Q295 Fc области, как показано в следующей формуле 

, где L представляет собой линкерную группу, соединенную с Q295 посредством амидной связи. В еще других вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит замену D265A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В

некоторых вариантах осуществления, конъюгат связывается с CD22 человека, экспрессированным на поверхности B-клетки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат индуцирует активацию TLR9.

[0015] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело содержит легкую цепь лямбда человека. В других вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело содержит легкую цепь каппа человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит константный домен легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No:108-110. В дополнительных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми предыдущими вариантами осуществления настоящего аспекта, по меньшей мере, одна Q-метка присоединена к тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна Q-метка слита с C-концом тяжелой цепи антитела. В других вариантах осуществления, по меньшей мере, одна Q-метка присоединена к легкой цепи антитела. В еще других вариантах осуществления, 1 или 2 Q-метки связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В других вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR 1. В других вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR 2.

[0016] В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид P независимо представляет собой

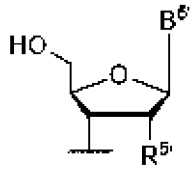


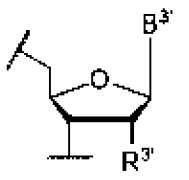
,

где

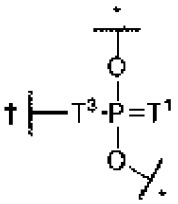
каждый b и c независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма b и c равна, по меньшей мере, 5;

〰 * указывает место присоединения иммуномодулирующего олигонуклеотида P к остальной части конъюгата;

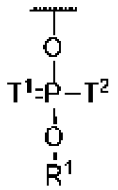
$X^{5'}$ представляет собой 5' концевой нуклеозид, имеющий структуру  ;

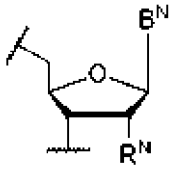
$X^{3'}$ представляет собой 3' концевой нуклеозид, имеющий структуру  ;

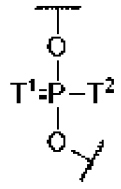
Y^{PTE} представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир, имеющий структуру



, где * указывает на точки присоединения к остальной части олигонуклеотида, и 〰 † указывает на точку присоединения к линкеру L, или, если L отсутствует, 〰 † указывает на точку присоединения к Q-метке Q пептида на глутаминовом остатке через амидную связь;

$Y^{3'}$ представляет собой концевой фосфотриэфир, имеющий структуру  ;

каждый X^N независимо представляет собой нуклеозид, имеющий структуру  ;

каждый Y^N независимо представляет собой межнуклеозидный линкер, имеющий структуру  ;

где каждый B^N независимо представляет собой модифицированное или не модифицированное нуклеооснование;

каждый R^N независимо представляет собой -H или $-OC_{1-4}$-алкил, где C_{1-4}-алкил из $-OC_{1-4}$-алкила дополнительно необязательно замещен $-O-C_1-C_4$-алкилом;

$B^{5'}$ и $B^{3'}$ независимо представляют собой модифицированное или не модифицированное нуклеооснование;

$R^{5'}$ и $R^{3'}$ независимо представляют собой -H или $-O-C_1-C_4$-алкил, где C_{1-4}-алкил из $-OC_{1-4}$-алкила дополнительно необязательно замещен $-O-C_1-C_4$-алкилом;

каждый T_1 независимо представляет собой O или S;

каждый T_2 независимо представляет собой O^- или S^-; и

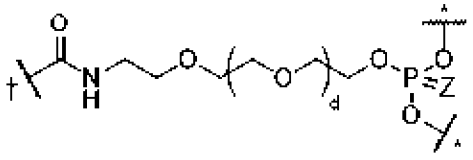
T_3 представляет собой группу, включающую олигоэтиленгликолевую группу; и

R^1 представляет собой C_{1-4}-алкиленгидрокси.

[0017] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, b равно 3. В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, (i) P содержит, по меньшей мере, один модифицированный нуклеозид X^N; (ii) P имеет, по меньшей мере, один модифицированный межнуклеозидный линкер Y^N, где, по меньшей мере, один из T^1

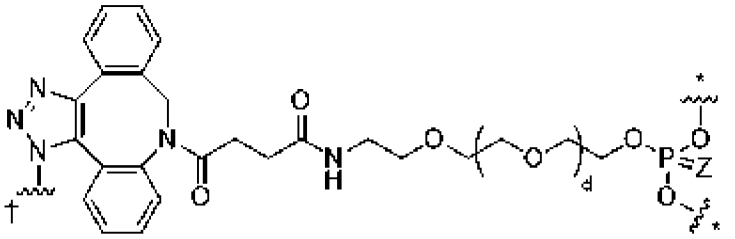
или T^2 представляет собой S; или (iii) как (i), так и (ii). В некоторых вариантах осуществления, P имеет, по меньшей мере, один фосфородитиоатный или фосфоротиоатный межнуклеозидный линкер. В некоторых вариантах осуществления, P содержит 0, 1, 2 или 3 фосфородитиоатных межнуклеозидных линкера. В других вариантах осуществления, P содержит модифицированный нуклеозид, выбранный из группы, состоящей из 2'-O-алкилнуклеозида, 2'-O-алкоксиалкилнуклеозида, 2'-дезоксинуклеозида и рибонуклеозида. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеозид выбран из группы, состоящей из 5-бром-2'-O-метилуридина, 5-бром-2'-дезоксиуридина, 2'-O-метилуридина, 2'-дезоксиуридина, 2'-O-метилтимидина, 2'-O-метилцитидина, 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидина и 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина. В еще других вариантах осуществления, $Y^{3'}$ или Y^N в 3' положении $X^{5'}$ содержит незамещенный или замещенный фосфоротиоат.

[0018] В других вариантах осуществления настоящего аспекта, Y^{PTE} представляет собой:

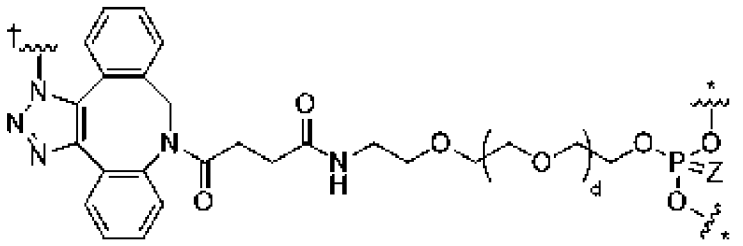


,

где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от 0 до 95; две ~~~ * на правой стороне структуры указывают на точки присоединения к соседним нуклеозидам X^N в олигонуклеотиде P, и ~~~ † на левой стороне структуры указывают на точку присоединения к линкеру L. В других вариантах осуществления, Y^{PTE} представляет собой:

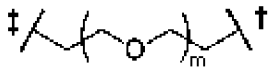


или



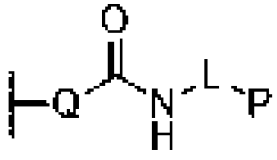
,

где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от 0 до 95; две ~~~ * на правой стороне структуры указывают на точки присоединения к соседним нуклеозидам X^N в олигонуклеотиде P, и один † на левой стороне структуры указывает на точку присоединения к линкеру L. В некоторых вариантах осуществления, Z представляет

собой S. В других вариантах осуществления, d представляет собой целое число от 1 до 25. В дополнительных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, линкер L содержит полиэтиленгликолевую группу. В еще других вариантах осуществления, линкер L представляет собой , где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к $Y^{PTE,}$ и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата. В других вариантах осуществления, P содержит один или несколько сайтов CpG. В еще одном варианте осуществления, P содержит, по меньшей мере, 3 сайта CpG. В еще других вариантах осуществления, каждый P независимо содержит последовательность олигонуклеотидов, выбранную из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 9** и ***таблицы* 10.**

[0019] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более или десять или более пептидов Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит два пептида Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более или десять или более иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один иммуномодулирующий олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, антитело связано с 2 пептидами Q-метки, и при этом один из пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; и где один из пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом (P) посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкера (L), *например,* как показано на **ФИГ. 16.**

[0020] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими, по меньшей мере, один глутаминовый остаток, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),



(A),

где:

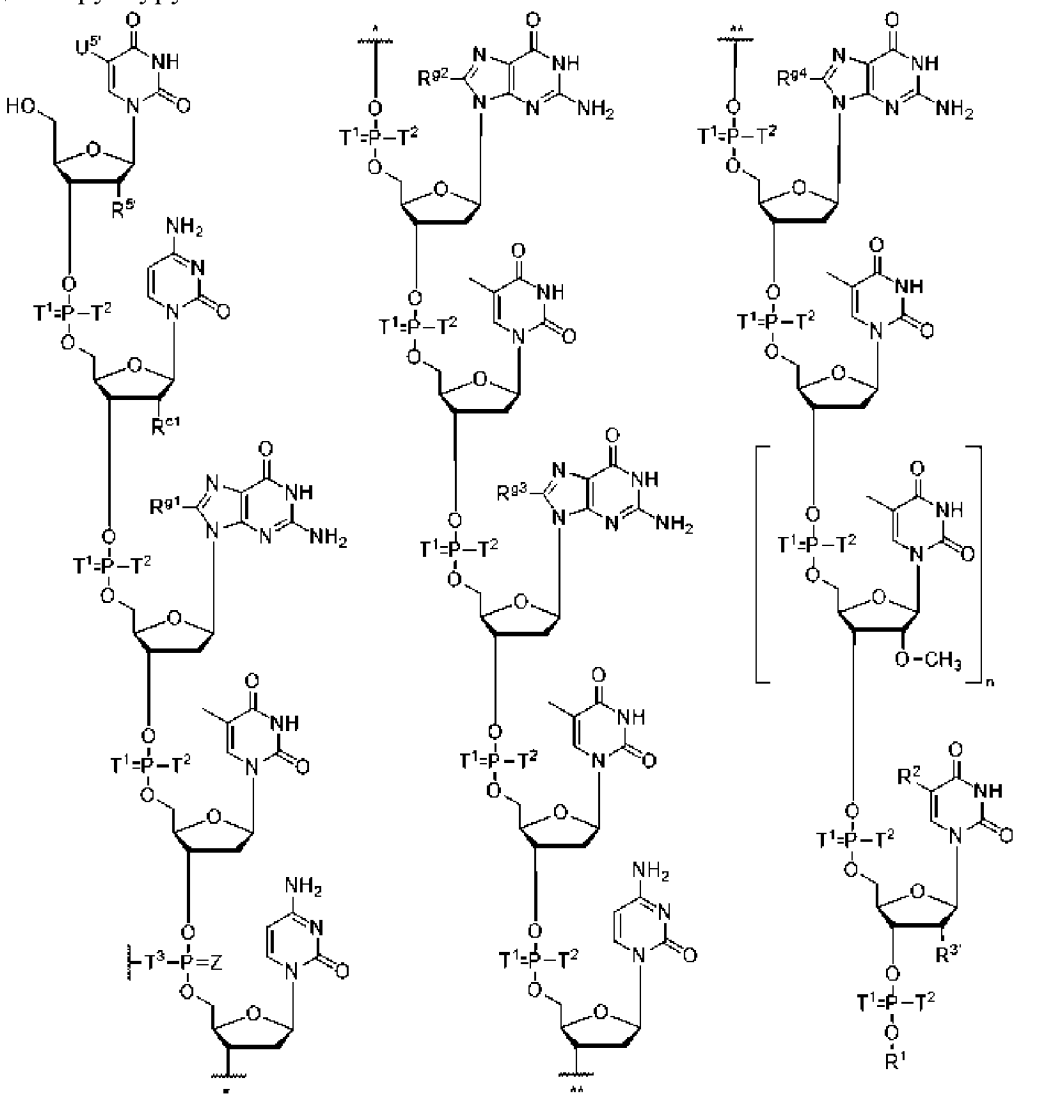
〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его

антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой пептидную последовательность Q-метки, содержащую, по меньшей мере, один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



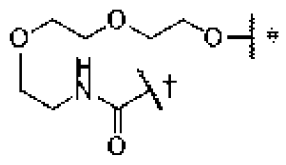
,

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;



T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части

олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

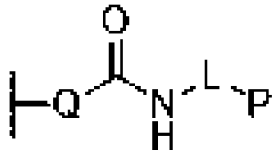
R^{1} представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^{2} представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело или его фрагмент специфически связываются с опухолеассоциированным антигеном.

[0021] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими, по меньшей мере, один глутаминовый остаток, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),



(A),

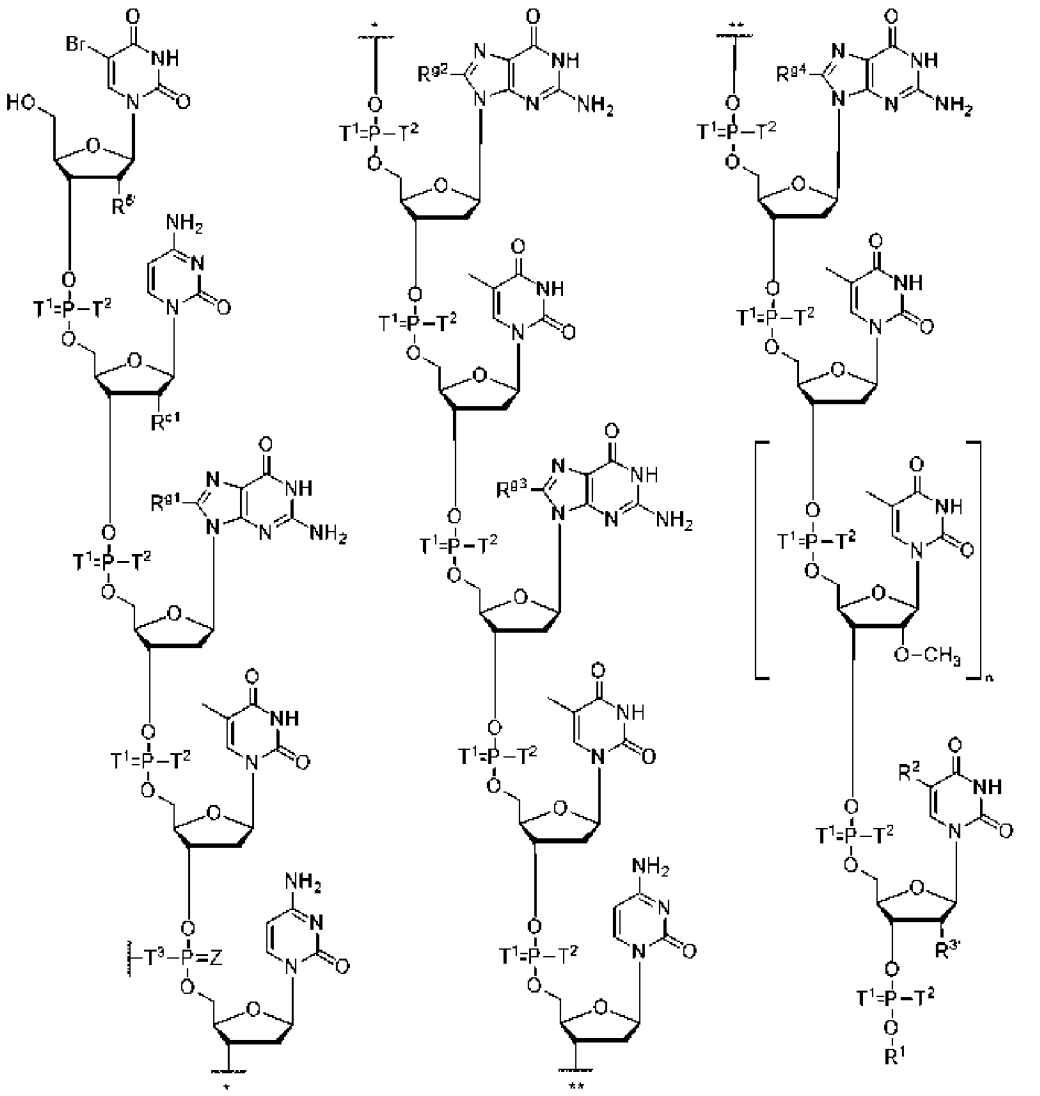
где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой пептидную последовательность Q-метки, содержащую, по меньшей мере, один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



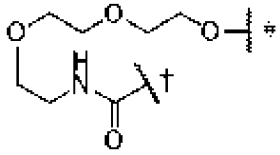
,

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

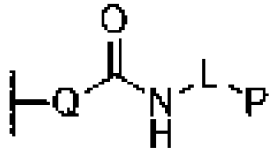
R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело или его фрагмент специфически связываются с опухолеассоциированным антигеном.

[0022] В другом аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащий последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A)



(A),

где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

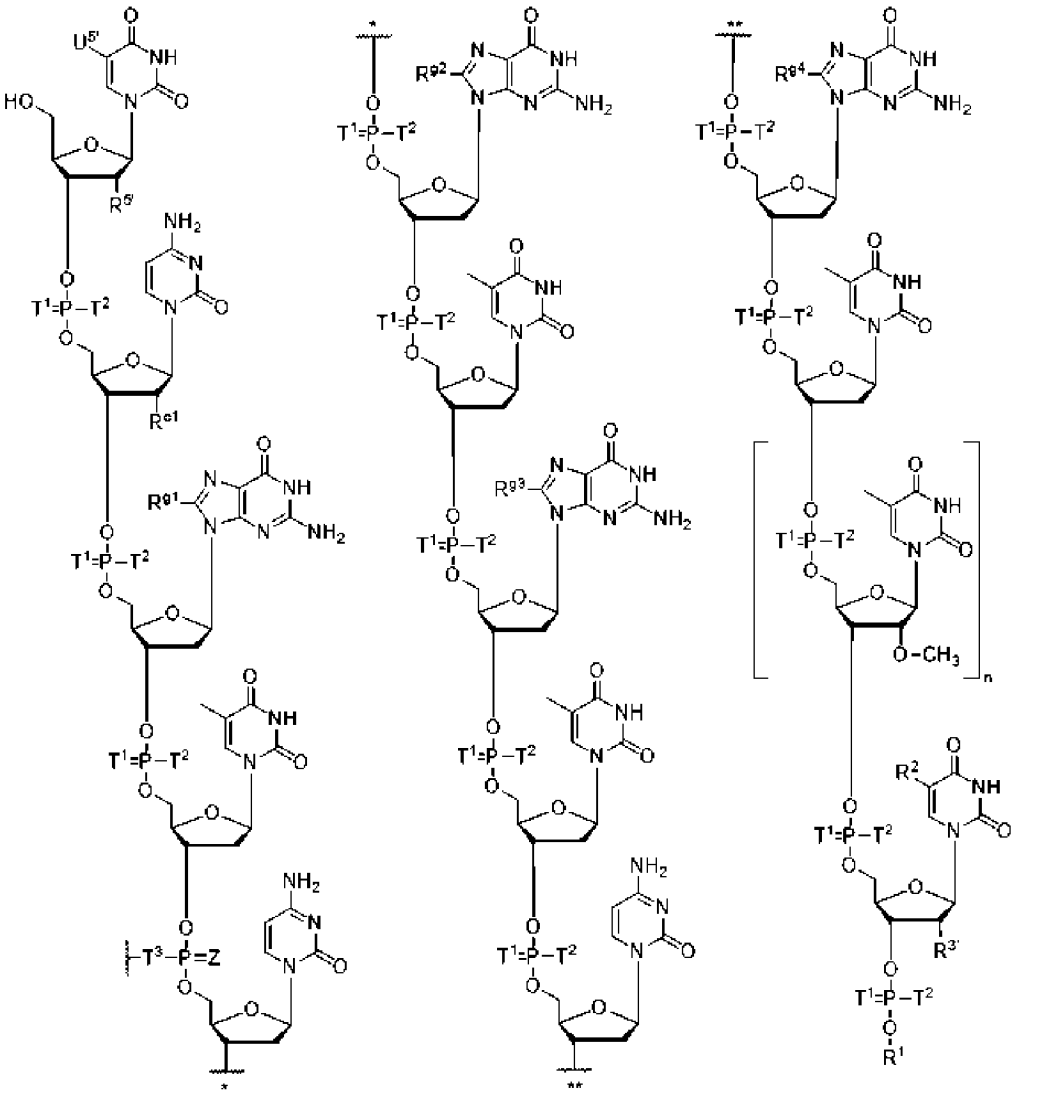
каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к P, и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q, через амидную связь с глутаминовым остатком; и

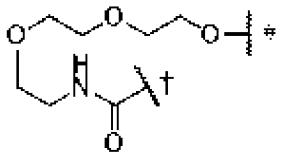
каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где ~~~ * и ~~~ ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу  , где ~~~ † указывает на точку присоединения к L, и где ~~~ # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

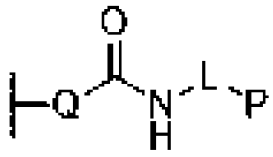
R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает опухолеассоциированный антиген.

[0023] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одной или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A)



(A),

где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

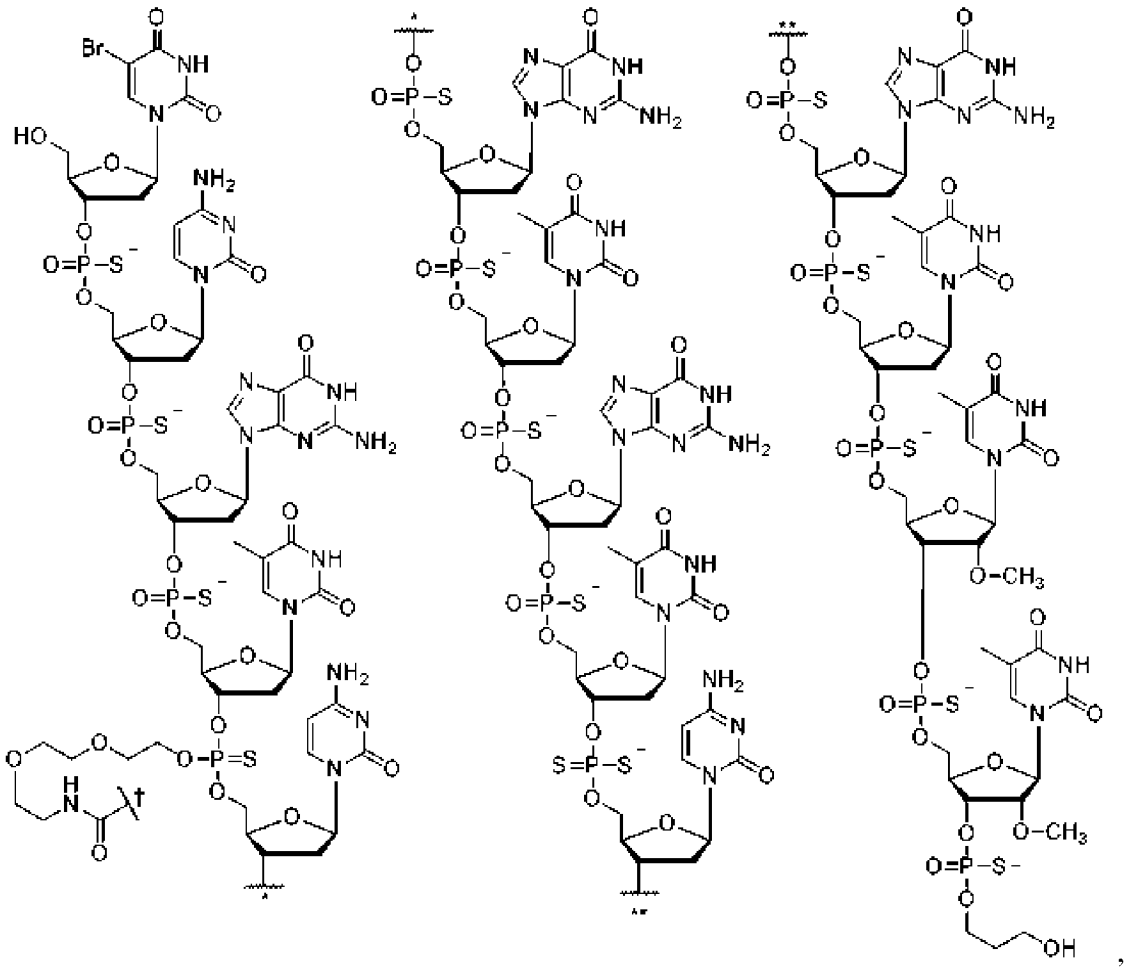
каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к P, и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где ~~~ * и ~~~ ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает опухолеассоциированный антиген.

[0024] В некоторых вариантах осуществления, опухолеассоциированный антиген экспрессируется раковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления, опухолеассоциированный антиген, экспрессируется стромальной клеткой, ассоциированной с раком. В некоторых вариантах осуществления, опухолеассоциированный антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD45R (B220), CD49, CD52, CD56, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD93, CD123, CD138, CD163, CD205, CD206, CD274, CD303 и CD304, рецептор фолиевой кислоты альфа, рецептор фолиевой кислоты бета, мезотелин, PSMA, Her-2, EGFR, CLDN18.2, 5T4, CD47, нектин 4, рецептор трансферрина, интегрин, крипто, EphA2, AGS-5, AGS-16, CanAg, EpCAM, рецептор IL4, рецептор IL2, Lewis Y, GPNMB, DLL3, GCC, GPA33, тканевый фактор (TF) и Trop2. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой рак молочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, меланому, лимфому или лейкоз.

[0025] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, антитело связано с 2 пептидами Q-метки, и где один

из пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом. В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело или его фрагмент представляет собой Fab, F(ab')2, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное антитело, антитело с одной тяжелой цепью или одной легкой цепью или фрагмент антитела. В других вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело или его фрагмент представляют собой гуманизированное, человеческое или химерное антитело или его фрагмент.

[0026] В других вариантах осуществления, антитело или его фрагмент специфически связывается с CD22 человека. В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH, выбранной из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG GGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64),

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAY WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) и

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPPGKGLEWIAYISSGGG TTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO:67). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из домена VH, показанного в **таблице 8.** В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG GGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64),

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAY WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) и

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPPGKGLEWIAYISSGGG TTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO: 67). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL, выбранной из группы, состоящей из:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 68),

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 69),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 70),

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWYQQKPGQAPRLLIYYTSILHS GIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 71) и

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWYQQKPGQSPQLLIYYTSILHS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 72). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из домена VL, показанного в **таблице 8.** В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену в остатке N92. В некоторых вариантах осуществления, где VL домен содержит аминокислотную замену в остатке N92, аминокислотная замена в остатке N92 выбрана из группы, состоящей из N92A, N92L и N92S. В других вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 68),

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 69),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 70),

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWYQQKPGQAPRLLIYYTSILHS GIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 71),

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWYQQKPGQSPQLLIYYTSILHS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 72),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGATLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 73) и

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGLTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 82). В других вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF AFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65), и VL домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 68),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGATLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 73),

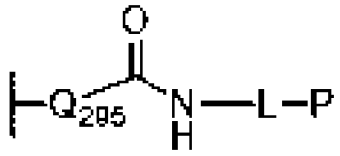
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGLTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 82) и

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGSTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 87).

[0027] В других вариантах осуществления, антитело или его фрагмент специфически связывается с Her2 человека. В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168) и/или где VL домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 последовательности из последовательности VH домена DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF

GQGTKVEIK (SEQ ID NO:169). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательность EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168) и VL домен содержит последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:169). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170) и/или где VL домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 последовательности из последовательности VH домена DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:171). В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170) и VL домен содержит последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAW YQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPY TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:171). В некоторых вариантах осуществления, анти-Her2 антитело представляет собой трастузумаб или пертузумаб.

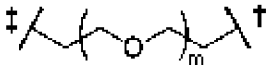
[0028] В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, который может быть объединен с любым из предыдущих аспектов, антитело содержит Fc область. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, выбранную из группы, состоящей из Fc области IgG1, Fc области IgG2 и Fc области IgG4. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область IgG1, IgG2 или IgG4 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают одну или несколько эффекторных функций по сравнению с эффекторной(ыми) функцией(ями) Fc области человека, в которой отсутствует аминокислотная(ые) замена(ы). В других вариантах осуществления, Fc область представляет собой: (a) Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; (b) Fc область IgG2 человека, содержащую замены A330S и/или P331S, нумерация

аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или (c) Fc область IgG4 человека, содержащую замены S228P и/или L235E, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В еще одном варианте осуществления, Fc область дополнительно содержит замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит замену N297A. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит константный домен тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 92-107 и 178. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат дополнительно содержит иммуномодулирующий олигонуклеотид P, присоединенный к остатку Q295 Fc области, как показано в следующей формуле 

, где L представляет собой линкерную группу, соединенную с Q295 посредством амидной связи. В еще других вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит замену D265A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат связывается с CD22 человека, экспрессированным на поверхности B-клетки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат индуцирует активацию TLR9.

[0029] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело содержит легкую цепь лямбда человека. В других вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело содержит легкую цепь каппа человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит константный домен легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No:108-110. В дополнительных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми предыдущими вариантами осуществления по настоящему аспекту, по меньшей мере, одна Q-метка присоединена к тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна Q-метка слита с C-концом тяжелой цепи антитела. В других вариантах осуществления, по меньшей мере, одна Q-метка присоединена к легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, и по меньшей мере, одна Q-метка слита с C-концом каждой тяжелой цепи.

[0030] В других вариантах осуществления, по меньшей мере, одна Q-метка находится в Fc домене. В дополнительных вариантах осуществления, каждая Q-метка независимо содержит пептидную последовательность, содержащую от 5 до 15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, Q-

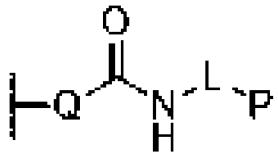
метка встречается в природе. В других вариантах осуществления, пептидная последовательность каждой Q-метки независимо выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55. В некоторых вариантах осуществления, Q-метка содержит пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47). В еще других вариантах осуществления, 1 или 2 Q-метки связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В еще других вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR 1. В еще других вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR 2. В дополнительных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, линкер L содержит полиэтиленгликолевую группу. В еще других вариантах осуществления, линкер L представляет собой , где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где ‡ указывает точку присоединения к Y^{PTE}, и † указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

[0031] В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой S. В других вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-. В других вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, $R^{5'}$ представляет собой H. В других вариантах осуществления, $R^{5'}$ представляет собой метокси. В некоторых вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой H. В других вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой метокси. В других вариантах осуществления, R^2 представляет собой метил. В других вариантах осуществления, R^2 представляет собой H. В дополнительных вариантах осуществления, m представляет собой целое число от 20 до 25. В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, каждый P независимо содержит последовательность олигонуклеотидов, выбранную из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы 10.***

[0032] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более или десять или более пептидов Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит два пептида Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более или десять или более иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один иммуномодулирующий олигонуклеотид. В других вариантах осуществления, антитело связано с 2 пептидами Q-метки, и при этом один из пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом. В некоторых вариантах

осуществления, антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки связан с С-концом одной из тяжелых цепей антитела; и где, по меньшей мере, один из пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом (P) посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкера (L), *например,* как показано на **ФИГ. 16A-16D.** В некоторых вариантах осуществления, два пептида Q-метки содержат пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47). В других вариантах осуществления, два пептида Q-метки содержат остаток Q295, подвергшийся воздействию мутации N297A (Fc области). В других вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR, равный 1 или 2.

[0033] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L) как показано в формуле (A),


(A),

где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

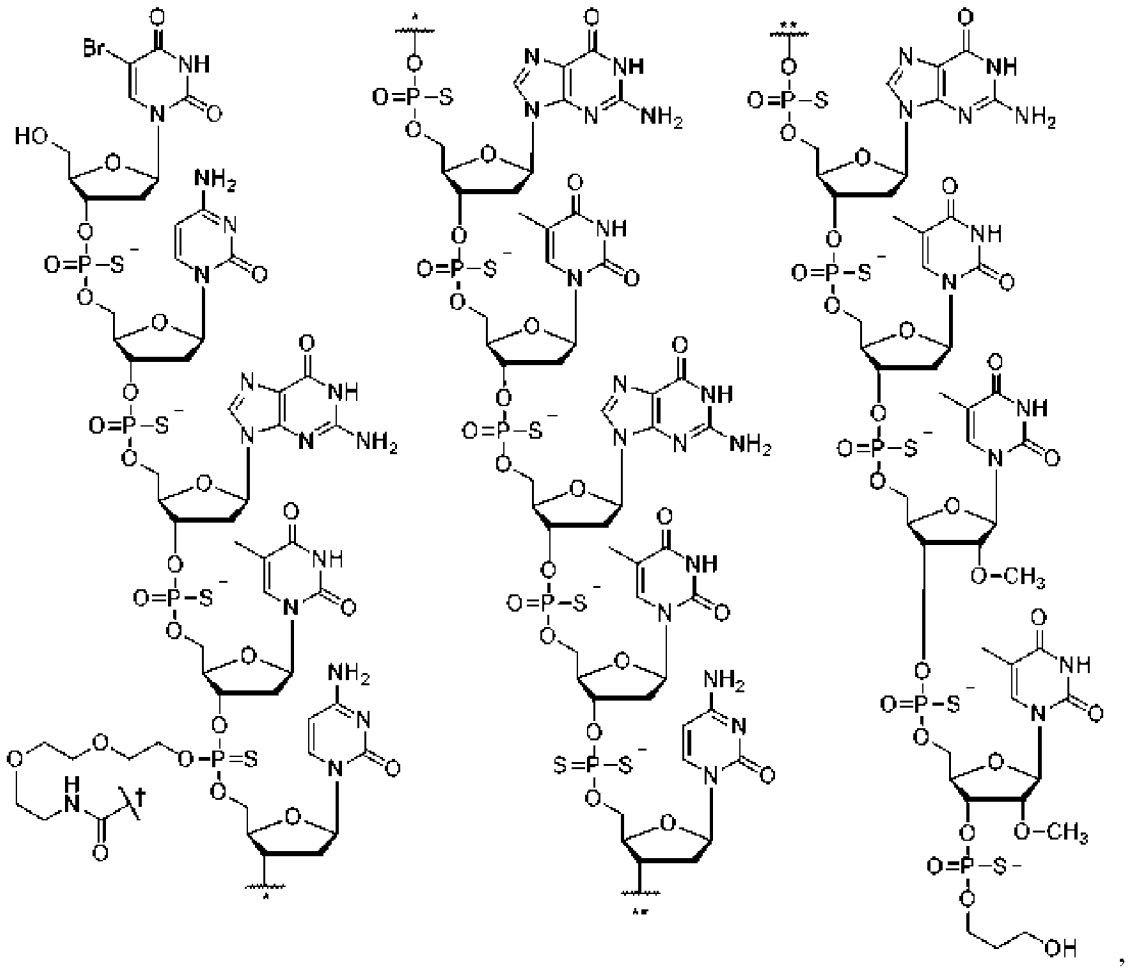
каждый Q содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу


,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к P, и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком;

и каждый P представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где ~~~ * и ~~~ ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

где Ab содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65) или VH домен, показанный в **таблице 8**;

где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL:

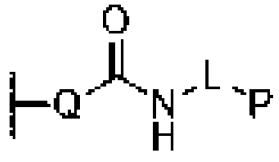
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:68) или домена VL, показанного в **Таблице 8.**

[0034] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену N92A. В других вариантах осуществления, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену N92L. В других вариантах осуществления, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену N92S.

[0035] В других вариантах осуществления настоящего аспекта, каждая метка Q независимо выбрана из группы, состоящей из RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID

NO:48) и RPQGFGPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления, каждая Q-метка представляет собой RPQGFGPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления, 1 или 2 Q-метки связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В других вариантах осуществления, Q-метка связана с С-концом тяжелой цепи антитела. В других вариантах осуществления, антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений соответствует индексу EU. В еще других вариантах осуществления, m представляет собой целое число от примерно 20 до примерно 25. В некоторых вариантах осуществления, m равно 24. В еще других вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR, равный 1. В еще других вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR, равный 2. В других вариантах осуществления, конъюгат связывается с CD22 человека, экспрессированным на поверхности В-клетки.

[0036] В другом аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),


(A),

где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

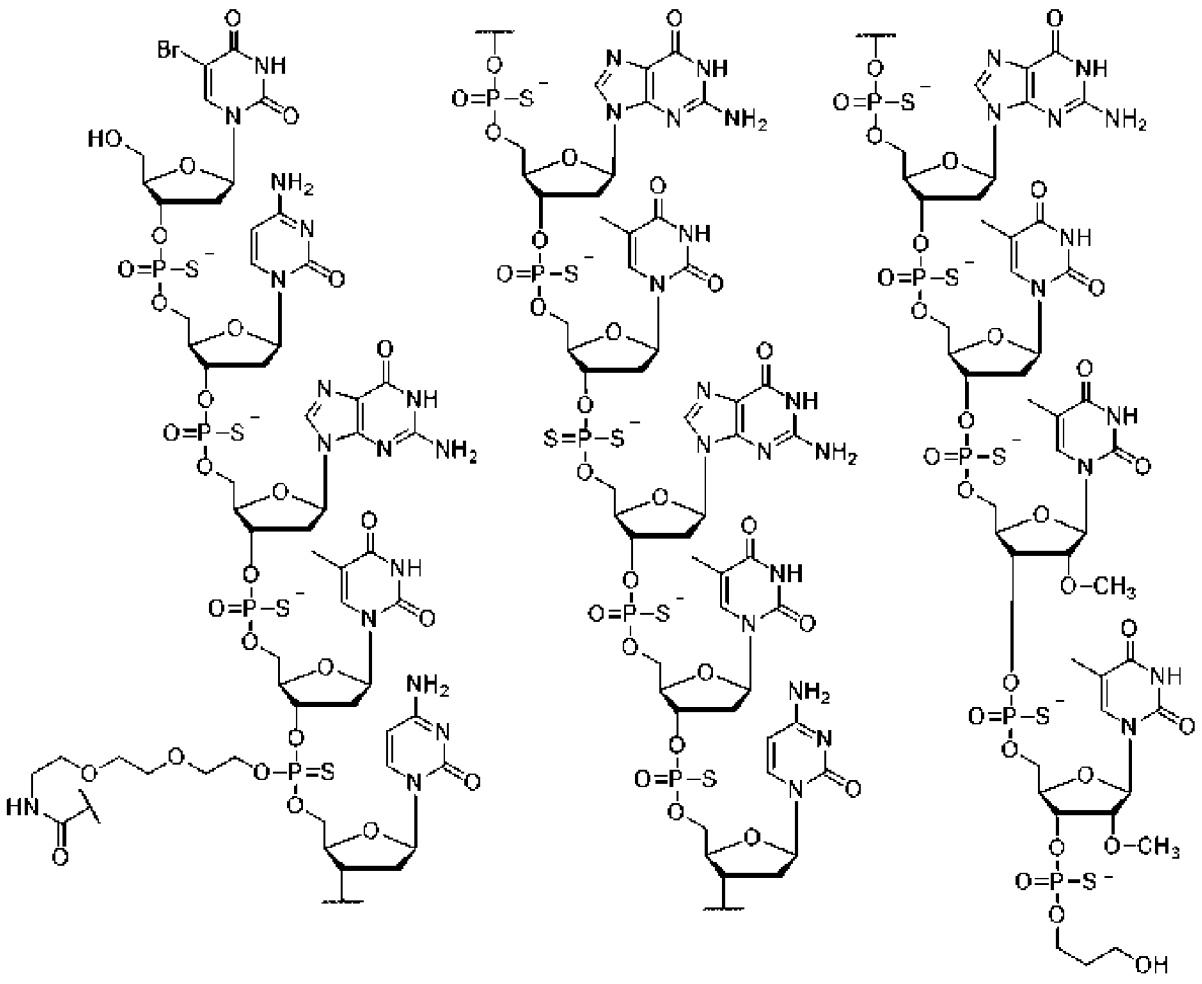
каждый Q содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу


,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к P, и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком;

и каждый P представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где ~~~ * и ~~~ ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

где Ab содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65);

где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL:

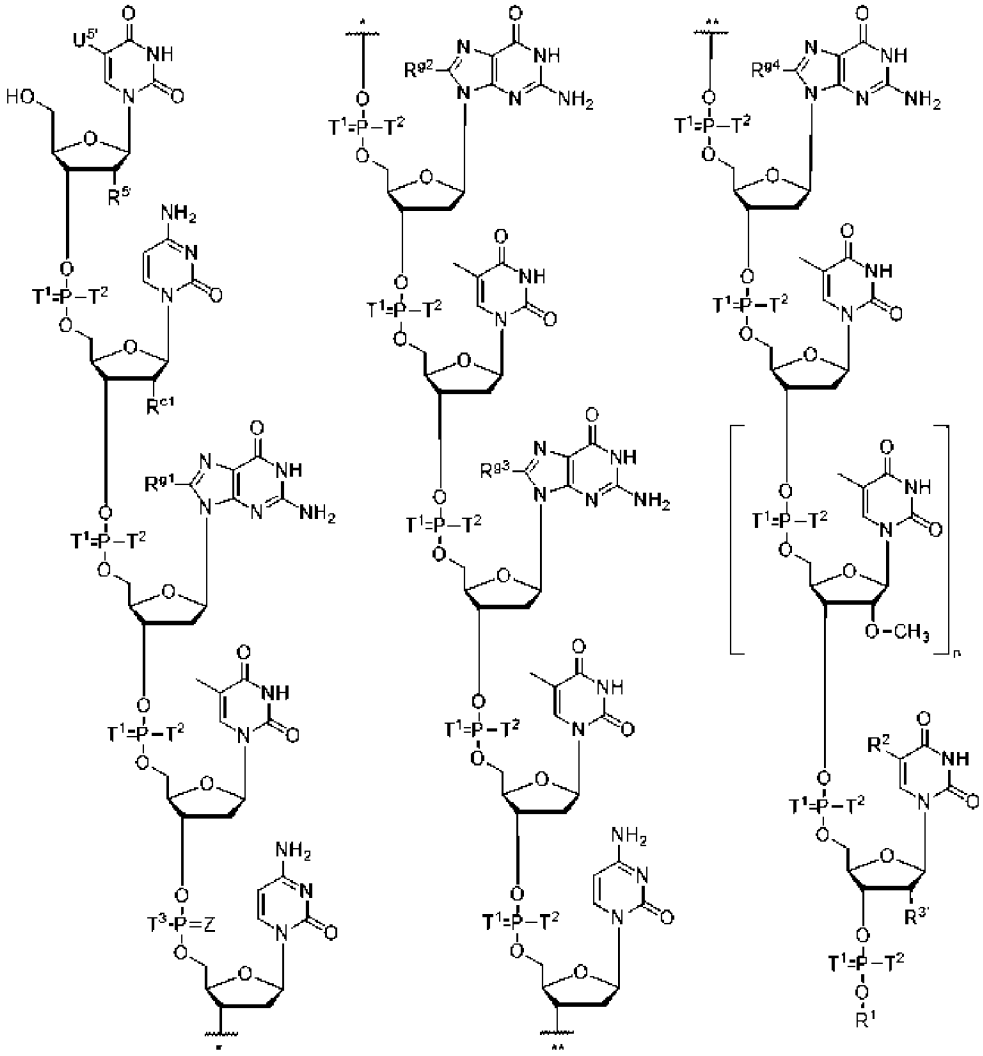
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:68).

[0037] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену N92A. В других вариантах осуществления, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену N92L. В других вариантах осуществления, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену N92S.

[0038] В других вариантах осуществления настоящего аспекта, каждая метка Q независимо выбрана из группы, состоящей из RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID

NO:48) и RPQGFGPP. В некоторых вариантах осуществления, каждая Q-метка представляет собой RPQGFGPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления, 1 или 2 Q-метки связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В других вариантах осуществления, Q-метка связана с С-концом тяжелой цепи антитела. В других вариантах осуществления, антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений соответствует индексу EU. В еще других вариантах осуществления, m представляет собой целое число от примерно 20 до примерно 25. В некоторых вариантах осуществления, m равно 24. В еще других вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR, равный 1. В еще других вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR, равный 2. В других вариантах осуществления, конъюгат связывается с человеческим CD22, экспрессированным на поверхности В-клетки.

[0039] В еще одном аспекте, настоящее описание также предлагает иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C):



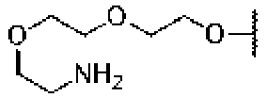
(C),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где m представляет собой целое число от 0 до 50 и где ~~~ указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

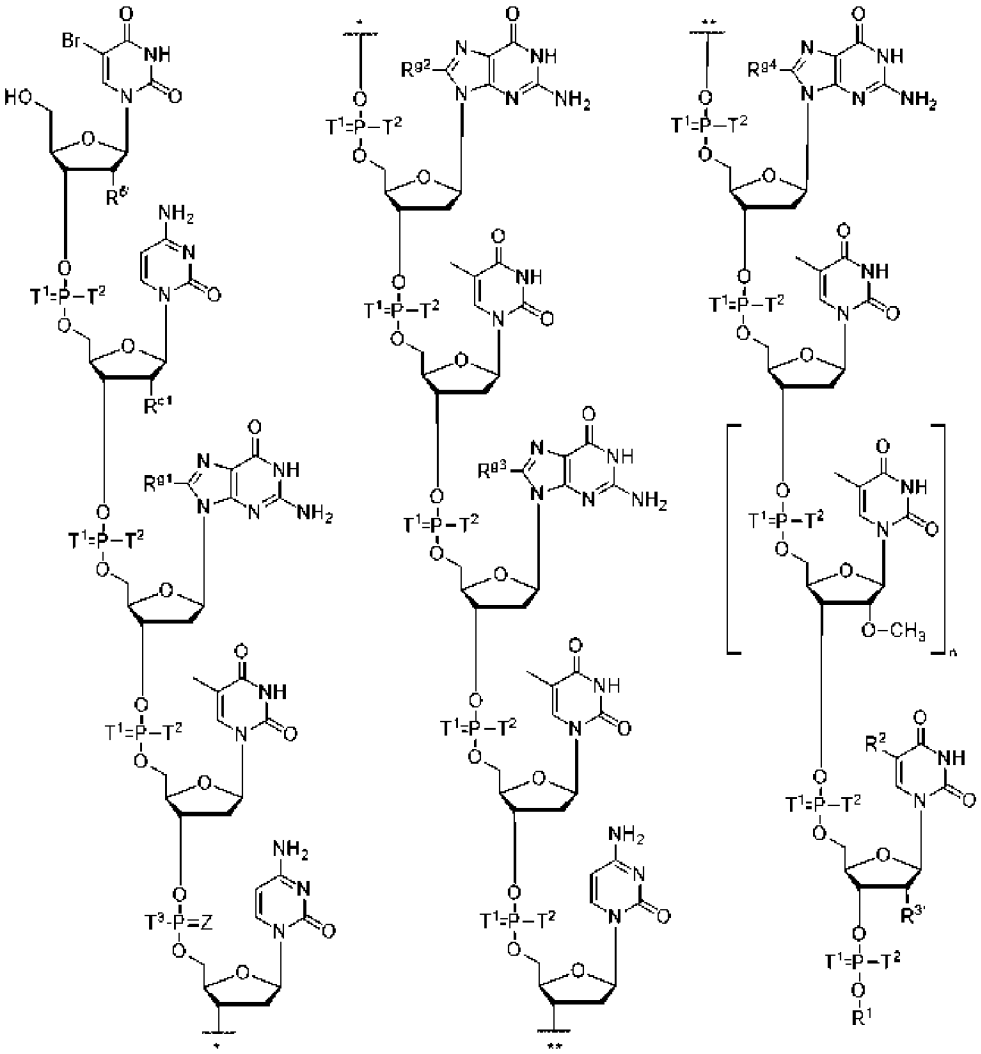
R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[0040] В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание также предлагает иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C'):



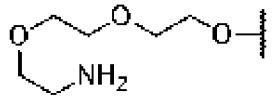
(C')

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где m представляет собой целое число от 0 до 50 и где 〰 указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

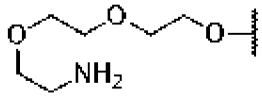
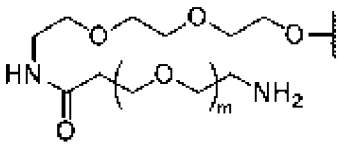
$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

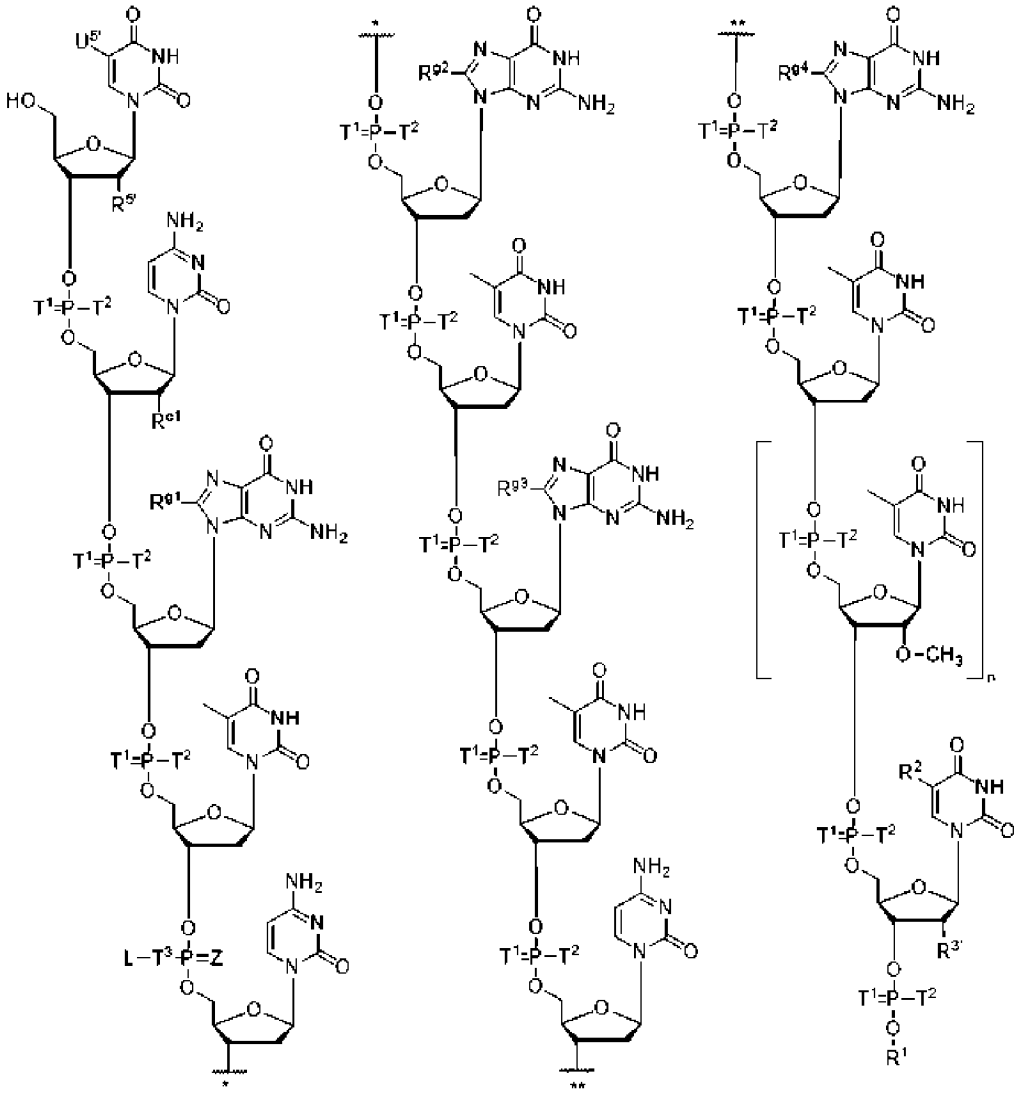
[0041] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, Z представляет собой S. В дополнительных вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

[0042] В некоторых вариантах осуществления, $R^{5'}$ представляет собой H. В других вариантах осуществления, $R^{5'}$ представляет собой метокси. В некоторых вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой H. В других вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой метокси. В других вариантах осуществления, R^2 представляет собой метил. В еще других вариантах осуществления, R^2 представляет собой H. В еще других дополнительных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, T^3 представляет собой . В других вариантах осуществления, T^3 представляет собой . В некоторых вариантах осуществления, m представляет собой целое число от 20 до 25.

[0043] В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 10.**

[0044] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает

иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D):



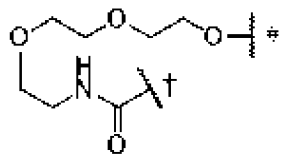
(D),

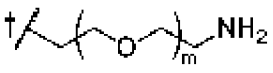
где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу  , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

L представляет собой группу  , где m представляет собой целое число от 0 до 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T^3;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

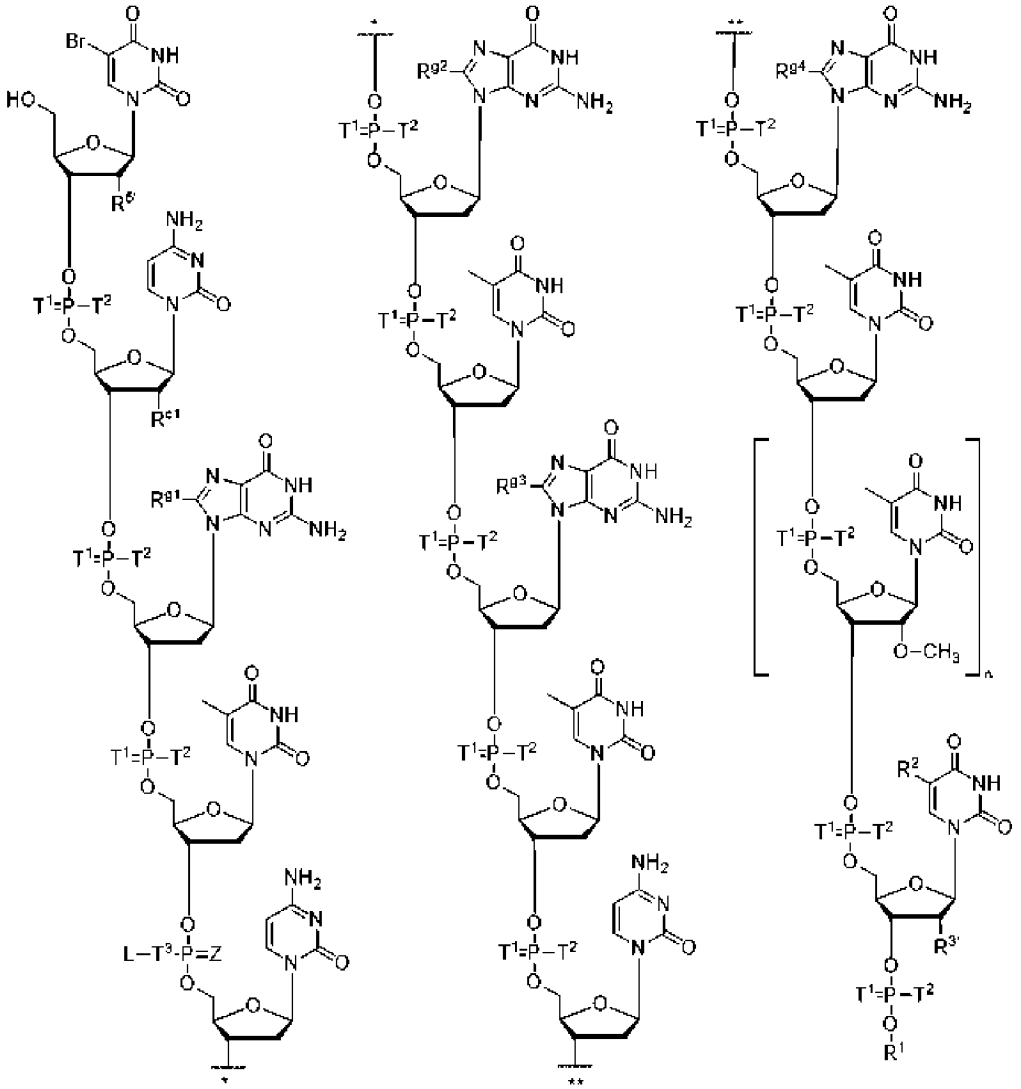
$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^{1} представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^{2} представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[0045] В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D'):



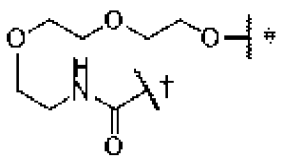
(D')

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

L представляет собой группу , где m представляет собой целое число от 0 до 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T^3;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[0046] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, Z представляет собой S. В дополнительных вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

[0047] В некоторых вариантах осуществления, $R^{5'}$ представляет собой H. В других вариантах осуществления, $R^{5'}$ представляет собой метокси. В некоторых вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой H. В других вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой метокси. В других вариантах осуществления, R^2 представляет собой метил. В других вариантах осуществления, R^2 представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления, m представляет собой целое число от 20 до 25.

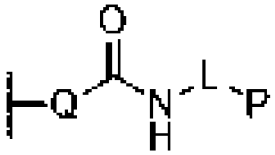
[0048] В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 12.**

[0049] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает иммуномодулирующий олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 10** и ***таблицы* 12.**

[0050] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий белок, по меньшей мере, одну последовательность пептида Q-метки, содержащую глутаминовый остаток, и по меньшей мере, один иммуномодулирующий олигонуклеотид, где последовательность пептида Q-метки является природной или синтетической, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-меткой

посредством амидной связи с глутаминовым остатком, где пептидная последовательность Q-метки выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55. В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, иммуномодулирующий олигонуклеотид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы*** **10** и ***таблицы*** **12.** В дополнительных вариантах осуществления, антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 56; и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 57.

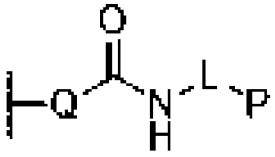
[0051] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий антитело, связанное с двумя пептидами Q-метки (Q), и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P); где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки связан с С-концом одной из тяжелых цепей антитела; и где один из пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A):


(A),

где 〰 указывает точку присоединения каждого Q к антителу.

[0052] В некоторых вариантах осуществления, каждый пептид Q-метки содержит аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47). В некоторых вариантах осуществления, каждый L представляет собой линкер, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, каждый (P) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антитело, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с CD22 (*например,* CD22 человека).

[0053] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47); где каждый из пептидов Q-метки связан с С-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A):


(A),

где ~~~ указывает точку присоединения каждого Q к антителу (Ab).

[0054] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:65 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:92, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:87, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:65 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:94, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:87, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:65 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:94, где

две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:73, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:34. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:65 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:92, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:73, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:34. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:65 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:92, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:73, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ

ID NO:65 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:92, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:87, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит линкерную группу , где m равно целому числу 24, и где ‡ указывает точку присоединения к P, и ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком.

[0055] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:168 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:92, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:169, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:168 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:104, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:169, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2

антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:168 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:92, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:169, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:170 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:92, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:171, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:170 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:104, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:171, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35. В

еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; где каждый из пептидов Q-метки связан с С-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), где две тяжелые цепи антитела содержат VH домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:170 и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO:92, где две легкие цепи антитела содержат VL домен, содержащий последовательность SEQ ID NO:171, и константную область, содержащую последовательность SEQ ID NO: 108, и где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит линкерную группу , где m равно целому числу 24, и где 〰 † указывает точку присоединения к P, и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанной с Q через амидную связь с глутаминовым остатком.

[0056] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:180; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат,

содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:180; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:34; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:34; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-CD22 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В некоторых вариантах осуществления, один из двух пептидов Q-

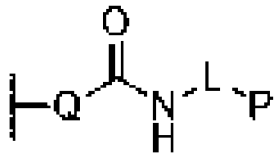
метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит два иммуномодулирующих олигонуклеотида, где каждый из двух пептидов Q-метки связан с одним из двух иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR, равный 1. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR, равный 2. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит линкерную группу , где m представляет собой целое число 24, и где ‡ указывает точку присоединения к P, и ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком.

[0057] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:185; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:184; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:185; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:183; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:185; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:184; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с

иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:187; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:186; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий анти-Her2 антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:187; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L). В некоторых вариантах осуществления, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит два иммуномодулирующих олигонуклеотида, где каждый из двух пептидов Q-метки связан с одним из двух иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR, равный 1. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат имеет DAR, равный 2. В некоторых вариантах осуществления, линкер содержит

линкерную группу  , где m представляет собой целое число 24, и где ~~~ † указывает точку присоединения. к P, и ~~~ ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком.

[0058] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, который содержит антитело (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело связано с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими, по меньшей мере, один глутаминовый остаток, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),

 (A),

где:

где ~~~ указывает точку присоединения Q к антителу (Ab);

антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки;

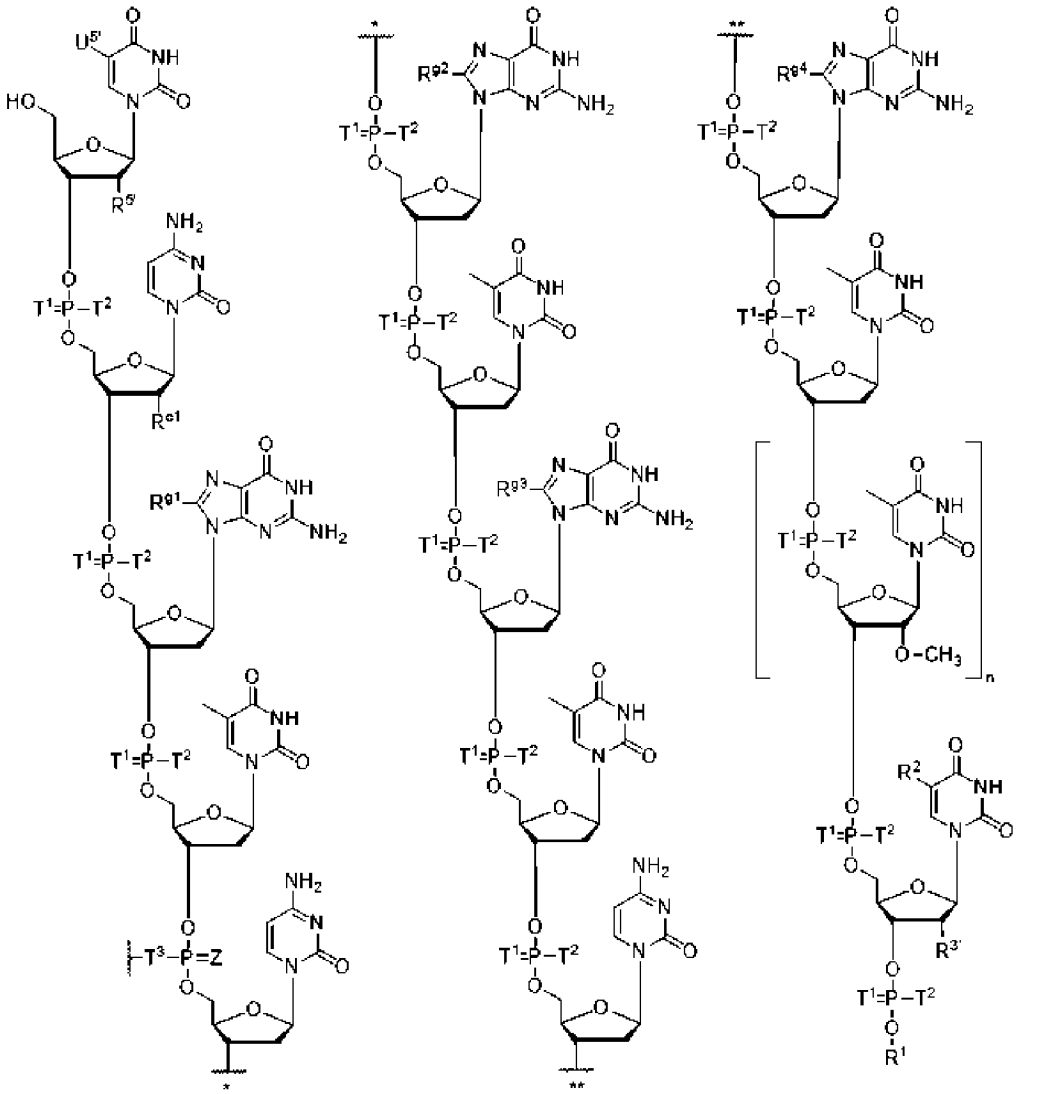
каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела;

один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки;

каждый Q независимо представляет собой пептидную последовательность Q-метки, содержащую, по меньшей мере, один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



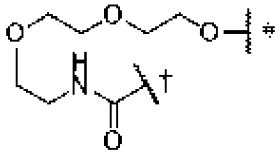
,

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S-;

T^3 представляет собой группу  , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

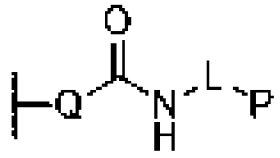
$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[0059] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, который содержит антитело (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело связано с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими, по меньшей мере, один глутаминовый остаток, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),



(A),

где:

где ~~~ указывает точку присоединения Q к антителу (Ab);

антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки;

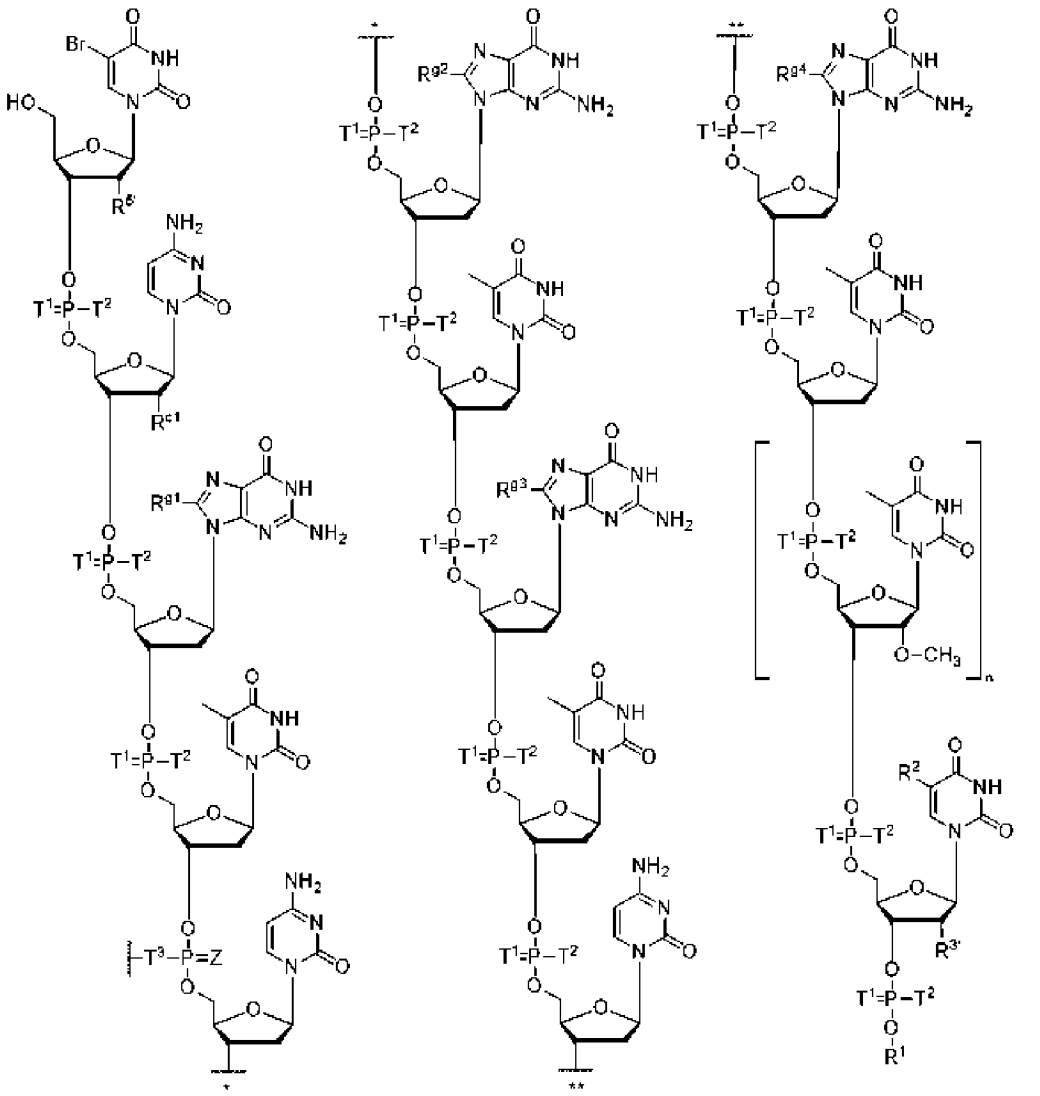
каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела;

один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки;

каждый Q независимо представляет собой пептидную последовательность Q-метки, содержащую, по меньшей мере, один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру

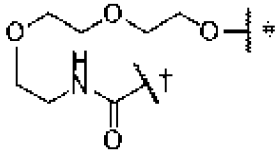


где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу  , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

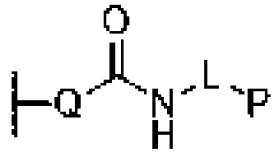
$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[0060] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q) содержащими последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A)

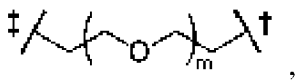

(A),

где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

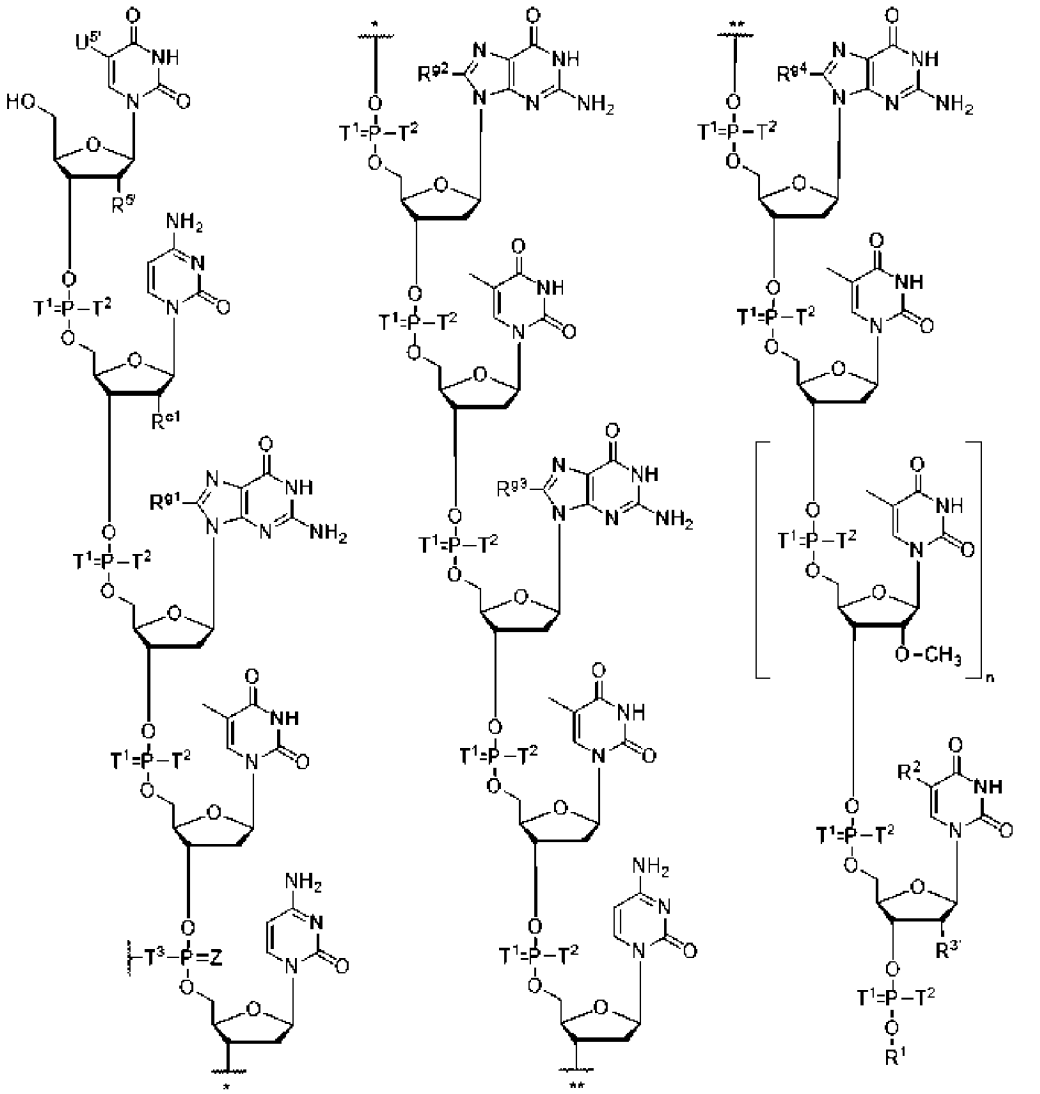
каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу


,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к P, и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



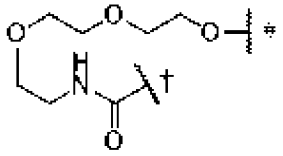
,

где ~~~ * и ~~~ ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

при условии, что каждый P содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и $T^{2,}$ где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S,



T^3 представляет собой группу , где ~~~ † указывает на точку присоединения к L, и где ~~~ # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H;

R^{c1} представляет собой -H;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -метил; и

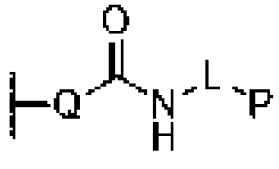
п равно 1,

где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает опухолеассоциированный антиген.

[0061] В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат специфически связывает антиген, экспрессируемый раком или стромой, ассоциированной с раком.

[0062] В другом аспекте, в настоящем документе также предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат, как описано в настоящем документе. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает фармацевтическую композицию, содержащую иммуномодулирующий олигонуклеотид, как описано в настоящем документе. В еще одном дополнительном аспекте, в настоящем документе предложен набор, содержащий конъюгат, как описано в настоящем документе, и инструкции по применению конъюгата.

[0063] В дополнительных аспектах, в настоящем документе предложены способы получения конъюгатов, как описано в настоящем документе. В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ получения конъюгата, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),



(A),

где:

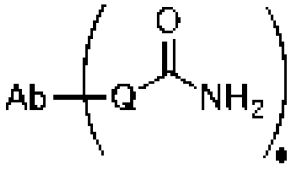
〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

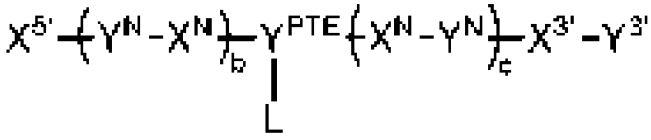
каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид;

включающий контакт соединения формулы (B)


(B),

где Ab и Q имеют значения, определенные для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или несколькими иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где каждый P независимо имеет следующую формулу:


,

где

$X^{5'}$ представляет собой 5' концевой нуклеозид;

$X^{3'}$ представляет собой 3' концевой нуклеозид;

Y^{PTE} представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир;

$Y^{3'}$ представляет собой концевой фосфотриэфир;

каждый X^N независимо представляет собой нуклеозид;

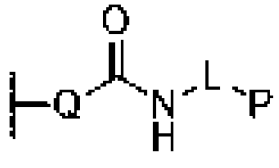
каждый Y^N независимо представляет собой межнуклеозидный линкер;

каждый b и c независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма b и c равна, по меньшей мере, 5; и

L представляет собой линкерную группу, содержащий концевой амин,

в присутствии трансглутаминазы.

[0064] В другом аспекте, настоящее описание предлагает способ получения конъюгата, который содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими, по меньшей мере, один глутаминовый остаток, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),


(A),

где:

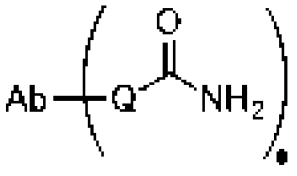
〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой пептид Q-метки, содержащий, по меньшей мере, один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид;

включающий контакт соединения формулы (B)



(B),

где Ab и Q имеют значения, определенные для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или несколькими иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид P независимо представляет собой олигонуклеотид формулы (C), описанный в настоящем документе, или олигонуклеотид формулы (D), описанный в настоящем документе, в присутствии трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления настоящих аспектов способов получения конъюгатов, каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид независимо представляет собой олигонуклеотид формулы (C) или формулы (D), выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы*** **10** и ***таблицы*** **12.**

[0065] В других аспектах, настоящее описание предлагает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD22, где указанное антитело или его фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательность домена VH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 64-67; и где VL домен содержит последовательность домена VL, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 68-91. В других аспектах, настоящее описание предлагает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD22, где указанное антитело или его фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из домена VH, показанного в таблице 8, и где VL домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из домена VL, показанного в таблице 8. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антитело Fab, F(ab')2, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное антитело, одну тяжелую или одну легкую цепь или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит Fc область. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, выбранную из группы, состоящей из Fc области IgG1, Fc области IgG2 и Fc области IgG4. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область IgG1, IgG2 или IgG4 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с C1q. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают эффекторную

функцию, по сравнению с Fc областью человека, где отсутствует(ют) аминокислотная(ые) замена(ы). В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой: (a) Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; (b) Fc область IgG2 человека, содержащая замены A330S и/или P331S, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или (c) Fc область IgG4 человека, содержащую замены S228P и/или L235E, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит замену N297A, нумерацию аминокислот в соответствии с индексом EU. В некоторых вариантах осуществления, антитело дополнительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 92-110.

[0066] В других аспектах, настоящее описание предлагает антитело, которое связывается с CD22 человека, где указанное антитело содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, где тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:179 или 180, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:181 или 182. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:179, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:181. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:179, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:182. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:180, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:181. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:180, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:182.

[0067] В других аспектах, настоящее описание предлагает антитело, которое связывается с Her2 человека, где указанное антитело содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, где тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:183, 184, 186 или 187, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:185 или 188. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:183, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO: 185. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:184, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:185. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:186, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:185. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:187, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:185. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:183, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:184, и легкая цепь антитела содержит последовательность

SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:186, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:188. В некоторых вариантах осуществления, тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:187, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:188.

[0068] В других аспектах, настоящее описание предлагает фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат или антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе и фармацевтически приемлемый носитель. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает фармацевтическую композицию, содержащую иммуномодулирующий олигонуклеотид в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе и фармацевтически приемлемый носитель. В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены способы лечения заболевания или нарушения. В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата, иммуномодулирующего олигонуклеотида, антитела или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе. В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества: (a) ингибитора иммунной контрольной точки и (b) конъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе; где рак является трудно поддающимся лечению или резистентным к ингибитору иммунной контрольной точки при введении в отсутствие конъюгата; и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD22 человека. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело. В некоторых вариантах осуществления, введение приводит к уменьшению роста, размера и/или объема рака. В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе; где введение приводит к активации B-клеток у индивидуума. В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе; где рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), рака пищевода, рака шейки матки, плоскоклеточного рака шейки матки,

карциномы из клеток Меркеля, рака эндометрия, рака яичников, рака поджелудочной железы, меланомы, меланомы кожи, саркомы, колоректального рака, рака молочной железы, мелкоклеточного рака легкого (SCLC), плоскоклеточного рака кожи и уротелиальной карциномы. В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе; где рак выбран из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза (ALL), волосатоклеточного лейкоза и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL). В одном аспекте, настоящее описание предлагает способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления в настоящем документе; где рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, уротелиального рака и рака желудка. В некоторых вариантах осуществления, введение приводит к уменьшению роста, размера и/или объема рака. В другом аспекте, настоящее описание предлагает конъюгат, иммуномодулирующий олигонуклеотид, антитело или фармацевтическую композицию в соответствии с любым из вариантов осуществления, настоящего документа для применения в способе лечения рака, где способ включает введение эффективного количества конъюгата, иммуномодулирующего олигонуклеотида, антитела или фармацевтической композиции индивидууму. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой В-клеточный рак. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой лимфому или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой рак молочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, меланому, лимфому или лейкоз. В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает способ доставки иммуномодулирующего олигонуклеотида в соответствии с любым из вариантов осуществления настоящего документа, включающий контакт иммуномодулирующего олигонуклеотида с клеткой. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид ПЭГилирован. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид входит в состав наночастицы. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид конъюгирован с полипептидом. В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат специфически связывает антиген, экспрессируемый раком или стромой, ассоциированной с раком.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0069] Настоящая заявка может быть понята со ссылкой на следующее описание, взятое в сочетании с прилагаемыми чертежами.

[0070] На **ФИГ. 1А и 1В** показана активность только иммуномодулирующих

олигонуклеотидов в PBMC человека на основе наблюдаемой повышенной экспрессии (a) HLADR и (b) CD40.

[0071] На **ФИГ. 2A-2D** показано влияние иммуномодулирующих полинуклеотидов и их конъюгатов антител на увеличение количества и активацию B-клеток. На **ФИГ. 2A** показано наблюдаемое влияние на количество B-клеток только различных иммуномодулирующих полипептидов. На **ФИГ. 2B-2C** показана наблюдаемая активация B-клеток (путем обнаружения экспрессии CD40), производимая только иммуномодулирующими полинуклеотидами. На **ФИГ. 2D** показана наблюдаемая активность конъюгатов антитело-олигонуклеотид с RFB4 (анти-CD22) (DAR1).

[0072] На **ФИГ. 3** показана доля выхода опосредованных трансглутаминазой конъюгаций и деконъюгаций с полиэтиленгликолевым линкером (-NH-C(=O)-PEG_{23}-NH_2) и различными Q-метками. Показаны SEQ ID No: 39-47 и 49-52.

[0073] На **ФИГ. 4A** и **4B** показана доля изменения конъюгации и деконъюгации с течением времени при конъюгации трансглутаминазой двух пептидов Q-метки (LSLSPGLLQGG, SEQ ID NO: 39; и RPQGF, SEQ ID NO: 47).

[0074] На **ФИГ. 5A-5D** показана активность конъюгатов RBF4 с различными олигонуклеотидами, показанная по их активации B-клеток, оцениваемой по экспрессии (a) CD40, (b) CD86, (c) HLADR и (d) CD69.

[0075] На **ФИГ. 6A-6D** показана активность конъюгатов BDCA2 с различными олигонуклеотидами, показанная по их активации pDC, оцениваемой по экспрессии (a) CD86, (b) CD40, (c) HLADR или (d) IFNα.

[0076] На **ФИГ. 7A-7D** показана активность конъюгатов BDCA2 с различными олигонуклеотидами, показанная их активацией (a) моноцитов; (b) mDC; (в) $CD19^+$ B-клетки; или (d) $CD3^+$ T-клеток.

[0077] На **ФИГ. 8A** показано выравнивание мышиных и гуманизированных последовательностей вариабельного домена тяжелой цепи (VH) анти-CD22. CDR-H1, -H2 и -H3 показаны в рамках. Последовательности соответствуют SEQ ID No: 56 и 64-67 (сверху вниз).

[0078] На **ФИГ. 8B** показано выравнивание мышиных и гуманизированных последовательностей вариабельного домена легкой цепи (VL) анти-CD22. CDR-L1, -L2 и -L3 показаны в рамках. Последовательности соответствуют SEQ ID No: 57 и 68-72 (сверху вниз).

[0079] На **ФИГ. 9** показаны относительные уровни экспрессии каждой комбинации тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного анти-CD22, как указано.

[0080] На **ФИГ. 10A-10E** показана очистка конъюгатов антитело:CpG. Показана очистка конъюгатов с использованием антител TNT70 (**ФИГ. 10A**), TNT71 (**ФИГ. 10B**), TNT72 (**ФИГ. 10C**) и TNT74 (**ФИГ. 10D**). На **ФИГ. 10E** показан анализ исходного материала и конъюгатов CpG в восстановленной (r) или не восстановленной (n.r.) форме, как указано.

[0081] На **ФИГ. 11** показана активация B-клеток различными конъюгатами

гуманизированное анти-CD22 антитело:CpG в различных концентрациях, как указано.

[0082] На **ФИГ. 12A-12D** показаны профили указанных конъюгатов CpG:анти-CD22, определенные с помощью эксклюзионной хроматографии ВЭЖХ (HPLC-SEC). Конъюгаты с использованием доменов VH RH1 (**ФИГ. 12A**), RH2 (**ФИГ. 12B**), RH3 (**ФИГ. 12C**) и RH4 (**ФИГ. 12D**) группируют.

[0083] На **ФИГ. 13A** суммированы выбранные свойства указанных конъюгатов CpG:анти-CD22, включая уровень экспрессии в клетках Expi293 или CHO,% высокомолекулярных (HMW) или мономерных видов по данным SEC-HPLC, связывание VH/VL, аффинность связывания с CD22 человека и связывание с CD22 яванского макака. На **ФИГ. 13B** показан уровень экспрессии указанных конъюгатов CpG:анти-CD22 из клеток CHO.

[0084] На **ФИГ. 14** показаны результаты анализа термостабильности указанных антител и конъюгатов антител с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC).

[0085] На **ФИГ. 15A** и **15B** показана экспрессия вариантов замены N92 домена RL1 VL в не восстанавливающих (**ФИГ. 15A**) или восстанавливающих (**ФИГ. 15B**) условиях.

[0086] На **ФИГ. 15C-15F** показана кинетика связывания антител, включая варианты замены N92 домена RL1 VL на CD22, включая KD (**ФИГ. 15C**), Ka (**ФИГ. 15D**), Kd (**ФИГ. 15E**) и уровни захвата (**ФИГ. 15F**), как определено SPR.

[0087] На **ФИГ. 16A-16E** показана схематическая диаграмма типовых конъюгатов в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. Примеры конъюгатов антитело:CpG со сконструированной Q-меткой (RPQGF; SEQ ID NO:47), слитой с C-концом тяжелой цепи, показаны на **ФИГ. 16A** и **16E** (с DAR1) и на **ФИГ. 16B** (с DAR2). Примеры конъюгатов антитело:CpG с встречающейся в природе Q-меткой (Q295), подвергнутой конъюгации посредством мутации N297A, показаны на **ФИГ. 16C** (с DAR1) и на **ФИГ. 16D** (с DAR2).

[0088] На **ФИГ. 17A-17B** показаны фармакокинетические свойства конъюгатов CpG-антитело. На **ФИГ. 17A** показано время полужизни конъюгатов CpG-антитело Cmpd 1.1b (SEQ ID NO:3), соединения 3.2b (SEQ ID NO:9), соединения 4.2b (SEQ ID NO:12), соединения 4.3b (SEQ ID NO:12). ID NO:13), соединения 5.2a (SEQ ID NO:15) или соединения 5.7a (SEQ ID NO:20) с RFB4 (SEQ ID NO:56 и 57) по сравнению с голым RFB4. На **ФИГ. 17B** показано время полужизни конъюгатов RFB4, оцененное путем захвата 5' области CpG с использованием анти-BrdU антитела; конъюгаты RFB4 с соединением 3.2b (SEQ ID NO:9), соединением 4.2b (SEQ ID NO:12), соединением 4.3b (SEQ ID NO:13), соединением 5.2a (SEQ ID NO:15) и соединением 5.7a. (SEQ ID NO:20) имеют увеличенный период полужизни по сравнению с конъюгатом RFB4 с соединением 1.1b (SEQ ID NO:3).

[0089] На **ФИГ. 18** показана активация B-клеток из PBMC яванского макака олигонуклеотидами CpG, измеренная по экспрессии CD86. Обработка соединением 7.7b (7-7) индуцирует более сильную активацию CD86 по сравнению с индуцированной

соединением 1.1b (12070), демонстрируя усиленную активацию B-клеток.

[0090] На **ФИГ. 19** показана индукция IL-6 после обработки PBMC человека конъюгатом олигонуклеотида анти-CD22:CpG. Анти-CD22, конъюгированное с соединением 1.1b (12070). CpG индуцирует экспрессию IL6, не достигаемую с помощью не конъюгированного анти-CD22 антитела.

[0091] На **ФИГ. 20A** и **20B** показана активация Т-клеток (**ФИГ. 20A)** и B-клеток (**ФИГ. 20B)** вне мишени анти-SIRP-α, конъюгированным с соединением 1.1b (12070), по сравнению с обработкой не конъюгированным анти-SIRP-α.

[0092] На **ФИГ. 21A-21C** показаны результаты анализа иммунного ответа на опухоль у мышей. Клетки MC38 инъецируют в правый бок самкам мышей C57BL/6 в концентрации $2x10^6$ клеток на мышь в среде DMEM. Опухоли наблюдают до тех пор, пока средний размер опухолей не достигнет 150-155 $мм^3$. Мышей рандомизируют в группу контроля PBS, анти-SIRP-α-4523 CpG или анти-mCD22-4523 CpG по 5 мышей на когорту. Анти-SIRP-α-4523 и анти-mCD22-4523 вводят в общей дозе 10 мг/кг два раза с интервалом в три дня. Оба лекарственных средства вводят внутрибрюшинно. На 88 день мышам с ликвидированными опухолями повторно вводят MC38 (левый бок) в количестве $2x10^6$ клеток на мышь в среде DMEM. Наивных мышей, которым не имплантируют MC38 мыши, включают в качестве контроля роста опухоли. Опухоли измеряют штангенциркулем в двух измерениях, и объем опухоли рассчитывают как: длина x ширина x ширина x 0,5, где длина является большей для двух измерений. После повторного заражения, ранее искорененные мыши демонстрируют эффективное отторжение опухоли уже через три дня после повторной имплантации опухоли, что свидетельствует о том, что лечение анти-SIRP-α (**ФИГ. 21B)** и анти-mCD22 (**ФИГ. 21C)**, конъюгированными с 4523 CpG вызывает устойчивый ответ иммунной памяти на имплантированную опухоль, чего не наблюдается у мышей, не подвергавшихся лечению, которые впервые столкнулись с опухолью MC38 (**ФИГ. 21A**).

[0093] На **ФИГ. 22A-22D** показано, что активная Fc область (**ФИГ. 22A** и **22C**) лучше подходит для таргетирования опухоли конъюгатами олигонуклеотидов анти-Her2:CpG по сравнению с менее активной Fc областью (**ФИГ. 22B** и **22D**). Клетки MC38, экспрессирующие m/h Her2, получают с помощью лентивирусной трансдукции и сортируют для получения клеток, экспрессирующих m/h Her2. Клетки m/h Her2-MC38 инъецируют в правый бок самок мышей C57BL/6 в концентрации $2x10^6$ клеток на мышь в среде DMEM. Опухоли контролируют до тех пор, пока средний размер опухолей не достигнет 70 $мм^3$. Мышей рандомизируют в контрольную группу PBS, блокирующую TNT149a (анти-Her2 mIgG2a) и TNT150a (анти-Her2 mIgG1) по 5 мышей в группе. Мышам, которых лечат конъюгатом нуклеотида анти-Her2-CpG, вводят дозы 1, 3 и 10 мг/кг всего три раза с интервалом в три дня (**ФИГ. 22A** и **22B)**. Оба лекарственных средства вводят внутрибрюшинно. Стрелки указывают на введение К 60 дню у мышей, которым вводят 1, 3 и 10 мг/кг TNT149a три раза с интервалом в три дня, наблюдают искоренение опухоли (1/5, 5/5 и 5/5 мышей, соответственно; **ФИГ. 22C)**, в то время как

мыши, леченные 1, 3 и 10 мг/кг TNT150a, демонстрируют меньшее количество мышей с искорененными опухолями (0/5, 3/5 и 5/5, соответственно; **ФИГ. 22D)**. Мыши, леченные контролем PBS, достигают конечной точки к 24 дню, и все группы, леченные TNT149a или TNT150a, демонстрируют задержку роста опухоли по сравнению с контролем PBS.

[0094] На **ФИГ. 23A-23I** показаны результаты анализа повторного заражения мышей MC38 m/h Her2. На **ФИГ. 23A** показана схема анализа. На 81 день мышам с искорененными опухолями повторно вводят m/h Her2 MC38 (нижний правый бок), родительские MC38 (нижний левый бок), m/h Her2 B16F10 (верхний правый бок) и родительские B16F10 (верхний левый бок) в количестве $2x10^6$ клеток (клеток m/h Her2 MC38 и MC38) и $1x10^6$ клеток (клеток m/h Her2 B16F10 и B16F10) на мышь в DMEM. На 81 день имеется 5 мышей с искорененными опухолями в группах, получавших 10 мг/кг TNT150a, 3 и 10 мг/кг TNT149a, и 3 мыши с искорененными опухолями в группах, получавших 3 мг/кг TNT150a. Наивные мыши показали рост всех имплантированных клеток. m/h Her2 B16F10, MC38 и m/h Her2 MC38 показали искоренение опухолей или значительную задержку роста опухоли по сравнению с наивными. Во всех группах, исходные опухоли B16F10 растут у одной мыши, у которой не было роста в группе, получавшей 10 мг/кг mIgG2a. К 99 дню у всех мышей наблюдается полное искоренение клеток m/h Her2 MC38. Как исходные клетки MC38, так и клетки m/h Her2 B16F10 показали искоренение опухоли, за исключением одной мыши для 3 и 10 мг/кг мышей, ранее получавших TNT149a для исходных клеток MC38, и 1-3 мышей для всех групп, ранее леченных 3 и 10 мг/кг. Эти данные показывают, что мыши с опухолями m/h Her2 MC38 с искорененными опухолями после лечения анти-Her2 mIgG1 и mIgG2a обладают мощным и стойким противоопухолевым ответом на m/h Her2 MC38, родительские MC38 и m/h B16F10, но не на родительские B16F10. опухоли. На **ФИГ. 23B-23I** показаны результаты для отдельных мышей в группах повторного заражения, опухолях B16F10, MC38, m/h Her2 B6F10 и m/h Her2 MC38, соответственно.

[0095] На **ФИГ. 24A-24C** показаны результаты анализа экспрессии гена NanoString через 8 часов после внутрибрюшинного введения конъюгатов анти-mCD22:CpG олиго. Нормализованные данные экспрессии опухолей анализируют с помощью программного обеспечения для расширенного анализа nSolver и nCounter для получения сигнатур экспрессии генов, как определено NanoString. У мышей с CT26, получавших анти-mCD22 CpG, наблюдают более высокие баллы сигнатуры для передачи сигнала интерферона (**ФИГ. 24A)**, презентации антигена (**ФИГ. 24B)** и цитотоксичности (**ФИГ. 24C)** в опухоли по сравнению с контролем PBS и только анти-mCD22.

[0096] На **ФИГ. 25** показаны результаты совместного культивирования макрофагов костного мозга мыши с Her2-положительными или Her2-отрицательными опухолевыми клетками в присутствии конъюгатов анти-Her2:CpG с активными или неактивными Fc областями.

[0097] На **ФИГ. 26A-26C** показана индукция активации B-клеток в PBMC человека конъюгатами олигонуклеотидов анти-CD22:CpG по сравнению с голыми CpG. Показана

экспрессия CD40 (**ФИГ. 26A**), CD80 (**ФИГ. 26B**) и CD86 (**ФИГ. 26C**) после обработки PBMC человека анти-CD22 антителом с доменом VH RH2 и доменом VL RL1 N92S (SEQ ID No: 65 и 87, соответственно), конъюгированным с соединением 7.7b (7-7) CpG, TNT52a (RFB4, конъюгированные с 12070), соединением 7.7b (7-7) CpG, 12070 CpG или только средой.

[0098] На **ФИГ. 27** показана активность указанных свободных олигонуклеотидов CpG на PBMC человека, как определено по экспрессии CD40 на CD19+ B-клетках.

[0099] На **ФИГ. 28** показано действие указанных свободных олигонуклеотидов CpG в отношении PBMC человека, как определено с помощью репортерного анализа Ramos NFkb.

[00100] На **ФИГ. 29A-29C** показано действие указанных свободных олигонуклеотидов CpG на PBMC человека из трех разных донорских линиях (D559, D804 и D643), наблюдаемая по экспрессии CD40.

[00101] На **ФИГ. 30** показано действие указанных свободных олигонуклеотидов CpG на PBMC человека, как определено по экспрессии CD40 на CD19+ B-клетках.

[00102] На **ФИГ. 31** показано действие конъюгатов CpG:антитело на PBMC человека, как определено по экспрессии CD40 на CD19+ B-клетках.

[00103] На **ФИГ. 32A-32C** показано действие указанных конъюгатов анти-CD22-антитело:олигонуклеотид CpG на PBMC человека, как определено по экспрессии CD40 на CD19+ B-клетках.

[00104] На **ФИГ. 33** показан объем опухоли в зависимости от времени после обработки конъюгатом анти-CD22-антитело:олигонуклеотид CpG, имеющим «мертвый» домен Fc, при указанном количестве доз по сравнению с PBS. Использована сингенная модель опухоли с использованием клеток карциномы толстой кишки мыши CT26. Конъюгаты вводят внутривенно от 1 до 3 доз каждые 3 дня по 10 мг/кг.

[00105] На **ФИГ. 34A-34D** показано действие лечения неконъюгированным олигонуклеотидом CpG, неконъюгированным анти-CD22 антителом или конъюгатом анти-CD22антитело:олигонуклеотид CpG на различные типы иммунных клеток. Воздействие на B-клетки анализируют с использованием маркера активации CD40 (**ФИГ. 34A**), воздействие на дендритные клетки анализируют с использованием маркера активации CD80 (**ФИГ. 34B**), воздействие на миелоидные клетки CD14+ анализируют с использованием маркера активации CD86 (**ФИГ. 34C**) и воздействие на T-клетки анализируют с использованием маркера активации CD69 (**ФИГ. 34D**).

[00106] На **ФИГ. 35A и 35B** показана активация моноцитов, макрофагов и дендритных клеток при обработке анти-huHer2антителом, имеющим Fc домен mIgG1 или mIgG2a, либо не конъюгированным, либо конъюгированным с олигонуклеотидом CpG мыши. На **ФИГ. 35A** показано совместное культивирование спленоцитов сингенной мыши Balbc (полная иммунная система) в присутствии линии клеток опухоли молочной железы человека SKBR3 (Her2+++), гейтирование моноцитов/макрофагов (Lin-CD11b+, F480+, GR1mid) и анализ экспрессии CD40. На **ФИГ. 35B** показано совместное

культивирование спленоцитов сингенной мыши Balbc (полная иммунная система) в присутствии линии клеток опухоли молочной железы человека SKBR3 (Her2+++), гейтирование дендритных клеток (lin-, F480-, CD11c+, MHCII+) и анализ экспрессии CD40.

[00107] На **ФИГ. 36** показана противоопухолевая эффективность анти-CD22-антитела, конъюгированного с олигонуклеотидом CpG, в соответствии с 3 схемами дозирования в модели рака молочной железы EMT6, который обычно не поддается лечению анти-PD1/PD-L1.

[00108] На **ФИГ. 37** показана противоопухолевая эффективность анти-CD22-антитела, конъюгированного с олигонуклеотидом CpG или свободного олигонуклеотида CpG, в модели рака молочной железы EMT6 при внутриопухолевом введении.

[00109] На **ФИГ. 38A-38D** показано усиление дифференциации B-клеток и снижение B-регуляторных клеток в селезенке после введения конъюгата анти-CD22 Ab-CpG.

[00110] На **ФИГ. 39A-39D** показано увеличение количества эффекторных клеток CD4 и CD8 и их функции в селезенке после введения конъюгата анти-CD22 Ab-CpG.

[00111] На **ФИГ. 40A-40D** показано увеличение инфильтратов B-клеток и модулирование супрессивного микроокружения в опухоли после введения конъюгата анти-CD22 Ab-CpG.

[00112] На **ФИГ. 41A-41C** показана устойчивая индукция цитокинов и хемокинов при CD22-опосредованном вовлечении TLR9 в B-клетки человека.

[00113] На **ФИГ. 42A и 42B** показана устойчивая индукция различных цитокинов и хемокинов (как указано) с помощью анти-mCD22-CpG без видимого накопления на периферии при повторном введении дозы мышам.

[00114] На **ФИГ. 43** показан противоопухолевый ответ в группах сингенных мышей CT26, которые не отвечают на лечение анти-PD1 антителом. Лечение проводят с использованием антитела против CD22 мыши (SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125), конъюгированного с CpG 4523 мыши (SEQ ID NO: 121). Объем опухоли уменьшается у мышей, получавших конъюгат или комбинацию конъюгата и анти-PD1 антитела, тогда как у соответствующих мышей, получавших только анти-PD1 антитело, не наблюдается значительное уменьшение объема опухоли.

[00115] На **ФИГ. 44** показано действие лечения антителом против CD22 мыши (SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125), конъюгированным с CpG 4523 мыши (SEQ ID NO: 121) с конфигурацией DAR1, у мышей BALB/C, которым имплантируют клетки 4T1. Количество метастатических бляшек значительно снижено в конъюгате CD22 Ab-CpG по сравнению с контролем.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00116] Следующее описание излагает типовые способы, параметры и подобное. Однако следует признать, что такое описание не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения, а вместо этого предложено как описание типовых вариантов

осуществления.

[00117] Настоящее описание основано на открытии того, что определенные конъюгаты полипептид-олигонуклеотид обеспечивают повышенную стабильность и селективность доставки. В описании также предложены способы получения этих конъюгатов. В частности, конъюгацию можно осуществить с помощью реакции, опосредованной трансглутаминазой (Tgase). В описании также предложены промежуточные соединения, которые можно использовать для получения этих конъюгатов, и композиции и наборы, которые содержат эти конъюгаты полипептид-олигонуклеотид.

I. Определения

[00118] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное описание. Все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки. Если определение, изложенное в этом разделе, противоречит или иным образом несовместимо с определением, изложенным в патенте, заявке или другой публикации, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, определение, изложенное в этом разделе, имеет преимущественную силу над определением, включенным в настоящий документ посредством ссылки.

[00119] Понятно, что некоторые признаки описания, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки описания, которые для краткости, описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены по отдельности или в любой подходящей комбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящиеся к конкретным стадиям способа, реагентам или условиям, конкретно охватываются настоящим описанием и описываются в настоящем документе так же, как если бы каждая комбинация была описана отдельно и в явном виде.

[00120] Используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Далее следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключать любой необязательный элемент. Как таковое, это заявление предназначено служить предшествующей основой для использования такой исключительной терминологии, как «исключительно», «только» и подобной, в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использованием «отрицательного» ограничения.

[00121] В настоящей заявке, если в контексте не указано иное, ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают ионные формы, полиморфы, псевдополиморфы, аморфные формы, сольваты, сокристаллы, хелаты, изомеры, таутомеры, оксиды (*например,* N-оксиды, S-оксиды), сложные эфиры, пролекарства, изотопы и/или их

защищенные формы. В некоторых вариантах осуществления, ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают его полиморфы, сольваты, сокристаллы, изомеры, таутомеры и/или оксиды. В некоторых вариантах осуществления, ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают его полиморфы, сольваты и/или сокристаллы. В некоторых вариантах осуществления, ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают его изомеры, таутомеры и/или оксиды. В некоторых вариантах осуществления, ссылки на соединение формулы (A)-(D) включают его сольваты.

[00122] «*Алкил*» включает прямые и разветвленные углеродные цепи, имеющие указанное число атомов углерода, например, от 1 до 20 атомов углерода, или от 1 до 8 атомов углерода, или от 1 до 6 атомов углерода. Например, C_{1-6} алкил включает алкил как с прямой, так и с разветвленной цепью, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Когда назван алкильный остаток, имеющий конкретное число атомов углерода, подразумевается, что охватываются все версии с разветвленной и прямой цепью, имеющие это число атомов углерода; так, например, «пропил» включает н-пропил и изопропил; и «бутил» включает н-бутил, втор-бутил, изобутил и трет-бутил. Примеры алкильных групп включают, но не ограничены ими, метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил, 2-пентил, 3-пентил, изопентил, неопентил, гексил, 2-гексил, 3 -гексил и 3-метилпентил.

[00123] Когда указан диапазон значений (например, C_{1-6} алкил), включаются все значения в пределах диапазона, и все промежуточные диапазоны. Например, «C_{1-6} алкил» включает C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6, C_{1-6}, C_{2-6}, C_{3-6}, C_{4-6}, C_{5-6}, C_{1-5}, C_{2-5}, C_{3-5}, C_{4-5}, C_{1-4}, C_{2-4}, C_{3-4}, C_{1-3}, C_{2-3} и C_{1-2} алкил.

[00124] «*Алкенил*» относится к ненасыщенной алкильной группе с разветвленной или прямой цепью, имеющей указанное число атомов углерода (например, от 2 до 8 или от 2 до 6 атомов углерода) и, по меньшей мере, одну двойную связь углерод-углерод. Группа может находиться либо в цис-, либо в транс-конфигурации (Z- или E-конфигурации) вокруг двойной(ых) связи(ей). Алкенильные группы включают, но не ограничены ими, этенил, пропенил (например, проп-1-ен-1-ил, проп-1-ен-2-ил, проп-2-ен-1-ил (аллил), проп-2-ен-2-ил) и бутенил (например, бут-1-ен-1-ил, бут-1-ен-2-ил, 2-метил-проп-1-ен-1-ил, бут-2-ен-1-ил, бут-2-ен-1-ил, бут-2-ен-2-ил, бута-1,3-диен-1-ил, бута-1,3-диен-2-ил).

[00125] «*Алкинил*» относится к ненасыщенной алкильной группе с разветвленной или прямой цепью, имеющей указанное число атомов углерода (например, от 2 до 8 или от 2 до 6 атомов углерода) и, по меньшей мере, одну тройную углерод-углеродную связь. Алкинильные группы включают, но не ограничены ими, этинил, пропинил (например, проп-1-ин-1-ил, проп-2-ин-1-ил) и бутинил (например, бут-1-ин-1-ил, бут-1-ин-3-ил, бут-3-ин-1-ил).

[00126] Термин «*амино*», используемый в настоящем документе, представляет собой $-N(R^{N1})_2$, где, если амино не замещен, оба R^{N1} представляют собой H; или, если амино замещен, каждый R^{N1} независимо представляет собой H, -OH, $-NO_2$, $-N(R^{N2})_2$, -

SO_2OR^{N2}, $-SO_2R^{N2}$, $-SOR^{N2}$, $-COOR^{N2}$, N-защитную группу, алкил, алкенил, алкинил, алкокси, арил, арилалкил, арилокси, циклоалкил, циклоалкенил, гетероалкил или гетероциклил, при условии, что, по меньшей мере, один R^{N1} не представляет собой H, и где каждый R^{N2} независимо представляет собой H, алкил, или арил. Каждый из заместителей сам по себе может быть незамещенным или замещенным незамещенным(ыми) заместителем(ями), определенным(ими) в настоящем документе для каждой соответствующей группы. В некоторых вариантах осуществления, амино представляет собой незамещенную аминогруппу (*например,* $-NH_2$) или замещенную аминогруппу (*например,* $-NHR^{N1}$), где R^{N1} независимо представляет собой -OH, $-SO_2OR^{N2}$, $-SO_2R^{N2}$, $-SOR^{N2}$, $-COOR^{N2}$, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный арил, и каждый R^{N2} может быть необязательно замещенным алкилом или необязательно замещенным арилом. В некоторых вариантах осуществления, замещенный амино может представлять собой алкиламино, в котором алкильные группы необязательно замещены, как описано в настоящем документе для алкила. В некоторых вариантах осуществления, аминогруппа представляет собой $-NHR^{N1}$, где R^{N1} представляет собой необязательно замещенный алкил. Неограничивающие примеры $-NHR^{N1}$, в которых R^{N1} представляет собой необязательно замещенный алкил, включают: необязательно замещенный алкиламино, протеиногенную аминокислоту, не протеиногенную аминокислоту, C_{1-6} алкиловый эфир протеиногенной аминокислоты и C_{1-6} алкиловый эфир не протеиногенной аминокислоты. Используемая аминокислота необязательно находится в L-форме.

[00127] Термин «*иммуномодулирующий полинуклеотид*», используемый в настоящем документе, представляет собой полинуклеотидную конструкцию, содержащую в общей сложности от 6 до 50 смежных нуклеозидов, ковалентно связанных друг с другом межнуклеозидными мостиками, независимо выбранными из группы, состоящей из межнуклеозидных фосфоэфиров и, необязательно, межнуклеозидных спейсеров с удаленным азотистым основанием. Иммуномодулирующие полинуклеотиды кэпированы на 5'- и 3'-концах 5'- и 3'-кэпирующими группами, соответственно. Иммуномодулирующие полинуклеотиды способны модулировать врожденный иммунный ответ, определяемый, например, изменением активации внутриклеточного(ых) сигнального(ых) пути(ей), включая, но не ограничиваясь ими, NFκB, изменением экспрессии маркера активации или изменением секреции, по меньшей мере, одного воспалительного цитокина или, по меньшей мере, одного интерферона типа I в иммунной клетке (*например,* антигенпрезентирующей клетке), в которую был доставлен иммуномодулирующий полинуклеотид (*например,* по сравнению с другой иммунной клеткой (*например,* антигенпрезентирующей клеткой), в которую не был доставлен иммуномодулирующий полинуклеотид) или в иммунной клетке, которая взаимодействует с иммунной клеткой (*например,* антигенпрезентирующей клеткой), в которую был доставлен иммуномодулирующий полинуклеотид (включая прямые межклеточные взаимодействия, и косвенную стимуляцию, например, из одного или нескольких цитокинов,

секретируемых клеткой, в которую был доставлен иммуномодулирующий полинуклеотид). Иммуномодулирующий полинуклеотид может содержать конъюгирующую группу или, если иммуномодулирующий полинуклеотид является частью конъюгата, линкер, связанный с таргетной группой и, необязательно, с одним или несколькими (например, от 1 до 6) вспомогательными группами (например, полиэтиленгликолями). Конъюгирующая группа или линкер может быть частью фосфотриэфира или концевой кэпирующей группы.

[00128] Термин «*иммуностимулирующий полинуклеотид*», используемый в настоящем документе, представляет собой иммуномодулирующий полинуклеотид, способный активировать иммунный ответ, что определяется, например, усилением активации внутриклеточного(ых) сигнального(ых) пути(ей), такого(их) как NFκB, или повышением уровней маркера(ов) клеточной поверхности активации или функции, или увеличением секреции, по меньшей мере, одного воспалительного цитокина или, по меньшей мере, одного интерферона типа I в иммунной клетке (*например,* антигенпрезентирующей клетке), в которую был доставлен иммуностимулирующий полинуклеотид (например, в сравнении с другой иммунной клеткой (*например,* антигенпрезентирующей клеткой), в которую не был доставлен иммуностимулирующий полинуклеотид), или в иммунной клетке, которая взаимодействует с иммунной клеткой (*например,* антигенпрезентирующей клеткой), в которую был доставлен иммуномодулирующий полинуклеотид (включая прямые межклеточные взаимодействия, и косвенную стимуляцию, например, от одного или нескольких цитокинов, секретируемых клеткой, к которой был доставлен иммуномодулирующий полинуклеотид). В некоторых вариантах осуществления, иммуностимулирующий полинуклеотид содержит, по меньшей мере, одну цитидин-п-гуанозиновую (CpG) последовательность, где p представляет собой межнуклеозидный фосфодиэфир (например, фосфат или тиофосфат) или межнуклеозидный фосфотриэфир или фосфотиотриэфир. Используемый в настоящем документе CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид может существовать в природе, например, CpG ODN бактериального или вирусного происхождения, или может быть синтетическим. Например, в некоторых вариантах осуществления, последовательность CpG в иммуностимулирующем полинуклеотиде содержит 2'-дезоксирибозу. В некоторых вариантах осуществления, последовательность CpG в иммуностимулирующем полинуклеотиде не метилирована. В некоторых вариантах осуществления, иммуностимулирующий полинуклеотид представляет собой полинуклеотид формулы (C), представленный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, иммуностимулирующий полинуклеотид представляет собой соединение формулы (D), представленное в настоящем документе.

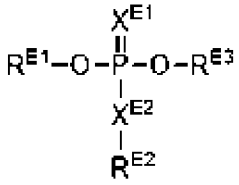
[00129] Термин «*иммунодепрессивный полинуклеотид*», используемый в настоящем документе, представляет собой иммуномодулирующий полинуклеотид, способный противодействовать иммунному ответу, что определяется, например,

снижением активации или отсутствием активации NFκB или отсутствием повышения уровней маркера(ов) активации функции или снижения или отсутствия увеличения секреции, по меньшей мере, одного воспалительного цитокина или, по меньшей мере, одного интерферона типа I в иммунной клетке (*например,* антигенпрезентирующей клетке), в которую был доставлен иммунодепрессивный полинуклеотид (например, по сравнению с другой иммунной клеткой (*например,* антигенпрезентирующей клеткой), в которую не был доставлен иммунодепрессивный полинуклеотид) или в иммунной клетке, которая взаимодействует с иммунной клеткой (*например,* антигенпрезентирующей клеткой), в которую был доставлен иммуномодулирующий полинуклеотид (включая прямые межклеточные взаимодействия, и косвенную стимуляцию, например, от одного или нескольких цитокинов, секретируемых клеткой, к которой был доставлен иммуномодулирующий полинуклеотид).

[00130] Следует понимать, что термины «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо. Кроме того, следует понимать, что термины «иммуномодулирующий полинуклеотид», «иммуностимулирующий полинуклеотид», «иммунодепрессивный полинуклеотид» и «конъюгат» охватывают соли иммуномодулирующего полинуклеотида, иммуностимулирующего полинуклеотида, иммунодепрессивного полинуклеотида и конъюгата, соответственно. Например, термины «иммуномодулирующий полинуклеотид», «иммуностимулирующий полинуклеотид», «иммунодепрессивный полинуклеотид» и «конъюгат» охватывают как протонированную, нейтральную форму (группу P-XH, где X представляет собой O или S) фосфата, фосфоротиоата, или фосфородитиоата, и депротонированную ионную форму (группу PX^-, где X представляет собой O или S) фосфата, фосфоротиоата или фосфородитиоата. Соответственно, следует понимать, что фосфоэфиры и фосфодиэфиры, описанные как содержащие один или несколько R^{E1}, R^{E2} и R^{E3} в виде водорода, охватывают соли, в которых фосфат, фосфоротиоат или фосфородитиоат присутствует в депротонированной ионной форме. Кроме того, термины «свободный», «голый» и «неконъюгированный», относящиеся к иммуномодулирующим полинуклеотидам, иммуностимулирующим полинуклеотидам, иммунодепрессивным полинуклеотидам и/или олигонуклеотидам (*например,* CpG олигонуклеотидам), могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

[00131] Термин «*фосфотриэфир*» относится к фосфоэфиру, в котором все три валентности замещены не водородными заместителями. Фосфотриэфир состоит из фосфата, фосфоротиоата или фосфородитиоата; одной или двух связей с нуклеозидом(ами) или спейсером(ами) с удаленным азотистым основанием и/или фосфорильной(ыми) группой(ами); и одной или двух групп, независимо выбранных из группы, состоящей из биообратимой группы; не биообратимой группы; вспомогательной группы; конъюгирующей группы; и линкера, связанного с таргетирующей группой и, необязательно, с одной или несколькими (например, от 1 до 6) вспомогательными группами. Концевой фосфотриэфир включает одну связь с группой, содержащей

нуклеозид, и две группы, независимо выбранные из группы, состоящей из биообратимой группы; не биообратимой группы; вспомогательной группы; конъюгирующей группы; фосфорильной группы; и линкера, связанного с таргетирующей группой и, необязательно, с одной или несколькими (например, от 1 до 6) вспомогательными группами. В некоторых вариантах осуществления, концевой фосфотриэфир содержит 1 или 0 линкеров, связанных с таргетирующей группой и, необязательно, с одной или несколькими (например, от 1 до 6) вспомогательными группами. Межнуклеозидный фосфотриэфир включает две связи с нуклеозидсодержащими группами. Фосфотриэфир может представлять собой группу следующей структуры:



где:

каждый из X^{E1} и X^{E2} независимо представляет собой O или S;

каждый или R^{E1} и R^{E3} независимо представляет собой связь с нуклеозидом; сахарный аналог спейсера с удаленным азотистым основанием; биообратимую группу; не биообратимую группу; вспомогательную группу; конъюгирующую группу; линкер, связанный с таргетирующей группой; линкер, связанный с таргетирующей группой и одной или несколькими (например, от 1 до 6) вспомогательными группами; или атом фосфора в группе формулы $-P(=X^{E1})(-X^{E2}-R^{E2}A)-O-$,

где $R^{E2}A$ представляет собой водород; биообратимую группу; не биообратимую группу; вспомогательную группу; конъюгирующую группу; линкер, связанный с таргетирующей группой; или линкер, связанный с таргетирующей группой и одной или несколькими (например, от 1 до 6) вспомогательными группами; и

R^{E2} представляет собой биообратимую группу; не биообратимую группу; вспомогательную группу; конъюгирующую группу; линкер, связанный с таргетирующей группой; или линкер, связанный с таргетирующей группой и одной или несколькими (*например,* от 1 до 6) вспомогательными группами;

при условии, что, по меньшей мере, один из R^{E1} и R^{E3} представляет собой связь с группой, содержащей, по меньшей мере, один нуклеозид.

Если и R^{E1}, и R^{E3} связаны с группами, содержащими хотя бы один нуклеозид, фосфотриэфир представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир. Если один и только один из R^{E1} и R^{E3} представляет собой связь с группой, содержащей нуклеозид, фосфотриэфир является концевым фосфотриэфиром.

[00132] Используемый в настоящем документе термин «*аминокислота*» относится к любой аминокислоте (как стандартной, так и нестандартной аминокислоте), включая, но не ограничиваясь ими, α-аминокислоты, β-аминокислоты, γ-аминокислоты и δ-аминокислоты. Примеры подходящих аминокислот включают, но не ограничены ими, аланин, аспарагин, аспартат, цистеин, глутамат, глутамин, глицин, пролин, серин,

тирозин, аргинин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин. Дополнительные примеры подходящих аминокислот включают, но не ограничены ими, омитин, гипузин, 2-аминоизомасляную кислоту, дегидроаланин, гамма-аминомасляную кислоту, цитруллин, бета-аланин, альфа-этилглицин, альфа-пропилглицин и норлейцин.

[00133] Термины «*антитело*», «*иммуноглобулин*» и «*Ig*» используются в настоящем документе взаимозаменяемо, используются в самом широком смысле и конкретно охватывают, например, отдельные моноклональные антитела (включая агонисты, антагонисты, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), композиции антител с полиэпитопной или моноэпитопной специфичностью, поликлональные или моновалентные антитела, мультивалентные антитела, мультиспецифические антитела (*например,* биспецифические антитела, если они проявляют желаемую биологическую активность), образованные, по меньшей мере, из двух интактных антител, одноцепочечных антител и фрагментов антител. Антитело может быть человеческим, гуманизированным, химерным и/или с созревшей аффинностью, а также антителом других видов, например мыши и кролика.

[00134] Предполагается, что термин «*антитело*» включает полипептидный продукт В-клеток полипептидов класса иммуноглобулинов, который способен связываться со специфическим антигеном и состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну тяжелую цепь (около 50-70 кДа) и одну легкую цепь (около 25 кДа), и каждая амино концевая часть каждой цепи включает вариабельную область от примерно 100 до примерно 130 или более аминокислот, и каждая карбоксильная концевая часть каждой цепи включает константную область. *См.* Borrebaeck (ed.) (1995) Antibody Engineering, Second Ed., Oxford University Press.; Kuby (1997) Immunology, Third Ed., W.H. Freeman and Company, New York. Антитела включают, но не ограничены ими, синтетические антитела, моноклональные антитела, рекомбинантные антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), антитела человека, гуманизированные антитела, камелизированные антитела, химерные антитела, интратела, анти-идиотипические (анти-Id) антитела и их функциональные фрагменты, которые относятся к части полипептида тяжелой или легкой цепи антитела, которая сохраняет часть или всю связывающую активность антитела, из которого получен фрагмент. Неограничивающие примеры функциональных фрагментов антител включают одноцепочечные Fv (scFv) (*например,* включая моноспецифические или биспецифические), Fab фрагменты, F(ab') фрагменты, $F(ab')_2$ фрагменты, $F(ab')_2$ фрагменты, Fv с дисульфидной связью (sdFv), Fd фрагменты, Fv фрагменты, scRv-Fc, нанотело, диатело, триатело, тетратело и минитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит вариант Fc со сниженной или устраненной эффекторной функцией. В частности, антитела, представленные в настоящем документе, включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, например, антигенсвязывающие домены или молекулы, которые

содержат антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном (*например,* одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) анти-CD56 антитела или анти-SIRPα антитела). Такие фрагменты антител описаны, например, в Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Myers (ed.), Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, New York: VCH Publisher, Inc.; Huston et al., Cell Biophysics **1993**, 22, 189-224; Plückthun and Skerra, Meth. Enzymol. **1989**, 178, 497-515; and Day, Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990). Представленные в настоящем документе антитела могут быть любого типа (*например,* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), любого класса (*например,* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любого подкласса (*например,* IgG2a и IgG2b) молекулы иммуноглобулина.

[00135] Термин «*антиген*» относится к заранее определенной мишени, с которой может избирательно связываться антитело. Антиген-мишень может быть полипептидом, углеводом, нуклеиновой кислотой, липидом, гаптеном или их фрагментом или другим встречающимся в природе или синтетическим соединением. В одном варианте осуществления, антиген-мишень представляет собой полипептид.

[00136] Термины «*антигенсвязывающий фрагмент*», «*антигенсвязывающий домен*» и «*антигенсвязывающая область*» относятся к части антитела, которая содержит аминокислотные остатки, взаимодействующие с антигеном (*например,* полипептидом, углеводом, нуклеиновой кислотой, липидом, гаптеном или их фрагментом, или другим встречающимся в природе или синтетическим соединением) и придают связывающему агенту его специфичность и аффинность к антигену (*например,* определяющие комплементарность области (CDR)).

[00137] Термин «*специфическое связывание*», «*специфически связывается с*» или «*специфичен в отношении*» конкретного полипептида или эпитопа на конкретном полипептиде-мишени может демонстрироваться, например, молекулой (*например,* антителом), имеющей константу диссоциации (K_d) для мишени, по меньшей мере, примерно 10^{-4} M, по меньшей мере, примерно 10^{-5} M, по меньшей мере, примерно 10^{-6} M, по меньшей мере, примерно 10^{-7} M, по меньшей мере, примерно 10^{-8} M, по меньшей мере, примерно 10^{-9} M, по меньшей мере, примерно 10^{-10} M, по меньшей мере, примерно 10^{-11} M или, по меньшей мере, примерно 10^{-12} M. В одном варианте осуществления, термин «специфическое связывание» относится к связыванию, при котором молекула связывается с конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде без существенного связывания с каким-либо другим полипептидом или полипептидным эпитопом.

[00138] Единица 4-цепочечного антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. В случае IgG, 4-цепочечная единица обычно составляет около 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными

связями в зависимости от изотипа H-цепи. Каждая цепь H и L также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь имеет на N-конце вариабельный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH) для каждой из цепей α и γ и четыре домена CH для изотипов μ и ε. Каждая L-цепь имеет на N-конце вариабельный домен (VL), за которым следует константный домен (CL) на другом конце. VL выравнивается с VH, и CL выравнивается с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Спаривание VH и VL вместе образует один сайт связывания антигена. О структуре и свойствах различных классов антител *см., например,* Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Stites et al. (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, страница 71 и глава 6.

[00139] Термин «*вариабельная область*» или «*вариабельный домен*» относится к части легкой или тяжелой цепи антитела, которая обычно расположена на амино конце легкой или тяжелой цепи и имеет длину примерно от 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и примерно от 100 до 110 аминокислот в легкой цепи, и используется для связывания и специфичности каждого конкретного антитела с его конкретным антигеном. Вариабельная область тяжелой цепи может обозначаться как «VH». Вариабельная область легкой цепи может обозначаться как «VL». Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельных областей сильно различаются по последовательности среди антител. V область опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако вариабельность неравномерно распределена по 110-аминокислотному диапазону вариабельных областей. Вместо этого, V области состоят из менее вариабельных (*например,* относительно инвариантных) удлинений, называемых каркасными областями (FR), состоящих примерно из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями с большей вариабельностью (*например,* экстремальной вариабельностью), называемыми «гипервариабельными областями», каждая из которых имеет длину примерно 9-12 аминокислот. Каждая из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR, в основном принимающих конфигурацию β-листа, соединенные тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие структуру β-листа и, в некоторых случаях, образующие ее часть. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR, и вместе с гипервариабельными областями из другой цепи вносят вклад в формирование антигенсвязывающего сайта антител (*см., например*, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)). Константные области не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Вариабельные области сильно различаются по последовательности между разными антителами. Вариабельность последовательности

сосредоточена в CDR, в то время как менее вариабельные части вариабельной области называются каркасными областями (FR). CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь ответственны за взаимодействие антитела с антигеном. В конкретных вариантах осуществления, вариабельная область представляет собой вариабельную область человека.

[00140] Термин «*нумерация остатков вариабельной области по Kabat*» или «*нумерация аминокислотных положений по Kabat*» и их варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных областей тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи в компиляции антител в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). При использовании этой системы нумерации, реальная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, соответствующие усечению или вставке в FR или CDR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать вставку одной аминокислоты (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (*например,* остатки 82a, 82b и 82c и *т. д.* по Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания участков гомологии последовательности антитела со «стандартной» последовательностью, нумерованной по Kabat. Система нумерации Kabat обычно используется для обозначения остатка в вариабельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (*например,* Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). «Система нумерации EU» или «индекс EU» обычно используется, когда речь идет об остатке в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (*например,* индекс EU, описанный в Kabat et al., см. выше). «Индекс EU по Kabat» относится к нумерации остатков антитела IgG 1 EU человека. Были описаны и другие системы нумерации, включая, например, AbM, Chothia, Contact, IMGTи AHon.

[00141] «*Интактное*» антитело представляет собой антитело, содержащее сайт связывания антигена и CL и, по меньшей мере, константные области тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные области могут включать константные области человека или варианты их аминокислотной последовательности. Предпочтительно, интактное антитело имеет одну или несколько эффекторных функций.

[00142] Термин «*фрагмент антитела*» относится к части интактного антитела, предпочтительно к антигенсвязывающей или вариабельной области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, фрагменты Fab, Fab', F(ab')2 и Fv; диатела и ди-диатела (*см., например,* Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1993**, 90, 6444-8; Lu et al., J. Biol. Chem. **2005**, 280, 19665-72; Hudson et al., Nat. Med. **2003**, 9, 129-134; WO 93/11161; и патенты США №№ 5,837,242 и 6,492,123); молекулы одноцепочечных антител (*см., например*, патенты США №№ 4,946,778; 5,260,203; 5,482,858 и 5,476,786); антитела с двойным вариабельным доменом (*см., например*, патент

США № 7,612,181); антитела с одним вариабельным доменом (SdAbs) (*см.*, *например*, Woolven et al., Immunogenetics **1999**, 50, 98-101 Streltsov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **2004**, 101, 12444-12449); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[00143] Термин «*функциональный фрагмент*», «*связывающий фрагмент*» или «*антигенсвязывающий фрагмент*» антитела относится к молекуле, которая демонстрирует, по меньшей мере, одну из биологических функций, приписываемых интактному антителу, где эта функция включает, по меньшей мере, связывание с антигеном-мишенью.

[00144] Термин «*тяжелая цепь*» при использовании в отношении антитела относится к полипептидной цепи примерно 50-70 кДа, где амино концевая часть включает вариабельную область примерно от 120 до 130 или более аминокислот, и карбокси концевая часть включает константную область. Константная область может быть одного из пяти различных типов (*например,* изотипов), обозначаемых как альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ε), гамма (γ) и мю (μ), в зависимости от аминокислотной последовательности. константной области тяжелой цепи. Отдельные тяжелые цепи различаются по размеру: α, δ и γ содержат примерно 450 аминокислот, и μ и ε содержат примерно 550 аминокислот. В сочетании с легкой цепью, эти различные типы тяжелых цепей дают начало пяти хорошо известным классам (*например,* изотипам) антител, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая четыре подкласса IgG, а именно IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Тяжелая цепь может представлять собой тяжелую цепь человека.

[00145] Термин «*легкая цепь*» при использовании в отношении антитела относится к полипептидной цепи размером примерно 25 кДа, где амино концевая часть включает вариабельную область примерно от 100 до примерно 110или более аминокислот, и карбокси концевая часть включает константную область. Приблизительная длина легкой цепи составляет от 211 до 217 аминокислот. Существует два различных типа, называемых каппа (κ) или лямбда (λ) на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. Легкая цепь может представлять собой легкую цепь человека.

[00146] Термин «*моноклональное антитело*», используемый в настоящем документе, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, *например,* отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах, и каждое моноклональное антитело обычно распознает один эпитоп на антигене. В конкретных вариантах осуществления, «моноклональное антитело», как используется в настоящем документе, представляет собой антитело, продуцируемое одной гибридомой или другой клеткой, где антитело связывается только с эпитопом бета «клото», как определено, например, с помощью ELISA или другого анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного в данной области техники. Термин «моноклональный» не ограничивается

каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, моноклональные антитела, применимые в настоящем изобретении, могут быть получены по методике гибридомы, впервые описанной Kohler et al., Nature **1975**, 256, 495; или могут быть получены с использованием способов рекомбинантной ДНК в бактериальных, эукариотических животных или растительных клетках (*см., например,* патент США № 4,816,567). «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием методов, описанных Clackson et al., Nature **1991**, 352, 624-628 и Marks et al., J. Mol. Biol. **1991**, 222, 581-597, например. Другие способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны в данной области техники (см., например, главу 11 в: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York). Примеры способов получения моноклональных антител представлены в примерах в настоящем документе.

[00147] «*Гуманизированные*» формы антител не человеческого происхождения (*например,* мыши) представляют собой химерные антитела, которые включают иммуноглобулины человека (*например,* реципиентное антитело), в которых нативные остатки CDR заменены остатками из соответствующих CDR видов не человеческого происхождения (*например,* донорное антитело), таких как мышь, крыса, кролик или примат, отличный от человека, обладающими желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. В некоторых случаях, один или несколько остатков FR области иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками не человеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации вносятся для дальнейшего улучшения характеристик антител. Тяжелая или легкая цепь гуманизированного антитела может содержать по существу все из, по меньшей мере, одной или нескольких вариабельных областей, в которых все или по существу все CDR соответствуют CDR иммуноглобулина не человеческого происхождения, и все или по существу все FR являются таковыми для последовательности иммуноглобулина человека. В некоторых вариантах осуществления, гуманизированное антитело будет содержать, по меньшей мере, часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации *см.,* Jones et al., Nature **1986**, 321, 522-525; Riechmann et al., Nature **1988**, 332, 323-329; Presta, Curr. Opin. Biotechnol. **1992**, 3, 394-398; Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1992**, 89, 4285-4289; и патенты США №№ 6,800,738, 6,719,971, 6,639,055, 6,407,213 и 6,054,297.

[00148] «*Антитело человека*» представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, продуцируемого человеком, и/или было получено с использованием любой из методик получения антител человека, как описано в настоящем документе. Это определение антитела человека специально исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки не человеческого происхождения. Антитела человека могут

быть получены с использованием различных методов, известных в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. **1991**, 227, 381; Marks et al., J. Mol. Biol. **1991**, 222, 581) и библиотеки дрожжевого дисплея (Chao et al., Nature Protocols **2006**, 1, 755-768). Для получения моноклональных антител человека доступны способы, описанные Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol. **1991**, 147, 86-95. *См.* также van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. **2001**, 5, 368-374. Антитела человека могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но чьи эндогенные локусы были отключены, *например,* мышам (*см., например,* Jakobovits, Curr. Opin. Biotechnol. **1995**, 6, 561-566; Brüggemann and Taussing, Curr. Opin. Biotechnol. **1997**, 8, 455-458; и патенты США №№ 6,075,181 и 6,150,584 относительно технологии XENOMOUSE™). *См.* также, например, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **2006**, 103, 3557-3562 относительно антител человека, полученных с помощью технологии гибридомы В-клеток человека.

[00149] «CDR» относится к одной из трех гипервариабельных областей (H1, H2 или H3) в некаркасной области каркаса β-листа VH иммуноглобулина (Ig или антитела) или к одной из трех гипервариабельных областей (L1, L2, или L3) в некаркасной области каркаса β-листа VL антитела. Соответственно, CDR представляют собой последовательности вариабельной области, диспергированные в последовательности каркасной области. CDR области хорошо известны специалистам в данной области техники и были определены, например, Kabat, как участки с наибольшей гипервариабельностью в пределах вариабельных (V) доменов антитела. Kabat et al., J. Biol. Chem. **1977**, 252, 6609-6616; Kabat, Adv. Protein Chem. **1978**, 32, 1-75. Последовательности CDR области также были структурно определены Chothia как те остатки, которые не являются частью консервативного каркаса β-листа и, таким образом, способны адаптироваться к различным конформациям. Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. **1987**, 196, 901-917. Обе терминологии хорошо известны в данной области техники. Последовательности CDR области также были определены AbM, Contact и IMGT. Положения CDR в вариабельной области канонического антитела были определены путем сравнения многочисленных структур. Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. **1997**, 273, 927-948; Morea et al., Methods. **2000**, 20, 267-279. Поскольку количество остатков в гипервариабельной области различается в разных антителах, дополнительные остатки, относящиеся к каноническим позициям, обычно нумеруются буквами a, b, c и так далее рядом с номером остатка в схеме нумерации канонической вариабельной области. Al-Lazikani et al., выше (1997). Подобная номенклатура хорошо известна специалистам в данной области техники.

[00150] Термин «*гипервариабельная область*», «HVR» или «*HV*» при использовании в настоящем документе относится к областям вариабельной области антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли. Как правило, антитела содержат шесть

гипервариабельных областей; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). Ряд внешних границ гипервариабельной области используется и охвачен в настоящем документе. Определяющие комплементарность области по Kabat (CDR), основаны на вариабельности последовательностей и являются наиболее часто используемыми (см., *например,* Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Вместо этого, Chothia относится к расположению структурных петель. *См., например,* Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. **1987**, 196, 901-917. Конец петли Chothia CDR-H1 при нумерации с использованием соглашения о нумерации Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации Kabat помещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствует, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют и 35A, и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные области AbM представляют собой компромисс между CDR Kabat и структурными петлями Chothia и используются программным обеспечением для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (*см., например,* Martin, in Antibody Engineering, Vol. 2, Chapter 3, Springer Verlag). Гипервариабельные области «Contact» основаны на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. Остатки из каждой из этих гипервариабельных областей или CDR указаны ниже.

[00151] Термин «*Fc область*» в настоящем документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая, например, Fc области нативной последовательности, рекомбинантные Fc области и вариантные Fc области. Хотя границы Fc области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc область тяжелой цепи IgG человека часто определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбокси конца. C-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) Fc области может быть удален, например, во время получения или очистки антитела, или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может включать популяции антител с удаленными всеми остатками K447, популяции антител без удаленных остатков K447 и популяции антител, содержащие смесь антител с остатком K447 и без него.

[00152] «*Циклоалкил*» означает неароматическое, полностью насыщенное карбоциклическое кольцо, имеющее указанное число атомов углерода, например, от 3 до 10, или от 3 до 8, или от 3 до 6 атомов углерода в кольце. Циклоалкильные группы могут быть моноциклическими или полициклическими (например, бициклическими, трициклическими). Примеры циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил, и мостиковые и замкнутые кольцевые группы (например, норборнан, бицикло[2.2.2]октан). Кроме того, одно кольцо полициклической циклоалкильной группы может быть ароматическим при условии, что полициклическая циклоалкильная группа связана с исходной структурой через не ароматический углерод. Например, 1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил (где группа связана с исходной структурой

через не ароматический атом углерода) представляет собой циклоалкильную группу, и 1,2,3,4-тетрагидронафталин-5-ил (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода) не считается циклоалкильной группой. Примеры полициклических циклоалкильных групп, состоящих из циклоалкильной группы, конденсированной с ароматическим кольцом, описаны ниже.

[00153] «*Циклоалкенил*» означает не ароматическое карбоциклическое кольцо, содержащее указанное число атомов углерода (например, от 3 до 10, или от 3 до 8, или от 3 до 6 атомов углерода в кольце) и, по меньшей мере, одну двойную связь углерод-углерод. Циклоалкенильные группы могут быть моноциклическими или полициклическими (например, бициклическими, трициклическими). Примеры циклоалкенильных групп включают циклопропенил, циклобутенил, циклопентенил, циклопентадиенил и циклогексенил, и мостиковые и замкнутые кольцевые группы (например, бицикло[2.2.2]октен). Кроме того, одно кольцо полициклической циклоалкенильной группы может быть ароматическим при условии, что полициклическая алкенильная группа связана с исходной структурой через не ароматический атом углерода. Например, инден-1-ил (где группа связана с исходной структурой через не ароматический атом углерода) считается циклоалкенильной группой, а инден-4-ил (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода) не считается циклоалкенильной группой. Примеры полициклических циклоалкенильных групп, состоящих из циклоалкенильной группы, конденсированной с ароматическим кольцом, описаны ниже.

[00154] «*Циклоалкинил*» относится к ненасыщенной углеводородной группе в циклоалкиле, имеющей, по меньшей мере, один участок ацетиленовой ненасыщенности (*т.е.* имеющей, по меньшей мере, одну группу формулы C≡C). Циклоалкинил может состоять из одного кольца, такого как циклооктин, или нескольких колец. Одна циклоалкинильная группа представляет собой ненасыщенный циклический углеводород, содержащий от 5 до 10 кольцевых атомов углерода («C_5-C_{10} циклоалкинил»). Примеры включают циклопентин, циклогексин, циклогептин, циклооктин, циклононин и подобные.

[00155] «*Арил*» означает ароматическое карбоциклическое кольцо, имеющее указанное число атомов углерода, например, от 6 до 12 или от 6 до 10 атомов углерода. Арильные группы могут быть моноциклическими или полициклическими (например, бициклическими, трициклическими). В некоторых случаях, оба кольца полициклической арильной группы являются ароматическими (например, нафтил). В других случаях, полициклические арильные группы могут включать не ароматическое кольцо, конденсированное с ароматическим кольцом, при условии, что полициклическая арильная группа связана с исходной структурой через атом в ароматическом кольце. Таким образом, 1,2,3,4-тетрагидронафталин-5-ил (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода) считается арильной группой, и 1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил (где группа связана с исходной структурой через не ароматический атом углерода) не считается арильной группой. Точно так же, арильной

группой считается 1,2,3,4-тетрагидрохинолин-8-ил (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода), тогда как 1,2,3,4-тетрагидрохинолин-1-ильная группа (где группа связана с исходной структурой через не ароматический атом азота) не считается арильной группой. Однако термин «арил» не охватывает или не перекрывается с «гетероарилом», как определено в настоящем документе, независимо от точки присоединения (например, и хинолин-5-ил, и хинолин-2-ил представляют собой гетероарильные группы). В некоторых случаях, арил представляет собой фенил или нафтил. В некоторых случаях, арил представляет собой фенил. Дополнительные примеры арильных групп, содержащих ароматическое углеродное кольцо, конденсированное с неароматическим кольцом, описаны ниже.

[00156] Термин «DAR» относится к соотношению лекарственное средство-антитело в конъюгате олигонуклеотид-антитело, более конкретно, к соотношению иммуномодулирующий полинуклеотид-антитело. В некоторых случаях, например, конъюгат олигонуклеотид-антитело может быть описан в настоящем документе как имеющий DAR, равный 1, или как конъюгат DAR1, где соотношение олигонуклеотид-антитело составляет 1:1. В других случаях, конъюгат олигонуклеотид-антитело может быть описан в настоящем документе как имеющий DAR, равный 2, или как конъюгат DAR2, где соотношение олигонуклеотид-антитело составляет 2:1.

[00157] «*Гетероарил*» означает ароматическое кольцо, содержащее указанное число атомов (например, 5-12 или 5-10-членный гетероарил), состоящее из одного или нескольких гетероатомов (например, 1, 2, 3 или 4 гетероатомов), выбранных из N, O и S, и остальные атомы кольца представляют собой углерод. Гетероарильные группы не содержат соседних атомов S и O. В некоторых вариантах осуществления, общее количество атомов S и O в гетероарильной группе составляет не более 2. В некоторых вариантах осуществления, общее количество атомов S и O в гетероарильной группе составляет не более 1. Если не указано иное, гетероарильные группы могут быть связаны с исходной структурой атомом углерода или азота, если позволяет валентность. Например, «пиридил» включает 2-пиридил, 3-пиридил и 4-пиридил, и «пирролил» включает 1-пирролил, 2-пирролил и 3-пирролил.

[00158] В некоторых случаях гетероарильная группа является моноциклической. Примеры включают пиррол, пиразол, имидазол, триазол (например, 1,2,3-триазол, 1,2,4-триазол, 1,2,4-триазол), тетразол, фуран, изоксазол, оксазол, оксадиазол (например, 1,2,3-оксадиазол, 1,2,4-оксадиазол, 1,3,4-оксадиазол), тиофен, изотиазол, тиазол, тиадиазол (например, 1,2,3-тиадиазол, 1,2,4-тиадиазол, 1,3,4-тиадиазол), пиридин, пиридазин, пиримидин, пиразин, триазин (например, 1,2,4-триазин, 1,3,5-триазин) и тетразин.

[00159] В некоторых случаях оба кольца полициклической гетероарильной группы являются ароматическими. Примеры включают индол, изоиндол, индазол, бензоимидазол, бензотриазол, бензофуран, бензоксазол, бензоизоксазол, бензоксадиазол, бензотиофен, бензотиазол, бензоизотиазол, бензотиадиазол, 1H-пирроло[2,3-b]пиридин, 1H-пиразоло[3,4-b]пиридин, 3H-имидазо[4,5-b]пиридин, 3H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин,

1H-пирроло[3,2-b]пиридин, 1H-пиразоло[4,3-b]пиридин, 1H-имидазо[4,5-b]пиридин, 1H-[1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин, 1H-пирроло[2,3-c]пиридин, 1H-пиразоло[3,4-c]пиридин, 3H-имидазо[4,5-c]пиридин, 3H-[1,2,3]триазоло[4,5-c]пиридин, 1H-пирроло[3,2 -c]пиридин, 1H-пиразоло[4,3-c]пиридин, 1H-имидазо[4,5-c]пиридин, 1H-[1,2,3]триазоло[4,5-c]пиридин, фуро[2,3-b]пиридин, оксазоло[5,4-b]пиридин, изоксазоло[5,4-b]пиридин, [1,2,3]оксадиазоло[5,4-b]пиридин, фуро[3,2-b]пиридин, оксазоло[4,5-b]пиридин, изоксазоло[4,5-b]пиридин, [1,2,3]оксадиазоло[4,5-b]пиридин, фуро[2,3-c]пиридин, оксазоло[5,4-c]пиридин, изоксазоло[5,4-c]пиридин, [1,2,3]оксадиазоло[5,4-c]пиридин, фуро[3,2-c]пиридин, оксазоло[4,5-c]пиридин, изоксазоло[4,5-c]пиридин, [1,2,3]оксадиазоло[4,5-c]пиридин, тиено[2,3-b]пиридин, тиазоло[5,4-b]пиридин, изотиазоло[5,4-b]пиридин, [1,2,3]тиадиазоло[5,4-b]пиридин, тиено[3,2-b]пиридин, тиазоло[4,5-b]пиридин, изотиазоло[4,5-b]пиридин, [1,2,3]тиадиазоло[4,5-b]пиридин, тиено[2,3-c]пиридин, тиазоло[5,4-c]пиридин, изотиазоло[5,4-c]пиридин, [1,2,3]тиадиазоло[5,4-c]пиридин, тиено[3,2-c]пиридин, тиазоло[4,5-c]пиридин, изотиазоло[4,5-c]пиридин, [1,2,3]тиадиазоло[4,5-c]пиридин, хинолин, изохинолин, циннолин, хиназолин, хиноксалин, фталазин, нафтиридин (например, 1,8-нафтиридин, 1,7-нафтиридин, 1,6-нафтиридин, 1,5-нафтиридин, 2,7-нафтиридин, 2,6-нафтиридин), имидазо[1,2-a]пиридин, 1H-пиразоло[3,4-d]тиазол, 1H-пиразоло[4,3-d]тиазол и имидазо[2,1-b]тиазол.

[00160] В других случаях, полициклические гетероарильные группы могут включать не ароматическое кольцо (например, циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкил, гетероциклоалкенил), конденсированное с гетероарильным кольцом, при условии, что полициклическая гетероарильная группа связана с исходной структурой через атом в ароматическом кольце. Например, 4,5,6,7-тетрагидробензо[d]тиазол-2-ил (где группа связана с исходной структурой через ароматический атом углерода) считается гетероарильной группой, в то время как 4,5,6,7-тетрагидробензо[d]тиазол-5-ил (где группа связана с исходной структурой через не ароматический атом углерода) не считается гетероарильной группой. Примеры полициклических гетероарильных групп, состоящих из гетероарильного кольца, слитого с неароматическим кольцом, описаны ниже.

[00161] Используемые в настоящем документе термины «*включая*», «*содержа*» и «*содержащий*» используются в их открытом, неограничивающем смысле. Также понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, могут включать «*состоящий*» и/или «*состоящий по существу из*» аспектов и вариантов осуществления.

[00162] Понятно, что независимо от того, используется ли термин «*примерно*» явно или нет, каждая величина, приведенная в настоящем документе, подразумевается как относящаяся к фактическому заданному значению, и относится к приближению к такому заданному значению, которое можно разумно вывести на основе обычного опыта в данной области техники, включая эквиваленты и приближения, обусловленные условиями эксперимента и/или измерения для такого заданного значения.

[00163] Используемый в настоящем документе термин «*носитель*» включает фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергающихся их воздействию в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный раствор с pH буфером. Неограничивающие примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее примерно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™.

[00164] Используемый в настоящем документе термин «*эффективное количество*» или «*терапевтически эффективное количество*» вещества представляет собой, по меньшей мере, минимальную концентрацию, необходимую для достижения измеримого улучшения или профилактики конкретного нарушения. Эффективное количество в настоящем документе может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес пациента, и способность вещества вызывать желаемый ответ у индивидуума. Эффективным количеством также является такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты лечения перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Что касается рака, эффективное количество включает количество, достаточное для того, чтобы вызвать уменьшение опухоли и/или снизить скорость роста опухоли (например, для подавления роста опухоли) или для профилактики или замедления другой нежелательной пролиферации клеток при раке. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития рака. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для профилактики или задержки рецидива. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество представляет собой количество, достаточное для снижения частоты рецидивов у индивидуума. Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может: (i) уменьшить количество раковых клеток; (ii) уменьшить размер опухоли; (iii) ингибировать, замедлять, до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать (*т.е.* до некоторой степени замедлять и, предпочтительно, останавливать) метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предотвращать или откладывать появление и/или рецидив опухоли; (vii) снижать частоту рецидивов опухоли

и/или (viii) облегчать до некоторой степени один или несколько симптомов, связанных с раком. Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений. Для целей настоящего описания, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для проведения профилактического или терапевтического лечения прямо или косвенно. Как понятно в клиническом контексте, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть достигнуто или не достигнуто в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, «эффективное количество» может рассматриваться в контексте введения одного или нескольких терапевтических агентов, и один агент может считаться вводимым в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими агентами может быть достигнут или достигается желаемый результат.

[00165] «*Вкладыш в упаковку*» относится к инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки лекарственных средств, которые содержат информацию о показаниях, обычно включенных в коммерческие упаковки лекарственных средств, которые содержат информацию о показаниях, использовании, дозировке, введении, противопоказаниях, других лекарственных средствах, которые следует комбинировать с упакованным продуктом и/или предупреждения относительно использования таких лекарственных средств и *т.д.*

[00166] Термины «*белок*», «*полипептид*» и «*пептид*» используются в настоящем документе для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может быть прерван не аминокислотами. Эти термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими как конъюгация с метящим компонентом. Как правило, используемый в настоящем документе белок будет иметь молекулярную массу по меньшей мере, примерно 5-20 кДа, альтернативно, по меньшей мере, примерно 20-100 кДа или, по меньшей мере, примерно 100 кДа. Также в определение включены, например, белки, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (включая, например, не природные аминокислоты и т. д.), и другие модификации, известные в данной области техники.

[00167] «*Фармацевтически приемлемая соль*» представляет собой форму соли, которая является нетоксичной, биологически переносимой или иным образом биологически подходящей для введения субъекту. *См. в общем* Berge et al.(1977) J. Pharm. Sci. 66, 1. Конкретными фармацевтически приемлемыми солями являются те, которые фармакологически эффективны и подходят для контакта с тканями субъектов без чрезмерной токсичности, раздражения или аллергической реакции. Фармацевтически

приемлемые соли включают, без ограничения, кислотно-аддитивные соли, образованные с неорганическими кислотами, такими как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и подобные; или образованы органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, пропионовая кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота, винная кислота и подобные. Эти соли могут быть получены из неорганических или органических кислот. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают сульфаты, пиросульфаты, бисульфаты, сульфиты, бисульфиты, фосфаты, моногидрофосфаты, дигидрофосфаты, метафосфаты, пирофосфаты, хлориды, бромиды, йодиды, ацетаты, пропионаты, деканоаты, каприлаты, акрилаты, формиаты, изобутираты, капроаты, гептаноаты, пропиолаты, оксалаты, малонаты, сукцинаты, субераты, себацинаты, фумараты, малеаты, бутин-1,4-диоаты, гексин-1,6-диоаты, бензоаты, хлорбензоаты, метилбензоаты, динитробензоаты, гидроксибензоаты, метоксибензоаты, фталаты, сульфонаты, метилсульфонаты, пропилсульфонаты, безилаты, ксилолсульфонаты, нафталин-1-сульфонаты, нафталин-2-сульфонаты, фенилацетаты, фенилпропионаты, фенилбутираты, цитраты, лактаты, γ-гидроксибутираты, гликоляты, тартраты и манделаты. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически приемлемые соли образуются, когда кислотный протон, присутствующий в исходном соединении, либо замещается ионом металла, например, ионом щелочного металла, ионом щелочноземельного металла или ионом алюминия; или координирует с органической основой. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических нетоксичных оснований, включают, без ограничений, соли первичных, вторичных и третичных аминов, замещенные амины, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, 2-диэтиламиноэтанол, трометамин, триметанин, дициклогексиламин, кофеин, прокаин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, N-этилглюкамин, N-метилглюкамин, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминовые смолы, аминокислоты, такие как лизин, аргинин, гистидин, и подобные. Примеры фармацевтически приемлемых основно-аддитивных солей включают соли, полученные из неорганических оснований, такие как соли натрия, калия, лития, аммония, кальция, магния, железа, цинка, меди, марганца, алюминия и подобных. В некоторых вариантах осуществления, органические нетоксичные основания представляют собой L-аминокислоты, такие как L-лизин и L-аргинин, трометамин, N-этилглюкамин и N-метилглюкамин. Приемлемые неорганические основания включают, без ограничения, гидроксид алюминия, гидроксид кальция, гидроксид калия, карбонат натрия, гидроксид натрия и подобные. Списки других подходящих фармацевтически приемлемых солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985.

[00168] «*Сольват*» образуется при взаимодействии растворителя и соединения. Подходящие растворители включают, например, воду и спирты (*например,* этанол).

Сольваты включают гидраты, имеющие любое соотношение соединения к воде, такие как моногидраты, дигидраты и полугидраты.

[00169] «*Субъект*», «*пациент*» или «*индивидуум*» включает млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно является человеком. В некоторых вариантах осуществления, субъект, *например,* пациент, которому вводят терапевтические агенты и композиции, является млекопитающим, обычно приматом, таким как человек. В некоторых вариантах осуществления, примат представляет собой мартышку или человекообразную обезьяну. Субъект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и пожилых людей. В некоторых вариантах осуществления, субъектом является млекопитающее, не относящееся к приматам, такое как грызун, собака, кошка, сельскохозяйственное животное, такое как корова или лошадь, и *т.д.*

[00170] Термин «*рак*» или «*опухоль*» относится к наличию клеток, обладающих характеристиками, типичными для клеток, вызывающих рак, такими как неконтролируемая пролиферация, бессмертие, метастатический потенциал, быстрый рост и скорость пролиферации, и некоторые характерные морфологические особенности. Раковые клетки часто находятся в форме солидной опухоли, которая выявляется на основании опухолевой массы, например, с помощью таких процедур, как компьютерная томография, МРТ, рентген, ультразвук или пальпация, и/или которая выявляется благодаря экспрессии одного или нескольких рак-специфических антигенов в образце, полученном от пациента. В некоторых вариантах осуществления, солидная опухоль не обязательно должна иметь поддающиеся измерению размеры. Раковые клетки могут также находиться в форме гемобластоза, где раковые клетки могут существовать отдельно или быть диссеминированными внутри животного. Используемые в настоящем документе термины «*диссеминированная опухоль*» и «*гемобластоз*» используются взаимозаменяемо и включают, помимо прочего, лейкоз, лимфому и другие виды рака клеток крови.

[00171] Термин «*лейкоз*» относится к типу рака крови или костного мозга, характеризующемуся аномальным увеличением количества незрелых лейкоцитов, называемых «бластами». Лейкоз представляет собой широкий термин, охватывающий целый спектр заболеваний. В свою очередь, он является частью еще более широкой группы заболеваний, поражающих кровь, костный мозг и лимфоидную систему, которые известны как гематологические новообразования. Лейкозы можно разделить на четыре основные классификации: острый лимфоцитарный (или лимфобластный) лейкоз (ALL), острый миелогенный (или миелоидный, или нелимфатический) лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CML). Другие типы лейкоза включают волосатоклеточный лейкоз (HCL), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз и Т-клеточный лейкоз взрослых.

[00172] Термин «*лимфома*» относится к группе опухолей клеток крови, которые развиваются из лимфатических клеток. Двумя основными категориями лимфом являются

лимфомы Ходжкина (HL) и неходжкинские лимфомы (NHL). Лимфомы включают любые новообразования лимфатических тканей. Основными классами являются раки лимфоцитов, типа лейкоцитов, которые принадлежат как лимфе, так и крови и пронизывают их обоих.

[00173] Используемый в настоящем документе термин «*рак*» включает как предраковые, так и злокачественные виды рака, и включает первичные опухоли (*например,* опухоли, клетки которых не мигрировали в участки тела субъекта, отличные от исходной опухоли) и вторичные опухоли (например, те, которые возникают в результате метастазирования, миграции опухолевых клеток во вторичные участки, отличные от места первоначальной опухоли), рецидивирующий рак и трудно поддающийся лечению рак.

[00174] Термины «*рецидив рака*» и «*рецидив рака*» используются взаимозаменяемо и относятся к возвращению признаков, симптомов или заболеваний после ремиссии. Рецидивирующие раковые клетки могут повторно появляться в том же месте первичной опухоли или в другом месте, например, при вторичном раке. Раковые клетки могут повторно появиться в той же болезненной форме, что и первичный рак, или в другой болезненной форме. Например, в некоторых вариантах осуществления, первичный рак представляет собой солидную опухоль, и рецидивирующий рак представляет собой гемобластоз. В других вариантах осуществления, первичный рак представляет собой гемобластоз, и рецидивирующий рак представляет собой солидную опухоль. В других вариантах осуществления, и первичный рак, и рецидивирующий рак представляют собой солидные опухоли или оба представляют собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления, рецидивирующая опухоль экспрессирует по меньшей мере, один опухолеассоциированный антиген, который также экспрессируется первичной опухолью.

[00175] Термин «*трудно поддающийся лечению рак*», используемый в настоящем документе, относится к раку, который не отвечает на лечение, например, к раку, который является резистентным в начале лечения (*например,* к лечению иммунотерапией), или к раку, который может стать резистентным во время лечения. лечение. Термины «*отвечать*», «*ответ*» или «*восприимчивость*» относятся к противораковому ответу, например, в смысле уменьшения размера опухоли или ингибирования роста опухоли. Эти термины также могут относиться к улучшенному прогнозу, например, что отражается увеличением времени до рецидива, то есть периодом до первого рецидива, цензурируемого для второго первичного рака как первого события или смерти без признаков рецидива, или увеличением общей выживаемости, то есть периодом от лечения до смерти от любой причины. Отвечать или давать ответ означает, что при воздействии стимула достигается благоприятная конечная точка. В качестве альтернативы, отрицательный или вредный симптом минимизируется, смягчается или ослабляется при воздействии стимула. Следует понимать, что оценка вероятности того, что опухоль или субъект будет демонстрировать благоприятный ответ, эквивалентна оценке вероятности того, что опухоль или субъект не будут демонстрировать благоприятный ответ (*т.е.* будет

демонстрировать отсутствие ответа или не будет отвечать).

[00176] В настоящем документе, рак включает, но не ограничен ими, меланому, рак молочной железы, рак легких, рак бронхов, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак головного мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак полости рта или глотки, рак печени, рак почки, рак яичка, рак желчевыводящих путей, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, рак надпочечников, остеосаркому, хондросаркому, рак гематологических тканей, В-клеточный рак, *например,* множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезни тяжелых цепей, такие как, например, болезнь альфа-цепей, болезнь гамма-цепей и болезнь мю-цепей, доброкачественную моноклональную гаммапатию и иммуноцитарный амилоидоз и подобные. Другие неограничивающие примеры типов рака, применимых для способов, охватываемых настоящим изобретением, включают саркомы и карциномы человека, например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, базально-клеточный рак, аденокарциному, рак потовых желез, рак сальных желез, папиллярный рак, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, рак печени, хориокарциному, соминому, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак кости, опухоль головного мозга, рак яичка, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластому, ретинобластому; лейкозы, *например,* острый лимфоцитарный лейкоз и острый миелоцитарный лейкоз (миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз); хронический лейкоз (хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз); и истинную полицитемию, лимфому (болезнь Ходжкина и неходжкинскую болезнь), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема и болезнь тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления, рак носит эпителиальный характер и включает, но не ограничен ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, гинекологический рак, рак почки, рак гортани, рак легкого, рак ротовой полости, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или рак кожи. В других вариантах осуществления, рак представляет собой рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легкого или рак толстой кишки. В других

вариантах осуществления, эпителиальный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, непапиллярную почечно-клеточную карциному, карциному шейки матки, карциному яичника (*например,* серозную карциному яичника) или карциному молочной железы. Эпителиальные раки могут быть охарактеризованы различными другими способами, включая, но не ограничиваясь ими, серозный, эндометриоидный, муцинозный, светлоклеточный рак, рак Бреннера или недифференцированный.

[00177] Термин «*лечение рака*» или «*противораковый терапевтический агент*», как используется в настоящем документе, относится к тем терапиям или агентам, которые могут оказывать противоопухолевое действие или обладать противоопухолевой активностью. Такой противоопухолевый эффект или противоопухолевую активность можно проявлять как снижение скорости пролиферации, жизнеспособности или метастатической активности опухолевых клеток. Возможный способ демонстрации противоопухолевой активности состоит в том, чтобы показать снижение скорости роста аномальных клеток, возникающее во время терапии, или стабильность или уменьшение размера опухоли. Такую активность можно оценить с использованием общепринятых моделей опухолей in vitro или in vivo, включая, но не ограничиваясь ими, модели ксенотрансплантатов, модели аллотрансплантатов, модели MMTV и другие известные в данной области модели для исследования противоопухолевой активности.

[00178] Термины «*лечить*», « *лечение*» и «*лечение*» предназначены для включения облегчения или отмены состояния, нарушения или заболевания или одного или нескольких симптомов, связанных с состоянием, нарушением или заболеванием; или облегчение или устранение причины(причин) состояния, нарушения или самого заболевания.

[00179] Термины «*предотвращать*», «*профилактика*» и «*профилактика*» предназначены для включения способа отсрочки и/или профилактики возникновения состояния, нарушения или заболевания и/или сопутствующих ему симптомов; профилактику возникновения у субъекта состояния, нарушения или заболевания; или снижение риска возникновения у субъекта состояния, нарушения или заболевания.

[00180] Термин «*замещенная*» означает, что указанная группа или фрагмент имеет один или несколько заместителей, включая, но не ограничиваясь ими, такие заместители, как алкокси, ацил, ацилокси, алкоксикарбонил, карбонилалкокси, ациламино, амино, аминоацил, аминокарбониламино, аминокарбонилокси, циклоалкил, циклоалкенил, арил, гетероарил, арилокси, циано, азидо, галоген, гидроксил, нитро, карбоксил, тиол, тиоалкил, алкил, алкенил, алкинил, гетероциклил, аралкил, аминосульфонил, сульфониламино, сульфонил, оксо и подобные. Термин «незамещенная» означает, что указанная группа не имеет заместителей. Когда термин «замещенная» используется для описания структурной системы, подразумевается, что замещение происходит в любом разрешенном по валентности положении в системе. Когда группа или фрагмент содержит более одного заместителя, подразумевается, что заместители могут быть одинаковыми или отличными друг от друга. В некоторых вариантах осуществления, замещенная группа или фрагмент

содержит от одного до пяти заместителей. В некоторых вариантах осуществления, замещенная группа или фрагмент содержит один заместитель. В некоторых вариантах осуществления, замещенная группа или фрагмент содержит два заместителя. В некоторых вариантах осуществления, замещенная группа или фрагмент содержит три заместителя. В некоторых вариантах осуществления, замещенная группа или фрагмент содержит четыре заместителя. В некоторых вариантах осуществления, замещенная группа или фрагмент содержит пять заместителей.

[00181] Под «*необязательным*» или «*необязательно*» подразумевается, что описанное впоследствии событие или обстоятельство может произойти или не произойти, и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда оно не происходит. Например, «необязательно замещенный алкил» включает как «алкил», так и «замещенный алкил», как определено в настоящем документе. Специалистам в данной области техники будет понятно, что в отношении любой группы, содержащей один или несколько заместителей, такие группы не предназначены для введения каких-либо замещений или моделей замещения, которые пространственно непрактичны, синтетически неосуществимы и/или нестабильны по своей природе. Также будет понятно, что если группа или фрагмент необязательно замещены, описание включает как варианты осуществления, в которых группа или фрагмент замещены, так и варианты осуществления, в которых группа или фрагмент не замещены.

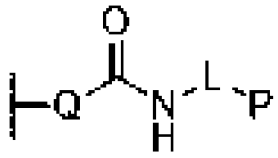
[00182] Термин «Q-*метка*», используемый в настоящем документе, относится к части полипептида, содержащей глутаминовый остаток, который при опосредованной трансглутаминазой реакции с соединением, содержащим -NH_2 амин, дает конъюгат, содержащий часть полипептида, где глутаминовый остаток включает боковую цепь, модифицированную для включения амида, связанного с соединением. Q-метки известны в данной области техники. Неограничивающими примерами Q-меток являются LLQGG (SEQ ID NO:172) и GGGLLQGG (SEQ ID NO:173). В некоторых вариантах осуществления, Q-метка присоединена к С-концу тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, Q-метка присоединена к легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, Q-метка встречается в природе. Например, мутация N297 в N297A обнажает Q295 антитела, где может произойти конъюгация (нумерация в соответствии с индексом EU, *например,* как перечислено в Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) and Kabat, E.A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication n° 91-3242, pp 662,680,689 (1991)). В некоторых вариантах осуществления, Q-метка находится в Fc домене антитела.

II. Конъюгаты

[00183] Иммуностимулирующие полинуклеотиды используются в различных терапевтических целях. Для улучшения специфичности таргетирования и распределения in vivo, иммуномодулирующие полинуклеотиды (*например,* CpG ODN) могут быть конъюгированы с таргетной группой (*например,* полипептидами). В частности, для

проведения такой реакции конъюгации можно использовать реакцию, опосредованную трансглутаминазой, благодаря высокой скорости реакции и подходящей специфичности сайта. В настоящем изобретении предложены конъюгаты олигонуклеотид-полипептид, проявляющие благоприятную активность. В некоторых вариантах осуществления, полипептид представляет собой антитело, такое как тяжелая или легкая цепь антитела.

[00184] В настоящем документе предложен конъюгат олигонуклеотид-антитело, в котором олигонуклеотид и антитело соединены друг с другом посредством связывающей группы. В некоторых вариантах осуществления, одно антитело может быть конъюгировано с одним или несколькими олигонуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат олигонуклеотид-антитело представляет собой конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащий, по меньшей мере, один глутаминовый остаток, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A):



(A),

или стереоизомер, смесь двух или более диастереомеров, таутомер или смесь двух или более их таутомеров; или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат;

где:

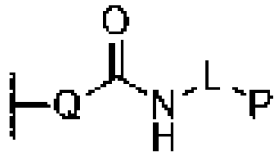
〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой пептидную последовательность Q-метки, содержащую, по меньшей мере, один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид.

[00185] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат представляет собой конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), которые содержат аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),



(A),

или стереоизомер, смесь двух или более диастереомеров, таутомер или смесь двух или более их таутомеров; или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат;

где:

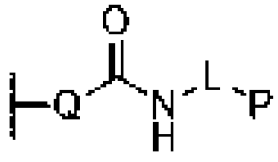
〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо содержит пептид Q-метки, содержащий пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид.

[00186] В других вариантах осуществления, конъюгат представляет собой конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими, по меньшей мере, один глутаминовый остаток, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),



(A),

или стереоизомер, смесь двух или более диастереомеров, таутомер или смесь двух или более их таутомеров; или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат;

где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой пептид Q-метки, содержащий, по меньшей мере, один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы*** **10.**

[00187] В одном варианте осуществления, конъюгат олигонуклеотид-антитело имеет DAR в диапазоне от примерно 1 до примерно 20, от примерно 1 до примерно 10, от

примерно 1 до примерно 8, от примерно 1 до примерно 4 или от примерно 1 до примерно 2. В другом варианте осуществления, конъюгат олигонуклеотид-антитело имеет DAR примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7 или примерно 8.

[00188] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более или двадцать или более пептидов Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или двадцать пептидов Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит 2 пептида Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более или двадцать или более иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или двадцать иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один иммуномодулирующий олигонуклеотид. Типовой конъюгат показан на **ФИГ. 16A-16D.**

[00189] В одном аспекте, олигонуклеотид в конъюгате олигонуклеотид-антитело представляет собой иммуномодулирующий (*например,* иммуностимулирующий) полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий полинуклеотид содержит 5-модифицированный уридин или 5-модифицированный цитидин. В некоторых вариантах осуществления, включение 5-модифицированного уридина (*например,* 5-этинилуридина) на 5'-конце иммуномодулирующего полинуклеотида (*например,* среди двух 5'-концевых нуклеозидов) усиливает иммуномодулирующие свойства полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий полинуклеотид короче (*например,* содержит всего от примерно 6 до примерно 16 нуклеотидов или от примерно 12 до примерно 14 нуклеотидов), чем типовой CpG ODN, длина которого составляет от 18 до 28 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, более короткий иммуномодулирующий полинуклеотид (*например,* содержащий всего от примерно 6 до примерно 16 нуклеотидов или от примерно 12 до примерно 14 нуклеотидов) сохраняет иммуномодулирующую активность более длинного типового CpG ODN; или демонстрирует более высокую иммуномодулирующую активность (*например,* измеренную по активации NFκB или по изменениям уровней экспрессии маркеров активации или функции клеточной поверхности, таких как CD40, HLADR, CD69 или CD80, или по изменениям уровней, по меньшей мере, одного цитокина (*например,* IL-6 или IL-10), по сравнению с более длинным CpG ODN. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий полинуклеотид содержит спейсер с удаленным азотистым основанием. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий полинуклеотид содержит

межнуклеозидный фосфотриэфир.

[00190] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий полинуклеотид, представленный в настоящем документе, демонстрирует стабильность (*например,* стабильность против нуклеаз), которая превосходит таковую у CpG ODN, содержащего в основном межнуклеозидный фосфат (*например,* более 50% межнуклеозидных фосфатов), без существенного ухудшения его иммуностимулирующей активности. Этот эффект может быть достигнут, *например,* путем включения, по меньшей мере, 50% (*например,* по меньшей мере, 70%) межнуклеозидных фосфоротиоатов или фосфородитиоатов, или путем включения межнуклеозидных фосфотриэфиров и/или межнуклеозидных спейсеров с удаленным азотистым основанием. Фосфотриэфиры и спейсеры с удаленным азотистым основанием также удобны для конъюгации с таргетирующей группой. Фосфотриэфиры на основе фосфатов и спейсеры с удаленным азотистым основанием также можно использовать для снижения активности вне мишени по сравнению с полинуклеотидами с полностью фосфоротиоатными остовами. Не желая быть связанными какой-либо теорией, этот эффект может быть достигнут за счет снижения самодоставки без нарушения таргетной доставки, опосредованной группой, в клетки-мишени. Соответственно, представленный в настоящем документе полинуклеотид может включать примерно 15 или меньше, примерно 14 или меньше, примерно 13 или меньше, примерно 12 или меньше, примерно 11 или меньше или примерно 10 или меньше смежных межнуклеозидных фосфоротиоатов. Например, иммуностимулирующий полинуклеотид, содержащий в общей сложности от примерно 12 до примерно 16 нуклеозидов, может содержать примерно 10 или меньше смежных межнуклеозидных фосфоротиоатов.

[00191] Предлагаемый в настоящем документе иммуностимулирующий полинуклеотид может содержать всего примерно 50 или менее, примерно 30 или менее, примерно 28 или менее или примерно 16 или менее нуклеозидов. Иммуностимулирующий полинуклеотид может содержать всего, по меньшей мере, 6, примерно 10 или более или примерно 12 или более нуклеозидов. Например, иммуностимулирующий полинуклеотид может содержать всего от примерно 6 до примерно 30, от примерно 6 до примерно 28, от примерно 6 до примерно 20, от примерно 6 до примерно 16, от примерно 10 до примерно 20, от примерно 10 до примерно 16, от примерно 12 до примерно 28, от примерно 12 до примерно 20 или от примерно 12 до примерно 16 нуклеозидов.

[00192] В некоторых вариантах осуществления, иммуностимулирующий полинуклеотид содержит один или несколько фосфотриэфиров (*например,* межнуклеозидные фосфотриэфиры) и/или тиофосфатов (*например,* от примерно 1 до примерно 6 или от примерно 1 до примерно 4), *например,* на одном или обоих концах (*например,* в пределах шести 5'-концевых нуклеозидов или шести 3'-концевых нуклеозидов). Включение одного или нескольких межнуклеозидных фосфотриэфиров и/или тиофосфатов может повышать стабильность полинуклеотида за счет снижения скорости опосредованной экзонуклеазой деградации.

[00193] В некоторых вариантах осуществления, иммуностимулирующий полинуклеотид содержит фосфотриэфир или концевой фосфодиэфир, где фосфотриэфир или концевой фосфодиэфир содержит линкер, связанный с таргетирующей группой или конъюгирующей группой и, необязательно, с одним или несколькими (*например,* от примерно 1 до примерно 6) вспомогательными группами. В некоторых вариантах осуществления, иммуностимулирующий полинуклеотид содержит только один линкер. В некоторых вариантах осуществления, иммуностимулирующий полинуклеотид содержит только одну конъюгирующую группу.

[00194] Представленный в настоящем документе полинуклеотид может представлять собой гибридизованный полинуклеотид, включающий цепь и ее частичный или полный комплемент. Гибридизованные полинуклеотиды могут иметь, по меньшей мере, 6 комплементарных пар оснований (*например,* примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 16, примерно 17, примерно 18, примерно 19, примерно 20, примерно 21, примерно 22 или примерно 23), вплоть до общего числа нуклеотидов, присутствующих во включенной более короткой цепи. Например, гибридизированная часть гибридизованного полинуклеотида может содержать примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 16, примерно 17, примерно 18, примерно 19, примерно 20, примерно 21, примерно 22 или примерно 23 пары оснований.

[00195] В одном аспекте, олигонуклеотид в конъюгате олигонуклеотид-антитело содержит один или несколько сайтов CpG. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, 1, по меньшей мере, 2 или по меньшей мере, 3 сайта CpG. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид представляет собой антисмысловой олигонуклеотид. Как используется в настоящем документе, «модифицированный нуклеотид» представляет собой нуклеотид, отличный от рибонуклеотида (2'-гидроксинуклеотид). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 65%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 75%, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, при по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% нуклеотидов являются модифицированными нуклеотидами. Используемые в настоящем документе термины модифицированные нуклеотиды включают, но не ограничены ими, дезоксирибонуклеотиды, имитаторы нуклеотидов, нуклеотиды с удаленным азотистым основанием, 2'-модифицированные нуклеотиды, нуклеотиды с 3'-3' связями (инвертированные), нуклеотиды, содержащие неприродные основания, мостиковые нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), миметики 2',3'секо нуклеотидов (аналоги не закрытых нуклеооснований), закрытые нуклеотиды, 3'-O-метокси (2'-межнуклеозидные связи) нуклеотиды, 2'-F-арабинонуклеотиды, 5'-Me, 2’-фторнуклеотид, морфолинонуклеотиды, винилфосфонатдезоксирибонуклеотиды,

винилфосфонатсодержащие нуклеотиды и циклопропилфосфонатсодержащие нуклеотиды (cPrpN). 2'-модифицированные нуклеотиды (*т.е.* нуклеотиды с группой, отличной от гидроксильной группы, в положении 2' пятичленного сахарного кольца) включают, но не ограничены ими, 2'O-алкилнуклеотиды, 2'-дезокси-2'-галогеннуклеотиды, 2'-дезоксинуклеотиды, 2'-метоксиэтил(2'-O-2-метоксиэтил)нуклеотиды, 2'-аминонуклеотиды, 2'аминоалкилнуклеотиды и 2'-алкилнуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 5-бром-2'-O-метилуридина, 5-бром-2'-дезоксиуридина, 2'-O-метилуридина, 2'-дезоксиуридина, 2'-O-метилтимидина, 2'-O-метилцитидина, 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидина и 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина. Нет необходимости, чтобы все положения в настоящем соединении были модифицированы одинаково. И наоборот, более чем одна модификация может быть включена в один олигонуклеотид или даже в один его нуклеотид. Олигонуклеотиды могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, известными в данной области техники. Модификация одного нуклеотида не зависит от модификации другого нуклеотида.

[00196] Модифицированные нуклеооснования включают синтетические и природные нуклеооснования, такие как 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины (*например,* 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил или 5-пропинилцитозин), 5-метилцитозин (5-Me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-алкильные (*например,* 6-метильные, 6-этильные, 6-изопропильные или 6-н-бутильные) производные аденина и гуанина, 2-алкильные (*например,* 2-метильные, 2-этильные, 2-изопропильные или 2-н-бутильные) и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 2-тиоцитозин, 5-галорацил (например, 5-бромурацил и 5-йодурацил), цитозин, 5-пропинилурацил, 5-пропинилцитозин, 6-азоурацил, 6-азоцитозин, 6-азотимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-сульфгидрил, 8-тиоалкил, 8-гидроксил, 8-оксо и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-гало (*например,* 5-бром и 5-йод), 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин, 7-деазааденин, 3-деазагуанин и 3-деазааденин.

[00197] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько нуклеотидов олигонуклеотида связаны нестандартными связями или остовами (*например,* модифицированными межнуклеозидными связями или модифицированными остовами). В некоторых вариантах осуществления, модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой не фосфатсодержащую ковалентную межнуклеозидную связь. Модифицированные межнуклеозидные связи или остовы включают, но не ограничены ими, 5'-фосфоротиоатные группы, хиральные фосфоротиоаты, тиофосфаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, алкилфосфонаты (*например,* метилфосфонаты или 3'-алкиленфосфонаты), хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты (*например,* 3'-аминофосфорамидат, аминоалкилфосфорамидаты или тионофосфорамидаты), тионоалкилфосфонаты,

тионоалкилфосфотриэфиры, морфолиновые связи, боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, 2'-5' связанные аналоги боранофосфатов, или боранофосфаты, имеющие инвертированную полярность, при которой соседние пары нуклеозидных звеньев связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. В некоторых вариантах осуществления, в модифицированной межнуклеозидной связи или остове отсутствует атом фосфора. Модифицированные межнуклеозидные связи, в которых отсутствует атом фосфора, включают, но не ограничены ими, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные межсахарные связи, смешанные гетероатомные и алкильные или циклоалкильные межсахарные связи или одну или несколько короткоцепочечных гетероатомных или гетероциклических межсахарных связей. В некоторых вариантах осуществления, модифицированные межнуклеозидные основные цепи включают, но не ограничены ими, силоксановые остовы, сульфидные остовы, сульфоксидные остовы, сульфоновые остовы, формацетильные и тиоформацетильные остовы, метиленовые формацетильные и тиоформацетильные остовы, алкенсодержащие остовы, сульфаматные остовы, метиленимино- и метиленгидразино остовы, сульфонатные и сульфонамидные остовы, амидные остовы и другие остовы, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH_2.

[00198] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит по меньшей мере, 2, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 7, по меньшей мере, 8, по меньшей мере, 9, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 11, по меньшей мере, 12, по меньшей мере, 13, по меньшей мере, 14 или, по меньшей мере, 15 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, 2, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 7, по меньшей мере, 8, по меньшей мере, 9, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 11, по меньшей мере, 12, по меньшей мере, 13, по меньшей мере, 14 или по меньшей мере, 15 фосфородитиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 тиофосфатных связей. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 фосфородитиоатных связей. В некоторых вариантах осуществления, фосфоротиоатные межнуклеозидные связи или фосфородитиоатные межнуклеозидные связи находятся между нуклеотидами в положениях 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 4-5, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, 18-20 или 19-21 от 5' конца олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов и одну или несколько модифицированных межнуклеозидных связей.

[00199] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит концевой кэп. В некоторых вариантах осуществления, концевой кэп находится на 3' конце олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, концевой кэп находится на 5' конце олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, концевой кэп находится на 5' конце и 3' конце олигонуклеотида. Термин «концевой кэп» также может называться

«кэп» и имеет значение, общепринятое в данной области техники. Например, термин относится к группе, которая может быть химически модифицированным нуклеотидом или не нуклеотидом, который может быть вставлен на одном или нескольких концах одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты по изобретению. Эти концевые модификации могут защитить молекулу нуклеиновой кислоты от деградации экзонуклеазой и могут способствовать доставке и/или локализации внутри клетки. В неограничивающих примерах, кэп включает, но не ограничен ими, полимер; лиганд; закрытую нуклеиновую кислоту (LNA); глицерил; остаток рибозы с удаленным азотистым основанием; инвертированный дезокси остаток с удаленным азотистым основанием; инвертированный нуклеотид; 4',5'-метиленовый нуклеотид; 1-(бета-D-эритрофуранозил)нуклеотид; 5'-меркаптогруппы; 4'-тионуклеотид; карбоциклический нуклеотид; 1,5-ангидрогекситовый нуклеотид; L-нуклеотиды; альфа-нуклеотиды; нуклеотид с модифицированным основанием; фосфородитиоатную связь; трео-пентофуранозильный нуклеотид; ациклический 3',4'-секонуклеотид; ациклический 3,4-дигидроксибутиловый нуклеотид; ациклический 3,5-дигидроксипентиловый нуклеотид; 3'-3'-инвертированный нуклеотид; 3'-3'-инвертированную группу с удаленным азотистым основанием; 3'-2'-инвертированный нуклеотид; 3'-2'-инвертированную группу с удаленным азотистым основанием; 1,4-бутандиолфосфат; 3'-фосфорамидат; гексилфосфат; аминогексилфосфат; 3'-фосфат; 3'-фосфотиоат; 5'-5'-инвертированную нуклеотидную группу; 5'-5'-инвертированную группу с удаленным азотистым основанием; 5'-фосфорамидат; 5'-фосфотиоат; 1,4-бутандиолфосфат; 5'-амино; мостиковый и/или не мостиковый 5'-фосфорамидат; фосфоротиоат и/или фосфородитиоат; или мостиковую или не мостиковую метилфосфонатную группу. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит одну или несколько концевых молекул кэпа. В некоторых вариантах осуществления, [N] представляет собой 3' концевой кэп. В некоторых вариантах осуществления, 3' концевой кэп представляет собой O-(3-гидроксипропил)фосфотиоат.

[00200] В некоторых вариантах осуществления, длина олигонуклеотида составляет примерно 10-30, примерно 10-15, примерно 15-20, примерно 20-25, примерно 25-30, примерно 15-25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет длину примерно 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов.

[00201] В другом аспекте, олигонуклеотид конъюгата представляет собой:



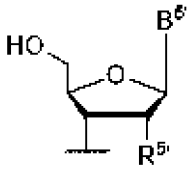
,

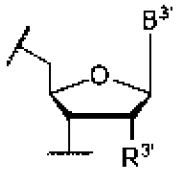
где

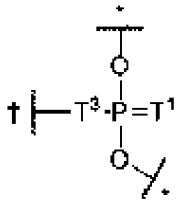
каждый b и c независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма b и c равна, по меньшей мере, 5;

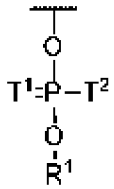
〰 * указывает место присоединения иммуномодулирующего олигонуклеотида P

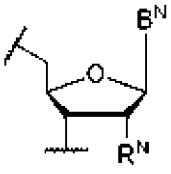
к остальной части конъюгата;

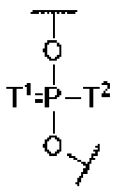
$X^{5'}$ представляет собой 5' концевой нуклеозид, имеющий структуру ;

$X^{3'}$ представляет собой 3' концевой нуклеозид, имеющий структуру ;

Y^{PTE} представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир, имеющий структуру , где * указывает на точки присоединения к остальной части олигонуклеотида, и 〰 † указывает на точку присоединения к линкеру L или, если L отсутствует, 〰 † указывает на точку присоединения к Q-метке Q пептида на глутаминовом остатке через амидную связь;

$Y^{3'}$ представляет собой концевой фосфотриэфир, имеющий структуру ;

каждый X^N независимо представляет собой нуклеозид, имеющий структуру ;

каждый Y^N независимо представляет собой межнуклеозидный линкер, имеющий структуру ;

где каждый B^N независимо представляет собой модифицированное или не модифицированное нуклеооснование;

каждый R^N независимо представляет собой -H или $-OC_{1-4}$-алкил, где C_{1-4}-алкил из $-O-C_{1-4}$-алкила необязательно дополнительно замещен $-O-C_{1-4}$-алкилом;

$B^{5'}$ и $B^{3'}$ независимо представляют собой модифицированное или не

модифицированное нуклеооснование;

$R^{5'}$ и $R^{3'}$ независимо представляют собой -H или -O-C_1-C_4-алкил, где C_{1-4}-алкил из -O-C_{1-4}-алкила необязательно дополнительно замещен -O-C_{1-4}-алкилом;

каждый T_1 независимо представляет собой O или S;

каждый T_2 независимо представляет собой O^- или S^-; и

T_3 представляет собой группу, включающую олигоэтиленгликолевую группу; и

R^1 представляет собой C_{1-4}-алкилен-гидрокси.

[00202] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит нуклеотид с модифицированным нуклеооснованием. В некоторых вариантах осуществления, $B^{5'}$ представляет собой модифицированное нуклеооснование. В других вариантах осуществления, $B^{3'}$ представляет собой модифицированное нуклеооснование. В некоторых вариантах осуществления, $B^{5'}$ представляет собой не модифицированное нуклеооснование. В других вариантах осуществления, $B^{3'}$ представляет собой не модифицированное нуклеооснование. В других вариантах осуществления, по меньшей мере, один B^N представляет собой модифицированное нуклеооснование.

[00203] В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число в диапазоне от примерно 1 до примерно 15. В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14 или примерно 15. В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число, равное примерно 3, примерно 4, примерно 11 или примерно 14. В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число примерно 3. В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число примерно 4. В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число примерно 11. В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число примерно 14.

[00204] В некоторых вариантах осуществления, c представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 10. В некоторых вариантах осуществления, c представляет собой целое число примерно 0, примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9 или примерно 10. В некоторых вариантах осуществления, c представляет собой целое число, равное примерно 0 или примерно 8. В некоторых вариантах осуществления, c представляет собой целое число примерно 0. В некоторых вариантах осуществления, c представляет собой целое число примерно 8.

[00205] В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число примерно 3, и c представляет собой целое число примерно 8. В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число примерно 4, и c представляет собой целое число примерно 8. В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число примерно 11, и c представляет собой целое число примерно 0. В некоторых вариантах осуществления, b представляет собой целое число примерно 14, и c

представляет собой целое число примерно 0.

[00206] В некоторых вариантах осуществления, b и c вместе в сумме составляют от примерно 5 до примерно 20. В некоторых вариантах осуществления, b и c вместе в сумме составляют от примерно 5 до примерно 15. В некоторых вариантах осуществления, b и c вместе в сумме составляют примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14 или примерно 15. В некоторых вариантах осуществления, b и c вместе в сумме составляют примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13 или примерно 14. В некоторых вариантах осуществления, b и c вместе в сумме составляют примерно 11. В некоторых вариантах осуществления, b и c вместе в сумме составляют примерно 12. В некоторых вариантах осуществления, b и c вместе составляют примерно 12. c вместе всего примерно 14.

[00207] В некоторых вариантах осуществления, каждый X^N независимо представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид или 2'-модифицированный рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, каждый X^N независимо представляет собой 2'-дезоксиаденозин (A), 2'-дезоксигуанозин (G), 2'-дезоксицитидин (C), 5-галоген-2'-дезоксицитидин, 2'-дезокситимидин (T), 2'-дезоксиуридин (U), 5-галоген-2'-дезоксиуридин, 2'-фторрибонуклеозид, 2'-метоксирибонуклеозид или 2'-(2-метоксиэтокси)рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, каждый X^N независимо представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, каждый X^N независимо представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксицитидин, 5-галоген-2'-дезоксицитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин или 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, каждый X^N независимо представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксицитидин, 2'-дезокситимидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-йод-2'-дезоксиуридин.

[00208] В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид или 2'-модифицированный рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксицитидин, 5-галоген-2'-дезоксицитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин, 5-галоген-2'-дезоксиуридин, 2'-фторрибонуклеозид, 2'-метоксирибонуклеозид или 2'-(2-метоксиэтокси)рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксицитидин, 5-галоген-2'-дезоксицитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин или 5-галоген-2 -дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-дезокситимидин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид с замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид с 5-замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-

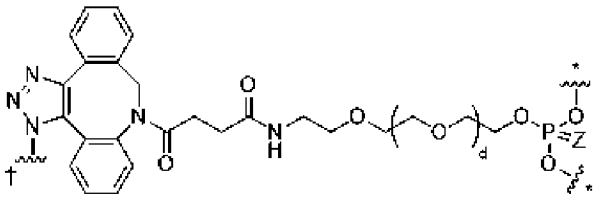
дезокситимидин, 5-галоген-2'-дезоксицитидин или 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-бром-2'-дезоксицитидин, 5-йод-2'-дезоксицитидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-йод-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-йод-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{3'}$ представляет собой концевой нуклеотид, содержащий 3' кэпирующую группу. В некоторых вариантах осуществления, 3' кэпирующая группа представляет собой концевой фосфоэфир. В некоторых вариантах осуществления, 3' кэпирующая группа представляет собой 3-гидроксипропилфосфорил (*т.е.* $-P(O_2)-OCH_2CH_2CH_2OH$).

[00209] В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид или 2'-модифицированный рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксицитидин, 5-галоген-2'-дезоксицитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин, 5-галоген-2'-дезоксиуридин, 2'-фторрибонуклеозид, 2'-метоксирибонуклеозид или 2'-(2-метоксиэтокси)рибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезоксиаденозин, 2'-дезоксигуанозин, 2'-дезоксицитидин, 5-галоген-2'-дезоксицитидин, 2'-дезокситимидин, 2'-дезоксиуридин или 5-галоген-2-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид с замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезоксирибонуклеозид с 5-замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-галоген-2'-дезоксицитидин или 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 5-галоген-2'-дезоксицитидин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезоксиуридин, 5-галоген-2'-дезоксиуридин, 2'-метоксиуридин или 5-галоген-2'-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых других вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 5-галоген-2'-метоксиуридин. В некоторых других вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2’-дезокситимидин, 5-бром-2’-дезоксицитидин, 5-йод-2’-дезоксицитидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-йод-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 2'-дезокситимидин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-йод-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 5-бром-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ представляет собой 5-йод-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ имеет 3'-фосфотиоатную группу. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ имеет 3'-фосфотиоатную группу с хиральностью Rp. В некоторых вариантах осуществления, $X^{5'}$ имеет 3'-фосфотиоатную

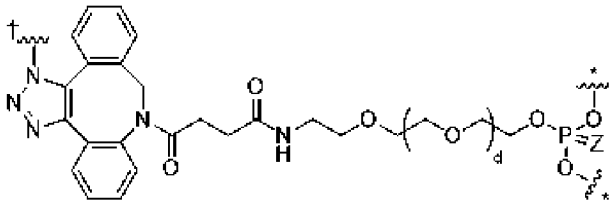
группу с хиральностью Sp.

[00210] В некоторых вариантах осуществления, Y^{PTE} представляет собой межнуклеозидный фосфотиотриэфир.

[00211] В некоторых вариантах осуществления, Y^{PTE} представляет собой

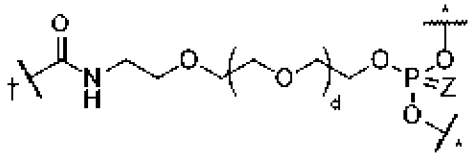


или



, где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от примерно 0 до примерно 50; две ~~~ * на правой стороне структуры указывают точки присоединения к олигонуклеотиду P; и ~~~ † на левой стороне структуры указывает на точку присоединения к остальной части конъюгата. В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления, d представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 10. В некоторых вариантах осуществления, d представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 5. В некоторых вариантах осуществления, d представляет собой целое число, равное примерно 0, примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4 или примерно 5. В некоторых вариантах осуществления, d представляет собой целое число, равное примерно 0, примерно 1 или примерно 3.

[00212] В некоторых вариантах осуществления, Y^{PTE} представляет собой



, где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от примерно 0 до примерно 50; две ~~~ * на правой стороне структуры указывают точки присоединения к олигонуклеотиду P; и ~~~ † на левой стороне структуры указывает точку присоединения к остальной части конъюгата. В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой S. В некоторых вариантах осуществления, d представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 10. В некоторых вариантах осуществления, d представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0

до примерно 5. В некоторых вариантах осуществления, В вариантах осуществления, d представляет собой целое число, равное примерно 0, примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4 или примерно 5. В некоторых вариантах осуществления, d представляет собой целое число, равное примерно 0, примерно 1 или примерно 3.

[00213] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит один дополнительный межнуклеозидный фосфотриэфир. В одном варианте осуществления дополнительный межнуклеозидный фосфотриэфир представляет собой C_{1-6} алкилфосфотриэфир. В другом варианте осуществления, дополнительный межнуклеозидный фосфотриэфир представляет собой этилфосфотриэфир.

[00214] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит один 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В одном варианте осуществления 5-галоген-2'-дезоксиуридин представляет собой 5-фтор-2'-дезоксиуридин, 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-йод-2'-дезоксиуридин. В другом варианте осуществления, 5-галоген-2'-дезоксиуридин представляет собой 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-йод-2'-дезоксиуридин. В еще одном варианте осуществления, 5-галоген-2'-дезоксиуридин представляет собой 5-фтор-2'-дезоксиуридин. В еще одном варианте осуществления, 5-галоген-2'-дезоксиуридин представляет собой 5-бром-2'-дезоксиуридин. В еще одном варианте осуществления, 5-галоген-2'-дезоксиуридин представляет собой 5-йод-2'-дезоксиуридин.

[00215] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит три или более 2'-дезоксицитидинов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит три 2'-дезоксицитидина.

[00216] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит четыре или более 2'-дезоксигуанозинов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит четыре 2'-дезоксигуанозина.

[00217] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит три 2'-дезоксицитидина и четыре 2'-дезоксигуанозина. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит один, два или три динуклеотида CG. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит три динуклеотида CG.

[00218] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит три или более 2'-дезокситимидинов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит три, четыре, пять, шесть, семь или восемь 2'-дезокситимидинов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит три, четыре, пять или восемь 2'-дезокситимидинов.

[00219] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид не содержит 2'-дезоксиаденозин. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит один или два 2'-дезоксиаденозина.

[00220] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет длину в диапазоне от примерно 5 до примерно 20 или от примерно 6 до примерно 15. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет длину примерно 6, примерно 7,

примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14 или примерно 15. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет длину примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14 или примерно 15.

[00221] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит один или несколько межнуклеозидных фосфоротиоатов. В некоторых вариантах осуществления, все межнуклеозидные фосфоэфиры в олигонуклеотиде представляют собой межнуклеозидные фосфоротиоаты. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит один или несколько хиральных межнуклеозидных фосфоротиоатов.

[00222] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотиды, содержащие последовательность $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO:174), или стереоизомер, смесь двух или нескольких диастереомеров, таутомер или смесь двух или нескольких их таутомеров; или их фармацевтически приемлемая соль, сольват или гидрат, являются такими как описано, например, в WO 2018/189382 A1.

[00223] В одном варианте осуществления олигонуклеотид содержит последовательность $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO:174) или стереоизомер, смесь двух или более диастереомеров, таутомер или смесь двух или более их таутомеров; или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или гидрат; где:

x представляет собой целое число в диапазоне от примерно 1 до примерно 4;

N^1 отсутствует или представляет собой 2'-дезокситимидин;

N^2 представляет собой 2'-дезоксирибонуклеотид с модифицированным нуклеооснованием;

N^3 представляет собой 2'-дезоксиаденозин или 2'-дезокситимидин, каждый из которых необязательно содержит 3'-фосфотриэфир;

N^4 представляет собой 2'-дезоксиаденозин или 2'-дезокситимидин;

N^5 представляет собой 2'-дезокситимидин, необязательно содержащий 3'-фосфотриэфир; и

C представляет собой 2'-дезоксицитидин, и G представляет собой 2'-дезоксигуанозин.

[00224] В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174), x представляет собой целое число, равное примерно 1, примерно 2, примерно 3 или примерно 4. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO:174), x представляет собой целое число, равное примерно 1. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174), x представляет собой целое число, равное примерно 4.

[00225] В некоторых вариантах осуществления, $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^1 отсутствует. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174), N^1 представляет собой 2'-дезокситимидин.

[00226] В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$

(SEQ ID NO: 174), N^2 представляет собой 2'-дезоксирибонуклеотид с замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^2 представляет собой 2'-дезоксирибонуклеотид с 5-замещенным пиримидиновым основанием. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^2 представляет собой 5-галоген-2'-дезоксицитидин или 5-галоген-2'-дезоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^2 представляет собой 5-бром-2'-дезоксиуридин или 5-йодо-2'-дезоксиуридин.

[00227] В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^3 представляет собой 2'-дезоксиаденозин, содержащий 3'-фосфотриэфир. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^3 представляет собой 2'-дезокситимидин. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^3 представляет собой 2'-дезокситимидин, содержащий 3'-фосфотриэфир.

[00228] В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^4 представляет собой 2'-дезоксиаденозин. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^4 представляет собой 2'-дезокситимидин.

[00229] В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^5 представляет собой 2'-дезокситимидин. В некоторых вариантах осуществления, в $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) N^5 представляет собой 2'-дезокситимидин, содержащий 3'-фосфотриэфир.

[00230] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO:174) содержит один или несколько межнуклеозидных фосфоротиоатов или фосфоротиоатов. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO:174) содержит, по меньшей мере, один хиральный межнуклеозидный фосфоротиоат или фосфоротиоат. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO:174) содержит, по меньшей мере, один хиральный фосфордитиоат. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид $N^1N^2CGN^3CG(T)_xGN^4CGN^5T$ (SEQ ID NO: 174) представляет собой олигонуклеотидную последовательность, как описано, например, в WO 2018/189382 A1.

[00231] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, представляет собой иммуностимулирующий полинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, действует как PAMS. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, активирует врожденный иммунный ответ или стимулирует адаптивный иммунный ответ путем запуска передачи сигнала TLR9. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, представляет собой агонист TLR9.

[00232] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, представляет собой олигонуклеотид CpG, включающий модификацию, включающую 5-галоуридин или 5-алкинилуридин, или их усеченную версию (например, содержащую всего от примерно 6 до примерно 16 нуклеозидов). В некоторых вариантах осуществления, усеченный олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит усеченную олигонуклеотидную последовательность, из которой удалены один или несколько 3'-концевых нуклеотидов или вырезаны один или несколько нуклеотидов внутри последовательности).

[00233] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит, по меньшей мере, одну иммуностимулирующую последовательность (ISS). В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит примерно 1, примерно 2, примерно 3 или примерно 4 ISS. ISS в иммуностимулирующих полинуклеотидах зависит от организма-мишени. Общим признаком ISS, используемого в предложенном в настоящем документе олигонуклеотиде, является последовательность цитидин-п-гуанозин, где р представляет собой межнуклеозидный фосфодиэфир (например, фосфат или тиофосфат) или межнуклеозидный фосфотриэфир. В некоторых вариантах осуществления, каждый из цитидина и гуанозина в ISS независимо содержит 2'-дезоксирибозу. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит примерно 1, примерно 2 или примерно 3 ISS человека. В некоторых вариантах осуществления, ISS человека представляет собой CG или NCG, где N представляет собой уридин, цитидин или тимидин, или модифицированный уридин или цитидин; и G представляет собой гуанозин или модифицированный гуанозин. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный уридин или цитидин представляет собой 5-галогенуридин (например, 5-йодоуридин или 5-бромуридин), 5-алкинилуридин (например, 5-этинилуридин или 5-пропинилуридин), 5-гетероарилуридин или 5-галогенцитидин. В некоторых вариантах осуществления, модифицированный гуанозин представляет собой 7-деазагуанозин. В некоторых вариантах осуществления, ISS человека представляет собой NCG, в одном варианте осуществления, N представляет собой 5-галогенуридин. В некоторых вариантах осуществления, ISS человека представляет собой UCG, в одном варианте осуществления, U представляет собой 5-алкинилуридин, и в другом варианте осуществления, U представляет собой 5-этинилуридин. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, таргетирующий человека, содержит ISS в пределах четырех смежных нуклеотидов, которые включают 5'-концевой нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, таргетирующий человека, содержит 5'-концевой ISS. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит ISS мыши. В некоторых вариантах осуществления, ISS мыши представляет собой гексамерную нуклеотидную последовательность: Pu-Pu-CG-Py-Py, где каждый Pu независимо представляет собой

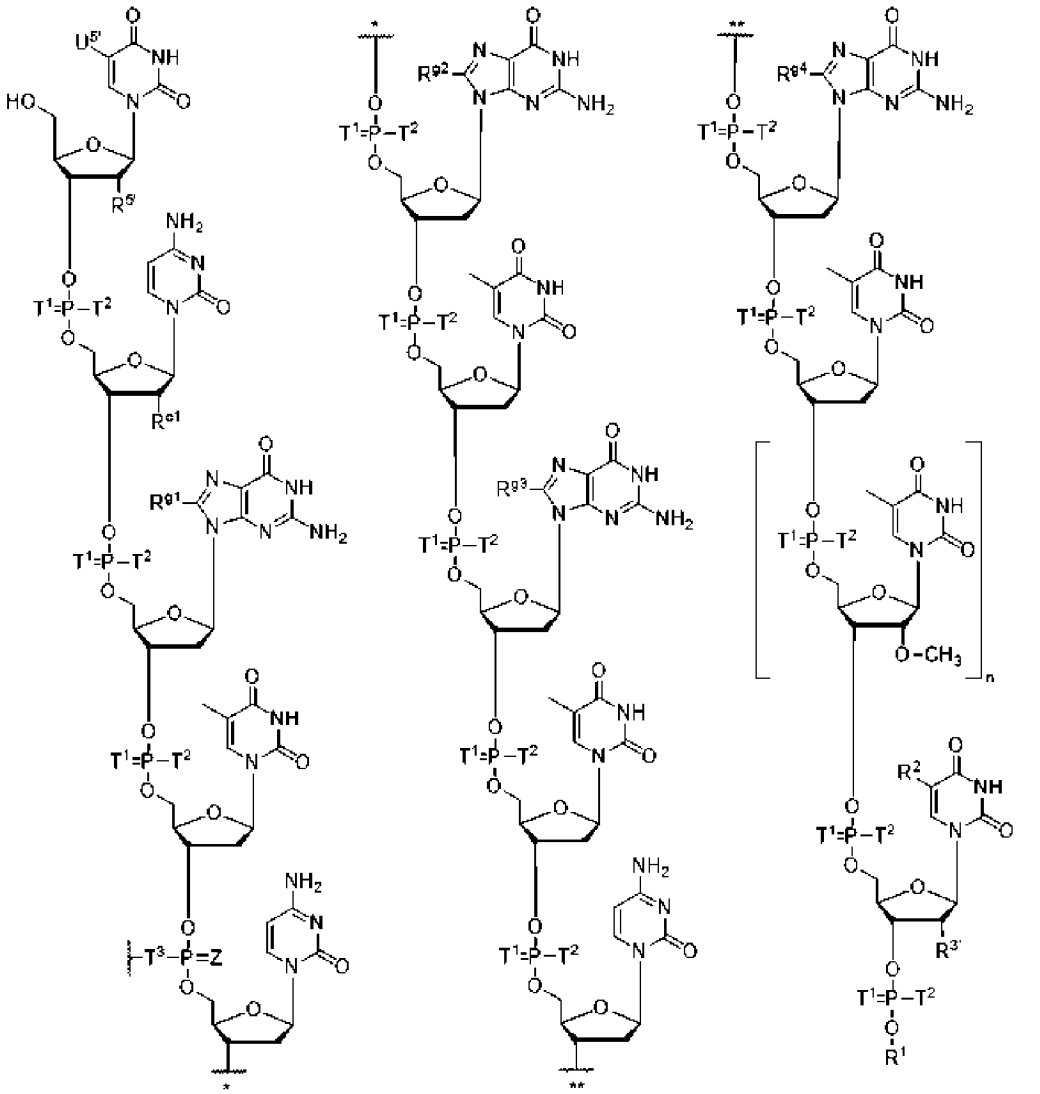
пуриновый нуклеотид, и каждый Py независимо представляет собой пиримидиновый нуклеотид.

[00234] В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующие нуклеотиды относительно CpG в олигонуклеотиде, представленном в настоящем документе, не содержат 2'-алкоксирибозу. В некоторых вариантах осуществления, 5'-фланкирующие нуклеотиды относительно CpG в олигонуклеотиде, представленном в настоящем документе, содержат только 2'-дезоксирибозу в качестве сахаров.

[00235] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид по настоящему изобретению имеет (1) высокое содержание фосфоротиоатов или фосфородитиоатов (например, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70% или по меньшей мере, 80% нуклеозидов могут быть связаны фосфоротиоатами или фосфородитиоатами); (2) отсутствие поли-G хвостов; (3) нуклеозиды в олигонуклеотиде включают 2'-дезоксирибозы или 2'-модифицированные рибозы (*например,* 2'-галоген (например, 2'-фтор, 2'-бром или 2'-йод) или необязательно замещенные 2'-алкокси (*например,* 2'-метокси)); и/или (4) включение 5'-концевого ISS, который представляет собой NCG, где N представляет собой уридин, цитидин или тимидин, или модифицированный уридин, или цитидин, и G представляет собой гуанозин или модифицированный гуанозин.

[00236] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид, предложенный в настоящем документе, подавляет адаптивный иммунный ответ за счет снижения активации передачи сигналов TLR9 (например, посредством антагонизма TLR9). В некоторых вариантах осуществления, иммуносупрессорный полинуклеотид, предложенный в настоящем документе, содержит, по меньшей мере, два 2'-алкоксинуклеотида, которые являются 5'-фланкирующими по отношению к CpG, как описано формулой N^1-N^2-CG, где каждый из N^1 и N^2 независимо представляет собой нуклеотид, содержащий 2'-алкоксирибозу (например, 2'-метоксирибозу).

[00237] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет структуру

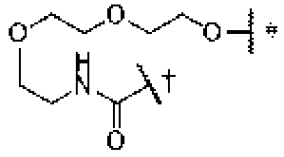


где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой O^- или S^-;

T^3 представляет собой группу  , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H или оксо, где

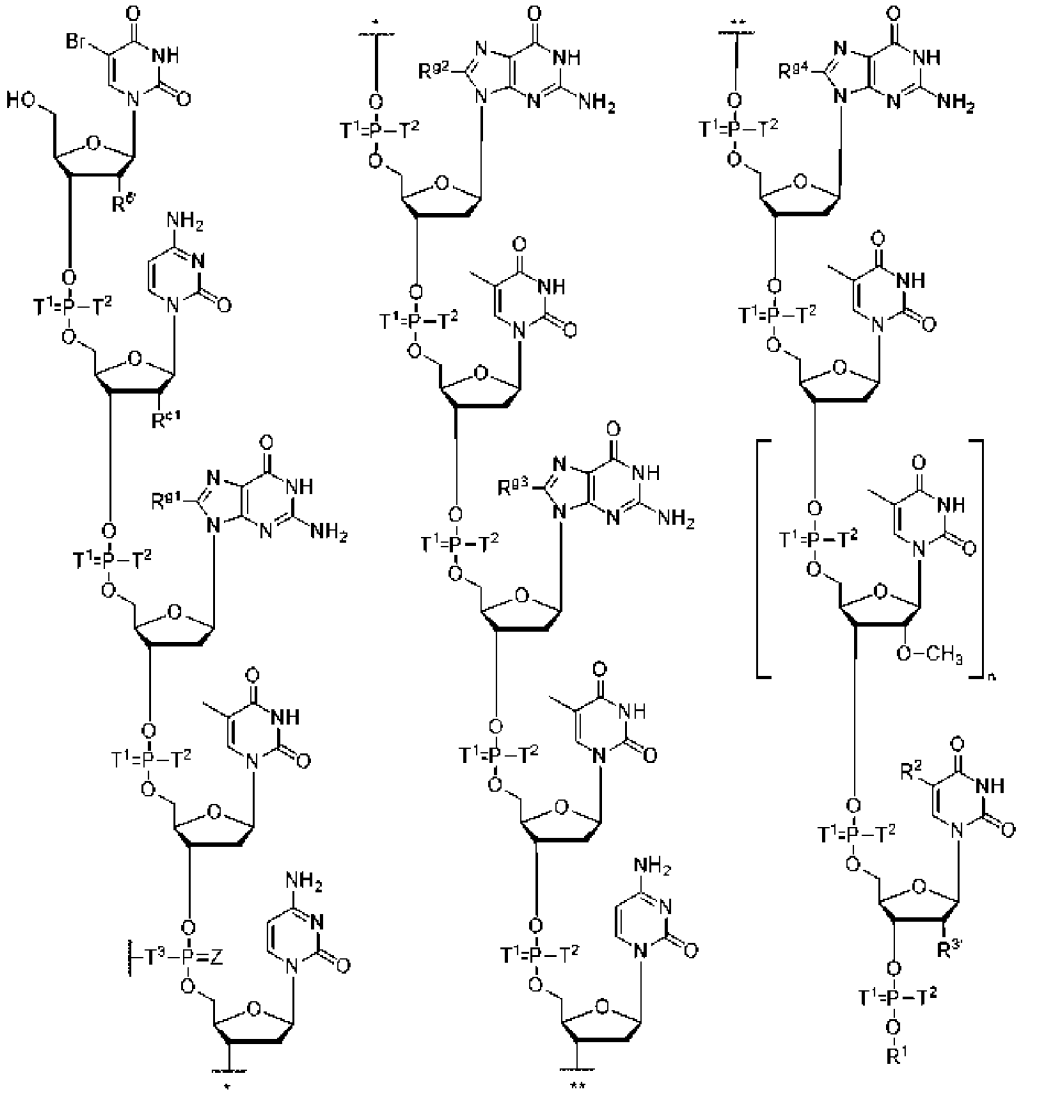
$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой C_{1-4}-алкилен-гидрокси;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[00238] В других вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет структуру



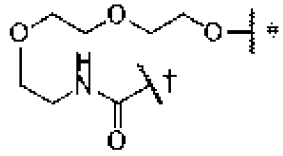
,

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой O^- или S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H или оксо, где

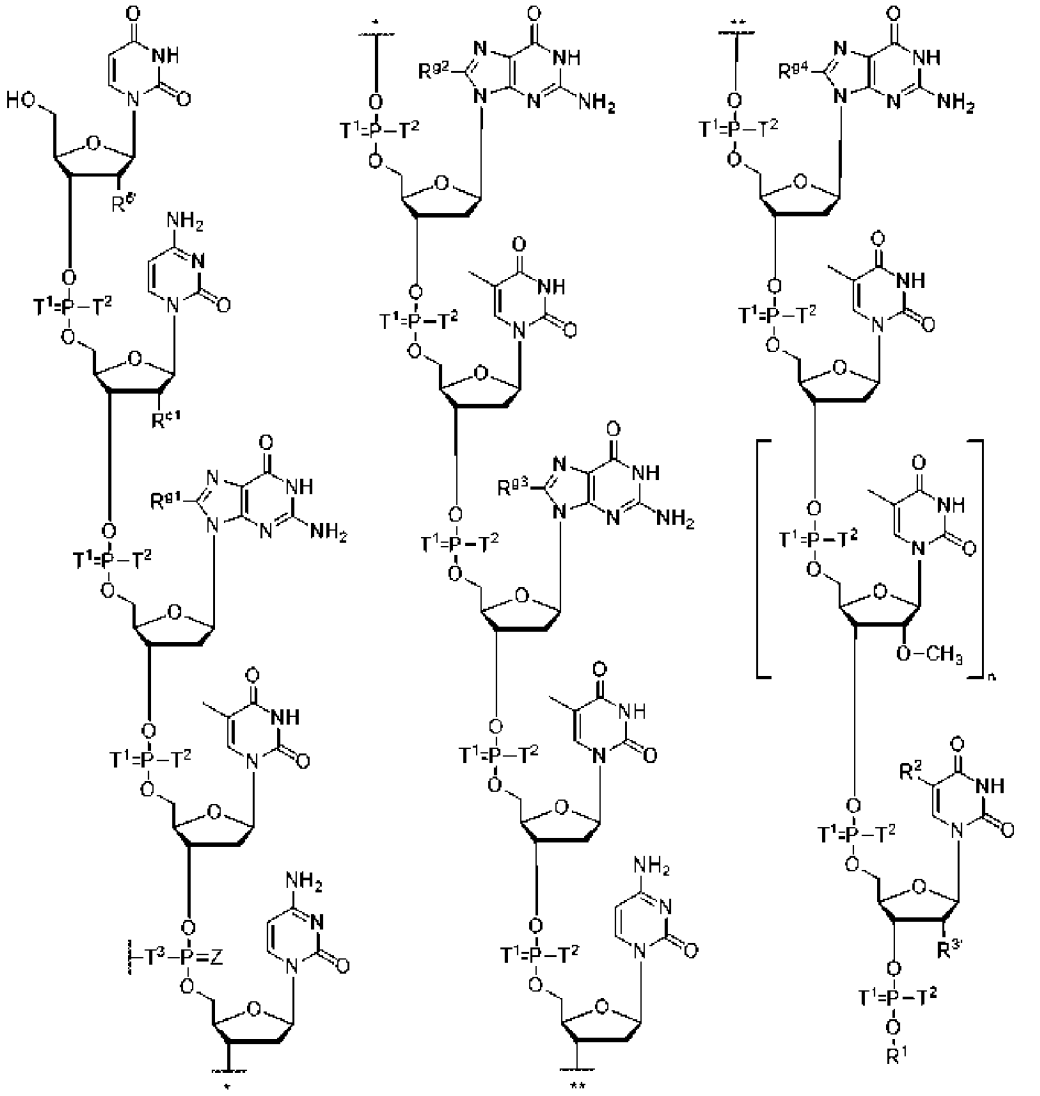
$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой C_{1-4}-алкилен-гидрокси;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[00239] В других вариантах осуществления, олигонуклеотид имеет структуру



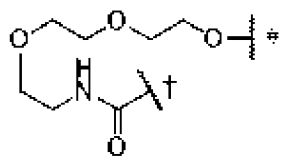
,

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой O^- или S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части

олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H или оксо, где

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^{1} представляет собой C_{1-4}-алкилен-гидрокси;

R^{2} представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

[00240] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит одну или несколько не модифицированных последовательностей, отличающихся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательностей, показанных в ***таблице* 1.** В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит одну или несколько модифицированных последовательностей, отличающихся на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида от последовательностей, показанных в ***таблице* 2.**

Таблица 1. Не модифицированные олигонуклеотиды

SEQ ID NO.	**Не модифицированная последовательность олигонуклеотидов** (5' → 3')
1	tucgtcgtgacgtt
2	ucgtcgtgtcgtt
129	tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt

Таблица 2. Модифицированные олигонуклеотиды

SEQ ID NO.	**Модифицированная последовательность олигонуклеотидов** (5' → 3')	**Соединение №**
3	**u**scsgstscsgstsgstscsgstsT-c3	1.1b
4	**u**scs**g**stscsgstsgstscsgstst-c3	2.1b
5	**u**scsgstscs**g**stsgstscsgstst-c3	2.2b
6	**u**scsgstscsgsts**g**stscsgstst-c3	2.3b
7	**u**scsgstscsgstsgstscs**g**stst-c3	2.4b
8	**u**scsgstscsgstsgstscsgstst-c3	3.1b
9	**u**scsgstscsgstsgstscsgststst-c3	3.2b
10	**u**scsgstscsgstsgstscsgststststst-c3	3.3b
11	**u**scsgstscsgstsgstscsgstst-c3	4.1b
12	**u**scsgstscsgstsgstscsgststst-c3	4.2b
13	**usc**sgstscsgstsgstscsgststst-c3	4.3b

14	**u**scs2gs**t**scsgstsgstscsgstst-c3	5.1a
15	**u**scsgs2**t**scsgstsgstscsgstst-c3	5.2a
16	**u**scsgs**t**scs2gstsgstscsgstst-c3	5.3a
17	**u**scsgs**t**scsgs2tsgstscsgstst-c3	5.4a
18	**u**scsgs**t**scsgsts2gstscsgstst-c3	5.5a
19	**u**scsgs**t**scsgstsgs2tscsgstst-c3	5.6a
20	**u**scsgs**t**scsgstsgsts2csgstst-c3	5.7a
21	**u**scsgs**t**scsgstsgstscs2gstst-c3	5.8a
22	**u**scsgs**t**scsgstsgstscsgs2tst-c3	5.9a
23	**u**scsgs**t**scsgstsgstscsgsts2**t**-c3	5.10a
24	**u**scsgs**t**scsgstsgstscsgsts**u**s2-c3	5.11a
25	**u**scs2gs**t**scsgstsgstscsgsts**u**s2-c3	5.12a
26	**usc**sgs2tscsgstsgstscsgststst-c3	6.1b
27	**usc**sgstscsgstsgsts2csgststst-c3	6.2b
28	**usc**sgs2tscsgstsgsts2csgststst-c3	6.3b
29	**u**scs2gstscsgstsgstscsgststst-c3	7.1b
30	**u**scsgstscsgstsgs2tscsgststst-c3	7.2b
31	**u**scs2gstscsgstsgs2tscsgststst-c3	7.3b
32	**u**scsgstscs2gstsgstscsgststst-c3	7.4b
33	**u**scsgstscsgs2tsgstscsgststst-c3	7.5b
34	**u**scsgstscsgsts2gstscsgststst-c3	7.6b
35	**u**scsgstscsgstsgsts2csgststst-c3	7.7b
36	**u**scs2gstscsgstsgsts2csgststst-c3	7.8b
37	**u**scsgs2tscsgstsgstscsgststst-c3	7.9b
38	**u**scsgstscsgstsgstscs2gststst-c3	7.10b
130	uscsgstscsgstsgstscsgsts**T**-c3	8.1b
131	uscs**g**stscsgstsgstscsgstst-c3	9.1b
132	uscsgstscs**g**stsgstscsgstst-c3	9.2b
133	uscsgstscsgsts**g**stscsgstst-c3	9.3b
134	uscsgstscsgstsgstscsgstst-c3	9.4b
135	uscsgstscsgstsgstscsgstst-c3	10.1b
136	uscsgstscsgstsgstscsgststst-c3	10.2b
137	uscsgstscsgstsgstscsgststststst-c3	10.3b
138	**u**scsgstscsgstsgstscsgstst-c3	12.1b

139	**u**scsgstscsgstsgstscsgststst-c3	12.2b
140	**usc**sgstscsgstsgstscsgststst-c3	12.3b
141	uscs2gs**t**scsgstsgstscsgstst-c3	13.1a
142	uscsgs2**t**scsgstsgstscsgstst-c3	13.2a
143	uscsgs**t**scs2gstsgstscsgstst-c3	13.3a
144	uscsgs**t**scsgs2tsgstscsgstst-c3	13.4a
145	uscsgs**t**scsgsts2gstscsgstst-c3	13.5a
146	uscsgs**t**scsgstsgs2tscsgstst-c3	13.6a
147	uscsgs**t**scsgstsgsts2csgstst-c3	13.7a
148	uscsgs**t**scsgstsgstscs2gstst-c3	13.8a
149	uscsgs**t**scsgstsgstscsgs2tst-c3	13.9a
150	uscsgs**t**scsgstsgstscsgsts2**t**-c3	13.10a
151	uscsgs**t**scsgstsgstscsgsts**u**s2-c3	13.11a
152	uscs2gs**t**scsgstsgstscsgsts**u**s2-c3	13.12a
153	**u**scsgs2tscsgstsgstscsgststst-c3	14.1b
154	**u**scsgstscsgstsgsts2csgststst-c3	14.2b
155	**u**scsgs2tscsgstsgsts2csgststst-c3	14.3b
156	uscs2gstscsgstsgstscsgststst-c3	15.1b
157	uscsgstscsgstsgs2tscsgststst-c3	15.2b
158	uscs2gstscsgstsgs2tscsgststst-c3	15.3b
159	uscsgstscs2gstsgstscsgststst-c3	15.4b
160	uscsgstscsgs2tsgstscsgststst-c3	15,5b
161	uscsgstscsgsts2gstscsgststst-c3	15.6b
162	uscsgs**t**scsgstsgsts2csgststst-c3	15.7a
163	uscsgstscsgstsgsts2csgststst-c3	15.7b
164	uscs2gstscsgstsgsts2csgststst-c3	15.8b
165	uscsgs2tscsgstsgstscsgststst-c3	15.9b
166	uscsgstscsgstsgstscs2gststst-c3	15.10b

*__u__: 5-бром-2'-дезоксиуридин

__g__: 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин

u: 5-бром 2'-OMe уридин

c: 2'-OMe-Цитидин

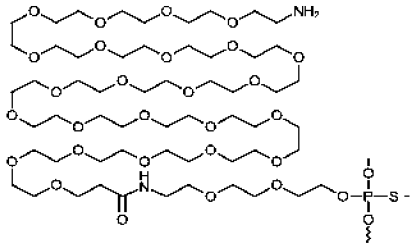
t: 2'-OMe-тимидин

__u__: 2'-OMe-уридин

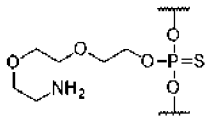
u: 2'-дезоксиуридин

T: 2'-OMOE тимидин

ts: фосфотриэфирный линкер-PEG_{24}-NH_2



после тимидина;

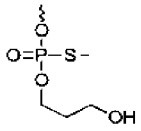


ts: фосфотриэфирный линкер после тимидина;

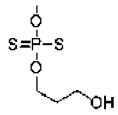
Нижний регистр: 2'-дезоксинуклеотид

s: фосфоротиоатная связь

s2: фосфородитиоатная связь



c3:

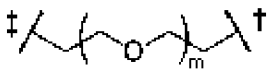


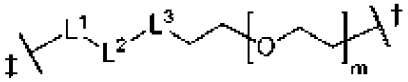
s2-c3:

[00241] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид функционализирован химической меткой для присоединения к связывающей группе. В некоторых вариантах осуществления, химическая метка присоединена к межнуклеозидной связи олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, химическая метка присоединена к 5' межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах осуществления, химическая метка присоединена к 3' межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах осуществления, межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления, межнуклеозидная связь представляет собой фосфородитиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления, химическая метка расположена ближе к 5' концу, чем к 3' концу олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, химическая метка присоединена к нуклеооснованию.

Связывающие группы

[00242] В другом аспекте, олигонуклеотид конъюгирован с полипептидом посредством связывающей группы. Длина, жесткость и химическая композиция связывающей группы влияют на скорость реакции конъюгации и стабильность полученных конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления, связывающая группа содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых вариантах осуществления, ПЭГ содержит примерно 10-50 единиц этиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления, связывающая группа представляет собой алифатическую цепь.

[00243] В формуле (A) связывающая группа представлена L. В некоторых вариантах осуществления, линкер L содержит олигоэтиленгликоль или полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления, линкер L представляет собой группу, имеющую структуру , где † указывает точку присоединения к Y^{PTE}, и ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

[00244] В других вариантах осуществления, линкер L представляет собой группу, имеющую структуру , где † указывает на точку присоединения к Y^{PTE}, и ‡ указывает на точку присоединения к остальной части конъюгата. В некоторых вариантах осуществления, L^1 отсутствует. В некоторых вариантах осуществления, L^1 представляет собой незамещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления, L^1 независимо представляет собой незамещенный C_{1-6} алкил. В некоторых вариантах осуществления, каждый L^1 представляет собой метил или этил. В некоторых вариантах осуществления, L^1 независимо представляет собой замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления, L^1 независимо представляет собой замещенный C_{1-6} алкил. В некоторых вариантах осуществления, L^1 представляет собой C_{1-6} алкил, замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкокси, ацила, ацилокси, алкоксикарбонила, карбонилалкокси, ациламино, амино, аминоацила, аминокарбониламино, аминокарбонилокси, циклоалкила, циклоалкенила, циано, азидо, галогена, гидроксила, нитро, карбоксила, тиола, тиоалкила, алкила, алкенила, алкинила, гетероциклила, аминосульфонила, сульфониламино, сульфонила и оксо.

[00245] В некоторых вариантах осуществления, L^2 отсутствует. В некоторых вариантах осуществления, L^2 представляет собой незамещенный или замещенный алкил.

[00246] В некоторых вариантах осуществления, L^3 отсутствует. В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой линкерную группу. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа представляет собой незамещенный или замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа независимо представляет собой незамещенный C_{1-6} алкил. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа представляет собой метил или этил. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа независимо представляет собой замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа независимо представляет собой замещенный C_{1-6} алкил. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа представляет собой C_{1-6} алкил, замещенный одним или несколькими заместителями,

выбранными из группы, состоящей из алкокси, ацила, ацилокси, алкоксикарбонила, карбонилалкокси, ациламино, амино, аминоацила, аминокарбониламино, аминокарбонилокси, циклоалкила, циклоалкенила, циано, азидо, галогена, гидроксила, нитро, карбоксила, тиола, тиоалкила, алкила, алкенила, алкинила, гетероциклила, аминосульфонила, сульфониламино, сульфонила и оксо. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа представляет собой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления, аминокислота выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, глутаминовой кислоты и пролина. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа представляет собой $-R^5C(O)R^6NHR^7-$, где R^5 и R^7 независимо отсутствуют или представляют собой незамещенный или замещенный алкил, и R^6 представляет собой аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления, аминокислота выбрана из группы, состоящей из глицина, аланина, глутаминовой кислоты и пролина. В некоторых вариантах осуществления, линкерная группа представляет собой $-R^3C(O)NHR^4-$, где R^3 и R^4 независимо отсутствуют или представляют собой незамещенный или замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления, R^3 представляет собой метилен, и R^4 представляет собой $-(CH_2)_4-$. В некоторых вариантах осуществления, R^3 представляет собой метилен, и R^4 отсутствует. При более одном олигонуклеотиде (*т.е.* p=2), два L^1 могут быть разными или одинаковыми, два L^2 могут быть разными или одинаковыми и два L^3 могут быть разными или одинаковыми.

[00247] В некоторых вариантах осуществления, m составляет примерно 3-10, примерно 10-15, примерно 15-20, примерно 20-25, примерно 25-30, примерно 5-16, примерно 15-30, примерно 15-25 или примерно 20-30. В некоторых вариантах осуществления, m равно 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

Белок

[00248] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид по настоящему изобретению конъюгирован с полипептидом или белком, *например,* антителом. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид конъюгирован с антителом через одну или несколько Q-меток. В некоторых вариантах осуществления, Q-метка содержит глутаминовый остаток, который связан с остальной частью конъюгата. В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, каждая Q-метка независимо содержит или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55. В некоторых вариантах осуществления, каждая Q-метка независимо содержит или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из пептидных последовательностей из ***таблицы* 3.** В других вариантах осуществления настоящего аспекта, каждая Q-метка независимо содержит или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-55. В других вариантах осуществления, каждая Q-метка независимо содержит или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 47-49. В некоторых вариантах осуществления, Q-метка содержит LLQGG (SEQ ID NO:172), GGGLLQGG (SEQ ID NO:173), RPQGF (SEQ ID NO:47) или RPQGFGPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления, Q-метка содержит пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47). В некоторых вариантах осуществления, Q-метка, содержащая пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), выбрана из группы, состоящей из RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48) и RPQGFGPP (SEQ ID NO:49).

[00249] В некоторых вариантах осуществления, белок представляет собой белковый фрагмент, пептид или Fc слитый белок. В некоторых вариантах осуществления, белок представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из поликлонального антитела, моноклонального антитела, гуманизированного антитела, антитела человека, химерного антитела и фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, scFv, однодоменного антитела, антитела с одной тяжелой цепью и антитела с одной легкой цепью. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой анти-IgG антитело человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой анти-IgG1, анти-IgG2 или анти-IgG4 антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой анти-CD22 антитело (*например,* RFB4, EPRA, 10F4, m971). В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH). В некоторых вариантах осуществления, VH содержит последовательность SEQ ID NO: 56, и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления, VH содержит последовательность SEQ ID NO: 58, и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления, VH содержит последовательность SEQ ID NO: 60, и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления, VH содержит последовательность SEQ ID NO: 62, и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 63.

[00250] В некоторых вариантах осуществления, указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена, выбранной из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG GGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64),

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAY WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) и

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPPGKGLEWIAYISSGGG TTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO: 67).

[00251] В некоторых вариантах осуществления, указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG GGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64),

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAY WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) и

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPPGKGLEWIAYISSGGG TTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO: 67).

[00252] В других вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен содержит CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 последовательности из последовательности домена VL, выбранной из группы, состоящей из:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 68),

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 69),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 70),

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWYQQKPGQAPRLLIYYTSILHS GIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 71) и

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWYQQKPGQSPQLLIYYTSILHS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 72).

[00253] В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с

любым из предыдущих вариантов осуществления, антитело содержит Fc область. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, выбранную из группы, состоящей из Fc области IgG1, Fc области IgG2 и Fc области IgG4. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область IgG1, IgG2 или IgG4 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают или устраняют одну или несколько эффекторных функций по сравнению с эффекторной(ыми) функцией(ями) Fc области человека, где отсутствует аминокислотная(ые) замена(ы). В других дополнительных вариантах осуществления, Fc область представляет собой: (a) Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; (b) Fc область IgG2 человека, содержащая замены A330S и/или P331S, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или (c) Fc область IgG4 человека, содержащую замены S228P и/или L235E, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают или устраняют связывание с C1q человека по сравнению со связыванием Fc области человека, где отсутствуют аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления, Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают или устраняют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) по сравнению с ADCC Fc области человека, где отсутствует аминокислотная(ые) замена(ы).

[00254] Антитела, таргетирующие антигены клеточной поверхности, могут запускать иммуностимулирующие и эффекторные функции, которые связаны с вовлеченем Fc рецептора (FcR) на иммунных клетках. Существует ряд Fc рецепторов, специфичных для определенных классов антител, включая IgG (гамма рецепторы), IgE (эта рецепторы), IgA (альфа рецепторы) и IgM (мю рецепторы). Связывание Fc области с Fc рецепторами на клеточной поверхности может запускать ряд биологических реакций, включая фагоцитоз частиц, покрытых антителами (антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз, или ADCP), клиренс иммунных комплексов, лизис клеток, покрытых антителами, киллерами (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, или ADCC) и высвобождение медиаторов воспаления, перенос через плаценту и контроль продуцирования иммуноглобулинов. Дополнительно, связывание компонента C1 комплемента с антителами может активировать систему комплемента. Активация комплемента может быть важна для лизиса клеточных патогенов. Однако активация комплемента может также стимулировать воспалительную реакцию и также может быть связана с аутоиммунной гиперчувствительностью или другими иммунологическими нарушениями. Варианты Fc областей со сниженной или устраненной способностью связывать определенные Fc рецепторы пригодны для разработки

терапевтических антител и полипептидных конструкций, слитых с Fc, которые действуют путем таргетирования, активации или нейтрализации функций лиганда, не повреждая и не разрушая локальные клетки или ткани.

[00255] В некоторых вариантах осуществления, Fc домен может относиться к димеру двух мономеров Fc домена. В Fc домене дикого типа два мономера Fc домена димеризуются за счет взаимодействия между двумя константными доменами CH3 антитела, а также одной или несколькими дисульфидными связями, которые образуются между шарнирными доменами двух мономеров димеризованного Fc домена. В некоторых вариантах осуществления, Fc домен мутирован с отсутствием эффекторных функций, например, «мертвый Fc домен». В некоторых вариантах осуществления, каждый из мономеров Fc домена в Fc домене включает аминокислотные замены в константном домене CH2антитела для уменьшения взаимодействия или связывания между Fc доменом и Fc рецептором, таким как Fcγ рецептор (FcγR), Fcα рецептор (FcαR) или Fcε (FcεR).

[00256] Fc домен не участвует непосредственно в связывании антитела с его мишенью, но может участвовать в различных эффекторных функциях, таких как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности. В некоторых вариантах осуществления, Fc домен в антителе или конъюгате по настоящему изобретению содержит одну или несколько аминокислотных замен, добавлений или вставок, делеций или любых их комбинаций, которые приводят к снижению эффекторной функции, такой как снижение антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), снижение комплемент-зависимого цитолиза (CDC), снижение антителозависимого клеточно-опосредованного фагоцитоза (ADCP) или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты по настоящему изобретению характеризуются пониженным связыванием (например, минимальным связыванием или отсутствием связывания) с Fc рецептором человека и пониженным связыванием (например, минимальным связыванием или отсутствием связывания) с комплементарным белком C1q. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты по настоящему изобретению характеризуются сниженным связыванием (например, минимальным связыванием или отсутствием связывания) с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIB, FcγRIIIB или любыми их комбинациями и C1q человека. Для изменения или снижения антителозависимой эффекторной функции, такой как ADCC, CDC, ADCP или любые их комбинации, в некоторых вариантах осуществления, Fc домены в антителах или конъюгатах по настоящему изобретению относятся к классу IgG и содержат одну или несколько аминокислотных замен в E233, L234, L235, G236, G237, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 или P329 (нумерация в соответствии с индексом EU Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

[00257] В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты, содержащие не нативную Fc область, описанную в настоящем документе, демонстрируют сниженное или исчезнувшее связывание, по меньшей мере, с одним из Fcγ рецепторов

CD16a, CD32a, CD32b, CD32c и CD64 по сравнению с полипептидной конструкцией, содержащей нативный Fc участок. В некоторых случаях, антитела или конъюгаты, описанные в настоящем документе, демонстрируют пониженное или аблированное связывание с рецепторами CD16a, CD32a, CD32b, CD32c и CD64 Fcγ.

[00258] CDC относится к форме цитотоксичности, при которой каскад комплемента активируется компонентом комплемента C1q, связывающимся с Fc антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты, содержащие не нативную Fc область, описанную в настоящем документе, демонстрируют, по меньшей мере, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или большее снижение связывания C1q по сравнению с антителом или конъюгатом, содержащим Fc область дикого типа. В некоторых случаях, антитела или конъюгаты, содержащие не нативную Fc область, как описано в настоящем документе, демонстрируют пониженную CDC по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты, содержащие не нативную Fc область, как описано в настоящем документе, демонстрируют, по меньшей мере, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или большее снижение CDC по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа. В некоторых случаях, антитела или конъюгаты, содержащие не природный вариант Fc, как описано в настоящем документе, демонстрируют незначительную CDC по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа.

[00259] В некоторых вариантах осуществления, варианты Fc в настоящем документе являются минимально гликозилированными или имеют пониженное гликозилирование по сравнению с последовательностью дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, дегликозилирование достигается путем мутации N297A или путем мутации N297 в любую аминокислоту, не являющуюся N. В некоторых вариантах осуществления, дегликозилирование достигается путем разрушения мотива N-Xaa1-Xaa2-Xaa3 (SEQ ID NO:175), где N=аспарагин; Xaa1=любая аминокислота, кроме P (пролина); Xaa2=T (треонин), S (серин) или C (цистеин); и Xaa3=любая аминокислота, кроме P (пролина). В одном варианте осуществления, мотив N-Xaa1-Xaa2-Xaa3 (SEQ ID NO: 175) относится к остаткам 297-300, как указано в Kabat et al., 1991. В некоторых вариантах осуществления, мутация любого одного или нескольких из N, Xaa1, Xaa2 или Xaa3 приводит к дегликозилированию Fc варианта.

[00260] В некоторых вариантах осуществления, варианты константных областей IgG антитела (например, варианты Fc) обладают пониженной способностью специфически связываться с рецепторами Fcγ или обладают пониженной способностью индуцировать фагоцитоз. В некоторых вариантах осуществления, варианты константных областей IgG антитела (например, варианты Fc) обладают пониженной способностью специфически связываться с рецепторами Fcγ и обладают пониженной способностью индуцировать фагоцитоз. Например, в некоторых вариантах осуществления, Fc домен мутирован и лишен эффекторных функций, что типично для «мертвого» Fc домена.

Например, в некоторых вариантах осуществления, Fc домен включает специфические аминокислотные замены, которые, как известно, минимизируют взаимодействие между Fc доменом и рецептором Fcγ. В некоторых вариантах осуществления, мономер Fc домена происходит от антитела IgG1 и включает одну или несколько аминокислотных замен L234A, L235A, G237A и N297A (как указано в соответствии с системой нумерации EU согласно Kabat et al., 1991). В некоторых вариантах осуществления, в такой вариант Fc IgG1 включены одна или несколько дополнительных мутаций. Неограничивающие примеры таких дополнительных мутаций для вариантов Fc IgG1 человека включают E318A и K322A. В некоторых случаях, вариант Fc IgG1 человека имеет всего до 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 или меньше мутаций по сравнению с последовательностью IgG1 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, в такой вариант Fc IgG1 включены одна или несколько дополнительных делеций. Например, в некоторых вариантах осуществления, С-концевой лизин константной области тяжелой цепи Fc IgG1 удален, например, для повышения гомогенности полипептида, когда полипептид продуцируется в бактериальных клетках или клетках млекопитающих. В некоторых случаях вариант Fc IgG1 человека имеет всего до 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 или меньше делеций по сравнению с последовательностью IgG1 человека дикого типа.

[00261] В некоторых вариантах осуществления, мономер Fc домена происходит от антитела IgG2 или IgG4 и включает аминокислотные замены A330S, P331S или как A330S, так и P331S. Вышеупомянутые положения аминокислот определены согласно Kabat, et al. (1991). Нумерацию аминокислотных остатков по Kabat можно определить для данного антитела путем выравнивания участков гомологии последовательности антитела со «стандартной» нумерованной последовательностью по Kabat. В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc содержит последовательность Fc IgG2 человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен A330S, P331S и N297A (обозначенных в соответствии с системой нумерации EU согласно Kabat, et al. (1991). В некоторых вариантах осуществления, один или более дополнительных мутаций включены в такие варианты Fc IgG2. Неограничивающие примеры таких дополнительных мутаций для варианта Fc IgG2 человека включают V234A, G237A, P238S, V309L и H268A (обозначенные в соответствии с системой нумерации EU согласно Kabat et al. (1991)) В некоторых случаях вариант Fc IgG2 человека имеет всего до 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или меньше мутаций по сравнению с последовательностью IgG2 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, в такой вариант Fc IgG2 включены одна или несколько дополнительных делеций. Например, в некоторых вариантах осуществления, С-концевой лизин константной области тяжелой цепи Fc IgG2 делетирован, например, для повышения гомогенности полипептида, когда полипептид продуцируется в бактериальной клетке или клетке млекопитающих. В некоторых случаях, вариант Fc IgG2 человека имеет всего до 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 или меньше делеций по сравнению с последовательностью IgG2 человека дикого типа.

[00262] Когда вариант Fc представляет собой вариант Fc IgG4, в некоторых

вариантах осуществления, такой вариант Fc содержит мутацию S228P (как определено по Kabat, et al. (1991)), *например,* как представлено в SEQ ID NO:104 в **таблице 7.** В некоторых случаях, вариант Fc IgG4 человека имеет всего до 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию по сравнению с последовательностью IgG4 человека дикого типа.

[00263] В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc включает, по меньшей мере, одну из мутаций L234A, L235A, G237A или N297A Fc области IgG1 или, по меньшей мере, одну из мутаций A330S, P331S или N297A Fc области IgG2. В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc включает, по меньшей мере, две мутации L234A, L235A, G237A или N297A Fc области IgG1 или, по меньшей мере, две мутации A330S, P331S или N297A Fc области IgG2. В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc включает, по меньшей мере, три мутации L234A, L235A, G237A или N297A Fc области IgG1 или состоит из мутаций A330S, P331S и N297A Fc области IgG2. В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc состоит из мутаций L234A, L235A, G237A и N297A.

[00264] В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc демонстрирует пониженное связывание с Fc рецептором субъекта по сравнению с Fc областью IgG человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc демонстрирует удаленное связывание с Fc рецептором субъекта по сравнению с Fc областью IgG человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc демонстрирует снижение фагоцитоза по сравнению с Fc областью IgG человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc демонстрирует аблированный фагоцитоз по сравнению с Fc областью IgG человека дикого типа.

[00265] Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, которая также упоминается в настоящем документе как ADCC, относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается с Fc рецепторами (FcR), присутствующими на некоторых цитотоксических клетках (например, естественных киллерах (NK) и нейтрофилах), позволяя этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с клеткой-мишенью, несущей антиген, и впоследствии уничтожать клетку-мишень. Антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз, который также упоминается в настоящем документе как ADCP, относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается с Fc рецепторами (FcR), присутствующими на определенных фагоцитирующих клетках (например, макрофагах), что позволяет этим фагоцитарным эффекторным клеткам специфически связываться с клеткой-мишенью, несущей антиген, и затем захватывать и переваривать клетку-мишень. Лиганд-специфические высокоаффинные антитела IgG, направленные на поверхность клеток-мишеней, могут стимулировать цитотоксические или фагоцитирующие клетки и могут быть использованы для такого уничтожения. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты, содержащие вариант Fc, как описано в настоящем документе, демонстрируют пониженную ADCC или ADCP по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты, содержащие вариант Fc, как описано

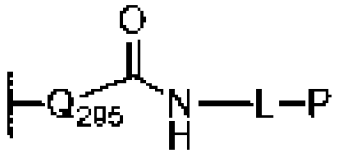
в настоящем документе, демонстрируют, по меньшей мере, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или большее снижение ADCC или ADCP по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты, содержащие вариант Fc, как описано в настоящем документе, проявляют аблированную ADCC или ADCP по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа.

[00266] Комплемент-направленная цитотоксичность, которая также упоминается в настоящем документе как CDC, относится к форме цитотоксичности, при которой каскад комплемента активируется за счет связывания компонента комплемента C1q с Fc антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты, содержащие вариант Fc, как описано в настоящем документе, демонстрируют, по меньшей мере, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или большее снижение связывания C1q по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа. В некоторых случаях, антитела или конъюгаты, содержащие вариант Fc, как описано в настоящем документе, демонстрируют сниженную CDC по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты, содержащие вариант Fc, как описано в настоящем документе, демонстрируют, по меньшей мере, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или большее снижение CDC по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа. В некоторых случаях, антитела или конъюгаты, содержащие вариант Fc, как описано в настоящем документе, демонстрируют незначительную CDC по сравнению с антителами или конъюгатами, содержащими Fc область дикого типа.

[00267] Варианты Fc в настоящем документе включают те, которые демонстрируют пониженное связывание с рецептором Fcγ по сравнению с Fc областью IgG человека дикого типа. Например, в некоторых вариантах осуществления, вариант Fc демонстрирует связывание с рецептором Fcγ, которое меньше, чем связывание, проявляемое Fc областью IgG человека дикого типа с рецептором Fcγ, как описано в примерах. В некоторых случаях, вариант Fc снижает связывание с рецептором Fcγ на коэффициент 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (полностью удалена эффекторная функция). В некоторых вариантах осуществления, сниженное связывание относится к любому одному или нескольким рецепторам Fcγ, например, CD16a, CD32a, CD32b, CD32c или CD64.

[00268] В некоторых случаях, описанные в настоящем документе варианты Fc демонстрируют снижение фагоцитоза по сравнению с Fc областью IgG человека дикого типа. Такие варианты Fc демонстрируют снижение фагоцитоза по сравнению с Fc областью IgG человека дикого типа, где снижение активности фагоцитоза составляет, например, коэффициент 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%. 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых случаях, вариант Fc демонстрирует абляционный фагоцитоз по сравнению с Fc областью IgG человека дикого типа.

[00269] В некоторых вариантах осуществления, Q-метка по настоящему изобретению присоединена к антителу, полипептиду, малой молекуле (*например,* низкомолекулярному агонисту или антагонисту), натуральному продукту, молекуле ДНК, молекуле РНК (*например,* РНК, миРНК, антисмысловому олигонуклеотиду, CRISPR направляющей РНК и т. д.), другой нуклеиновой кислоте, комплексу CRISPR или углеводу.

[00270] В некоторых вариантах осуществления, Q-метка присоединена к тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, Q-метка присоединена к тяжелой цепи антитела через линкер (*например,* аминокислоту или другой химический линкер). В некоторых вариантах осуществления, Q-метка присоединена к тяжелой цепи антитела (*например,* слита в рамке с тяжелой цепью). В некоторых вариантах осуществления, Q-метка присоединена к С-концу тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, Q-метка слита с С-концом тяжелой цепи антитела (*например,* в рамке считывания и смежно с аминокислотной последовательностью С-конца). В некоторых вариантах осуществления, Q-метка находится в домене Fc антитела. В некоторых вариантах осуществления, тег Q встречается в природе. Например, мутация N297 в N297A обнажает Q295 антитела, где может произойти конъюгация. В некоторых вариантах осуществления, где Fc область содержит замену N297A, конъюгат дополнительно содержит иммуномодулирующий олигонуклеотид P, присоединенный к остатку Q295, как показано в следующей формуле 

, где L представляет собой линкерную группу, соединенную с Q295 посредством амидной связи.

[00271] В некоторых вариантах осуществления, Q-метка содержит одну или несколько последовательностей, показанных в ***таблице* 3.**

Таблица 3. Последовательности пептидов Q-метки

SEQ ID NO.	Пептидные последовательности
39	LSLSPGLL**Q**GG-OH
40	WPA**Q**GPT
41	WP**Q**GPT
42	WAP**Q**GPT
43	WA**Q**GPT
44	TPG**Q**APW
45	PNP**Q**LPF
46	RP**Q**QF

47	RP**Q**GF
48	RP**Q**GFPP
49	RP**Q**GFGPP
50	RPRP**Q**QF
51	LS**Q**SKVLG
52	WGG**Q**LL
53	WAL**Q**RPHYSYPD
54	WAL**Q**RPYTLTES
55	WAL**Q**GPYTLTES

[00272] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат, предложенный в настоящем документе, предназначен для таргетирования специфической клетки и ткани-мишени в организме для таргетной доставки конъюгированной полезной нагрузки полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, предложенным в настоящем документе, представляет собой естественный киллер. В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, представленным в настоящем документе, представляет собой миелоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, представленным в настоящем документе, представляет собой В-клетку или Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, представленным в настоящем документе, представляет собой нейтрофил. В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, представленным в настоящем документе, представляет собой моноцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, представленным в настоящем документе, представляет собой макрофаг. В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, представленным в настоящем документе, представляет собой дендритную клетку (DC). В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, представленным в настоящем документе, представляет собой тучную клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, представленным в настоящем документе, представляет собой опухолеассоциированный макрофаг (TAM). В некоторых вариантах осуществления, клетка, таргетируемая конъюгатом, представленным в настоящем документе, представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения (MDSC).

[00273] В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению могут быть доставлены в виде чистого конъюгата белок-лекарственное средство или в виде конъюгата белок-лекарственное средство, составленного с носителем и доставленного, *например,* в виде инкапсулированного или в виде части наноносителя, наночастицы, липосомы, полимерной везикулы или оболочки вируса. В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему

изобретению могут быть доставлены внутриклеточно, *например,* путем конъюгации с доменом трансдукции белка или миметиком. В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению могут быть доставлены с помощью электропорации или микроинъекции.

[00274] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат по настоящему изобретению таргетирует более одной популяции или типа клеток, *например,* из описанных *выше.* В некоторых вариантах осуществления, конъюгат по настоящему изобретению таргетирует как В-клетки, так и моноциты. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат по настоящему изобретению таргетирует как В-клетки, так и моноциты и/или DC. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат по настоящему изобретению таргетирует как NK, так и DC.

[00275] В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающая группа в конъюгате, предложенном в настоящем документе, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (*например,* $F(ab)_2$ или Fab) или его сконструированное производное (*например,* Fcab или слитый белок (*например,* scFv)). В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающая группа в конъюгате, предложенном в настоящем документе, представляет собой человеческое или химерное (*например,* гуманизированное) антитело.

[00276] В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты таргетирует один или несколько типов нормальных клеток, выбранных из Т-клеток, В-клеток, естественных киллеров, нейтрофилов, тучных клеток, макрофагов, антигенпрезентирующих клеток (APC), базофилов и эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты таргетируют нормальные APC. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты таргетируют один или несколько типов нормальных APC, выбранных из В-клеток, моноцитов, дендритных клеток, клеток Лангерганса, кератиноцитов, эндотелиальных клеток, астроцитов, фибробластов и олигодендроцитов. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты таргетируют нормальную В-клетку. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты таргетируют нормальную дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты таргетируют нормальные макрофаги. В некоторых вариантах осуществления, антитела или конъюгаты, таргетирующие один или несколько типов нормальных клеток, не таргетируют аномальную клетку, такую как раковая клетка.

[00277] В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему описанию может содержать мультиспецифическое (*например,* биспецифическое) антитело. Например, в некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему описанию представляет собой биспецифическое антитело, содержащее 2 антигенсвязывающих домена, которые связывают разные мишени, экспрессированные на В-клетках. В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему описанию представляет собой биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт,

который связывает мишень, экспрессируемую на В-клетке, и антигенсвязывающий сайт, который связывает мишень, экспрессируемую на другой клетке (*например,* моноците). В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему описанию представляет собой биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт, который связывает мишень, экспрессируемую на иммунной клетке, и антигенсвязывающий сайт, который связывает мишень, экспрессируемую на поверхности раковой клетки.

[00278] В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с антигеном, экспрессируемым В-клеткой. Типовые антигены, экспрессируемые В-клетками, которые могут быть таргетированы конъюгатами, предложенными в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, B220/CD45R, B7-1/CD80, B7-2/CD86, BCMA/TNFRSF17, BLIMP1/PRDM1, C1q R1/CD93, CD117/c-kit, CD11b/интегрин альфа M, CD19, CD1c/BDCA-1, CD1d, CD20, CD21, CD23/Fc эпсилон RII, CD24, CD25/IL-2 R альфа, CD27/TNFRSF7, CD34, CD37, CD38, CD40/TNFRSF5, CD43, CD5, CD69, CD72, CD83, CXCR4, CXCR5, DEP-1/CD148, EMMPRIN/CD147, FCRL3/FcRH3, Flt-3/Flk-2, HLA-DR, IgM, IL-10, IL-12 R бета 2, IL-12/IL-35 p35, IL-21, IL-21 R, IL-27 R альфа/WSX-1/TCCR, IL-27/IL-35 EBI3 субъединицу, IL-3 R альфа/CD123, IL-4 R альфа, IL-6 рецептор, IL-7 R альфа/CD127, IRF4, MHC класса II (I-A/I-E), Неприлизин/CD10, Pax5/BSAP, Sca-1/Ly6, Siglec-2/CD22, STAT1, STAT3, Синдекан-1/CD138, TACI/TNFRSF13B, TGF-бета, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TLR4. В конкретных вариантах осуществления, В-клеточные специфические антигены выбраны из CD1, CD2, CD5, CD9, CD11, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21/CD35, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27, CD30, CD38, CD40, CD45R/B220, CD69, CD70, CD78, CD79a (Igα), CD79b (Igβ), CD80, CD86, CD93 (C1Rqp), CD137/4-1BB, CD138, CD180, CD252/OX40L, CD267, CD268/BAFF-R, CD279/PD1, CD319, PDL-2, Pax-5, IgD, IgM, Notch 2 и TLR4.

[00279] В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с антигеном, экспрессируемым Т-клеткой (*например,* на поверхности Т-клетки). Примеры антигенов, экспрессируемых Т-клетками, которые могут быть таргетированы конъюгатами, предложенными в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, Т-клеточные костимулирующие молекулы, OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1/CD11a/CD18, ICOS/CD278, 4-1BB/CD137, GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, CD83, BLIMP1/PRDNM1, SIRPγ, TNFR2, B7-H4, A2AR, STING и TIGIT.

[00280] В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с антигеном, экспрессируемым дендритной клеткой. Примеры антигенов, экспрессируемых дендритной клеткой, которые могут быть таргетированы конъюгатами, предложенными в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, B220/CD45R, BATF3, BST-2/Тетерин, CD11b/Интегрин альфа M, CD11c, CD14, CD163, CD19, CD1c/BDCA-1, CD1d1, CD20, CD3, CD4, CD8, CLEC9a, CX3CR1, DC-SIGN/CD209, DEC-205/CD205, DLEC/CLEC4C/BDCA-2, E-Кадгерин, EpCAM/TROP1, F4/80, Fc эпсилон RI альфа, Fc гамма RI/CD64, Fc гамма RIA/CD64, Fc гамма RIB/CD64, Fc гамма RIII (CD16), Fc гамма

RIIIA/CD16a, Fc гамма RIIIB/CD16b, FLT3, GFI-1, HLA-DR, IFN-альфа, IFN-бета, IFN-гамма, IGSF4A/SynCAM1, A2AR, Ikaros, IL-1 бета/IL-1F2, IL-10, IL-12, IL-2, IL-23, IL-3 R альфа/CD123, IL-6, iNOS, Интегрин альфа E/CD103, IRF4, IRF8, Лангерин/CD207, Ly-6G (Gr-1), Ly-6G/Ly-6C (Gr-1), MHC класса II (I-A/I-E), MMR/CD206, NCAM-1/CD56, Нейропилин-1, NFIL3/E4BP4, оксид азота, PU.1/Spi-1, SIRP альфа/CD172a, Spi-B, Тромбомодулин/BDCA-3, TLR7, TLR9, TNF-альфа, TREM2 и XCR1. В конкретных вариантах осуществления, антигены, специфичные для дендритных клеток, выбраны из CD1a, CD1b/c, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD40, CD45R/B220, CD49d, CD80, CD83, CD85a, CD85f, CD85g/ILT7, CD85i, CD85j, CD86, CD123, CD180, CD197/CCR7, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD273/B7-DC/PD-L2, CD303/BDCA-2, CD304/neuropilin-1, DC маркер/33D1, F4/80, MHC класса I, фасцин, HLA-DR, STING и Siglec H. В конкретных вариантах осуществления, антигены, специфичные для дендритных клеток, представляют собой плазмоцитоидные антигены дендритных клеток, выбранные из CD1a, CD1b, CD1c, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD40, CD45R/B220, CD49d, CD80, CD83, CD85g/ILT7, CD86, CD123, CD197 (CCR7), CD273 (B7-DC, PD-L2), CD303 (BDCA-2), CD304 (Нейропилин-1), DC маркер (33D1), F4/80, HLA-DR, MHC класса II и Siglec H.

[00281] В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с антигеном, экспрессируемым макрофагом. Типовые антигены, экспрессируемые макрофагом, которые могут быть таргетированы конъюгатами, предложенными в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, активин A, AIF-1/Iba1, аргиназу 1/ARG1, A2AR, B7-1/CD80, B7-2/CD86, Кальцитонин R, CCL1/I-309/TCA-3, CCL11/Эотаксин, CCL14/HCC-1/HCC-3, CCL15/MIP-1 дельта, CCL16/HCC-4, CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL19 /MIP-3 бета, CCL2/JE/MCP-1, CCL20/MIP-3 альфа, CCL22/MDC, CCL23/Ck бета 8-1, CCL23/MPIF-1, CCL24/Эотаксин-2/MPIF-2, CCL26/Эотаксин-3, CCL3/CCL4, CCL3/MIP-1 альфа, CCL4/MIP-1 бета, CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CCR2, CCR5, CD11b/интегрин альфа M, CD11c, CD15/Lewis X, CD163, CD200 R1, CD200R1L, CD36/SR-B3, CD43, CD45, CD68/SR-D1, CLEC10A/CD301, COX-2, CX3CL1/Фракталкин, CX3CR1, CXCL1/GRO альфа/KC/CINC-1, CXCL10/IP-10/CRG-2, CXCL11/I-TAC, CXCL13/BLC/BCA-1, CXCL16, CXCL2/GRO бета/MIP-2/CINC-3, CXCL3/GRO гамма/CINC-2/DCIP-1, CXCL5/ENA-70, CXCL5/ENA-74, CXCL5/ENA-78, CXCL9/MIG, CXCR1/IL-8 RA, CXCR2/IL-8 RB, DC-SIGN/CD209, DEC-205/CD205, Дектин-1/CLEC7A, Дектин-2/CLEC6A, EMR1, F4/80, Fc эпсилон RI альфа, Fc гамма RI/CD64, Fc гамма RIA/CD64, Fc гамма RIB/CD64, Fc гамма RII/CD32, Fc гамма RIII (CD16), FIZZ1/RELM альфа, Галектин-3, GATA-6, G-CSF, GITR лиганд/TNFSF18, GM-CSF, HLA-DR, ID2, IFN-гамма, IFN-гамма R1/CD119, IL-1 бета/IL-1F2, IL-1 RII, IL-10, IL-15, IL-17/IL-17A, IL-18/IL-1F4, IL-1ra/IL-1F3, IL-23, IL-4 P альфа, IL-6, IL-8/CXCL8, iNOS, Интегрин альфа L/CD11a, IRF4, IRF5, LAMP-2/CD107b, Лангерин/CD207, LILRB4/CD85k/ILT3, L-селектин/CD62L, LXR альфа/NR1H3, Ly-6G (Gr-1), Ly-6G /Ly-6C (Gr-1), MARCO, M-CSF R/CD115, Mer, MERTK, MFG-E8, MHC класса II (IA/IE), MMR/CD206, NFATC1, NGFI-B альфа/Nur77/NR4A1, PPAR дельта/NR1C2, PPAR гамма/NR1C3, RANK/TNFRSF11A,

RUNX3/CBFA3, Siglec-1/CD169, Siglec-3/CD33, Siglec-F, SIGNR1/CD209b, SIRP альфа/CD172a, SLAM/CD150, SOCS-3, сфингозинкиназу 1/SPHK1, сфингозинкиназу 2/SPHK2, SR-AI/MSR, SR-BI, STAT1, STAT6, STING, TGF-бета, TIM-4, TLR1, TLR2, TLR4, TLR8, TNF-альфа, TRACP/PAP/ACP5, TREM1, VCAM-1/CD106, VEGF и YM1/Хитиназа 3-подобный 3. В конкретных вариантах осуществления, макрофаг-специфические антигены выбраны из CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD15 (SSEA-1), CD16/32, CD33, CD64, CD68, CD80, CD85k (ILT3), CD86, CD105 (эндоглин), CD107b, CD115, CD163, CD195 (CCR5), CD282 (TLR2), CD284 (TLR4), F4/80, GITRL, HLA-DR, Mac-2 (галектин-3) и MHC класса II.

[00282] В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с антигеном, экспрессируемым NK клеткой. Примеры антигенов, экспрессируемых NK клетками, которые могут быть таргетированы конъюгатами, предложенными в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, CD11b, CD11c, CD16/32, CD49b, CD56 (NCAM), CD57, CD69, CD94, CD122, CD158 (Kir), CD161 (NK-1.1), CD180, CD244 (2B4), CD314 (NKG2D), CD319 (CRACC), CD328 (Siglec-7), CD335 (NKp46), A2AR, Ly49, Ly108, Vα24-Jα18 TCR (iNKT), гранулизин, гранзим, перфорин, SIRP-α, LAIR1, SIGLEC-3 (CD33), SIGLEC-7, SIGLEC-9, LIR1 (ILT2, LILRB1), NKR-P1A (KLRB1), CD94-NKG2A, KLRG1, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1, KIR2DS1, CD94-NKG2C/E, NKG2D, CD160 (BY55), CD16 (FcγRIIIA), NKp46 (NCR1), NKp30 (NCR3), NKp44 (NCR2), DNAM1(CD226), CRTAM, CD2, CD7, CD11a, CD18, CD25, CD27, CD28, NTB-A (SLAMF6), PSGL1, CD96 (Тактиль), CD100 (SEMA4D), NKp80 (KLRF1, CLEC5C), SLAMF7 (CRACC, CS1, CD319), STING и CD244 (2B4, SLAMF4).

[00283] В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с антигеном, экспрессируемым миелоидной клеткой. Примеры антигенов, экспрессируемых миелоидной клеткой, и которые могут быть таргетированы конъюгатами, предложенными в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, siglec-3, siglec 7, siglec 9, siglec 10, siglec 15, CD200, CD200R, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, M-CSF, CSF-1R, GM-CSF R, IL4 R, аргиназу, IDO, TDO, MPO, EP2, COX-2, CCR2, CCR-7, CXCR1, CX3CR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR7, c-Kit, CD244, L-селектин/CD62L, CD11b, CD11c, CD68, CD163, CD180, CD204, DEC205, IL-1R, CD31, SIRPα, SIRPβ, PD-L1, CEACAM-8/CD66b, CD103, BDCA-1, BDCA2. BDCA-4, CD123, STING и ILT-7.

[00284] В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с антигеном, экспрессируемым MDSC. Примеры антигенов, экспрессируемых MDSC и которые могут быть таргетированы конъюгатами, предложенными в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, siglec-3, Siglec 7, siglec 9, siglec 10, siglec 15, CD200, CD200R, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, M-CSF, CSF-1R, GM-CSF R, IL4 R, аргиназу, IDO, TDO, MPO, EP2, COX-2, CCR2, CCR-7, CXCR1, CX3CR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR7, c-Kit, CD244, L-селектин/CD62L, CD11b, CD11c, CD68, CD163, CD180, CD204, DEC205, IL-1R, CD31, SIRPα, SIRPβ, PD-L1, CEACAM-8/CD66b, CD103, BDCA-1,

BDCA2. BDCA-4, CD123 и ILT-7.

[00285] В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с антигеном, экспрессируемым TAM. Примеры антигенов, экспрессируемых TAM и которые могут быть таргетированы конъюгатами, предложенными в настоящем документе, включают, но не ограничены ими, siglec-3, Siglec 7, siglec 9, siglec 10, siglec 15, CD200, CD200R, нерофилин 2 (NRP2), B7-H3, B7-H4, LILRB1, LILRB2, LILRB3, LILRB4, LILRB5, M-CSF, CSF-1R, GM-CSF R, IL4 R, аргиназу, IDO, TDO, MPO, EP2, COX-2, CCR2, CCR-7, CXCR1, CX3CR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR7, c-Kit, CD244, L-selectin/CD62L, CD11b, CD11c, CD68, CD163, CD204, DEC205, IL-1R, CD31, MARCO, TREM2, CD81, APOE, SIRPα, SIRPβ, PD-L1, CEACAM-8/CD66b, CD103, BDCA-1, BDCA2. BDCA-4, CD123 и ILT-7.

[00286] В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с антигеном, специфичным к NK клетке. В некоторых вариантах осуществления, NK клетка является мишенью для анти-CD56 антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой анти-CD56 антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой моноклональное анти-CD56 антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой анти-CD56 антитело мыши. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD56 антитело мыши представляет собой клон 5.1H11 (BioLegend, кат. №: 362502). В некоторых вариантах осуществления, анти-CD56 антитело мыши представляет собой клон MEM-188 (BioLegend, 304601). В некоторых вариантах осуществления, анти-CD56 антитело мыши представляет собой клон QA17A16 (BioLegend, кат. №: 392402). В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой гуманизированное анти-CD56 антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой анти-CD56 антитело человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой гуманизированное анти-CD56 антитело.

[00287] B-клетки могут быть таргетированы анти-CD38, анти-CD79b, анти-CD30, анти-CD22 или анти-CD20, анти-CD19 антителами или их антигенсвязывающими фрагментами или их сконструированными производными. Плазмацитоидные дендритные клетки (pDC) могут быть таргетированы анти-DEC205, анти-CD304 (BDCA4), анти-CD303 (BDCA2), анти-CD40, анти-CD74 или анти-CD123 антителами или их антигенсвязывающими фрагментами или их сконструированными производными. Макрофаги могут быть таргетированы анти-CD163, анти-CD40, анти-CD74, анти-CD206 или анти-CD123 антителами или их антигенсвязывающими фрагментами или их сконструированными производными. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат по настоящему изобретению содержит иммуномодулирующий олигонуклеотид, как описано в настоящем документе, конъюгированный с полипептидом, углеводом или другим соединением, которое ассоциируется или связывается с антигеном-мишенью, описанным в настоящем документе (*например,* CD22, B-клеточным антигеном, макрофагальным антигеном и так далее).

[00288] Неограничивающими примерами анти- CD38 антител являются даратумумаб, SAR650984, MOR202 или любое из антител Ab79, Ab19, Ab43, Ab72 и Ab110, описанных в WO 2012/092616, описание этих антител включено в настоящее описание посредством ссылки. Неограничивающим примером антитела к CD79b является huMA79b v28, раскрытый в WO 2014/011521. Неограничивающим примером анти-CD22 антитела является антитело 10F4, описанное в US 2014/0127197. Неограничивающим примером анти-CD20 антитела является ритуксимаб. Неограничивающий пример анти-DEC205 антитела представлен в US 2010/0098704, антитела которой включены в настоящий документ посредством ссылки. Неограничивающими примерами анти-CD40 антител являются лукатумумаб и дацетузумаб. Неограничивающим примером анти-CD304 антитела является весенкумаб.

[00289] В некоторых вариантах осуществления, антитело выбрано из группы, состоящей из анти-CD20 антитела, анти-CD22 антитела, анти-CD30 антитела, анти CD37 антитела, анти-CD38 антитела, анти-CD40 антитела, анти-CD74 антитела, анти-CD79b антитела, анти-CD205 антитела, анти-CD274 антитела, анти-CD303 антитела, анти-CD304 антитела, анти-CD19 антитела, анти-CD1 антитела, анти-CD2 антитела, анти-CD3 антитела, анти-CD5 антитела, анти-CD6 антитела, анти-CD9 антитела, анти-CD11 антитела, анти-CD18 антитела, анти-CD21 антитела, анти-CD23 антитела, анти-CD24 антитела, анти-CD25 антитела, анти-CD26 антитела, анти-CD44 антитела, анти-CD45R антитела, анти-CD49 антитела, анти-CD66 (раково-эмбрионального антигена, CEA) антитела, анти-CD93 антитела, анти-CD52 антитела, анти-CD56 антитела, анти-CD123 антитела, анти-CD138 антитела, анти-CD163 антитела, анти-SLAMF7 антитела, анти-CD180 антитела, анти-DEC205 антитела и анти-CD206 антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой анти-CD20 антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой анти-CD22 антитело.

[00290] В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном рака, который лечат данным способом. Примеры опухолеассоциированных антигенов (TAA), которые могут быть таргетированы иммуноконъюгатом CpG-Ab по настоящему изобретению, включают, но не ограничены ими, последовательности, содержащие все или часть последовательностей DLL3, GCC, GPA33, тканевого фактора (TF), TEM8, FOLR1, CEACAM5, LRRC15, Claudin18.2, AXL, CA9, CD155, AMHR2, NTSE, FLT1, нектина 4, 5T4 MT-1/MMP-14, DKK1, миостатина, sema4D, Trop-2, HER3, Her2, Her2/neu, HER1, VWF, IGF-1, GRP78, CXCR4, cMET, витментина, VEGFR2, VEGFR1, VEGF, VEGF-A, TYRP1 (гликопротеина 75), рецептора TWEAK, опухолевого антигена CTAA16.88, TRAIL-R2, TRAIL-R1, TNF-альфа, TGF-бета, TGF бета 2, TGF бета 1, TFPI, тенасцина C, TEM1, TAG-72, STEAP1, сфингозин-1-фосфата, SOST, SLAMF7, BCL-2, селектина P, SDC1, склеростина, RTN4, RON, резус-фактора, RHD, респираторно-синцитиального вируса, RANKL, гликопротеина вируса бешенства, PDGF-R бета, фосфатидилсерина, фосфатно-натриевого котранспортера, PDGF-R альфа, PDCD1, PD-1, PD-L1, PCSK9,

oxLDL, OX-40, NRP1, Notch рецептора 4, Notch рецептора 3, Notch рецептора 2, Notch рецептора 1, NOGO-A, NGF, протеиназы 1, регулируемой нейронным апоптозом, NCA-90 (гранулоцитарного антигена), NARP-1, N-гликолилнейраминовой кислоты, миостатина, миелин-ассоциированного гликопротеина, муцина CanAg, MSLN, MS4A1, MIF, MCP-1, LTA, LOXL2, липотейхоевой кислоты, LINGO-1, LFA-1 (CD11a), антигена Lewis-Y, L-селектина (CD62L), KIR, лиганда KIR, ITGB2 (CD18), ITGA2, рецептора интерферона, гамма-индуцированного белка интерферона, интегрина αvβ3, интегрина αIIβ3, интегрина α7β7, интегрина α5β1, интегрина α4β7, интегрина α4, рецептора инсулиноподобного фактора роста I, гемагглутинина гриппа A, ILGF2, IL9, IL6, IL4, IL3 IRA, IL23, ИЛИ-7A, рецептора IL-6, IL-6, IL-S, IL-4, IL-23, IL-22, IL-I, IL-I 7A, IL-I 7, IL-13, IL-I 2, IL-I, IL-20, IGHE, IGF-I, рецептора IGF-I, Fc области IgE, IFN-гамма, IFN-альфа, ICAM-1 (CD54), TNF человека, киназы рецептора фактора рассеяния человека, Hsp90, HNGF, HLA-DR, HIV-1, гистонового комплекса, HHGFR, HGF, поверхностного антигена гепатита B, GUCY2C, GPNMB, альфа-цепи рецептора GMCSF, глипикана 3, ганглиозида GD3, GD2, ганглиозида GD2, рецептора Frizzled, рецептора фолиевой кислоты 1, фолатгидролазы, дополнительного домена-B фибронектина, фибрина II, бета-цепи, FAP, F-белка респираторно-синцитиального вируса, ERBB3, эписиалина, EpCAM, эндотоксина, EGFR, EGFL7, шига токсина E. coli типа-2, шига токсина E. coli типа-I, DRS, DPP4, DLL4, дабигатрана, гликопротеина B цитомегаловируса, CTLA-4, CSF2, CSF1R, фактора слипания A, CLDN6, CLDN18.1, CLDN18.2, ch4DS, CFD, CEA-родственного антигена, CEA, CD80, CD79B, CD74, CD73, CD70, CD6, CD56, CD52, CD51, CD5, CD44 v6, CD41, лиганда CD40, CD40, CD47, CD4, CD39, CD38, CD37, CD33, CD30 (TNFRSF8), CD123, CD138, CD3 эпсилон, CD3, CD28, CD274, CD27, CD2S (цепи рецептора IL-2), CD23 (рецептора IgE), CD221, CD22, CD200, CD20, CD2, CD19, CD137, CD142, CD154, CD152, CD15, CD147 (басигина), CD140a, CD125, CD11, CD-18, CCR5, CCR4, CCL11 (эотаксина-I), сердечного миозина, карбоангидразы 9 (CA-IX), IL31 Canis lupus familiaris, CA-125, C5, антигена C242, хемокинового рецептора CXC типа 4, бета-амилоида, BAFF, B7-H3, клетки B-лимфомы, AOC3 (VAP-I), токсина сибирской язвы, защитного антигена, ангиопоэтина 3, ангиопоэтина 2, альфа-фетопротеина, AGS-22M6, антигена аденокарциномы, ACVR2B, киназы I, подобной рецептору активина, 5T4, 5AC, 4-IBB, 1-40-бета-амилоида, EGFR, EGFRvIII, gp100 или Pmel17, CEA, MART-1/Melan-A, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MUC-1, GPNMB, HMW-MAA, TIM1, ROR1, CD19, gp100, дипептидилпептидазы IV (DPPIV), белка, связывающего аденозиндезаминазу (ADAbp), циклофилина b, колоректального ассоциированного антигена (CRC)-C017-1A/GA733, раково-эмбрионального антигена (CEA) и его иммуногенных эпитопов CAP-1 и CAP-2, etv6, aml1, простатспецифического антигена (PSA) и его иммуногенных эпитопов PSA-1, PSA-2 и PSA-3, простатспецифического мембранного антигена (PSMA), T-клеточного рецептора/CD3-дзета цепи, MAGE-семейства опухолевых антигенов (например, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3

(MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-05), семейства GAGE опухолевых антигенов (например, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, тирозиназы, p53, семейства MUC (например, MUC1, MUC16 и т. д.; см., например, патент США № 6,054,438; WO 98/04727; или WO98/37095), p21ras, RCAS1, альфа-фетопротеина, E-кадгерина, альфа-катенина, бета-катенина и гамма-катенина, p120ctn, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, белка аденоматозного полипоза толстой кишки (APC), фодрина, коннексина 37, Ig-идиотипа, p15, gp75, ганглиозидов GM2 и GD2, семейства Smad опухолевых антигенов гликогенфосфорилазы головного мозга, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 и CT-7, c-erbB-2 и вирусных антигенов, таких как антигены E6 и E7 HPV-16 и HPV-18, и ядерного антигена, кодируемого EBV (EBNA)-1, βhCG, WT1, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), теломеразы и опухолевых антигенов, полученных из зародышевых клеток. Опухолеассоциированные антигены также включают антигены группы крови, например антигены Lea, Leb, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2. Опухолеассоциированный антиген можно идентифицировать с использованием способов, известных в данной области техники, таких как описаны в *Zhang et al. выше*.

[00291] В частности, в некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном, выбранным из CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD45R(B220), CD49, CD52, CD56, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD93, CD123, CD138, CD163, CD205, CD206, CD274, CD303 и CD304, альфа-рецептора фолиевой кислоты, бета-рецептора фолиевой кислоты, мезотелина, PSMA, Her-2, EGFR, CLDN18.2, 5T4, CD47, нектина 4, рецептора трансферрина, интегрина, крипто, EphA2, AGS-5, AGS-16, CanAg, EpCAM, рецептора IL4, рецептора IL2, Lewis Y, GPNMB, DLL3, GCC, GPA33, тканевого фактора (TF) и Trop2. В некоторых вариантах осуществления, опухолеассоциированный антиген экспрессируется опухолевыми клетками. В некоторых вариантах осуществления, опухолеассоциированный антиген экспрессируется стромальными клетками, *например* частью стромы опухоли.

[00292] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к CD22 и анти-CD22 антителам. В некоторых вариантах осуществления, CD22 относится к CD22 человека, и антитела связывают CD22 человека. CD22 также известен как Siglec-2, и последовательности генов и полипептидов CD22 (*например*, последовательности генов и полипептидов человека) известны в данной области техники. *См., например,* ID гена NCBI № 933 и эталонную последовательность NCBI, номер доступа NP_001172028. В некоторых вариантах осуществления, анти-CD22 антитело представляет собой антитело, содержащее VH и VL, как показано ниже в **таблице 4. Последовательности анти-CD22 антител.**

Таблица 4. Последовательности анти-CD22 антител

Название	**Домен**	**SEQ ID NO:**	**Последовательность**

RFB4	VH	**56**	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMS WVRQTPEKRLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGS SYGVLFAYWGQGTLVTVSS
RFB4	VL	**57**	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWY QQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK
эпратузумаб	VH	**58**	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWL HWVRQAPGQGLEWIGYINPRNDYTEYNQNFKDKA TITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDITTFY WGQGTTVTVSS
эпратузумаб	VL	**59**	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMSCKSSQSVLYSANHK NYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCHQYLSSWTFGGGT KLEIK
m971	VH	**60**	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAA WNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKS RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTG DLEDAFDIWGQGTMVTVSS
m971	VL	**61**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWY QQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFT LTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK
10F4	VH	**62**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMN WVRQAPGKGLEWVGRIYPGDGDTNYSGKFKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSW DWYFDVWGQGTLVTVSS
10F4	VL	**63**	MDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGN TFLEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQGT KVEIK
RH1	VH	**64**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMS WVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGT HWGVLFAYWGRGTLVTVSS

RH2	VH	**65**	QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMN WVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGT HWGVLFAYWGRGTLVTVSS
RH3	VH	**66**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTH WGVLFAYWGRGTLVTVSS
RH4	VH	**67**	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSW IRQPPGKGLEWIAYISSGGGTTYYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWG VLFAYWGRGTLVTVSS
RL1	VL	**68**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWY QQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK
RL2	VL	**69**	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAW YQQKPGKAPKLLIYYTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK
RL3	VL	**70**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK
RL4	VL	**71**	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWY QQKPGQAPRLLIYYTSILHSGIPARFSGSGPGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK
RL5	VL	**72**	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWY QQKPGQSPQLLIYYTSILHSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK

Таблица 5. Последовательности VH анти-CD22 антител.

Название	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
RH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQ APGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRG TLVTVSS	64
RH2	QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQ	65

	APGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRG TLVTVSS	
RH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQ APGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGT LVTVSS	66
RH4	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPP GKGLEWIAYISSGGGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVT VSS	67

Таблица 6. Последовательности VL анти-CD22 антител.

Название	**Последовательность**	**SEQ ID NO**
RL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK	68
RL2	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAWYQQKP GKAPKLLIYYTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK	69
RL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK	70
RL4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWYQQKP GQAPRLLIYYTSILHSGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDF AVYYCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK	71
RL5	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWYQQKP GQSPQLLIYYTSILHSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK	72
RL1 N92A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGATLPWTFGQGTKLEIK	73
RL1 N92C	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGCTLPWTFGQGTKLEIK	74

RL1 N92D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGDTLPWTFGQGTKLEIK	75
RL1 N92E	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGETLPWTFGQGTKLEIK	76
RL1 N92F	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGFTLPWTFGQGTKLEIK	77
RL1 N92G	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGGTLPWTFGQGTKLEIK	78
RL1 N92H	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGHTLPWTFGQGTKLEIK	79
RL1 N92I	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGITLPWTFGQGTKLEIK	80
RL1 N92K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGKTLPWTFGQGTKLEIK	81
RL1 N92L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGLTLPWTFGQGTKLEIK	82
RL1 N92M	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGMTLPWTFGQGTKLEIK	83
RL1 N92P	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGPTLPWTFGQGTKLEIK	84
RL1 N92Q	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGQTLPWTFGQGTKLEIK	85
RL1 N92R	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP	86

	GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGRTLPWTFGQGTKLEIK	
RL1 N92S	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGSTLPWTFGQGTKLEIK	87
RL1 N92T	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGTTLPWTFGQGTKLEIK	88
RL1 N92V	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGVTLPWTFGQGTKLEIK	89
RL1 N92W	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGWTLPWTFGQGTKLEIK	90
RL1 N92Y	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYFCQQGYTLPWTFGQGTKLEIK	91

Таблица 13. Последовательности анти-CD22 антител

Тяжелая цепь	**Легкая цепь**
QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSI YDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GRPQGFGPP (SEQ ID NO:179)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYT SILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYFCQQGATLPWTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO:181)

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSI YDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GRPQGFGPP (SEQ ID NO:180)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYT SILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYFCQQGSTLPWTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO:182)

[00293] В некоторых вариантах осуществления, анти-CD22 антитело или конъюгат содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 179 или 180, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 181 или 182.

[00294] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к Her2 и анти-Her2 антителам. В некоторых вариантах осуществления, Her2 относится к Her2 человека, и антитела связывают Her2 человека. Her2 также известен как тирозинкиназа 2 рецептора erb-b2 (ERBB2), Neu, NGL, TKR1, CD340 и MLN19. Последовательности гена и полипептида Her2 (*например*, последовательности гена и полипептида человека) известны в данной области техники. *См., например,* ID гена NCBI № 2064 и эталонную последовательность NCBI, номер доступа NP_001005862. В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с полипептидом Her2, *например,* полипептидом Her2 человека. В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с внеклеточным доменом полипептида Her2, *например,* полипептида Her2 человека. В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с клеткой (*например,* опухолевой клеткой), которая экспрессирует на своей клеточной поверхности полипептид Her2, *например*, полипептид Her2 человека. Антитела, которые связывают полипептид Her2, *например,* полипептид Her2 человека, известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, указанное антитело содержит VH домен, содержащий 1, 2 или 3 последовательности CDR из домена VH анти-Her2 антитела трастузумаб, и/или VL домен, содержащий 1, 2 или 3 последовательности CDR из домена VL анти-Her2 антитела трастузумаб. В некоторых вариантах осуществления, указанное

антитело содержит VH домен, содержащий 1, 2 или 3 последовательности CDR из VH домена, содержащего аминокислотную последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168), или VL домен, содержащий 1, 2 или 3 последовательности CDR из VL домена, содержащего аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:169). В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит VH домен анти-Her2 антитела трастузумаб и/или VL домен анти-Her2 антитела трастузумаб. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит VH домен, содержащий аминокислотную последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168) и/или VL домен, содержащий аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:169). В некоторых вариантах осуществления, указанное антитело содержит VH домен, содержащий 1, 2 или 3 последовательности CDR из VH домена анти-Her2 антитела пертузумаб, и/или VL домен, содержащий 1, 2 или 3 последовательности CDR из домена VL анти-Her2 антитела пертузумаб. В некоторых вариантах осуществления, указанное антитело содержит VH домен, содержащий 1, 2 или 3 последовательности CDR из VH домена, содержащего аминокислотную последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTM DWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170), или VL домен, содержащий 1,2 или 3 последовательности CDR из VL домена, содержащего аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:171). В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит VH домен анти-Her2 антитела пертузумаб и/или VL домен анти-Her2 антитела пертузумаб. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит VH домен, содержащий аминокислотную последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTM DWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170) и/или VL домен, содержащий аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:171). В некоторых вариантах осуществления, анти-Her2 антитело представляет собой трастузумаб. В некоторых вариантах осуществления, анти-Her2 антитело представляет собой пертузумаб. В некоторых вариантах осуществления, анти-Her2 антитело обладает одной или несколькими эффекторными функциями, включая, без ограничения, ADCC и/или ADCP. В некоторых

вариантах осуществления, анти-Her2 антитело содержит Fc область человека, *например,* Fc область IgG человека. В некоторых вариантах осуществления, анти-Her2 антитело содержит Fc область IgG1, IgG2 или IgG4 человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, анти-Her2 антитело содержит последовательность константного домена антитела SEQ ID NO:178.

Таблица 14: Последовательности анти-Her2 антител

Тяжелая цепь	**Легкая цепь**
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGRPQG FGPP (**SEQ ID NO:183**)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (**SEQ ID NO:185**)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSA SYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC (**SEQ ID NO:188**)

MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGR PQGFGPP (**SEQ ID NO:184**)	
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT DYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGS IYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGRPQGF GPP (**SEQ ID NO:186**)	
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT DYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGS IYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGR	

PQGFGPP (**SEQ ID NO:187**)	

[00295] В некоторых вариантах осуществления, анти-Her2 антитело или его конъюгат содержат тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:183, 184, 186 или 187; и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:185 или 188.

[00296] В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению (*например,* анти-CD22 антитело или анти-Her2 антитело) содержит константный домен антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению (*например,* анти-CD22 антитело или анти-Her2 антитело) содержит константный домен тяжелой цепи антитела и/или константный домен легкой цепи антитела, перечисленные в **таблице 7.** В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению (*например,* анти-CD22 антитело или анти-Her2 антитело) содержит константный домен тяжелой цепи антитела, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No: 92-107 и 178. В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению (*например,* анти-CD22 антитело или анти-Her2 антитело) содержит константный домен тяжелой цепи антитела с Q-меткой на С-конце Fc области, *например,* как показано в SEQ ID №: 95 или 178. В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению (*например,* анти-CD22 антитело или анти-Her2 антитело) содержит две тяжелые цепи антитела, каждая с константным доменом, где каждая из двух тяжелых цепей антитела содержит Q-метку на С-конце Fc области, *например,* как показано в SEQ ID No: 95 или 178. В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению (*например,* анти-CD22 антитело или анти-Her2 антитело) содержит две тяжелые цепи антитела, каждая с константным доменом, где только один из двух антигенов тяжелые цепи тела содержат Q-метку на С-конце Fc области, *например,* как показано в SEQ ID No: 95 или 178. В некоторых вариантах осуществления, изобретения антитело по настоящему изобретению (*например,* анти-CD22 антитело или анти-Her2 антитело) содержит константный домен легкой цепи антитела, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID No:108-110.

Таблица 7. Последовательности константного домена антитела

Имя	**SEQ ID NO:**	**Последовательность**
IgG1 дикого типа	92	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG

		QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG1_AAA_N297A	93	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG1_AAA	94	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG1_AAA+S-метка	95	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGRPQG FGPP
IgG1_N297A	96	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

		VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG1_D265A	97	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG1_N297A/D265A	98	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG2	99	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE

		EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG2Da	100	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG2Da_N297A	101	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG2_N297A	102	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFASTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG2Da_D265A	103	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

		VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVAVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IgG4_S228P	104	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
IgG4_S228P_D265A	105	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVAVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
IgG4_S228P, L235E	106	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ

		EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
IgG4_S228P, N297A	107	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
IgG1_wt+S-метка	178	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGRPQGF GPP
Каппа человека	108	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
Лямбда человека IGLC1	109	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV APTECS
Лямбда человека IGLC2	110	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV

		APTECS

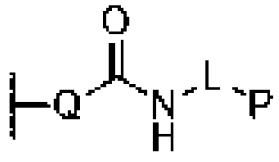
[00297] В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VH домен, содержащий 1, 2 или 3 CDR одного антитела, показанного в **таблице 8.** В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VH домен, содержащий 3 CDR одного антитела, показанные в **таблице 8.** В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VL домен, содержащий 1, 2 или 3 CDR одного антитела, показанного в **таблице 8.** В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VL домен, содержащий 3 CDR одного антитела, показанные в **таблице 8.** В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VH домен, содержащий 1, 2 или 3 CDR одного антитела, показанного в **таблице 8,** и VL домен, содержащий 1, 2 или 3 CDR одного антитела, показанного в **таблице 8.** В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VH домен, содержащий 3 CDR одного антитела, показанного в **таблице 8,** и VL домен, содержащий 3 CDR одного антитела, показанного в **таблице 8.** В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VH домен, содержащую CDR-H1, содержащий последовательность SEQ ID NO:113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116. В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VH домен, содержащий CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:114, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:189, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116. В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VL домен, содержащий CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120. В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат по настоящему изобретению содержит VL домен, содержащий CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:118, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:177, и CDR-L3. содержащую последовательность SEQ ID NO:120.

Таблица 8. Последовательности CDR анти-CD22 антитела

Антитело	**CDR-H1**	**CDR-H2**	**CDR-H3**	**CDR-L1**	**CDR-L2**	**CDR-L3**
RH1	GFAFSIYD (SEQ ID NO:113)	ISSGGGTT (SEQ ID NO:115)	ARHSGYGTHW GVLFAY (SEQ ID NO:116)	--	--	--
RH2	GFAFSIYD	ISSGGGT	ARHSGYGTHW	--	--	--

	(SEQ ID NO:113)	T (SEQ ID NO:115)	GVLFAY (SEQ ID NO:116)			
RH3	GFTFSSYE (SEQ ID NO:114)	ISSSGSTI (SEQ ID NO:189)	ARHSGYGTHW GVLFAY (SEQ ID NO:116)	--	--	--
RH4	GFAFSIYD (SEQ ID NO:113)	ISSGGGT T (SEQ ID NO:115)	ARHSGYGTHW GVLFAY (SEQ ID NO:116)	--	--	--
RL1	--	--	--	QDIHG Y (SEQ ID NO:117)	YTS (SEQ ID NO:119)	QQGNTLP WT (SEQ ID NO:120)
RL2	--	--	--	QDIHG Y (SEQ ID NO:117)	YTS (SEQ ID NO:119)	QQGNTLP WT (SEQ ID NO:120)
RL3	--	--	--	QSISSY (SEQ ID NO:118)	AAS (SEQ ID NO:177)	QQGNTLP WT (SEQ ID NO:120)
RL4	--	--	--	QDIHG Y (SEQ ID NO:117)	YTS (SEQ ID NO:119)	QQGNTLP WT (SEQ ID NO:120)
RL5	--	--	--	QDIHG Y (SEQ ID NO:117)	YTS (SEQ ID NO:119)	QQGNTLP WT (SEQ ID NO:120)

[00298] В еще одном аспекте, настоящего изобретения предложен конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),


(A),

где:

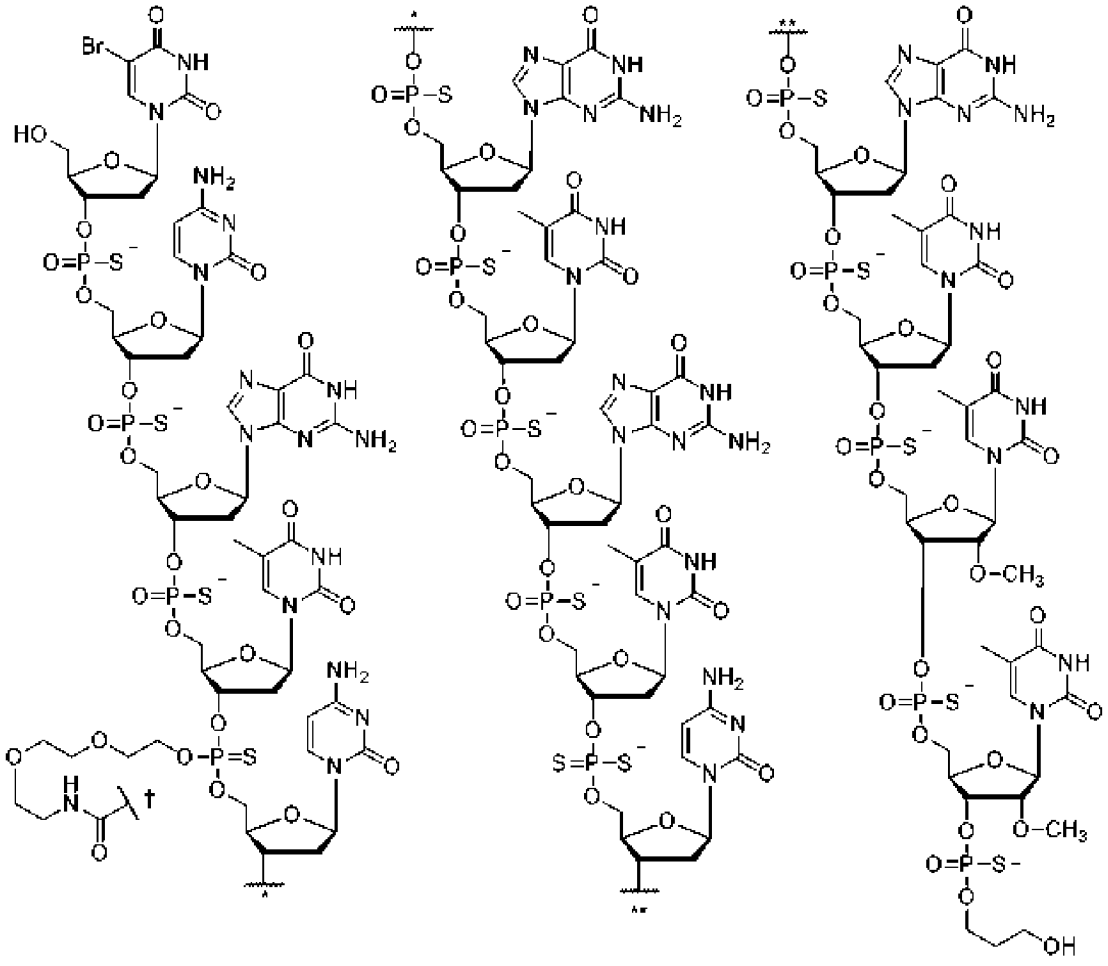
каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу


,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к P, и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком;

и каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру


,

где 〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида, и 〰 † указывает точку присоединения к L;

где Ab содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности домена VH: QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYD MNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65);

где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQ KPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 68).

[00299] В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену в остатке N92 (нумерация начинается с N-конца последовательности домена VL). В некоторых вариантах осуществления, где VL домен содержит аминокислотную замену в положении N92, VL домен содержит аминокислотную замену N92A. В некоторых других вариантах осуществления, где VL домен содержит аминокислотную замену в положении N92, VL домен содержит аминокислотную замену N92L. В некоторых других вариантах осуществления, в которых VL домен содержит аминокислотную замену в положении N92, VL домен содержит аминокислотную замену N92S. В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного, VL домен содержит последовательность домена VL, показанную в **таблице 6,** *например,* SEQ ID No: 73-91.

[00300] В других аспектах, настоящее описание предлагает конъюгат, содержащий белок, по меньшей мере, одну последовательность пептида Q-метки, содержащую глутаминовый остаток, и по меньшей мере, один иммуномодулирующий олигонуклеотид, где последовательность пептида Q-метки является природной или синтетической, и где иммуномодулирующая олигонуклеотид связан с Q-меткой посредством амидной связи с глутаминовым остатком, где, по меньшей мере, одна пептидная последовательность Q-метки выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55.

[00301] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 10** и ***таблицы* 12.**

[00302] В некоторых вариантах осуществления, предпочтительный иммуномодулирующий агент в анти-CD22 конъюгате представляет собой агонист Toll-подобного рецептора, выбранный из агониста TLR1, агониста TLR2, агониста TLR3, агониста TLR4, агониста TLR5, агониста TLR6, агониста TLR7, агониста TLR8 и агониста TLR10. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий агент представляет собой агонист Toll-подобного рецептора, выбранный из агониста TLR7, агониста TLR8, агониста TLR7/TLR8.

[00303] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий агент в анти-CD22 конъюгате представляет собой агонист пути STING или модулятор вышестоящих ферментов, которые модулируют STING (*например,* ингибиторы ENPP1,

фосфодиэстеразы, которая отрицательно регулирует путь STING). STING (стимулятор генов интерферона, также известный как TMEM173, MITA, ERIS и MPYS) представляет собой трансмембранный белок, локализованный в ER, который претерпевает конформационные изменения в ответ на прямое связывание циклических динуклеотидов (CDN), что приводит к нисходящему сигнальному каскаду, включая активацию TBK1, фосфорилирование IRF-3 и продуцирование IFN-β и других цитокинов. Путь STING в антигенпрезентирующих клетках хозяина-резидента опухоли, участвует в индукции спонтанного ответа CD8+ Т-клеток против опухолеассоциированных антигенов. Активация этого пути и последующее продуцирование IFN-β также способствуют противоопухолевому эффекту. В некоторых вариантах осуществления, агонистом пути STING является ADU-S100. Дополнительные агонисты STING и их применение описано, например, в US20180028553, US20170319680, US20170298139, US20060040887, US20080286296, US20120041057, US20140205653, WO2014179335, WO 2014179760, US20150056224, WO 2016096174, WO 2017011444, WO 2017027645 и WO 2017027646.

[00304] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий агент в анти-CD22 конъюгате представляет собой агонист пути RIG-I. RIG-I (ген-I, индуцируемый ретиноевой кислотой) является членом рецепторов распознавания паттернов, которые инициируют врожденную иммунную систему хозяина для защиты от патогенных микробов на ранних стадиях инфекции. Существует три члена семейства (RIG-I)-подобных рецепторов: RIG-I, MDA5 (фактор дифференциации меланомы 5) и LGP2 (лаборатория генетики и физиологии 2), которые экспрессируются в большинстве типов клеток и тканей. RIG-I функционирует как цитоплазматический сенсор для распознавания различных РНК вирусов и последующей активации нижестоящей передачи сигналов для управления продуцированием IFN I типа и экспрессией антивирусных генов. Активированный RIG-I рекрутирует свою нижестоящую адаптерную молекулу MAVS (также известную как IPS-1, CARDIF и VISA) через взаимодействия, опосредованные CARD-CARD. Олигомерная сборка RIG-I CARD и полимерное образование MAVS вместе служат сигнальной платформой для белковых комплексов, которые опосредуют разветвление передачи сигналов на две ветви. Одна ветвь рекрутирует факторы, ассоциированные с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF)-2/6, и белок 1, взаимодействующий с рецептором, для последующей активации комплекса IKK, что приводит к активации NF-κB. Другая ветвь передает сигналы через TRAF3 и активирует комплекс TANK/IKKγ/IKKϵ/TBK1, что приводит к фосфорилированию и димеризации факторов регулятора интерферона (IRF)-3 и -7. Liu et al., Front Immunol. 2017, 7:662. Активация этого пути способствует противоопухолевому эффекту. В некоторых вариантах осуществления, агонист пути RIG-I представляет собой RGT100. Агонисты RIG-I и их применение описаны, например, в US20170057978, US20170258897, US9381208, US9738680, US9650427, WO2017173427 и WO2017011622.

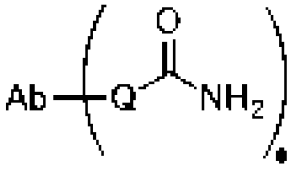
III. БЕЛКИ С Q-МЕТКОЙ

[00305] В одном аспекте, в настоящем документе предложен белок, содержащий,

по меньшей мере, одну пептидную последовательность Q-метки, содержащую глутаминовый остаток. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность Q-метки является природной или синтетической. В некоторых вариантах осуществления, пептидная последовательность Q-метки представляет собой внутренний реактивный глутамин, подвергаемый аминокислотной замене. В дополнительных вариантах осуществления, Q-метка слита с С-концом тяжелой цепи белка. В дополнительных вариантах осуществления, по меньшей мере, одна из по меньшей мере, одной пептидной последовательности Q-метки выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55.

[00306] В некоторых вариантах осуществления, белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 56; и VL содержит последовательность SEQ ID NO: 57.

[00307] В другом аспекте настоящего описания, в настоящем документе предложены антитела формулы (B)



(B),

где:

каждый Q независимо представляет собой Q-метку, содержащую пептидную последовательность, по меньшей мере, с одним глутаминовым остатком;

Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; и

e представляет собой целое число от 1 до 20.

[00308] Антитела формулы (B) могут быть предшественниками конъюгатов антитело-олигонуклеотид формулы (A), как описано выше. Соответственно, свойства и варианты осуществления антител, как описано в предыдущем аспекте формулы (A), могут быть такими же или отличаться от свойств и/или вариантов осуществления антител формулы (B).

[00309] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его фрагмент представляют собой Fab, F(ab')2, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное антитело, антитело с одной тяжелой цепью или одной легкой цепью или фрагмент антитела. В других вариантах осуществления, антитело или его фрагмент представляет собой гуманизированное, человеческое или химерное антитело или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, антитело или его фрагмент специфически связываются с CD22 человека.

[00310] В некоторых вариантах осуществления, где указанное антитело содержит

вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена, выбранной из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG GGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64),

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAY WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) и

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPPGKGLEWIAYISSGGG TTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO: 67).

[00311] Антитело по любому из вариантов осуществления 87-90, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где VH домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG GGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64),

QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSG GGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFA YWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65),

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS GSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAY WGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66) и

QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPPGKGLEWIAYISSGGG TTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO: 67).

[00312] Антитело по любому из вариантов осуществления 87-93, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности домена VL, выбранной из группы, состоящей из:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:68),

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID

NO:69),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:70),

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWYQQKPGQAPRLLIYYTSILHS GIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 71) и

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWYQQKPGQSPQLLIYYTSILHSGVPDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 72).

[00313] В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного, VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену в остатке N92. В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного, VL домен содержит аминокислотную замену в остатке N92, выбранном из группы, состоящей из N92A, N92L и N92S.

[00314] В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит вариабельный домен (VH) тяжелой цепи и вариабельный домен (VL) легкой цепи, где аминокислотная последовательность VL домена выбрана из группы, состоящей из:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 68),

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 69),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 70),

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWYQQKPGQAPRLLIYYTSILHS GIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 71) и

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWYQQKPGQSPQLLIYYTSILHS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:72).

[00315] В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит Fc область. В некоторых вариантах осуществления, где антитело содержит Fc область, Fc область представляет собой Fc область человека, выбранную из группы, состоящей из Fc области IgG1, Fc области IgG2 и Fc области IgG4.

[00316] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, Fc область представляет собой:

(a) Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(b) Fc область IgG2 человека, содержащую замены A330S и/или P331S, нумерация

аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или

(c) Fc область IgG4 человека, содержащую замены S228P и/или L235E, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

[00317] В некоторых вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В других вариантах осуществления, Fc область дополнительно содержит замену D265A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU. В дополнительных вариантах осуществления, антитело содержит легкую цепь лямбда человека. В других вариантах осуществления, антитело содержит легкую цепь каппа человека.

[00318] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна Q-метка присоединена к тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна Q-метка слита с C-концом тяжелой цепи антитела. В других вариантах осуществления, по меньшей мере, одна Q-метка присоединена к легкой цепи антитела. В других вариантах осуществления, по меньшей мере, одна Q-метка находится в Fc домене.

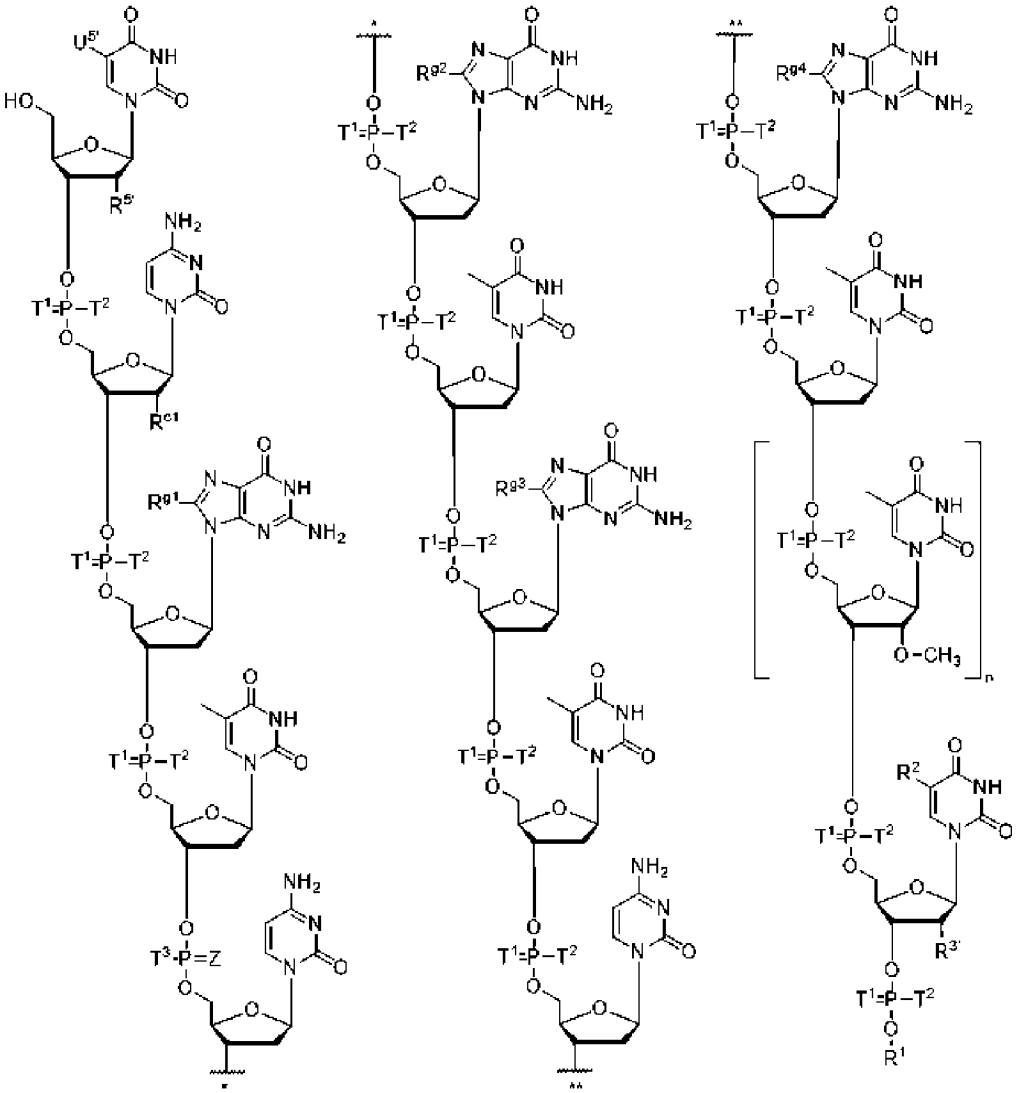
[00319] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, антитело связано с 1-20 Q-метками Q. В некоторых вариантах осуществления, количество Q-меток, связанных с антителом/конъюгатом, представляет собой целое число примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 11, примерно 12, примерно 13, примерно 14, примерно 15, примерно 16, примерно 17, примерно 18, примерно 19 или примерно 20. В некоторых других вариантах осуществления, 1 или 2 Q-метки связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В других вариантах осуществления, количество Q-меток, связанных с антителом/конъюгатом, представляет собой целое число от 1 до 10, от 10 до 20, от 5 до 10, от 10 до 15, от 15 до 20 или от 1 до 5.

[00320] В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, каждая Q-метка независимо содержит или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39-55. В некоторых вариантах осуществления, каждая Q-метка независимо содержит или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из пептидных последовательностей из ***таблицы* 3.** В других вариантах осуществления настоящего аспекта, каждая Q-метка независимо содержит или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-55. В других вариантах осуществления, каждая Q-метка независимо содержит или представляет собой пептидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47-49. В некоторых вариантах осуществления, Q-метка содержит LLQGG (SEQ ID NO:172), GGGLLQGG (SEQ ID NO:173), RPQGF (SEQ ID NO:47) или RPQGFGPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, каждый Q независимо

представляет собой Q-метку, содержащую пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47). В некоторых вариантах осуществления, каждая Q-метка, содержащая пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), выбрана из группы, состоящей из RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48) и RPQGFGPP (SEQ ID NO:49). В некоторых вариантах осуществления, каждая Q-метка независимо содержит или представляет собой пептидную последовательность RPQGFGPP (SEQ ID NO:49).

IV. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ПОЛИНУКЛЕОТИДЫ

[00321] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает иммуномодулирующий полинуклеотид формулы (C),



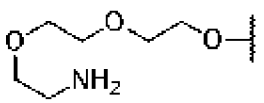
(C),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H или оксо, при условии, что, по меньшей мере, один из R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляет собой оксо, и где углерод, к которому присоединен оксо, имеет одну связь с кольцевым азотом в положении 7);

$R^{3'}$ представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

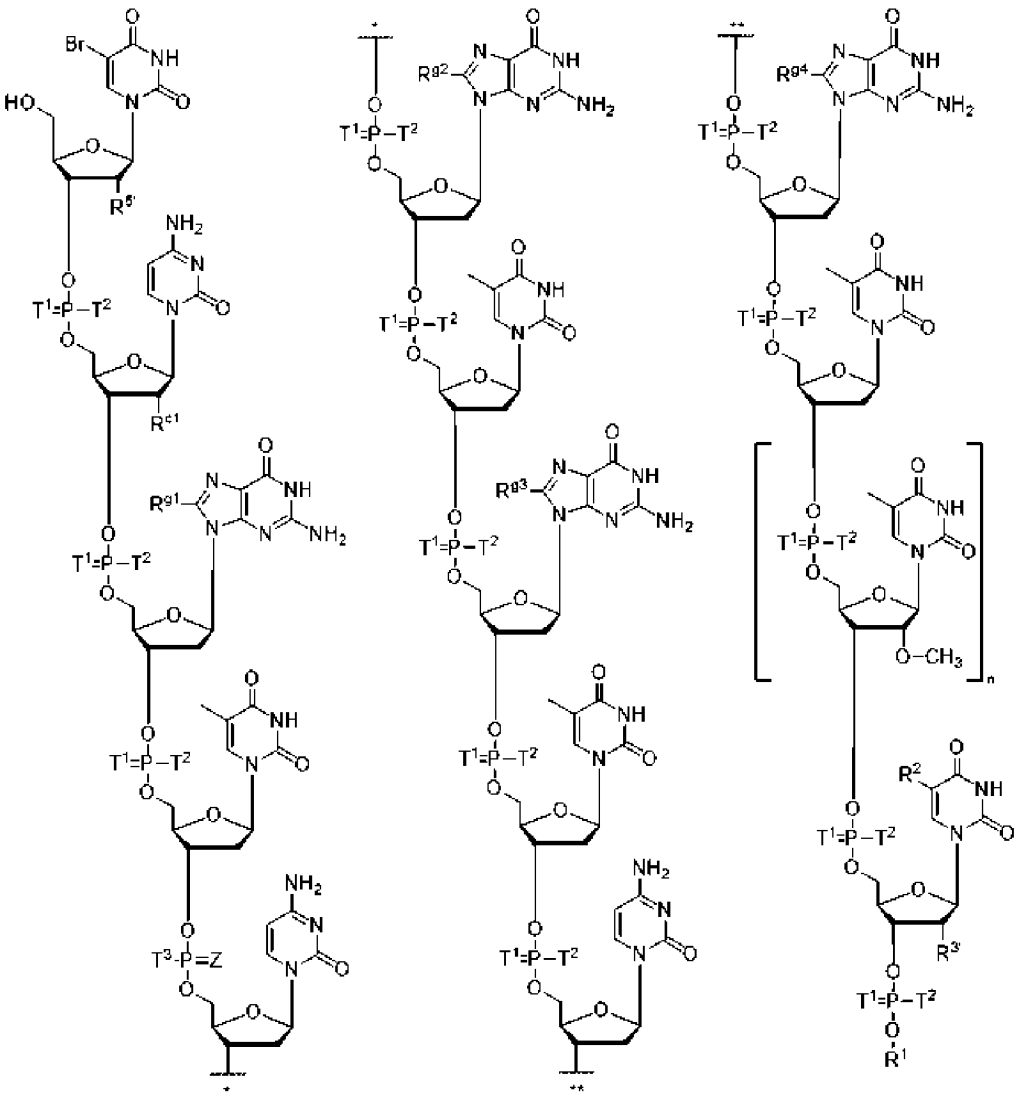
R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00322] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, $U^{5'}$ представляет собой -H. В других вариантах осуществления, $U^{5'}$ представляет собой галоген. В некоторых вариантах осуществления, $U^{5'}$ представляет собой йод или бром. В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C'). В других вариантах осуществления настоящего аспекта, иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C”).

[00323] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе предложен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C')



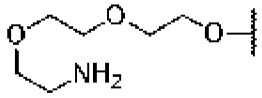
(C'),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H или оксо, при условии, что, по меньшей мере, один из R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляет собой оксо, и где углерод, к которому присоединен оксо, имеет одну связь с кольцевым азотом в положении 7);

$R^{3'}$ представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

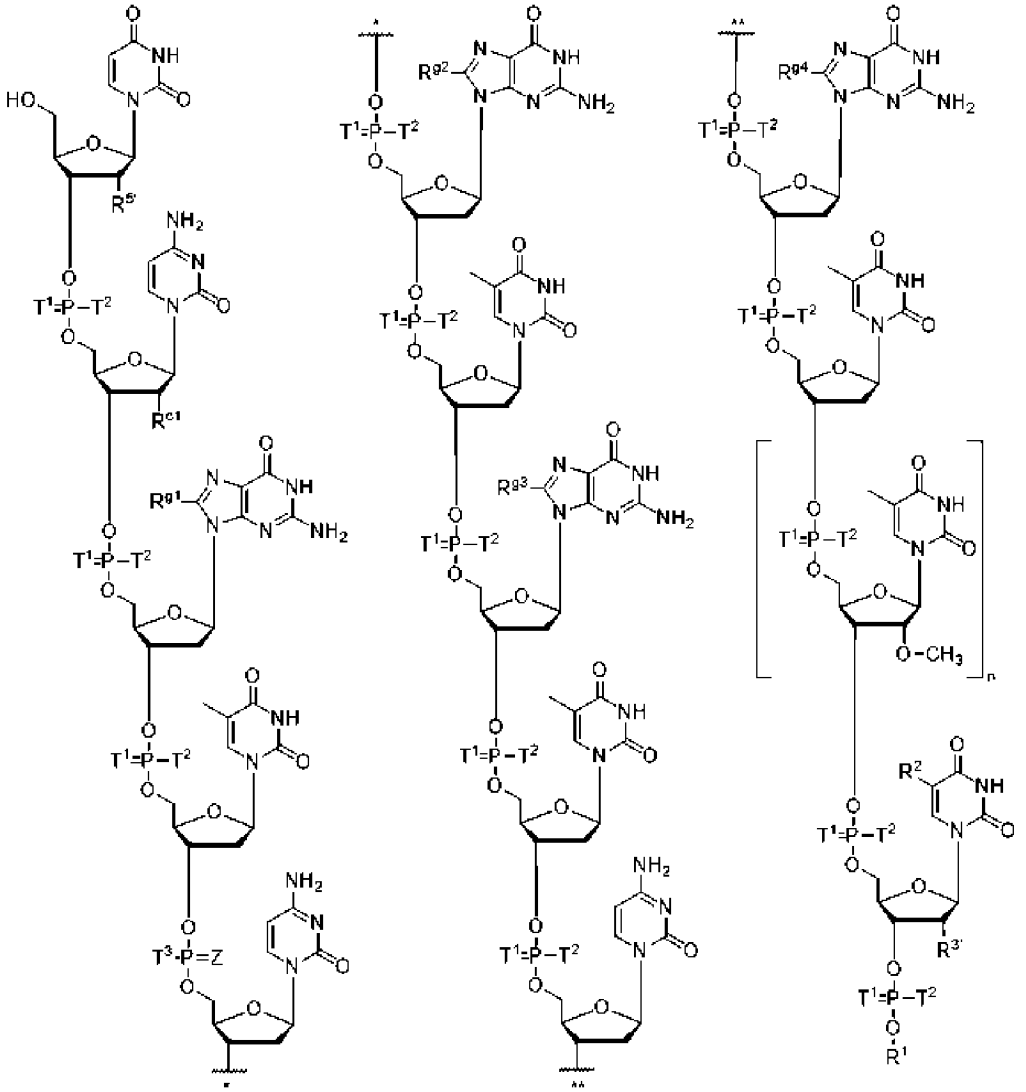
R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00324] В других вариантах осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе предложен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C'')



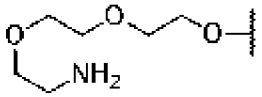
(C''),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H или оксо, при условии, что, по меньшей мере, один из R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляет собой оксо, и где углерод, к которому присоединен оксо, имеет одну связь с кольцевым азотом в положении 7);

$R^{3'}$ представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

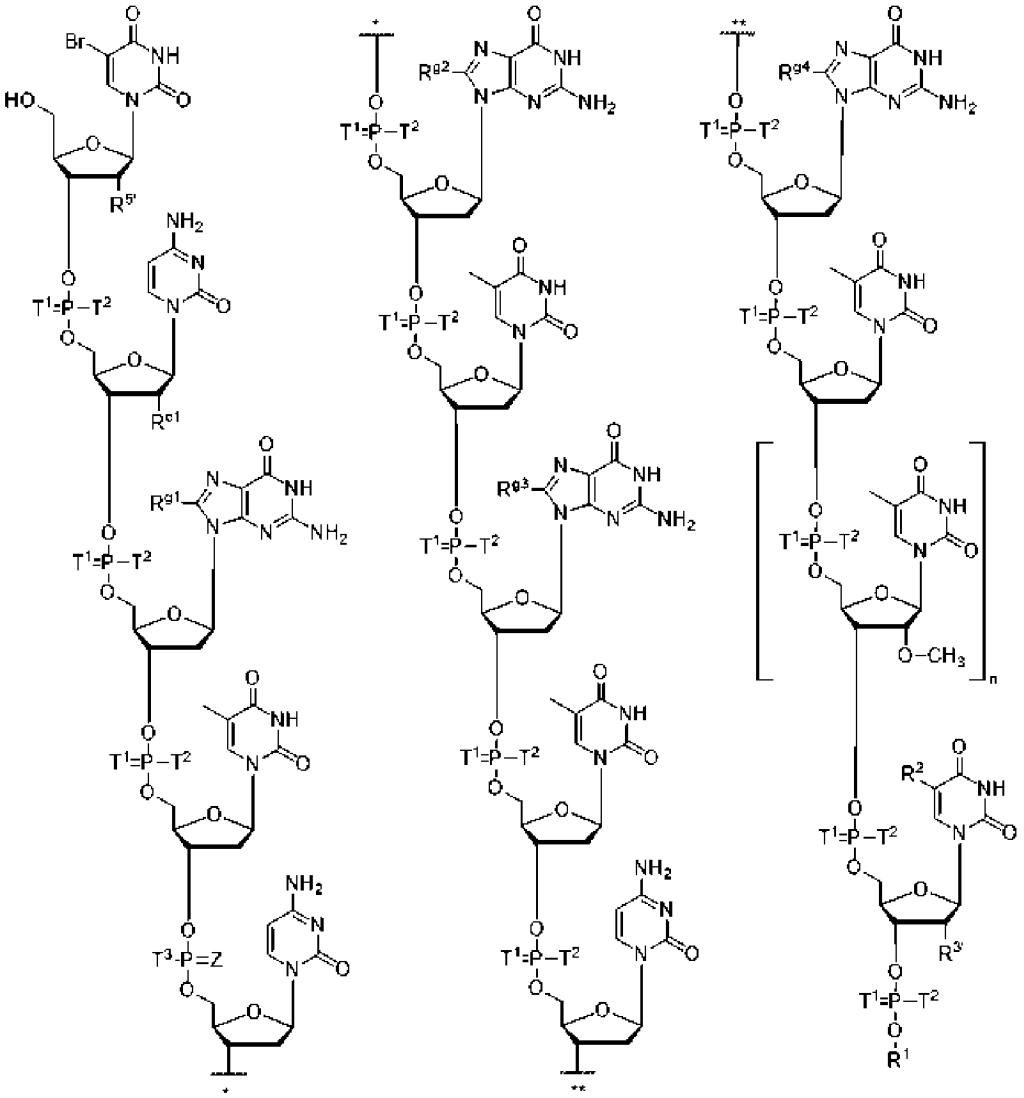
R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00325] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе предложен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C')



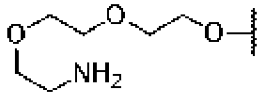
(C'),

где:

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 указывает точку

присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

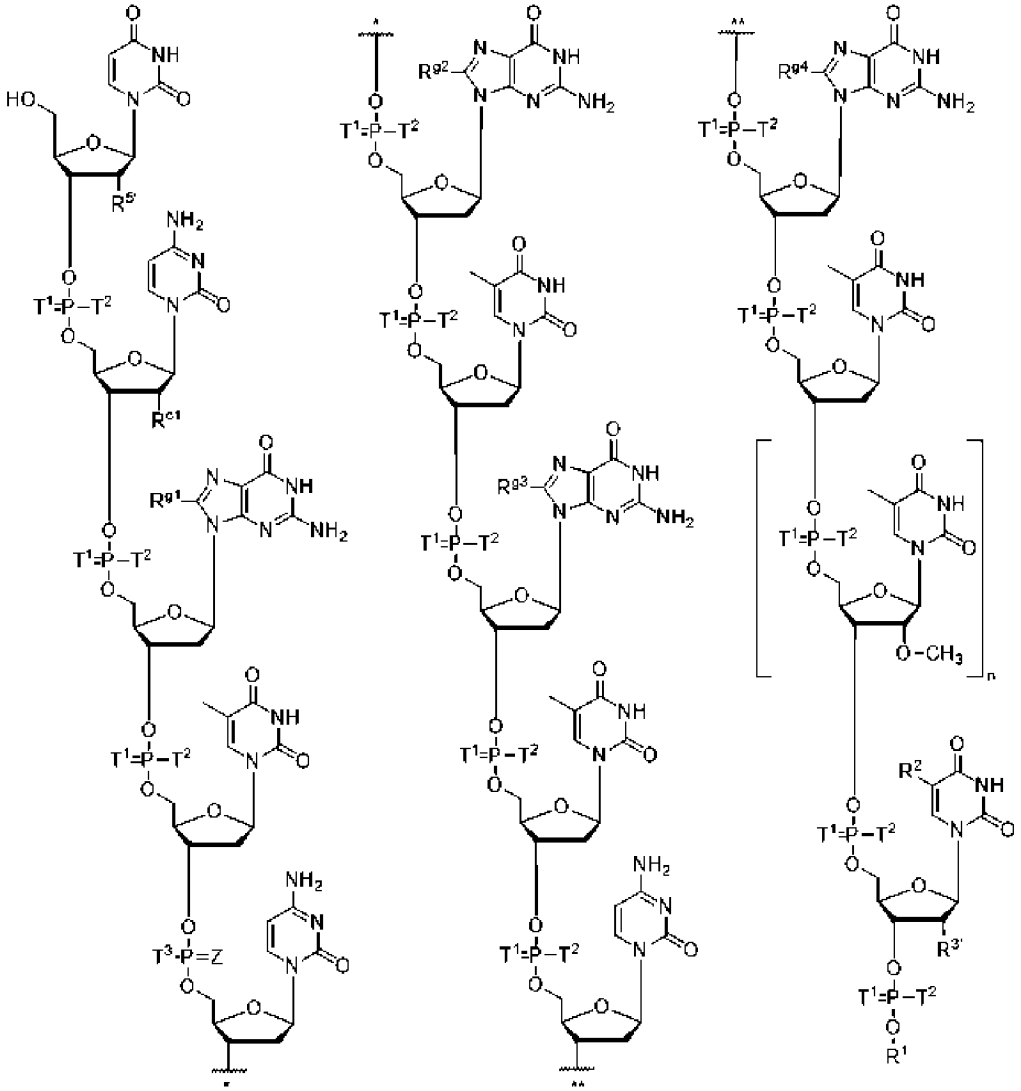
R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00326] В других вариантах осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе представлен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C'')



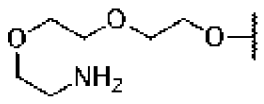
(C"),

где:

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где ~~~ указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00327] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, Z представляет собой S. В дополнительных вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-. Пара(ы) геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, также могут быть описаны как фосфородитиоатные связи.

[00328] Следует понимать, что в некоторых случаях, когда олигонуклеотид имеет, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, фосфородитиоатная связь может быть дополнительно описана в терминах положения внутри олигонуклеотида, на котором расположена связь. Положение связи может быть охарактеризовано, например, как положение между двумя нуклеозидными остатками, *например,* между первым и вторым нуклеозидными остатками (или между нуклеозидными остатками 1 и 2), считая от 5' конца олигонуклеотида. Альтернативно, положение связи может быть описано как расположенное в 3' положении данного нуклеозидного остатка, *например,* на межнуклеозидном линкере, непосредственно следующем за указанным нуклеозидным остатком, или в 3' положении ’3 концевого остатка.

[00329] В некоторых вариантах осуществления, где олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, и где n равно 0, по меньшей мере, одна фосфородитиоатная связь находится между нуклеозидными остатками 1 и 2, между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10, между нуклеозидными остатками 10 и 11 или между нуклеозидными остатками 11 и 12. В некоторых вариантах осуществления, где олигонуклеотид содержит, по меньшей мере,

одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, и где n равно 0, по меньшей мере, одна фосфородитиоатная связь расположена в 3' положении нуклеозидного остатка 1, нуклеозидного остатка 2, нуклеозидного остатка 3, нуклеозидного остатка 5, нуклеозидного остатка 6, нуклеозидного остатка 7, нуклеозидного остатка 8, нуклеозидного остатка 9, нуклеозидного остатка 10, нуклеозидного остатка 11, нуклеозидного остатка 12 или нуклеозидного остатка 13.

[00330] В некоторых вариантах осуществления, где олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, и где n равно 1, по меньшей мере, одна фосфородитиоатная связь находится между нуклеозидными остатками 1 и 2, между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10, между нуклеозидными остатками 10 и 11, между нуклеозидными остатками 11 и 12 или между нуклеозидными остатками 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и $T^{2,}$ где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, и где n равно 0, по меньшей мере, одна фосфородитиоатная связь расположена в 3' положении нуклеозидного остатка 1, нуклеозидного остатка 2, нуклеозидного остатка 3, нуклеозидного остатка 5, нуклеозидного остатка 6, нуклеозидного остатка 7, нуклеозидного остатка 8, нуклеозидного остатка 9, нуклеозидного остатка 10, нуклеозидного остатка 11, нуклеозидного остатка 12, нуклеозидного остатка 13 или нуклеозидного остатка 14.

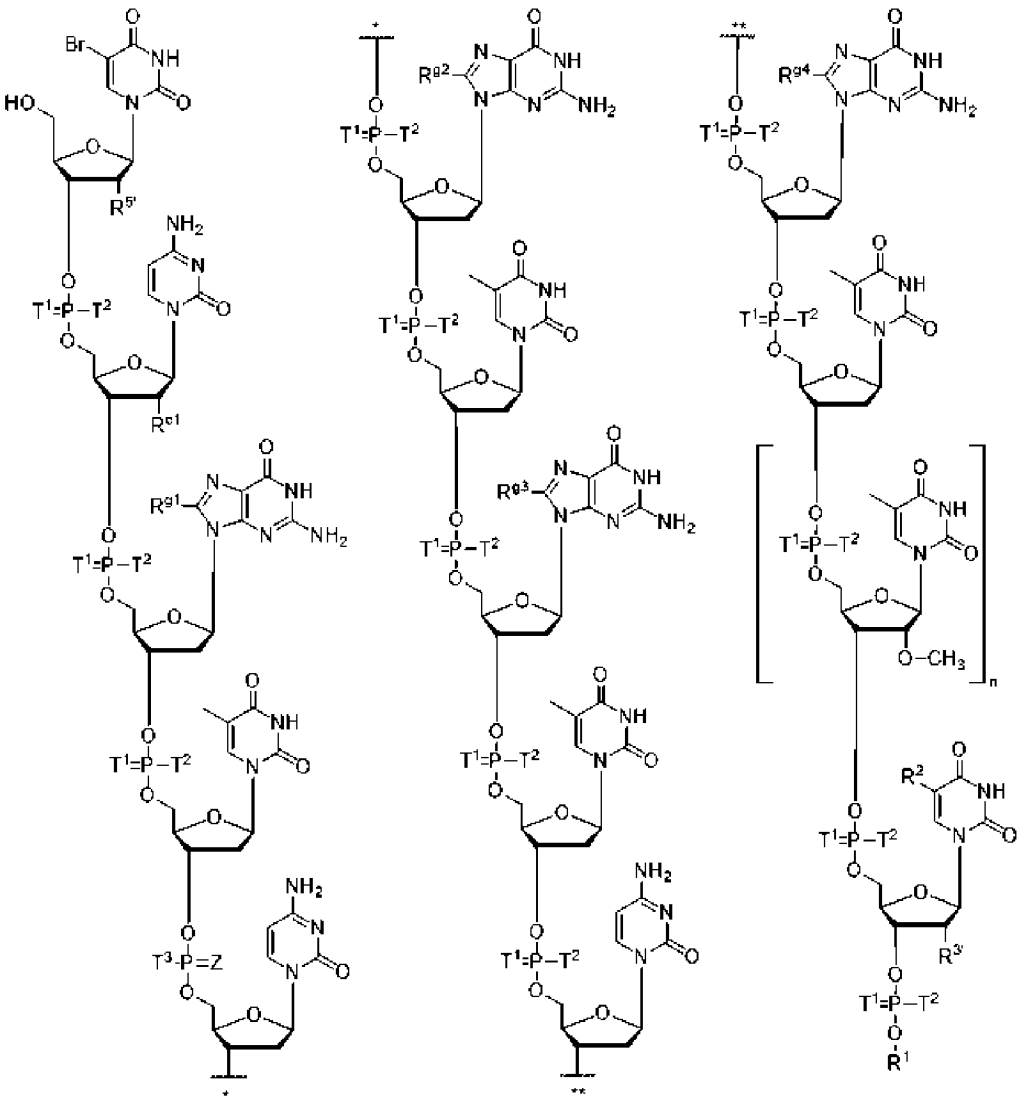
[00331] В некоторых вариантах осуществления, где олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, и где n равно 1, по меньшей мере, одна фосфородитиоатная связь находится между нуклеозидными остатками 1 и 2, между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10, между нуклеозидными остатками 10 и 11, между нуклеозидными остатками 11 и 12 или между нуклеозидными остатками 12 и 13. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и $T^{2,}$ где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, и где n равно 1, по меньшей мере, одна фосфородитиоатная связь расположена в 3' положении нуклеозидного остатка 1, нуклеозидного остатка 2, нуклеозидного остатка 3, нуклеозидного остатка 5, нуклеозидного остатка 6, нуклеозидного остатка 7, нуклеозидного остатка 8, нуклеозидного остатка 9, нуклеозидного остатка 10, нуклеозидного остатка 11, нуклеозидного остатка 12, нуклеозидного остатка 13 или нуклеозидного остатка 14.

[00332] В некоторых вариантах осуществления, где олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2

представляет собой S^-, и где n равно 2, по меньшей мере, одна фосфородитиоатная связь находится между нуклеозидными остатками 1 и 2, между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10, между нуклеозидными остатками 10 и 11, между нуклеозидными остатками 11 и 12, между нуклеозидными остатками 12 и 13 или между нуклеозидными остатками 13 и 14. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, и где n равно 2, по меньшей мере, одна фосфородитиоатная связь расположена в 3' положении нуклеозидного остатка 1, нуклеозидного остатка 2, нуклеозидного остатка 3, нуклеозидного остатка 5, нуклеозидного остатка 6, нуклеозидного остатка 7, нуклеозидного остатка 8, нуклеозидного остатка 9, нуклеозидного остатка 10, нуклеозидного остатка 11, нуклеозидного остатка 12, нуклеозидного остатка 13, нуклеозидного остатка 14 или остатка 15.

[00333] В других вариантах осуществления, где олигонуклеотид имеет, по меньшей мере, две фосфородитиоатные связи или содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-, положения одной или обеих фосфородитиоатных связей или пар T^1 и T^2 могут быть указаны. Следует признать, что положения одной или обеих фосфородитиоатных связей могут варьироваться независимо друг от друга.

[00334] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе представлен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C')



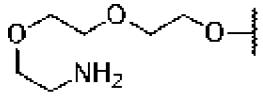
(C'),

где:

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

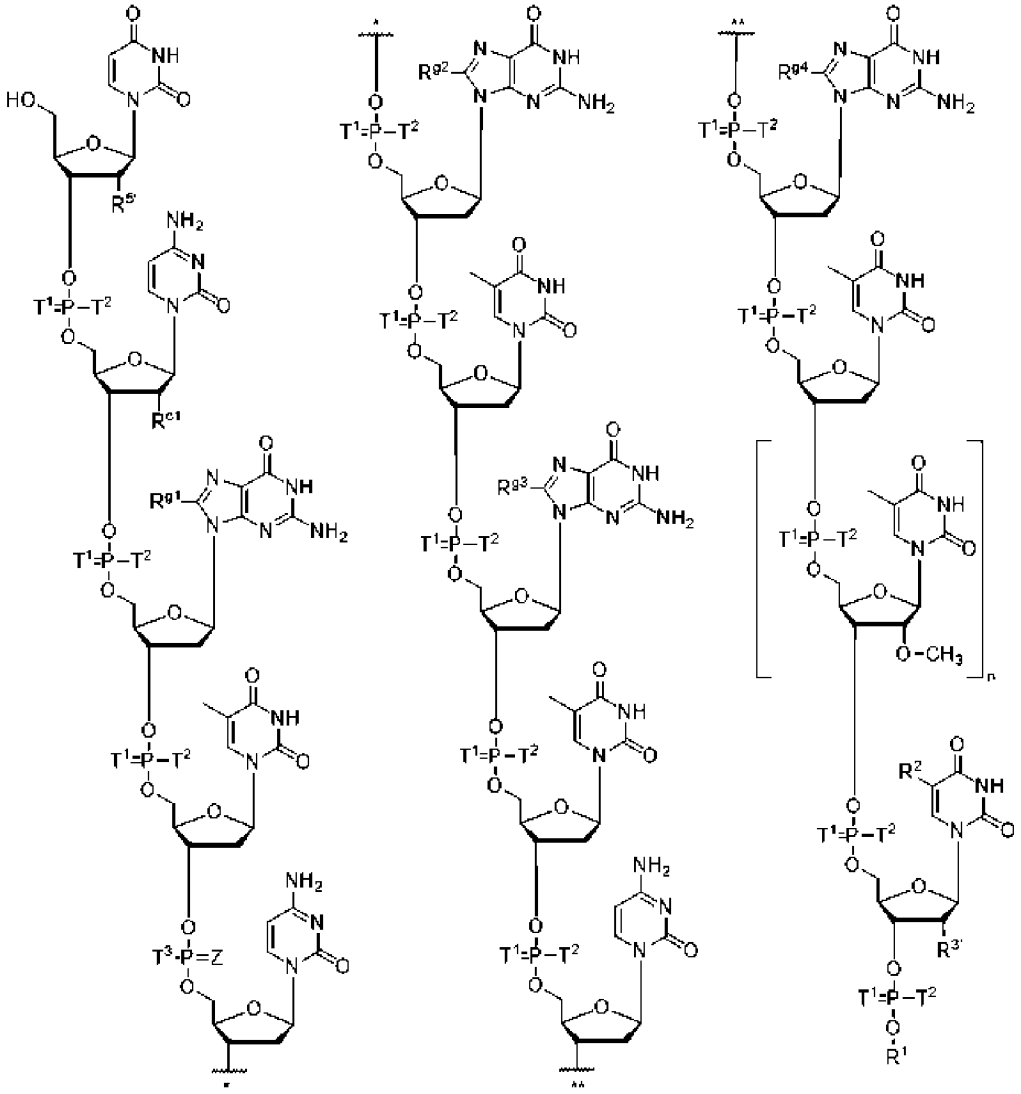
R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00335] В других вариантах осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе представлен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C'')



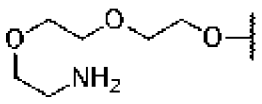
(C"),

где:

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

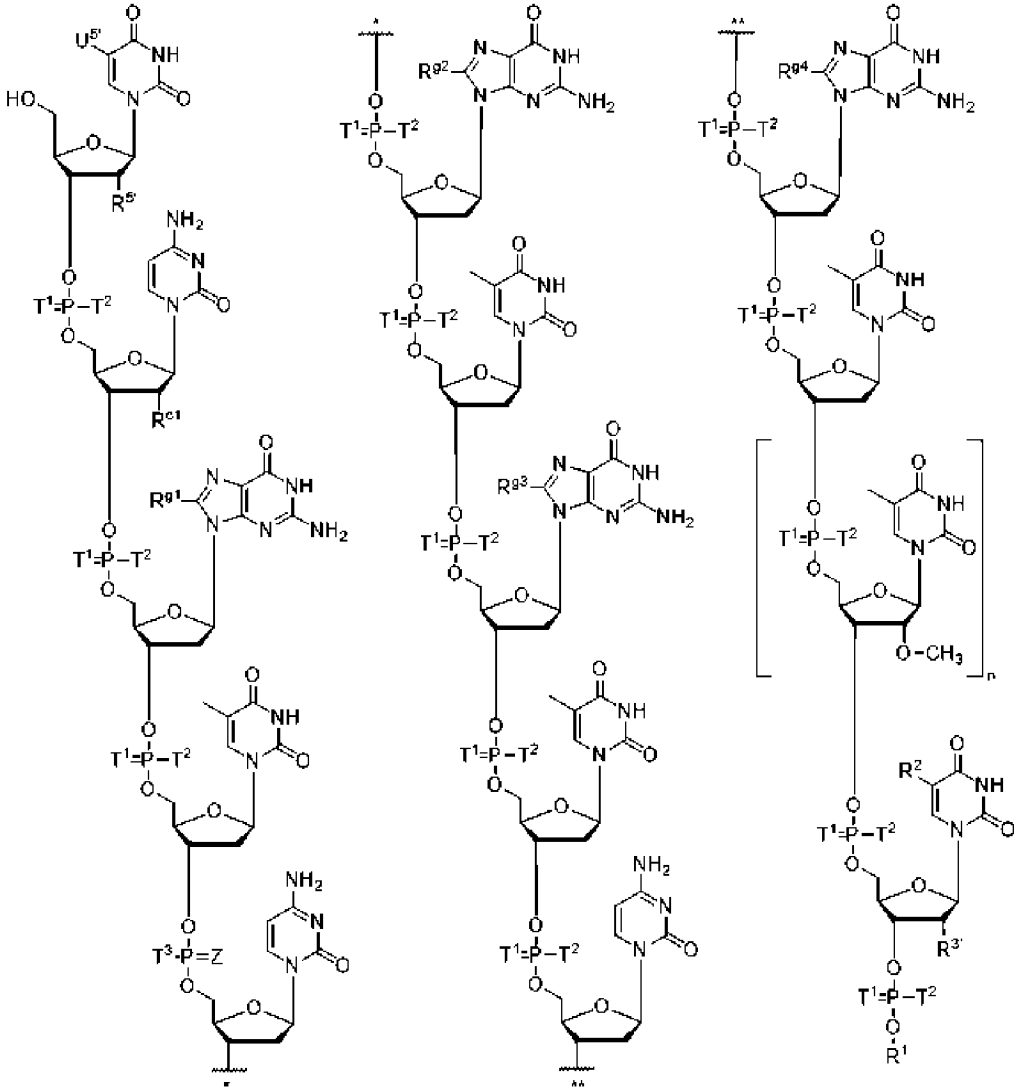
R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00336] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, Z представляет собой S. В дополнительных вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

[00337] В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе представлен олигонуклеотид формулы (C)



(C),

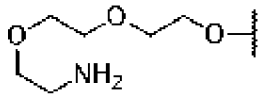
где ~~~ * и ~~~ ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

при условии, что олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару

геминальных T^1 и $T^{2,}$ где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S,

T^3 представляет собой группу , где ~~~ указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H;

Rc1 представляет собой -H;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -метил; и

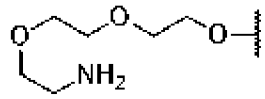
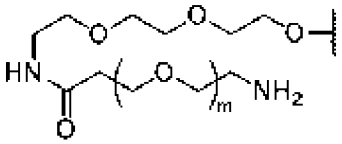
п равно 1,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00338] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеизложенного, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и $T^{2,}$ где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, находится между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В других вариантах осуществления вышеизложенного, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и $T^{2,}$ где T^1 представляет собой S и T^2 представляет собой S, и где, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S и T^2 представляет собой S, находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11.

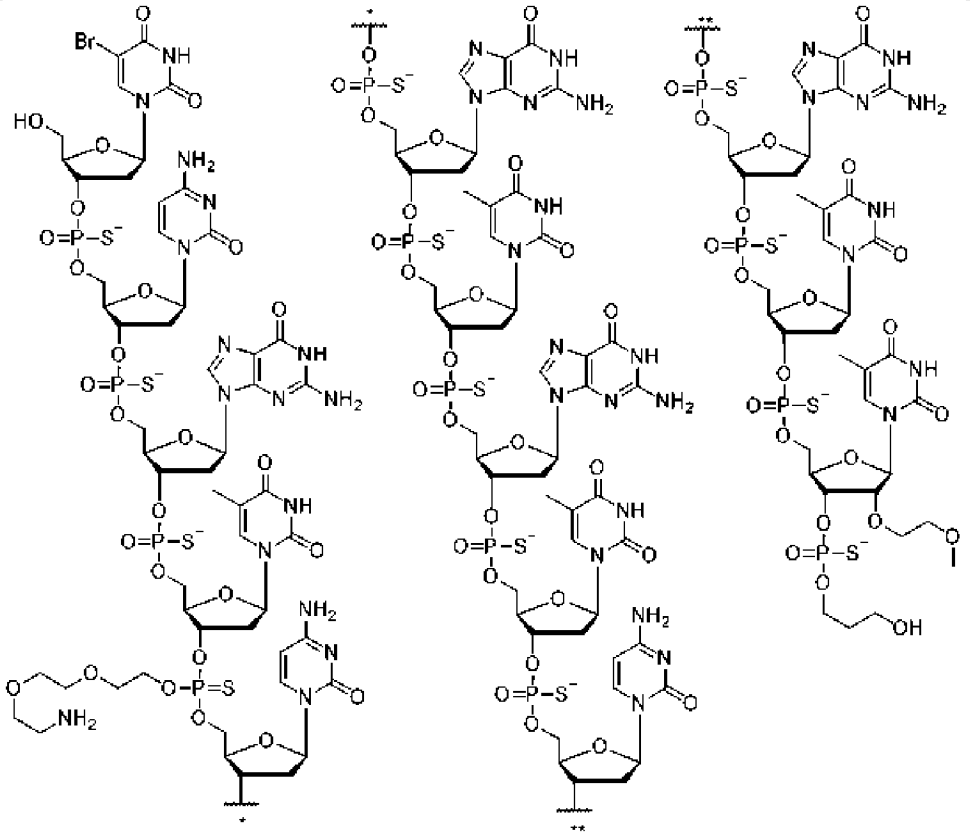
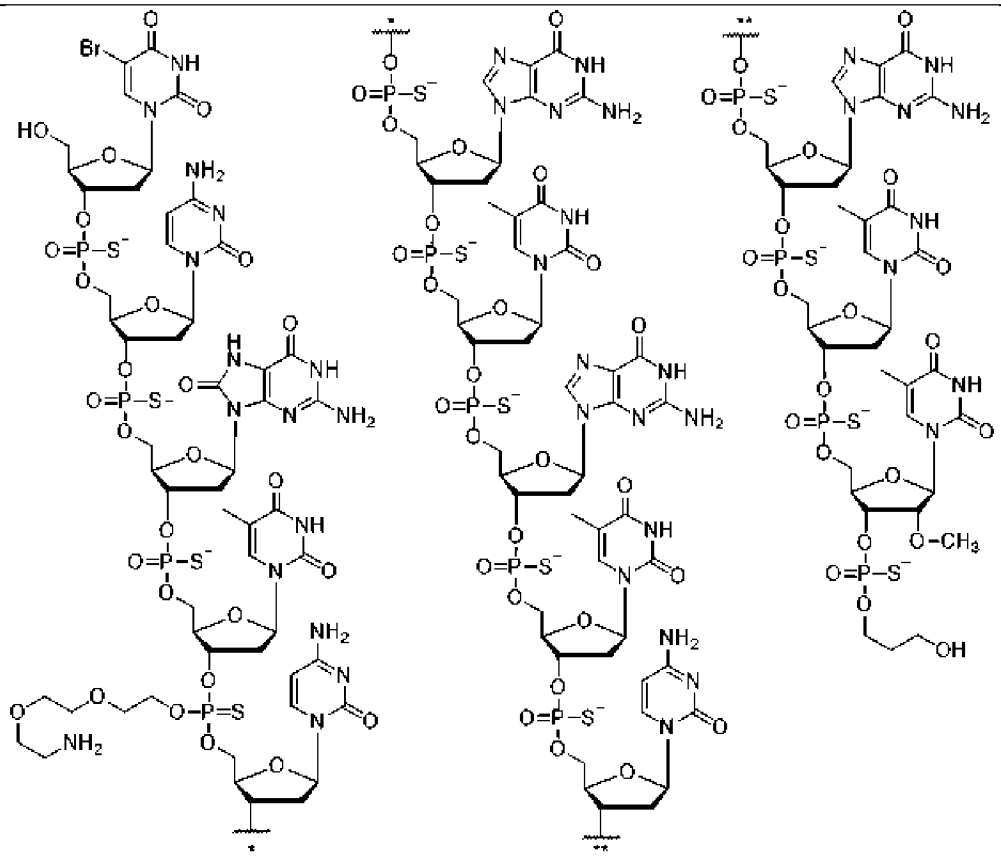
[00339] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит одну или две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, и где одна или две пары геминальных T^1 и T^2 находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, а T^2 представляет собой S, и где пара геминальных T^1 и T^2 находится между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8,

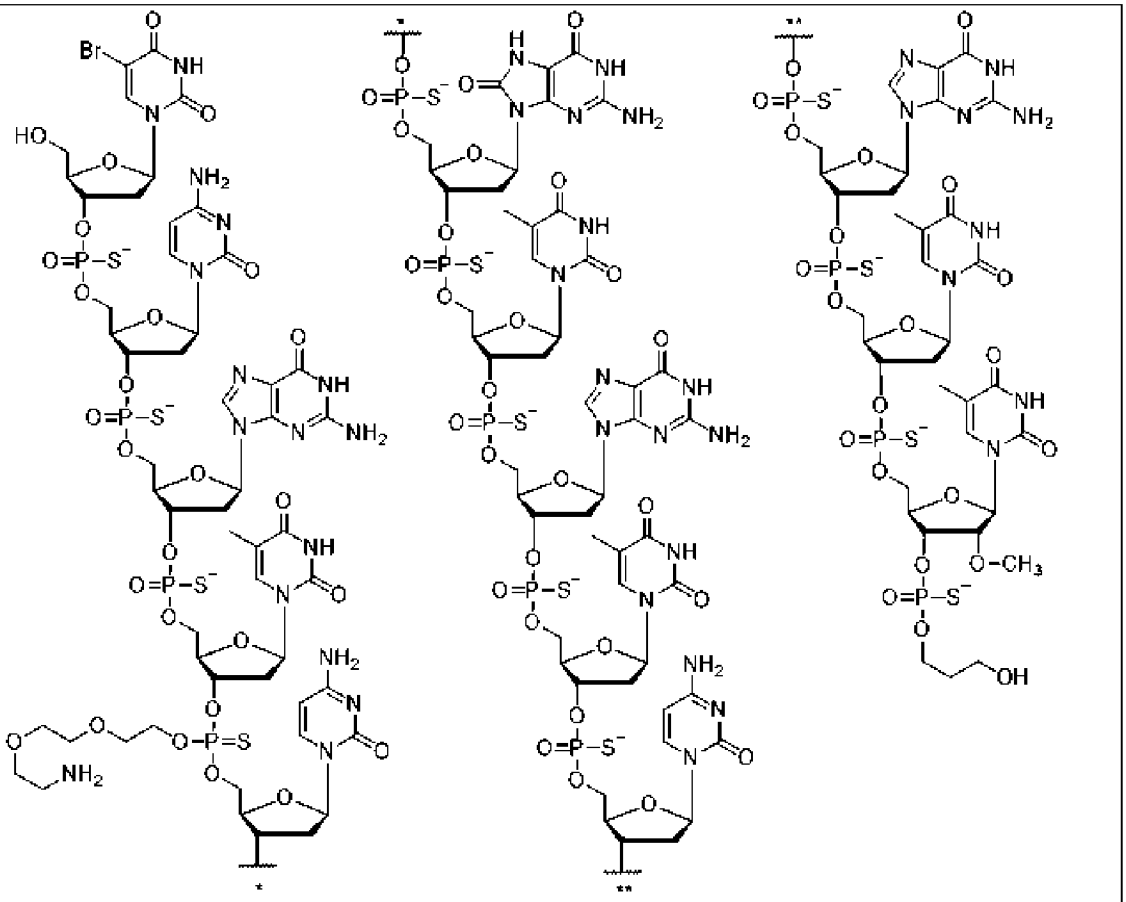
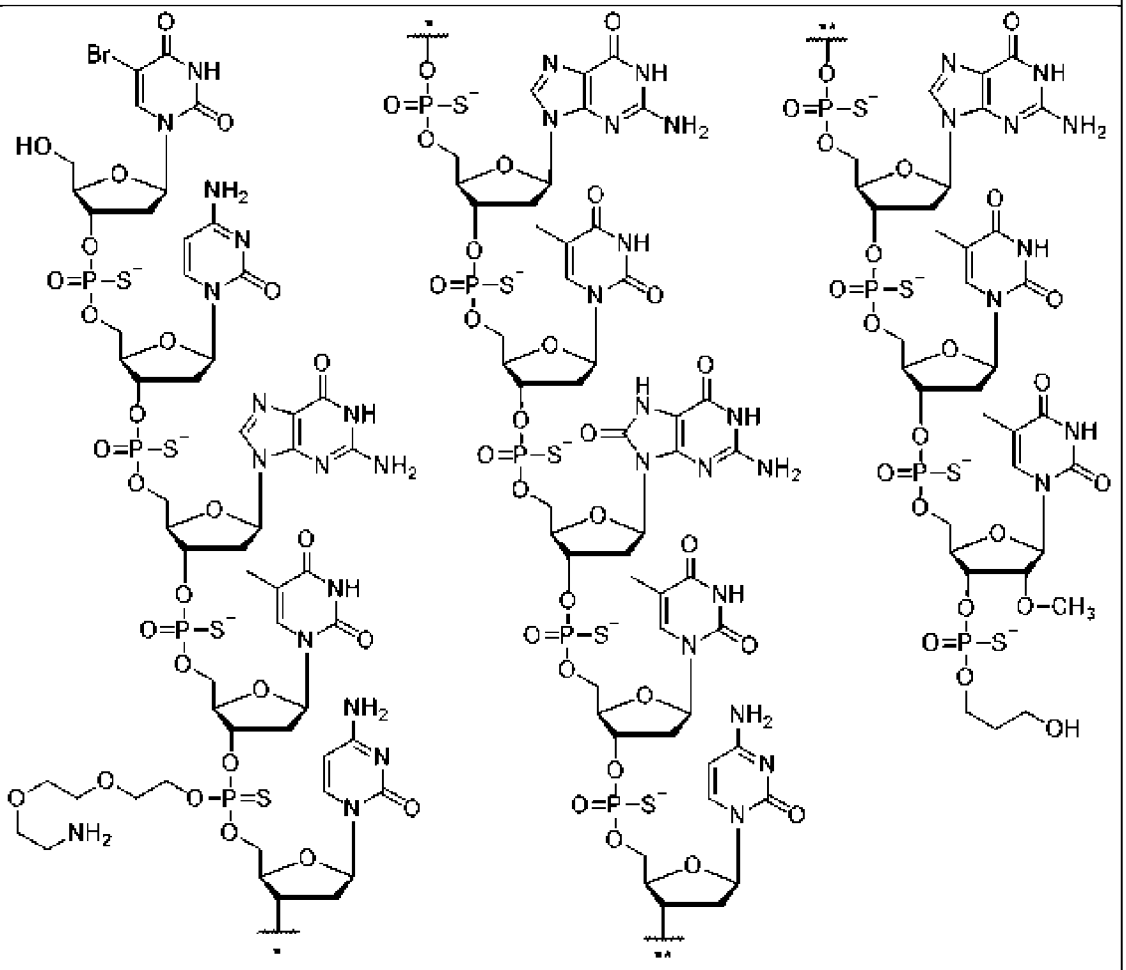
между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В некоторых других вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, и где две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S и T^2 представляет собой S, находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11.

[00340] В некоторых вариантах осуществления, $R^{5'}$ представляет собой H. В других вариантах осуществления, $R^{5'}$ представляет собой метокси. В некоторых вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой H. В других вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой метокси. В других вариантах осуществления, R^2 представляет собой метил. В еще других вариантах осуществления, R^2 представляет собой H. В еще других дополнительных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, T^3 представляет собой . В других вариантах осуществления, T^3 представляет собой . В некоторых вариантах осуществления, m представляет собой целое число от 20 до 25.

[00341] В другом аспекте, иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 9** и ***таблицы* 10,** или его фармацевтически приемлемую соль. В других вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 10,** или его фармацевтически приемлемую соль.

Таблица 9. Модифицированные олигонуклеотидные структуры (с PEG_3NH_2)

Соед. №	Структура
1.1a	
2.1a	

2.2a	
2.3a	

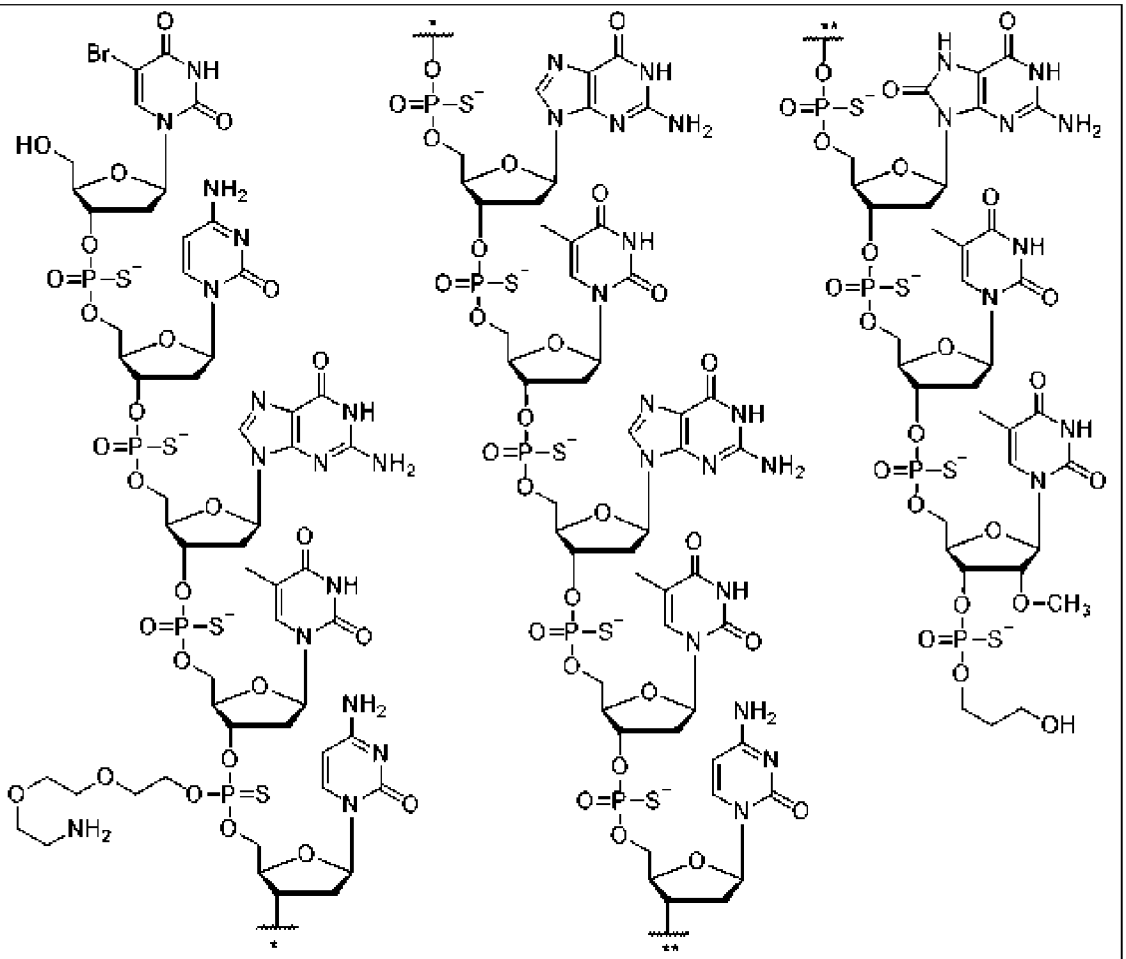
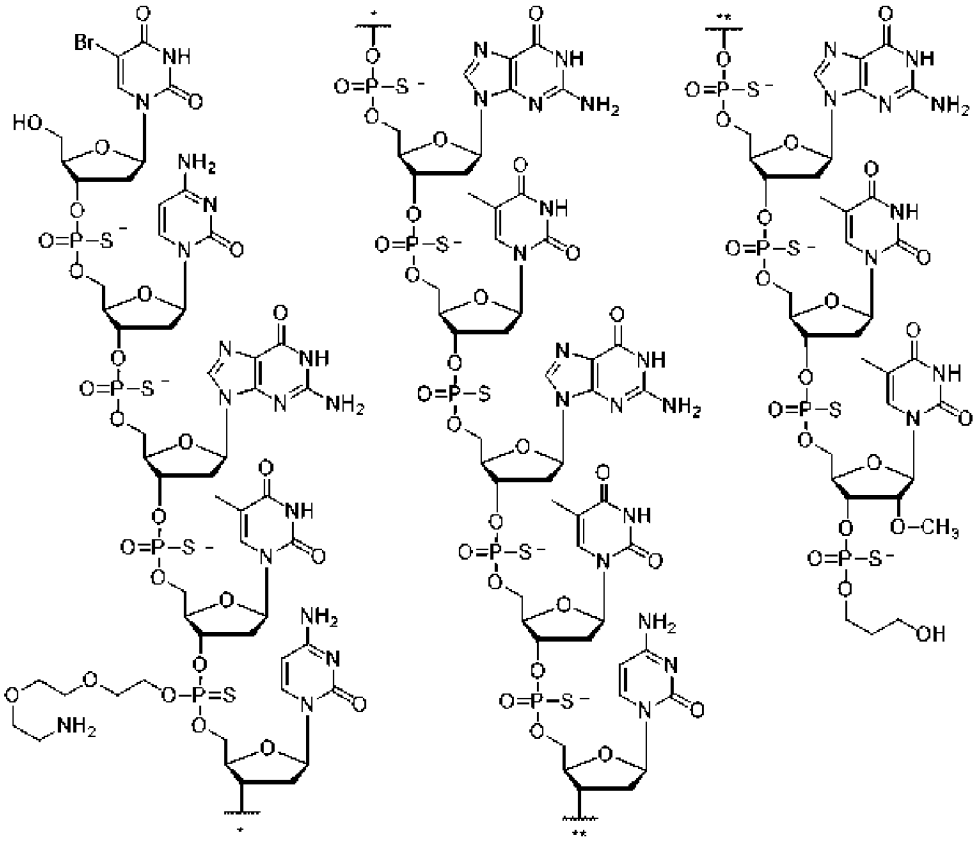
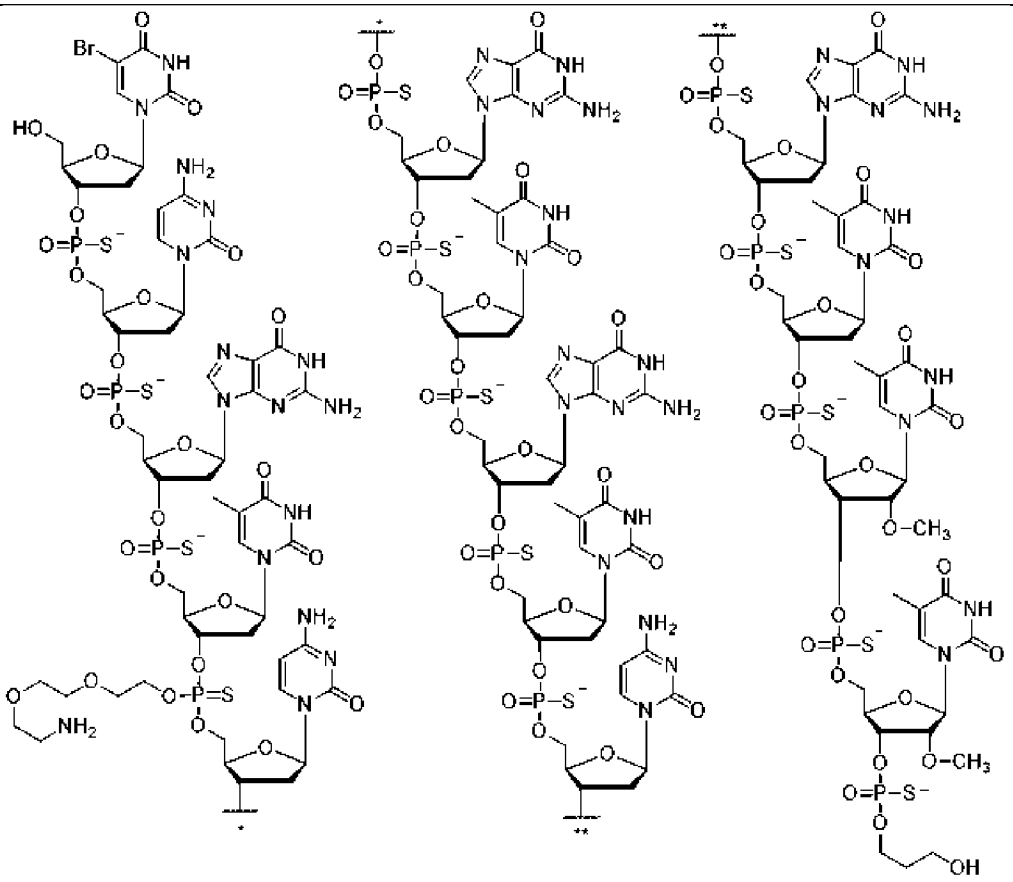
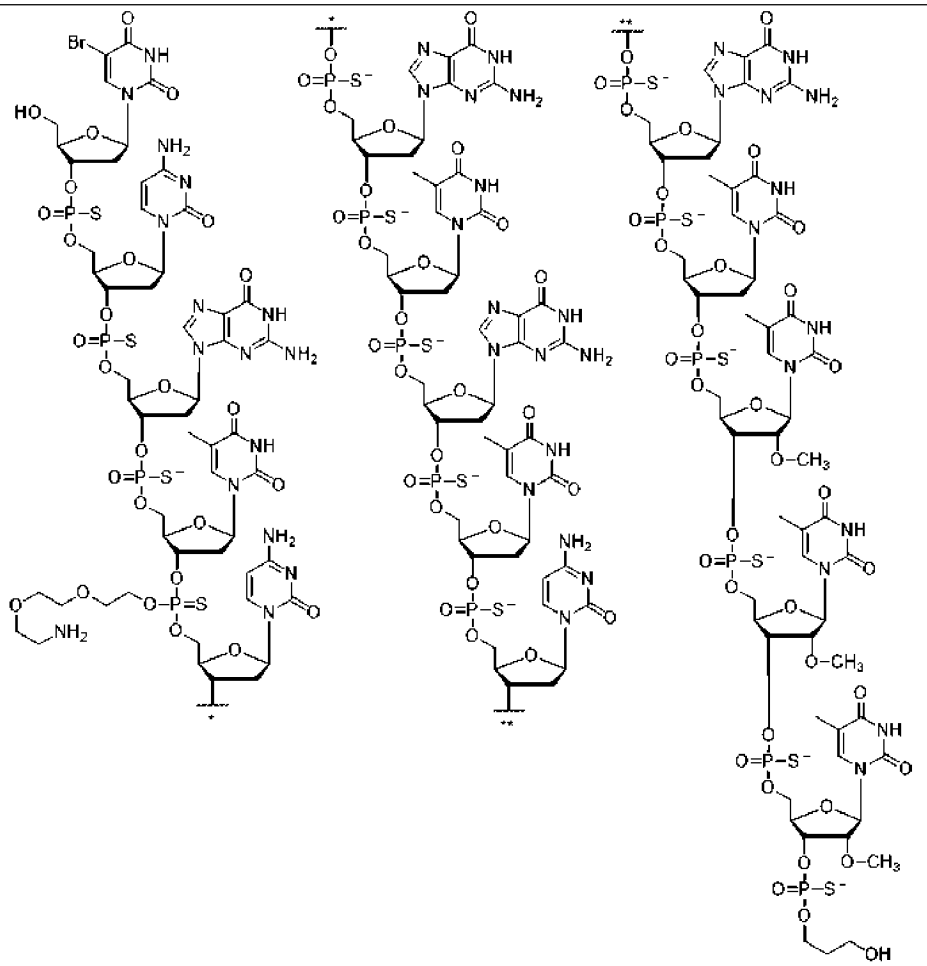
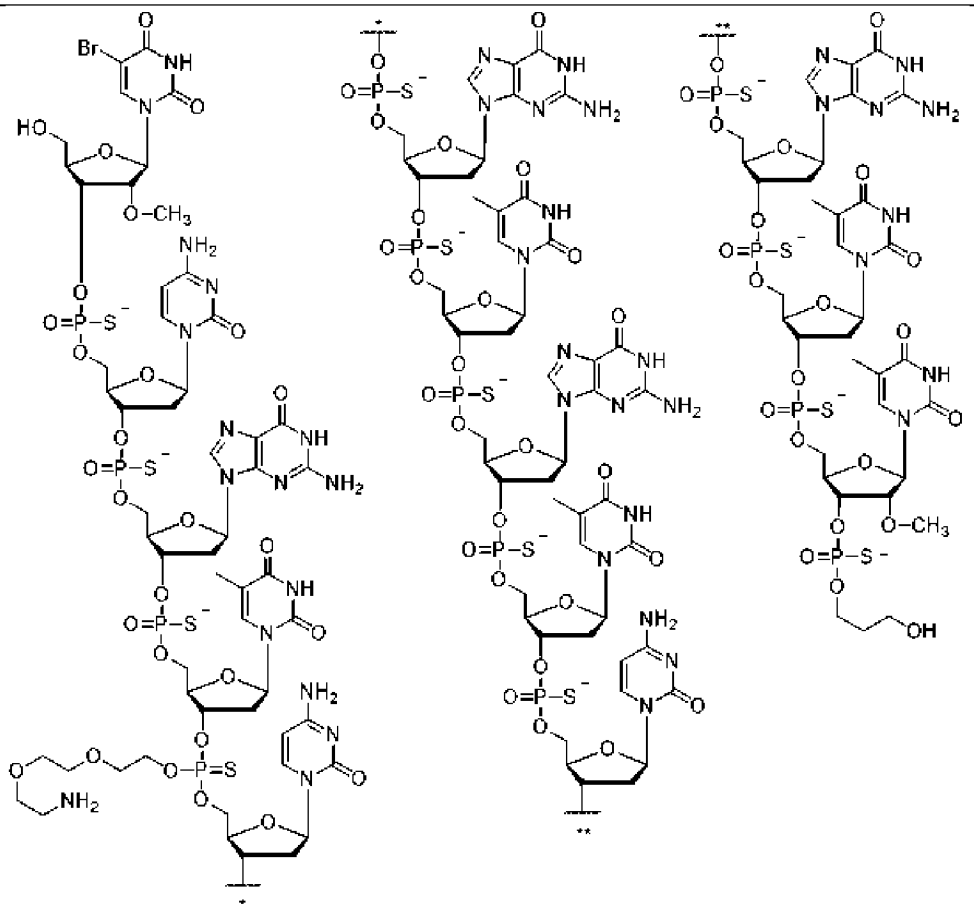
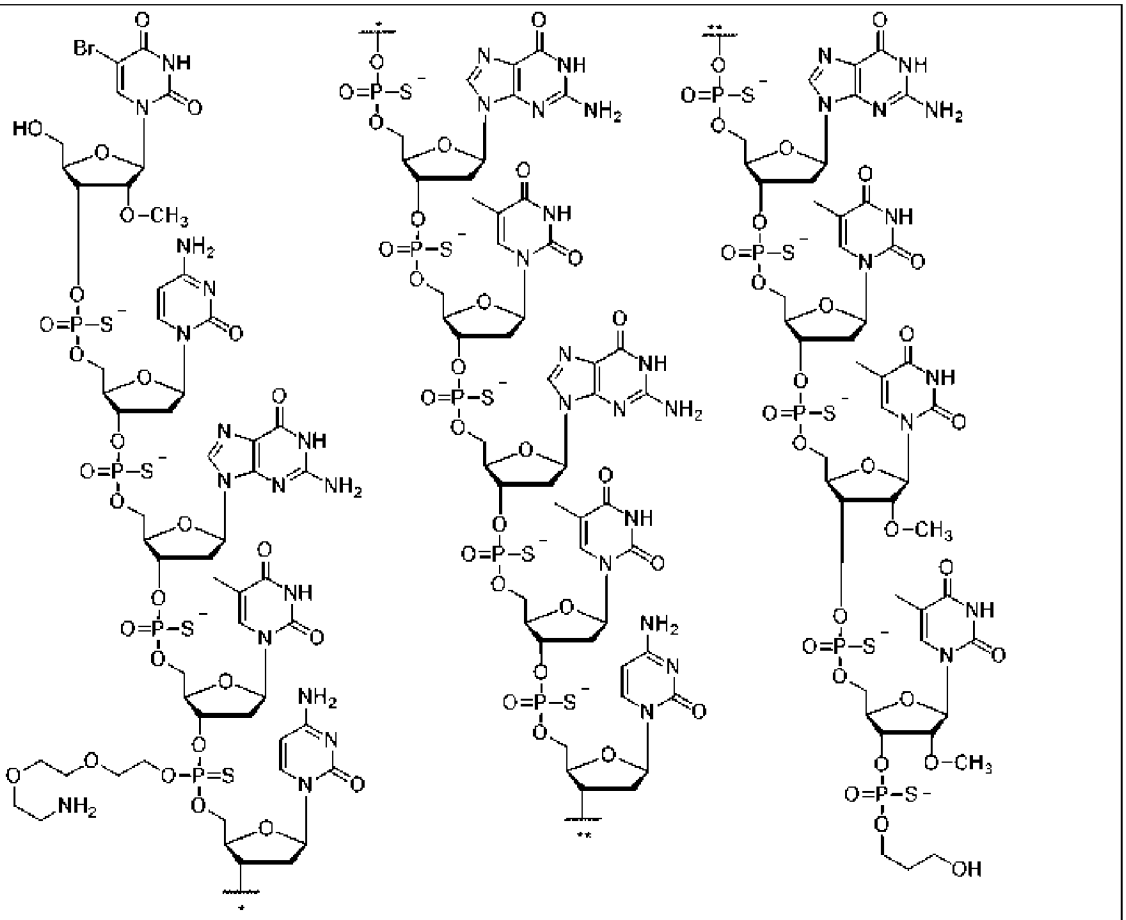
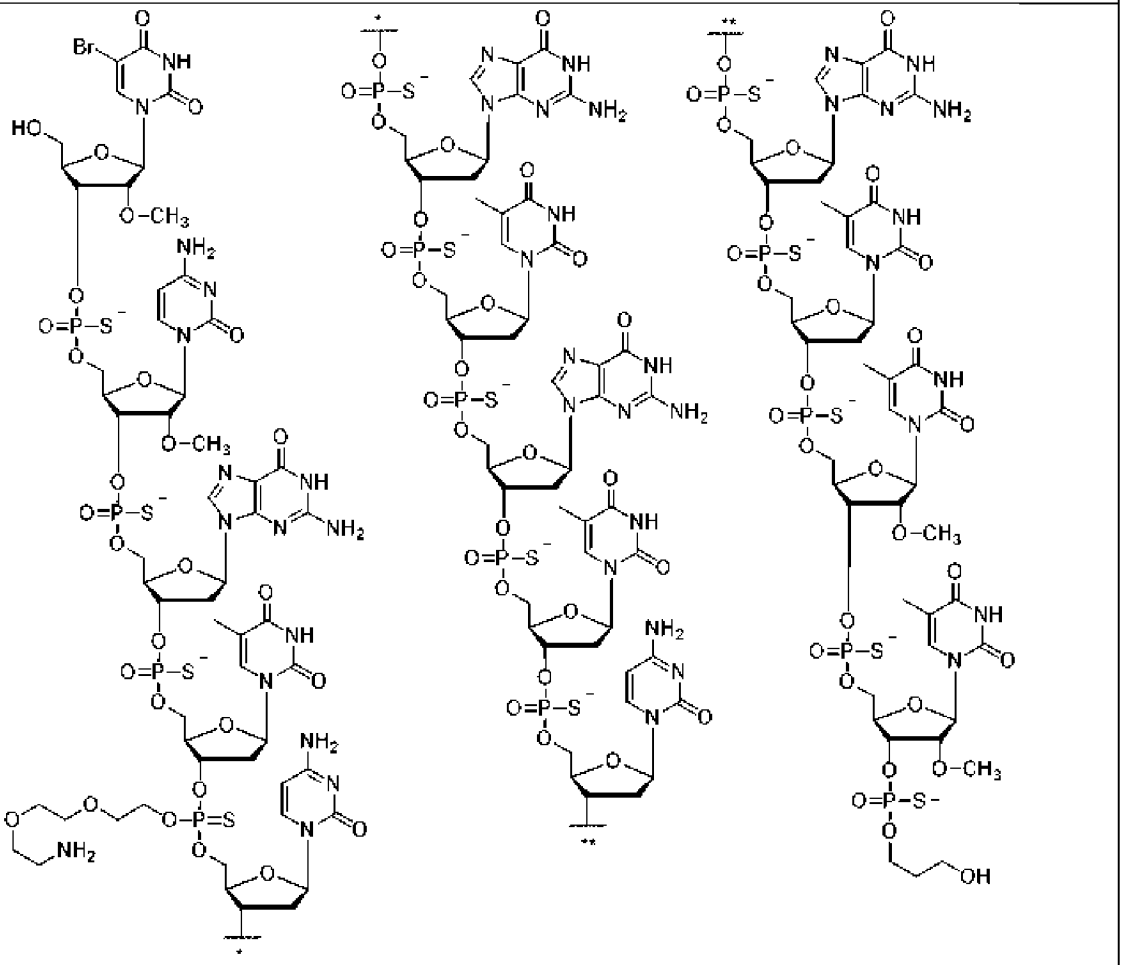
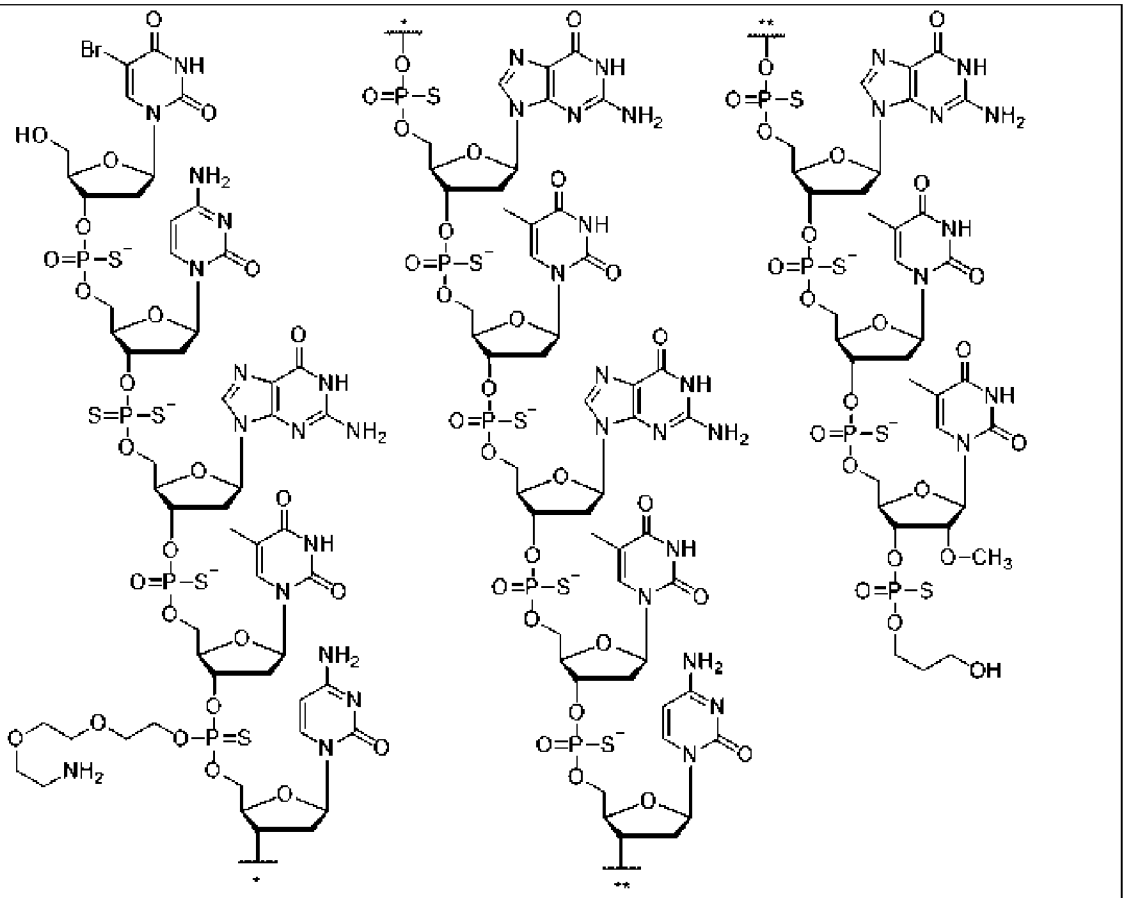
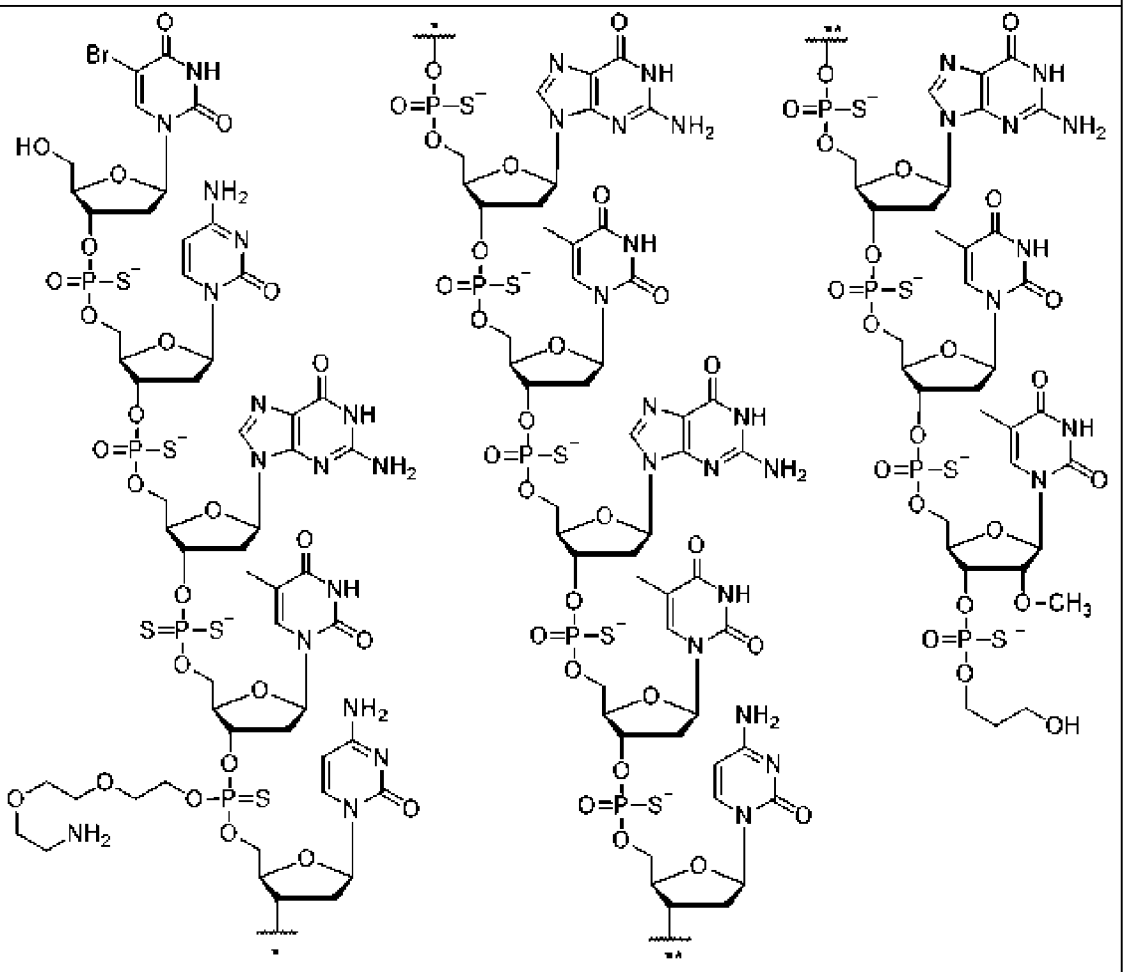
2.4a	

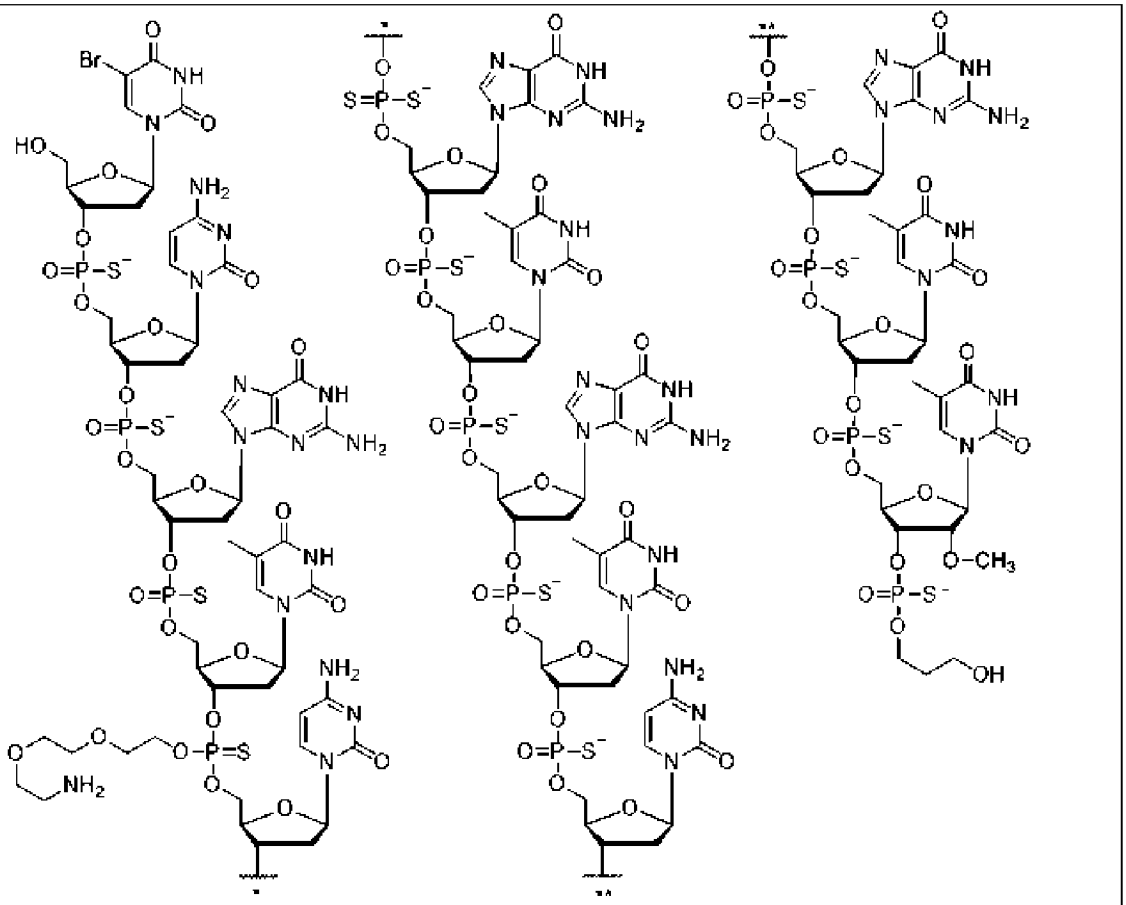
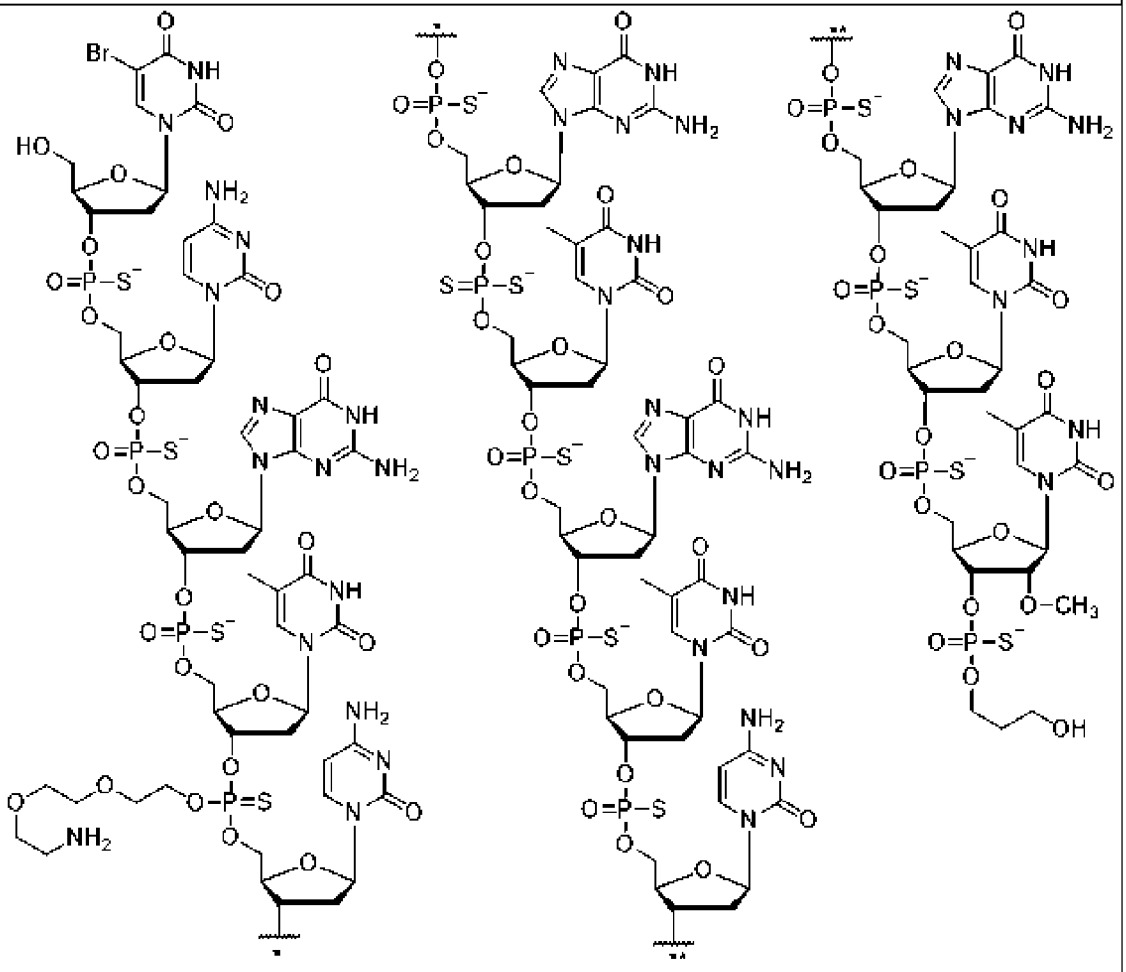
Таблица 10. Модифицированные олигонуклеотидные структуры (с -PEG_3NH_2)

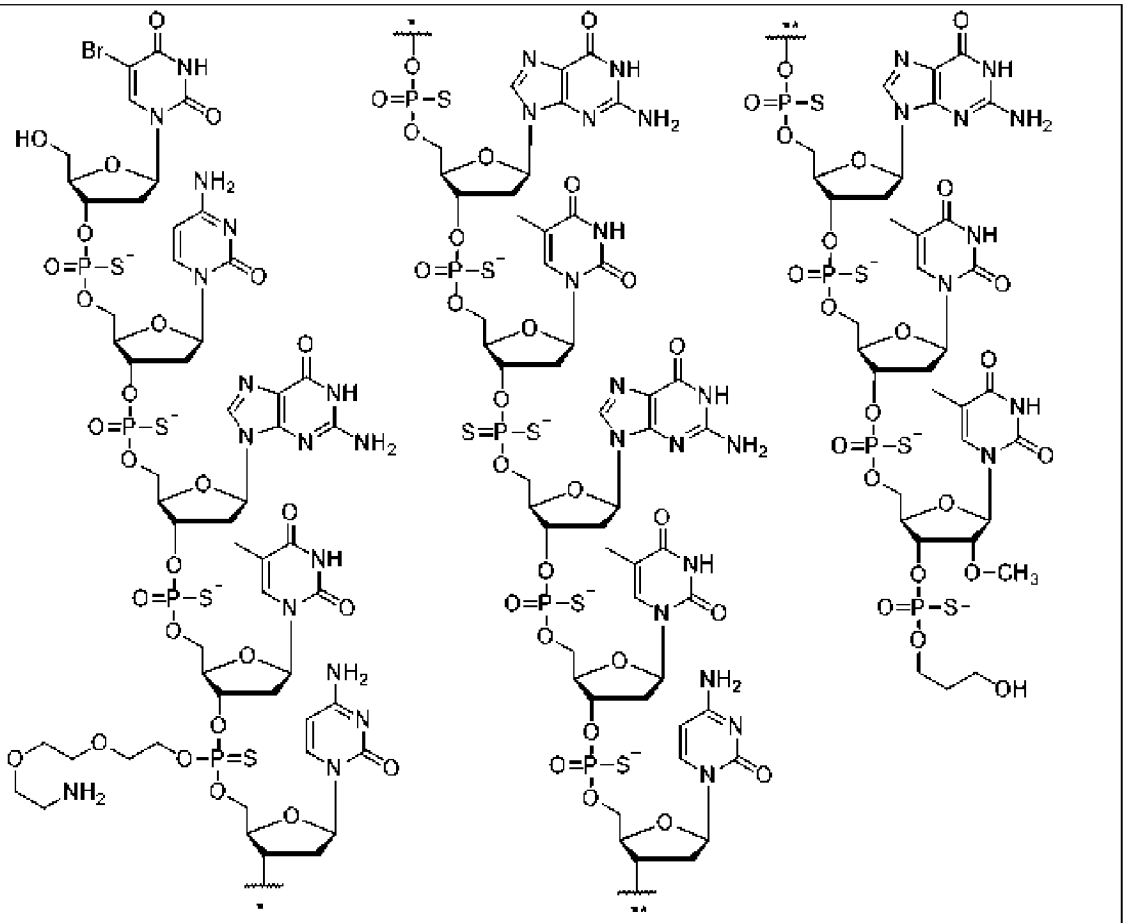
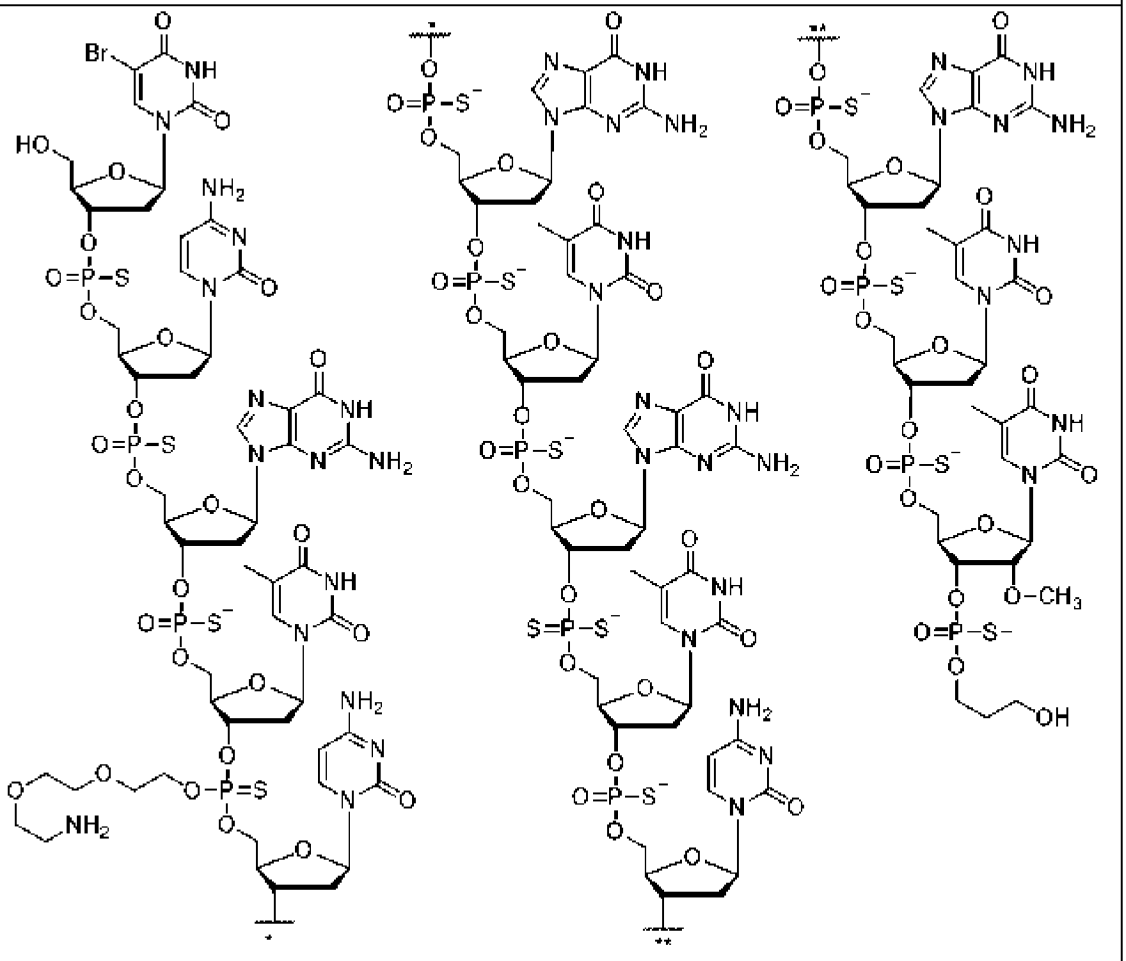
Соед. №	Структура
3.1a	
3.2a	

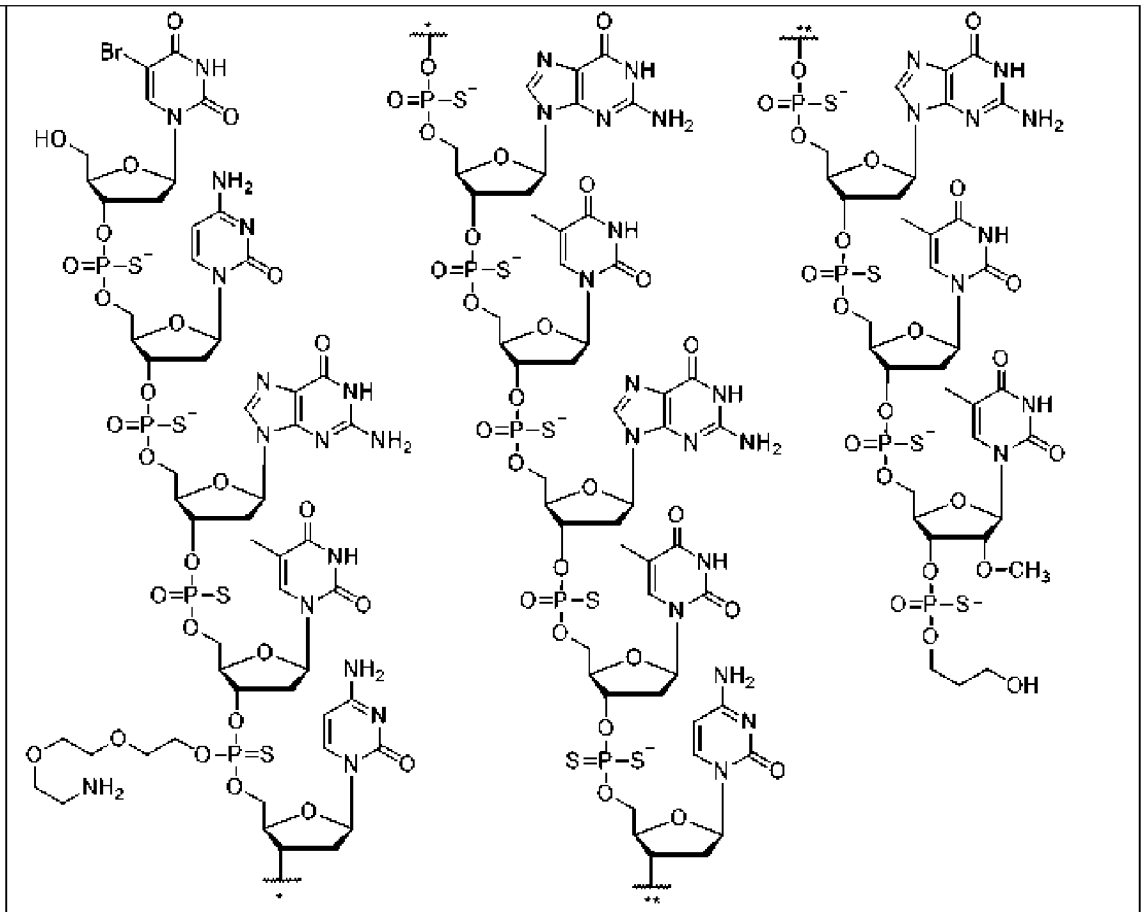
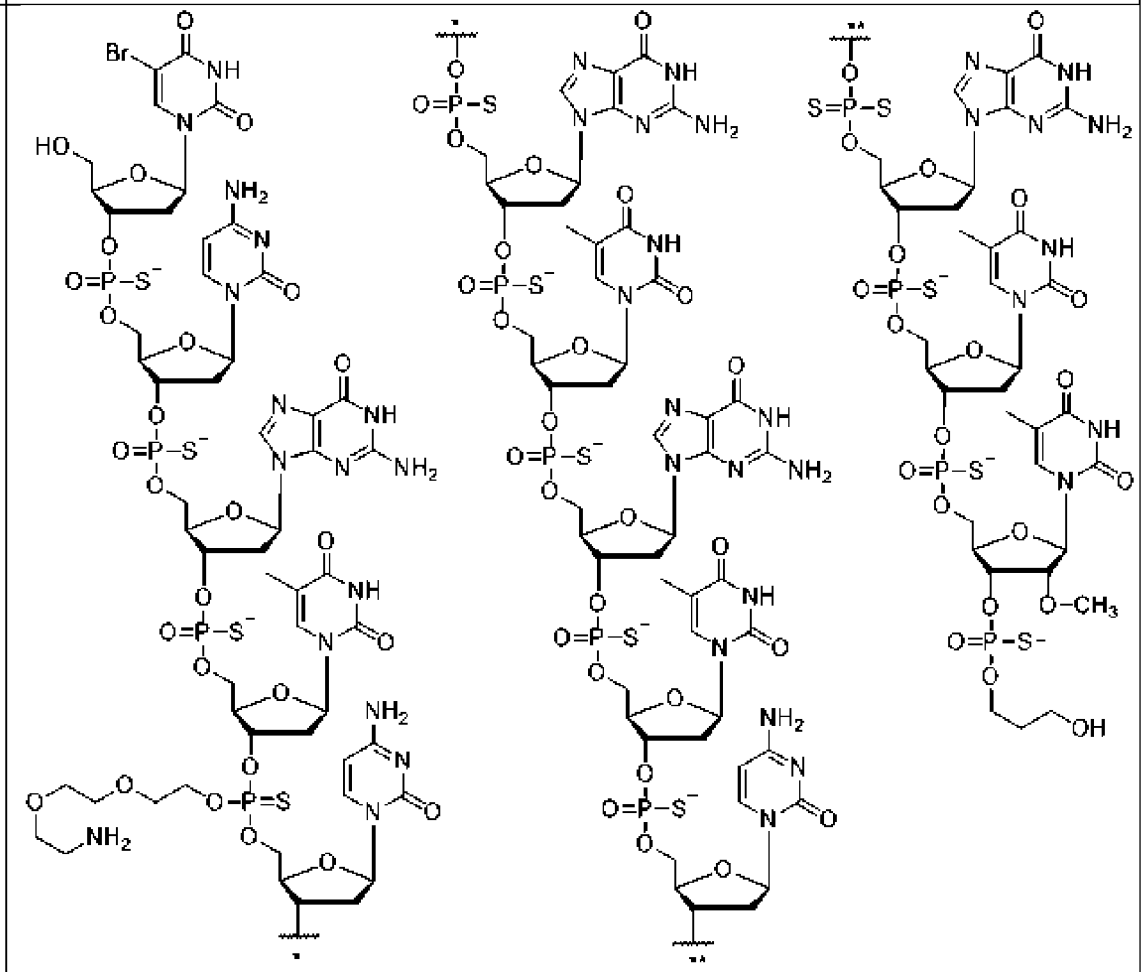
3.3a	
4.1a	

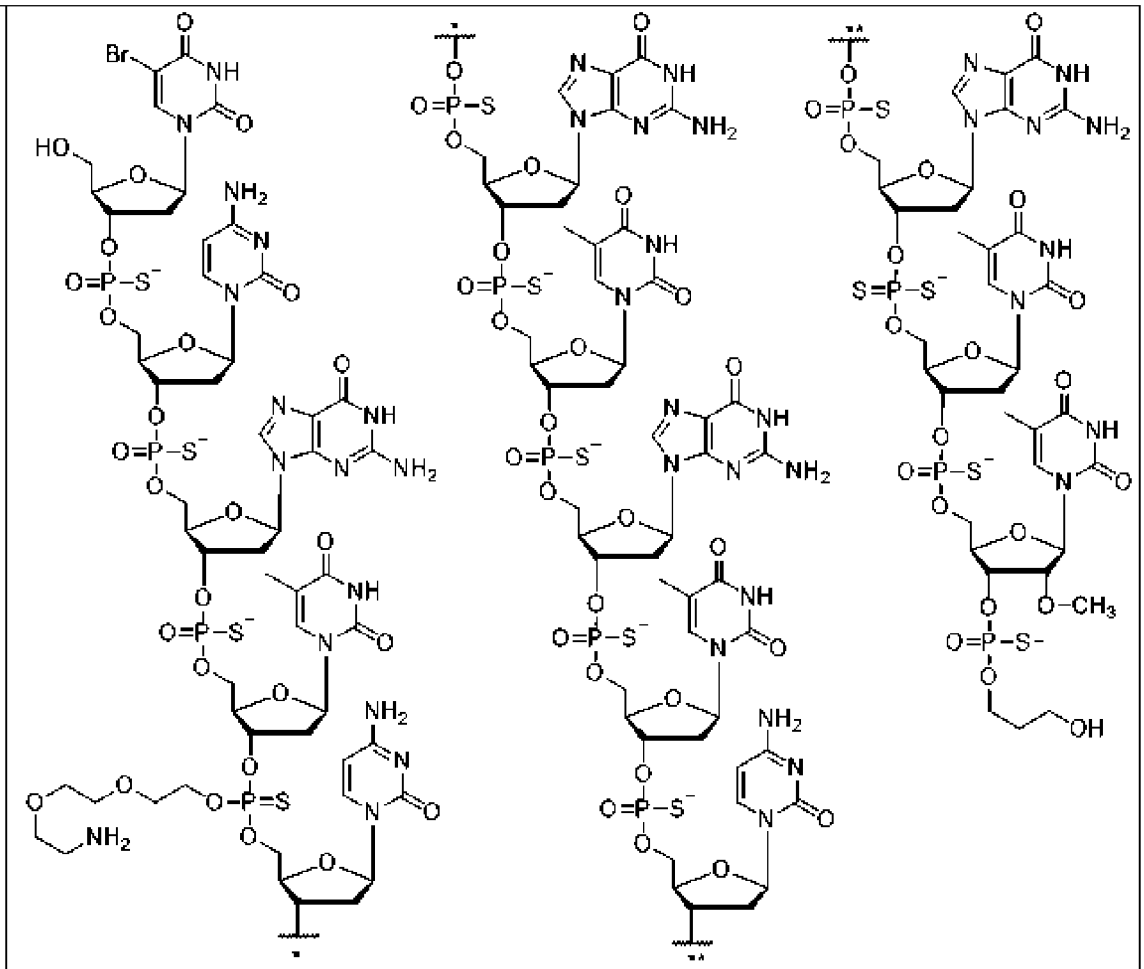
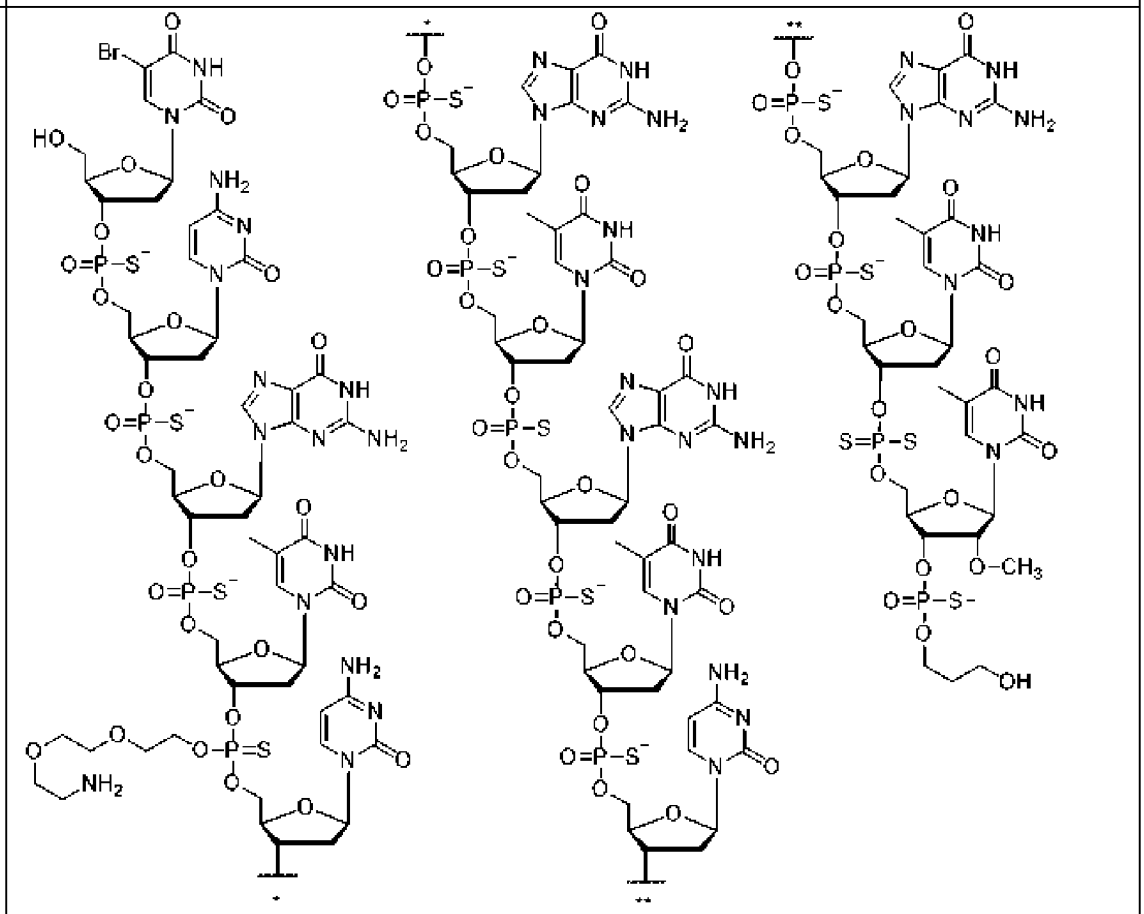
4.2a	
4.3a	

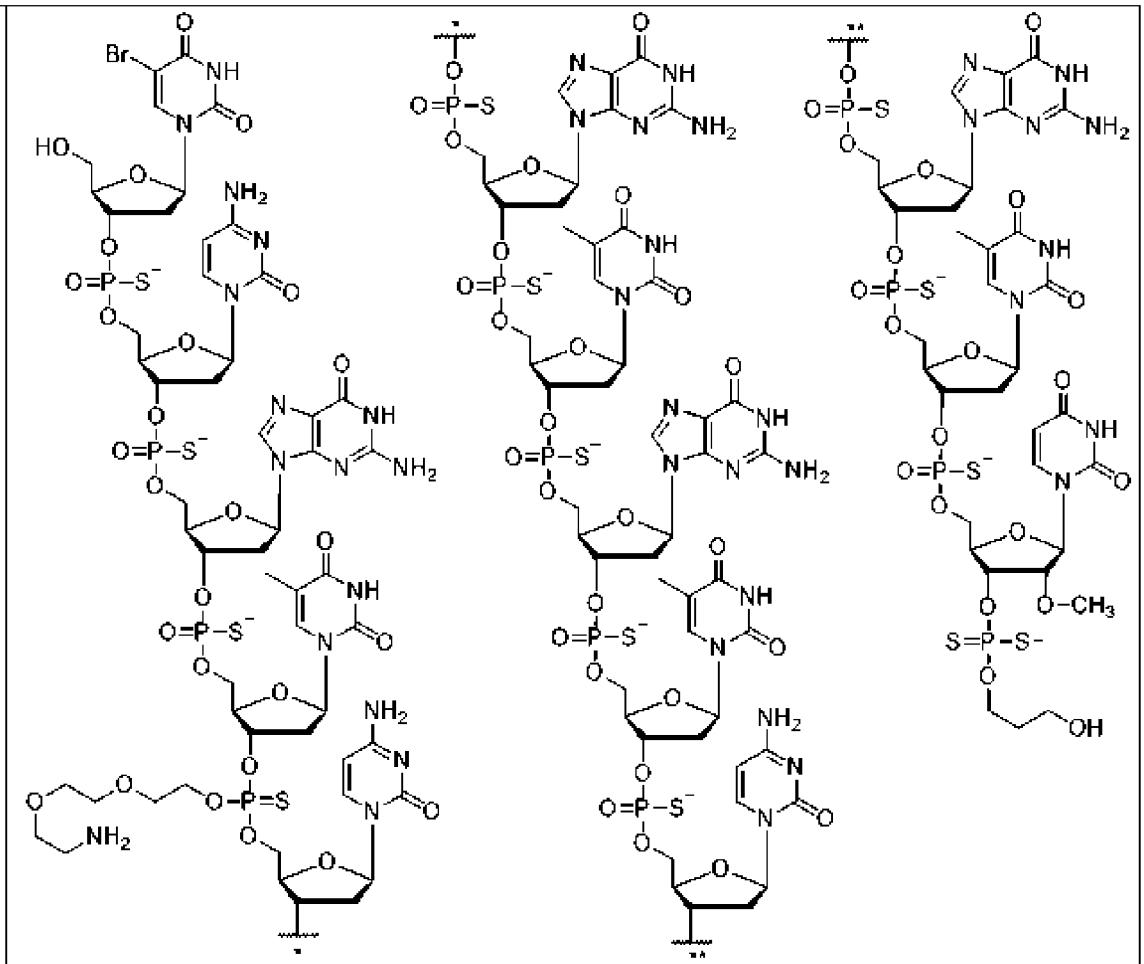
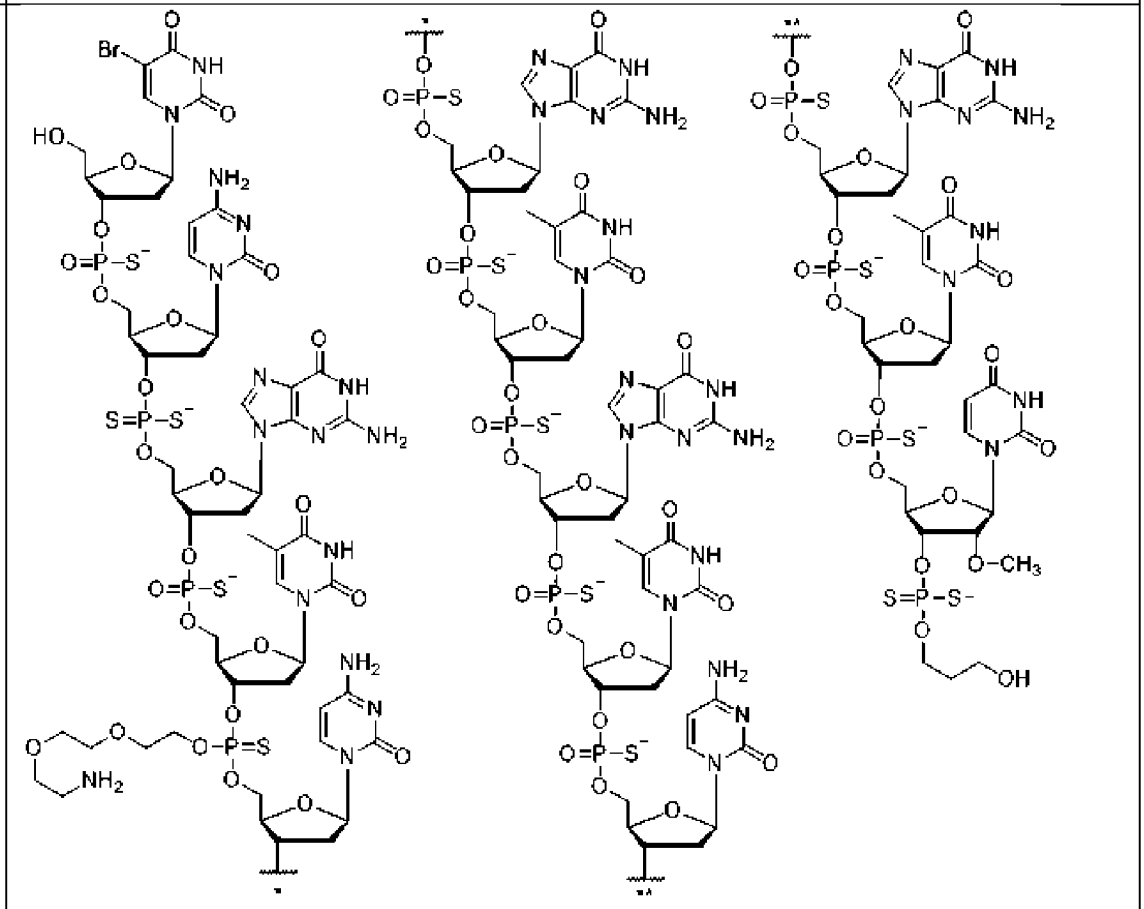
5.1a	
5.2a	

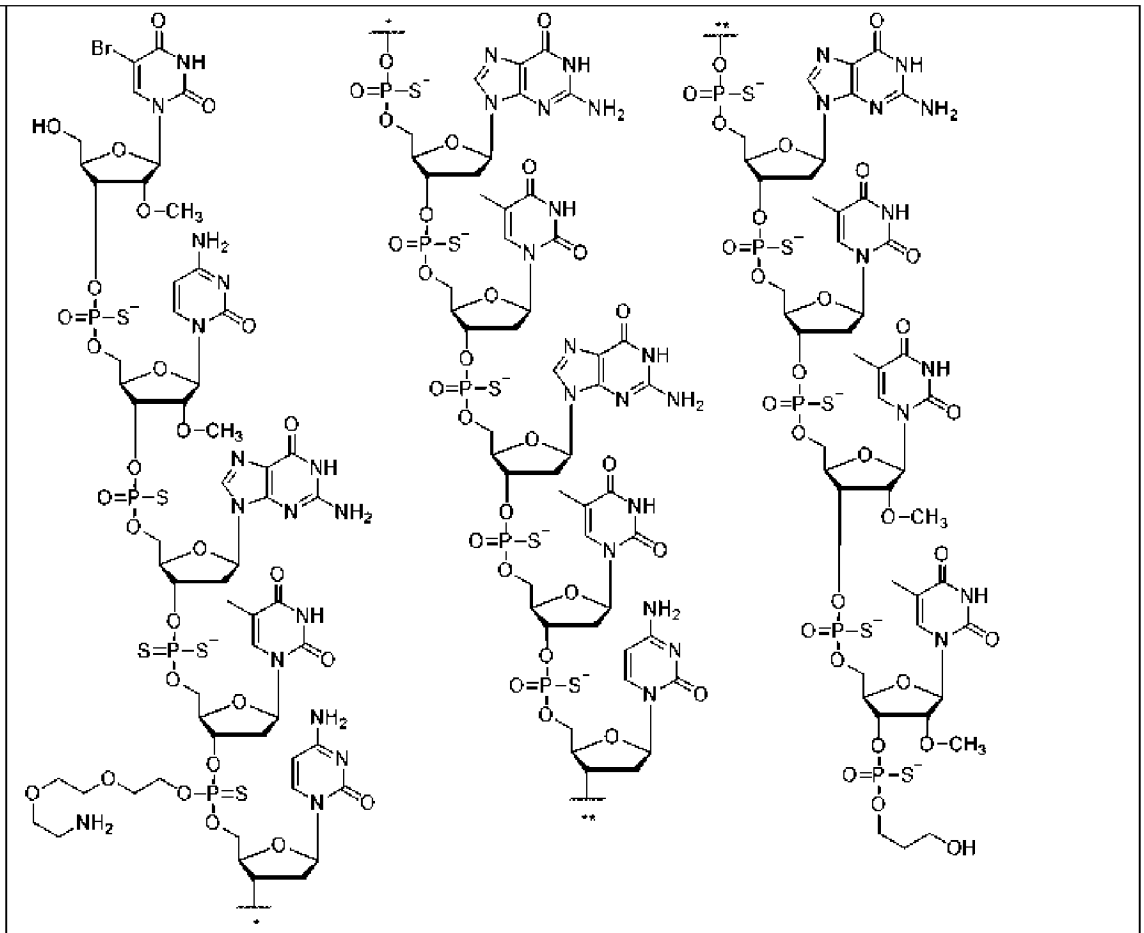
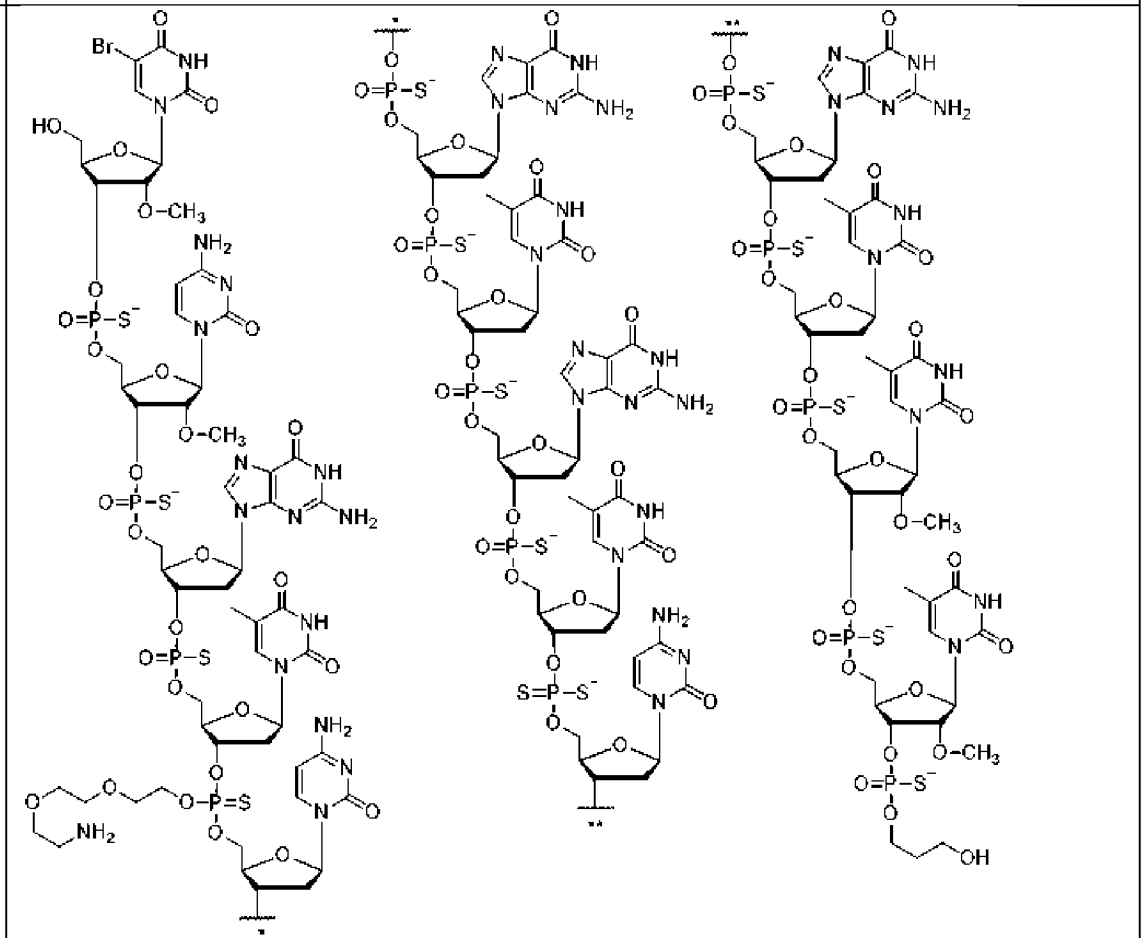
5.3a	
5.4a	

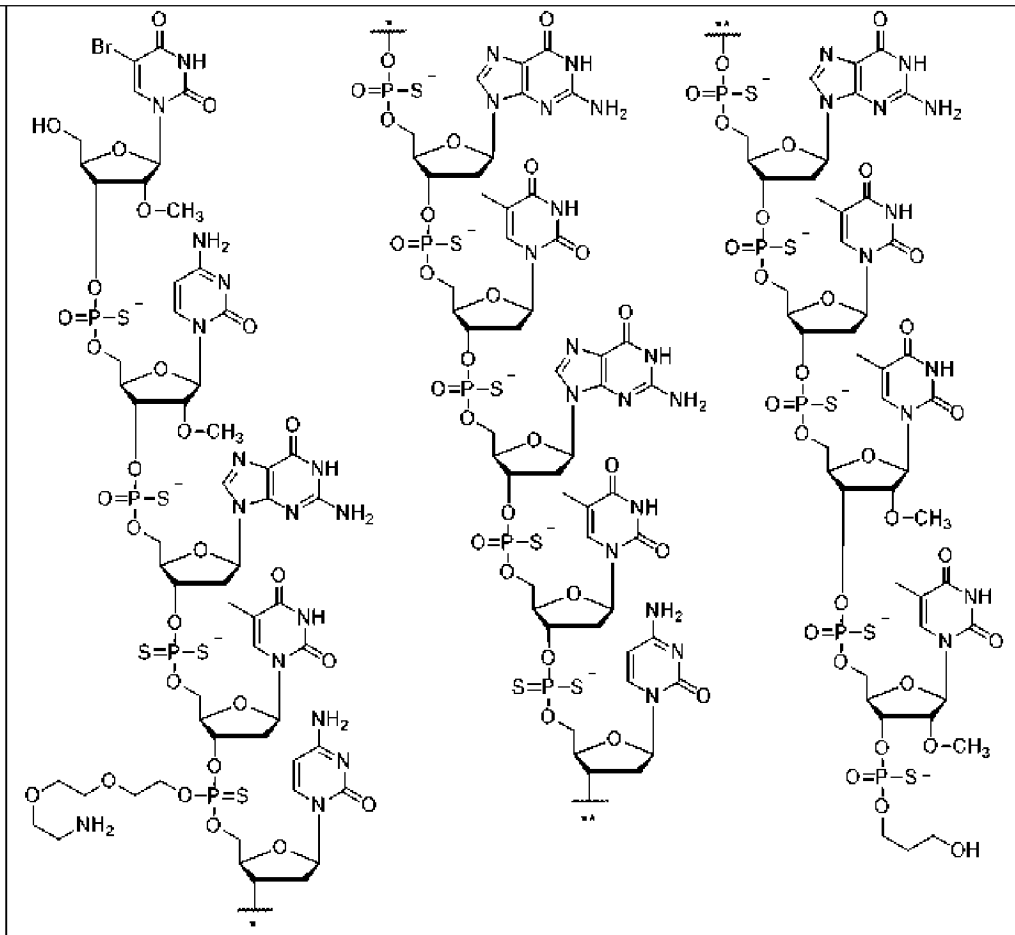
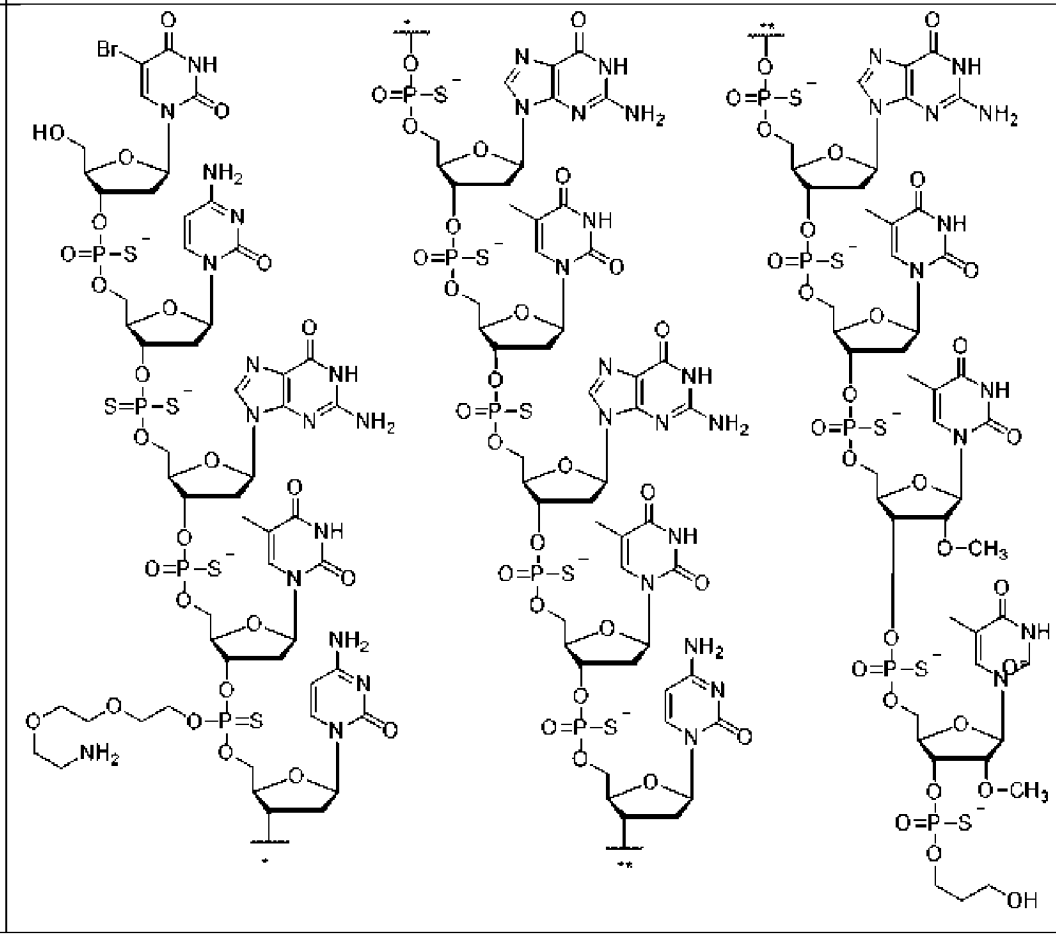
5.5a	
5.6a	

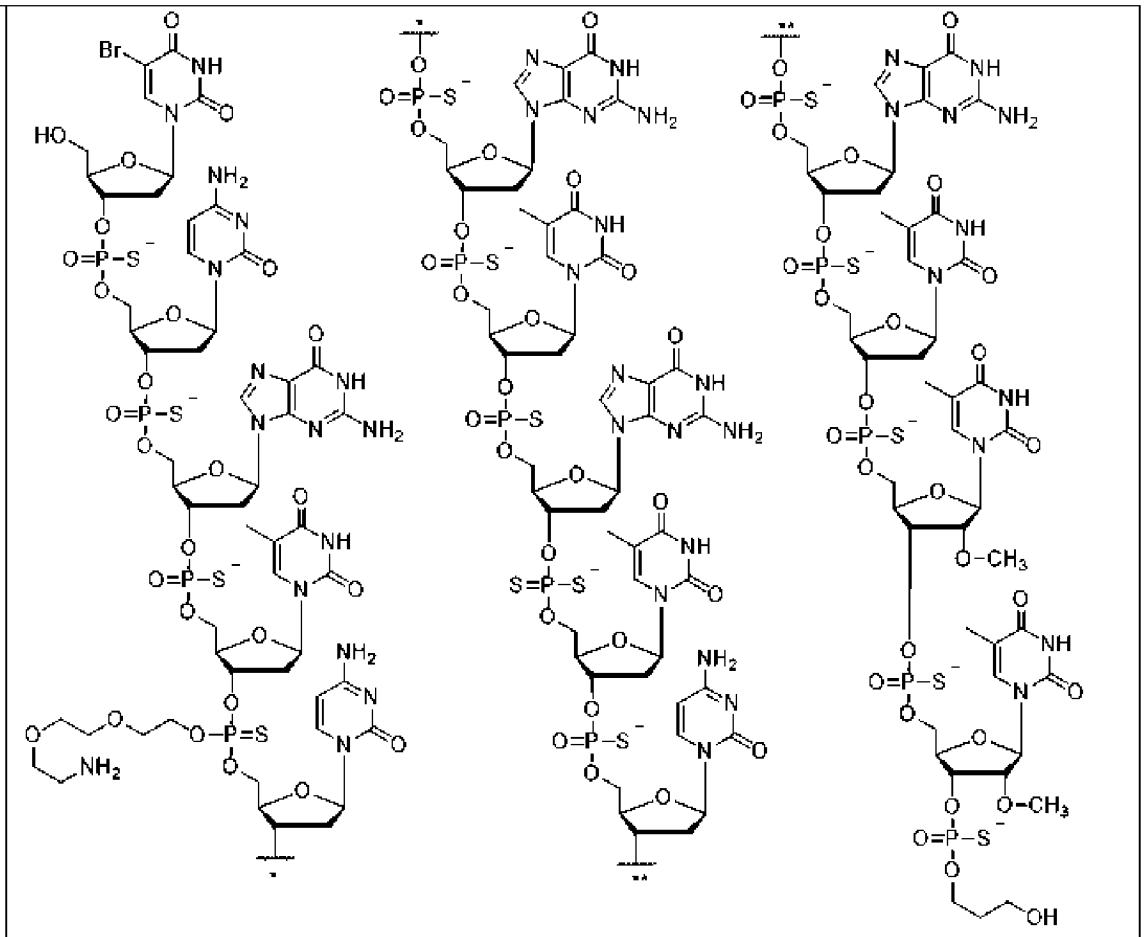
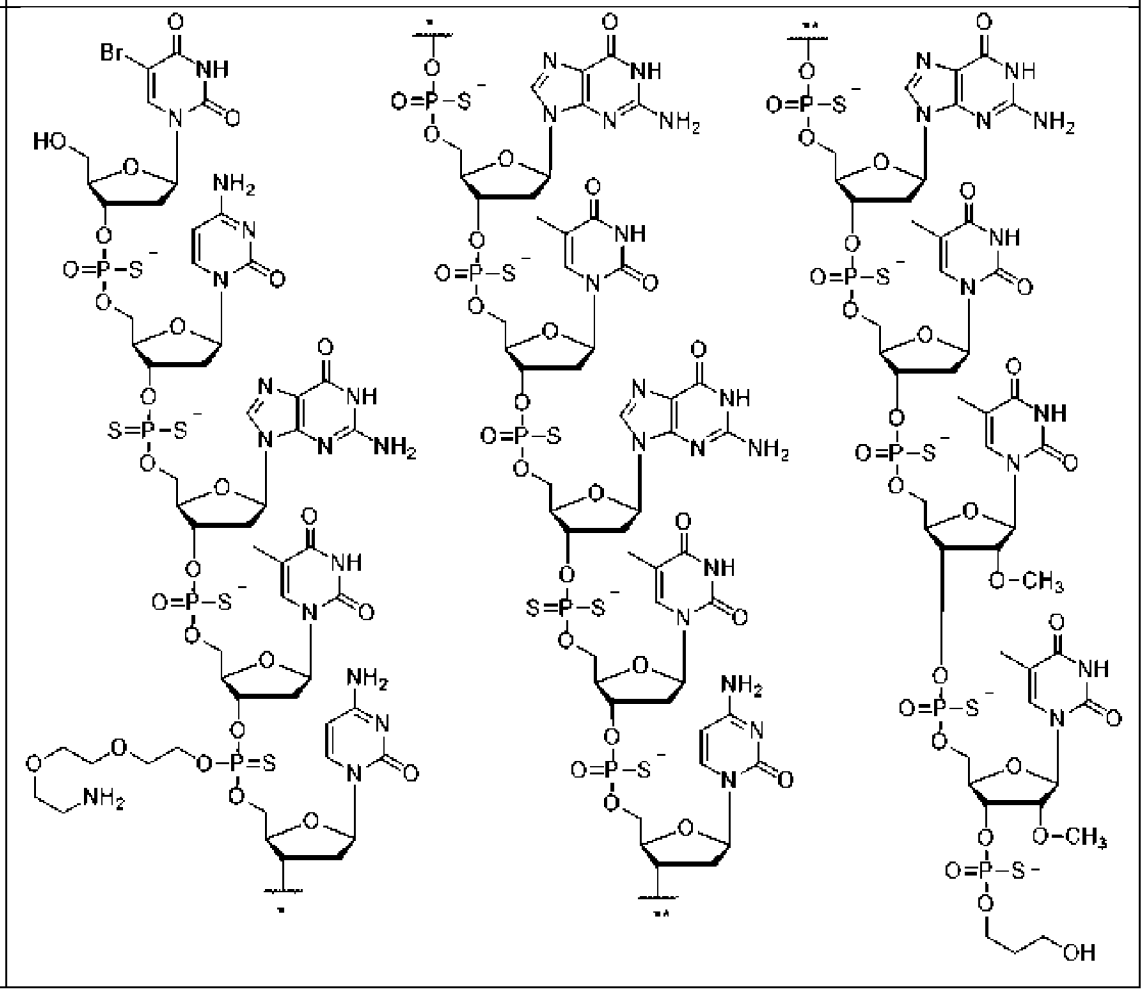
5.7a	
5.8a	

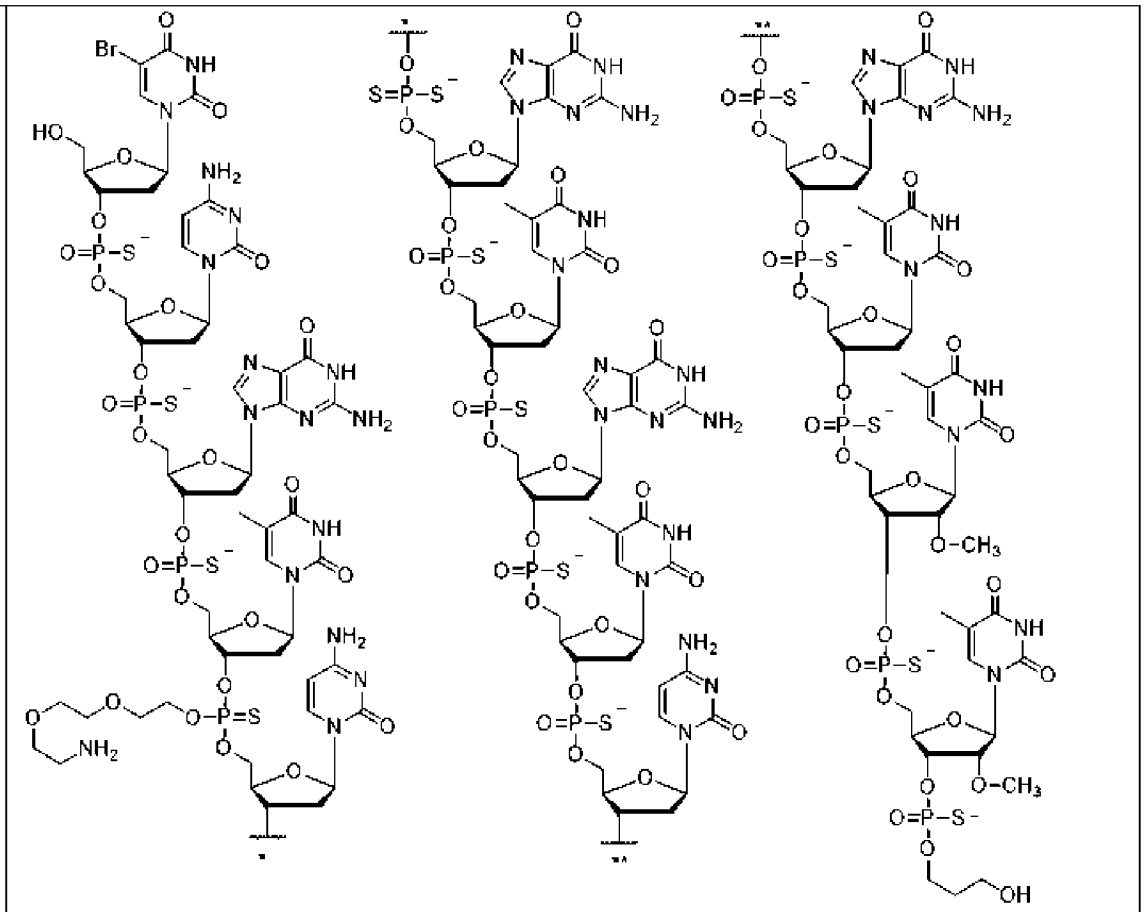
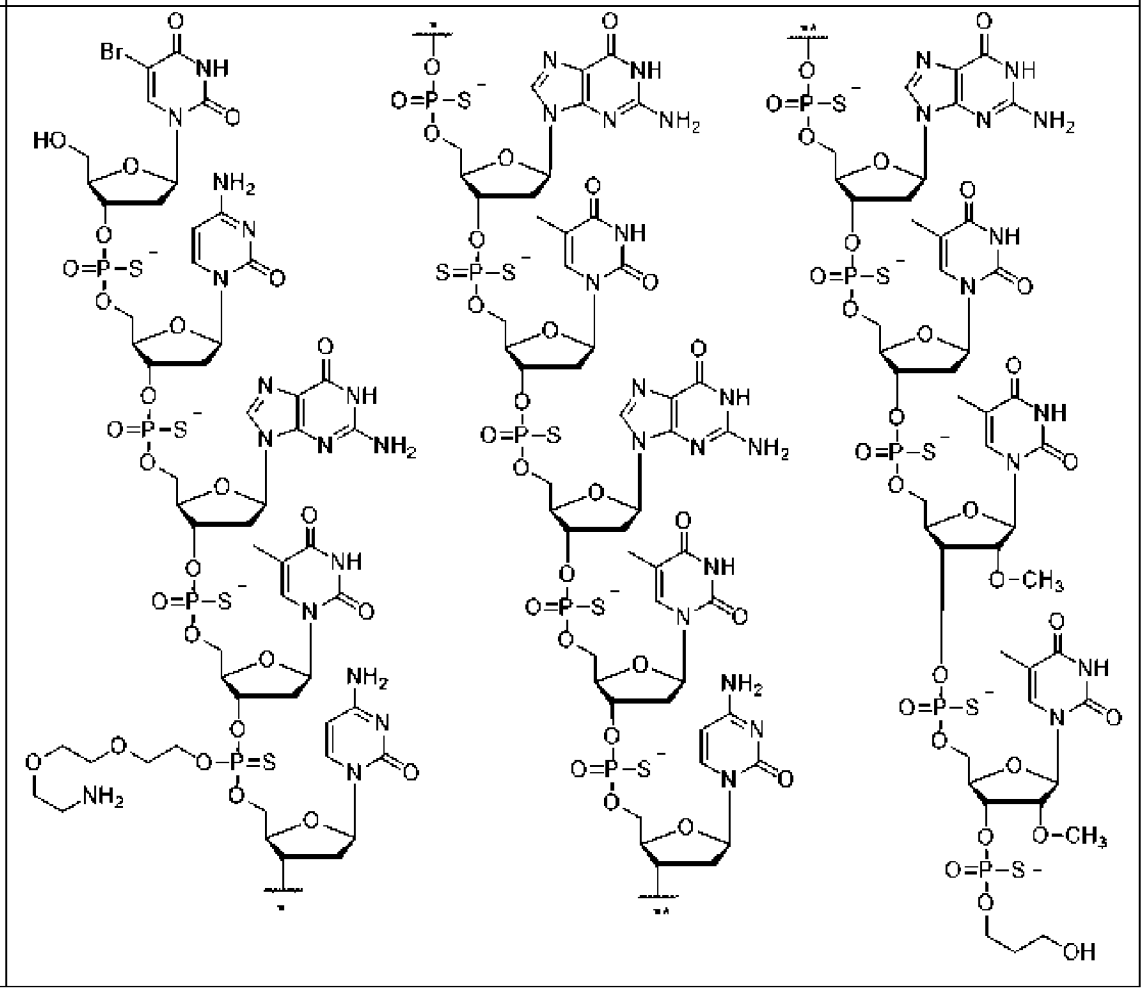
5.9a	
5.10a	

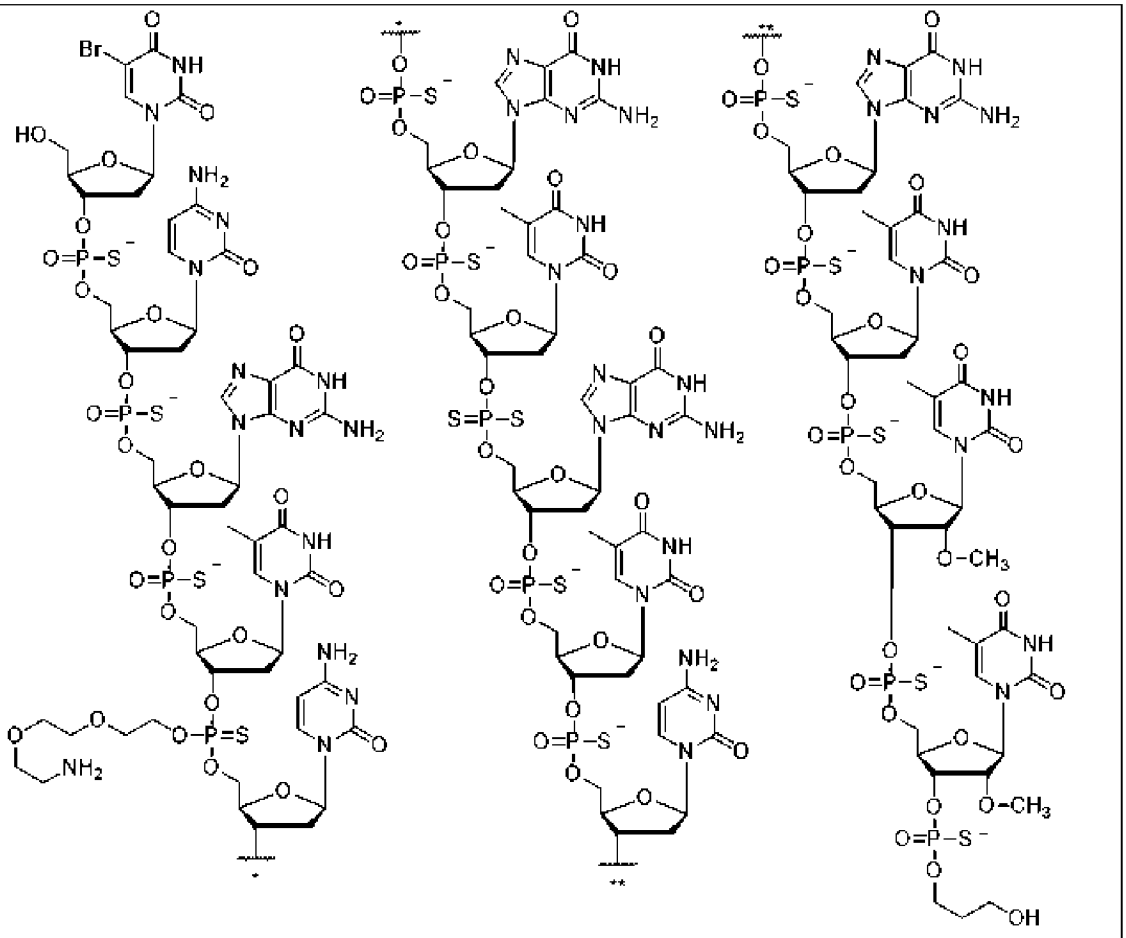
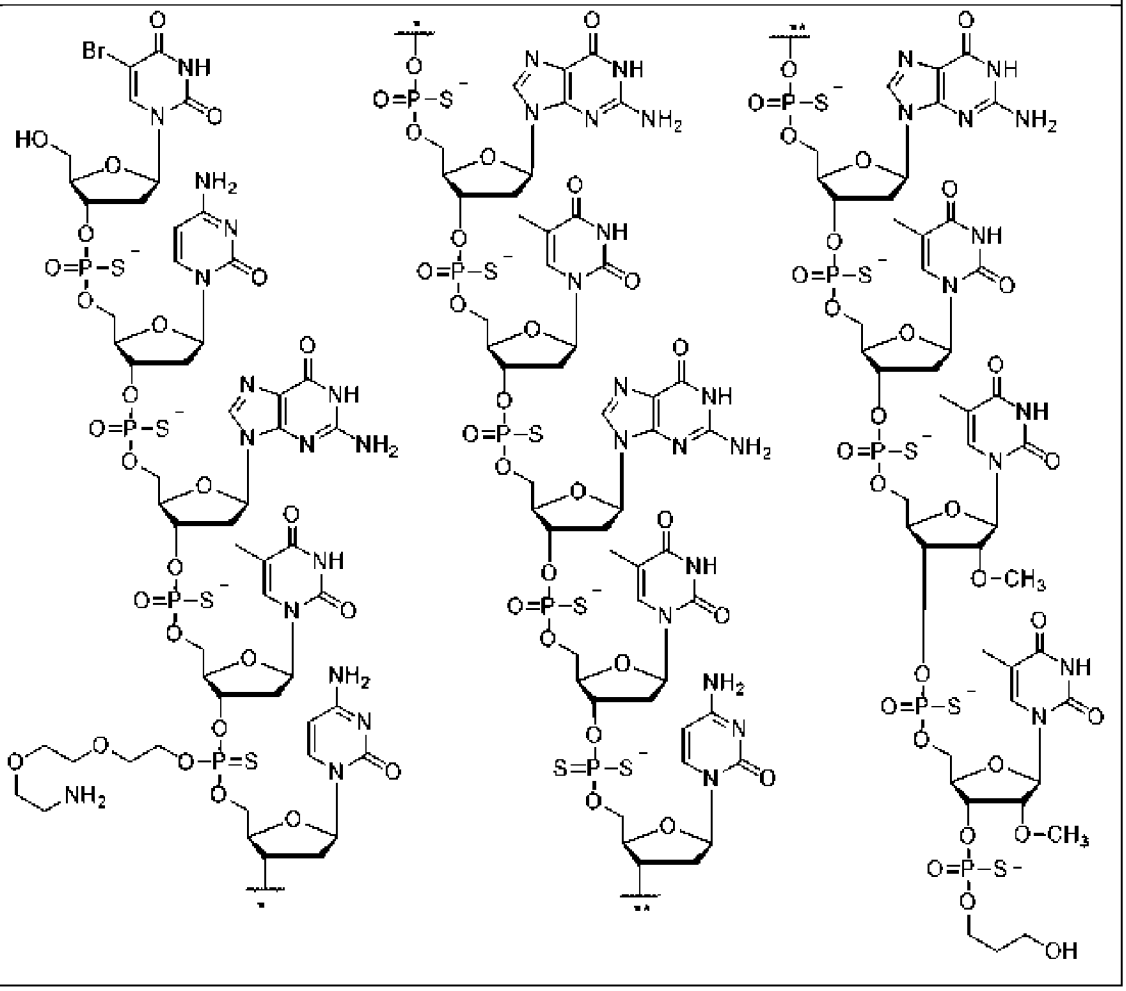
5.11a	
5.12a	

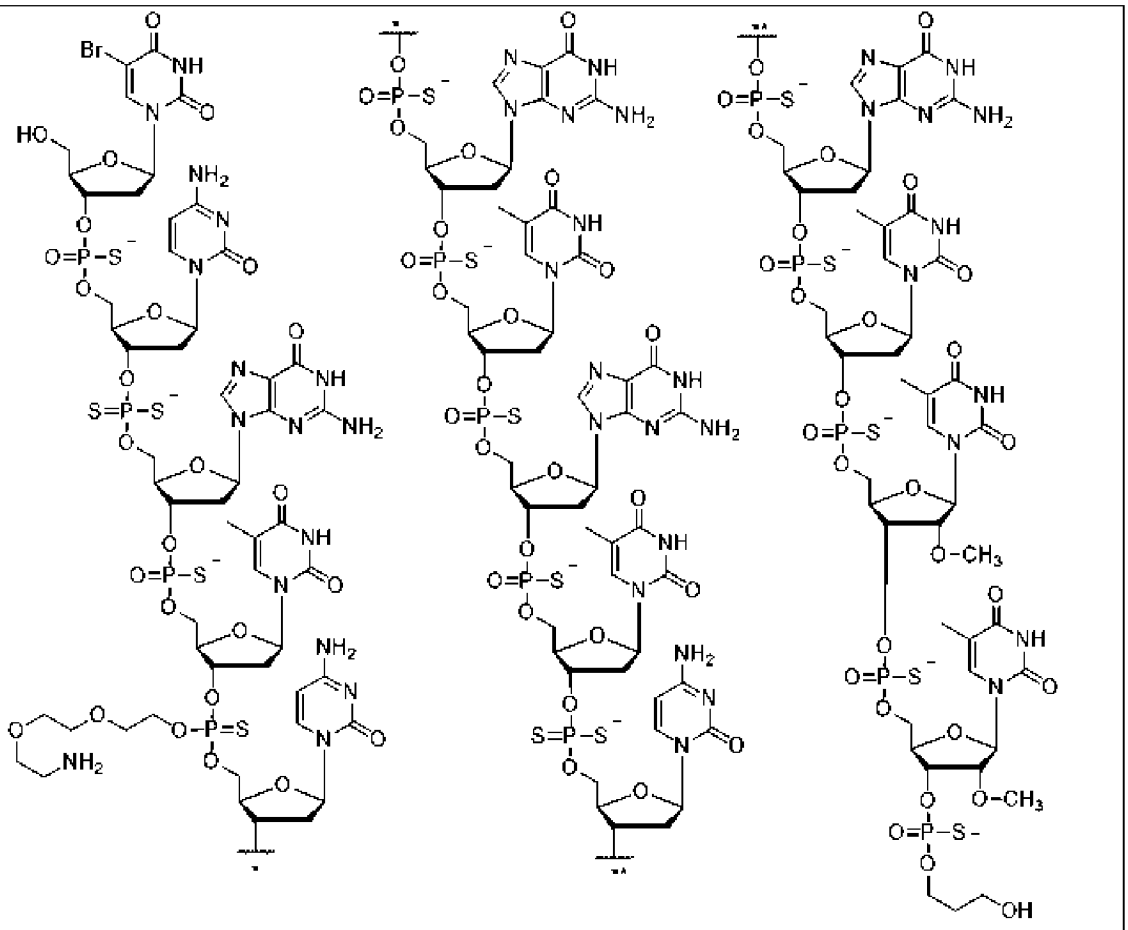
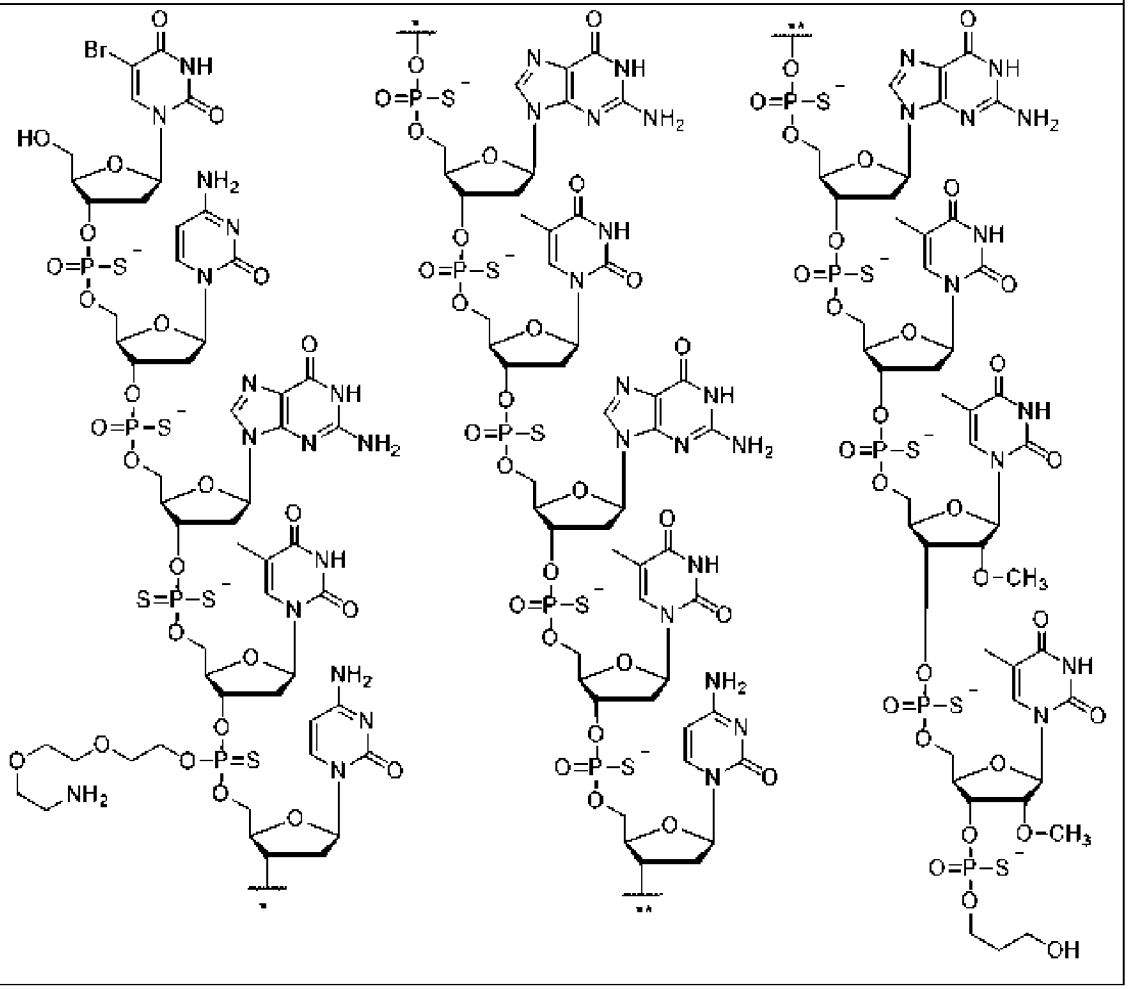
6.1a	
6.2a	

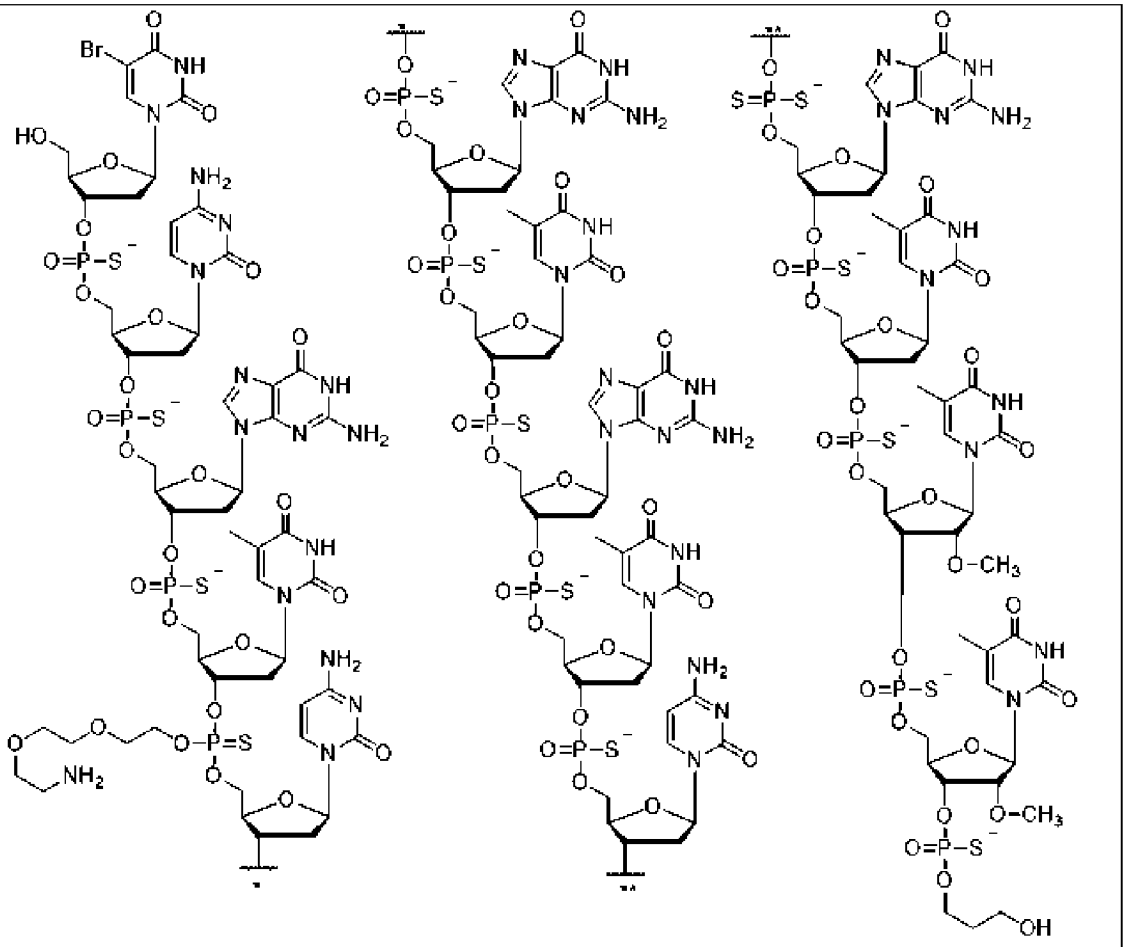
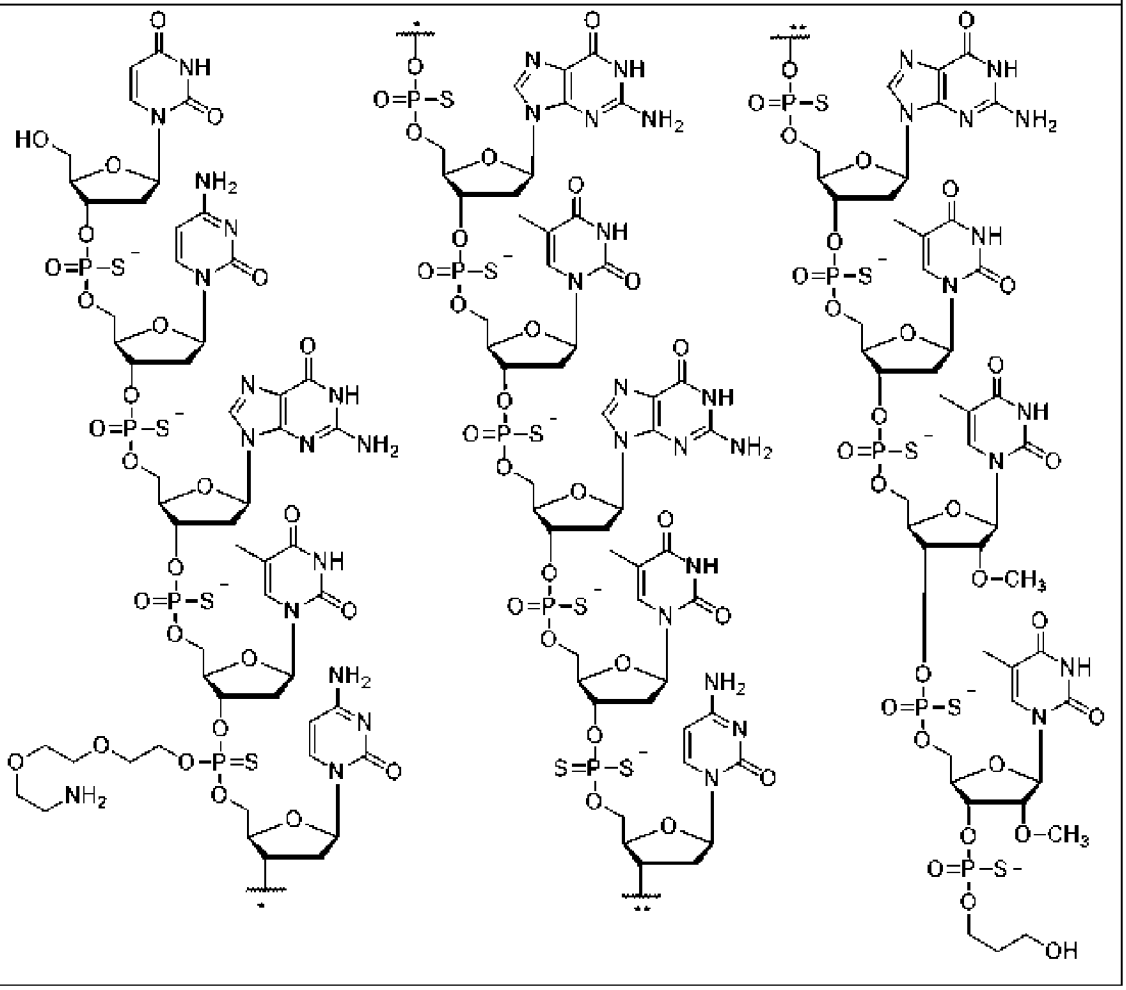
6.3a	
7.1a	

7.2a	
7.3a	

7.4a	
7.5a	

7.6a	
7.7a	

7.8a	
7.9a	

7.10a	
15.7a	

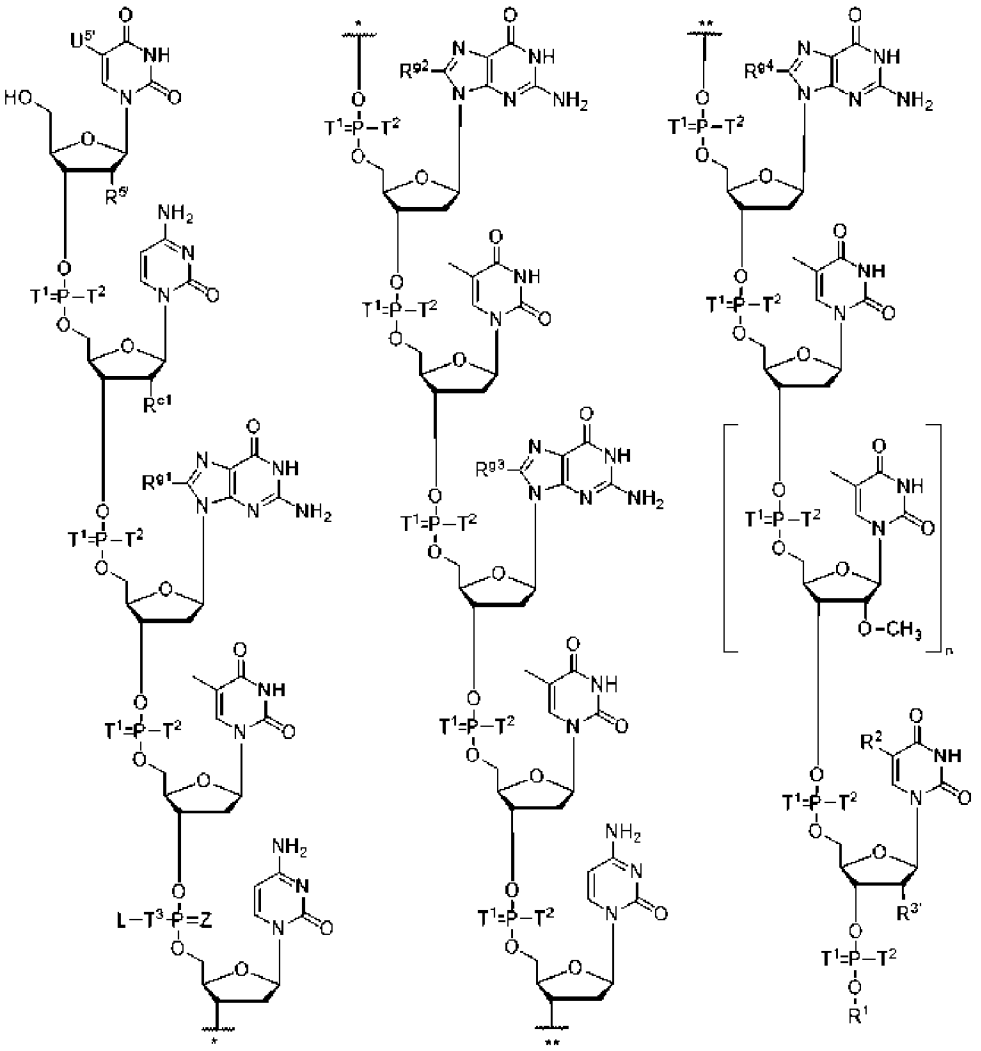
[00342] В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (C) можно использовать без конъюгации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или можно использовать в качестве предшественников для получения конъюгатов, содержащих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов. формулы (C), связанной через Q-метку, как показано в структурах формулы (A), как описано в настоящем документе.

[00343] В одном аспекте, настоящее описание предлагает иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C), где олигонуклеотид не конъюгирован с каким-либо способом доставки (например, с наночастицей или белком) или таргетирующей группой (например, с антителом или его антигенным фрагментом). Такие олигонуклеотиды можно далее называть «голыми» олигонуклеотидами или «голыми» CpG.

[00344] В другом аспекте в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (C), где иммуномодулирующий олигонуклеотид пегилирован. В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (C), где иммуномодулирующий олигонуклеотид иммобилизован на грануле. В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (C), где иммуномодулирующий олигонуклеотид составлен в виде наночастицы. В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (C), где иммуномодулирующий олигонуклеотид инкапсулирован в липосому. В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (C), где иммуномодулирующий олигонуклеотид конъюгирован с полипептидом.

[00345] В еще одном аспекте, настоящее описание предлагает способ доставки иммуномодулирующего олигонуклеотида в соответствии с любым из вариантов осуществления настоящего документа, включающий контакт иммуномодулирующего олигонуклеотида с клеткой. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид пегилирован. В других вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид иммобилизован на грануле. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид входит в состав наночастицы. В других вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид инкапсулирован в липосому. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид конъюгирован с полипептидом.

[00346] В других вариантах осуществления, иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (C) могут быть модифицированы для присоединения линкерной группы L к концевой группе T^3 в формуле (C) с получением иммуномодулирующих олигонуклеотидов формулы (D). В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (D)



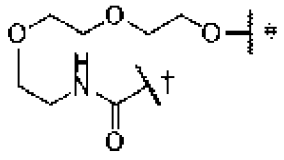
(D),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;



T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;



L представляет собой группу , где m представляет собой целое число от 0 до 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T^3;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H или оксо, при условии, что, по меньшей мере, один из R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляет собой оксо, и где углерод, к которому присоединен оксо, имеет одну связь с кольцевым азотом в положении 7;

$R^{3'}$ представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

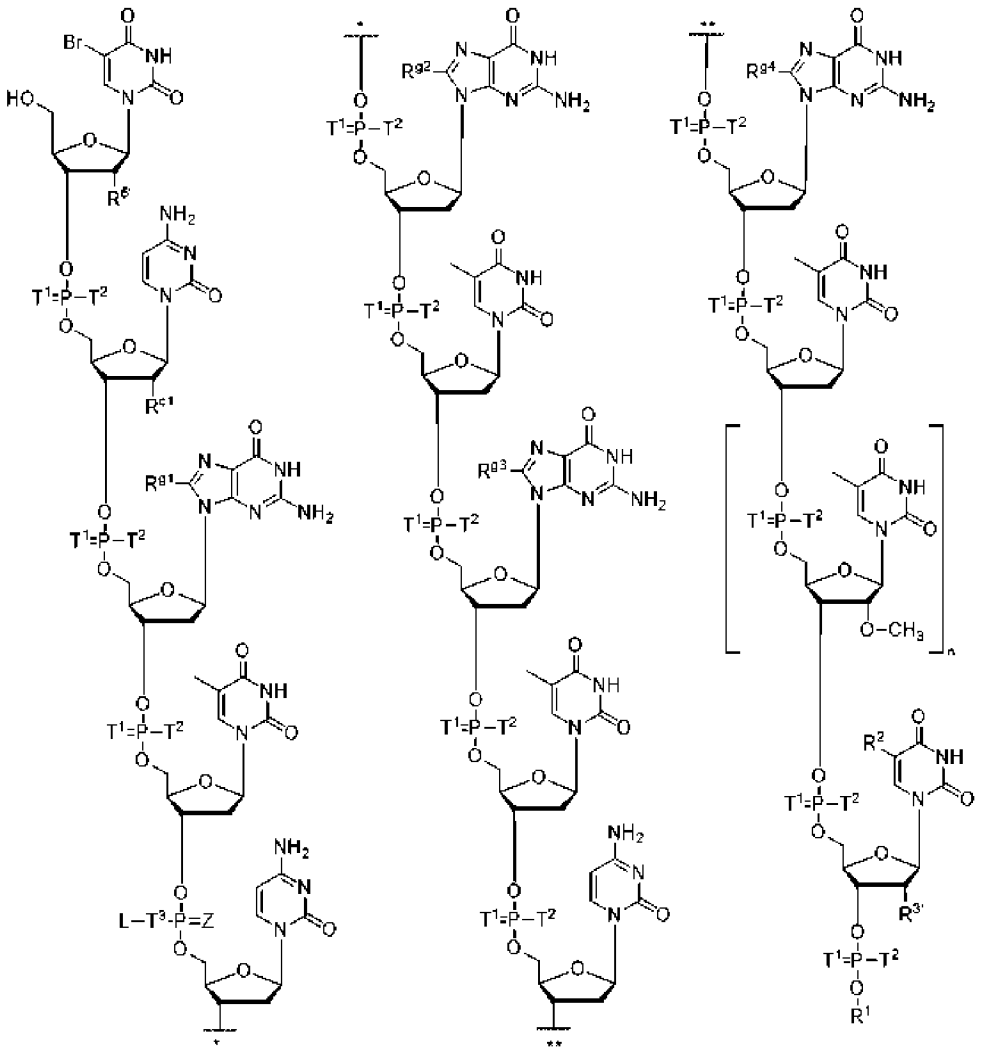
R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00347] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, $U^{5'}$ представляет собой -H. В других вариантах осуществления, $U^{5'}$ представляет собой галоген. В некоторых вариантах осуществления, $U^{5'}$ представляет собой йод или бром. В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D'). В других вариантах осуществления настоящего аспекта, иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D) представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D”).

[00348] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе предложен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D')



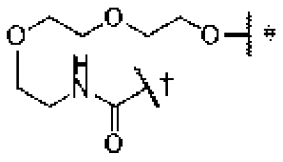
(D'),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;



T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;



L представляет собой группу , где m представляет собой целое число от 0 до 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T^3;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H или оксо, при условии, что, по меньшей мере, один из R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляет собой оксо, и где углерод, к которому присоединен оксо, имеет одну связь с кольцевым азотом в положении 7;

$R^{3'}$ представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

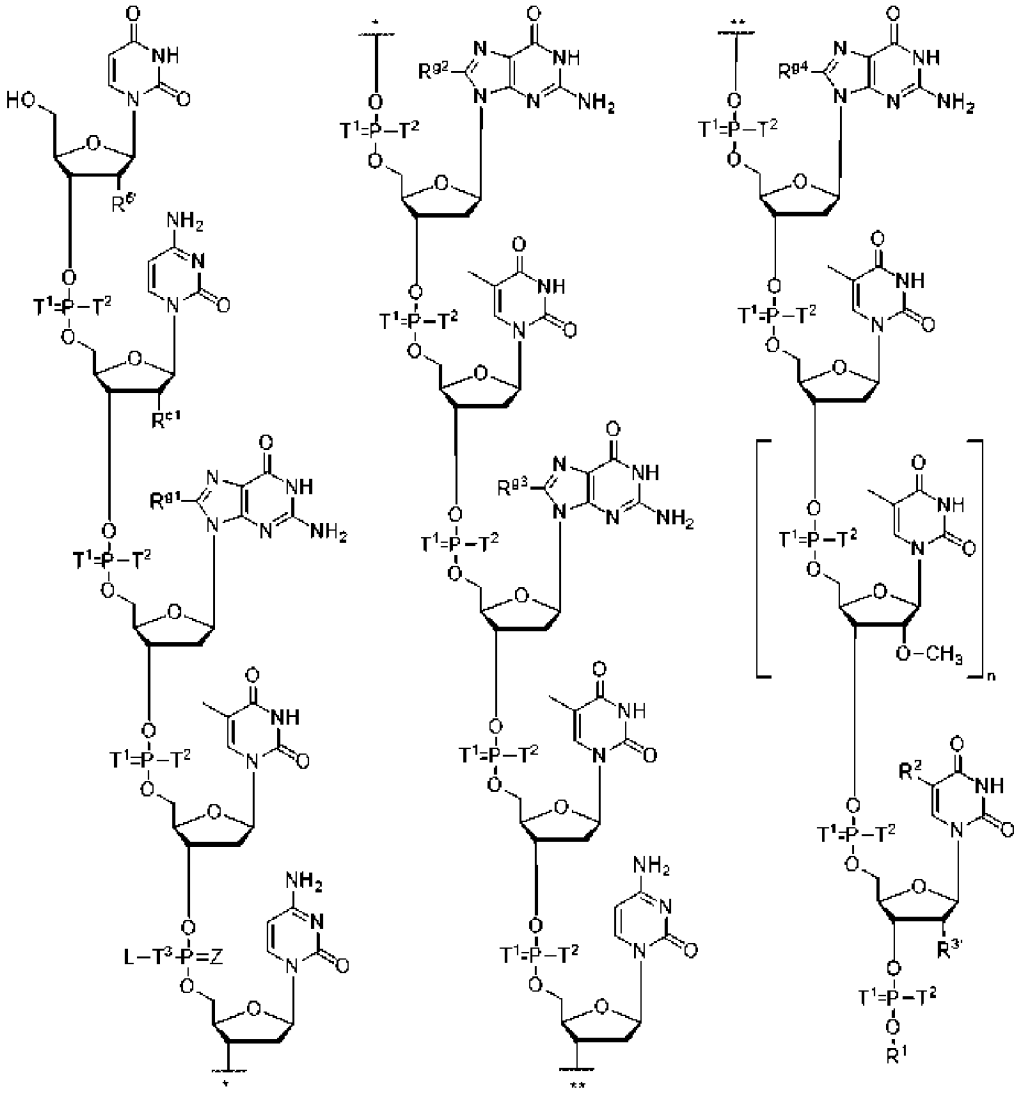
R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00349] В других вариантах осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе предложен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D'').



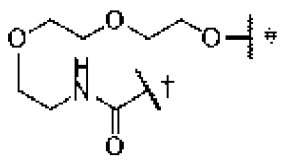
(D"),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

L представляет собой группу , в которой m представляет собой целое число от 0 до 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T^3;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, $R^{g2,}$ R^{g3} и R^{g4} представляют собой H или оксо, при условии, что, по меньшей мере, один из R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляет собой оксо, и где углерод, к которому присоединен оксо, имеет одну связь с кольцевым азотом в положении 7;

$R^{3'}$ представляет собой метокси или 2-метоксиэтокси;

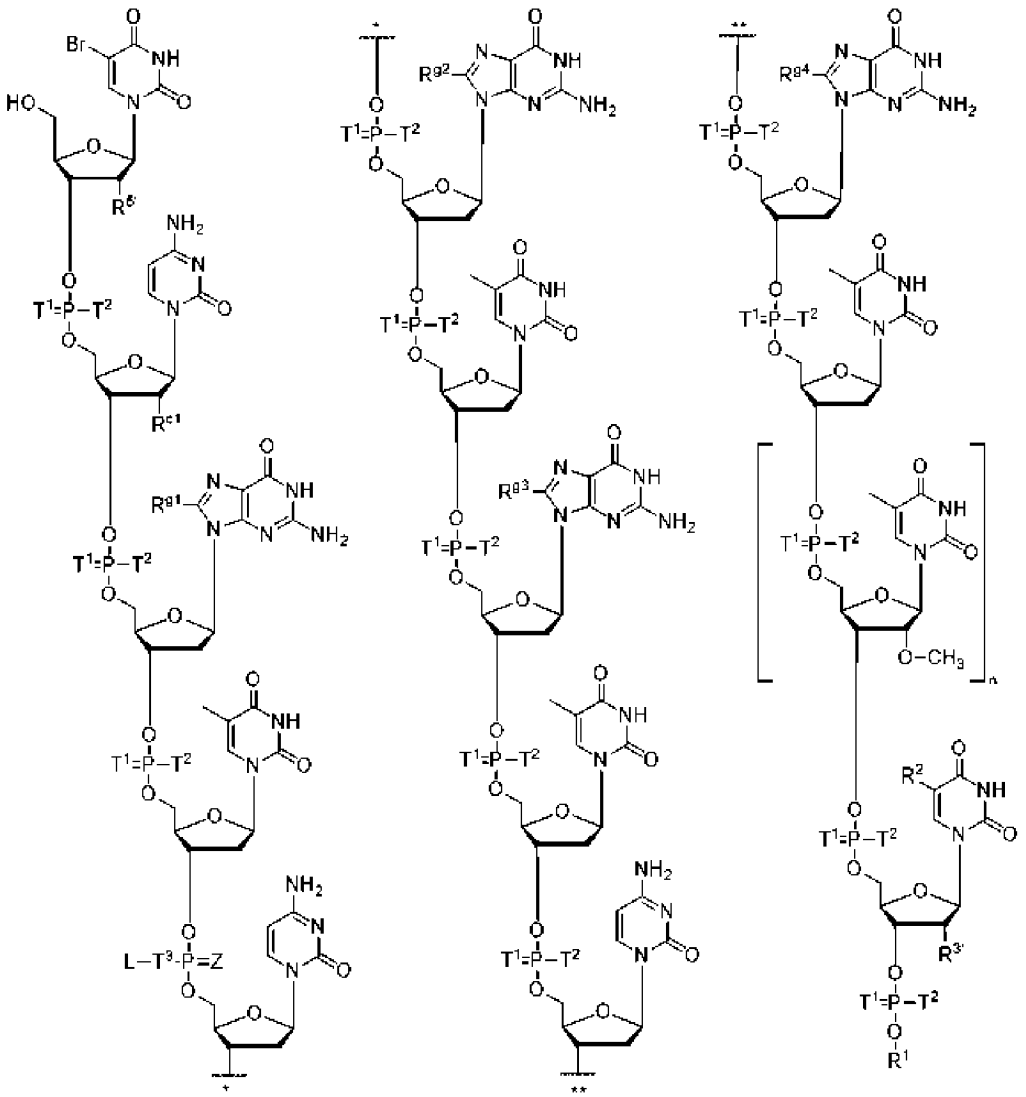
R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00350] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, настоящее изобретение также предлагает иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (D')



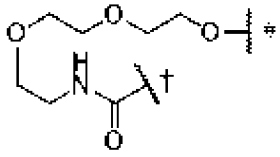
(D'),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;



T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;



L представляет собой группу , где m представляет собой целое число от 0 до 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T^3;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

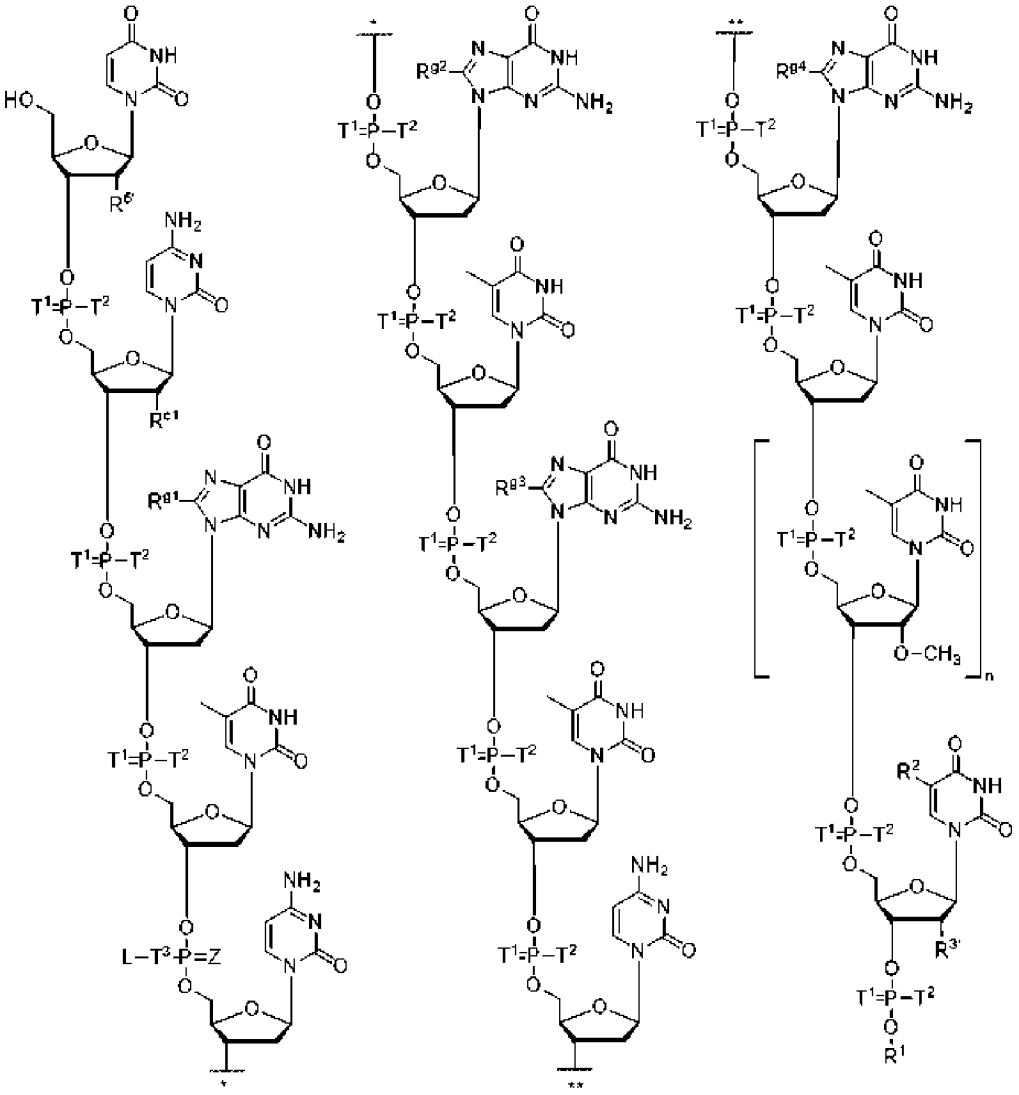
R^{1} представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^{2} представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00351] В других вариантах осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе предложен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D'').



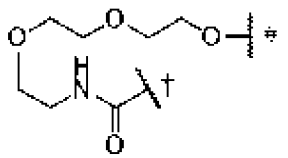
(D"),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;



T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку

присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

L представляет собой группу , где m представляет собой целое число от 0 до 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T^3;

Z представляет собой O или S;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

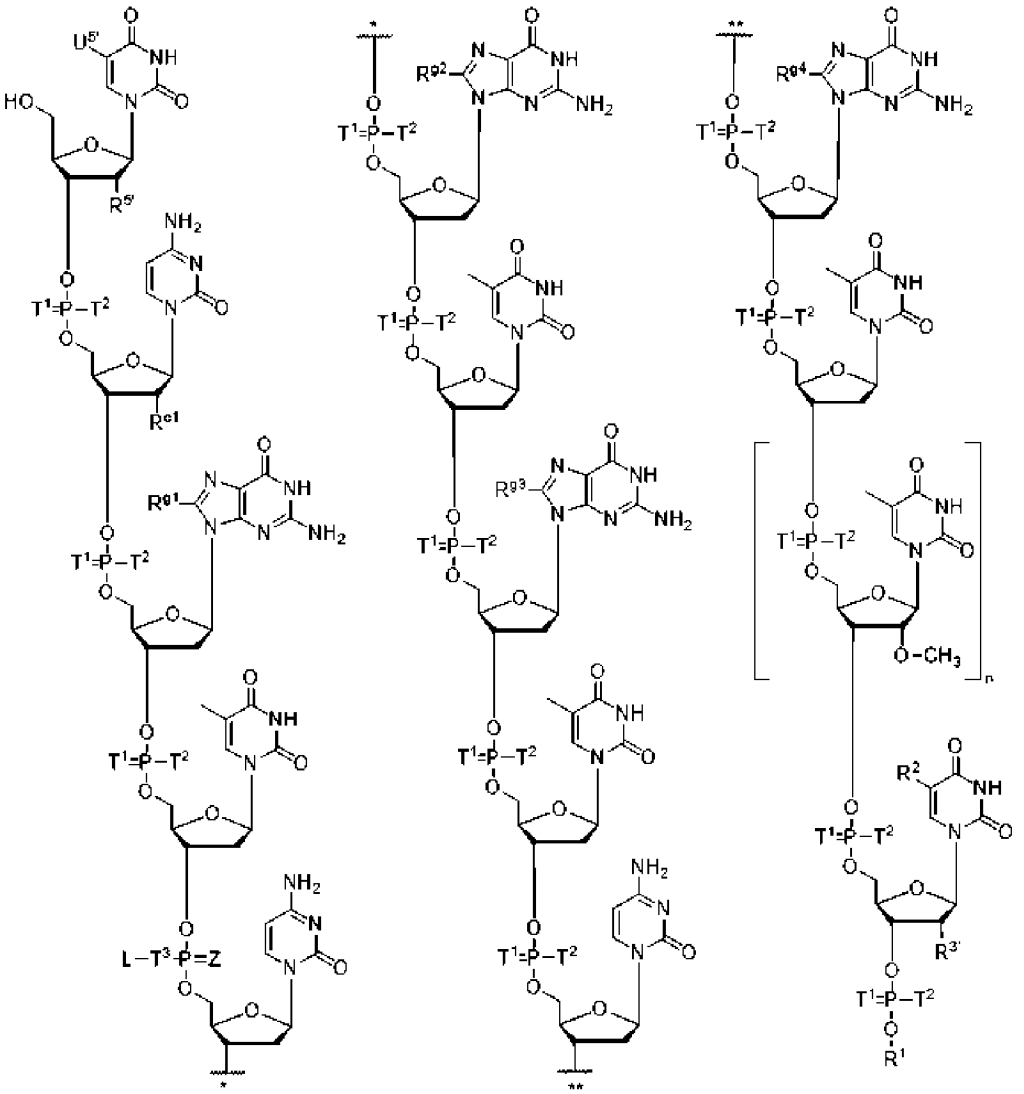
R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00352] В некоторых вариантах осуществления настоящего аспекта, Z представляет собой S. В дополнительных вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-. В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

[00353] В еще одном варианте осуществления настоящего аспекта, в настоящем документе предложен олигонуклеотид формулы (D)



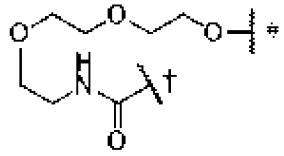
(D),

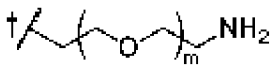
где ~~~ * и ~~~ ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

при условии, что олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S,

T^3 представляет собой группу , где ~~~ † указывает на точку присоединения к L, и где ~~~ # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

L представляет собой группу , где m представляет собой целое число от 0 до 50, и где ~~~ † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T^3;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H;

Rc1 представляет собой -H;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3$-OH;

R^2 представляет собой -метил; и

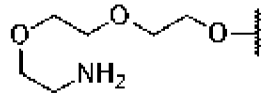
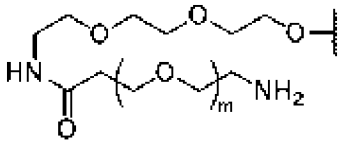
п равно 1,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[00354] В некоторых вариантах осуществления любого из вышеизложенного, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, находится между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В других вариантах осуществления вышеизложенного, олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S и T^2 представляет собой S, и где, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S и T^2 представляет собой S, находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11.

[00355] В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит одну или две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, и где одна или две пары геминальных T^1 и T^2 находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11.В некоторых вариантах осуществления, олигонуклеотид содержит одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, и где пара геминальных T^1 и T^2 находится между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11. В некоторых других вариантах осуществления, олигонуклеотид с включает две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, и где две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S и T^2 представляет собой S, находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между

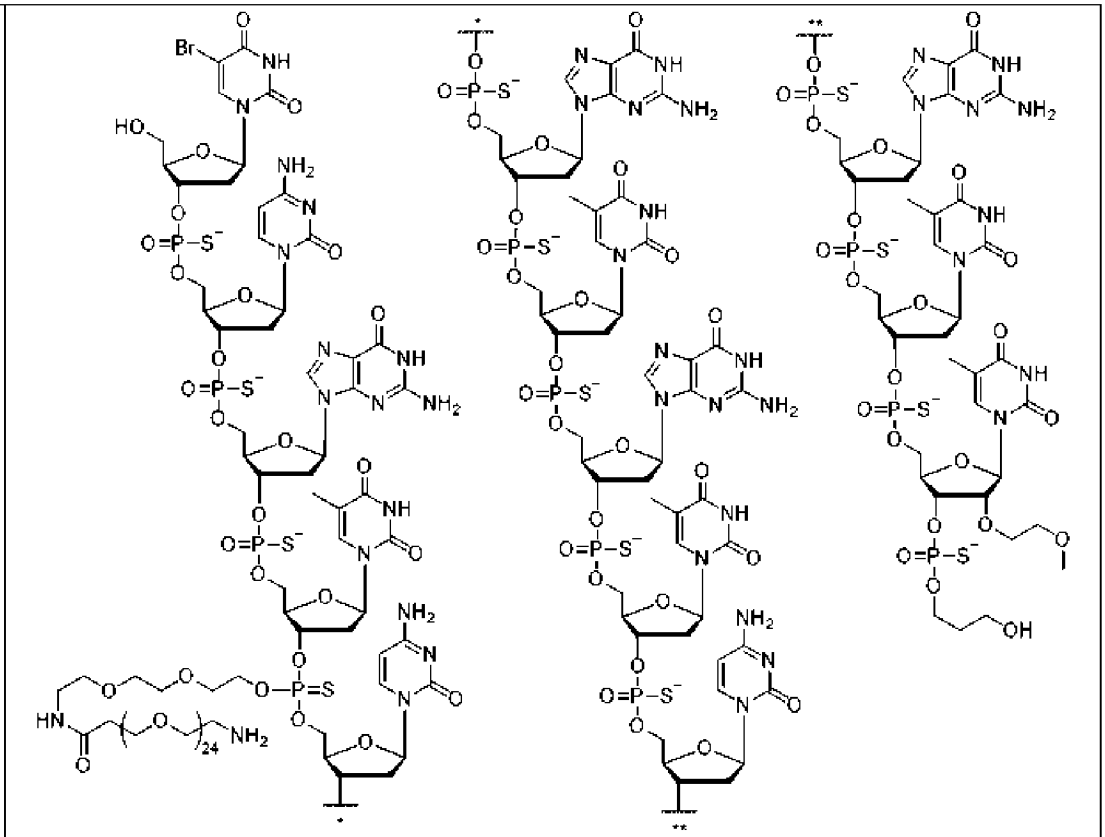
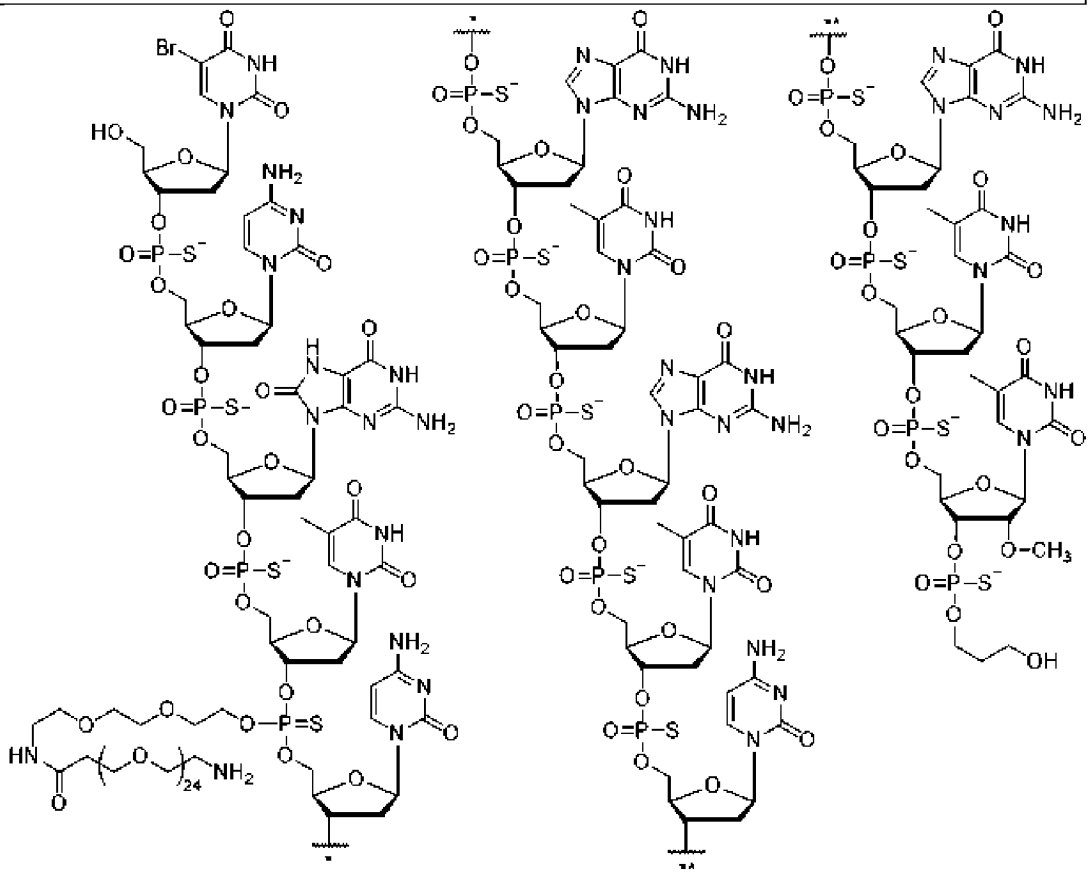
нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11.

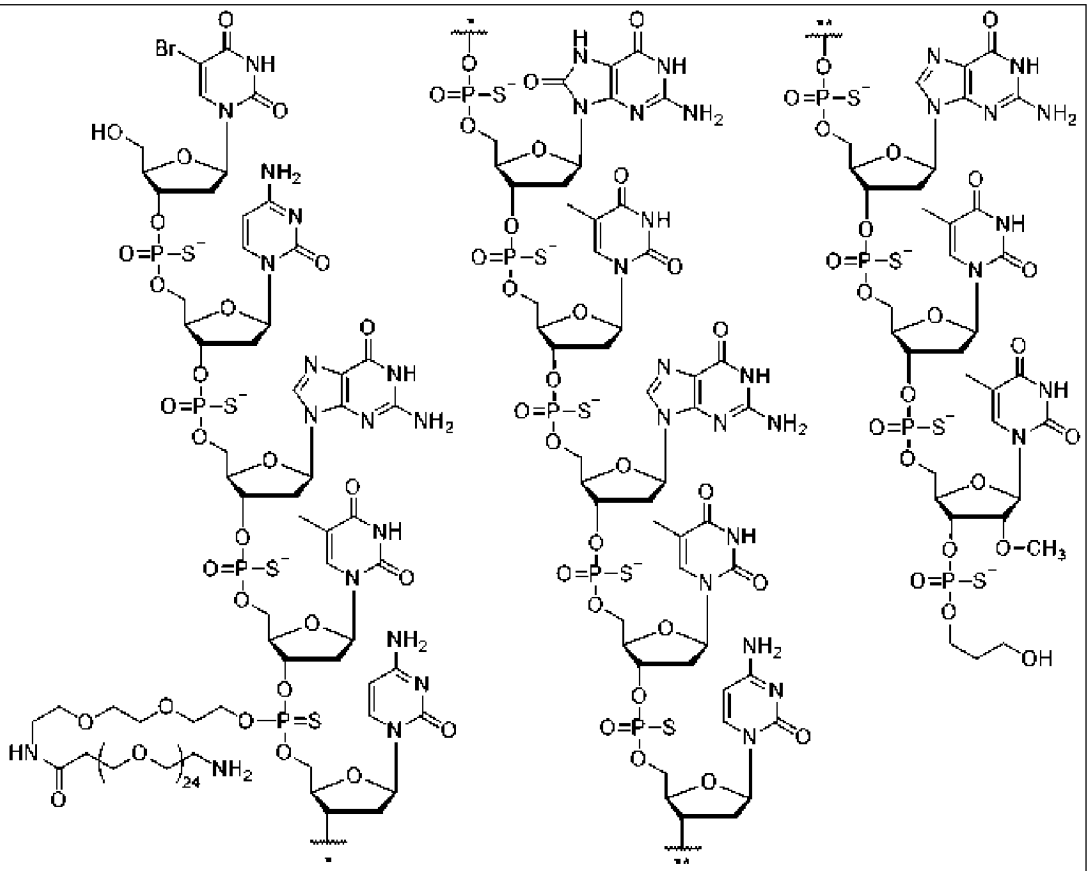
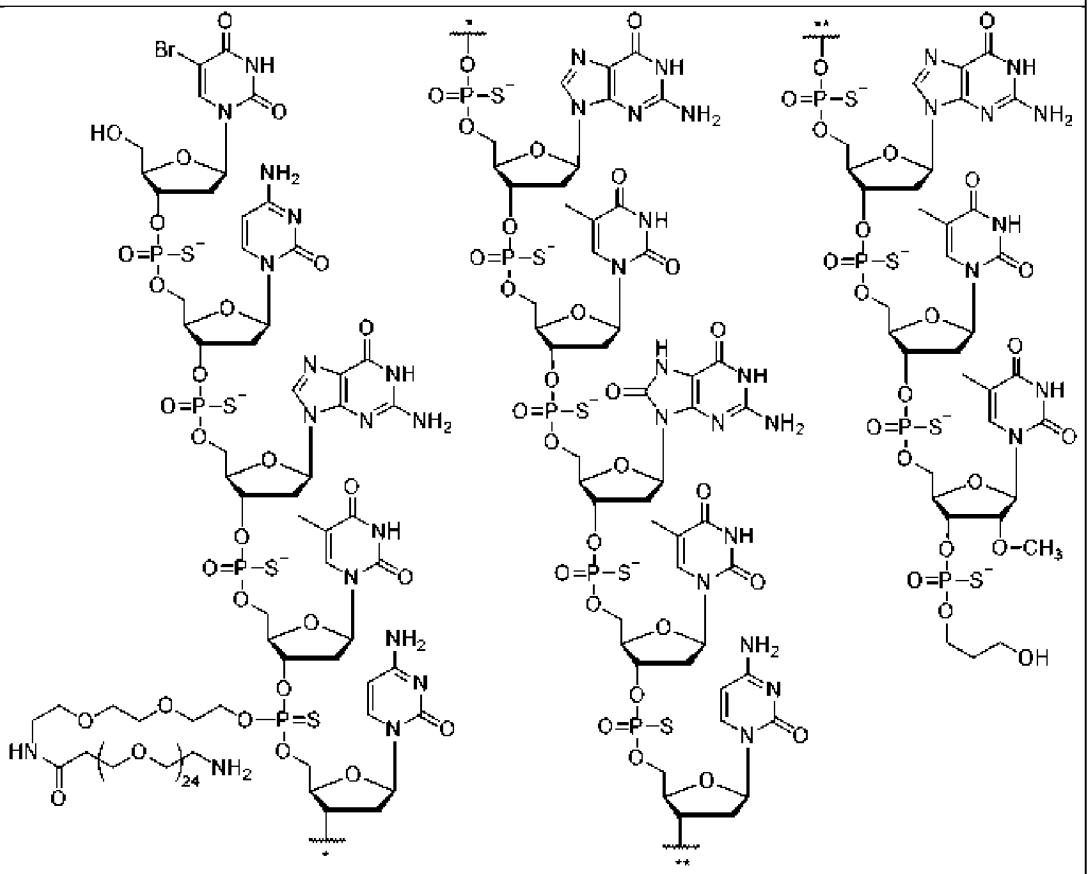
[00356] В некоторых вариантах осуществления, $R^{5'}$ представляет собой H. В других вариантах осуществления, $R^{5'}$ представляет собой метокси. В некоторых вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой H. В других вариантах осуществления, R^{c1} представляет собой метокси. В других вариантах осуществления, R^2 представляет собой метил. В еще других вариантах осуществления, R^2 представляет собой H. В еще других дополнительных вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любым из предыдущих вариантов осуществления, T^3 представляет собой . В других вариантах осуществления, T^3 представляет собой . В некоторых вариантах осуществления, m представляет собой целое число от 20 до 25.

[00357] В другом аспекте, иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D) представляет собой олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы*** **11** и ***таблицы*** **12,** или его фармацевтически приемлемую соль. В дополнительных вариантах осуществления настоящего аспекта, олигонуклеотид формулы (D) выбран из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы*** **12,** или его фармацевтически приемлемой соли.

Таблица 11. Модифицированные олигонуклеотидные структуры (с -$PEG_3NHCOPEG_{24}NH_2$)

Соед. №	**Структура**

1.1b	
2.1b	

2.2b	
2.3b	

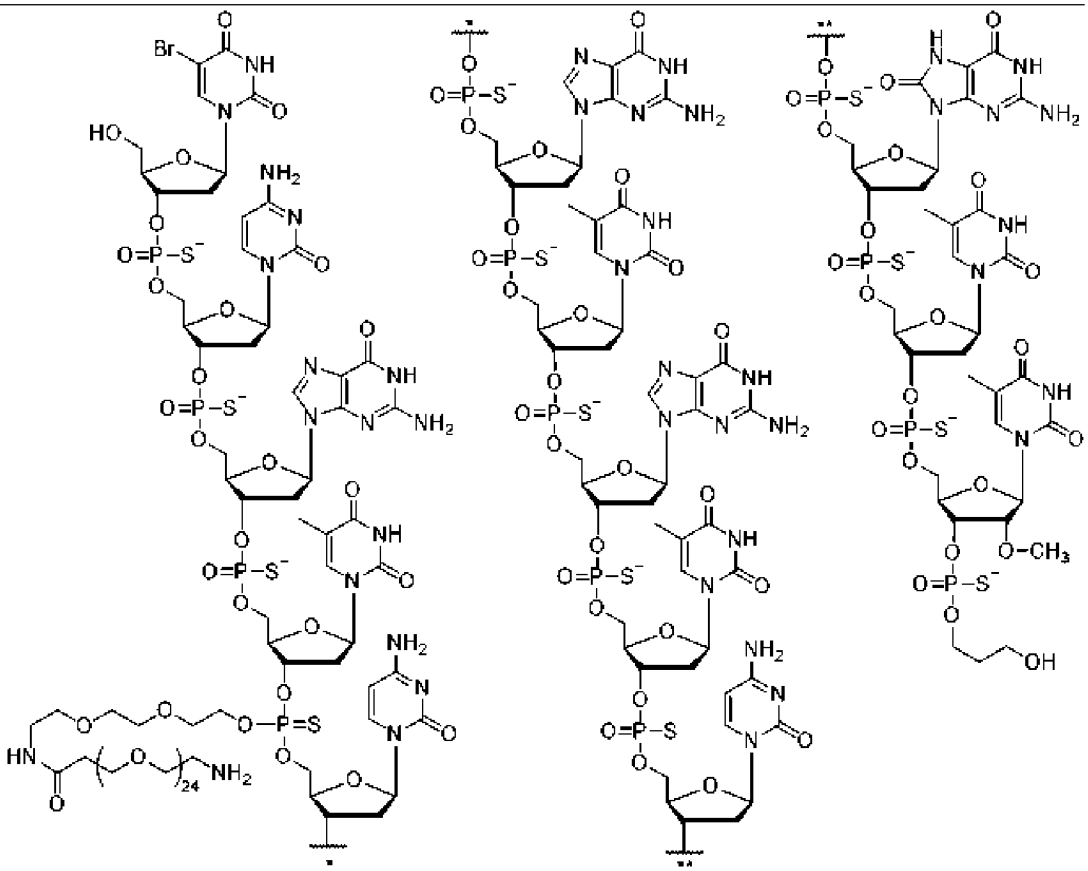
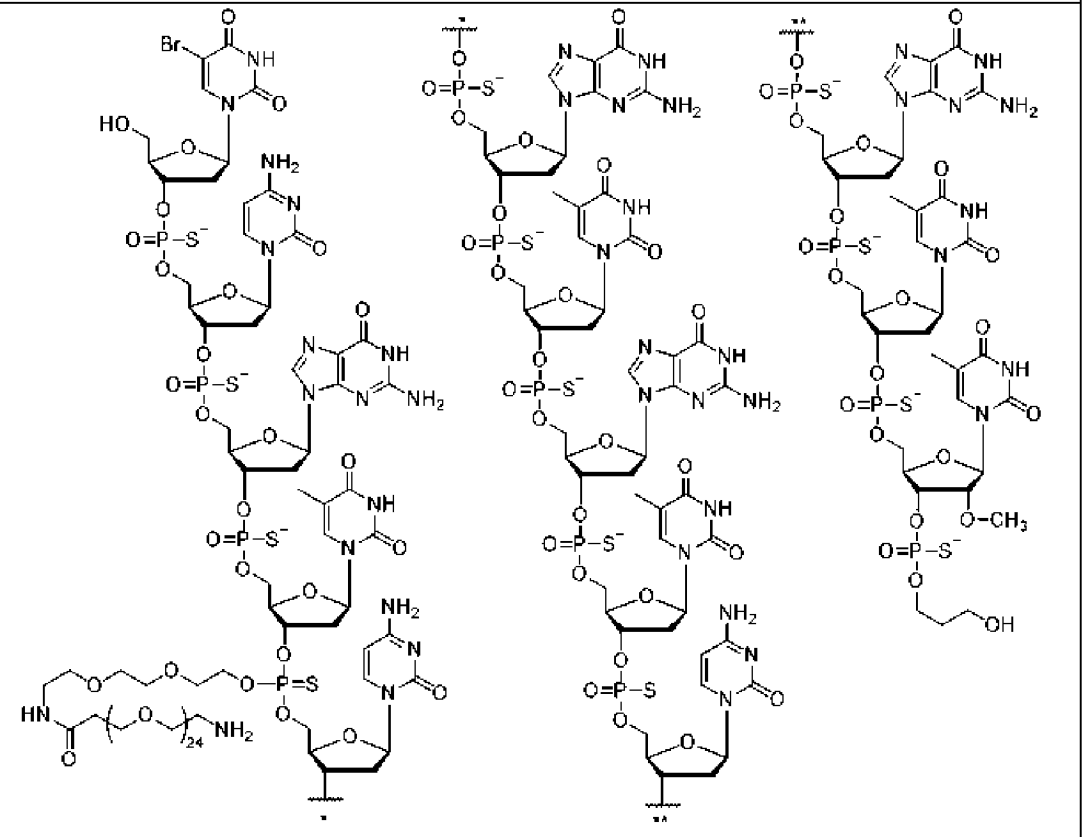
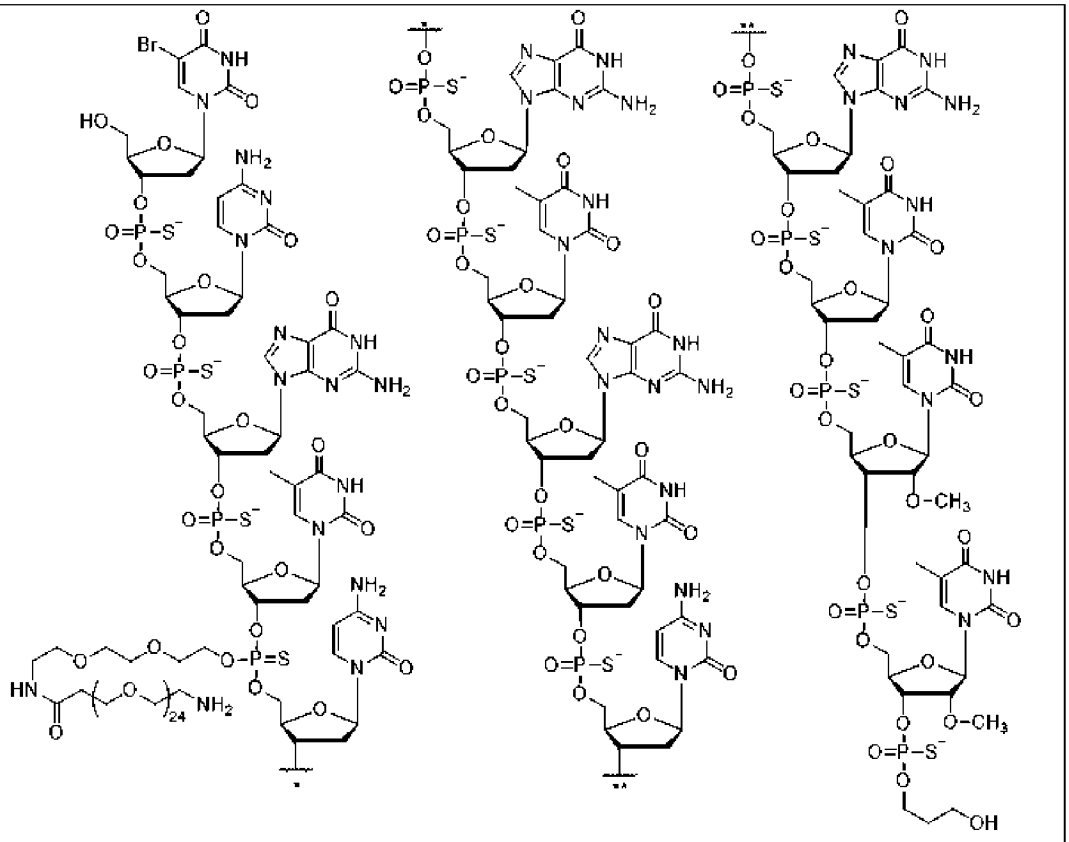
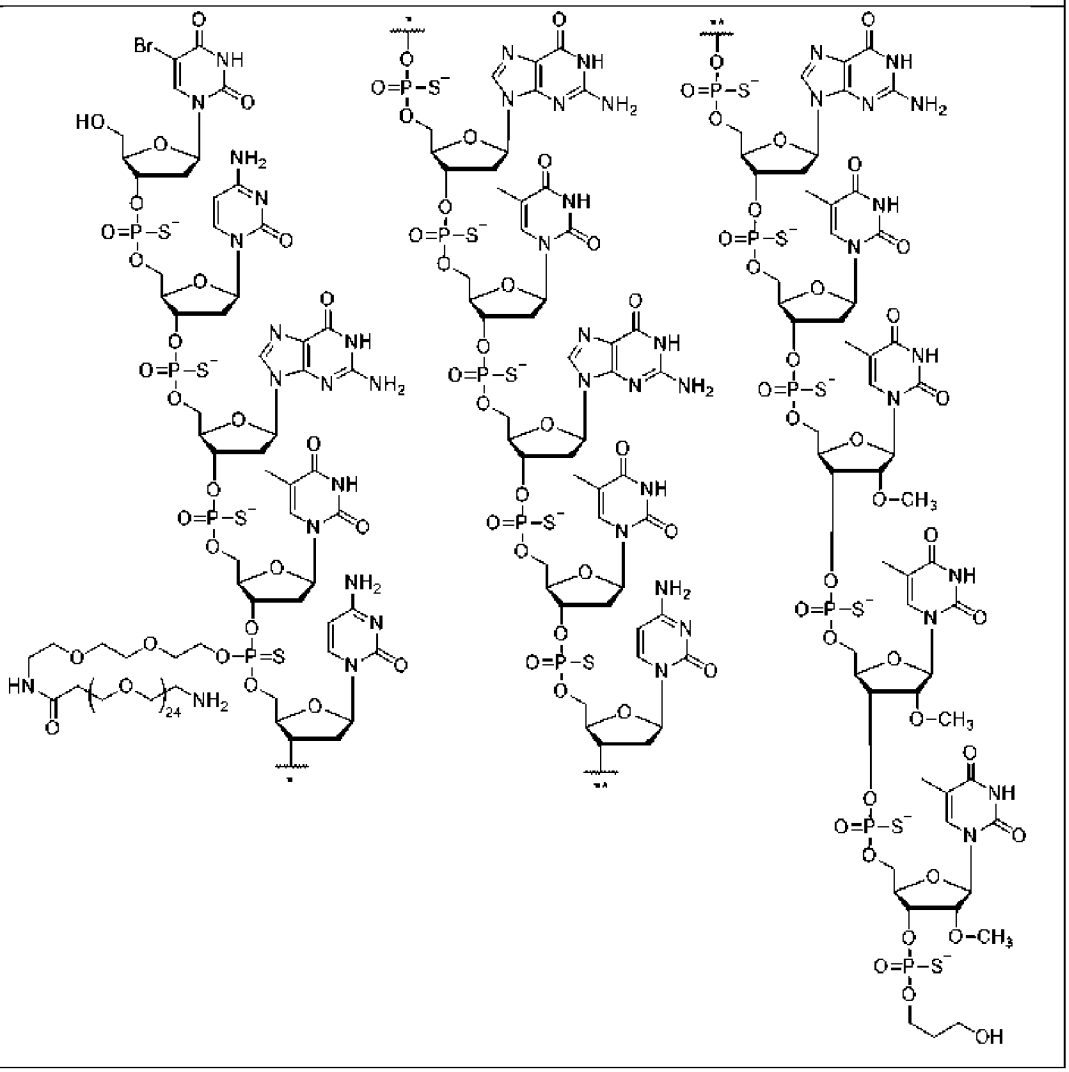
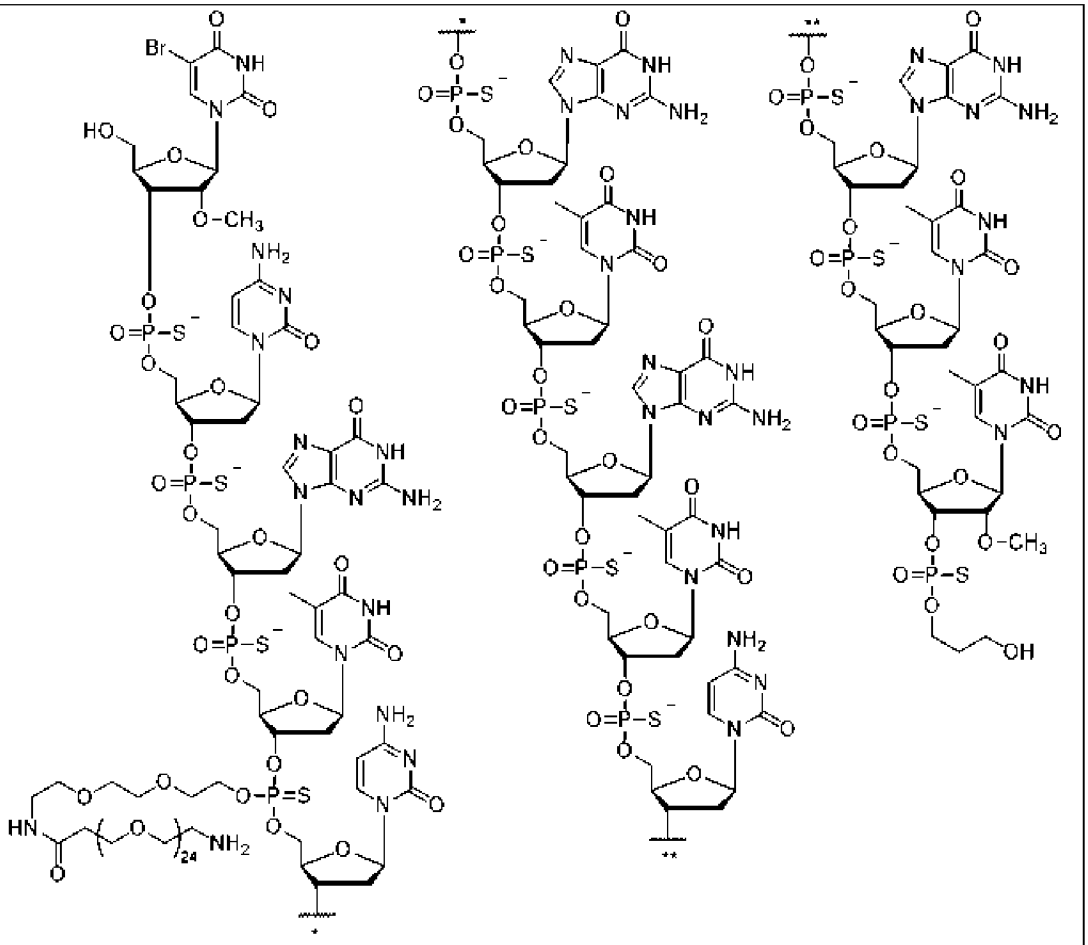
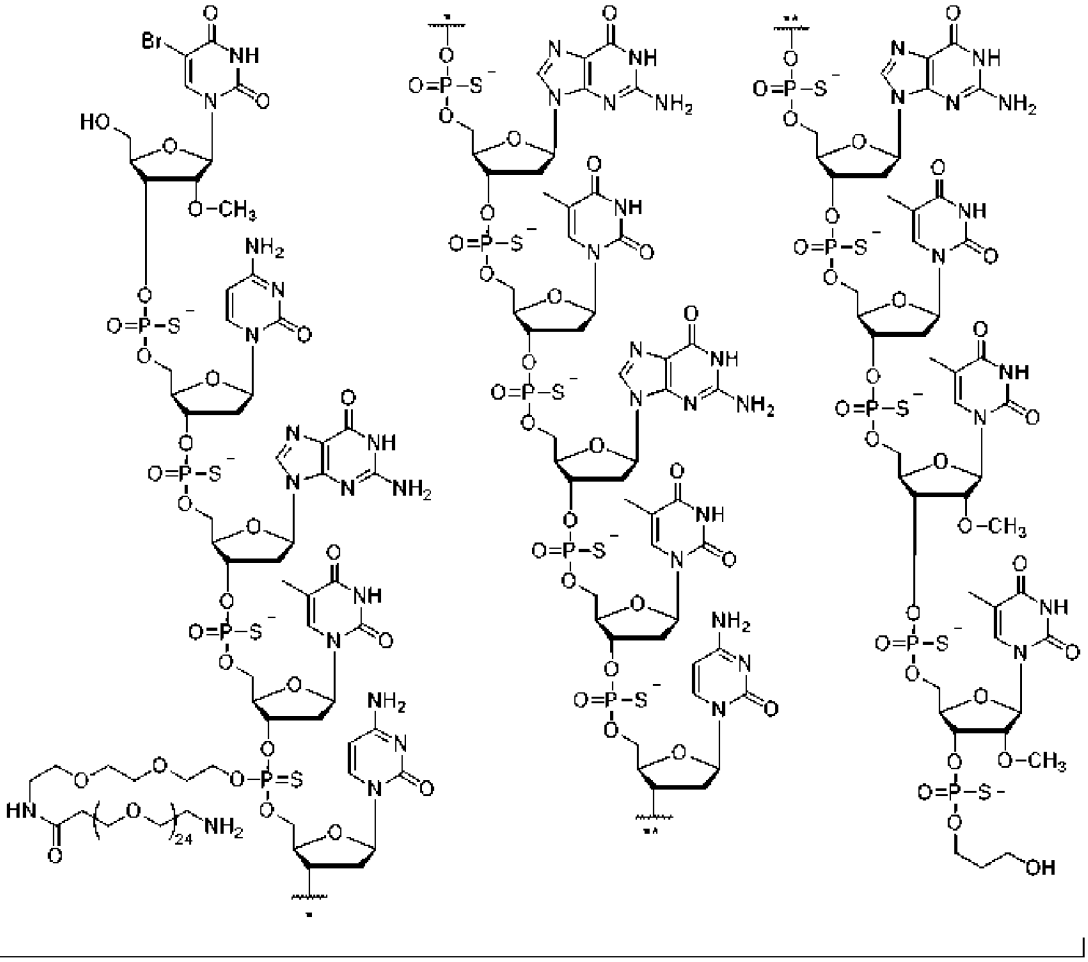
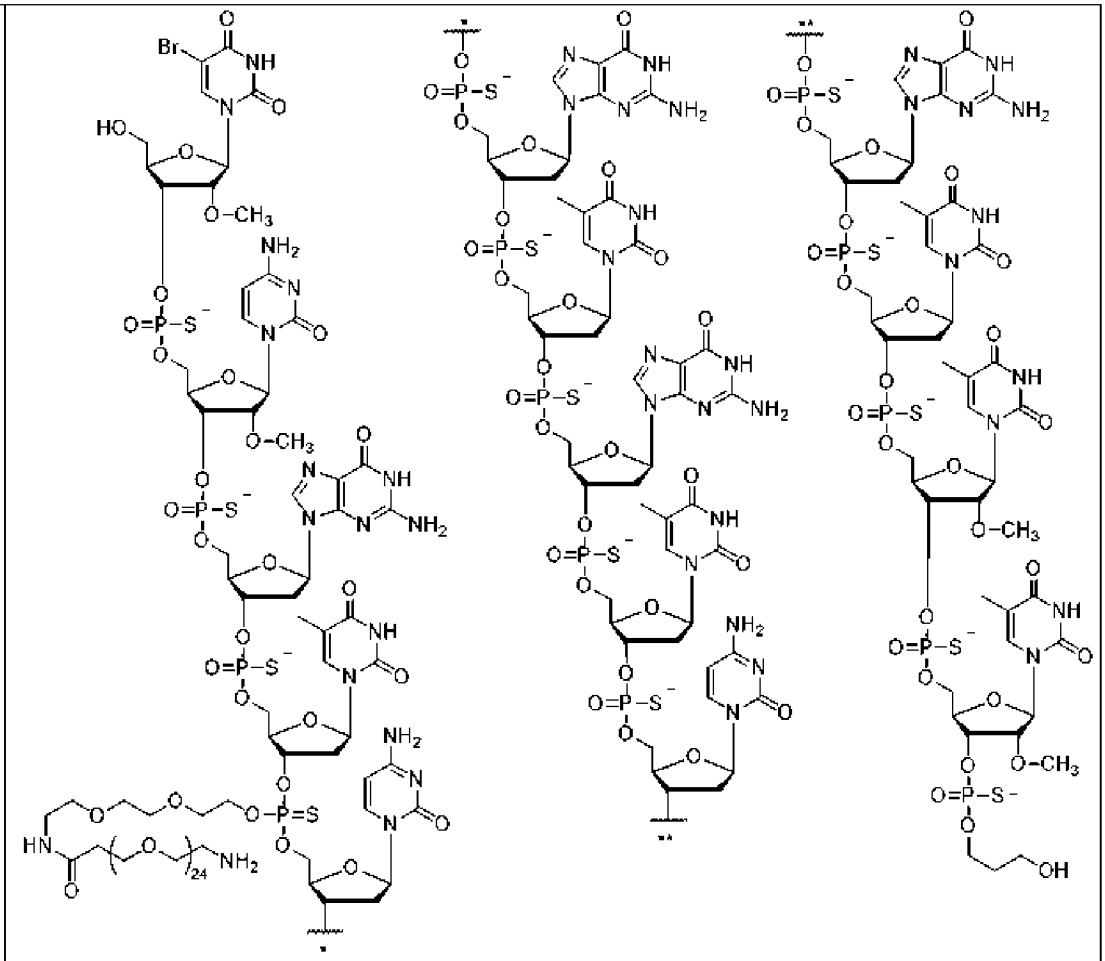
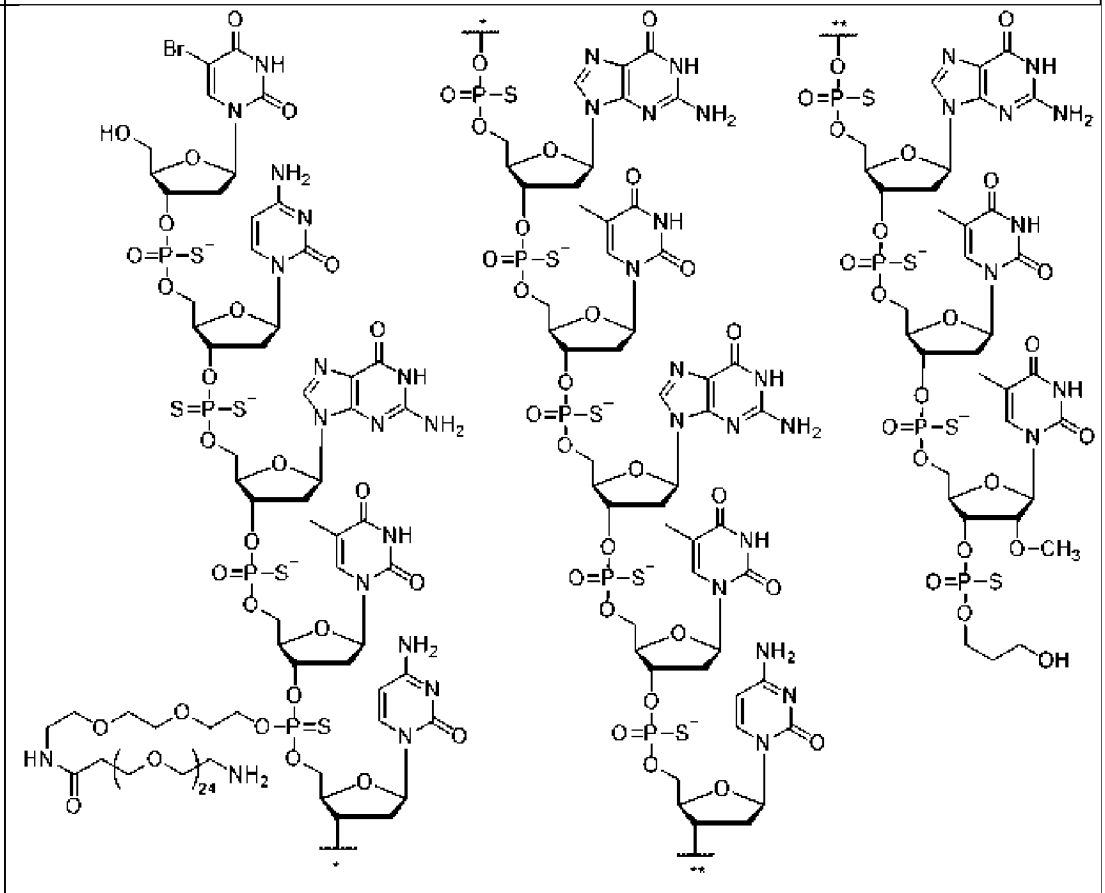
2.4b	

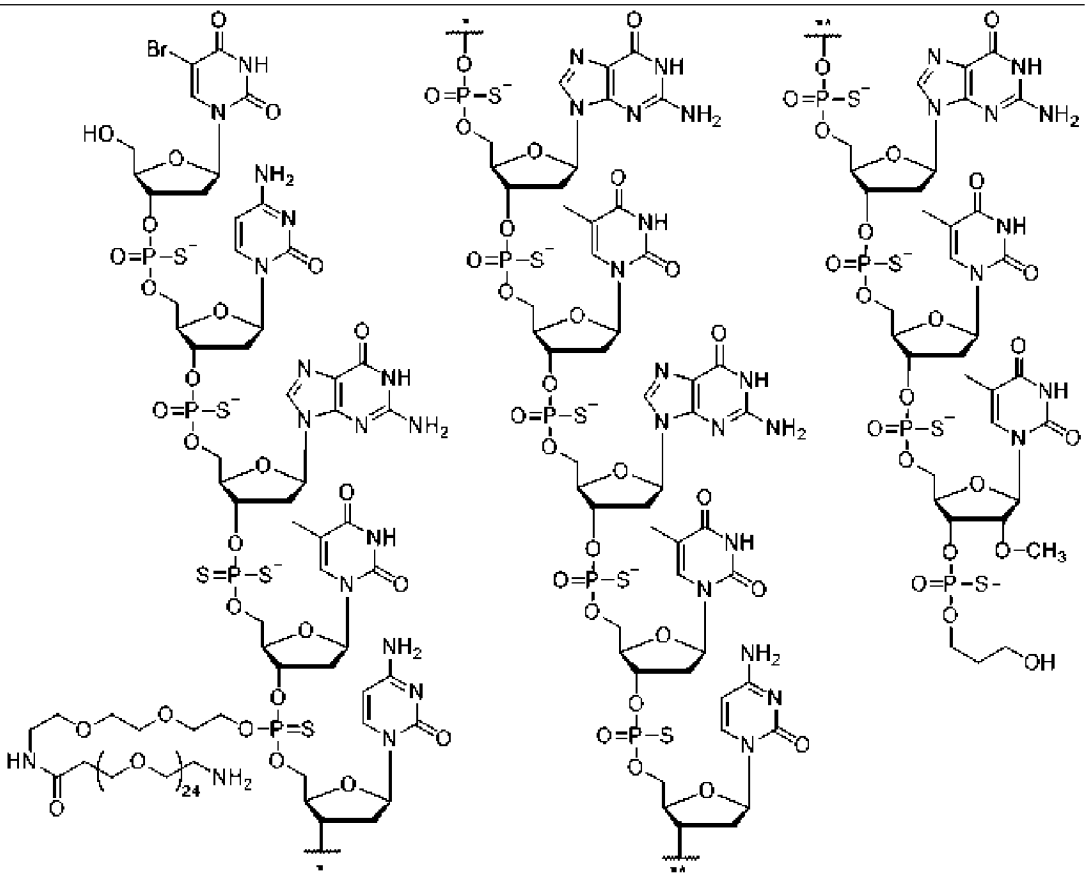
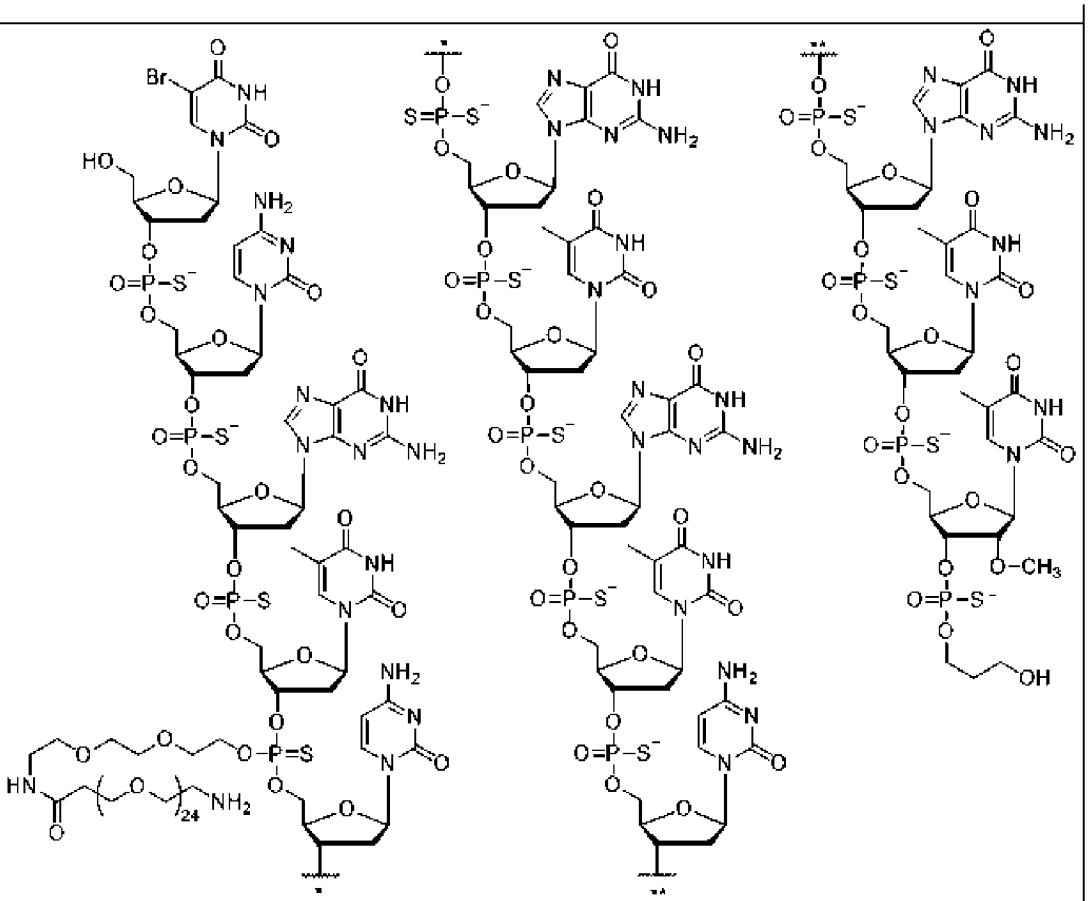
Таблица 12. Модифицированные олигонуклеотидные структуры (с -$PEG_3NHCOPEG_{24}NH_2$)

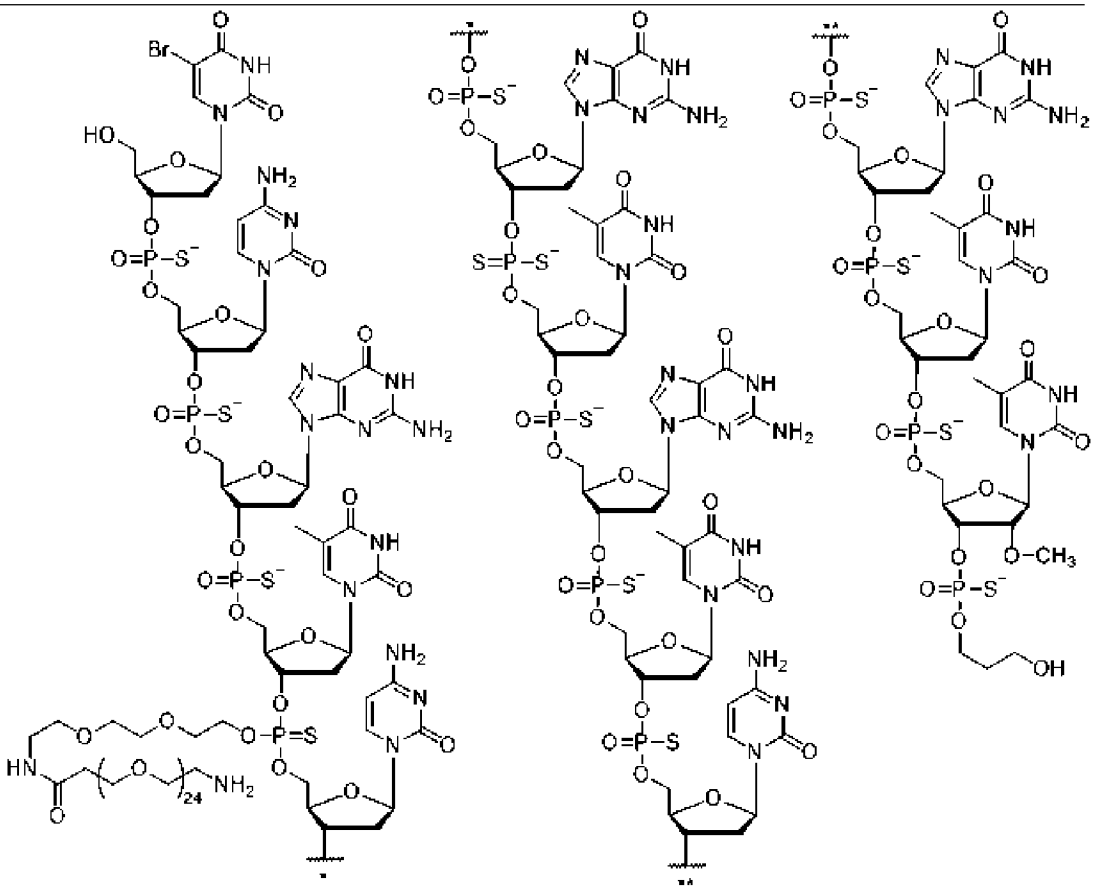
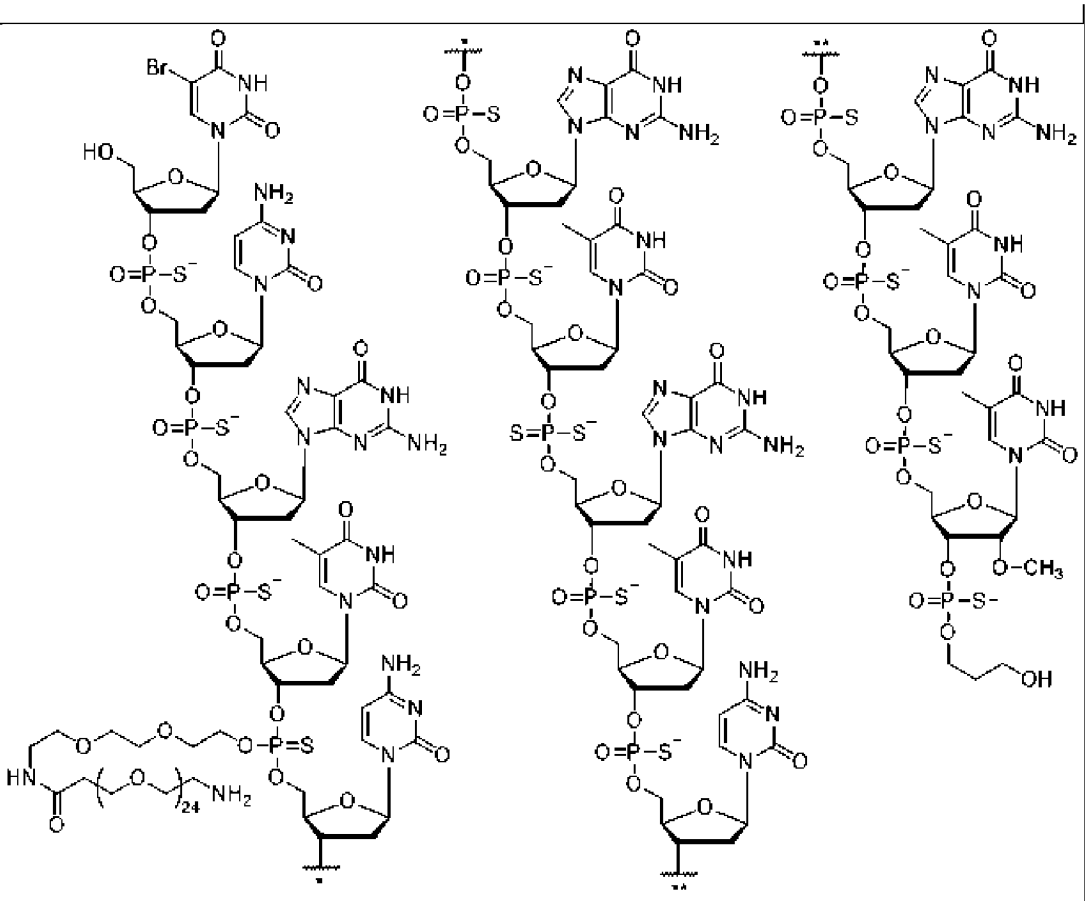
Соед. №	**Структура**
3.1b	

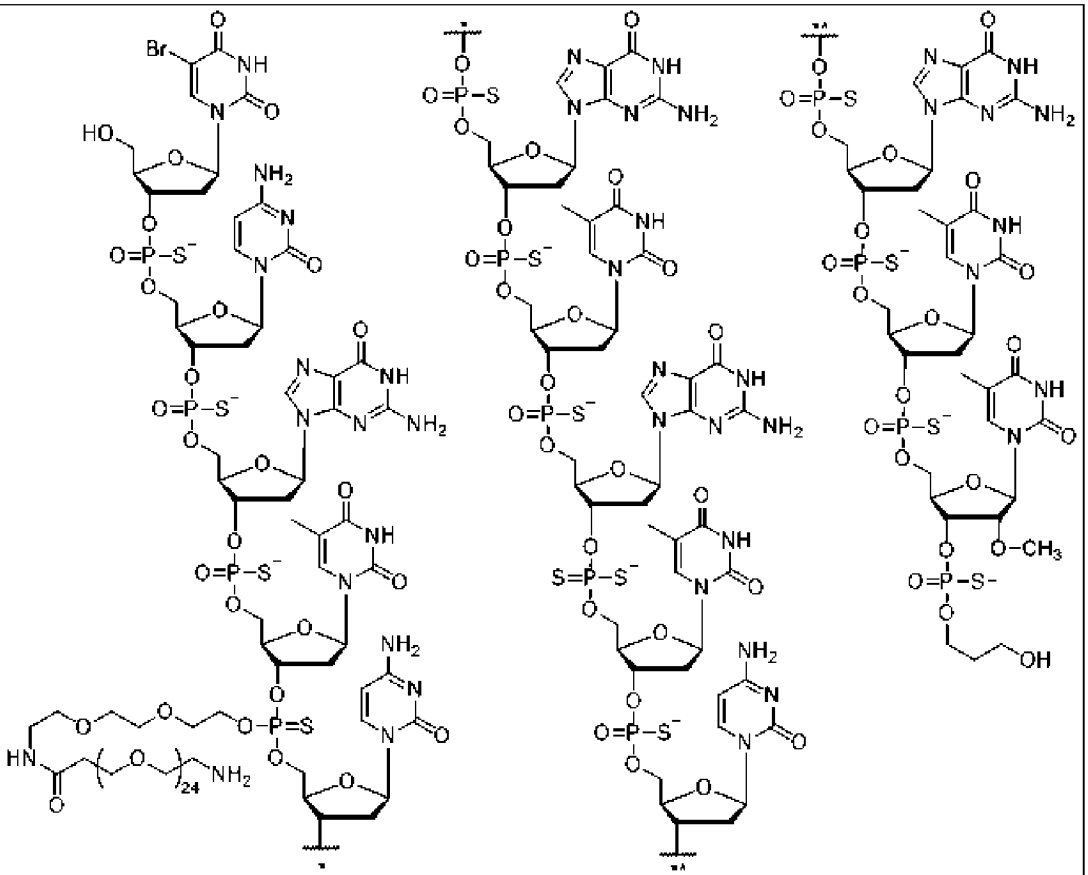
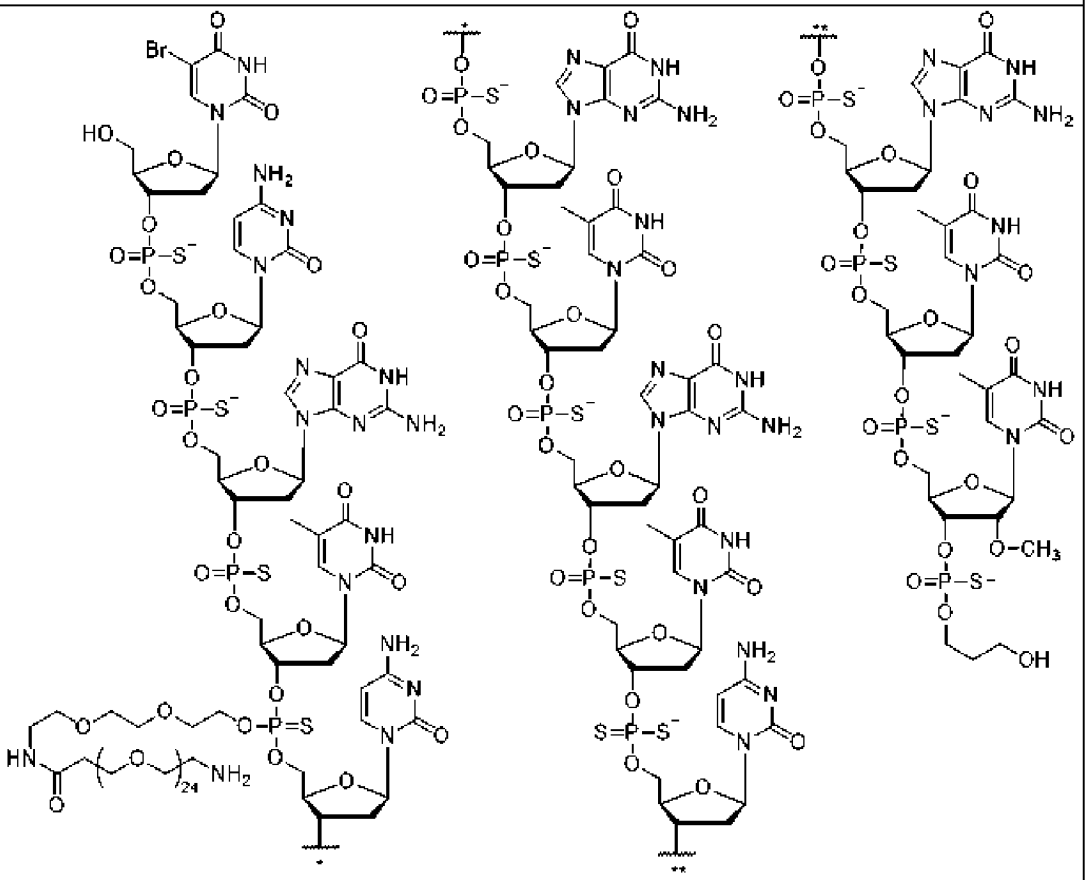
3.2b	
3.3b	

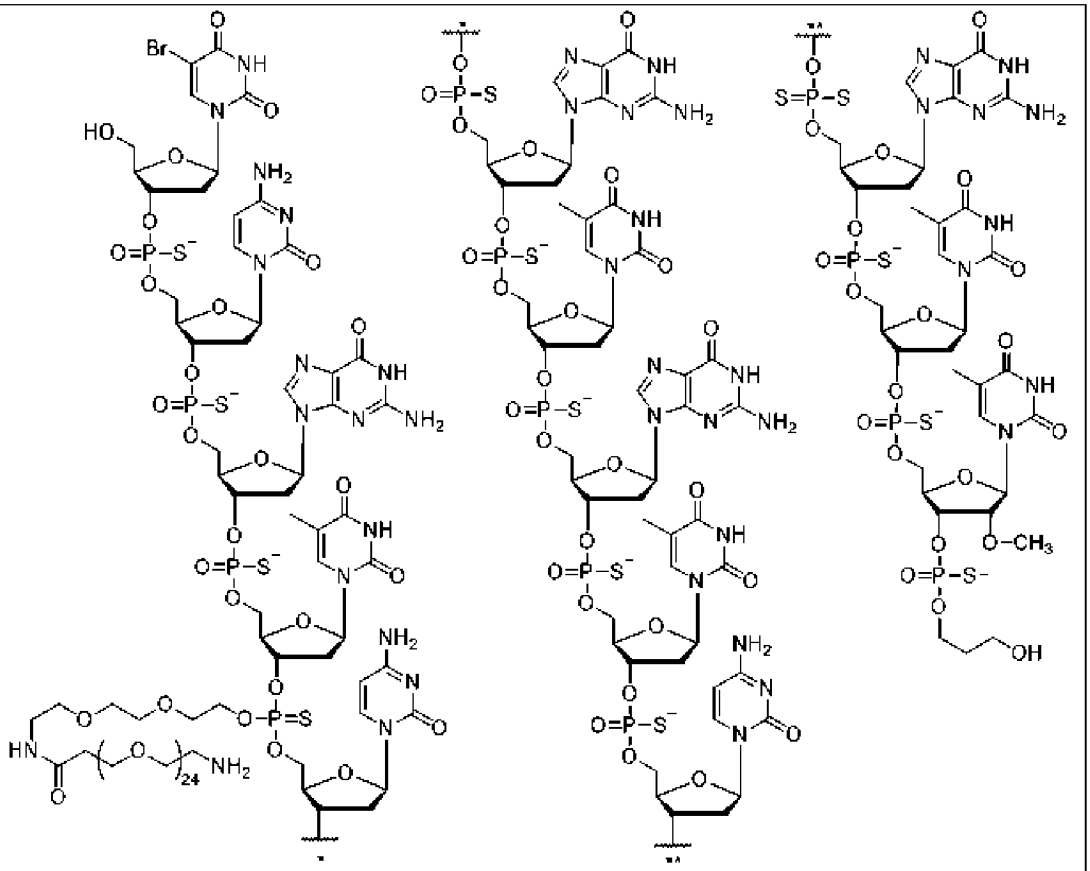
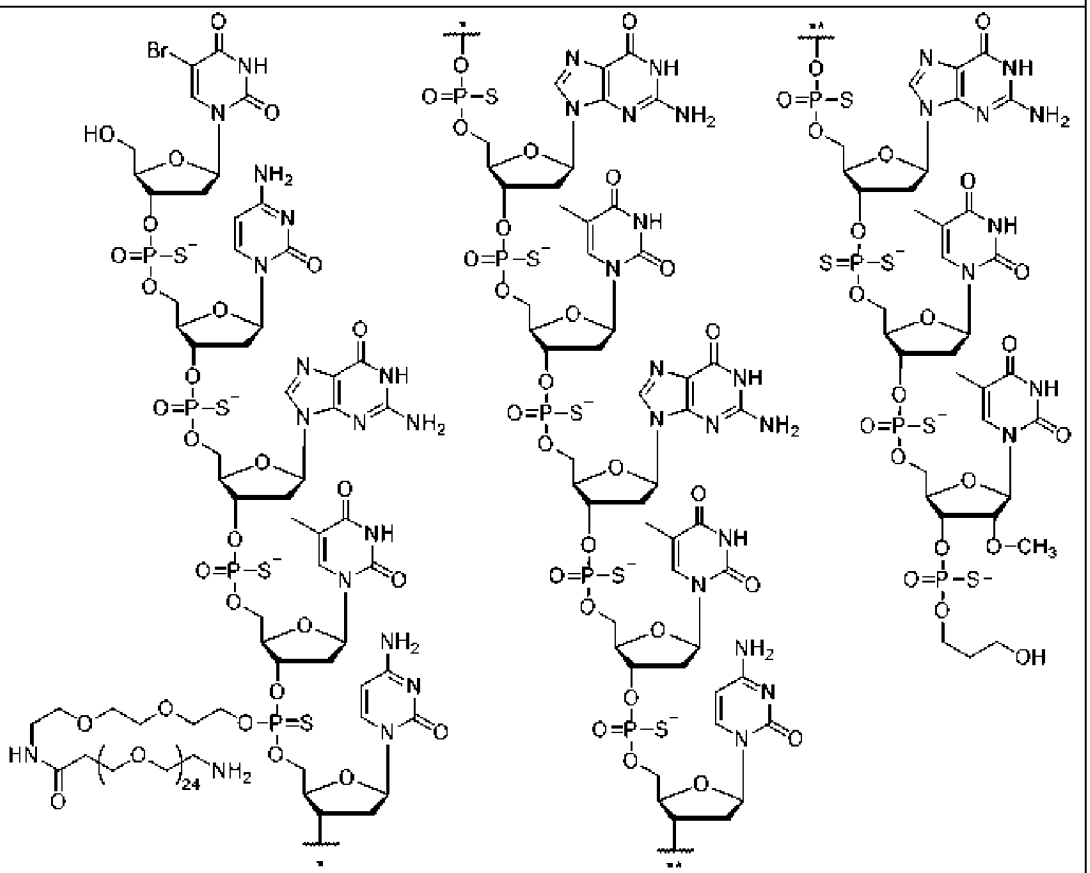
4.1b	
4.2b	

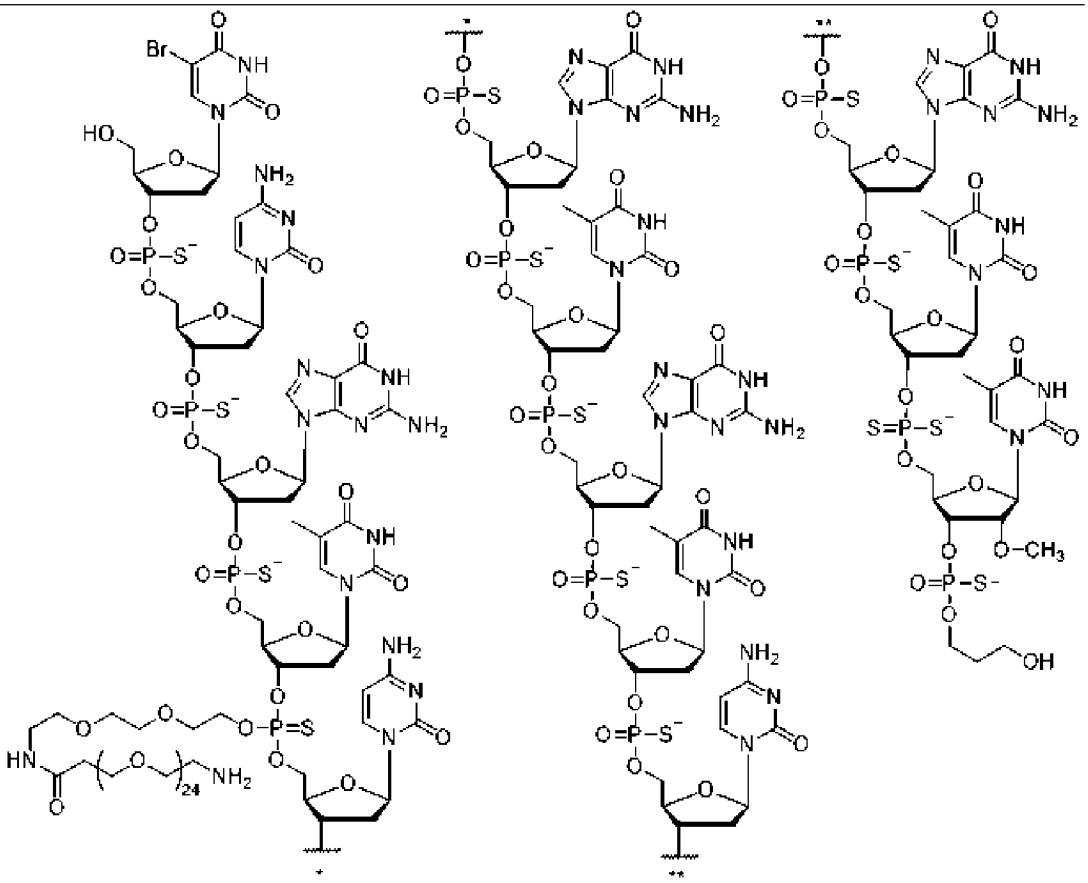
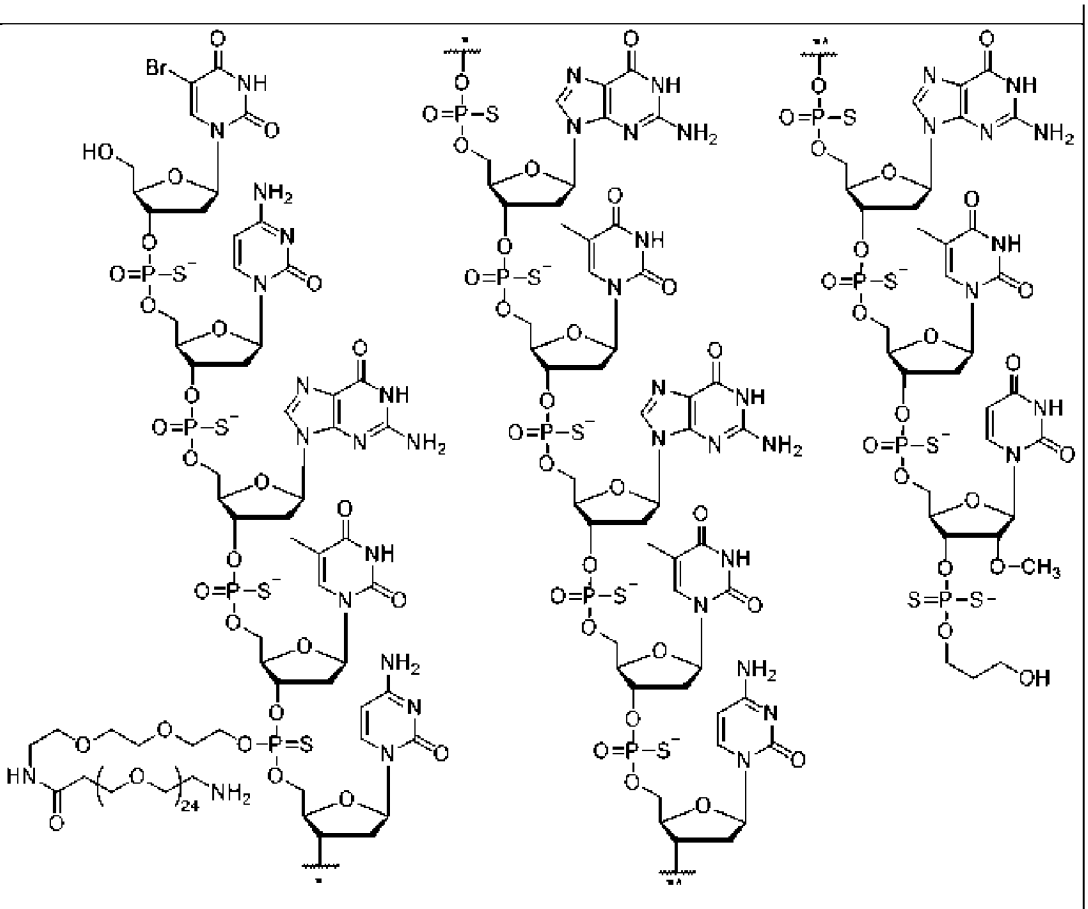
4.3b	
5.1b	

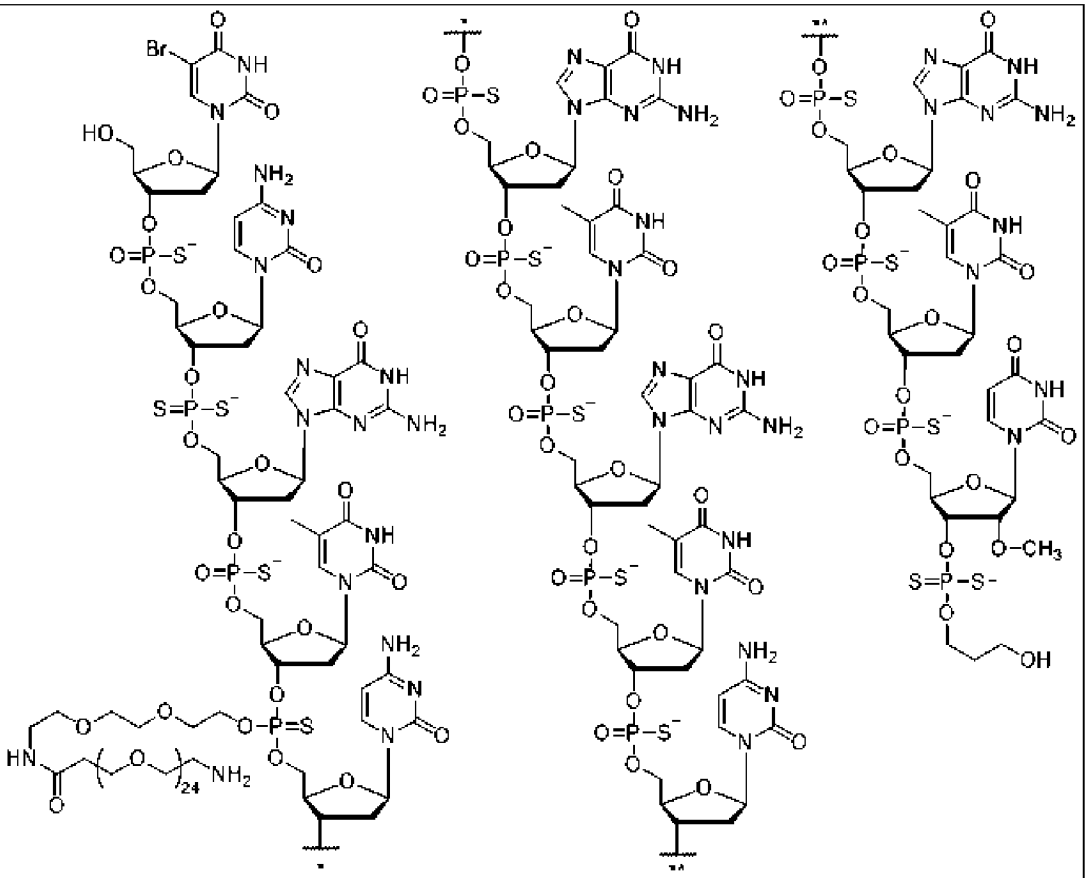
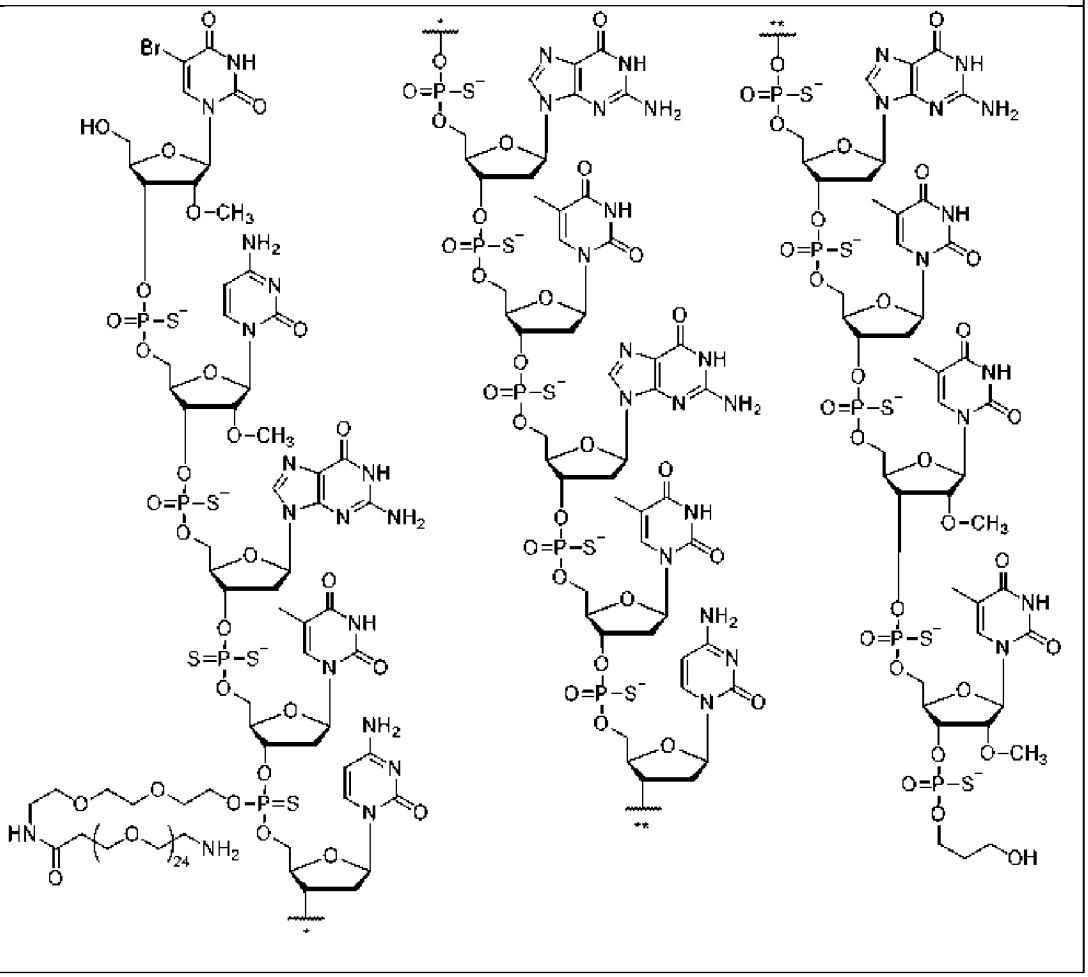
5.2b	
5.3b	

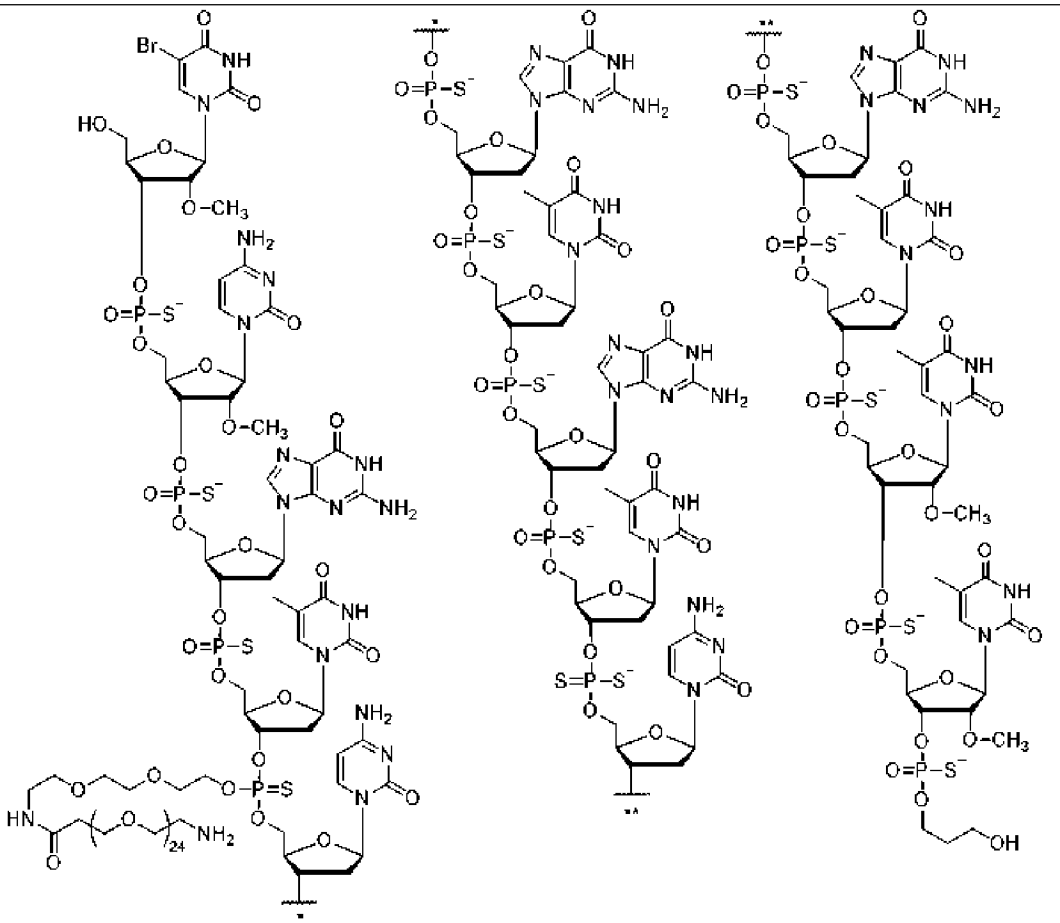
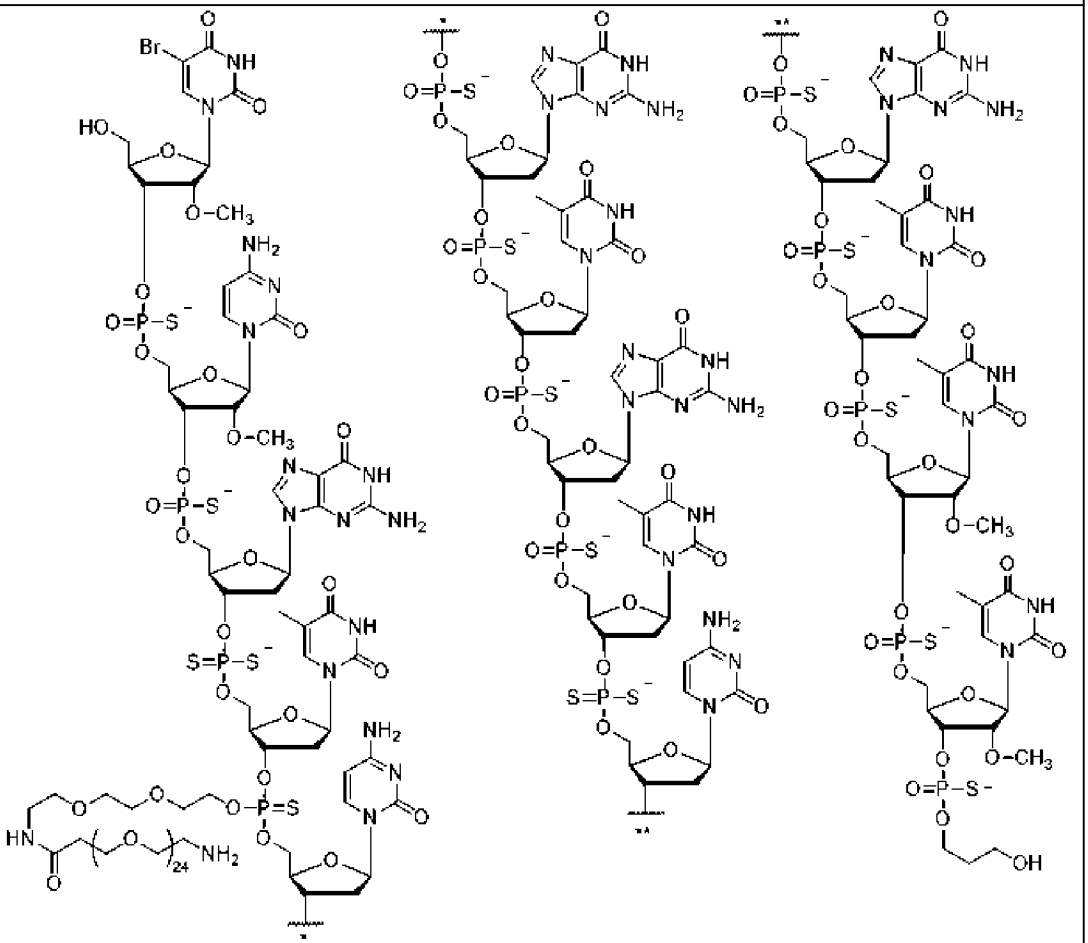
5.4b	
5.5b	

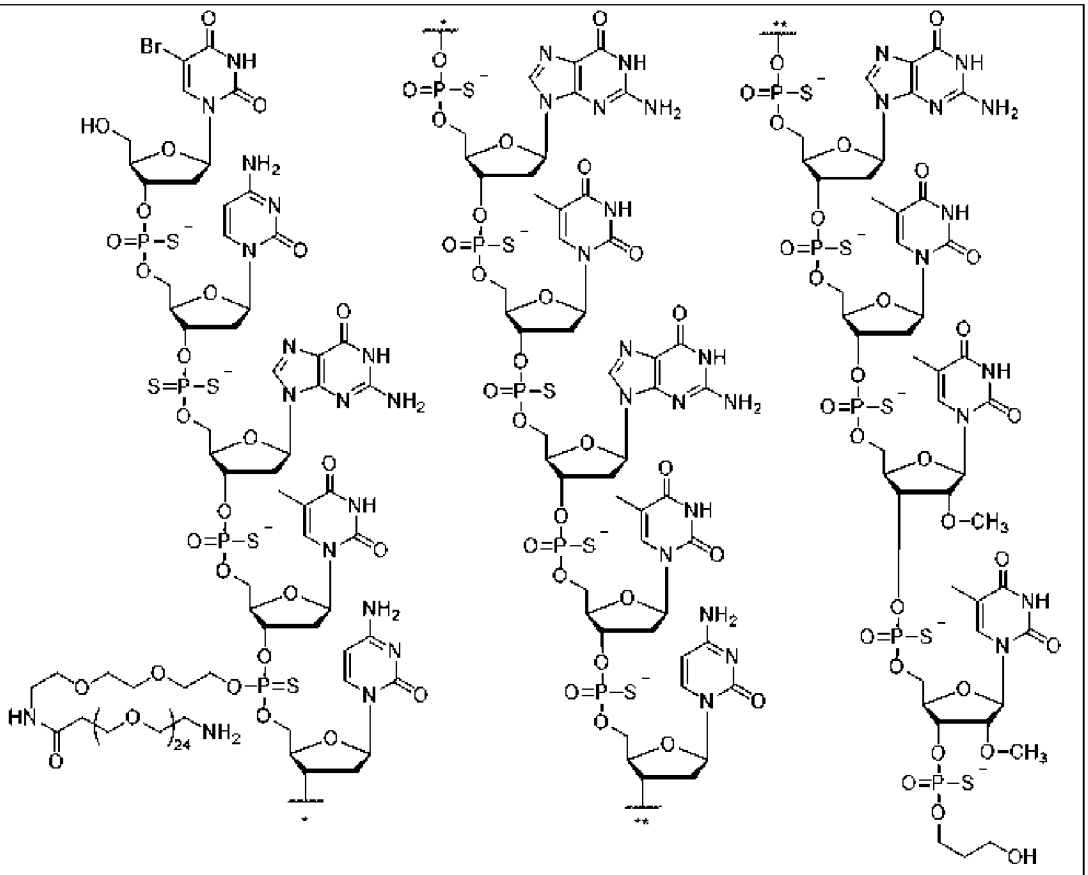
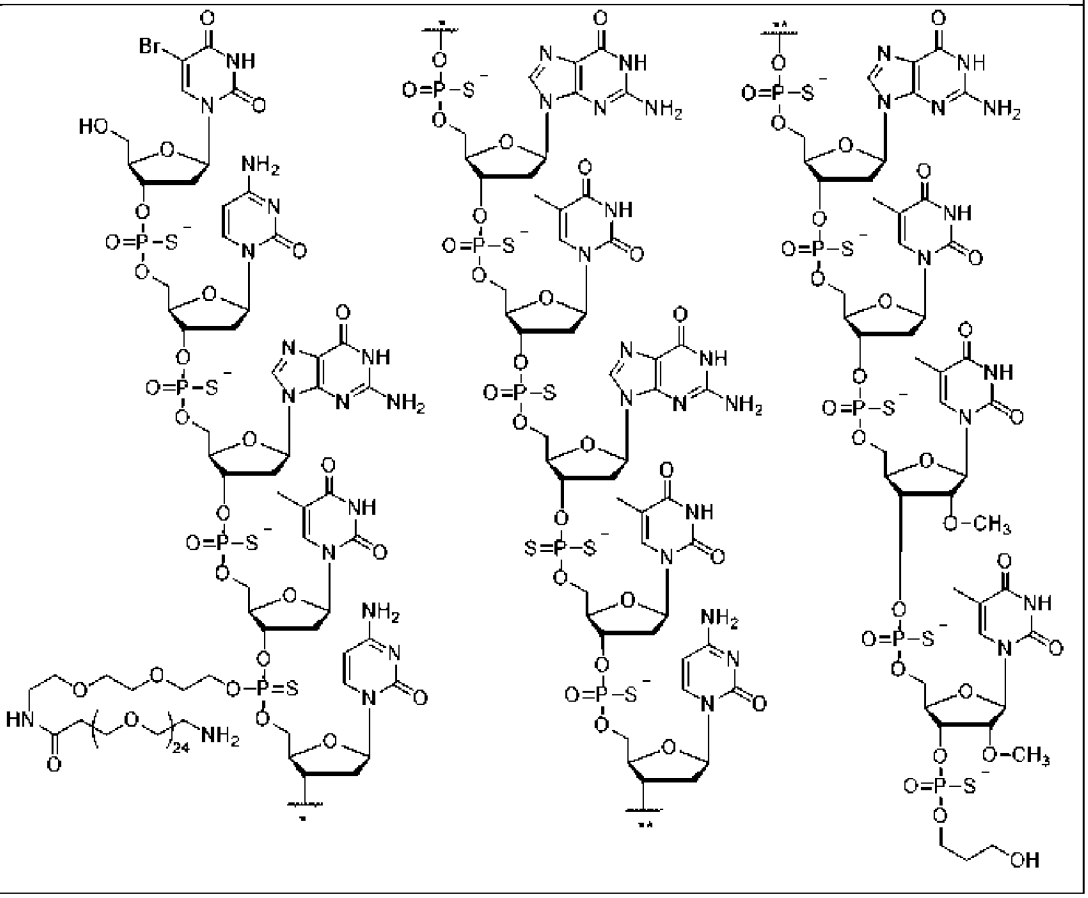
5.6b	
5.7b	

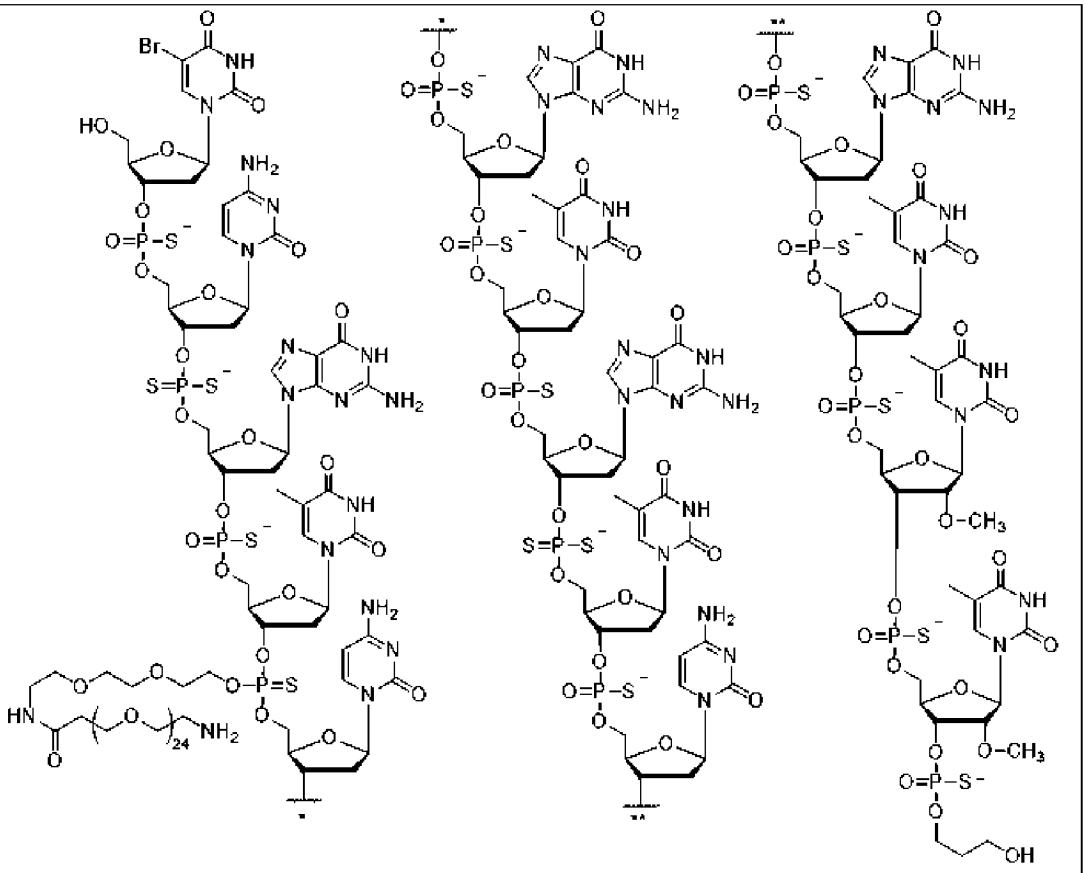
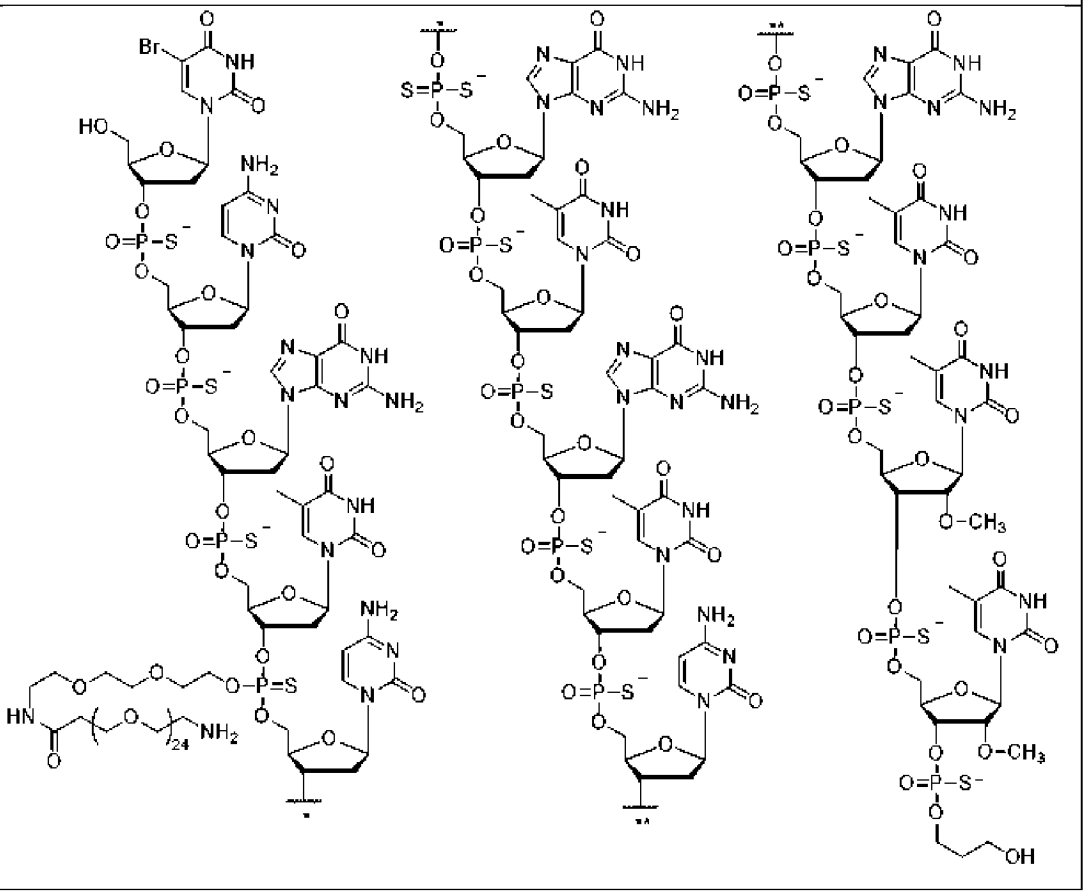
5.8b	
5.9b	

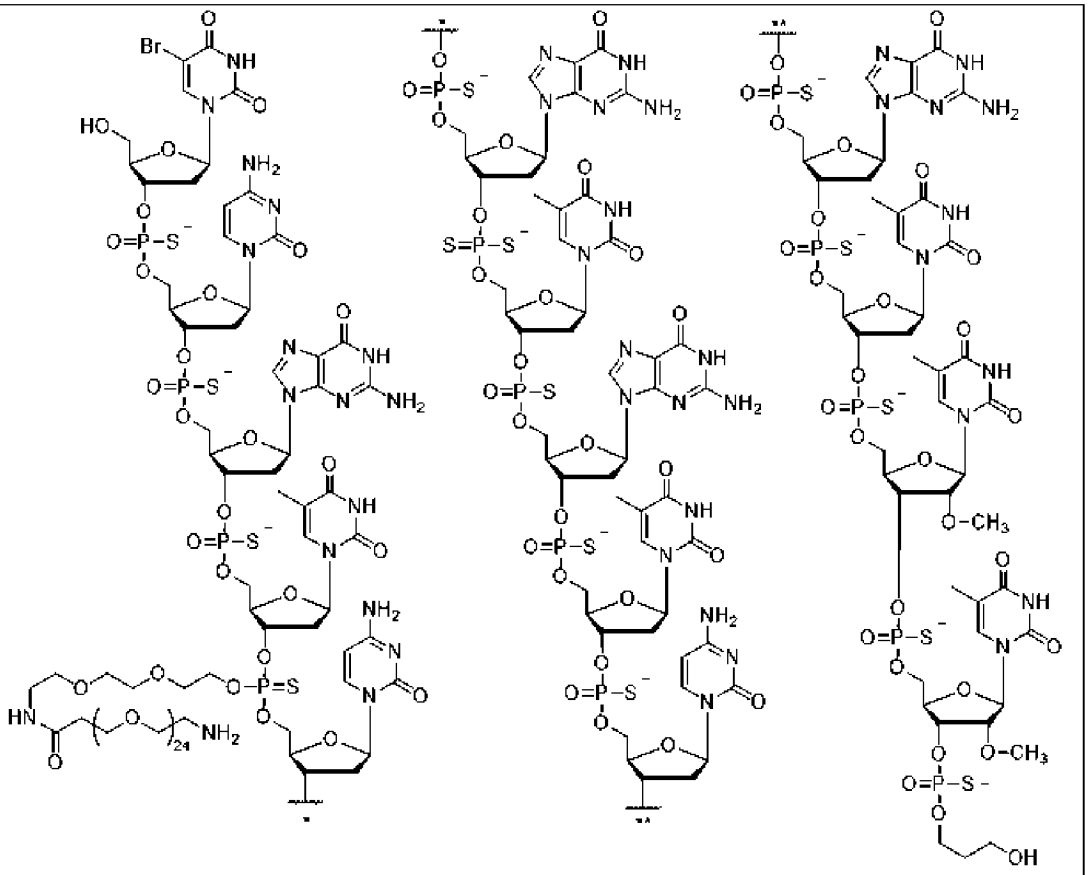
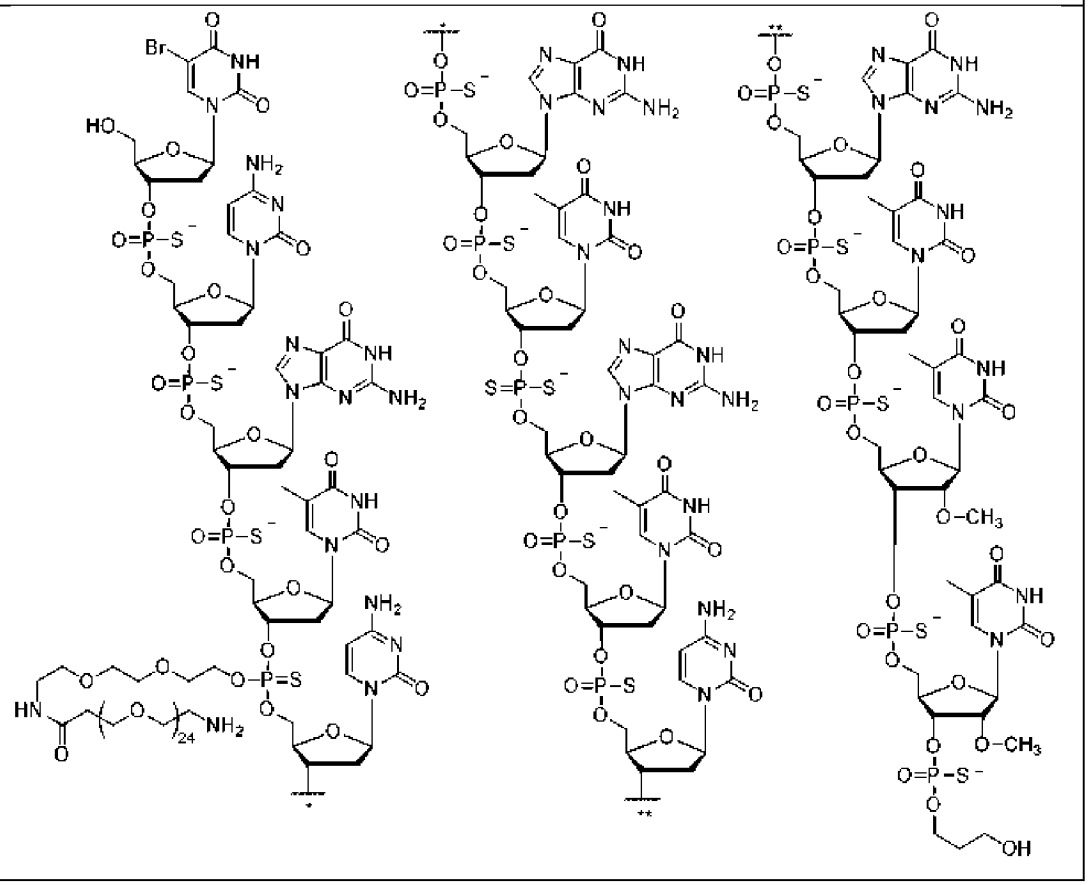
5.10b	
5.11b	

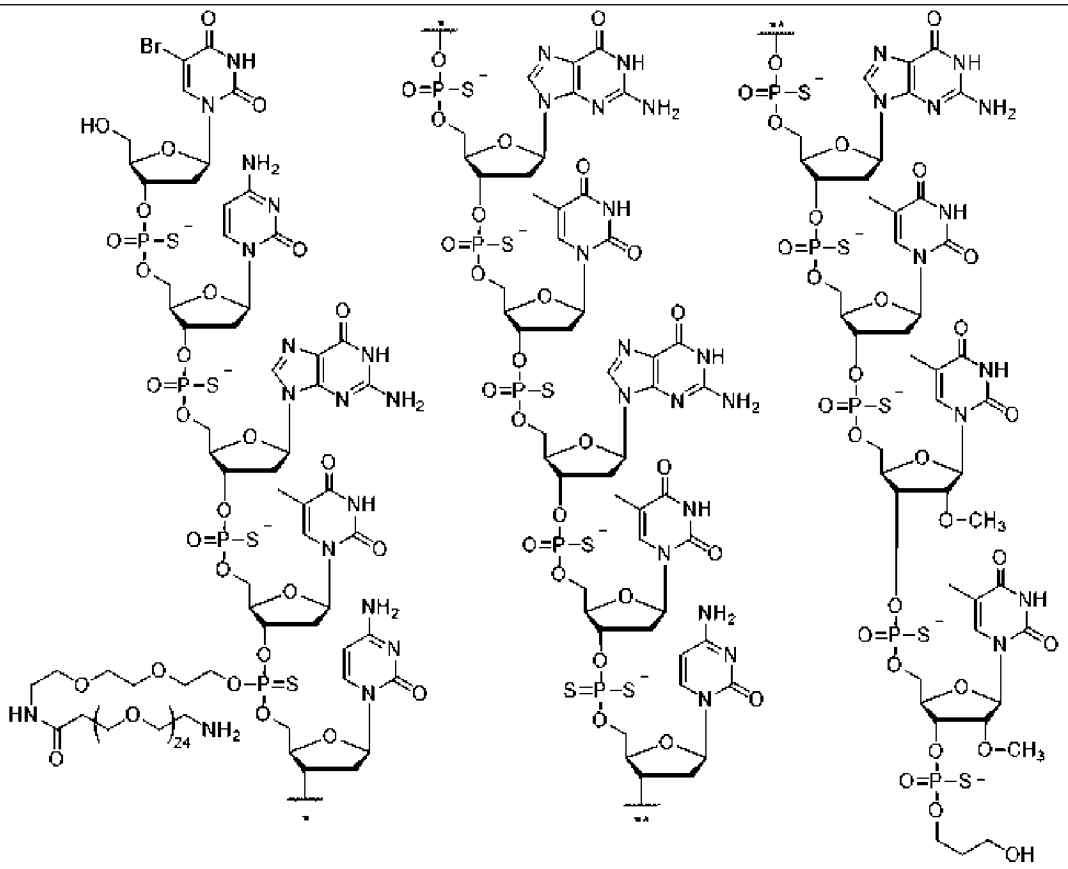
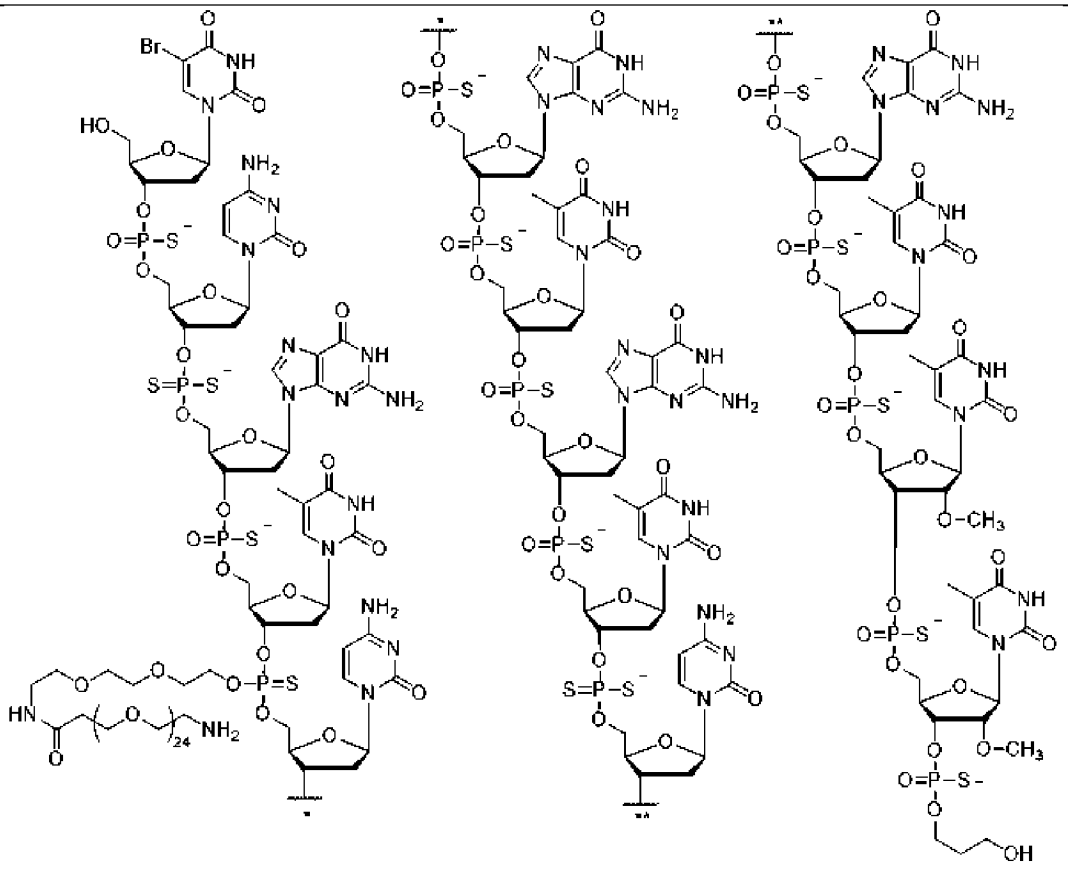
5.12b	
6.1b	

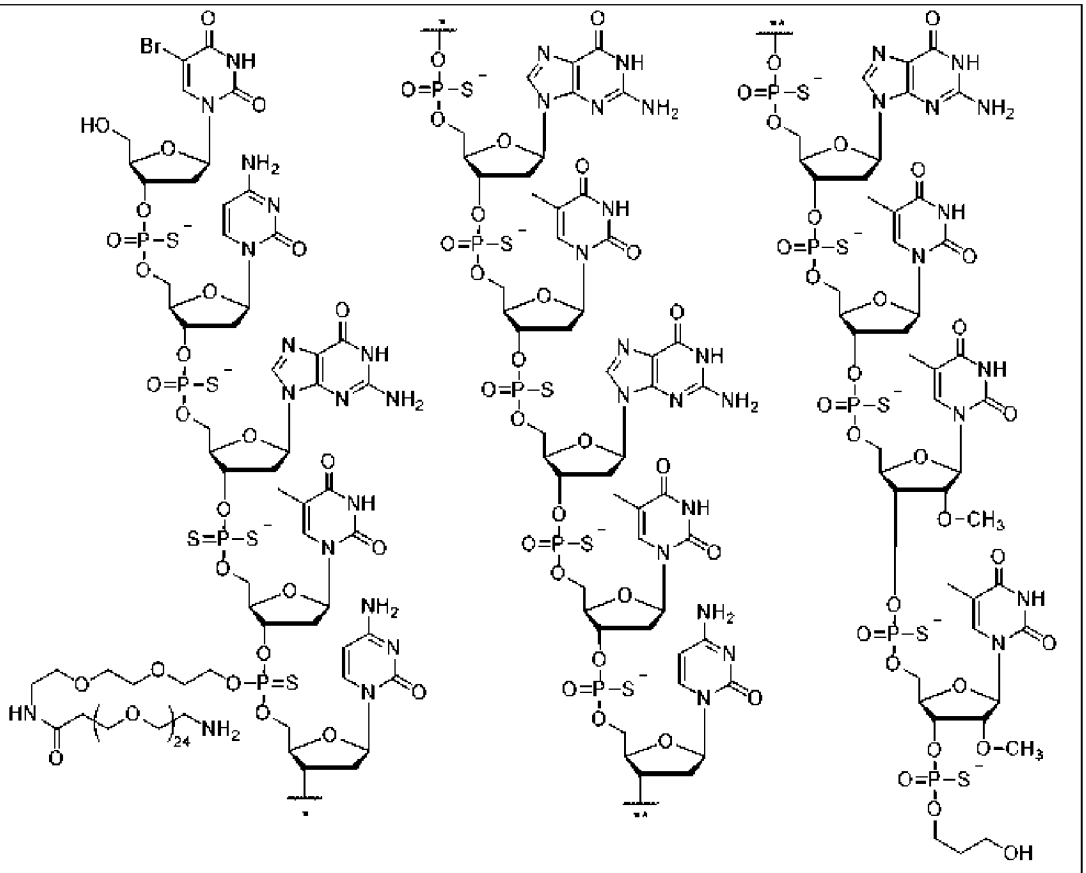
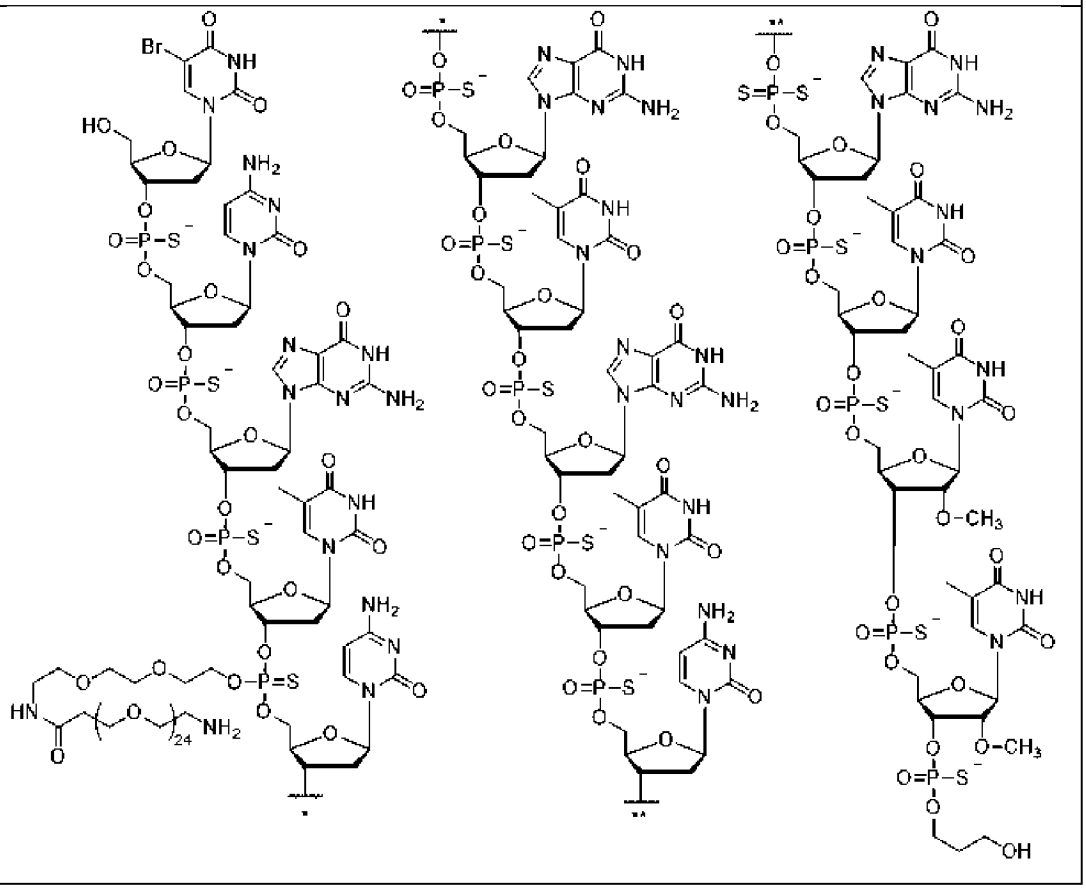
6.2b	
6.3b	

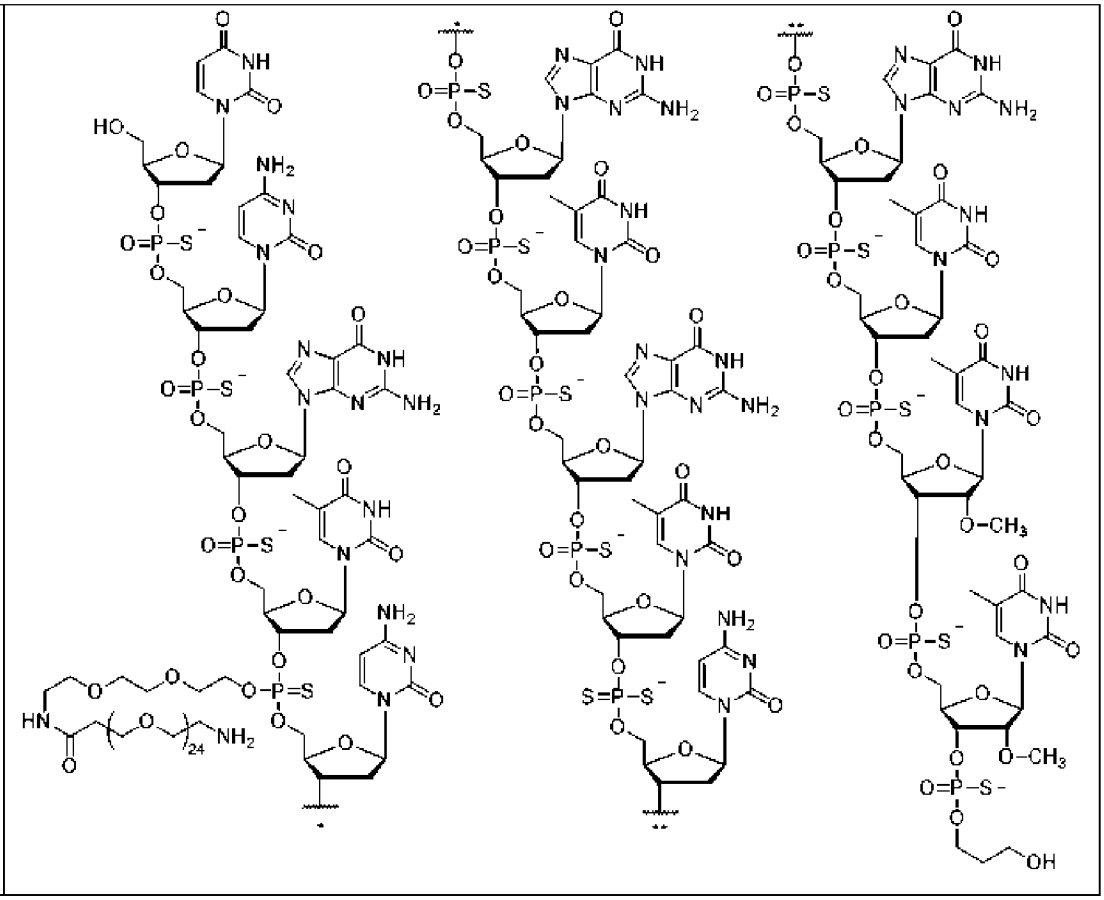
7.1b	
7.2b	

7.3b	
7.4b	

7.5b	
7.6b	

7.7b	
7.8b	

7.9b	
7.10b	

15.7b	

[00358] Как и в случае олигонуклеотидов формулы (C), иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (D) могут быть использованы без конъюгации с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или могут быть использованы в качестве предшественников для получения конъюгатов, содержащих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов формулы (D), связанных посредством Q-метки, как показано в структурах формулы (A), как описано в настоящем документе.

[00359] В одном аспекте, в настоящем документе предложен иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D), где олигонуклеотид не конъюгирован с каким-либо способом доставки (таким как наночастица или белок) или таргетной группой (таким как антитело или его антигенный фрагмент). Такие олигонуклеотиды можно далее называть «голыми» олигонуклеотидами или «голыми» CpG.

[00360] В другом аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (D), где иммуномодулирующий олигонуклеотид пегилирован. В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (D), где иммуномодулирующий олигонуклеотид иммобилизован на грануле. В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (D), где иммуномодулирующий олигонуклеотид составлен в виде наночастицы. В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды

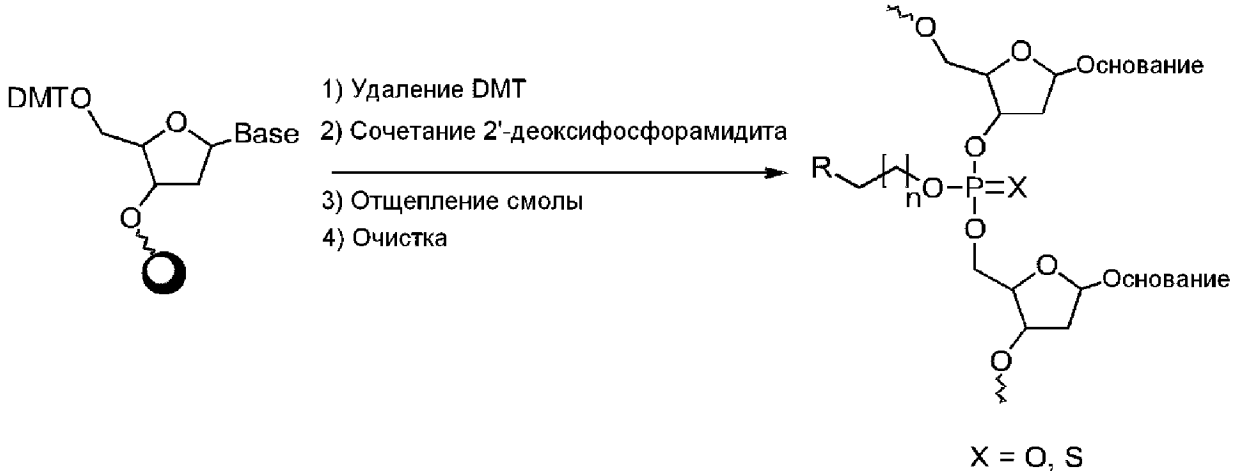
формулы (D), где иммуномодулирующий олигонуклеотид инкапсулирован в липосому. В еще одном аспекте, в настоящем документе предложены иммуномодулирующие олигонуклеотиды формулы (D), где иммуномодулирующий олигонуклеотид конъюгирован с полипептидом.

[00361] В еще одном аспекте, в настоящем документе предложен способ доставки иммуномодулирующего олигонуклеотида в соответствии с любым из вариантов осуществления настоящего документа, включающий контакт иммуномодулирующего олигонуклеотида с клеткой. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид пегилирован. В других вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид иммобилизован на грануле. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид входит в состав наночастицы. В других вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид инкапсулирован в липосому. В некоторых вариантах осуществления, иммуномодулирующий олигонуклеотид конъюгирован с полипептидом.

[00362] Иммуномодулирующие олигонуклеотиды формул (C) и (D), как описано в настоящем документе, могут быть получены в соответствии со способами, известными в данной области техники. Общий способ получения иммуномодулирующих олигонуклеотидов, в том числе представленных в настоящем изобретении, описан ниже.

Общий синтез полинуклеотидов:

Общая схема:



Детали эксперимента:

[00363] Автоматизированный синтез полинуклеотидов (в масштабе 1 мкмоль) проводят на MerMade 6 или 12 со следующими реагентами и растворителями:

Окислитель - 0,02 М I_2 в ТГФ/пиридине/H_2O (окисление 60 с за цикл),

Сульфирующий реагент II - производное дитиазола/пиридина/ацетонитрила (0,05 М, в 6:4 пиридине:ацетонитриле) (60 с на цикл)

Деблокирование - 3% трихлоруксусная кислота (деблокирование 2х 40 с за цикл),

Cap Mix A - ТГФ/2,6-лутидин/Ac_2O (кэпирование 60 с за цикл), и

Cap Mix B - 16% метилимидазол в ТГФ (кэпирование 60 с за цикл)

[00364] Исключениями из стандартных условий синтеза полинуклеотидов

являются следующие:

- Используют подложки CPG с не нуклеозидным линкером, называемым Uny-линкер.

- Все 2'-дезоксифосфорамидиты ресуспендируют до 100 мМ в 100% безводном ацетонитриле перед синтезом, за исключением некоторых модифицированных 2'-дезоксифосфорамидитов, растворенных до 100 мМ в смеси ТГФ/ацетонитрил (1:4), в зависимости от растворимости исходного материала.

- Активацию фосфорамидита проводят 2,5-кратным молярным избытком 5-бензилтио-1H-тетразола (BTT). Активированные 2'-дезоксирибозофосфорамидиты сочетают для сочетания 2x 1 мин на вставку, и модифицированные фосфорамидиты сочетают для сочетания 2x 3 мин на вставку.

- Сульфирование основной цепи проводят с помощью 0,05М сульфирующего реагента II в пиридине/ацетонитриле (6:4) в течение 1 мин.

Протокол снятия защиты и очистки полинуклеотидов:

[00365] После автоматического синтеза полинуклеотидов, твердую подложку и защитные группы основания (такие как A-Bz, C-Ac, G-iBu и т. д.) и метиловые эфиры фосфотриэфиров отщепляют и снимают защиту в 1 мл AMA (соотношение 1:1 36% водн. аммиака и 40% метиламина в метаноле) в течение 2 ч или более при комнатной температуре с последующим центробежным испарением.

[00366] Неочищенные пеллеты полинуклеотидов ресуспендируют в 100 мкл 50% ацетонитрила, кратковременно нагревают до 65°C и тщательно встряхивают.

[00367] Для очистки полинуклеотидов, 100 мкл неочищенных полинуклеотидов вводят в ОФ-ВЭЖХ со следующими буферами/градиентом:

- Буфер A=50 мМ TEAA в воде;
- Буфер B=90% ацетонтрила; и
- Скорость потока=1 мл/мин;
- Градиент:
  - 0-2 мин (100% буфера A/0% буфера B),
  - 2-42 мин (от 0% до 60% буфера B) и
  - 42-55 мин (от 60% до 100% буфера B).

Протокол конъюгации и очистки DBCO:

[00368] Сложный эфир DBCO NHS конъюгируют с неочищенным 2'-дезокси DMT-полинуклеотидом, как описано в настоящем документе. Пеллет неочищенного полинуклеотида суспендируют в 45 мкл ДМСО, кратковременно нагревают до 65°C и тщательно встряхивают. Добавляют 5 мкл ДИПЭА, и затем сложный эфир DBCO-NHS (30 экв.), который предварительно растворяют в ДМСО (1М). Реакционной смеси дают постоять в течение 10 минут или до тех пор, пока MALDI не подтвердит образование продукта. Всего 80 мкл неочищенных образцов полинуклеотидов вводят в ОФ-ВЭЖХ со следующими буферами/градиентом:

- Буфер A=50 мМ TEAA в воде.

- Буфер B=90% ацетонитрил
- Скорость потока=1 мл/мин
- Градиент:
  - 0-2 мин (90% буфера A/10% буфера B)
  - 2-42 мин (от 0% до 60% буфера B)
  - 42-55 мин (от 60% до 100% буфера B).

[00369] По преобладающим пикам ОФ-ВЭЖХ собирают фракции по 0,5 мл и анализируют с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF для подтверждения наличия желаемой массы. Отобранные по массе очищенные фракции замораживают и лиофилизируют. После высыхания, фракции ресуспендируют, объединяют с соответствующими фракциями, замораживают и лиофилизируют.

[00370] Расщепление DMT: лиофилизированные пеллеты суспендируют в 20 мкл 50% ацетонитрила и добавляют 80 мкл уксусной кислоты, образцы выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч, замораживают и лиофилизируют. Высушенные образцы повторно растворяют в 20% ацетонитриле и обессоливают на колонках NAP 10 (Sephadex™-G25 DNA Grade). Собранные чистые фракции замораживают и лиофилизируют для получения конечного продукта.

Способы присоединения олигонуклеотидов к связывающей группе

Cu-*катализируемая клик-реакция*

Получение комплекса медь-THPTA

[00371] 5 мМ водный раствор пентагидрата сульфата меди ($CuSO_4$-$5H_2O$) и 10 мМ водный раствор Tris(3-гидроксипропилтриазолилметил)амина (THPTA) смешивают в соотношении 1:1 (об./об.) (молярное соотношение 1:2) и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа. Этот комплекс можно использовать для катализа циклоприсоединения Хьюсгена, например, как показано на общих схемах сопряжения ниже.

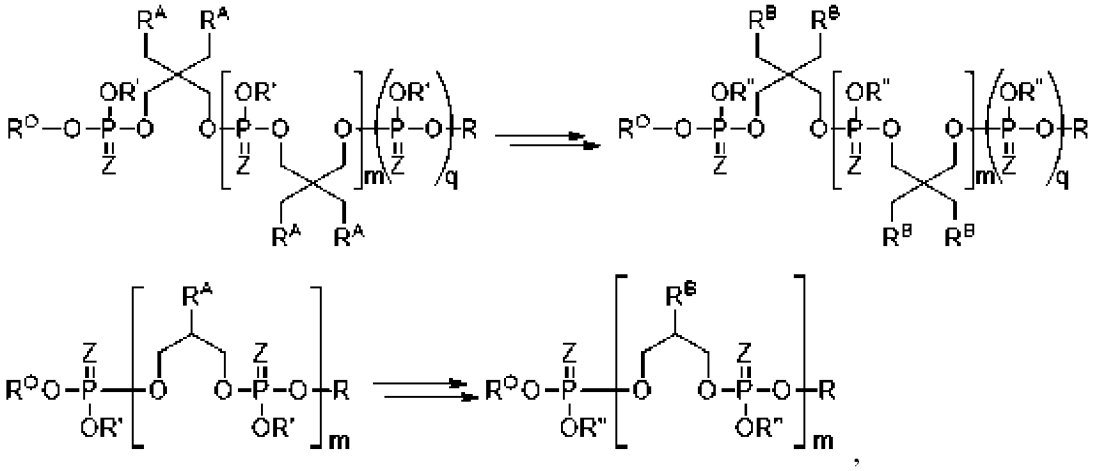
Общая методика (шкала 100 нМ):

[00372] К раствору 710 мкл воды и 100 мкл *трет*-бутанола (10% от конечного объема) в 1,7 мл пробирке Эппендорфа добавляют 60 мкл комплекса медь-THPTA, затем 50 мкл 2 мМ раствора олиго, 60 мкл 20 мМ водного раствора аскорбата натрия и 20 мкл 10 мМ раствора таргетной группы-азида. После тщательного перемешивания, раствору дают постоять при комнатной температуре в течение 1 часа. Завершение реакции подтверждают анализом геля. Реакционную смесь добавляют во флакон с завинчивающейся крышкой, содержащий 5-10-кратный молярный избыток SiliaMetS® TAAcONa (натриевая соль ЭДТК, связанная смолой). Смесь перемешивают в течение 1 часа. Затем эту смесь элюируют через колонку illustra™Nap™-10 Sephadex™. Полученный раствор затем замораживают и лиофилизируют в течение ночи.

Присоединение через амидную связь:

[00373] Конъюгацию посредством амидирования можно проводить в условиях реакции амидирования, известных в данной области техники. См., например, Aaronson et

al., Bioconjugate Chem. 22:1723-1728, 2011.



где

каждый q равен 0 или 1;

каждый m представляет собой целое число от 0 до 5;

Z представляет собой O или S;

R^O представляет собой связь с нуклеозидом в полинуклеотиде;

R представляет собой связь с H, нуклеозидом в полинуклеотиде, с твердой подложкой или с кэпирующей группой (например, $-(CH_2)_3-OH$);

каждый R' независимо представляет собой H, $-Q^1-Q^{A1}$, биообратимую группу или не биообратимую группу;

каждый R" независимо представляет собой H, $-Q^1-Q^A-Q^1-T$, биообратимую группу или не биообратимую группу;

каждый R^A независимо представляет собой H или $-OR^C$, где R^C представляет собой $-Q^1-Q^{A1}$, биообратимую группу или не биообратимую группу;

каждый R^B независимо представляет собой H или $-OR^D$, где R^D представляет собой $-Q^1-Q^A-Q^2-T$, биообратимую группу или не биообратимую группу;

где

каждый Q^1 независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу, где одна валентность связана с Q^A или Q^{A1}, вторая валентность открыта, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо связана с вспомогательной группой;

каждый Q^2 независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу, где одна валентность связана с Q^A, вторая валентность связана с T, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо связана со вспомогательной группой;

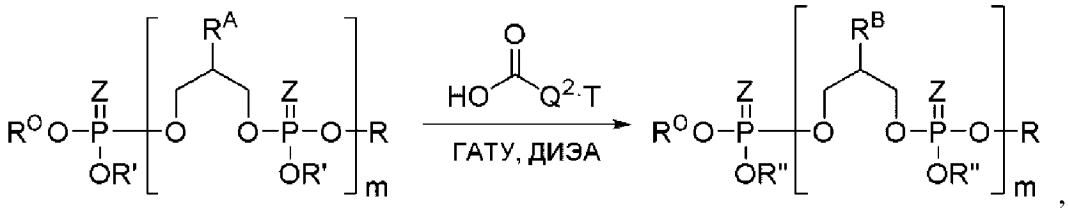
Q^A представляет собой необязательно замещенный C_{2-12} гетероалкилен, содержащий -C(O)-N(H) или -N(H)-C(O)-;

Q^{A1} представляет собой $-NHR^{N1}$ или $-COOR^{12}$, где R^{N1} представляет собой H, N-защитную группу или необязательно замещенный C_{1-6} алкил, и R^{12} представляет собой H, необязательно замещенный C_{1-6} алкилом, или O-защитную группу; и

T представляет собой связывающую группу,

при условии, что исходные материалы содержат хотя бы один $-Q^1-Q^{A1}$, и продукты содержат $-Q^1-Q^A-Q^2-T$.

[00374] Присоединение в фазе раствора:



,

где

m представляет собой целое число от 0 до 5;

Z представляет собой O или S;

R^O представляет собой связь с нуклеозидом в полинуклеотиде;

R представляет собой связь с H, нуклеозидом в полинуклеотиде или с кэпирующей группой;

каждый R' независимо представляет собой H, $-Q^1-NH_2$, биообратимую группу или не биообратимую группу;

каждый R" независимо представляет собой H, $-Q^1-NH-CO-Q^2-T$, биообратимую группу или не биообратимую группу;

каждый R^A независимо представляет собой H или $-OR^C$, где R^C представляет собой Q^1-NH_2, биообратимую группу или не биообратимую группу;

каждый R^B независимо представляет собой H или $-OR^D$, где R^D представляет собой $-Q^1-NH-CO-Q^2-T$, биообратимую группу или не биообратимую группу;

где

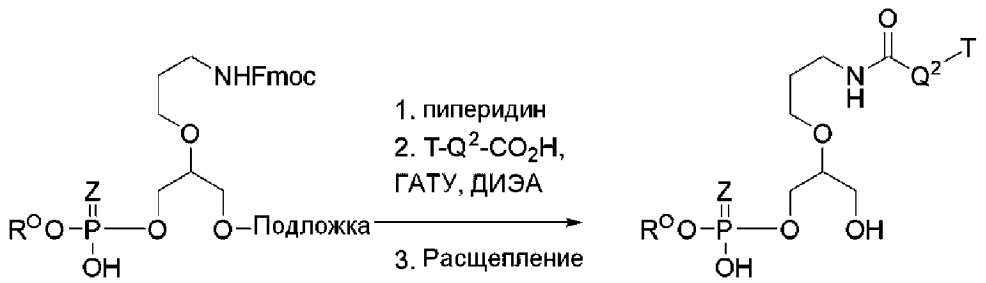
каждый Q^1 независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу, где одна валентность связана с -NH-CO- или $-NH_2$, вторая валентность открыта, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо присоединена к вспомогательной группе;

каждый Q^2 независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу, где одна валентность связана с -NH-CO-, вторая валентность связана с T, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо присоединена к вспомогательной группе; и

T представляет собой связывающую группу,

при условии, что исходный материал содержит $-Q^1-NH_2$, и продукт содержит $-Q^1-NH-CO-Q^2-T$.

[00375] Присоединение на подложке:



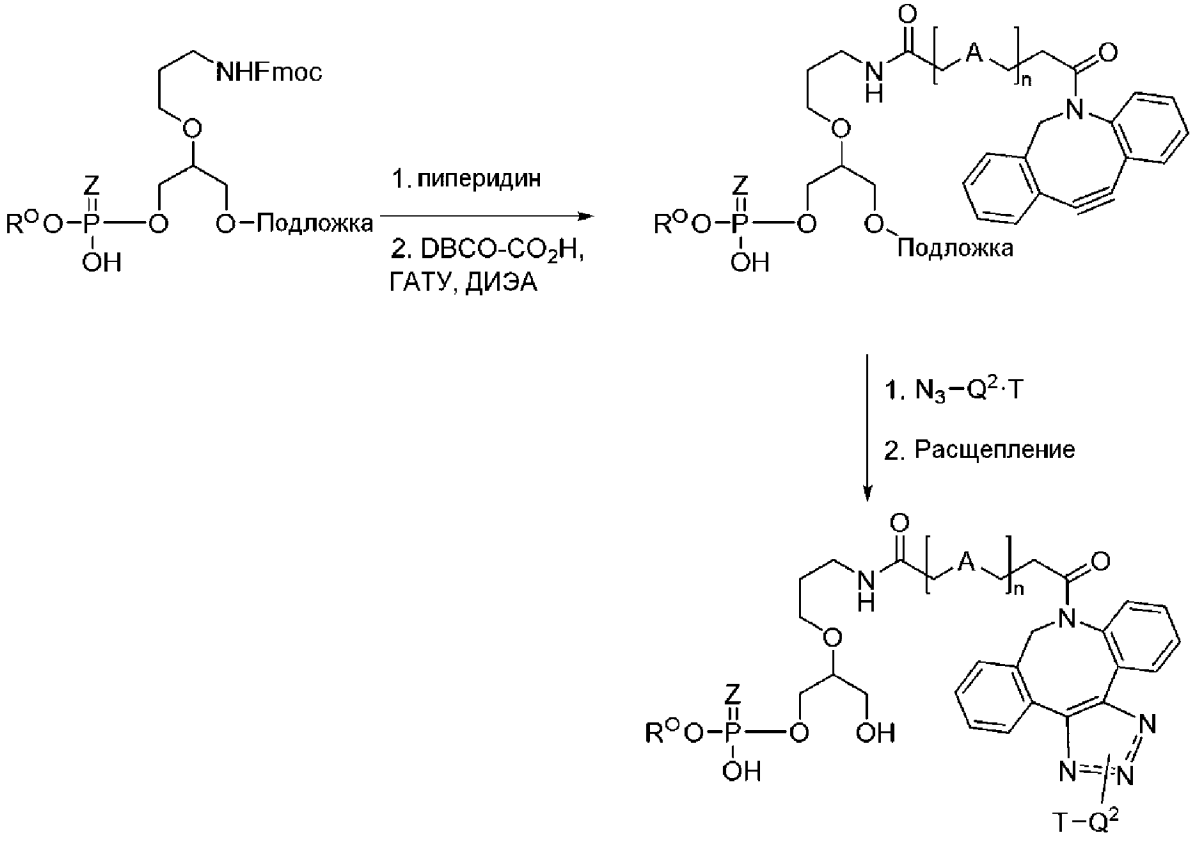
где

Z представляет собой O или S;

R^O представляет собой связь с нуклеозидом в полинуклеотиде;

каждый Q^2 независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу, где одна валентность связана с -NH-CO-, вторая валентность связана с T, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо присоединена к вспомогательной группе; и

T представляет собой связывающую группу.



где

n представляет собой целое число от 1 до 8;

A представляет собой O или $-CH_2-$;

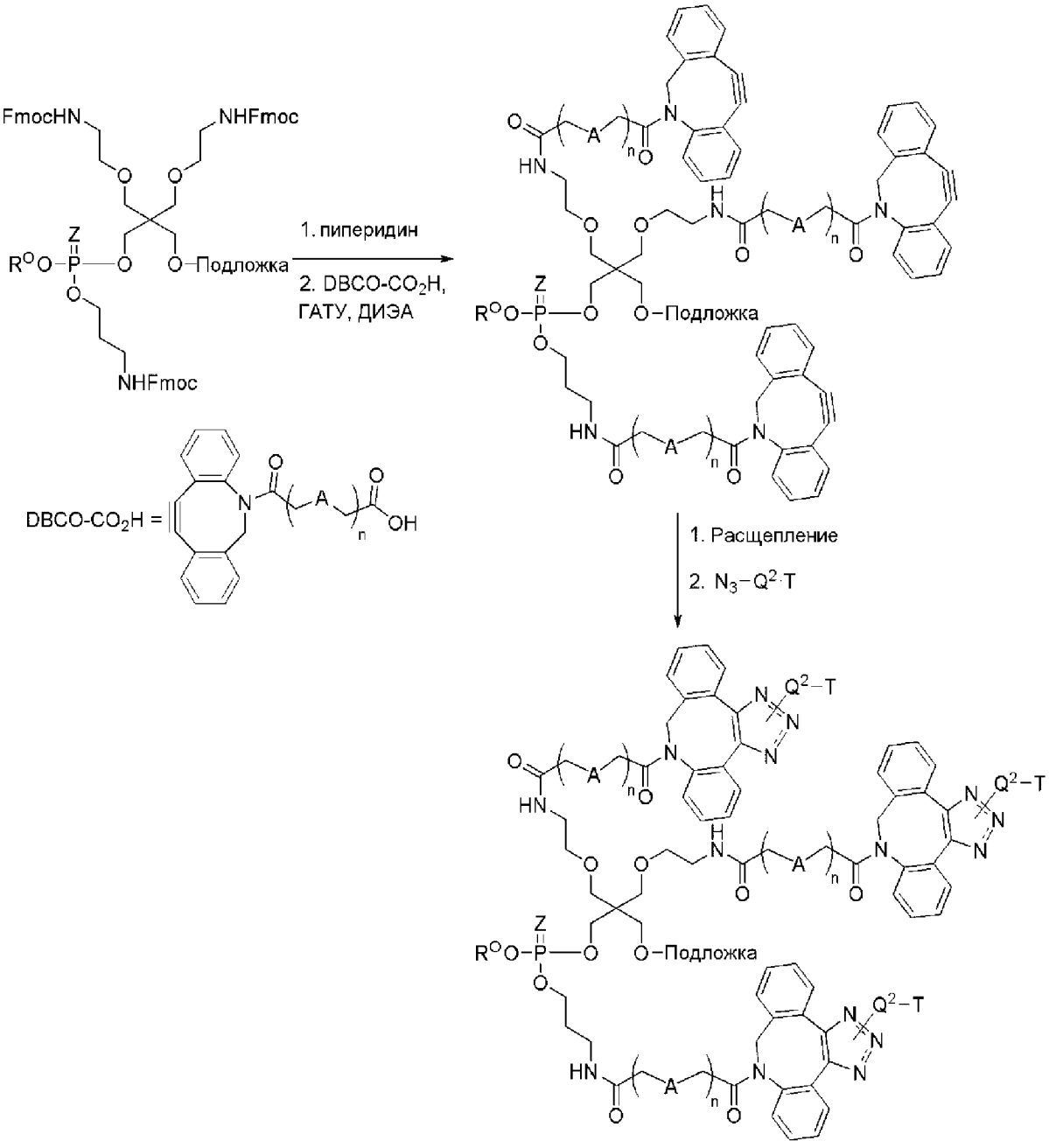
Z представляет собой O или S;

R^O представляет собой связь с нуклеозидом в полинуклеотиде;

каждый Q^2 независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу; где одна валентность связана с азидом или триазолом, вторая валентность связана с T, и каждая из оставшихся валентностей, если

они присутствуют, независимо связана с вспомогательной группой; и

T представляет собой связывающую группу.



где

n представляет собой целое число от 1 до 8;

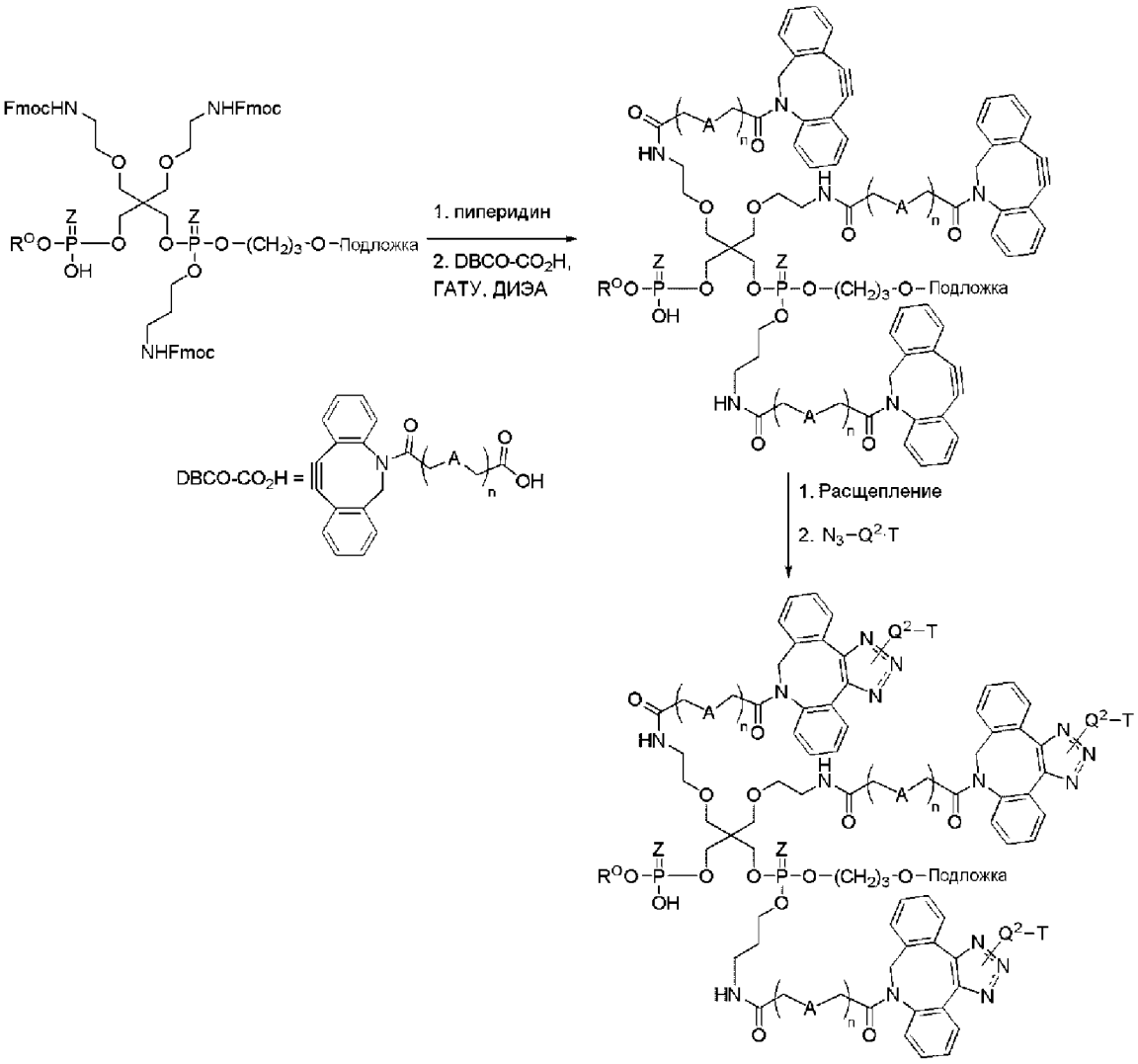
A представляет собой O или -CH_2-;

Z представляет собой O или S;

R^O представляет собой связь с нуклеозидом в полинуклеотиде;

каждый Q^2 независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу; где одна валентность связана с азидом или триазолом, вторая валентность связана с T, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо связана с вспомогательной группой; и

T представляет собой связывающую группу.



где

n представляет собой целое число от 1 до 8;

A представляет собой O или -CH_2-;

Z представляет собой O или S;

R^O представляет собой связь с нуклеозидом в полинуклеотиде;

каждый Q^2 независимо представляет собой двухвалентную, трехвалентную, четырехвалентную или пятивалентную группу; где одна валентность связана с азидом или триазолом, вторая валентность связана с T, и каждая из оставшихся валентностей, если они присутствуют, независимо связана с вспомогательной группой; и

каждый T независимо представляет собой связывающую группу.

Типовой пример снятия защиты Fmoc с фосфотриэфира:

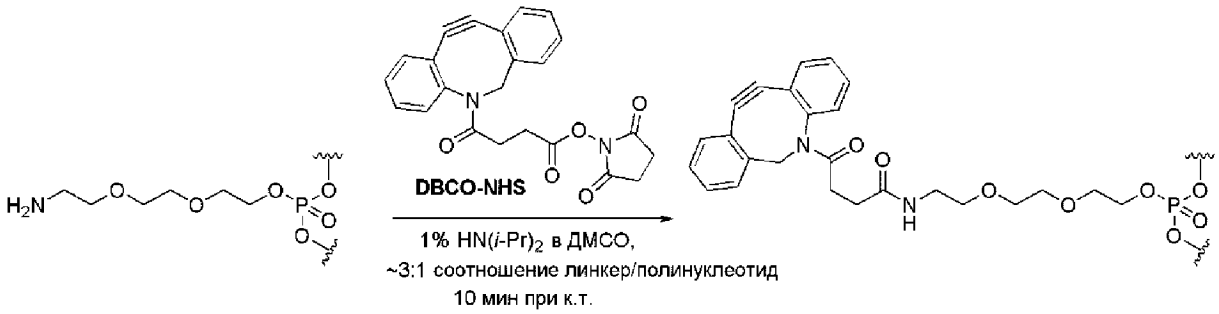
[00376] Полинуклеотид, включающий фосфотриэфир с Fmoc-защищенным амином, подвергают снятию защиты в условиях, приводящих к снятию защиты Fmoc без наблюдаемого превращения фосфотриэфира в фосфодиэфир.

TCCATGACGT*T*CCTGACGTT(SEQ ID NO:176)



Конъюгация DBCO-NHS с TCCATGACGTTCCTGACGTT(SEQ ID NO:176) - типовой пример:

[00377] Конъюгацию DBCO-NHS с аминогруппой фосфотриэфира проводят за 10 мин при комнатной температуре, о чем свидетельствует масс-спектрометрический анализ.



[00378] ОФ-ВЭЖХ очистку TCCATGACGTTCCTGACGTT(SEQ ID NO:176), содержащей группу конъюгации DBCO, проводят с использованием следующих условий:

- Буфер A=50 мМ TEAA в воде;
- Буфер B=90% ацетонтрил; и
- Скорость потока=1 мл/мин;
- Градиент:
  - 0-2 мин (100% буфера A/0% буфера B),
  - 2-22 мин (от 0% до 100% буфера B) и
  - 22-25 мин (100% буфера B).

[00379] Аналогичная процедура может быть использована для получения полинуклеотида с использованием, например, 2'-модифицированных нуклеозидфосфорамидитов, таких как описаны в настоящем документе. Такая процедура предложены в международной заявке на патент PCT/US2015/034749; описание синтеза дисульфидного фосфотриэфирного олигонуклеотида в PCT/US 2015/034749 включено в настоящий документ посредством ссылки.

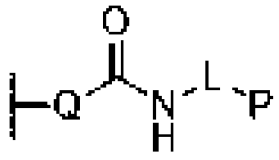
V. СПОСОБЫ КОНЪЮГАЦИИ

[00380] В настоящем документе предложены способы получения конъюгата, содержащего антитело или его антигенсвязывающую группу и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов, связанных посредством одного или нескольких пептидов Q-метки, как показано в структуре формулы (A). В некоторых вариантах осуществления, способы включают объединение антитела, содержащего, по меньшей мере, одну пептидную последовательность Q-метки, по меньшей мере, с одним экспонированным глутаминовым остатком и олигонуклеотидом в условиях, достаточных для индуцирования конъюгации, *m.e.* реакции амидирования между CpG и Q-меткой. В других вариантах осуществления, способы включают реакцию антитела, содержащего, по

меньшей мере, одну пептидную последовательность Q-метки, по меньшей мере, с одним экспонированным глутаминовым остатком и олигонуклеотидом в химических условиях, достаточных для индуцирования конъюгации. В других вариантах осуществления, способы включают реакцию антитела, содержащего, по меньшей мере, одну пептидную последовательность Q-метки, по меньшей мере, с одним экспонированным глутаминовым остатком и олигонуклеотидом в ферментативных условиях, *например,* с трансглутаминазой, достаточных для индуцирования конъюгации.

Условия реакции конъюгации, опосредованной трансглутаминазой

[00381] В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ получения конъюгата формулы (A), включающий комбинирование одного или нескольких иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P) и антитела, содержащего один или несколько глутаминовых остатков. В одном аспекте, в настоящем документе предложен способ получения конъюгата, содержащего антитело или его антигенсвязывающую группу (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),


(A),

где:

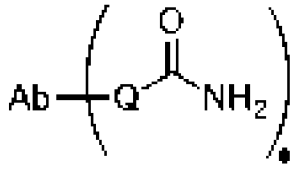
〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид;

включающий контакт соединения формулы (B)


(B),

где Ab и Q имеют значения, определенные для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или несколькими иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где

каждый P независимо имеет следующую формулу:



,

где

$X^{5'}$ представляет собой 5' концевой нуклеозид;

$X^{3'}$ представляет собой 3' концевой нуклеозид;

Y^{PTE} представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир;

$Y^{3'}$ представляет собой концевой фосфотриэфир;

каждый X^N независимо представляет собой нуклеозид;

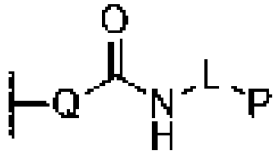
каждый Y^N независимо представляет собой межнуклеозидный линкер;

каждый b и c независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма b и c равна, по меньшей мере, 5; и

L представляет собой линкерную группу, содержащую концевой амин,

в присутствии трансглутаминазы.

[00382] В другом аспекте предложен способ получения конъюгата, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q) содержащими, по меньшей мере, один глутаминовый остаток, и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),



(A),

где:

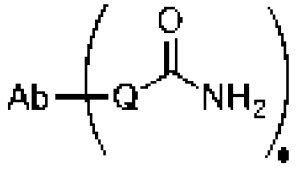
〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой пептид Q-метки, содержащий, по меньшей мере, один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид;

включающий контакт соединения формулы (B)



(B),

где Ab и Q имеют значения, определенные для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или несколькими иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где каждый олигонуклеотид P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) или формулы (D), в присутствии трансглутаминазы.

[00383] В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более или двадцать или более пептидов Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или двадцать пептидов Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит 2 пептида Q-метки. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более или двадцать или более иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или двадцать иммуномодулирующих олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит один иммуномодулирующий олигонуклеотид.

[00384] В другом аспекте, способ включает объединение соединения формулы (C) и антитела формулы (B), содержащего один или несколько глутаминовых остатков, в присутствии трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления, способ включает контакт соединения формулы (D) и антитела формулы (B), содержащего один или несколько глутаминовых остатков, в присутствии трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления, конечная концентрация соединения формулы (C) или формулы (D) находится в диапазоне примерно 1-100 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, конечная концентрация антитела, содержащего Q-метку, находится в диапазоне примерно 1-500 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, конечная концентрация трансглутаминазы находится в диапазоне примерно 1-500 мкМ. В некоторых вариантах осуществления, конечная концентрация трансглутаминазы находится в диапазоне примерно 1-50 мкМ, примерно 50-100 мкМ, примерно 100-150 мкМ, примерно 150-200 мкМ, примерно 200-250 мкМ, примерно 250-300 мкМ, примерно 300-400 мкМ, примерно 400-500 мкМ, примерно 100-125 мкМ, примерно 125-150 мкМ, примерно 150-175 мкМ, примерно 175-200 мкМ, примерно 200-225 мкМ, примерно 225-250 мкМ, примерно 250-275 мкМ, примерно 275-300 мкМ, примерно 300-325 мкМ или примерно 325-350 мкМ.

[00385] В некоторых вариантах осуществления, соотношение Q-метки, содержащей антитело, и соединения формулы (C) или формулы (D) находится в диапазоне примерно 1:1-250:1, примерно 1:1-5:1, примерно 5:1-10:1, примерно 10:1-20:1, примерно 20:1-30:1, примерно 30:1-40:1, примерно 40:1-50:1, примерно 50:1-75:1, примерно 75:1-100:1, примерно 100:1-150:1, примерно 150:1-200:1, примерно 200:1-250:1, примерно 1:1-25:1, примерно 25:1-50:1, примерно 50:1-75:1, примерно 75:1-100:1 или примерно 100:1-250:1

массовых. В некоторых вариантах осуществления, соотношение соединения формулы (C) или формулы (D) и антитела составляет примерно 1:1, примерно 2:1, примерно 3:1, примерно 4:1, примерно 5:1, примерно 6:1, примерно 7:1, примерно 8:1, примерно 9:1, примерно 10:1, примерно 11:1, примерно 12:1, примерно 13:1, примерно 14:1, примерно 15:1, примерно 16:1, примерно 17:1, примерно 18:1 или примерно 20:1 молярных.

[00386] В некоторых вариантах осуществления, соотношение Q-метки, содержащей антитело, и транслутаминазы составляет в диапазоне примерно 1:1-500:1, примерно 1:1-5:1, примерно 5:1-10:1, примерно 10:1-20:1, примерно 20:1-30:1, примерно 30:1-40:1, примерно 40:1-50:1, примерно 50:1-75:1, примерно 75:1-100:1, примерно 100:1-150:1, примерно 150:1-200:1, примерно 200:1-250:1, примерно 1:1-25:1, примерно 25:1-50:1, примерно 50:1-75:1, примерно 75:1-100:1, примерно 100:1-150:1, примерно 150:1-200:1, примерно 200:1-250:1, примерно 250:1-300:1, примерно 300:1-400:1 или примерно 400:1-500:1 массовых. В некоторых вариантах осуществления, соотношение пептида и трансглутаминазы составляет примерно 15:1, примерно 16:1, примерно 17:1, примерно 18:1, примерно 20:1, примерно 21:1, примерно 22:1, примерно 23:1, примерно 24:1, примерно 25:1, примерно 26:1, примерно 27:1, примерно 28:1, примерно 29:1, примерно 30:1, примерно 31:1, примерно 32:1, примерно 33:1, примерно 34:1, примерно 35:1, примерно 36:1, примерно 37:1, примерно 38:1, примерно 39:1, примерно 40:1, примерно 41:1, примерно 42:1, примерно 43:1, примерно 44:1, примерно 45:1, примерно 46:1, примерно 47:1, примерно 48:1, примерно 49:1 или примерно 50:1 молярных.

[00387] В некоторых вариантах осуществления, соотношение Q-метка:CpG:трансглутаминаза составляет примерно 1:1,3:10. В некоторых вариантах осуществления, соотношение Q-метка:CpG:трансглутаминаза составляет примерно 1:1,5:10. В некоторых вариантах осуществления, соотношение Q-метка:CpG:трансглутаминаза составляет примерно 1:1,3:15.

[00388] В некоторых вариантах осуществления, реакцию инкубируют при температуре выше 15°C, выше 20°C, выше 25°C, выше 30°C, выше 35°C, выше 40°C, выше 45°C или выше 50°C. В некоторых вариантах осуществления, реакцию инкубируют примерно при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления, реакцию инкубируют в течение, по меньшей мере, 10минут, 20 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 15 часов, 20 часов, 25 часов, 30 часов, 35 часов, 40 часов, 45 часов, 50 часов или 60 часов.

[00389] В некоторых вариантах осуществления, описанный в настоящем документе способ дает соединение формулы (A) в количестве более чем примерно 5%, более чем примерно 10%, более чем примерно 15%, более чем примерно 20%, более чем примерно 25%, более чем примерно 30%, больше примерно 35%, больше примерно 40%, больше примерно 45%, больше примерно 50%, больше примерно 60%, больше примерно 70%, больше примерно 80%, больше примерно 90%, более чем примерно 95%, более чем примерно 97% или более чем примерно 99% по сравнению с пептидом.

[00390] В некоторых вариантах осуществления, pH реакции находится в диапазоне

примерно 4-10. В некоторых вариантах осуществления, pH реакции находится в диапазоне примерно 4-6, примерно 6-8 или примерно 8-10. В некоторых вариантах осуществления, pH реакции находится в диапазоне примерно 7-8.

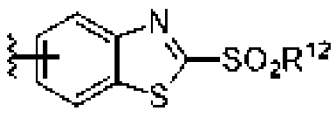
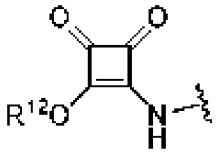
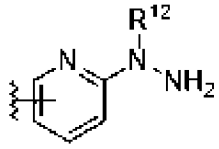
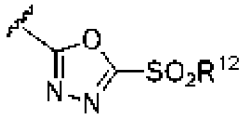
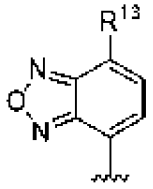
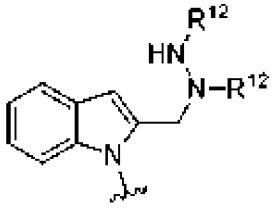
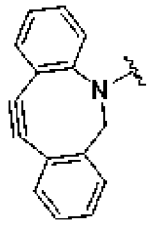
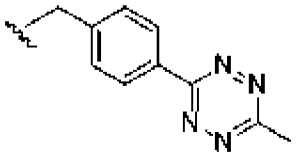
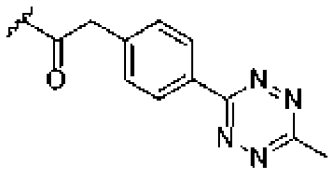
[00391] В другом аспекте, реакции, полезные для присоединения связывающей группы к олигонуклеотиду, известны в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, циклоприсоединение Хюисгена (катализируемое металлом или не содержащее металл) между азидо и конъюгирующей группой на основе алкина (*например,* необязательно замещенного C_{6-16} гетероциклилена, содержащего эндоциклическую тройную связь углерод-углерод, или необязательно замещенного C_{8-16} циклоалкинила) с образованием триазольной группы; реакцию Дильса-Альдера между диенофилом и диеном/гетеродиеном; образование связи посредством перициклических реакций, таких как еновая реакция; образование амидной или тиоамидной связи; образование сульфонамидной связи (*например,* с азидосоединениями); алкилирование спиртом или фенолом (*например,* алкилирование по Вильямсону), реакции конденсации с образованием оксимной, гидразонной или семикарбазидной группы; реакции сопряженного присоединения нуклеофилами (например, аминами и тиолами); образование дисульфидной связи; и нуклеофильное замещение (*например,* аминовым, тиоловым или гидроксильным нуклеофилом) в карбониле (*например,* в активированном сложном эфире карбоновой кислоты, таком как сложный пентафторфениловый (PFP) или тетрафторфениловый (TFP) эфир) или в электрофильном арене (*например,* SNAr при олигофторированном арене, фторбензонитрильной группе или фторнитробензольной группе).

[00392] В некоторых вариантах осуществления, реакция присоединения представляет собой диполярное циклоприсоединение, и конъюгирующая группа включает азидо, необязательно замещенный C_{6-16} гетероциклилен, содержащий эндоциклическую тройную связь углерод-углерод, или необязательно замещенный C_{8-16} циклоалкинил. Комплементарную реакционноспособную группу и конъюгирующую группу выбирают по их взаимной комплементарности. Например, азид используется в одной из конъюгирующей группы и комплементарной реакционноспособной группы, тогда как алкин используется в другой из конъюгирующей группы и комплементарной реакционноспособной группы.

Присоединение связывающей группы к олигонуклеотиду

[00393] Связывающая группа может быть присоединена к олигонуклеотиду путем образования связи между связывающей группой в олигонуклеотиде и комплементарной реакционноспособной группой, связанной со связывающей группой. В некоторых вариантах осуществления, связывающая группа модифицирована для включения комплементарной реакционноспособной группы. Способы введения таких комплементарных реакционноспособных групп в связывающую группу известны в данной области техники.

[00394] В некоторых вариантах осуществления, комплементарная

реакционноспособная группа представляет собой необязательно замещенный C_{2-12} алкинил, необязательно замещенный N-защищенный амино, азидо, N-малеимидо, S-защищенный тиол, , ,  или их N-защищенную группу, , , , необязательно замещенный C_{6-16} гетероциклил, содержащий эндоциклическую тройную связь углерод-углерод (*например,* ), 1,2,4,5-тетразиновую группу (*например,*  или ), необязательно замещенный C_{8-16} циклоалкинил (*например,* ), $-NHR^{N1}$, необязательно замещенный C_{4-8} циклоалкенил (*например, транс*-циклооктенил или норборненил) или необязательно замещенный C_{1-16} алкил, содержащий $-COOR_{12}$ или -CHO;

где:

R^{N1} представляет собой H, N-защитную группу или необязательно замещенный C_{1-6} алкил;

каждый R^{12} независимо представляет собой H, необязательно замещенный C_{1-6} алкил или O-защитную группу (*например,* карбоксильную защитную группу); и

R^{13} представляет собой галоген (*например,* F).

[00395] В некоторых вариантах осуществления, комплементарная реакционноспособная группа защищена до реакции конъюгации. Например, комплементарная реакционноспособная группа, которая защищена, может включать $-COOR^{PGO}$ или $-NHR^{PGN}$, где R^{PGO} представляет собой O-защитную группу (*например,* карбоксильную защитную группу), и R^{PGN} представляет собой N-защитную группу.

VI. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

[00396] Соединения и конъюгаты по настоящему изобретению, такие как

конъюгаты, содержащие структуры формулы (A), антитела формулы (B) и иммуномодулирующие олигонуклеотиды формул (C), (C'), (C"), (D), (D') и (D"), или фармацевтически приемлемая соль любого из вышеперечисленных, или любая их подгруппа могут быть включены в состав различных фармацевтических форм для целей введения. В качестве подходящих композиций могут быть указаны все композиции, обычно применяемые для системного введения лекарственных средств. Для приготовления фармацевтических композиций по настоящему изобретению, эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме аддитивной соли, в качестве активного ингредиента комбинируют в смеси с фармацевтически приемлемым носителем, который может принимать самые разные формы в зависимости от формы препарата, желательного для введения. Эти фармацевтические композиции желательны в стандартной дозированной форме, подходящей, в частности, для перорального, ректального, трансдермального или парентерального введения. Например, при приготовлении композиций в пероральной дозированной форме можно использовать любую из обычных фармацевтических сред, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты и подобные, в случае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, смазывающие вещества, связующие вещества, разрыхлители и подобные, в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток. Из-за простоты введения, таблетки и капсулы представляют собой наиболее предпочтительные стандартные дозированные формы для перорального применения, и в этом случае используются твердые фармацевтические носители. Для парентеральных композиций, носитель обычно будет включать стерильную воду, по меньшей мере, в значительной части, хотя могут быть включены и другие ингредиенты, например, для повышения растворимости. Например, могут быть приготовлены растворы для инъекций, в которых носитель включает солевой раствор, раствор глюкозы или смесь солевого раствора и раствора глюкозы. Также могут быть приготовлены суспензии для инъекций, и в этом случае можно использовать соответствующие жидкие носители, суспендирующие агенты и подобные. Также включены препараты в твердой форме, предназначенные для преобразования незадолго до применения в препараты в жидкой форме. В композициях, подходящих для трансдермального введения, носитель необязательно содержит агент, усиливающий проникновение, и/или подходящий смачивающий агент, необязательно в комбинации с подходящими добавками любой природы в небольших количествах, где эти добавки не оказывают значительного вредного воздействия на кожу. Соединения по настоящему изобретению можно также вводить посредством пероральной ингаляции или инсуффляции в форме раствора, суспензии или сухого порошка с использованием любой системы доставки, известной в данной области техники.

[00397] Особенно выгодно составлять вышеупомянутые фармацевтические композиции в стандартной дозированной форме для простоты введения и однородности дозировки. Стандартная дозированная форма, используемая в настоящем документе,

относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз, каждая единица содержит предварительно определенное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Примерами таких стандартных дозированных форм являются таблетки (включая таблетки с насечками или таблетки с покрытием), капсулы, пилюли, суппозитории, пакетики с порошком, облатки, растворы или суспензии для инъекций и подобные, и их разделенные множества.

[00398] Введение может быть, но не ограничено ими, внутривенным, внутриартериальным, подкожным, внутрибрюшинным, подкожным (например, через имплантированное устройство) и внутрипаренхиматозным введением. В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе фармацевтические композиции вводят путем подкожной инъекции.

[00399] Фармацевтические композиции, включающие описанный в настоящем документе конъюгат, могут быть доставлены в клетку, группу клеток, опухоль, ткань или субъекту с использованием технологий доставки, известных в данной области техники. В общем, любой подходящий способ доставки конъюгата нуклеиновая кислота-белок (in vitro или in vivo), признанный в данной области техники, может быть адаптирован для применения с описанными в настоящем документе композициями. Например, доставка может осуществляться местным введением (*например,* прямой инъекцией, имплантацией или местным введением), системным введением или подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным или парентеральным путями, включая внутричерепное (*например,* внутрижелудочковый, внутрипаренхиматозный и интратекальный), внутримышечное, трансдермальное, воздушное (аэрозоль), назальное, пероральное, ректальное или местное (включая буккальное и сублингвальное) введение. В некоторых вариантах осуществления, композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции.

[00400] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут содержать один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть составлены для введения субъекту.

[00401] Используемая в настоящем документе фармацевтическая композиция или лекарственное средство включает фармакологически эффективное количество, по меньшей мере, одного из описанных терапевтических соединений или конъюгатов, и один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов. Фармацевтически приемлемые эксципиенты (эксципиенты) представляют собой вещества, отличные от Активного фармацевтического ингредиента (АФИ, терапевтического продукта), намеренно включаемого в систему доставки лекарственного средства. Эксципиенты не оказывают или не предназначены для оказания терапевтического эффекта в предполагаемой дозировке. Эксципиенты могут: a) способствовать обработке системы доставки лекарственного средства во время производства, b) защищать, поддерживать или

улучшать стабильность, биодоступность или приемлемость АФИ для пациента, c) помогать в идентификации продукта и/или d) улучшать любые другие характеристики общей безопасности, эффективности доставки АФИ во время хранения или использования. Фармацевтически приемлемый эксципиент может быть или не быть инертным веществом.

[00402] Эксципиенты включают, но не ограничены ими: усилители абсорбции, антиадгезивы, пеногасители, антиоксиданты, связующие вещества, буферные агенты, носители, покрытия, красители, усилители доставки, полимеры доставки, декстран, декстрозу, разбавители, разрыхлители, эмульгаторы, объемообразующие агенты, наполнители, ароматизаторы, глиданты, увлажнители, смазывающие вещества, масла, полимеры, консерванты, солевой раствор, соли, растворители, сахара, суспендирующие агенты, матрицы с замедленным высвобождением, подсластители, загустители, тонизирующие агенты, носители, водоотталкивающие агенты и смачивающие агенты.

[00403] Фармацевтические композиции, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы (где они растворимы в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Для внутривенного введения, подходящие носители включают солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой буфер. Он должен быть стабильным в условиях производства и хранения, и должен быть защищен от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования, и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях, предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит и хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обеспечена включением в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[00404] Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, способы приготовления включают сушку в вакууме и лиофилизацию, в результате которых получается порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного желаемого ингредиента из его предварительно стерильно

отфильтрованного раствора.

[00405] Составы, подходящие для внутрисуставного введения, могут быть в виде стерильного водного препарата лекарственного средства, которое может быть в микрокристаллической форме, например, в виде водной микрокристаллической суспензии. Липосомальные составы или биоразлагаемые полимерные системы также могут быть использованы для подачи лекарственного средства как для внутрисуставного, так и для офтальмологического введения.

[00406] Активные соединения могут быть приготовлены с носителями, которые защитят соединение от быстрого выведения из организма, например, в виде состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы приготовления таких составов будут очевидны специалистам в данной области техники. Липосомальные суспензии также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

[00407] Соединение или конъюгат могут быть составлены в виде композиций в виде стандартной дозированной формы для простоты введения и однородности дозировки. Стандартная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве стандартных дозировок для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных дозированных форм по настоящему изобретению диктуется и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и достигаемого терапевтического эффекта, и ограничений, присущих области составления таких активных соединений для лечения индивидуумов.

[00408] Фармацевтическая композиция может содержать другие дополнительные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях. Такие дополнительные компоненты включают, но не ограничены ими: средства против зуда, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные агенты (например, антигистамины, дифенгидрамин и т. д.).

[00409] Как правило, эффективное количество активного соединения будет находиться в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 100 мг/кг массы тела/день, например, от примерно 1,0 до примерно 50 мг/кг массы тела/день. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество активного соединения будет находиться в диапазоне от примерно 0,25 до примерно 5 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество активного соединения будет находиться в диапазоне 25-400 мг в течение 1-18 недель или 1-6 месяцев. В некоторых

вариантах осуществления, эффективное количество активного соединения будет находиться в диапазоне 50-125 мг за 4 недели или за один месяц. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество активного ингредиента будет находиться в диапазоне от примерно 0,5 до примерно 3 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество активного ингредиента будет находиться в диапазоне примерно 25-400 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления, эффективное количество активного ингредиента будет находиться в диапазоне примерно 50-125 мг на дозу. Вводимое количество также, вероятно, будет зависеть от таких переменных, как общее состояние здоровья пациента, относительная биологическая эффективность доставляемого соединения, состав лекарственного средства, наличие и типы эксципиентов в составе и способ введения. Кроме того, следует понимать, что начальная вводимая доза может быть увеличена выше указанного выше верхнего уровня для быстрого достижения желаемого уровня в крови или ткани, или начальная доза может быть меньше оптимальной.

[00410] Для лечения заболевания или для получения лекарственного средства или композиции для лечения заболевания, фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, включающие соединение или конъюгат, можно комбинировать с эксципиентом или вторым терапевтическим агентом или лечением, включая, но не ограничиваясь ими: второй или другие конъюгаты, низкомолекулярное лекарственное средство, антитело, фрагмент антитела и/или вакцину.

[00411] Описанные соединения или конъюгаты, при добавлении к фармацевтически приемлемым эксципиентам или адъювантам, могут быть упакованы в наборы, контейнеры, упаковки или дозаторы. Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть упакованы в предварительно заполненные шприцы или флаконы.

VII. НАБОРЫ

[00412] Также в настоящем документе предложен набор, содержащий конъюгат, как описано выше.

[00413] В другом аспекте набор дополнительно содержит вкладыш в упаковку, содержащий, без ограничений, соответствующие инструкции по приготовлению и введению состава, побочные эффекты состава и любую другую соответствующую информацию. Инструкции могут быть в любом подходящем формате, включая, но не ограничиваясь ими, печатные материалы, видеокассеты, машиночитаемые диски, оптические диски или указания к инструкциям в Интернете.

[00414] В другом аспекте, предлагаются наборы для лечения индивидуума, который страдает описанными в настоящем документе состояниями или подвержен им, включающие первый контейнер, содержащий дозированное количество композиции или состава, как описано в настоящем документе, и вкладыш в упаковку для применения. Контейнер может быть любым из известных в данной области техники и подходящим для хранения и доставки состава для внутривенного введения. В некоторых вариантах

осуществления, набор дополнительно содержит второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, адъювант и т. д., для приготовления состава для введения индивидууму.

[00415] В другом аспекте, также могут быть предложены наборы, которые содержат достаточные дозы описанных в настоящем документе композиций (включая их фармацевтические композиции) для обеспечения эффективного лечения индивидуума в течение длительного периода, например, 1-3 дней, 1-5 дней, недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 6 недель, 8 недель, 1 цикла, 2 циклов, 3 циклов, 4 циклов, 5 циклов, 6 циклов, 7 циклов, 8 циклов или более.

[00416] В некоторых вариантах осуществления, наборы могут также включать несколько доз и могут быть упакованы в количествах, достаточных для хранения и использования в аптеках, например, в больничных аптеках и аптеках, где готовят по рецептам. В некоторых вариантах осуществления, наборы могут включать дозированное количество, по меньшей мере, одной композиции, как описано в настоящем документе.

VIII. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

[00417] В настоящем документе также предложены способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение эффективного количества соединения или конъюгата, описанного в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В настоящем документе также предложены применения соединения или конъюгата, описанные в настоящем документе, для получения лекарственного средства для лечения пациента, нуждающегося в лечении, с использованием олигонуклеотида в конъюгате. Также предложены соединения или конъюгаты, как описано в настоящем документе, для лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в лечении, с олигонуклеотидом в соединениях или конъюгатах. Также предложены соединения или конъюгаты, описанные в настоящем документе, для лечения пациента, включающие введение пациенту эффективного количества соединения или конъюгата. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет или подвержен риску развития рака. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение представляет собой вирусную инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение представляет собой иммунодефицит, *например,* при котором иммунная активация может быть благоприятной. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение представляет собой аутоиммунное и/или воспалительное заболевание или нарушение, *например,* при котором могут быть благоприятны подавление и/или модуляция иммунитета.

[00418] В некоторых вариантах осуществления способов лечения рака, описанных в настоящем документе, рак, который лечат описанными в настоящем документе способами, представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, рак, который лечат описанными в настоящем документе способами, представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления, рак, который лечат описанными в настоящем документе способами, представляет собой солидную

опухоль. В конкретных вариантах осуществления, рак, который лечат описанными в настоящем документе способами, представляет собой рак молочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, меланому, лимфому или лейкоз. В некоторых вариантах осуществления, рак включает, но не ограничивается ими, В-клеточный рак, например, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, заболевания тяжелых цепей, такие как, например, заболевание альфа-цепей, заболевание гамма-цепей и заболевание мю-цепей, доброкачественную моноклональную гаммапатию и иммуноцитарный амилоидоз, меланому, рак молочной железы, рак легких, рак бронхов, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак мозга или центральной нервной системы, рак периферической нервной системы, рак пищевода, рак шейки матки, рак матки или эндометрия, рак полости рта или глотки, рак печени, рак почки, рак яичка, рак желчевыводящих путей, рак тонкой кишки или аппендикса, рак слюнных желез, рак щитовидной железы, рак надпочечников, остеосаркому, хондросаркому, рак гематологических тканей и подобные. Другие неограничивающие примеры типов рака, применимых для способов, охватываемых настоящим изобретением, включают саркомы и карциномы человека, например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточный рак, базально-клеточный рак, аденокарциному, рак потовых желез, рак сальных желез, папиллярный рак, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, рак печени, хориокарциному, соминому, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак кости, опухоль головного мозга, рак яичка, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, менингиому, меланому, нейробластому, ретинобластому; лейкозы, *например* острый лимфоцитарный лейкоз и острый миелоцитарный лейкоз (миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз); хронический лейкоз (хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз); и истинную полицитемию, лимфому (болезнь Ходжкина и неходжкинскую болезнь), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема и болезнь тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления, рак носит эпителиальный характер и включает, но не ограничен ими, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, гинекологический рак, рак почки, рак гортани, рак легкого, рак ротовой полости, рак головы и шеи, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы или

рак кожи. В других вариантах осуществления, рак представляет собой рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легкого или рак толстой кишки. В других вариантах осуществления, эпителиальный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, непапиллярную почечно-клеточную карциному, карциному шейки матки, карциному яичника (*например,* серозную карциному яичника) или карциному молочной железы. Эпителиальный рак может быть охарактеризован различными другими путями, включая, но не ограничиваясь ими, серозный, эндометриоидный, муцинозный, светлоклеточный, Бреннеровский или недифференцированный. В конкретных вариантах осуществления, рак, который лечат способами, описанными в настоящем документе, выбран из списка, состоящего из мантийноклеточной лимфомы (MCL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (DLBCL), лимфомы Беркитта, множественной меланомы (MM), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), острого миелоидного лейкоза (AML), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), волосатоклеточного лейкоза (HCL), лимфоплазмоцитарной лимфомы (LPL), лимфомы скелетных мышц (SML), лимфомы маргинальной зоны селезенки (SMZL), лимфомы фолликулярного центра (FCL), колоректального рака, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака головы и шеи, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, глиобластомы (GBM), рака предстательной железы, рака пищевода, почечно-клеточного рака, рака печени, рака мочевого пузыря и рака желудка.

[00419] В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе предложены способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение эффективного количества иммуноконъюгата CpG-Ab, описанного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту, где иммуноконъюгат CpG-Ab связывается с CD22, например, иммуноконъюгат CpG-Ab, содержащий анти-CD22 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и где заболевание или нарушение, подвергаемое лечению, представляет собой рак, характеризующийся опухолью, инфильтрирующей В-клетки. В некоторых вариантах осуществления, такие виды рака включают плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC), почечно-клеточную карциному (RCC), рак желудка, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), рак пищевода, рак шейки матки, карциному из клеток Меркеля, рак эндометрия, острый лимфобластный лейкоз (ALL), волосатоклеточный лейкоз и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL). В некоторых вариантах осуществления, такие виды рака включают рак яичников, рак поджелудочной железы, меланому, меланому кожи, саркому, колоректальный рак, рак молочной железы, плоскоклеточный рак шейки матки, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), плоскоклеточный рак кожи и уротелиальную карциному. В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab указан в одной из таблиц 2 и 9-12.

[00420] В некоторых вариантах осуществления, способы лечения включают введение иммуноконъюгата CpG-Ab, который связывается с CD22, экспрессируемым на

поверхности В-клетки, и лечение приводит к активации одной или нескольких В-клеток, дифференциации В-клеток, увеличению эффекторной функции Т-клеток, пролиферации Т-клеток, секреции цитокинов и хемокинов, индукции секреции иммуноглобулина и модуляции супрессивных миелоидных клеток в микроокружении опухоли у субъекта, подвергающегося лечению. В некоторых вариантах осуществления, способы лечения включают введение иммуноконъюгата CpG-Ab, который связывается с CD22, экспрессированным на поверхности В-клетки, и лечение приводит к иммунному ответу памяти. В некоторых вариантах осуществления, такое лечение приводит к противоопухолевой активности за счет как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа.

[00421] В некоторых вариантах осуществления, способы лечения включают введение иммуноконъюгата CpG-Ab, который связывается с HER2, присутствующим на опухолевой клетке, и лечение приводит к уничтожению или поражению опухолевых клеток, так что объем, размер и/или рост опухоли замедляется или ингибируется. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлены способы лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающие введение эффективного количества иммуноконъюгата CpG-Ab, описанного в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом, где иммуноконъюгат CpG-Ab связывается с HER2, например, иммуноконъюгат CpG-Ab, содержащий анти-HER2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и где заболевание или нарушение, подвергаемое лечению, представляет собой рак, характеризующийся опухолевыми клетками, экспрессирующими HER2. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение, подвергаемое лечению, представляет собой рак, при котором опухолевые клетки сверхэкспрессируют HER2. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой рак молочной железы, уротелиальный рак или рак желудка.

[00422] В некоторых вариантах осуществления, рак, который лечат описанными в настоящем документе способами, является резистентным, по меньшей мере, к одной иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления, рак, который лечат описанными в настоящем документе способами, является резистентным, по меньшей мере, к одной противораковой терапии, выбранной из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, таргетной терапии, вакцинотерапии и CAR-T терапии. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения рака включает совместное введение субъекту, страдающему раком, (i) терапевтически эффективного количества CpG-содержащего иммуностимулирующего полинуклеотида или иммуноконъюгата CpG-антитело; и (ii) иммунотерапевтического агента, который, как было показано, является резистентным или не отвечает на лечение рака, когда рак лечат одним иммунотерапевтическим агентом.

[00423] В конкретных вариантах осуществления, было показано, что рак, который лечат способами, представленными в настоящем документе, не отвечает на лечение модулятором иммунных контрольных точек. В конкретных вариантах осуществления, модулятор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1. В

конкретных вариантах осуществления, модулятор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L1. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения рака включает совместное введение субъекту, страдающему раком, (i) терапевтически эффективного количества CpG-содержащего иммуностимулирующего полинуклеотида или иммуноконъюгата CpG-Ab; и (ii) терапевтически эффективного количества ингибитора PD-1. В некоторых вариантах осуществления, способ лечения рака включает совместное введение субъекту, страдающему раком, (i) терапевтически эффективного количества CpG-содержащего иммуностимулирующего полинуклеотида или иммуноконъюгата CpG-Ab; и (ii) терапевтически эффективного количества ингибитора PD-L1. В частности, в некоторых вариантах осуществления, ингибитор PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, лечение направлено на субъекта, который не отвечает или обладает резистентностью к ингибитору PD-1 или PD-L1, и такого субъекта лечат иммуноконъюгатом CpG-Ab, который связывает CD22, таким как иммуноконъюгат CpG-Ab, содержащий анти-CD22 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00424] В некоторых аспектах, в настоящем документе предложены способы профилактики рака у субъекта, предрасположенного к развитию рака, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества агониста TLR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества CpG-содержащего иммуностимулирующего полинуклеотида или иммуноконъюгата CpG-Ab, описанных в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab таргетирует иммунную клетку, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab таргетирует экспрессирующую TLR клетку, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с антигеном, ассоциированным с иммунной клеткой, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с антигеном, ассоциированным с иммунной клеткой, и не связывается с опухолеассоциированным антигеном рака, который необходимо предотвратить. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с антигеном, ассоциированным с TLR-экспрессирующей клеткой, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с антигеном, ассоциированным с TLR-экспрессирующей клеткой, и не связывается с опухолеассоциированным антигеном рака, который необходимо предотвратить. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с опухолеассоциированным антигеном рака, который необходимо предотвратить, как описано в настоящем документе, *например,* с антигеном,

экспрессируемым на поверхности опухолевых клеток. В конкретных вариантах осуществления, опухолеассоциированный антиген рака, который необходимо предотвратить, ассоциирован с иммунной клеткой или TLR-экспрессирующей клеткой. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab не связывается специфически с антигеном, выбранным из CD19, CD20, CD22, STAT3, экспортина 7, Her2, Src, EGFR, CD52, CXCR-4 и Muc-1.

[00425] В некоторых вариантах осуществления, способы профилактики рака дополнительно включают введение субъекту, предрасположенному к развитию рака, (i) терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-Ab и (ii) опухолеассоциированного антигена рака, который необходимо предотвратить. В некоторых вариантах осуществления, опухолеассоциированный антиген не конъюгирован с иммуноконъюгатом CpG-Ab. В конкретных вариантах осуществления, опухолеассоциированный антиген составляют в виде противораковой вакцины. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab составляют в виде адъюванта противораковой вакцины.

[00426] В некоторых вариантах осуществления, рак, который предотвращается или лечится с использованием способов, предложенных в настоящем документе, представляет собой эпизод рецидива рака у субъекта, находящегося в частичной или полной ремиссии предшествующего рака. В конкретных вариантах осуществления, предшествующий рак представляет собой гемобластоз, и рецидивирующий рак, который предотвращается или лечится, представляет собой гемобластоз. В конкретных вариантах осуществления, предшествующий рак представляет собой солидный рак, и рецидивирующий рак, который предотвращается или лечится, представляет собой солидный рак. В конкретных вариантах осуществления, предшествующий рак представляет собой гемобластоз, и рецидивирующий рак, который предотвращается или лечится, представляет собой солидный рак. В конкретных вариантах осуществления, предшествующий рак представляет собой солидный рак, и рецидивирующий рак, который предотвращается или лечится, представляет собой гемобластоз.

[00427] В некоторых вариантах осуществления, рак, который предотвращается или лечится с использованием способов, представленных в настоящем документе, представляет собой первый эпизод рецидива рака у субъекта после того, как у субъекта была достигнута частичная или полная ремиссия. В некоторых вариантах осуществления, рак, который предотвращается или лечится с использованием способов, представленных в настоящем документе, представляет собой второй эпизод рецидива рака у субъекта после того, как у субъекта была достигнута частичная или полная ремиссия. В некоторых вариантах осуществления, рак, который предотвращается или лечится с использованием способов, представленных в настоящем документе, представляет собой третий эпизод рецидива рака у субъекта после того, как у субъекта была достигнута частичная или полная ремиссия. В некоторых вариантах осуществления, рак, который предотвращается или лечится с использованием способов, представленных в настоящем документе,

представляет собой эпизод рецидива рака, следующий за третьим эпизодом рецидива рака у субъекта, после того, как у субъекта наступила частичная или полная ремиссия.

[00428] В некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы индукции адаптивного иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества агониста TLR, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, способ индукции адаптивного иммунного ответа включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества CpG-содержащего иммуностимулирующего полинуклеотида или иммуноконъюгата CpG-Ab, описанных в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab таргетирует нормальную иммунную клетку, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab таргетирует экспрессирующую TLR клетку, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab таргетирует больную клетку, выбранную из раковой клетки или клетки, инфицированной патогеном. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с антигеном, ассоциированным с нормальной иммунной клеткой, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с антигеном, ассоциированным с нормальной иммунной клеткой, и не связывается с антигеном заболевания. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с антигеном, ассоциированным с TLR-экспрессирующей клеткой, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с антигеном, ассоциированным с TLR-экспрессирующей клеткой, и не связывается с антигеном заболевания. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab специфически связывается с антигеном заболевания, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления, антиген заболевания также ассоциирован с нормальной иммунной клеткой или TLR-экспрессирующей клеткой. В конкретных вариантах осуществления, антиген заболевания представляет собой опухолеассоциированный антиген или патогенный антиген. В конкретных вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab не связывается специфически с антигеном, выбранным из CD19, CD20, CD22, STAT3, экспортина 7, Her2, Src, EGFR, CD52, CXCR-4 и Muc-1. В некоторых вариантах осуществления, антитело или конъюгат специфически связывает антиген, экспрессируемый раком или стромой, ассоциированной с раком.

[00429] В некоторых вариантах осуществления, способов и применений, описанных в настоящем документе, CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в дозе, достаточной для активации TLR9-опосредованного сигнального пути у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab вводят нуждающемуся в этом субъекту в дозе,

достаточной для активации TLR9-опосредованного сигнального пути в клеточной популяции, которую таргетирует иммуноконъюгат CpG-Ab. Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления, популяция клеток, которую таргетирует иммуноконъюгат CpG-Ab, экспрессирует TLR9. В некоторых вариантах осуществления, клеточная популяция, которую таргетирует иммуноконъюгат CpG-Ab, может экспрессировать TLR9 на поверхности клетки-мишени, на эндосомальной мембране клетки-мишени или как на клеточной поверхности, так и на эндосомальной мембране клетки-мишени.

[00430] В частности, в некоторых вариантах осуществления, способов и применений, описанных в настоящем документе, CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в дозе, которая эффективна для индукции одного или нескольких эффектов, выбранных из (a) специфического связывания с TLR9 рецептором CpG-содержащего иммуностимулирующего полинуклеотида на клетке-мишени; (b) эффективной интернализации иммуноконъюгата CpG-Ab или его иммуностимулирующей полинуклеотидной части, содержащей CpG, клеткой-мишенью; (c) активации одного или нескольких сигнальных путей в клетке-мишени; (d) индуцирования секреции одного или нескольких воспалительных цитокинов клеткой-мишенью; (e) подавления секреции одного или нескольких воспалительных цитокинов клеткой-мишенью; (f) повышения экспрессии одного или нескольких генов клетки-мишени; (g) подавление экспрессии одного или нескольких генов клетки-мишени; (h) активации нормальных иммунных клеток-мишеней, (i) индукции иммунного ответа, который приводит к элиминации заболевания, например раковых клеток, (j) индуцирования апоптоза раковой клетки-мишени и (k) индуцирования некроза раковой клетки-мишени.

[00431] В частности, в некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящем документе, при введении иммуноконъюгата CpG-Ab CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид специфически связывается с рецептором TLR9 клетки-мишени. В частности, в некоторых вариантах осуществления, связывание иммуноконъюгата CpG-Ab с антигеном, ассоциированным с клеткой-мишенью, облегчает специфическое связывание CpG-содержащего иммуностимулирующего полинуклеотида с рецептором TLR9. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень иммуноконъюгата CpG-Ab расположен рядом с рецептором TLR9. В конкретных вариантах осуществления, как антиген-мишень, так и рецептор TLR9 расположены на клеточной мембране клетки-мишени. В конкретных вариантах осуществления, как антиген-мишень, так и рецептор TLR9 расположены на внутриклеточной мембране клетки-мишени. В конкретных вариантах осуществления, как антиген-мишень, так и рецептор TLR9 расположены на эндосомальной или фагосомальной мембране клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления, антиген-мишень расположен на клеточной мембране и способствует интернализации иммуноконъюгата CpG-Ab в цитозоль при связывании с иммуноконъюгатом CpG-Ab.

[00432] В частности, в некоторых вариантах осуществления, способов и применений, описанных в настоящем документе, способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-Ab, таргетирующего нормальную иммунную клетку, где, при введении иммуноконъюгата CpG-Ab, активируются один или несколько иммуногенных сигнальных путей в клетке-мишени. В конкретных вариантах осуществления, активированными сигнальными путями являются один или несколько, выбранных из сигнального пути ядерного фактора (NF)-κB, сигнального пути N-концевой киназы c-Jun (JNK), сигнального пути AP1, пути IRF3/7 и сигнального пути митоген-активируемой протеинкиназы p38 (MAPK). Активация клеточного сигнального пути может быть обнаружена с использованием способов, известных в данной области техники, таких как, но не ограничиваясь ими, обнаружение присутствия молекулярного маркера, экспрессия которого специфически индуцируется при активации представляющего интерес сигнального пути.

[00433] В частности, в некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящем документе, способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-Ab, таргетирующего нормальную иммунную клетку, где при введении иммуноконъюгата CpG-Ab, индуцируется секреция одного или нескольких воспалительных цитокинов. В конкретных вариантах осуществления, один или несколько воспалительных цитокинов выбраны из интерферона I типа (IFN), интерлейкина (IL)-6, IL10, IL-12, IL-18 и фактора некроза опухоли (TNF).

[00434] В частности, в некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящем документе, способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-Ab, таргетирующего нормальную иммунную клетку, где, при введении иммуноконъюгата CpG-Ab, активируется экспрессия одного или нескольких дополнительных белков. В конкретных вариантах осуществления, белки с повышенной экспрессией представляют собой один или несколько белков, выбранных из антигенпрезентирующих молекул (например, MHC класса I и II), цитокиновых рецепторов (например, рецепторов IL-6, рецепторов IL-10, рецепторов IL-12, рецептора TNF-α, рецептора TNF-β, рецептора IFN-α, рецептора IFN-β, IFN-γ), хемокиновых рецепторов (например, хемокинового рецептора 7), костимулирующих молекул (например, CD3, CD28, CD27, CD30, CD40, CD69, CD80/B7-1, CD86/B7-2, CD134/OX-40, OX-40L, CD137/4-1BB, 4-1BBL, CD278/ICOS, B7-H3, B7h/B7RP-1, LIGHT и т.д.), регуляторных белков HLA-DR и созревания Т-клеток (например, индоламин-2,3-диоксигеназы).

[00435] В частности, в некоторых вариантах осуществления, способов и применений, описанных в настоящем документе, способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-Ab, таргетирующего нормальную иммунную клетку, где после введения иммуноконъюгата CpG-Ab пролиферация, дифференциация, созревание и/или выживание

одной или нескольких популяций нормальных иммунных клеток увеличиваются. В конкретных вариантах осуществления, одна или несколько увеличенных популяций нормальных иммунных клеток выбраны из CD4+ Т-клеток, CD8+ Т-клеток, естественных киллеров, Т-хелперных клеток, В-клеток и миелоидных клеток (включая mDC и pDC). В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящем документе, способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-Ab, таргетирующего нормальную иммунную клетку, где при введении иммуноконъюгата CpG-Ab происходит пролиферация, дифференциация, созревание и/или выживание одной или нескольких популяций нормальных иммунных клеток снижены. В конкретных вариантах осуществления, одна или несколько сниженных популяций нормальных иммунных клеток выбраны из B-reg клеток, T-reg клеток и MDSC.

[00436] В конкретных вариантах осуществления, при введении иммуноконъюгата CpG-Ab активность презентирования антигена увеличивается в APC субъекта. В некоторых вариантах осуществления, APC выбраны из В-клеток, моноцитов, дендритных клеток и клеток Лангерганса, кератиноцитов, эндотелиальных клеток, астроцитов, фибробластов и олигодендроцитов. В конкретных вариантах осуществления, APC представляет собой В-клетки. В конкретных вариантах осуществления, APC представляют собой дендритные клетки. В конкретных вариантах осуществления, APC представляет собой макрофаг. В некоторых вариантах осуществления, дендритная клетка представляет собой pDC. В конкретных вариантах осуществления, повышенная активность презентирования антигена приводит к более эффективному презентированию опухолеассоциированного антигена активированными APC.

[00437] В конкретных вариантах осуществления, при введении иммуноконъюгата CpG-Ab усиливается опосредованный антигенспецифическими CD4+ Т-клетками иммунитет против одного или нескольких опухолеассоциированных антигенов рака, который подвергается лечению или профилактике. В конкретных вариантах осуществления, при введении иммуноконъюгата CpG-Ab усиливается инфильтрация опухоли CD4+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления, при введении иммуноконъюгата CpG-Ab усиливается опосредованный антигенспецифическими CD8+ Т-клетками иммунитет против одного или нескольких опухолеассоциированных антигенов рака, подвергаемого лечению или профилактике. В конкретных вариантах осуществления, при введении иммуноконъюгата CpG-Ab усиливается инфильтрация опухоли CD8+ Т-клетками. В конкретных вариантах осуществления, при введении иммуноконъюгата CpG-Ab повышается секреция В-клетками иммуноглобулина, специфически направленного против одного или нескольких опухолеассоциированных антигенов рака, подвергаемого лечению или профилактике.

[00438] В частности, в некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящем документе, способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата CpG-

Ab, таргетирующего больную клетку, где при введении иммуноконъюгата CpG-Ab один или несколько апоптотических сигнальных путей индуцируются, запуская апоптоз пораженной клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления, больная клетка представляет собой раковую клетку.

[00439] В некоторых вариантах осуществления способов и применений, описанных в настоящем документе, иммуноконъюгат CpG-Ab вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, не эффективном для активации системы комплемента у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, не эффективном для активации комплемента C1 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, не эффективном для активации комплемента C3 у субъекта. Активация комплемента может быть обнаружена с использованием способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгат CpG-Ab вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, не эффективном для того, чтобы часть антитела иммуноконъюгата CpG-Ab индуцировала антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность у субъекта.

[00440] Как описано в настоящем документе, терапевтические агенты, конъюгаты или композиции, содержащие CpG-содержащие полинуклеотиды, можно использовать в комбинации, по меньшей мере, с одним дополнительным терапевтическим агентом для профилактики или лечения рака. В некоторых вариантах осуществления, такая комбинированная терапия демонстрирует синергетический терапевтический эффект, который лучше, чем отдельное действие любого терапевтического агента по отдельности. В некоторых вариантах осуществления, такая комбинированная терапия демонстрирует синергетический терапевтический эффект, который лучше, чем сумма отдельных эффектов терапевтических агентов по отдельности.

[00441] Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем документе предложены способы профилактики или лечения рака с использованием CpG-содержащего иммуностимулирующего полинуклеотида в комбинации, по меньшей мере, с одним дополнительным противораковым терапевтическим агентом. Такие способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту (i) терапевтически эффективного количества CpG-содержащего иммуностимулирующего полинуклеотида и (ii) терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, одного дополнительного противоракового терапевтического агента. В конкретных вариантах осуществления, CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид вводят в виде отдельного полинуклеотида. В конкретных вариантах осуществления, CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид вводят в виде иммуноконъюгата CpG-Ab. В конкретных вариантах осуществления, CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид и дополнительные терапевтические агенты составляют в виде одной и той же композиции. В других вариантах осуществления, CpG-содержащий иммуностимулирующий

полинуклеотид и дополнительные терапевтические агенты составляют в виде отдельных композиций.

[00442] В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один дополнительный противораковый терапевтический агент выбран из агонистов Т-клеток, модуляторов иммунных контрольных точек, агонистов STING, агонистов RIG-I, других агонистов Toll-подобных рецепторов.

[00443] В некоторых вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой костимулирующую молекулу Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, костимулирующая молекула Т-клеток выбрана из OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1/CD11a/CD18, ICOS/CD278, 4-1BB/CD137, GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 и CD83 или их лиганда. В некоторых вариантах осуществления, лиганд костимулирующей молекулы представляет собой антитело, специфически связывающееся с костимулирующей молекулой. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент выбран из анти-OX40 антитела, анти-OX40L антитела, анти-ICOS антитела, анти-CTLA4 антитела, анти-CD40L антитела, анти-CD28 антитела, анти-LFA1 антитела, анти-TIM1/TIM3 антитела, анти-LAG3 антитела, анти-Siglec-15 антитела, анти-PD1 антитела, анти-PDL1 антитела, анти-CD27 антитела и анти-4-1BB антитела.

[00444] В некоторых вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой опухолеассоциированный антиген, продуцируемый раком, который предотвращается или лечится данным способом. В некоторых вариантах осуществления, рак, который предотвращается или лечится, представляет собой лейкоз, лимфому, меланому, колоректальный рак, рак молочной железы, предстательной железы, почек, поджелудочной железы, головы и шеи, кожи и головного мозга, рак легкого, и опухолеассоциированный антиген выбран из CD19, CD20, CD22, CD38, CD138, CD30, CD52, CD56, CD79, CD123, CD206, CD303, CD304, EGFR, альфа-рецептора фолиевой кислоты, бета-рецептора фолиевой кислоты, мезотелина, Her2, рецептора трансферрина и PSMA. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой модулятор иммунной контрольной точки, выбранный из ингибиторов PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, LAG-3, CEACAM-1, CEACAM-5, CLTA-4, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD47, SIRP-α, CD160, 2B4, CD172a и TGFR. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой ингибитор PD-1. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой ингибитор PD-L1. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой ингибитор CD47. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой антитело, специфически связывающееся с модулятором иммунной контрольной точки. В конкретных вариантах осуществления,

дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой анти-CD47 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой анти-CD172a антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой анти-OX40 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой анти-TIM3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой анти-LAG3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Анти-PD-1 и анти-PD-L1 антитела и их применение описано, например, в US20180030137, US9815898, US20170313776, US20170313774, US20170267762, WO2017019846, WO2018013017, US20180022809, US20180002423, WO2017220990, WO2017218435, WO2017215590, US9828434 и WO2017196867. Анти-CD47 антитела и их применение описаны, например, в US9663575, US9803016, US20170283498, US20170369572, WO2017215585, WO2017196793 и WO2017049251.

[00445] В некоторых вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой агонист STING пути. STING (стимулятор генов интерферона, также известный как TMEM173, MITA, ERIS и MPYS) представляет собой трансмембранный белок, локализованный в ER, который претерпевает конформационные изменения в ответ на прямое связывание циклических динуклеотидов (CDN), что приводит к нисходящему сигнальному каскаду, включая активацию TBK1, фосфорилирование IRF-3 и продуцирование IFN-β и других цитокинов. Путь STING в резидентных опухолевых клетках, презентирующих антигена-хозяина, участвует в индукции спонтанного ответа CD8+ Т-клеток против опухолеассоциированных антигенов. Активация этого пути и последующее продуцирование IFN-β также способствуют противоопухолевому эффекту. В некоторых вариантах осуществления, агонистом пути STING является ADU-S100. Дополнительные агонисты STING и их применение описано, например, в US20180028553, US20170319680, US20170298139, US20060040887, US20080286296, US20120041057, US20140205653, WO2014179335, WO 2014179760, US20150056224, WO 2016096174, WO 2017011444, WO 2017027645 и WO 2017027646

[00446] В некоторых вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой агонист пути RIG-I. RIG-I (ген-I, индуцируемый ретиноевой кислотой) является членом рецепторов распознавания образов, которые инициируют врожденную иммунную систему хозяина для защиты от патогенных

микробов на ранних стадиях инфекции. Существует три члена семейства (RIG-I)-подобных рецепторов: RIG-I, MDA5 (фактор дифференциации меланомы 5) и LGP2 (лаборатория генетики и физиологии 2), которые экспрессируются в большинстве типов клеток и тканей. RIG-I функционирует как цитоплазматический сенсор для распознавания различных РНК вирусов и последующей активации нижестоящей передачи сигналов для управления продуцированием IFN I типа и экспрессией антивирусных генов. Активированный RIG-I рекрутирует свою нижестоящую молекулу-адаптер MAVS (также известную как IPS-1, CARDIF и VISA) посредством взаимодействий, опосредованных CARD-CARD. Олигомерная сборка RIG-I CARD и полимерное образование MAVS вместе служат сигнальной платформой для белковых комплексов, которые опосредуют разветвление передачи сигналов на две ветви. Одна ветвь рекрутирует факторы, ассоциированные с рецептором фактора некроза опухоли (TRAF)-2/6, и белок 1, взаимодействующий с рецептором, для последующей активации комплекса IKK, что приводит к активации NF-κB. Другая ветвь передает сигналы через TRAF3 и активирует комплекс TANK/IKKγ/IKKϵ/TBK1, что приводит к фосфорилированию и димеризации факторов регулятора интерферона (IRF)-3 и -7. Liu et al., Front Immunol. 2017, 7:662. Активация этого пути способствует противоопухолевому эффекту. В некоторых вариантах осуществления, агонист пути RIG-I представляет собой RGT100. Агонисты RIG-I и их применение описаны, например, в US20170057978, US20170258897, US9381208, US9738680, US9650427, WO2017173427 и WO2017011622.

[00447] В некоторых вариантах осуществления, дополнительный противораковый терапевтический агент представляет собой агонист Toll-подобного рецептора, выбранный из агониста TLR1, агониста TLR2, агониста TLR3, агониста TLR4, агониста TLR5, агониста TLR6, агониста TLR7, агониста TLR8 и агониста TLR10.

[00448] В дополнительных вариантах осуществления, в отношении способа лечения рака CpG-содержащий иммуностимулирующий полинуклеотид вводят (либо в отдельной форме, либо в виде иммуноконъюгата CpG-Ab) в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами или процедурами, например, в котором дополнительный терапевтический агент или процедура выбраны из группы, состоящей из химиотерапии, таргетной противораковой терапии, онколитического лекарственного средства, цитотоксического агента, иммунной терапии, цитокина, хирургической процедуры, лучевой процедуры, активатора костимулирующей молекулы, ингибитора ингибиторной молекулы, вакцины, клеточной иммунотерапии, клеточной терапии (*например,* терапии CAR-T, TIL, TCR-T, CAR-NK и CAR-макрофагов) и онколитической вирусной терапии.

ПРИМЕРЫ

[00449] Описываемый в настоящем документе объект будет лучше понят со ссылкой на следующие примеры, которые представлены в качестве примера изобретения, а не в качестве ограничения.

Материалы

[00450] Прототипы пептидов получают собственными силами, но их можно приобрести у специализированных поставщиков пептидов (например, CPC Scientific). Олигонуклеотиды получают собственными силами или в LGC. Трансглутаминазу, используемую в этих примерах, выделяют из различных бактериальных штаммов Streptoverticillium (*например,* Ajinomoto). mAb Q-метки производят в Sino Biologicals или своими силами.

Получение олигонуклеотидов

[00451] Олигонуклеотиды обычно получают в соответствии со схемой твердофазного синтеза, показанной ниже, начиная с начального снятия защиты с твердой подложки для синтеза олигонуклеотидов, с последующим связыванием твердой подложки с первым нуклеотидом, тиолированием с получением фосфотиоэфира и повторным снятием защиты и сочетанием с получением полной олигонуклеотидной последовательности.

[00452] Общий синтез олигонуклеотидов по настоящему описанию описан ниже.

[00453] *Снятие защиты*: твердую подложку из стекла с регулируемыми порами, защищенную диметокситритил-1,3-пропандиолгликолятом (DMTO-C3-CPG, 1000 Å, объемная плотность 0,26-0,36 г/см^3, загрузка 30-40 мкмоль/г), подвергают взаимодействию с 3% дихлоруксусной кислотой в толуоле (об./об.) при 25°C, чтобы получить CPG подложку без защиты. УФ поглощение аликвоты реакционной смеси измеряют для определения конечной точки реакции (длина волны 350 нм, целевое минимальное поглощение 0,25 OD, с использованием фиксированной настройки команды часов) и для подтверждения удаления диметокситритильной защитной группы.

[00454] *Активация/связывание*: Подложку CPG со снятой защитой сочетают с первым нуклеотидным предшественником фосфорамидита для 3'-конца для синтеза соответствующего олигонуклеотида путем добавления и смешивания желаемого 3' нуклеотида (3 экв.) в течение 5 минут при 25°C в реакторе, содержащем CPG подложку со снятой защитой в присутствии активатора 5-этилтио-1H-тетразола (0,5 М в АЦН) при концентрации нуклеотидов 60%.

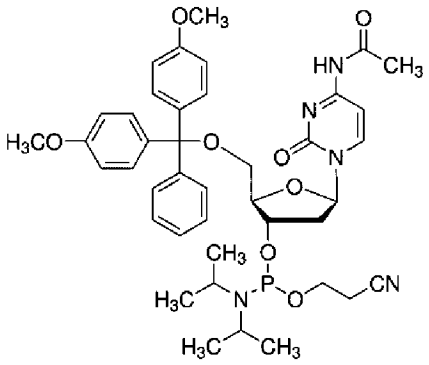
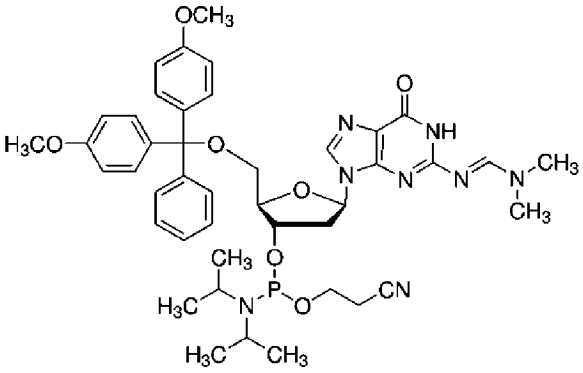
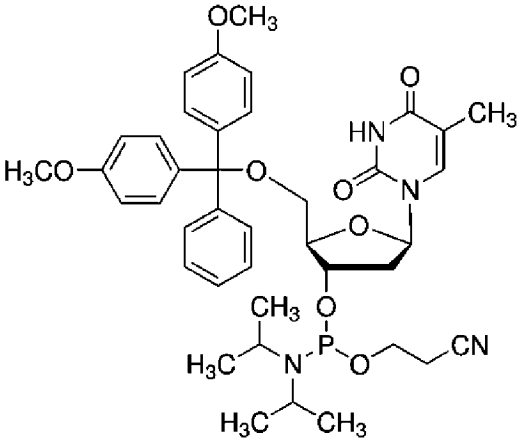
[00455] *Тиолирование/сульфирование*: После стадии сочетания, связывающую триэфирную фосфитную группу добавленного нуклеотидного предшественника тиолируют (или сульфируют) путем добавления Polyorg Sulfa (3-фенил-1,2,4-дитиазолин-5-она), 0,15 М в сухом АЦН, с получением фосфотиоэфира.

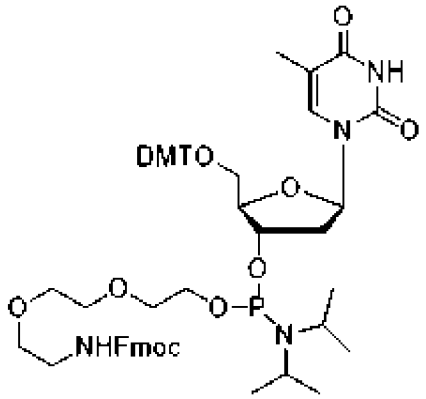
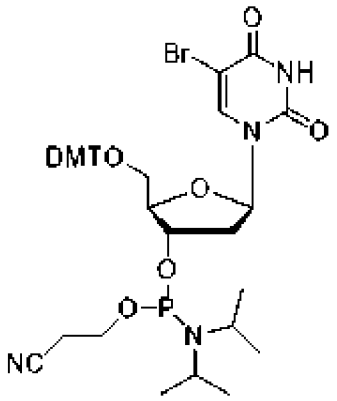
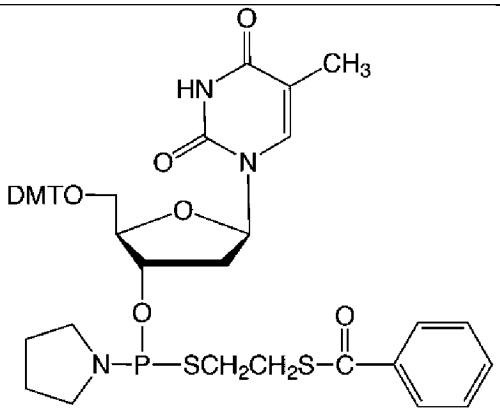
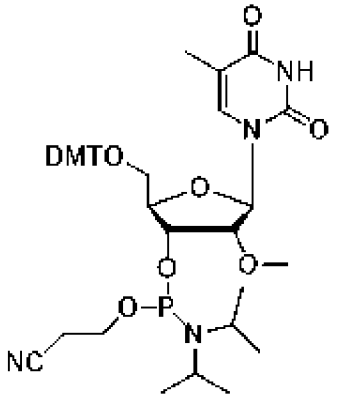
[00456] *Кэпирование*: после сульфирования, CPG подложку и связанный нуклеотид обрабатывают двумя кэпирующими композициями (кэпирующая композиция A: 20% N-метилимидазол в АЦН; кэпирующая композиция B: 20% уксусный ангидрид, 30% пиридин, 50% АЦН) для блокирования непрореагировавших нуклеотидных реагентов.

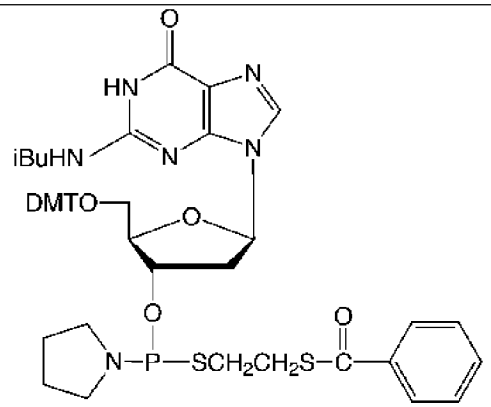
[00457] *Повторный синтез*: оставшиеся нуклеотиды добавляют последовательно, от 3' конца к 5' концу, используя соответствующие предшественники фосфорамидитов в растворе, повторяя стадии снятия защиты, активации/связывания, тиолирования/сульфирования и кэпирования, как описано выше, для получения желаемой

олигонуклеотидной последовательности в защищенной форме. Все предшественники фосфорамидита смешивают с носителем CPG в течение 5 минут во время стадии сочетания, за исключением dT-тиофосфорамидита, который смешивают в течение 15 минут.

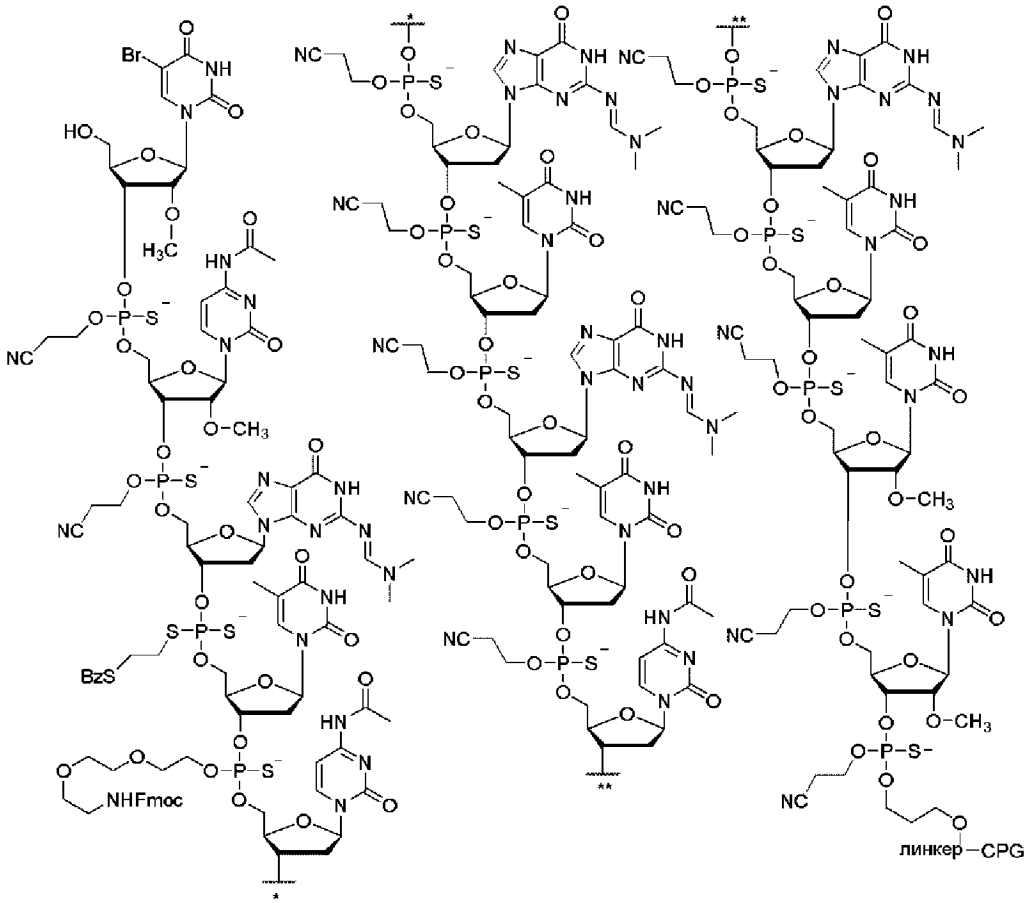
[00458] Выбранные предшественники фосфорамидитов, использованные в синтезе, показаны ниже. Предшественники фосфорамидитов получают в растворах с растворителями и в указанных концентрациях, соответственно, для использования на стадиях сочетания.

Амидит	**Структура**	**Концентрация**
DMT-dC(Ac) амидит		0,1 М в сухом АЦН:
DMT-dG(dmf) амидит		0,1 М в сухом АЦН:
DMT-dT фосфорамидит		0,1 М в сухом АЦН:

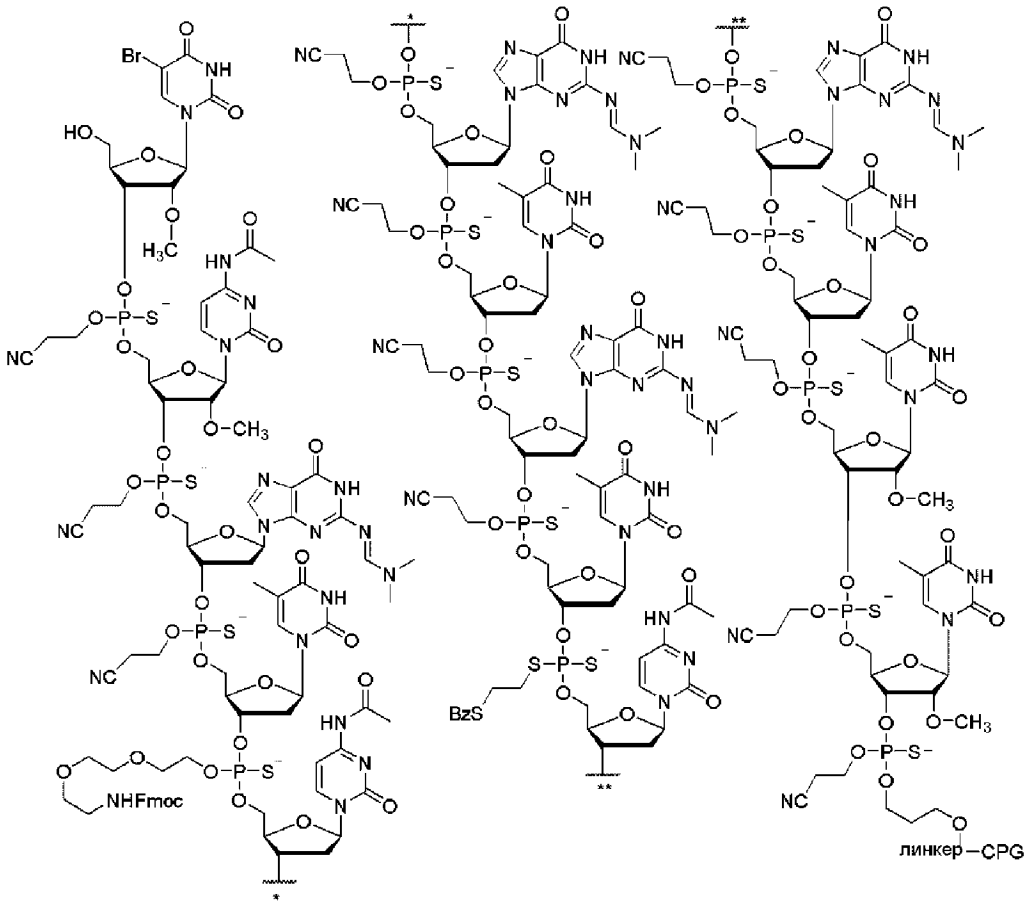
Fmoc-защищенный DMT-dTPEG2 NH2 амидит		0,1М в сухом АЦН
5-Br-dU-CE фосфорамидит		0,1М в сухом АЦН
dT-тиофсофорамидит		0,15 М в сухом 10% (об./об.) ДХМ/АЦН
2'-O-метил 5-метилуридин CED фосфорамидит		0,1М в сухом АЦН

dG-тиофосфорамидит		0,1М в сухом АЦН

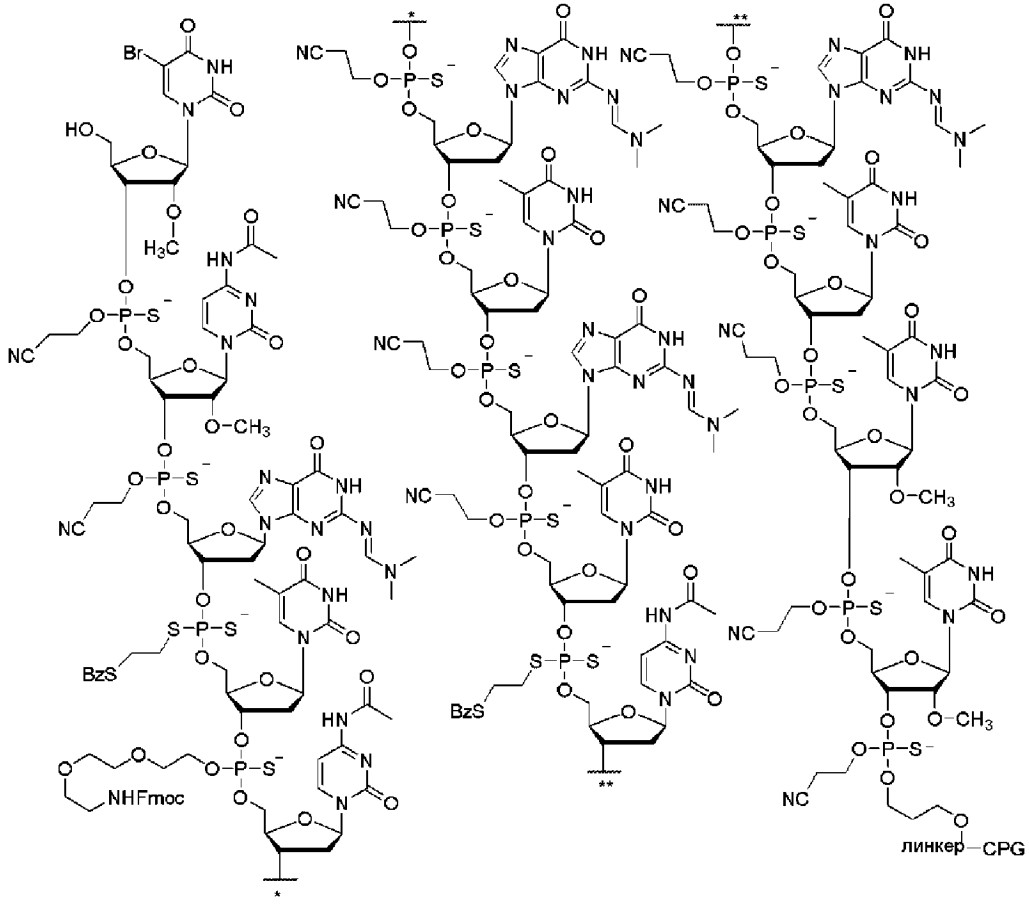
[00459] Типовые Fmoc-защищенные олигонуклеотидные соединения 6.1a, 6.2a и 6.3a, полученные на стадиях синтеза, описанных выше, показаны ниже. Снятие защиты, очистка и связывание соединения 6.1a с получением соединения 6.1b дополнительно описаны ниже.



Защищенное Fmoc соединение 6.1a на CPG подложке



Защищенное Fmoc соединение 6.2a на CPG подложке



Защищенное Fmoc соединение 6.3a на CPG подложке

[00460] Защищенное Fmoc олигонуклеотидное соединение 6.1a на CPG подложке, полученное в результате описанного выше синтеза, одновременно отщепляют от носителя и снимают защиту путем взаимодействия CPG подложки с 20 мМ дитиотреитола в гидроксиде аммония:метиламине, 1:1 (об./об.) в течение 2 часов при комнатной температуре с получением неочищенного соединения 6.1a. Неочищенный продукт очищают с помощью ион-парной ВЭЖХ с обращенной фазой (ИП-ОФ-ВЭЖХ), и его идентичность подтверждают с помощью ИЭР-МС. Неочищенное соединение 6.1a очищают с помощью ВЭЖХ и обессоливают.

[00461] Затем соединение 6.1a подвергают взаимодействию с O-[2-(Fmoc-амино)этил]-*O'*-[3-(N-сукцинимидилокси)-3-оксопропил]полиэтиленгликолем (сложным эфиром Fmoc-N-амидо-dPEG$_{24}$-NHS) в буфере на основе бикарбоната натрия с получением защищенного Fmoc соединения 6.1b. Защищенное Fmoc соединение 6.1b подвергают взаимодействию с 20 мМ дитиотреитола в смеси гидроксид аммония:метиламин, 1:1 (об./об.) в течение 2 часов при комнатной температуре с получением неочищенного соединения 6.1b. Неочищенный продукт очищают с помощью ион-парной ВЭЖХ с обращенной фазой (ИП-ОФ-ВЭЖХ), и его идентичность подтверждают с помощью ИЭР-МС. Неочищенное соединение 6.1b очищают с помощью ВЭЖХ, обессоливают и лиофилизируют с получением очищенного олигонуклеотида 6.1b.

Получение антител

[00462] Антитела, полученные внутри компании, обычно экспрессируются в суспензионной культуре системы Expi293 (ThermoFisher) в соответствии с руководством производителя. Экспрессированные антитела очищают путем захвата белка A с использованием хроматографии MabSelectLX (GE), элюируют 0,1 M цитратом (pH 3,3) и подвергают диализу в конечной буферной композиции 1X PBS (фосфатно-солевом буфере, pH 7,4).

Одностадийный способ конъюгации с помощью mTG (микробной трансглутаминазы)

[00463] Q-метку с последовательностью RPQGFGPP (SEQ ID NO: 49) генетически связывают с C-концом тяжелой цепи антитела. Для проведения конъюгации, очищенное антитело (содержащее сконструированные Q-метки на C-конце тяжелой цепи) сначала заменяют буфером на 25 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 8. Группу, содержащую Ab-Q-метку и CpG, добавляют в молярном соотношении. 1:1,3 и инкубируют в течение ночи с конечной концентрацией mTG 1% (масс./об.) (Ajinomoto) при комнатной температуре. Конечная концентрация антитела, используемого для конъюгации, обычно составляет ~20-25 мкМ. Смесь загружают в Q Sepharose HP (GE), уравновешенную в 20% буфере B (40 мМ Tris, 2M NaCl, pH 8) и 80% буфере A (40 мМ Tris, pH 8). Колонку промывают 5 объемами колонки 20% буфером B. Разделение проводят с использованием линейного градиента от 20% B до 60% B в 30 объемах колонки. Пиковые фракции DAR1 (Q-метка, конъюгированная с одной частью CpG) объединяют и концентрируют с последующей

стадией гель-фильтрации с использованием S200 (GE). Фракции мономерных пиков объединяют и концентрируют.

Биологическая оценка CpG-нуклеотидов и конъюгатов антитело-CpG-нуклеотид

[00464] Остатки Trima получают от Vitalant и разводят 1:4 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на две пробирки и разводят 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела фаз и ресуспендируют в буфере FACS (PBS с 0,5% альбумина бычьей сыворотки (Gibco)). B-клетки очищают путем отрицательной селекции с использованием набора B Cell Isolation Kit II, колонок для человека (Miltenyi Biotec) и LS (Miltenyi Biotec) в соответствии с протоколом производителя.

[00465] PBMC немедленно высевают на 96-луночный формат (500 тыс./лунку) в Complete RPMI (RPMI+10% FBS). К клеткам добавляют пятикратные серийные разведения от 100 нМ до 6,4 пМ антитела и конъюгированного антитела и от 1 мкМ до 64 пМ полинуклеотидов CpG при 37°C в атмосфере 5% CO2 в течение 48-96 часов. Клетки осаждают центрифугированием в течение пяти минут при 400 x g и окрашивают при 4°C красителем Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенным 1:4000 в PBS. Клетки центрифугируют и окрашивают при 4°C в FACS буфере в течение 30 минут, содержащем блокирующий реагент FcR (Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD20, анти-CD40, анти-HLADR и анти-CD80 для анализа B-клеток и анти-CD14, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD14, анти-CD123, анти-CD11c и анти-CD86 для анализа pDC. Клетки центрифугируют и дважды промывают буфером FACS и фиксируют в 0,5% параформальдегиде. В каждую лунку добавляют микроносители CountBright™ Absolute Counting Beads (Thermo Fisher) для подсчета количества клеток. Клетки анализируют на проточном цитометре Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher) с последующим анализом данных на Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключают путем гейтирования на 780-отрицательной популяции eFluor. Клетки, специфические для линии, сначала исключают (CD19, CD3, CD14) до гейтирования клеток $CD123^{+}CD11c^{-}$ для идентификации pDC и гейтирования клеток $CD19^{+}$, $CD20^{+}$ или $CD19^{+}CD20^{+}$ для идентификации B-клеток.

Пример 1: Активность свободных иммуномодулирующих олигонуклеотидов (CpG) в PBMC человека

[00466] PBMC человека обрабатывают свободными CpG (SEQ ID NO: 3 и 26-28) для оценки их соответствующей активности, наблюдаемой по экспрессии HLADR и CD40 на CD19-положительных B-клетках (как показано на **ФИГ. 1A-1B**). Все CpG (SEQ ID NO: 26-28) проявляют повышенную активность по сравнению с CpG (SEQ ID NO: 3).

Пример 2: Активность иммуномодулирующих полинуклеотидов и их соответствующих конъюгатов с антителами

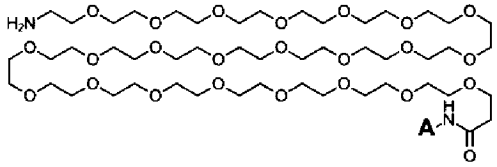
[00467] Различные полинуклеотиды CpG, SEQ ID NO: 3-25, тестируют на их влияние на пролиферацию и/или активацию B-клеток. На **ФИГ. 2A-2C** показаны

соответствующие активности отдельных CpG. Все протестированные полинуклеотиды CpG усиливают активацию B-клеток через 48 часов инкубации. Как определено путем подсчета микроносителей для расчета абсолютного количества B-клеток и экспрессии CD40, все CpG увеличивают количество B-клеток и экспрессию CD40. Выбранное количество протестированных полинуклеотидов CpG показывает усиленное действие на пролиферацию и активацию B-клеток по сравнению с CpG (SEQ ID NO: 3).

[00468] В качестве конъюгата антитело-CpG (**ФИГ. 2D)** с анти-CD22 антителом (SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57), все соответствующие конъюгаты модифицированных CpG (SEQ ID NO: 9, 12, 13, 15, и 20) имеют повышенную активацию B-клеток по сравнению с соответствующим конъюгатом CpG (SEQ ID NO: 3) и голым CpG (SEQ ID NO: 3), как определено по экспрессии CD80.

Пример 3: Конъюгация, опосредованная трансглутаминазой

[00469] Конъюгацию, опосредованную трансглутаминазой, тестируют с использованием олигонуклеотида A (с последовательностью: t**u**cgtcgtgacgtt, SEQ ID NO: 1), координированного с ПЭГилированным линкером (-NH-C(=O)-PEG_{23}-NH_2, структура показана ниже) и последовательности пептидов Q-метки SEQ ID NO: 39-47 и 50-52.



[00470] 2 нмоль Q-метки добавляют к 1 нмоль линкера в присутствии 0,04 нмоль трансглутаминазы в PBS. Конечная концентрация линкера составляет 50 мкМ. Реакции поддерживают при комнатной температуре и гасят 8М формамидом через 1 час. Реакционный раствор анализируют с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке Xbridge C18 (4,6×150 мм) с использованием растворителя A (50 мМ TEAA в воде) и растворителя B (ацетонитрил) с градиентом от 20% до 60% растворителя B за 10 минут при 60°C. Альтернативно, реакционный раствор анализируют с помощью ВЭЖХ с обращенной фазой на колонке Luna 3μ C18 (4,6×50 мм) с использованием растворителя A (0,1% ТФК в воде) и растворителя B (0,1% ТФК в ацетонитриле) с градиентом от 10% до 70% растворителя B за 10 минут при 50°C.

[00471] На **ФИГ. 3** показаны выходы опосредованной трансглутаминазой конъюгации и дезамидирования пептида с различными Q-метками. RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQQF, RPRPQQF показывают высокую долю конъюгатов и умеренно низкое дезамидирование.

[00472] На **ФИГ. 4A-4B** показаны конъюгация и деконъюгация двух конъюгатов, полученных из Q-метки с SEQ ID NO: 39 и 47, с течением времени. RPQGF (SEQ ID NO: 47) имеет более высокую долю конъюгации со всеми протестированными соотношениями Q-метка:линкер+CpG в течение 16 часов. Более того, скорость деконъюгации RPQGF (SEQ ID NO:47) также ниже по сравнению с LSLSPGLLQGG (SEQ ID NO:39).

Пример 4: Активность конъюгатов анти-CD22 и анти-BDCA2 антитело/CpG

[00473] Q-метка с последовательностью RPQGFGPP (SEQ ID NO: 49) генетически связана с С-концом тяжелой цепи антитела. Для выполнения конъюгации, очищенное антитело (содержащее сконструированные Q-метки на С-конце тяжелой цепи) сначала заменяют буфером на 25 мМ Tris, 150 мМ NaCl, pH 8. Группу, содержащую Ab-(Q-tag):CpG, добавленный в молярном соотношении 1:1,3, смешивают и инкубируют в течение ночи с конечной концентрацией mTG 1% (масс./об.) (Ajinomoto) при комнатной температуре. Конечная концентрация антитела, используемого для конъюгации, обычно составляет ~20-25 мкМ. Смесь загружают в Q Sepharose HP (GE), уравновешенную 20% буфером B (40 мМ Tris, 2M NaCl, pH 8) и 80% буфером A (40 мМ Tris, pH 8). Колонку промывают 5 объемами колонки 20% буфера B. Разделение проводят с использованием линейного градиента от 20% B до 60% B в 30 объемах колонки. Пиковые фракции DAR1 (Q-метка, конъюгированная с одной частью CpG) объединяют и концентрируют с последующей стадией гель-фильтрации с использованием S200 (GE). Фракции мономерных пиков объединяют и концентрируют.

[00474] Остатки Trima получают от Vitalant и разводят 1:4 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на две пробирки и разводят 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела фаз и ресуспендируют в буфере FACS (PBS с 0,5% альбумина бычьей сыворотки (Gibco)).

[00475] PBMC немедленно высевают на 96-луночный формат (500 тыс./лунку) в Complete RPMI (RPMI+10% FBS). К клеткам добавляют пятикратные серийные разведения от 100 нМ до 6,4 пМ антитела и конъюгированного антитела и от 1 мкМ до 64 пМ полинуклеотидов CpG при 37°C в атмосфере 5% CO2 в течение 48-96 часов. Клетки осаждают центрифугированием в течение пяти минут при 400 x g и окрашивают при 4°C красителем Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенным 1:4000 в PBS. Клетки центрифугируют и окрашивают при 4°C в FACS-буфере в течение 30 минут, содержащем блокирующий реагент FcR(Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD20, анти-CD40, анти-HLADR и анти-CD80 для анализа B-клеток, и анти-CD14, анти-CD3, анти-CD19, анти-CD14, анти-CD123, анти-CD11c и анти-CD86 для анализа pDC. Клетки центрифугируют и дважды промывают буфером FACS и фиксируют в 0,5% параформальдегиде. В каждую лунку добавляют микроносители CountBright Absolute Counting Beads (Thermo Fisher) для подсчета количества клеток. Клетки анализируют на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher) с последующим анализом данных на Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключают путем гейтирования 780-отрицательной популяции eFluor. Сначала исключают специфические для линии клетки (CD19, CD3, CD14) перед гейтированием $CD123^{+}CD11c^{-}$ клеток для идентификации pDC и гейтированием $CD19^{+,}$ CD20+или CD19+CD20+клеток для идентификации B-клеток.

[00476] Уровни альфа-интерферона анализируют с использованием панели воспалений человека LegendPlex 1 (Biolegend). После осаждения клеток, собирают супернатант из анализов pDC.

[00477] Различные антитела, специфические для B-клеток и pDC, конъюгируют с CpG 12070 (SEQ ID NO: 3), CpG (SEQ ID NO: 9, 12, 20, 27 и 28), все с конфигурацией DAR1, на их C-конце тяжелой цепи Q-метки (RPQGFGPP) (SEQ ID NO: 49) с помощью трансглутаминазной реакции. Затем конъюгированные антитела тестируют на их влияние на пролиферацию и/или активацию. Анти-CD22 антитела, конъюгированные с CpG, представляют собой RFB4 (SEQ ID NO: 56 и 57). Как показано на **ФИГ. 5A-5D,** анти-CD22-CpG антитела усиливают активацию B-клеток по сравнению с «голым» полинуклеотидом CpG 12070 (SEQ ID NO: 3) и контрольным антителом IgG человека через 96 часов. Как определено по экспрессии CD19, CD40, CD69, CD86 и HLADR, только анти-CD22-CpG и только CpG индуцируют активацию B-клеток. Прямая доставка CpG с помощью таргетного антитела приводит к более высокой активации по сравнению с одним CpG. Кроме того, анти-CD22, конъюгированное с CpG (SEQ ID NO: 9 и 20), обладает повышенной активностью по сравнению с анти-CD22, конъюгированным с CpG (SEQ ID NO: 3).

[00478] Антитело, таргетирующее pDC, анти-BDCA2 (SEQ ID NO: 111 и 112 для последовательностей VH и VL, соответственно), аналогичным образом конъюгируют с CpG 12070 (SEQ ID NO: 3), CpG (SEQ ID NO: 9, 12, 20, 27 и 28), все с конфигурацией DAR1, и тестируют его влияние на активацию по сравнению с не конъюгированным антителом через 48 часов, наблюдаемое по экспрессии CD86, CD40 и HLADR (**ФИГ. 6A-6C**) и по экспрессии CD40 в моноцитах и mDC и экспрессии CD19, CD40, CD3 и CD69 (**ФИГ. 7A-7D**). Конъюгат CpG 12070:анти-BDCA2 также индуцирует экспрессию IFNα в PBMC человека (**ФИГ. 6D**).

[00479] Конъюгированные анти-pDC-CpG антитела и только CpG индуцирует экспрессию HLADR по сравнению с только антителом.

Последовательность BDCA VH:

DVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWVRQAPGKGLEWVATISPG DSFGYYYPDSVQGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDIYYNYGAWFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 111)

Последовательность BDCA-VL:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYA ASTLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAEDRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 112)

Пример 5: Разработка гуманизированных анти-CD22 антител

[00480] В этом примере описано создание гуманизированных анти-CD22 антител. Исходное антитело представляет собой антитело мыши к CD22 (SEQ ID No: 56 и 57 для последовательностей VH и VL, соответственно).

Последовательность VH анти-CD22 мыши

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSG GGTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAY WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 56)

Последовательность VL анти-CD22 мыши

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 57)

[00481] Конструируют 4 варианта домена VH (RH1, RH2, RH3 и RH4; SEQ ID No: 64-67, соответственно) и 5 вариантов домена VL (RL1, RL2, RL3, RL4 и RL5; SEQ ID No: 68-72, соответственно). Выравнивания соответствующих доменов VH и VL показаны на **ФИГ. 8A-8B.** Каркасные последовательности, использованные для каждого варианта, следующие: RH1 - IGHV3 человека; RH2 - IGHV3 человека с некоторыми мутациями; RH3 - FW1-3 на основе IGHV3-48*03 с FW4 в качестве родительской мыши; RH4 - IGHV4 человека; RL1 - IGLV1 человека; RL2 - IGLV1 человека с некоторыми мутациями; RL3 - FW1-3 на основе IGKV1-39*01 с FW4 в качестве родительской мыши; RL4 - IGVK3; RL5 - IGVK2 (FW1 и FW2 фланкируют CDR1; FW2 и FW3 фланкируют CDR2, и FW4 находится после CDR3). Всего создают 20 конструкций антител путем объединения каждого домена VH с каждым доменом VL и использования Fc области AAA IgG1 человека с C-концевой Q-меткой (RPQGFGPP) (SEQ ID NO: 49) в константном домене тяжелой цепи антитела (SEQ ID NO:95), как показано ниже. IgG1 AAA Fc содержит замены L234A, L235A и G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

Название конструкции	**Легкая цепь+тяжелая цепь**
TNT69	RL1_hКаппа+RH1_hIgG1_AAA_Qметка
TNT70	RL1_hКаппа+RH2_hIgG1_AAA_Qметка
TNT71	RL1_hКаппа+RH3_hIgG1_AAA_Qметка
TNT72	RL1_hКаппа+RH4_hIgG1_AAA_Qметка
TNT73	RL2_hКаппа+RH1_hIgG1_AAA_Qметка
TNT74	RL2_hКаппа+RH2_hIgG1_AAA_Qметка
TNT75	RL2_hКаппа+RH3_hIgG1_AAA_Qметка
TNT76	RL2_hКаппа+RH4_hIgG1_AAA_Qметка
TNT77	RL3_hКаппа+RH1_hIgG1_AAA_Qметка
TNT78	RL3_hКаппа+RH2_hIgG1_AAA_Qметка
TNT79	RL3_hКаппа+RH3_hIgG1_AAA_Qметка
TNT80	RL3_hКаппа+RH4_hIgG1_AAA_Qметка
TNT81	RL4_hКаппа+RH1_hIgG1_AAA_Qметка
TNT82	RL4_hКаппа+RH2_hIgG1_AAA_Qметка
TNT83	RL4_hКаппа+RH3_hIgG1_AAA_Qметка
TNT84	RL4_hКаппа+RH4_hIgG1_AAA_Qметка
TNT85	RL5_hКаппа+RH1_hIgG1_AAA_Qметка

TNT86	RL5_hКаппа+RH2_hIgG1_AAA_Qметка
TNT87	RL5_hКаппа+RH3_hIgG1_AAA_Qметка
TNT88	RL5_hКаппа+RH4_hIgG1_AAA_Qметка
TNT89	Контроль_hRFB4_LC_hКаппа+Контроль_hRFB4_HC_hIgG1_AAA_Qметка
TNT90	Контроль_hRFB4+mutCDRL1_LC_hКаппа+Контроль_hRFB4+mutCDRH3_HC_hIgG1_AAA_Qметка
TNT31	RFB4 мыши

[00482] Для селекции антител учитывают следующие факторы: аффинность связывания CD22, биологическая активность CD22, связывание с CD22 яванского макака, экспрессия в клетках CHO или Expi293, выход конъюгации, профиль эксклюзионной ВЭЖХ (*например,* агрегация, форма пика), спаривание VH/VL, ответственность последовательности и тестирование на стабильность (*например,* замораживание-размораживание и термостабильность).

[00483] Каждую конструкцию экспрессируют в клеточной линии 293FS. Как показано на **ФИГ. 9,** антитела с RL4 и RL5 имеют самые низкие общие уровни экспрессии. RH4 также снижает общий уровень экспрессии в каждой паре легких цепей.

[00484] Связывание гуманизированных анти-CD22 антител с CD22 человека измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Для оценки связывания с помощью SPR, биотинилированный белок A (15 мкг/мл) иммобилизуют на поверхности NLC чипа. 30 мкл супернатанта mAb добавляют к 150 мкл PBS-T и захватывают над поверхностью белка A. Серийные разведения CD22-gly человека (300 нМ, 3-кратное разведение) впрыскивают на чипы, покрытые mAb, и определяют кинетику связывания. Чипы регенерируют с использованием 4:1 об./об. элюирующего масла Pierce IgG/4 M NaCl. Данные связывания представлены ниже.

Название образца	ka	kd	**KD**
	1/Мс	1/с	**М**
TNT69	2,01E+05	1,26E-04	**6,24E-10**
TNT70	2,35E+05	1,03E-04	**4,39E-10**
TNT72	2,23E+05	1,46E-04	**6,55E-10**
TNT71	2,81E+05	1,46E-03	**5,20E-09**
TNT73	1,58E+05	2,30E-03	**1,45E-08**
RFB4	2,97E+05	8,22E-04	**2,77E-09**
TNT74	1,86E+05	2,89E-03	**1,56E-08**

TNT76	1,99E+05	6,01E-03	**3,02E-08**
TNT75	2,80E+05	8,40E-03	**3,00E-08**
TNT77	2,03E+05	2,07E-03	**1,02E-08**
TNT78	1,95E+05	4,85E-03	**2,49E-08**
TNT80	2,23E+05	5,19E-03	**2,33E-08**
TNT79	2,70E+05	6,29E-03	**2,33E-08**
TNT81	1,69E+05	1,17E-04	**6,92E-10**
TNT82	1,67E+05	1,56E-04	**9,37E-10**
TNT84	2,71E+05	6,67E-04	**2,46E-09**
TNT83	2,69E+05	1,60E-03	**5,94E-09**
RFB4	3,06E+05	8,02E-04	**2,62E-09**
TNT85	1,35E+05	1,69E-04	**1,25E-09**
TNT86	1,30E+05	1,41E-04	**1,09E-09**
TNT88	2,15E+05	2,89E-04	**1,34E-09**
TNT87	2,50E+05	1,71E-03	**6,85E-09**
TNT89	3,59E+05	1,29E-03	**3,60E-09**
TNT90	3,55E+05	5,23E-05	**1,47E-10**

[00485] Все гуманизированные варианты RFB4 связываются с CD22 человека (домен d1 - d7 в соответствии с NP_001762.2) с аффинностью от ~30 нМ до ~0,1 нМ. Аффинность связывания родительского RFB4 антитела с CD22 человека составляет ~3 нМ. TNT71, TNT84, TNT83, TNT85, TNT86, TNT88, TNT89 и TNT90 имеют аффинность, эквивалентную RFB4. TNT69, TNT70, TNT72, TNT81, TNT82, TNT90 имеют более высокую аффинность (~0,1 нМ), чем RFB4.

[00486] Связывание гуманизированных анти-CD22 антител с PBMC человека или яванского макака измеряют с помощью проточной цитометрии. Остатки Trima получают от Vitalant, и цельную кровь яванского макака получают от BioIVT. Оба материала разводят 1:4 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на две пробирки и разводят 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела, промывают и ресуспендируют в буфере FACS (PBS с 0,5% бычьим сывороточным альбумином (Gibco)). 100 тыс. PBMC человека и яванского макака высевают в 96-луночные планшеты и осаждают центрифугированием в течение пяти минут при 400 x g и окрашивают при 4°C в 100 мкл красителя Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенного 1:4000 в PBS. Клетки центрифугируют и окрашивают при 4°C в 100 мкл буфера FACS в течение 30

минут, содержащего блокирующий реагент FcR (Miltenyi Biotec), анти-CD20 и конъюгированные с Alexa Fluor 647 CD22-связывающие антитела, которые помечены с использованием набора Molecular Probes Alexa Fluor 647 Protein Labeling (Molecular Probes) в соответствии с протоколом производителя. Клетки центрифугируют и дважды промывают в 200 мкл буфера FACS и фиксируют в 100 мкл 0,5% параформальдегида. Клетки анализируют на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher) с последующим анализом данных на Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключают путем гейтирования 780-отрицательной популяции eFluor. Клетки $CD20^+$ отбирают для идентификации B-клеток и определяют среднюю интенсивность флуоресценции для CD22.

[00487] Гуманизированные антитела RFB4 оценивают на связывание с B-клетками человека и яванского макака. В приведенной ниже таблице показана средняя интенсивность флуоресценции CD22 при связывании гуманизированными антителами RFB4 с $CD20^+$ и $CD20^-$ клетками человека и яванского макака. Кратность увеличения связывания определяют, вычисляя отношение средней интенсивности флуоресценции CD22 на $CD20^+$ по сравнению с $CD20^-$ клетками. Все гуманизированные антитела связывают CD22 на B-клетках человека подобно родительскому RFB4, но с вариабельностью на B-клетках яванского макака. Как определено по средней интенсивности флуоресценции CD22 на $CD20^+$ и $CD20^-$ клетках человека, кратное увеличение связывания с CD22 для гуманизированных антител составляет 19-26 раз по сравнению с 22-кратным для исходного RFB4. Кратность увеличения средней интенсивности флуоресценции CD22 на $CD20^+$ и $CD20^-$ яванского макака для гуманизированных антител находится в диапазоне 1-16 раз по сравнению с 8,3 раза для родительского RFB4.

	Человек				Яванский макак		
	$CD20^+$	$CD20^-$			$CD20^+$	$CD20^-$	
ID образца	CD22 Средняя интенсивность флуоресценции	CD22 Средняя интенсивность флуоресценции	CD22: $CD20^+$/ $CD20^-$		CD22 Средняя интенсивность флуоресценции	CD22 Средняя интенсивность флуоресценции	CD22 : $CD20^+$/ $CD20^-$
TNT 69	1610	63,4	25,4		1412	94,9	14,9
TNT 70	1555	65,9	23,6		1291	115	11,2
TNT 72	1555	62,1	25,0		1368	109	12,6
TNT 71	1457	65,9	22,1		1420	101	14,1
TNT 73	1413	70,9	19,9		216	114	1,9
TNT 74	1313	67,1	19,6		185	105	1,8

TNT 76	1193	58,4	20,4		140	85,4	1,6
TNT 75	1628	60,9	26,7		588	88,4	6,7
TNT 77	1324	63,4	20,9		236	90,1	2,6
TNT 78	1206	60,9	19,8		112	90,4	1,2
TNT 80	1211	59,6	20,3		159	86	1,8
TNT 79	1301	60,9	21,4		349	90,1	3,9
TNT 82	1515	63,4	23,9		1174	93,2	12,6
TNT 83	1489	64,6	23,0		1401	130	10,8
TNT 85	1579	68,4	23,1		1375	143	9,6
TNT 86	1572	65,9	23,9		1428	131	10,9
TNT 88	1531	58,4	26,2		1274	86,7	14,7
TNT 87	1444	60,9	23,7		1368	85,4	16,0
RFB4	1353	60,9	22,2		960	115	8,3

[00488] Чтобы оценить, влияет ли конъюгация CpG на связывание соответствующего гуманизированного анти-CD22 с CD22 человека, проводят анализ SPR. Гуманизированные анти-CD22 антитела (TNT70, TNT71, TNT72 и TNT74) конъюгируют с CpG (SEQ ID NO: 3) с конфигурацией DAR1 и сравнивают с соответствующими голыми антителами. Коротко, биотинилированный белок A (15 мкг/мл) иммобилизуют на поверхности NLC чипа. 30 нМ очищенного «голого» mAb или раствора mAb, конъюгированного с CpG, в PBS-T используют для захвата над поверхностью белка A. Серийные разведения CD22 человека (300 нМ, 3-кратное разведение) впрыскивают на чипы, покрытые mAb, и определяют кинетику связывания. Чипы регенерируют с использованием 4:1 об./об. элюирующего масла Pierce IgG/4 M NaCl. Данные связывания представлены ниже.

Название образца	ka	kd	**KD**
	1/Mc	1/c	**M**
TNT70 DAR1	1,25E+05	6,29E-05	**5,02E-10**
TNT71 DAR1	8,17E+04	3,14E-05	**3,84E-10**
TNT72 DAR1	2,01E+05	6,59E-05	**3,28E-10**
TNT74 DAR1	1,14E+05	2,10E-03	**1,85E-08**
TNT71	8,84E+04	2,33E-05	**2,63E-10**
TNT72	3,51E+05	3,23E-09	**9,22E-10**
TNT70	1,40E+05	5,62E-05	**4,00E-10**
TNT74	1,10E+05	1,99E-03	**1,82E-08**

[00489] CpG-конъюгированные mAb (TNT70, TNT71, TNT72 и TNT74)

связываются с CD22 человека с такой же аффинностью, что и соответствующие голые mAb, что указывает на то, что CpG-конъюгация не изменяет кинетику связывания.

[00490] Затем гуманизированные анти-CD22 антитела конъюгируют с CpG 12070 и анализируют активность конъюгатов антител (DAR1). Конъюгаты антител очищают хроматографией в следующих условиях: MonoQ 5/50 GL; буфер A: 50 мМ Tris, pH 8; буфер B: 50 мМ Tris, 2 M NaCl, pH 8; 2 мл/мин, 0-100% B в 200 CV, фракции 1 мл. Результаты показаны на **ФИГ. 10A-10D** для конъюгатов с TNT70, TNT71, TNT72 и TNT74, соответственно. Для очистки объединяют только пик DAR1, заменяют буфер на PBS и концентрируют. Исходный материал и конъюгаты также анализируют либо в восстановленной, либо в не восстановленной форме с помощью SDS-PAGE (**ФИГ. 10E).**

[00491] Анализ связывания с помощью SPR показывает, что голые антитела и конъюгаты CpG связываются с CD22 с одинаковой аффинностью.

[00492] Как показано на **ФИГ. 11,** все конъюгаты с различными гуманизированными анти-CD22 антителами способны активировать B-клетки. Никакой связи между аффинностью к CD22 и активацией B-клеток не наблюдается.

[00493] Конъюгаты CpG:антитело также профилируют эксклюзионной хроматографией (SEC), как показано на **ФИГ. 12A-12D.** Конъюгаты антител, включающие RH1 VH домена, демонстрируют широкие или двойные пики SEC (**ФИГ. 12A).** Конъюгаты антител, включающие RH2 VH домена, работают правильно на основании анализа SEC (**ФИГ. 12B)**. Конъюгаты антител, включающие RH3 VH домена, склонны к агрегации на основании анализа SEC (**ФИГ. 12C)**. Конъюгаты антител, включающие RH4 VH домена, работают правильно на основании анализа SEC, но характеризуются низкой общей экспрессией (**ФИГ. 12D)**.

[00494] Анализируют пары конкретных доменов VH и VL. Известно, что, как правило, IGHV3 часто спаривается с IGKV1 и IGKV3. Предпочтительные пары включают TNT69, TNT70, TNT71, TNT73, TNT74, TNT75, TNT77, TNT78, TNT79, TNT81, TNT82 и TNT83. Также исследуют потенциальную ответственность последовательности, включая остатки, потенциально подверженные окислению, дезамидированию и изомеризации метионина.

[00495] Отдельные характеристики протестированных конъюгатов суммированы на **ФИГ. 13A.** Антитела с RH1 вели себя аномально по данным эксклюзионной ВЭЖХ. Антитела с RH4, RL4 и RL5 имеют более низкие уровни экспрессии (**ФИГ. 13B)**. В частности, антитела с RL4 (IGKV3) имеют более низкую экспрессию в клетках CHO, как и в клетках Expi293. Антитела с RH3 имеют общую тенденцию к высокой агрегации. Спаривание RH4 и RL5, как правило, нежелательно. На основании всех характеристик, включая уровень экспрессии и потенциальную ответственность последовательности, предпочтение отдается спариванию RH2 VH домена с RL1, RL2 или RL3VL домена. Для дальнейшего изучения выбраны TNT70, TNT74, TNT78 и TNT82.

[00496] Для оценки температуры плавления используют дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC). DSC проводят с использованием MicroCal VP

Capillary DSC (Malvern). Считается, что DSC измеряет теплоемкость как функцию температуры. Температура плавления (Tm) считается хорошим индикатором термической стабильности и прогнозирующим фактором долговременной стабильности, где более стабильные белки имеют более высокую Tm. Результаты DSC тестирования выбранных конъюгатов CpG:антитело показаны ниже.

Образец	**$T_{начала}$**	**T_m1**	**T_m2**
TNT70	61,41	71,71	79,26
TNT70 DAR1	64,23	71,71	78,09
TNT72	62,64	71,17	86,37
TNT72 DAR1	62,54	70,80	86,00

[00497] TNT72 имеет более высокую Tm2, чем TNT70. Считается, что этот переход соответствует разворачиванию Fab/CH3. Незначительные различия в Tm наблюдаются между «голыми» и конъюгированными антителами. Графики DSC показаны на **ФИГ. 14.**

Пример 6: Анализ гуманизированных вариантов анти-CD22, мутированных для удаления потенциальной ответственности последовательности

[00498] Затем гуманизированные анти-CD22-антитела, описанные в примере 5, анализируют на потенциальную ответственность последовательности. Потенциальный сайт дезаминирования Asn присутствует в CDR-L3 (N92) всех гуманизированных вариантов (**ФИГ.8B**). Этот сайт мутирован в RL1 VH домена для создания вариантов антител, которые тестируют на влияние мутации на аффинность связывания с CD22. Для сконструированных вариантов, N92 мутировано во всех возможных аминокислотах. Данные для мутации в A, C, D, E, F, G, H, L, P, S, T, V или W показаны ниже.

[00499] Экспрессию каждого варианта сравнивают с TNT70 в восстанавливающих (**ФИГ. 15B**) или не восстанавливающих (**ФИГ. 15A**) условиях. Связывающие свойства мутантов суммированы ниже и на **ФИГ. 15C-15F.** Все замены N92 выглядят приемлемыми в отношении аффинности связывания с CD22. В частности, N92A, N92D, N92E и N92F выглядят сравнимыми с родительским антителом, но KD всех вариантов, по-видимому, находится в пределах погрешности анализа.

	ka	**kd**	**KD**
Образец	**1/Mc**	**1/c**	**M**
TNT70	1,55E+05	3,72E-05	2,40E-10
TNT70	1,45E+05	7,30E-05	5,04E-10
N92A	1,51E+05	4,45E-05	2,95E-10
N92C	1,11E+05	7,13E-05	6,43E-10
N92D	1,46E+05	5,05E-05	3,46E-10
N92E	1,47E+05	4,29E-05	2,93E-10

N92F	1,55E+05	4,58E-05	2,95E-10
N92G	1,51E+05	6,80E-05	4,52E-10
N92H	1,49E+05	6,08E-05	4,09E-10
N92K	1,45E+05	6,25E-05	4,31E-10
N92P	1,12E+05	7,24E-05	6,44E-10
N92S	1,52E+05	7,14E-05	4,68E-10
N92T	1,49E+05	7,85E-05	5,29E-10
N92V	1,45E+05	8,32E-05	5,73E-10
N92W	1,43E+05	7,87E-05	5,49E-10

Пример 7: Фармакокинетика конъюгатов CpG-антитело

[00500] Метод: Мышей Balb/c получают из Charles River и используют для исследования ФК разовой дозы. Каждое соединение, конъюгированное с антителом RFB4 (SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57 для последовательностей доменов VH и VL, соответственно), готовят в рабочей дозе 2 мг/мл, и каждой мыши дают 200 мг, за исключением соединения 4.2b (SEQ ID NO:12), конъюгированного с RFB4, которая составляет 170 мг. Конъюгаты RFB4 вводят внутривенно через хвостовую вену мыши. Каждый конъюгат RFB4 дозируют трем мышам. После введения дозы, у мышей берут кровь в следующие семь моментов времени: 0,5, 6, 24, 48, 72, 144 и 192 часа. Приблизительно 100 мкл цельной крови собирают в пробирки microtainer путем орбитального кровотечения. Образцы цельной крови выдерживают в течение 30 минут для отделения сыворотки. Затем образцы центрифугируют в течение 10 минут при 4 градусах при 10000 x g. Сыворотку переносят в 1,5 мл пробирку и замораживают до анализа. 96-луночные планшеты для ELISA Immulon (Thermo Fisher Scientific, кат. № 3855) покрывают в течение ночи 1 мкг/мл, 100 мкл/лунку антителом овцы против IgG человека (The Binding Site, кат. № AU003.M) в PBS для захвата антитела против IgG человека, или 2 мкг/мл, 100 мкл/лунку, NeutrAvidin Biotin Binding Protein (Thermo Fisher Scientific, кат. № 31050) в PBS для захвата анти-BrdU. Планшеты промывают Tris-буферированным солевым раствором Tween-20 (TBST, 25 мМ Tris, 0,15 М NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) и блокируют в течение 1 часа аналитическим буфером (PBS, 1% BSA, 0,05% Tween-20, 0,25% CHAPS, 5 мМ ЭДТК, 0,35 М NaCl) для захвата антител против IgG человека, и блокатором казеина (Thermo Fisher Scientific, кат. № 37528) для захвата анти-BrdU. Планшеты промывают TBST. 1 мкг/мл, 100 мкл/лунку биотинилированного моноклонального антитела мыши против BrdU (BioLegend, кат. № 317904) в аналитическом буфере (PBS, 1% BSA, 0,05% Tween-20, 0,25% CHAPS, 5 мМ ЭДТК, 0,35 М NaCl) + 20% блокатора казеина добавляют в планшеты и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре при осторожном встряхивании при 420 об/мин на шейкере для планшетов. Планшеты промывают TBST. Образцы сыворотки разводят как минимум 1:50 в буфере для анализа+20% блокатора казеина (Thermo Scientific, кат. № 37528) или

RFB4 белке стандартной кривой с и без присоединенными различными CpG (двукратные серийные разведения от 100 до 0,2 нг/мл, в 1:50 нормальной сыворотке мыши, разведенной в аналитическом буфере+20% блокаторе казеина), добавляют в блокированные планшеты на 1 час при комнатной температуре при осторожном встряхивании при 420 об/мин на шейкере для планшетов. Планшеты промывают TBST. Стандартные кривые и образцы инкубируют с 0,2 мкг/мл антитела козы против IgG человека-HRP (Bethyl, кат. № A80-319P) для захвата антитела против IgG человека или 0,4 мкг/мл антитела козы против IgG человека-HRP для анти-BrdUв течение 1 часа при комнатной температуре при осторожном встряхивании при 420 об/мин на шейкере для планшетов. Планшеты промывают TBST. Все планшеты инкубируют с раствором 1-Step Ultra TMB ELISA (Thermo Fisher Scientific, кат. № 34028), и реакцию останавливают 0,16 М раствором серной кислоты (Thermo Fisher Scientific, кат. № N600). Планшеты считывают при OD 450 нм с фоновым эталонным значением при 570 нм на планшетном ридере SpectraMax i3 (Molecular Devices). Концентрации белка в образцах сыворотки интерполируют из стандартных кривых антитела RFB4 с и без различных присоединенных CpG с использованием 4-параметрической аппроксимирующей кривой и программного обеспечения Prism (GraphPad).

[00501] Как показано на **ФИГ. 17A,** RFB4, конъюгированный с соединением 1.1b (SEQ ID NO:3), соединением 3.2b (SEQ ID NO:9), соединением 4.2b (SEQ ID NO:12), соединением 4.3b (SEQ ID NO:13), соединением 5.2a (SEQ ID NO:15) или соединением 5.7a (SEQ ID NO:20) имеет сходный период полужизни по сравнению с «голым» RFB4 при измерении общего количества антител. Это показывает, что конъюгация RFB4 с соответствующими олигонуклеотидами CpG не влияет на ФК антитела. На **ФИГ. 17B** показана ФК конъюгатов RFB4 путем захвата соединений с анти-BrdU антителом. Неожиданно, когда время полужизни конъюгатов RFB4 оценивают путем захвата 5' области CpG с использованием анти-BrdU антитела, соединение 3.2b (SEQ ID NO: 9), соединение 4.2b (SEQ ID NO: 12), соединение 4.3b (SEQ ID NO:13, соединение 5.2a (SEQ ID NO:15) и соединение 5.7a (SEQ ID NO:20) имеют увеличенный период полужизни по сравнению с соединением 1.1b (SEQ ID NO:3).

Пример 8: Активация B-клеток в PBMC яванского макака с помощью олигонуклеотидов CpG

[00502] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяют из цельной крови яванского макака путем разделения Фиколла (GE). 300000 клеток PBMC высевают в 96-луночные планшеты с круглым дном в RPMI 10% FBS (Life Technologies). Клетки обрабатывают 12070 (соединение 1.1b, SEQ ID NO:3), CpG 7-7 (соединение 7.7b, SEQ ID NO:35) или только средой при начальной концентрации 1 мкМ с последующим титрованием 1:5. Клетки инкубируют в течение 72 часов перед окрашиванием для проточной цитометрии. Клетки центрифугируют при 400G в течение 5 мин перед удалением среды. Затем клетки инкубируют с фиксируемым живым мертвым красителем eFluor780 (eBioscience) в течение 30 мин при 4°C. Буфер FACS (PBS+2% FBS) добавляют

в лунки перед центрифугированием при 400G в течение 5 минут. Затем клетки инкубируют в реагенте, блокирующем FcR человека (Miltenyi Biotec), и окрашивают меченными флуорохромом антителами против CD3 (клон SP34, Biolegend), CD14 (клон M5E2, Biolegend), CD16 (клон 3G8, Biolegend), HLADR (клон G46- 6, Biolegend), CD1c (клон L161, Biolegend), CD20 (клон 2H7, Biolegend), CD69 (клон FN50, eBiolegend), CD8 (клон RPAT8, Biolegend), CD40 (клон 5C3, Biolegend) и CD86 (клон IT2.2 Biolegend) в течение 1 часа при 4C. Затем клетки дважды промывают буфером FACS перед фиксацией в 0,5% параформальдегиде. Клетки собирают на проточном цитометре Attune (Thermofisher) с последующим анализом с использованием программного обеспечения FlowJo и сводят в таблицу с помощью программного обеспечения Prism.

[00503] PBMC яванского макака стимулируют в течение 72 часов в присутствии 7-7 CpG, 12070 CpG или только среды при начальной концентрации 1 мкМ с последующим титрованием 1:5. Затем клетки окрашивают и анализируют с помощью проточной цитометрии. После исключения синглетных и мертвых клеток, CD20+ B-клетки гейтируют с последующей средней интенсивностью флуоресценции маркера CD86. Обработка 7-7 индуцирует превосходную активацию CD86 (**ФИГ. 18)**, демонстрируя усиленную активацию B-клеток по сравнению с 12070.

Пример 9: Индукция экспрессии IL-6 с использованием конъюгатов олигонуклеотидов анти-CD22:CpG

[00504] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяют из остатков Trima (Vitalant) и разводят 1:4 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на пробирки и заливают 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела фаз и ресуспендируют в Complete RPMI (RPMI+10% FBS). Один миллион PBMC помещают в 96-луночные планшеты с круглыми лунками в Complete RPMI и обрабатывают не конъюгированным анти-CD22 антителом или анти-CD22, конъюгированным с 12070 CpG (соединение 1.1b, SEQ ID NO:3), начиная с концентрации 100 нМ, с последующим понижающим титрованием 1:5. Клетки инкубируют в течение 48 часов с последующим вращением при 400 x g в течение 5 минут, после чего собирают супернатанты. IL6 в собранном супернатанте оценивают в чистом виде с использованием набора для иммуноанализа на основе микроносителей (LegendPlex, Biolegend) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы собирают на проточном цитометре Attune (Thermofisher) с последующим анализом с использованием программного обеспечения FlowJo и сводят в таблицу с помощью программного обеспечения Prism.

[00505] PBMC человека стимулируют в течение 48 часов в присутствии не конъюгированного анти-CD22-антитела или анти-CD22-антитела, конъюгированного с 12070 CpG, после чего собирают супернатанты и определяют IL6 с помощью иммуноанализа на основе микроносителей. Анти-CD22, конъюгированное с 12070 CpG, индуцирует устойчивую экспрессию IL6 по сравнению с таковой после обработки не

конъюгированным анти-CD22 антителом (**ФИГ. 19**), что свидетельствует о том, что анти-CD22, конъюгированное с 12070, может устойчиво индуцировать экспрессию IL6 из клеток-мишеней.

Пример 10: Активация Т- и В-клеток, не являющихся мишенями, с использованием конъюгатов олигонуклеотидов анти-SIRP-α:CpG

[00506] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяют из остатков Trima (Vitalant) и разводят 1:4 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на пробирки и заливают 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела фаз и ресуспендируют в Complete RPMI (RPMI+10% FBS). Один миллион PBMC помещают в 96-луночные планшеты с круглыми лунками в Complete RPMI и обрабатывают анти-SIRP-α антителом или анти-SIRP-α антителом, конъюгированным с 12070 CpG (соединение 1.1b, SEQ ID NO:3), начиная с концентрации 100 нМ, с последующим понижающим титрованием 1:5. Последовательности доменов VH и VL анти-SIRP-α антитела представлены ниже.

VH домен анти-SIRP-α:

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNAMSWVRQAPGKGLEWVAGISA GGSDTYYPASVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETWNHLFDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO:122)

VL домен анти-SIRP-α:

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSYSSYYYAWYQQKPGQAPVTLIYSDDKRPS NIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGGYDQSSYTNPFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:123)

[00507] Затем клетки инкубируют в течение 48 часов перед окрашиванием потоком. Клетки центрифугируют при 400 x g в течение 5 мин перед удалением среды. Затем клетки инкубируют с фиксируемым живым мертвым красителем eFluor780 (eBioscience) в течение 30 мин при 4°C. Буфер FACS (PBS+2% FBS) добавляют в лунки перед центрифугированием при 400 x g в течение 5 минут. Затем клетки инкубируют в реагенте, блокирующем FcR человека (Miltenyi Biotec), и окрашивают меченными флуорохромом антителами против CD3, CD14, CD16, HLADR, CD11c, CD69, CD40 и CD86 в течение 1 часа при 4°C. Затем клетки дважды промывают буфером FACS перед фиксацией в 0,5% параформальдегиде. Клетки собирают на проточном цитометре Attune (Thermofisher) с последующим анализом с использованием программного обеспечения FlowJo и сводят в таблицу с помощью программного обеспечения Prism.

[00508] PBMC человека стимулируют в течение 48 часов в присутствии не конъюгированного анти-SIRP-α или анти-SIRP-α, конъюгированного с 12070, начиная с концентрации 100 нМ с последующим понижающим титрованием 1:5. Затем клетки окрашивают и анализируют с помощью проточной цитометрии. После исключения синглетных и мертвых клеток, CD20+ В-клетки (**ФИГ. 20B**) или CD3+ Т-клетки (**ФИГ. 20A**) гейтируют с последующей средней интенсивностью флуоресценции CD69, маркера

активации. Анти-SIRP-α, конъюгированное с 12070 CpG, индуцирует сильную активацию клеток, не являющихся мишенями, таких как Т-клетки и В-клетки, по сравнению с активацией после обработки не конъюгированным анти-SIRP-α, как видно из положительной регуляции CD69 (**ФИГ. 20А и 20В**).

Пример 11. Лечение конъюгатами антитело:олигонуклеотид CpG вызывает сильный ответ иммунной памяти на опухоли

[00509] Клетки MC38 инъецируют в правый бок самкам мышей C57BL/6 в концентрации $2x10^6$ клеток на мышь в среде DMEM. Опухоли наблюдают до тех пор, пока средний размер опухолей не достигнет 150-155 $мм^3$. Мышей рандомизируют в группу контроля PBS, анти-SIRP-α-4523 CpG или анти-mCD22-4523 CpG по 5 мышей на когорту. Последовательность олигонуклеотида CpG мыши 4523 представляет собой tucgtcgtgacgtt-c3, где нижний регистр указывает на фосфотиоатные связи, жирный шрифт указывает на йодо-уридин, и подчеркивание указывает на фосфотриэфирный линкер (SEQ ID NO:121). Последовательности VH и VL доменов анти-mCD22 антитела представлены ниже.

VH домен анти-mCD22:

QVQLQQPGAEIVRPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMNWVKQRPGQGLEWFGAIDP SDSYTRYNQEFKGKATLTVDTSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSDYTYSFYFDYWGL GTTLTVSS (SEQ ID NO:124)

VL домен анти-mCD22:

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQM SNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:125)

[00510] Анти-SIRP-α-4523 и анти-mCD22-4523 вводят в общей дозе 10 мг/кг два раза с интервалом в три дня. Оба лекарственных средства вводят внутрибрюшинно. На 88 день мышам с искорененными опухолями повторно вводят MC38 (левый бок) в количестве $2x10^6$ клеток на мышь в среде DMEM. Наивных мышей, которым не имплантированы MC38 мыши, включают в качестве контроля роста опухоли. Опухоли измеряют штангенциркулем в двух измерениях, и объем опухоли рассчитывают как: длина x ширина x ширина x 0,5, где длина является большей из двух измерений.

[00511] На 88 день имеется 5 мышей с искорененными опухолями в каждой из групп, получавших либо 10 мг/кг анти-SIRP-α 4523 CpG, либо анти-mCD22-4523 CpG. После повторного заражения, мыши с ранее искорененными опухолями демонстрируют эффективное отторжение опухоли уже через три дня после повторной имплантации опухоли, что позволяет предположить, что лечение как анти-SIRP-α, так и анти-mCD22, конъюгированными с 4523 CpG, вызывает сильный ответ иммунной памяти против имплантированной опухоли, не наблюдаемый у мышей, не подвергавшихся лечению, у которых опухоль MC38 встречается впервые (**ФИГ. 21А-21С**).

Пример 12: Лечение конъюгатами олигонуклеотидов анти-Her2:CpG приводит к длительной эрадикации опухоли

[00512] Эпитоп трастузумаба интегрируют в ген Her2 мыши для получения Her2

мыши/человека (m/h). Клетки MC38, экспрессирующие Her2 m/h, получают с помощью лентивирусной трансдукции и сортируют для получения клеток, экспрессирующих Her2 m/h. Клетки Her2-MC38 m/h инъецируют в правый бок самок мышей C57BL/6 в концентрации $2x10^6$ клеток на мышь в среде DMEM. Опухоли контролируют до тех пор, пока средний размер опухолей не достигнет 70 $мм^3$. Мышей рандомизируют на контрольную группу PBS, группу лечения TNT149a (анти-Her2 mIgG2a) и TNT150a (анти-Her2 mIgG1) по 5 мышей в когорте. Мышам, получавшим нуклеотидный конъюгат анти-Her2-CpG, вводят дозы 1, 3 и 10 мг/кг всего три раза с интервалом в три дня. Оба препарата вводят внутрибрюшинно. Последовательности тяжелой и легкой цепей анти-Her2 антител представлены ниже.

Тяжелая цепь анти-Her2 mIgG2a:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW GQGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTA QTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAP QVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSY FMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGLLQGG (SEQ ID NO:126)

Тяжелая цепь анти-Her2 mIgG1:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYW GQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCIC TVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPR EEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPP PKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFIYSKLN VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGLLQGG (SEQ ID NO:127)

Легкая цепь анти-Her2:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRADAAPTVS IFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSM SSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:128)

[00513]

[00514] Мышей с опухолью Her2 MC38 m/h измеряют и рандомизируют по объему опухоли. На 4 день, каждая группа из 5 мышей имеет средний размер опухоли 70 $мм^3$. Мышей лечат PBS или 1, 3 и 10 мг/кг TNT149a или TNT150a. К 60 дню, у мышей, которым вводят 1, 3 и 10 мг/кг TNT149a три раза с интервалом в три дня, наблюдают искоренение опухоли (у мышей 1/5, 5/5 и 5/5, соответственно; **ФИГ. 22A и 22C)**, в то

время как мыши, получающие лечение 1, 3 и 10 мг/кг TNT150a, демонстрируют меньшее количество мышей с искорененными опухолями (0/5, 3/5 и 5/5, соответственно; **ФИГ. 22B и 22D)**. Мыши, получающие контроль PBS, достигли конечной точки к 24 дню, и все группы, получающие TNT149a или TNT150a, демонстрируют задержку роста опухоли по сравнению с контролем PBS. Эти данные демонстрируют стойкость при эрадикации опухоли как с анти-Her2-CpG mIgG1, так и с mIgG2a, и превосходную активность у мышей, обработанных нуклеотидным конъюгатом анти-Her2-CpG, содержащим эффекторную функцию Fc.

[00515] На 81 день, имеется 5 мышей с искорененными опухолями для групп, получавших 10 мг/кг TNT150a, 3 и 10 мг/кг TNT149a, и 3 мыши с искорененными опухолями для групп, получавших 3 мг/кг TNT150a. На 81 день, мышам с искорененными опухолями повторно вводят Her2 MC38 m/h (нижний правый бок), родительский MC38 (нижний левый бок), Her2 B16F10 m/h (верхний правый бок) и родительский B16F10 (верхний левый бок) на 2 x 10^6 клеток (клеток Her2 MC38 m/h и MC38) и 1 x 10^6 клеток (клеток Her2 B16F10 m/h и B16F10) на мышь в DMEM (**ФИГ. 23A)**. Включают наивных мышей, которым не были имплантированы Her2 MC38 m/h мыши. Опухоли измеряют штангенциркулем в двух измерениях, и объем опухоли рассчитывают как: длина x ширина x ширина x 0,5, где длина является большей из двух измерений.

[00516] Как показано на **ФИГ. 23B-23I,** наивные мыши демонстрируют рост всех имплантированных клеток. Her2 B16F10 m/h, MC38 и Her2 MC38 m/h демонстрируют искоренение опухолей или значительную задержку роста опухоли по сравнению с наивными. Во всех лечебных группах, исходные опухоли B16F10 растут, за исключением одного случая, когда у одной из мышей из группы, получавшей 10 мг/кг Her2 mIgG2a, рост не наблюдается. К 99 дню у всех мышей наблюдается полное искоренение клеток Her2 MC38 m/h. Как исходные клетки MC38, так и клетки Her2 B16F10 m/h демонстрируют искоренение опухоли, за исключением одной мыши для 3 и 10 мг/кг мышей, ранее получавших TNT149a для исходных клеток MC38, и 1-3 мышей для всех групп, ранее леченных 3 и 10 мг/кг. Эти данные показывают, что мыши с опухолями Her2 MC38 m/h с искорененными опухолями после лечения анти-Her2 mIgG1 и mIgG2a обладают мощным и стойким противоопухолевым ответом на опухоли Her2 MC38 m/h, родительские MC38 и B16F10 m/h, но не на родительские B16F10. Эти результаты демонстрируют распространение эпитопа для искоренения родительских клеток MC38 и клеток B16F10, экспрессирующих Her2, с несколько большей надежностью, наблюдаемой при более высоких дозах.

Пример 13. Лечение конъюгатами олигонуклеотидов анти-mCD22:CpG приводит к усилению сигнатур экспрессии генов, связанных с передачей сигналов интерферона, презентированием антигена и цитотоксичностью

[00517] Клетки CT26 инъецируют в правый бок самкам мышей BALB/C в концентрации 2x10^6 клеток на мышь в RPMI. Опухоли наблюдают до тех пор, пока средний размер опухолей не достигнет 270-295 $мм^3$. Мышей рандомизируют на

контрольную группу PBS, анти-mCD22 и анти-mCD22-CpG по 4 мыши на когорту. Анти-mCD22 и анти-mCD22_CpG вводят внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг. Опухоли собирают через 8 часов после лечения и обрабатывают для получения РНК. Все образцы обрабатывают и количественно определяют с использованием панели Mouse PanCaner IO 360 (NanoString Technologies) в соответствии с протоколом производителя Canopy Biosciences (St. Louis, MO). Нормализованные данные экспрессии анализируют с помощью программного обеспечения для расширенного анализа nSolver и nCounter и представлены в виде оценок сигнатур. CpG, конъюгированный с анти-mCD22, представляет собой олигонуклеотид CpG мыши 4523 с последовательностью **tu**cgtcgtgacgtt-c3, где нижний регистр указывает на фосфотиоатные связи, жирный шрифт указывает на йодо-уридин, и подчеркивание указывает на фосфотриэфирный линкер (SEQ ID NO:121).

[00518] Нормализованные данные экспрессии опухолей анализируют с помощью программного обеспечения для расширенного анализа nSolver и nCounter для получения сигнатур экспрессии генов, как определено NanoString. У мышей с CT26, леченных анти-mCD22 CpG, наблюдают более высокую оценку сигнатуры для передачи сигнала интерферона (**ФИГ. 24A**), презентирования антигена (**ФИГ. 24B**) и цитотоксичности (**ФИГ. 24C**) в опухоли по сравнению с контролем PBS и только анти-mCD22.

Пример 14. Совместное культивирование макрофагов мыши, происходящих из костного мозга, и Her2-положительных опухолевых клеток в присутствии конъюгатов анти-Her2:CpG с активными или не активными Fc областями

[00519] Клетки-мишени, меченные CSFE, в опухолях $Her2^{pos}$ (MC38) или $Her2^{neg}$ (C1498) совместно культивируют с макрофагами мышиного происхождения в соотношении 1:2 (мишень:эффектор) в присутствии не конъюгированного Her2, TNT149a, TNT150a или 4523 CpG, начиная с 100 нМ, разведенных 1:2 (6 точек). Клетки инкубируют в течение 24 часов, центрифугируют при 400 x g для удаления супернатанта. Затем клетки промывают PBS и переносят PBS с клетками на новый планшет. Оставшиеся клетки в исходном планшете инкубируют с TrypLE в течение 10 минут, затем клетки соскребают и переносят в тот же планшет с PBS и клетками. Затем собранные клетки центрифугируют и окрашивают фиксируемым живым мертвым красителем, и затем меченными флуорохромом антителами к MHCII и CD11b мыши. Образцы собирают на проточном цитометре Attune (Thermofisher) с последующим анализом с использованием программного обеспечения FlowJo и сводят в таблицу с помощью программного обеспечения Prism.

[00520] Макрофаги мыши, полученные из костного мозга, совместно культивируют в присутствии опухолей $Her2^{pos}$ (MC38) или $Her2^{neg}$ (C1498) и обрабатывают анти-Her2, TNT149a, TNT150a или 4523 CpG в течение 24 часов. Медиану MHCII оценивают с помощью проточной цитометрии. Активацию маркера активации MHCII наблюдают на макрофагах мыши при совместном культивировании с опухолями $Her2^{pos}$ в присутствии активного конъюгата Her2-CpG (TNT149a), но не с опухолями $Her2^{neg}$, что позволяет

предположить, что присутствие Her2 необходимо для активации макрофагов, о чем свидетельствует индукция MHCII (**ФИГ. 25**). Дополнительно, активный Fc (TNT149a), по-видимому, необходим для активации макрофагов мыши in vitro, о чем свидетельствует отсутствие индукции MHCII менее активным Fc (TNT150a).

Пример 15: Индукция активации B-клеток в PBMC человека с помощью конъюгатов анти-CD22:CpG олигонуклеотида

[00521] Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяют из остатков Trima (Vitalant) и разводят 1:4 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на пробирки и заливали 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела фаз и ресуспендируют в Complete RPMI (RPMI+10% FBS). Один миллион PBMC высевают в 96-луночные планшеты с круглыми лунками в Complete RPMI и обрабатывают анти-CD22 антителом с RH2 VH домена и RL1 N92S VL домена (SEQ ID No: 65 и 87, соответственно), конъюгированными с 7-7 CpG, TNT52 (RFB4 анти-CD22, конъюгированными с 12070), 7-7, 12070 или средой, начиная только с концентрации 100 нМ для конъюгированных антител или 1 мкМ для свободного CpG с последующим понижающим титрованием 1:5. Затем клетки инкубируют в течение 48 часов перед окрашиванием потока. Клетки центрифугируют при 400 x g в течение 5 мин перед удалением среды. Затем клетки инкубируют с фиксируемым живым мертвым красителем eFluor780 (eBioscience) в течение 30 мин при 4°C. Буфер FACS (PBS+2% FBS) добавляют в лунки перед центрифугированием при 400 x g в течение 5 минут. Затем клетки инкубируют в реагенте, блокирующем FcR человека (Miltenyi Biotec), и окрашивают меченными флуорохромом антителами против CD19, CD40, CD80 и CD86 в течение 1 часа при 4°C. Затем клетки дважды промывают буфером FACS перед фиксацией в 0,5% параформальдегиде. Клетки собирают на цитометре Attune NxT(Thermofisher) с последующим анализом с использованием программного обеспечения FlowJo и сводят в таблицу с помощью программного обеспечения Prism.

[00522] PBMC человека стимулируют в течение 48 часов в присутствии анти-CD22 антитела с RH2 VH домена и RL1 N92S VL домена (SEQ ID No: 65 и 87, соответственно), конъюгированными с соединением 7.7b (7-7) CpG, TNT52a (RFB4, конъюгированным с 12070), соединением 7.7b (7-7) CpG, 12070 CpG или только средой. Затем клетки окрашивают и анализируют с помощью проточной цитометрии. После исключения синглетных и мертвых клеток, CD20+ B-клетки гейтируют, после чего определяют среднюю интенсивность флуоресценции маркеров активации CD40 (**ФИГ. 26A**), CD80 (**ФИГ. 26B**) и CD86 (**ФИГ. 26C**). Анти-CD22 антитело с RH2 VH доменом и RL1 N92S VL доменом, конъюгированное с соединением 7.7b (7-7 CpG), демонстрирует более высокую индукцию всех маркеров активации на гейтированных B-клетках, которая превосходит RFB4, конъюгированное с 12070. Кроме того, свободное 7.7b CpG индуцирует превосходную активацию всех исследованных маркеров по сравнению с 12070 CpG.

Пример 16: Оценка активности свободного CpG в отношении экспрессии

CD40 CD19+ B-клетками

Материалы и методы

[00523] Остатки Trima были получают от Vitalant и разводят 1:2 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на две пробирки и разводят 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела фаз, ресуспендируют и промывают буфером FACS (PBS с 0,5% альбумина бычьей сыворотки (Gibco)). После одной промывки, PBMC ресуспендируют в Complete RPMI (RPMI+10% FBS).

[00524] PBMC немедленно высевают на 96-луночный формат (500 тыс./лунку) в Complete RPMI. К клеткам добавляют пятикратные серийные разведения от 1 мкМ до 64 пМ полинуклеотидов CpG при 37°C в атмосфере 5% CO2 в течение 48 часов. Клетки осаждают центрифугированием в течение пяти минут при 400 x g и окрашивают при 4°C красителем Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенным 1:4000 в PBS. Клетки центрифугируют и окрашивают при 4°C в буфере FACS в течение 30 минут, содержащем блокирующий реагент FcR (Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD20, анти-CD40, анти-HLADR и анти-CD80. Клетки центрифугируют и дважды промывают буфером FACS и фиксируют в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализируют на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher) с последующим анализом данных на Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключают путем гейтирования 780-отрицательной популяции eFluor. B-клетки идентифицируют как $CD19^{+}CD20^{+}$ клетки, и уровень маркера активации оценивают по средней интенсивности флуоресценции.

[00525] Для анализа репортера Ramos NFkb, репортерные B-лимфоциты Ramos-Blue Cells NF-kB/AP-1 приобретают у Invivogen. Клетки выращивают и поддерживают в полной среде DMEM с добавлением 2 мМ L-глутамина, 10% FBS, 100 мкг/мл нормицина, Pen-Strep, 100 мкг/мл зеоцина. Проводят стимуляцию клеток Ramos-Blue. Коротко, клетки промывают питательной средой без антибиотиков. Клетки подсчитывают и ресуспендируют в свежей полной DMEM без селективных антибиотиков при плотности $2x10^{6}$ клеток/мл. 20 мкл 10 мкМ CpG 7-7, CpG 12070 и ODN2006, титрованных 1:5, добавляют в 96-луночный планшет с плоским дном, 180 мкл клеточной суспензии добавляют до конечной концентрации от 1 мкМ до 64 пМ CpG. Планшет инкубируют при 37°C в инкубаторе с 5% CO2 в течение 24 часов. В день анализа, реагент QB и буфер QB размораживают перед применением. Раствор Quanti-Blue готовят путем добавления 1 мл реагента QB и 1 мл 1 мл буфера QB к 98 мл стерильной воды в стерильной стеклянной бутылке. 180 мкл раствора Quanti-Blue наносят на лунку в новый 96-луночный планшет с плоским дном. Затем в 96-луночный планшет добавляют 20 мкл супернатанта обработанных клеток Ramos-Blue. Планшет инкубируют в течение 6 часов. Оптическую плотность измеряют при OD655 с использованием планшетного ридера (Molecular Devices) и данные сводят в таблицу в GraphPad Prism 9.0.

Результаты

[00526] PBMC человека обрабатывают свободными CpG для оценки их

соответствующей активности, наблюдаемой по экспрессии CD40 на CD19-положительных B-клетках. Как показано на **ФИГ. 27,** CpG серии 7 (SEQ ID NO: 29, 30 и 32-36) демонстрируют повышенную активность по сравнению с CpG 12070 (SEQ ID NO: 3).

[00527] CpG-олигонуклеотиды 7-7, 12070 и ODN2006 (5'-tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt-3'; SEQ ID NO:167) сравнивают в репортерном анализе NFkb. Как показано на **ФИГ. 28,** CpG 7-7 демонстрирует значительно более высокую активность по сравнению с 12070 и ODN2006.

Пример 17: Оценка активности CpG на PBMC от разных доноров

[00528] Активность олигонуклеотидов CpG 7-6, 7-7 и 12070 сравнивают с активностью в клетках PBMC из трех разных донорных линий (D559, D804 и D643) по данным экспрессии CD40. Оценку активности олигонуклеотидов CpG проводят с использованием тех же способов, что и в примере 16 выше.

[00529] Результаты демонстрируют, что более высокая активность 7-6 и 7-7 по сравнению с 12070 не зависит от донора (**ФИГ. 29A-29C**).

Пример 18. Вклад 5'-бром-2'-дезоксиуридина и связи ПЭГ в активность CpG

[00530] Для оценки олигонуклеотидов CpG в PBMC человека, остатки Trima получают от Vitalant и разводят 1:4 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на две пробирки и разводят 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела фаз и ресуспендируют в буфере FACS (PBS с 0,5% альбумина бычьей сыворотки (Gibco)). PBMC немедленно высевают на 96-луночный формат (500 тыс./лунку) в Complete RPMI (RPMI+10% FBS). К клеткам добавляют пятикратные серийные разведения от 1 мкМ до 64 пМ полинуклеотидов CpG при 37°C в атмосфере 5% CO2 в течение от 48 до 96 часов. Клетки осаждают центрифугированием в течение пяти минут при 400 x g и окрашивают при 4°C в красителе Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенном 1:4000 в PBS. Клетки центрифугируют и окрашивают при 4°C в буфере FACS в течение 30 минут, содержащем FcR. Блокирующий реагент (Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD40 и анти-CD86. Клетки центрифугируют и дважды промывают в буфере FACS и фиксируют в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализируют на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher) с последующим анализом данных на Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключают путем гейтирования 780-отрицательной популяции eFluor. Гейтирование клеток $CD19^+$, $CD20^+$ или $CD19^+CD20^+$ для идентификации B-клеток. Данные сводят в таблицу с использованием GraphPad Prism 9.0.

[00531] Как показано на **ФИГ. 30,** олигонуклеотиды CpG 9-9 и 9-10 без модификации брома в 5' уридине активируют экспрессию CD86. Это означает, что модификация брома не является существенным компонентом соответствующих олигонуклеотидов.

Пример 19: Биологическая оценка CpG-нуклеотидов и конъюгатов антитело-CpG-нуклеотид

[00532] Остатки Trima получают от Vitalant и разводят 1:2 фосфатно-солевым

буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на две пробирки и разводят 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела, ресуспендируют и промывают буфером FACS (PBS с 0,5% альбумина бычьей сыворотки (Gibco)). После одной промывки, PBMC ресуспендируют в Complete RPMI (RPMI+10% FBS). PBMC немедленно высевают на 96-луночный формат (500 тыс./лунку) в Complete RPMI. К клеткам добавляют пятикратные серийные разведения от 100 нМ до 6,4 пМ конъюгированного антитела при 37°C в атмосфере 5% CO2 в течение 48 часов. Клетки осаждают центрифугированием в течение пяти минут при 400 x g и окрашивают при 4°C красителем Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенным 1:4000 в PBS. Клетки центрифугируют и окрашивают при 4°C в буфере FACS в течение 30 минут, содержащем блокирующий реагент FcR (Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD20, анти-CD40, анти-HLADR и анти-CD80. Клетки центрифугируют и дважды промывают буфером FACS и фиксируют в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализируют на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher) с последующим анализом данных на Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключают путем гейтирования 780-отрицательной популяции eFluor. B-клетки идентифицируют как $CD19^{+}CD20^{+}$ клетки, и уровень маркера активации оценивают по средней интенсивности флуоресценции.

TNT127=RL1_hКаппа N92A+RH2_hIgG1_AAA+S-метка (SEQ ID No: 73 и 65, соответственно)

TNT130a=TNT127 с мутацией N92A, конъюгированной с CpG 12070 (DAR1)

TNT133a=TNT127 с мутацией N92A, конъюгированной с CpG 7-6 (DAR1)

TNT134a=TNT127 с мутацией N92A, конъюгированной с CpG 7-7 (DAR1)

[00533] Активность антитела TNT127 сравнивают при конъюгации с CpG 7-6, 7-7 и 12070. Как показано на **ФИГ. 31,** конъюгаты антител с CpG 7-6 (SEQ ID NO:34) и 7-7 (SEQ ID NO:35) демонстрируют существенно лучшую активность по сравнению с конъюгатом 12070 (SEQ ID NO:3), что наблюдается по экспрессии CD40.

Пример 20: Сравнение конъюгатов анти-CD22 антитело:олигонуклеотид CpG

[00534] Активность конъюгатов CD22 антитело-CpG DAR1 и DAR2 сравнивают по активности. Во всех протестированных случаях, при более низких диапазонах концентрации конъюгата, конъюгаты DAR2 демонстрируют более высокую активность по сравнению с конъюгатами DAR1 (**ФИГ. 32A-32C**). Однако конъюгаты DAR1 с CpG 7-6 и 7-7 демонстрируют более высокую активность, которая была более сопоставима с DAR2. Способы такие же, как описано в примере 19.

TNT135b=TNT127 с мутацией N92A, конъюгированной с CpG 12070 (DAR2)

TNT136b=TNT127 с мутацией N92A, конъюгированной с CpG 7-6 (DAR2)

TNT137b=TNT127 с мутацией N92A, конъюгированной с CpG 7-7 (DAR2)

TNT130a=TNT127 с мутацией N92A, конъюгированной с CpG 12070 (DAR1)

TNT133a=TNT127 с мутацией N92A, конъюгированной с CpG 7-6 (DAR1)

TNT134a=TNT127 с мутацией N92A, конъюгированной с CpG 7-7 (DAR1)

Пример 21. Конъюгат анти-CD22 антитело:олигонуклеотид CpG опосредует уничтожение опухоли в отсутствие активного Fc домена.

[00535] Опосредованный иммунными клетками противоопухолевый ответ тестируют в сингенной модели, несущей опухоль, с использованием анти-CD22 CpG-олигонуклеотида, содержащего не активный Fc, с использованием IgG1 N297A Fc мыши. Клетки карциномы толстой кишки мыши CT26 (ATCC) культивируют в среде Complete RPMI 1640 (RPMI1640+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO2. Как только клетки достигают 80% конфлюэнтности, клетки отделяют 0,25% трипсином (Gibco) и дважды промывают RPMI 1640 (Gibco). Клетки ресуспендируют при 20E6/мл в RPMI 1640 и хранят на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток имплантируют подкожно в правый бок 6-недельных самок мышей BALB/c (Charles River). Размер опухоли измеряют и регистрируют два раза в неделю с помощью штангенциркуля, начиная с 7 дней после имплантации и в течение всего исследования, примерно через 27 дней. Объем опухоли оценивают по следующей формуле: (длина x ширина x ширина)/2. Как только опухоль достигает 120 или 250 мм^3, примерно через 7 дней после имплантации, мышей рандомизируют по размеру опухоли и начинают лечение. Конъюгаты вводят внутривенно от 1 до 3 доз каждые 3 дня по 10 мг/кг. Мышей, у которых опухоли превышают 2000 мм^3 или у которых проявляются какие-либо признаки дистресса в любой момент исследования, умерщвляют гуманным способом в соответствии с одобренными IACUC протоколами для животных.

[00536] Как показано на **ФИГ. 33,** противоопухолевую активность наблюдают при всех схемах дозирования, где наиболее эффективная противоопухолевая активность наблюдается при внутривенном введении конъюгатов анти-CD22-4523 (не активный Fc) от 1 до 3 доз каждые 3 дня в дозе 10 мг/кг.

Пример 22: Активация TLR9 конъюгатами анти-CD22 антитело:олигонуклеотид CpG

[00537] Для биологической оценки CpG-олигонуклеотидов и конъюгатов антитело-CpG олигонуклеотид, остатки Trima получают от Vitalant и разводят 1:2 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на две пробирки и разводят 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела, ресуспендируют и промывают буфером FACS (PBS с 0,5% альбумина бычьей сыворотки (Gibco)). После одной промывки, PBMC ресуспендируют в Complete RPMI (RPMI+10% FBS). PBMC немедленно высевают на 96-луночный формат (500 тыс./лунку) в Complete RPMI. К клеткам добавляют пятикратные серийные разведения от 1 мкМ до 64 пМ полинуклеотидов CpG или от 100 нМ до 6,4 пМ конъюгированного антитела при 37°C в атмосфере 5% CO2 в течение 18 часов. Клетки осаждают центрифугированием в течение пяти минут при 400 x g и окрашивают при 4°C красителем Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенным 1:4000 в PBS. Клетки центрифугируют и окрашивают при 4°C в буфере FACS в течение 30 минут, содержащем блокирующий реагент FcR (Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD20, анти-

CD40, анти-HLADR, анти-CD80, анти-CD86, анти- CD3, анти-CD14, анти-CD11c, анти-CD69 и анти-CD56. Клетки центрифугируют и дважды промывают буфером FACS и фиксируют в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализируют на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher) с последующим анализом данных на Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключают путем гейтирования 780-отрицательной популяции eFluor. B-клетки идентифицируют как $CD19^{+}CD20^{+}$ клетки, Т-клетки как $CD3^{+}CD56^{-}$, DC как $CD11chiHLADR^{+}$ и моноциты как $CD14^{+}$, и уровень маркера активации оценивают по средней интенсивности флуоресценции.

TNT138a=анти-CD22 антитело, имеющее RH2 VH домен и RL1 N92S VL домен (SEQ ID No: 65 и 87, соответственно), конъюгированное с соединением 7.7b (7-7) CpG (SEQ ID NO: 35)

[00538] CpG (7-7b; SEQ ID NO:35), антитело к CD22 (не конъюгированное) и конъюгат антитело к CD22-CpG (TNT138a, как описано выше) сравнивают в отношении активации TLR9 как в TLR9-положительных, так и в TLR9-отрицательных иммунных клетках, наблюдая экспрессию CD40, CD80 и CD69. Конъюгат CD22-CpG активирует TLR9-положительные/CD22-положительные B-клетки, тогда как только CpG не способен активировать эти клетки, за исключением более высоких концентраций олигонуклеотидов (**ФИГ. 34A)**. Конъюгат CD22-CpG не активирует TLR9-положительные клетки, в которых отсутствует CD22, таргетируемый конъюгатом, демонстрируя специфичность доставки функции активации CpG олиго только к клеткам с мишенью CD22 с использованием антитела RFB4 и конъюгата (**ФИГ. 34B-34D**). Неконъюгированный CD22 не демонстрирует активацию ни в каких TLR9-положительных иммунных клетках. CpG, антитело и конъюгат не активируют TLR9-отрицательные иммунные клетки, о чем свидетельствует отсутствие активации CD69 в Т-клетках.

Пример 23: Биологическая оценка конъюгатов анти-Her2 антитело: олигонуклеотид CpG

Материалы и методы

[00539] Сокультуру селезенки мыши получают с использованием спленоцитов, полученных из селезенки либо сингенной мыши Balbc (полная иммунная система), либо мыши с ослабленным иммунитетом NODSCID (без B, T, дисфункциональных DC, NK) (обе из (Charles River), каждая культивирована отдельно в присутствии линии клеток опухоли молочной железы человека SKBR3 (Her2+++) (ATCC). Сокультуры инкубируют с конъюгатами CpG или контролем. Биологическую оценку CpG-нуклеотидов и конъюгатов антитело-CpG в анализе совместного культивирования путем наблюдения за активацией моноцитов, макрофагов и дендритных клеток, проводят следующим образом.

[00540] SKBR3 не ферментативно отщепляют с помощью TryplE (Thermo Scientific) и ресуспендируют в концентрации 1E6/мл в PBS (Gibco). Добавляют 300 нМ сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE (Thermo Scientific)) на 20 минут при 37°C. Избыток красителя удаляют из клеток путем промывания с помощью Complete RPMI (RPMI1640+10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco)). Клетки SKBR3, меченные

CFSE, немедленно высевают на 96-луночный формат (100 тысяч/лунку) в Complete RPMI.

[00541] Свежие селезенки собирают у мышей и пропускают через фильтр 70 мкм (Fisher Scientific) в пробирку на 50 мл (Falcon) с использованием резинового конца 3 мл поршня (Falcon). Диссоциированную селезенку ресуспендируют в 15 мл буфера FACs (PBS+0,5% бычий сывороточный альбумин (Gibco) и центрифугируют в течение 10 минут при 400 x g. Эритроциты удаляют из спленоцитов, добавляя 1 мл буфера для лизиса ACK (Gibco) в течение 2 минут перед нейтрализацией 15 мл буфера FACs. Клетки центрифугируют в течение 10 минут при 400 x g и пропускают через новый фильтр 70 мкМ. Спленоциты ресуспендируют в Complete RPMI и немедленно высевают (1E6/лунку) при соотношение 10:1 с мечеными CFSE клетками SKBR3.

[00542] К клеткам добавляют пятикратные серийные разведения от 100 нМ до 6,4 пМ антитела и конъюгированного антитела и от 1 мкМ до 64 пМ полинуклеотидов CpG при 37°C в атмосфере 5% CO2 в течение 48 часов. Клетки осаждают центрифугированием в течение пяти минут при 400 x g и окрашивают в течение 30 минут при 4°C красителем Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенным 1:4000 в PBS. Клетки центрифугируют и окрашивают при комнатной температуре в FACS буфере в течение 5 минут блокирующим реагентом FcR(Biolegend), и затем еще 40 минут при 4°C, содержащим анти-CD45, анти-CD49b, анти-CD3, анти-B220, анти-CD11b, анти-MHCII, анти-CD86, анти-CD40, анти-GR1, анти-F480 и анти-CD11c. Клетки центрифугируют и дважды промывают буфером FACS и фиксируют в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализируют на проточном цитометре Attune NxT(Thermo Fisher) с последующим анализом данных на Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключают путем гейтирования 780-отрицательной популяции eFluor. Клетки, специфичные для линии, сначала исключают (CD3, B220, CD49b) перед гейтированием клеток CD11b+GR1midF480+ для идентификации моноцитарных макрофагов и клеток F480-CD11c+MHCII+ для идентификации DC клеток.

Анти-huHer2 антитело (SEQ ID No: 126-128) тестируют в контексте домена Fc mIgG1 или mIgG2a, либо не конъюгированного, либо конъюгированного с 4523 олигонуклеотидом CpG мыши (SEQ ID NO:121).

Результаты

[00543] Эта модель совместного культивирования предлагает оценку активности протестированных конъюгатов CpG в присутствии более широкой иммунной модельной системы. Результаты демонстрируют, что конъюгаты CpG с доменом mIgG2a Fc активируют моноциты, макрофаги и дендритные клетки в большей степени, чем конъюгаты CpG с доменом Fc mIgG1 с использованием спленоцитов мышей BALBc (**ФИГ. 35A и 35B**).

Пример 24: Оценка конъюгата CD22 Ab-CpG в модели, трудно поддающейся лечению ингибитором иммунной контрольной точки

[00544] Клетки карциномы молочной железы мыши EMT6 (ATCC) культивируют в среде Complete RPMI 1640 (RPMI1640+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO2. Клетки

открепляют 0,25% трипсином (Gibco) и дважды промывают RPMI 1640 (Gibco). Клетки ресуспендируют при 20E6/мл в RPMI 1640 и хранят на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток имплантируют подкожно в правый бок 6-недельных самок мышей BALB/c (Charles River). Размер опухоли измеряют и регистрируют дважды в неделю с помощью штангенциркуля, начиная с 3 дней после имплантации и в течение всего исследования, примерно через 35 дней. Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле: (длина x ширина x ширина)/2. Как только опухоли достигают в среднем 75 $мм^3$, примерно через 3 дня после имплантации, мышей рандомизируют по размеру опухоли и начинают лечение. В этом исследовании, мышей лечат TNT50a, антителом против CD22 мыши (SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125), конъюгированным с CpG 4523 мыши (SEQ ID NO: 121) конфигурации DAR1. Конъюгаты TNT50a вводят внутрибрюшинно по 2 дозы каждые 3, 5 или 7 дней по 10 мг/кг. Мышей, у которых опухоли превышают 2000 $мм^3$ или у которых проявляются какие-либо признаки дистресса в любое время в ходе исследования, умерщвляют гуманным образом в соответствии с одобренными IACUC протоколами для животных.

[00545] Как показано на **ФИГ. 36,** TNT50a демонстрирует противоопухолевую эффективность при всех трех схемах дозирования. Модель молочной железы EMT6 обычно не поддается лечению анти-PD1 и анти-PD-L1. Таким образом, данные показывают, что конъюгат анти-CD22 Ab-CpG превосходит другие, демонстрируя мощную активность одного агента в модели, трудно поддающейся лечению ингибитором контрольной точки.

Пример 25: Внутриопухолевое введение

[00546] Клетки карциномы молочной железы мыши EMT6 (ATCC) культивируют в среде Complete RPMI 1640 (RPMI1640+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO2. Клетки открепляют 0,25% трипсином (Gibco) и дважды промывают RPMI 1640 (Gibco). Клетки ресуспендируют при 20E6/мл в RPMI 1640 и хранят на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток имплантируют подкожно в правый бок 6-недельных самок мышей BALB/c (Charles River). Размер опухоли измеряют и регистрируют два раза в неделю с помощью штангенциркуля, начиная с 7 дней после имплантации и в течение всего исследования, примерно через 25 дней. Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле: (длина x ширина x ширина)/2. Как только опухоли достигают в среднем 180 $мм^3$, примерно через 7 дней после имплантации, мышей рандомизируют по размеру опухоли и начинают лечение. В этом исследовании, мышей лечат TNT50a, антителом против CD22 мыши (SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125), конъюгированным с CpG 4523 мыши (SEQ ID NO: 121) конфигурации DAR1. Конъюгаты TNT50a вводят внутрь опухоли по 2 дозы каждые 3 дня в концентрации 24 мкм. Мышей, у которых опухоли превышают 2000 $мм^3$ или у которых проявляются какие-либо признаки дистресса в любое время в ходе исследования, умерщвляют гуманным образом в соответствии с одобренными IACUC протоколами для животных.

[00547] Как показано на **ФИГ. 37,** конъюгат CD22 Ab-CpG демонстрируют

противоопухолевую эффективность, как и свободный CpG (CpG-4253) при внутриопухолевом введении.

Пример 26: Иммунофенотипирование

[00548] Проводят иммунофенотипирование нескольких сингенных моделей, которым вводят TNT50a. TNT50a, анти-CD22 антитело мыши (SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125), конъюгированное с CpG 4523 мыши (SEQ ID NO: 121) конфигурации DAR1. B-клеточная лимфома A20, карцинома толстой кишки CT26, клетки карциномы молочной железы мыши EMT6 (ATCC) культивируют в Complete RPMI 1640 (RPMI1640+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO2. Клетки открепляют 0,25% трипсином (Gibco) и дважды промывают RPMI 1640 (Gibco). Клетки ресуспендируют при 20E6/мл в RPMI 1640 и хранят на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток имплантируют подкожно в правый бок 6-недельных самок мышей BALB/c (Charles River). Размер опухоли измеряют штангенциркулем. Объем опухоли рассчитывают по следующей формуле: (длина x ширина x ширина)/2. Как только опухоли достигают в среднем 200-300 $мм^3$, мышей рандомизируют по размеру опухоли и начинают лечение. Конъюгаты вводят 1 или 2 дозы внутрибрюшинно каждые 3 дня по 10 мг/кг. Мышей, у которых опухоли превышают 2000 $мм^3$ или у которых проявляются какие-либо признаки дистресса в любое время в ходе исследования, умерщвляют гуманным образом в соответствии с одобренными IACUC протоколами для животных.

[00549] Селезенки и опухоли собирают либо через два, либо через три дня после последней инъекции для иммунофенотипирования. Селезенки превращают в суспензию одиночных клеток в охлажденном льдом PBS, лизируют лизирующим буфером ACK (Gibco), дважды промывают и повторно суспендируют в PBS с добавлением 2% FBS. Опухолевые суспензии одиночных клеток готовят с использованием смеси коллагеназы A (Roche), коллагеназы D (Roche) и ДНКазы (Roche) в течение 45 мин при 37°C. Подсчет клеток проводят с использованием счетчика ViCell (Beckman Coulter) для исключения селезенки и трипанового синего с помощью гемацитометра для опухоли. Аликвоты 1-2 $x10^6$ клетки используют либо для окрашивания антигеном клеточной поверхности, либо для стимуляции для оценки цитокинов. Для поверхностного окрашивания, клетки окрашивают фиксируемым красителем LIVE/DEAD (Thermo Fisher), затем Fc блоком мыши (Biolegend), и затем окрашивают антителами в соответствии с панелями антител, специфичных для клеточного типа, в течение, по меньшей мере, 30 мин при 4°C. Используют следующие антитела: IgD, CD19, CD95, CD3, CD11b, IL-10, Cd1d, CD5, CD138, CD44, CD4, CD8, CD45, CD62L, IFNg, TNFa, CD25, FOXP3, KI67, CD11c, MHCII, Ly6C, CD64. Все проточные антитела приобретены либо у Biolegend, либо у Thermofisher.

[00550] Как показано на **ФИГ. 38-40,** конъюгат CD22 Ab-CpG способствует дифференциации B-клеток, снижению Breg, увеличению эффекторной функции T-клеток и модуляции супрессивных миелоидных клеток. На **ФИГ. 38A-38D** показано усиление дифференциации B-клеток и снижение B-регуляторных клеток в селезенке после введения конъюгата CD22 Ab-CpG. На **ФИГ. 39A-39D** показано увеличение CD4 и CD8 T-

эффекторных клеток и их функции в селезенке после введения конъюгата CD22 Ab-CpG. На **ФИГ. 40A-40D** показано увеличение инфильтратов B-клеток и модулирование супрессивного микроокружения в опухоли после введения конъюгата CD22 Ab-CpG.

Пример 27: Биологическая оценка экспрессии цитокинов, происходящих из B-клеток человека

[00551] Остатки Trima были получают от Vitalant и разводят 1:2 фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco). Разведенную кровь разделяют на две пробирки и разводят 15 мл Ficoll-Paque (GE Healthcare). Пробирки центрифугируют в течение 30 минут при 400 x g. PBMC собирают с поверхности раздела, ресуспендируют и промывают буфером FACS (PBS с 0,5% альбумина бычьей сыворотки (Gibco)). После одной промывки PBMC ресуспендируют в Complete RPMI (RPMI+10% FBS). PBMC немедленно высевают на 96-луночный формат (1e6/лунку) в Complete RPMI. К клеткам добавляют пятикратные серийные разведения от 1 мкМ до 64 пМ полинуклеотидов CpG при 37°C в атмосфере 5% CO2 в течение 48 часов. Клетки осаждают центрифугированием в течение пяти минут при 400 x g и окрашивают при 4°C красителем Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher), разведенным 1:4000 в PBS. Клетки центрифугируют и окрашивают при 4°C в буфере FACS в течение 30 минут, содержащем блокирующий реагент FcR (Miltenyi Biotec), анти-CD19, анти-CD40, анти-CD86, анти-CD25. Клетки центрифугируют и дважды промывают буфером FACS. Затем клетки обрабатывают для внутриклеточного окрашивания с использованием концентрата фиксации/пермеабилизации фактора транскрипции и разбавителя (eBioscience).

[00552] Коротко, клетки инкубируют в свежем буфере для фиксации путем смешивания 1 части концентрата для фиксации/пермеабилизации с 3 частями разбавителя для фиксации и пермеабилизации. Образцы инкубируют в течение 30-60 мин при 4°C в защищенном от света месте. Затем образцы центрифугируют при 600g в течение 5 минут при комнатной температуре. Ресуспендированный пеллет с 1x пермеабилизирующим буфером с последующими двумя циклами промывок и центрифугированием при 600g в течение 5 минут при комнатной температуре. Пеллеты ресуспендируют в 100 мкл пермеабилизирующего буфера и окрашивают анти-CCL3, анти-IL2 и анти-IL6 в течение 60 минут при комнатной температуре. Клетки центрифугируют и дважды промывают буфером FACS и фиксируют в 0,5% параформальдегиде. Клетки анализируют на проточном цитометре Attune NxT (Thermo Fisher) с последующим анализом данных на Flowjo 10.7 (Treestar). Мертвые клетки исключают путем гейтирования 780-отрицательной популяции eFluor. B-клетки идентифицируют как клетки $CD19^+$, уровни маркера активации оценивают по средней интенсивности флуоресценции, и экспрессию цитокинов/хемокинов оценивают как % клеток CD19+. В этих экспериментах используют не конъюгированное антитело против CD22 человека (SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 87), свободный CpG (SEQ ID NO: 35, 7-7b) и антитело против CD22 человека (SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 87), конъюгированное с CpG 7-7 (SEQ ID NO: 35).

[00553] На **ФИГ. 41A-41C** показана устойчивая индукция цитокинов и хемокинов

B-клеток при опосредованном CD22 вовлечении TLR9 в B-клетки человека.

Пример 28: Биологическая оценка уровней цитокинов в сыворотке мышей после повторного введения дозы конъюгата анти-mCD22-CpG

[00554] Клетки карциномы толстой кишки CT26 (ATCC) культивируют в среде Complete RPMI 1640 (RPMI1640+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO2. Клетки открепляют 0,25% трипсином (Gibco) и дважды промывают RPMI 1640 (Gibco). Клетки ресуспендируют при 20E6/мл в RPMI 1640 и хранят на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток имплантируют подкожно в правый бок 6-недельных самок мышей BALB/c (Charles River). Когда опухоли достигают среднего размера 300 мм^3, мышей случайным образом разделяют на две группы и внутрибрюшинно вводят 10 мг/кг TNT50a, анти-mCD22-CpG или PBS дважды с интервалом в 3 дня. Через сорок восемь часов после введения каждой дозы мышам, и через 9 дней после введения последней дозы, кровь берут в пробирки microtainer для сыворотки (BD). Сыворотку собирают после центрифугирования и хранят при -80°C для оценки цитокинов с использованием платформы Isoplexis. Коротко, образцы сыворотки размораживают при комнатной температуре вместе с чипом Mouse CodePlex Seretome (Isoplexis). Образцы сыворотки загружают чистыми в двух экземплярах в камеры для чипов. После загрузки калибровочного чипа, чип Codeplex Secretome загружают в Isolight для анализа. Диапазон чувствительности для этого анализа составляет 5-5000 пг/мл для 16 оцениваемых цитокинов и хемокинов. Анти-mCD22 конъюгат, используемый в этом исследовании, TNT50a, представляет собой антитело против CD22 мыши (SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125), конъюгированное с CpG 4523 мыши (SEQ ID NO: 121).

[00555] На **ФИГ. 42A и 42B** показана устойчивая индукция различных эффекторных цитокинов и хемокинов анти-mCD22-CpG без видимого накопления на периферии при повторном введении дозы мышам.

Пример 29: Гибель опухоли у пациентов, не ответивших на PD1

[00556] Противоопухолевый ответ, опосредованный иммунными клетками, тестируют в сингенной модели, несущей опухоль, с использованием TNT50a, которое представляет собой антитело против CD22 мыши (SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125), конъюгированное с CpG 4523 мыши (SEQ ID NO: 121). Клетки карциномы толстой кишки мышей CT26 (ATCC) культивируют в среде Complete RPMI 1640 (RPMI1640+10% FBS (Gibco)) при 37°C и 5% CO2. Как только клетки достигают 80% конфлюэнтности, клетки отделяют 0,25% трипсином (Gibco) и дважды промывают RPMI 1640 (Gibco). Клетки ресуспендируют при 20E6/мл в RPMI 1640 и хранят на льду до использования. 100 мкл суспендированных клеток имплантируют подкожно в правый бок 6-недельных самок мышей BALB/c (Charles River). Размер опухоли измеряют и регистрируют дважды в неделю с помощью штангенциркуля, начиная с 5 дней после имплантации и в течение всего исследования, примерно через 30 дней. Объем опухоли оценивают по следующей формуле: (длина x ширина x ширина)/2. Как только опухоли достигает 50-200 мм^3, примерно через 5 дней после имплантации, мышей рандомизируют по размеру опухоли и

начинают лечение анти-PD1 (клон RPMI14 BioXCell) и PBS. Анти-PD1 и PBS (Gibco) вводят внутрибрюшинно по 2 дозы каждые 3 дня по 10 мг/кг, и по 3 дозы каждые 3 дня, соответственно. Примерно через 11 дней после имплантации мышей, получавших анти-PD1, измеряют и повторно рандомизируют по размеру опухоли. Мышей, у которых опухоль прогрессирует по сравнению с первоначальным размером и достигает размеров более 200 $мм^3$, считают не отвечающими на лечение анти-PD1. Мышей в группе, не ответившей на лечение анти-PD1, повторно рандомизируют по размеру опухоли и начинают лечение конъюгатом. Конъюгаты вводят внутривенно по 2 дозы каждые 3 дня по 10 мг/кг. Для комбинированного контроля и одной группы контроля, лечение анти-PD1 продолжают путем внутрибрюшинного введения каждые 3 дня по 10 мг/кг за 2 дозы. Мышей, у которых опухоли превышают 2000 $мм^3$ или у которых проявляются какие-либо признаки дистресса в любое время в ходе исследования, умерщвляют гуманным образом в соответствии с одобренными IACUC протоколами для животных. На **ФИГ. 43** показано, что объем опухоли уменьшается у мышей, получавших лечение конъюгатом TNT50a, и у мышей, получавших комбинацию конъюгата TNT50a и антитела к PD1, тогда как у мышей, получавших только анти-PD1 антитело, не наблюдается значительного уменьшения объема опухоли.

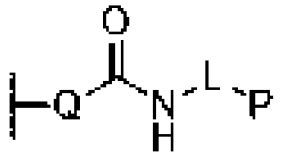
Пример 30: Уменьшение метастатического бремени в легких

[00557] Мышам BALB/C имплантируют клетки 4T1, лечение TNT50a начинают примерно на 5 день, когда размер опухоли составляет примерно 60 $мм^3$, в дозе 10 мг/кг, 3 дозы каждые 3 дня. TNT50a представляет собой антитело против CD22 мыши (SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125), конъюгированное с CpG 4523 мыши (SEQ ID NO: 121) с конфигурацией DAR1. Легкие собирают через 8-9 дней после последней инъекции для количественного определения метастатических узелков. Коротко, легкие собирают в охлажденном на льду 1xPBS, измельчают на мелкие кусочки, затем переносят в раствор для перевара, состоящий из 2 мг/мл коллагеназы типа V (Worthington), дополненной 50 мкг/мл ДНКазы (Sigma), и инкубируют в течение 2 часов в 37°C инкубаторе с вращением вверх-вниз. Суспензию переносят в 70 мкм сито, один раз промывают в 1x PBS, затем переносят в 10 мл среды для селекции, состоящей из RMPI 1640 с добавлением 10% FBS, пенициллина-стрептомицина и 10 мкг/мл 6-тиогуанина. Три-четыре серийных разведения 1:10 помещают либо в 6-луночные планшеты, либо в 10 см чашки и культивируют в течение 10-14 дней при 37°C, 5% CO2. Затем метастатические бляшки фиксируют в метаноле в течение 5 минут при комнатной температуре, повторно гидратируют в дистиллированной воде, затем окрашивают 0,03% метиленовым синим в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем краситель удаляют, планшет осторожно промывают дистиллированной водой и дают высохнуть на воздухе перед подсчетом бляшек.

[00558] Как показано на **ФИГ. 44,** количество метастатических бляшек значительно снижено в конъюгате CD22 Ab-CpG по сравнению с контролем.

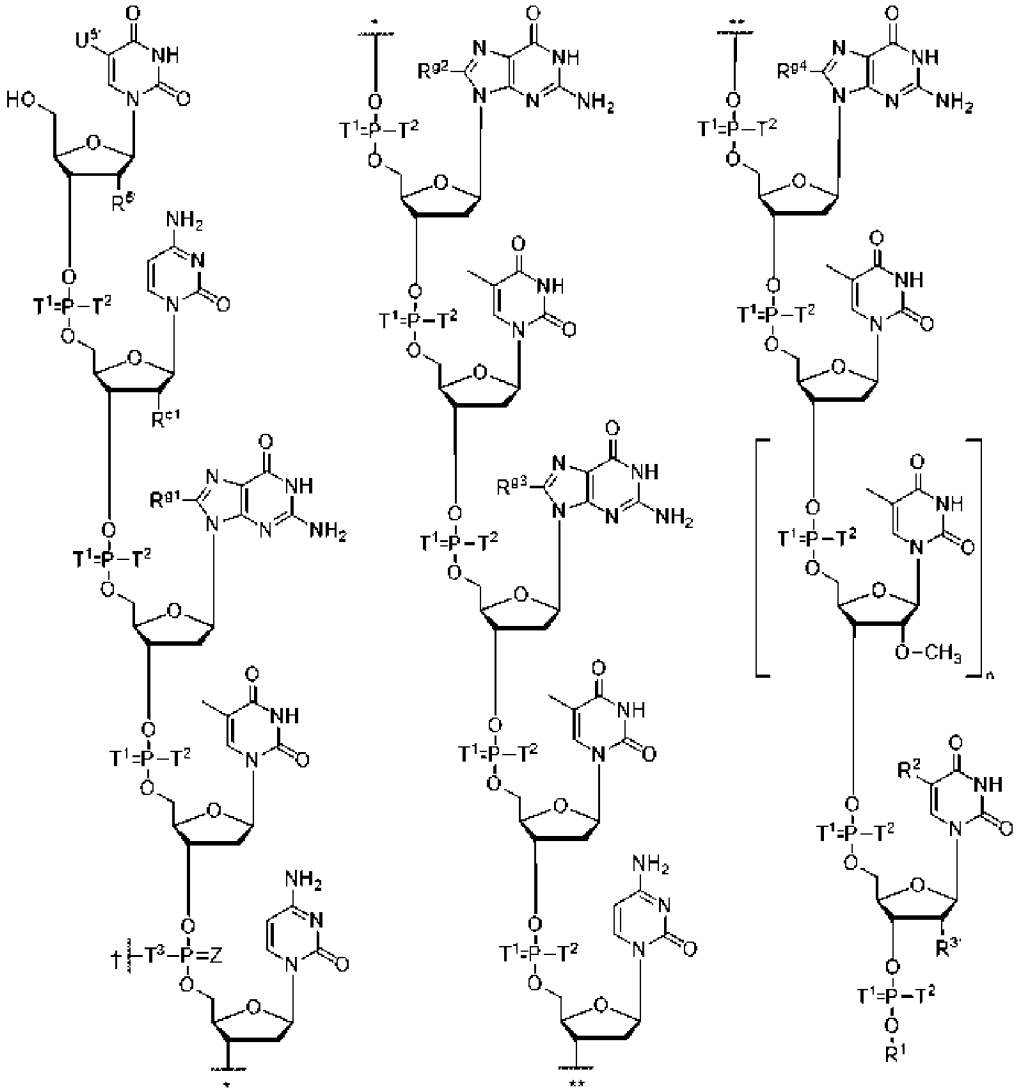
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими, по меньшей мере, один глутаминовый остаток, и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A):


(A);

где 〰 указывает точку присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

где каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру

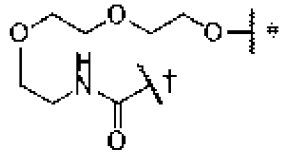


где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида, где 〰 † указывает точку присоединения к линкеру L;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2.

2. Конъюгат по п. 1, где антитело или его фрагмент представляют собой моноклональное антитело или его фрагмент.

3. Конъюгат по п. 1 или п. 2, где антитело или его фрагмент представляет собой Fab, F(ab')2, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное антитело, антитело с одной тяжелой цепью или одной легкой цепью или фрагмент антитела.

4. Конъюгат по любому из пп. 1-3, где антитело или его фрагмент представляют собой гуманизированное, человеческое или химерное антитело или его фрагмент.

5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, где указанное антитело или его фрагмент специфически связывается с CD22 человека.

6. Конъюгат по любому из пп. 1-5, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

(a) VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No:64-67;

(b) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116; или

(c) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:114, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:189, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116.

7. Конъюгат по любому из пп. 1-6, где указанное антитело содержит вариабельный

домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где VH домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 64-67.

8. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

(a) VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL домена, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 68-91;

(b) VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120; или

(c) VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:118, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:177, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120.

9. Конъюгат по п. 8, где VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену в остатке N92 (нумерация начинается с N-конца последовательности VL домена).

10. Конъюгат по п. 9, где VL домен содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из N92A, N92L и N92S.

11. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где указанный VL домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 68-91.

12. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность, и где VL домен содержит аминокислотную последовательность QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGF AFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65), и где VL доен содержит аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY FCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 68).

13. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность QVQLLESGGGVVQP GGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65), и где VL домен содержит аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYFCQQGATLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 73).

14. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH

домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116; и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120.

15. Конъюгат по любому из пп. 1-7, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность QVQLLESGGGVVQP GGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65), и где VL домен содержит аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYFCQQGSTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 87).

16. Конъюгат по любому из пп. 1-4, где указанное антитело или его фрагмент специфически связывается с Her2 человека.

17. Конъюгат по п. 16, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168)

18. Конъюгат по п. 17, где VH домен содержит последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD GFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168).

19. Конъюгат по п. 17 или п. 18, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL домена DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:169).

20. Конъюгат по п. 19, где VL домен содержит последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:169).

21. Конъюгат по п. 16, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWV RQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY

YCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170).

22. Конъюгат по п. 21, где VH домен содержит последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKG LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGP SFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170).

23. Конъюгат по п. 21 или п. 22, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL домена DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:171).

24. Конъюгат по любому из пп. 21-23, где VL домен содержит последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:171).

25. Конъюгат по любому из пп. 1-24, где антитело содержит Fc область.

26. Конъюгат по п. 25, где Fc область представляет собой Fc область человека, выбранную из группы, состоящей из Fc области IgG1, Fc области IgG2 и Fc области IgG4.

27. Конъюгат по п. 26, где Fc область представляет собой Fc область IgG1, IgG2 или IgG4 человека дикого типа.

28. Конъюгат по п. 26, где Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с C1q.

29. Конъюгат по п. 26, где Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают эффекторную функцию, по сравнению с Fc областью человека, где отсутствует(ют) аминокислотная(ые) замена(ы).

30. Конъюгат по п. 26, где Fc область представляет собой:

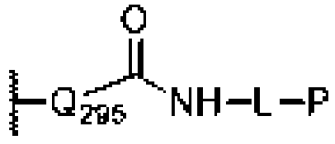
(a) Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(b) Fc область IgG2 человека, содержащую замены A330S и/или P331S, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или

(c) Fc область IgG4 человека, содержащую замены S228P и/или L235E, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

31. Конъюгат по любому из пп. 25, 26 и 28-30, где Fc область дополнительно содержит замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

32. Конъюгат по п. 31, где конъюгат дополнительно содержит иммуномодулирующий олигонуклеотид P, присоединенный к Q295 остатку Fc области,

как показано в следующей формуле , где L представляет собой линкерную группу, соединенную с Q295 Fc области посредством амидной связи.

33. Конъюгат по любому из пп. 26 и 28-32, где Fc область дополнительно содержит замену D265A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

34. Конъюгат по любому из пп. 1-24, где указанное антитело содержит константный домен тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 92-107 и 178.

35. Конъюгат по любому из пп. 1-34, где указанное антитело содержит легкую цепь лямбда человека.

36. Конъюгат по любому из пп. 1-34, где указанное антитело содержит легкую цепь каппа человека.

37. Конъюгат по любому из пп. 1-34, где указанное антитело содержит константный домен легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 108-110.

38. Конъюгат по любому из пп. 1-37, где указанное антитело содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и где одна Q-метка присоединена к одной или обеим тяжелым цепям антитела.

39. Конъюгат по п. 38, где Q-метка слита с С-концом тяжелой цепи антитела(антител).

40. Конъюгат по любому из пп. 1-37, где антитело содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и где одна Q-метка присоединена к одной или обеим легким цепям антитела.

41. Конъюгат по п. 38, где Q-метка находится в Fc домене.

42. Конъюгат по любому из пп. 1-15 и 25-41, где конъюгат связывается с CD22 человека, экспрессируемым на поверхности В-клетки.

43. Конъюгат по любому из пп. 1-42, где конъюгат индуцирует активацию TLR9.

44. Конъюгат по любому из пп. 1-43, где каждая Q-метка независимо содержит пептидную последовательность, содержащую от 5 до 15 аминокислотных остатков.

45. Конъюгат по любому из пп. 1-44, где Q-метка встречается в природе.

46. Конъюгат по любому из пп. 1-42, где пептидная последовательность каждой Q-метки независимо выбрана из группы, состоящей из **SEQ ID NO: 39-55.**

47. Конъюгат по любому из пп. 1-42, где Q-метка содержит пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO: 47).

48. Конъюгат по любому из пп. 1-47, где каждая Q-метка независимо содержит RPQGF (SEQ ID NO: 47), RPQGFPP (SEQ ID NO: 48) или RPQGFGPP (SEQ ID NO: 49).

49. Конъюгат по любому из пп. 1-48, где 1 или 2 Q-метки связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

50. Конъюгат по любому из пп. 1-49, где конъюгат имеет DAR, равный 1 или 2.

51. Конъюгат по любому из пп. 1-50, где линкер L содержит группу полиэтиленгликоля.

52. Конъюгат по любому из пп. 1-51, где линкер L представляет собой



,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где ~~~ † указывает точку присоединения к T^3, и ~~~ ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

53. Конъюгат по любому из пп. 1-52, где Z представляет собой S.

54. Конъюгат по любому из пп. 1-53, где олигонуклеотид P содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

55. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 1.

56. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 2.

57. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 3.

58. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 5.

59. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 6.

60. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 7.

61. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 8.

62. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 9.

63. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении

нуклеозидного остатка 10.

64. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 11.

65. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 12.

66. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 13.

67. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 14.

68. Конъюгат по п. 54, где, по меньшей мере, одна пара геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, расположена в 3'-положении нуклеозидного остатка 15.

69. Конъюгат по любому из пп. 1-68, где олигонуклеотид P содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

70. Конъюгат по любому из пп. 1-69, где $R^{5'}$ представляет собой H.

71. Конъюгат по любому из пп. 1-69, где $R^{5'}$ представляет собой метокси.

72. Конъюгат по любому из пп. 1-71, где R^{c1} представляет собой H.

73. Конъюгат по любому из пп. 1-71, где R^{c1} представляет собой метокси.

74. Конъюгат по любому из пп. 1-73, где R^2 представляет собой метил.

75. Конъюгат по любому из пп. 1-73, где R^2 представляет собой H.

76. Конъюгат по любому из пп. 1-75, где m представляет собой целое число от 20 до 25.

77. Конъюгат по п. 76, где m равно 24.

78. Конъюгат по любому из пп. 1-77, где $U^{5'}$ представляет собой бром.

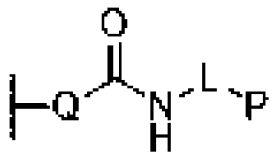
79. Конъюгат по любому из пп. 1-77, где $U^{5'}$ представляет собой -H.

80. Конъюгат по любому из пп. 1-53, где каждый P независимо содержит олигонуклеотид, выбранный из ***таблицы* 10.**

81. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P),

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), которые содержат аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47),

и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид (P) связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A):


(A),

где 〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab).

82. Конъюгат по п. 81, где антитело содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи, где каждая тяжелая цепь антитела связана с пептидом Q-метки, и где один или оба пептида Q-метки связаны с иммуномодулирующим олигонуклеотидом P.

83. Конъюгат по п. 81, где антитело или его фрагмент представляют собой моноклональное антитело или его фрагмент.

84. Конъюгат по любому из пп. 81-83, где антитело или его фрагмент представляет собой Fab, F(ab')2, Fab'-SH, Fv, scFv, антитело с одним доменом, одной тяжелой цепью или одной легкой цепью, или фрагмент антитела.

85. Конъюгат по любому из пп. 81-84, где антитело или его фрагмент представляют собой гуманизированное, человеческое или химерное антитело или его фрагмент.

86. Конъюгат по любому из пп. 81-85, где указанное антитело или его фрагмент специфически связывается с CD22 человека.

87. Конъюгат по п. 86, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где:

(a) VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No:64-67;

(b) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116; или

(c) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:114, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:189, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116.

88. Конъюгат по п. 86 или п. 87, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 64-67.

89. Конъюгат по любому из пп. 81-88, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где:

(a) VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL домена, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID No: 68-91;

(b) VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120; или

(c) VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:118,

CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:177, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120.

90. Конъюгат по п. 89, где VL домен дополнительно содержит аминокислотную замену в остатке N92 (нумерация начинается с N-конца последовательности VL домена).

91. Конъюгат по п. 90, где VL домен содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из N92A, N92L и N92S.

92. Конъюгат по любому из пп. 81-88, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где аминокислотная последовательность VL домена выбрана из группы, состоящей из SEQ ID No: 68-91.

93. Конъюгат по п. 86, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCA ASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65), и где VL домен содержит аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 68).

94. Конъюгат по п. 86, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCA ASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65), и где VL домен содержит аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYFCQQGATLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 73).

95. Конъюгат по п. 86, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116; и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120.

96. Конъюгат по п. 86, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит аминокислотную последовательность QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCA ASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSAISSGGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65), и где VL домен содержит аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ

PEDFATYFCQQGSTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 87).

97. Конъюгат по любому из пп. 81-85, где указанное антитело или его фрагмент специфически связывается с Her2 человека.

98. Конъюгат по п. 97, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168).

99. Конъюгат по п. 98, где VH домен содержит последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD GFYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:168).

100. Конъюгат по п. 98 или п. 99, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где указанный VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL домена DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:169).

101. Конъюгат по п. 99 или п. 100, где VL домен содержит последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:169).

102. Конъюгат по п. 97, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где VH домен содержит последовательности CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3 из последовательности VH домена EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWV RQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170).

103. Конъюгат по п. 102, где VH домен содержит последовательность EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKG LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGP SFYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:170).

104. Конъюгат по п. 102 или п. 103, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), и где VL домен содержит последовательности CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3 из последовательности VL домена DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG QGTKVEIK (SEQ ID NO:171).

105. Конъюгат по любому из пп. 102-104, где VL домен содержит

последовательность DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQK PGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO:171).

106. Конъюгат по любому из пп. 81-105, где указанное антитело содержит Fc область.

107. Конъюгат по п. 106, где Fc область представляет собой Fc область человека, выбранную из группы, состоящей из Fc области IgG1, Fc области IgG2 и Fc области IgG4.

108. Конъюгат по п. 107, где Fc область представляет собой Fc область IgG1, IgG2 или IgG4 человека дикого типа.

109. Конъюгат по п. 107, где Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают эффекторную функцию, по сравнению с Fc областью человека, где отсутствует(ют) аминокислотная(ые) замена(ы).

110. Конъюгат по п. 107, где Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с C1q.

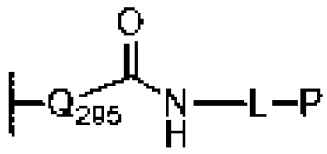
111. Конъюгат по п. 107, где Fc область представляет собой:

(a) Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(b) Fc область IgG2 человека, содержащую замены A330S и/или P331S, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или

(c) Fc область IgG4 человека, содержащую замены S228P и/или L235E, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

112. Конъюгат по любому из пп. 106, 107 и 109-111, где Fc область дополнительно содержит замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

113. Конъюгат по п. 112, где конъюгат дополнительно содержит иммуномодулирующий олигонуклеотид P, присоединенный к остатку Q295 Fc области, как показано в следующей формуле 

, где L представляет собой линкерную группу, соединенную с Q295 Fc области посредством амидной связи.

114. Конъюгат по любому из пп. 108 и 110-113, где Fc область дополнительно содержит замену D265A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

115. Конъюгат по любому из пп. 81-105, где указанное антитело содержит константный домен тяжелой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 92-107 и 178.

116. Конъюгат по любому из пп. 81-115, где указанное антитело содержит легкую

цепь лямбда человека.

117. Конъюгат по любому из пп. 81-115, где указанное антитело содержит легкую цепь каппа человека.

118. Конъюгат по любому из пп. 111-115, где указанное антитело содержит константный домен легкой цепи антитела, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 108-110.

119. Конъюгат по любому из пп. 81-96 и 106-118, где конъюгат связывается с CD22 человека, экспрессируемым на поверхности B-клетки.

120. Конъюгат по любому из пп. 81-119, где конъюгат индуцирует активацию TLR9.

121. Конъюгат по любому из пп. 81-120, где указанное антитело содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и где одна Q-метка присоединена к одной или обеим тяжелым цепям антитела.

122. Конъюгат по п. 121, где Q-метка слита с C-концом тяжелой(ых) цепи(ей) антитела.

123. Конъюгат по п. 121, где Q-метка находится в Fc домене тяжелой(ых) цепи(ей) антитела.

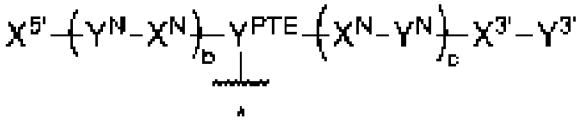
124. Конъюгат по любому из пп. 81-120, где указанное антитело содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и где одна Q-метка присоединена к одной или обеим легким цепям антитела.

125. Конъюгат по любому из пп. 81-124, где каждая Q-метка независимо содержит последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48) или RPQGFGPP (SEQ ID NO:49).

126. Конъюгат по любому из пп. 81-125, где 1 или 2 Q-метки связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

127. Конъюгат по любому из пп. 81-126, где конъюгат имеет DAR, равный 1 или 2.

128. Конъюгат по любому из пп. 81-127, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид P независимо представляет собой

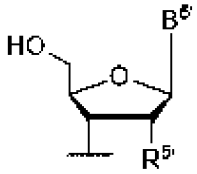


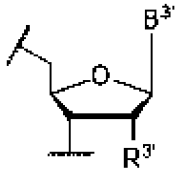
,

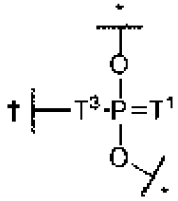
где

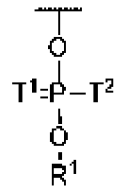
каждый b и c независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма b и c равна, по меньшей мере, 5;

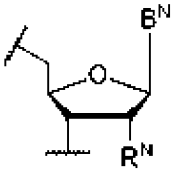
〰 * указывает место присоединения иммуномодулирующего олигонуклеотида P к остальной части конъюгата;

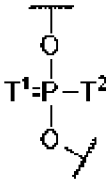
$X^{5'}$ представляет собой 5' концевой нуклеозид, имеющий структуру  ;

$X^{3'}$ представляет собой 3' концевой нуклеозид, имеющий структуру  ;

Y^{PTE} представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир, имеющий структуру  , где * указывает на точки присоединения к остальной части олигонуклеотида, и 〰 † указывает на точку присоединения к линкеру L или, если L отсутствует, 〰 † указывает на точку присоединения к пептиду Q-метки на глутаминовом остатке через амидную связь;

$Y^{3'}$ представляет собой концевой фосфотриэфир, имеющий структуру  ;

каждый X^N независимо представляет собой нуклеозид, имеющий структуру  ;

каждый Y^N независимо представляет собой межнуклеозидный линкер, имеющий структуру  ;

где каждый B^N независимо представляет собой модифицированное или не модифицированное нуклеооснование;

каждый R^N независимо представляет собой -H или -O-C_{1-4}-алкил, где C_{1-4}-алкил из -O-C_{1-4} -алкила необязательно дополнительно замещен -O-C_1-C_4-алкилом;

$B^{5'}$ и $B^{3'}$ независимо представляют собой модифицированное или не модифицированное нуклеооснование;

$R^{5'}$ и $R^{3'}$ независимо представляют собой -H или -O-C_1-C_4-алкил, где C_{1-4}-алкил -O-C_{1-4}-алкила необязательно дополнительно замещен -O-C_{1-4}-алкилом;

каждый T_1 независимо представляет собой O или S;

каждый T_2 независимо представляет собой O^- или S^-; и

T_3 представляет собой группу, включающую олигоэтиленгликолевую группу; и

R^1 представляет собой C_{1-4}-алкилен-гидрокси.

129. Конъюгат по п. 128, где b равно 3.

130. Конъюгат по п. 128 или п. 129, где

(i) P содержит, по меньшей мере, один модифицированный нуклеозид X^N;

(ii) P имеет, по меньшей мере, один модифицированный межнуклеозидный линкер Y^N, где, по меньшей мере, один из T^1 или T^2 представляет собой S; или

(iii) и (i), и (ii).

131. Конъюгат по любому из пп. 128-130, где P имеет, по меньшей мере, один фосфородитиоатный или фосфоротиоатный межнуклеозидный линкер.

132. Конъюгат по любому из пп. 128-131, где P содержит 0, 1, 2 или 3 фосфородитиоатных межнуклеозидных линкера.

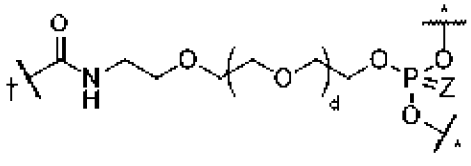
133. Конъюгат по любому из пп. 128-132, где P содержит модифицированный нуклеозид, выбранный из группы, состоящей из 2'-O-алкилнуклеозида, 2'-O-алкоксиалкилнуклеозида, 2'-дезоксинуклеозида и рибонуклеозида.

134. Конъюгат по п. 133, где модифицированный нуклеозид выбран из группы, состоящей из 5-бром-2'-O-метилуридина, 5-бром-2'-дезоксиуридина, 2'-O-метилуридина, 2'-дезоксиуридина, 2'-O-метилтимидина, 2'-O-метилцитидина, 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидина и 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина.

135. Конъюгат по любому из пп. 128-134, где $X^{5'}$ представляет собой 5-бром-2'-O-метилуридин, 5-бром-2'-дезоксиуридин, 2'-O-метилуридин или 2'-дезоксиуридин.

136. Конъюгат по любому из пп. 128-135, где $Y^{3'}$ или Y^N в 3' положении $X^{5'}$ содержит не замещенный или замещенный фосфоротиоат.

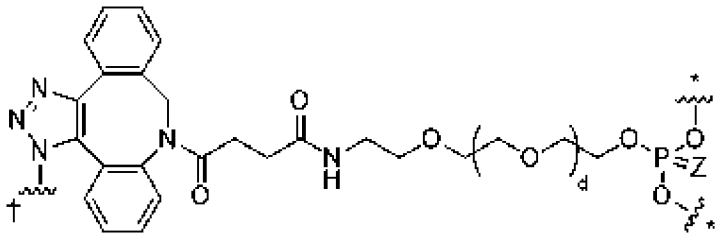
137. Конъюгат по любому из пп. 128-136, где Y^{PTE} представляет собой:



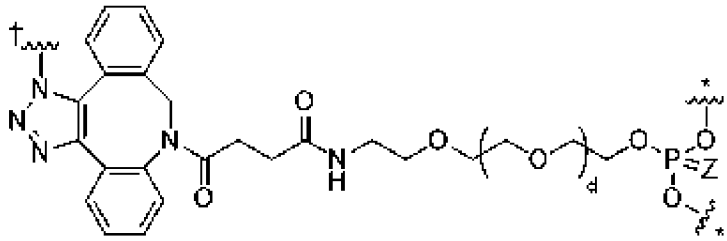
,

где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от 0 до 95; две ∿∿ * в правой части структуры обозначают точки присоединения к соседним нуклеозидам X^N в олигонуклеотиде P, и ∿∿ † в левой части структуры указывают на точку присоединения к линкеру L.

138. Конъюгат по любому из пп. 128-136, где Y^{PTE} представляет собой:



или



,

где Z представляет собой O или S; d представляет собой целое число от 0 до 95; две 〰 * на правой стороне структуры указывают на точки присоединения к соседним нуклеозидам X^N в олигонуклеотиде P, и одна 〰 † на левой стороне структуры указывает на точку присоединения к линкеру L.

139. Конъюгат по п. 137 или 138, где Z представляет собой S.

140. Конъюгат по любому из пп. 137-139, где d представляет собой целое число от 1 до 25.

141. Конъюгат по любому из пп. 81-140, где линкер L содержит группу полиэтиленгликоля.

142. Конъюгат по любому из пп. 81-141, где линкер L представляет собой



,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к $Y^{PTE,}$ и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата.

143. Конъюгат по любому из пп. 81-142, где P содержит один или несколько сайтов CpG.

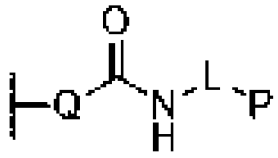
144. Конъюгат по любому из пп. 81-143, где P содержит, по меньшей мере, 3 сайта CpG.

145. Конъюгат по любому из пп. 81-144, где каждый P независимо содержит олигонуклеотид, выбранный из ***таблицы* 9** или ***таблицы* 10.**

146. Конъюгат по любому из пп. 81-145, где указанное антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; и где один из пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом (P) посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкера (L).

147. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab)

и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A)



(A),

где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

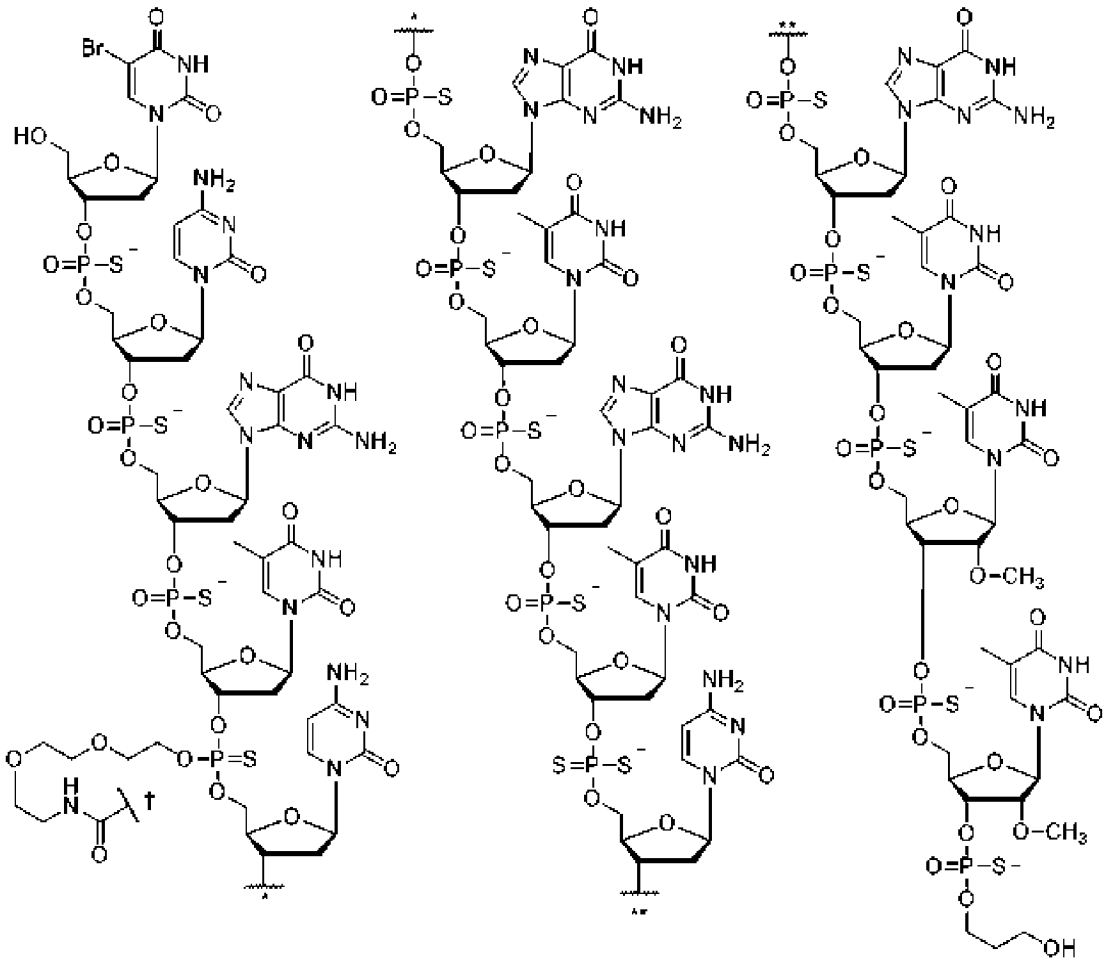
каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к P, и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



где ~~~ * и ~~~ ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида, и ~~~ † указывает точку присоединения к линкеру L;

где Ab содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL).

148. Конъюгат по п. 147, где каждая Q-метка независимо содержит RPQGF (SEQ ID NO: 47), RPQGFPP (SEQ ID NO: 48) или RPQGFGPP (SEQ ID NO: 49).

149. Конъюгат по п. 148, где каждая Q-метка представляет собой RPQGFGPP (SEQ ID NO: 49).

150. Конъюгат по любому из пп. 147-149, где 1 или 2 Q-метки связаны с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

151. Конъюгат по любому из пп. 147-150, где Q-метка связана с C-концом тяжелой цепи антитела.

152. Конъюгат по любому из пп. 147-151, где:

(a) антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(b) антитело содержит Fc область IgG1 человека дикого типа;

(c) антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(d) антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замену D265A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(e) антитело содержит Fc область IgG2 человека дикого типа;

(f) антитело содержит Fc область IgG2 человека, содержащую замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или

(g) антитело содержит Fc область IgG4 человека, содержащую замену S228P, нумерация аминокислот в соответствии с индексом EU.

153. Конъюгат по любому из пп. 147-152, где m представляет собой целое число от примерно 20 до примерно 25.

154. Конъюгат по п. 153, где m равно 24.

155. Конъюгат по любому из пп. 147-154, где конъюгат имеет DAR, равный 1 или 2.

156. Конъюгат по любому из пп. 147-155, где конъюгат связывается с CD22 человека, экспрессируемым на поверхности B-клетки.

157. Конъюгат по п. 156, где:

(a) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116, и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120;

(b) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:114, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:189, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116, и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120;

(c) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116, и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:118, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:177, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120; или

(d) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:114, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:189, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116, и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:118, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:177, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120.

158. Конъюгат по п. 156 или п. 157, где:

(a) VH домен содержит последовательность SEQ ID NO:65, и VL домен содержит последовательность SEQ ID NO:87; или

(b) VH домен содержит последовательность SEQ ID NO:65, и VL домен содержит последовательность SEQ ID NO:73.

159. Конъюгат по любому из пп. 156-158, где:

(a) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:179, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:181;

(b) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:180, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:181;

(c) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:179, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:182; или

(d) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:180, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:182.

160. Конъюгат по любому из пп. 147-155, где конъюгат связывается с Her2 человека, экспрессированным на поверхности опухолевой клетки.

161. Конъюгат по п. 160, где:

(a) VH домен содержит последовательность SEQ ID NO:168, и VL домен содержит последовательность SEQ ID NO:169; или

(b) VH домен содержит последовательность SEQ ID NO:170, и VL домен содержит последовательность SEQ ID NO:171.

162. Конъюгат по п. 161, где:

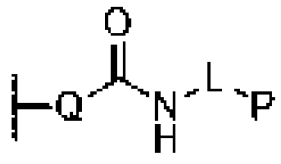
(a) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:184, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:185;

(b) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:183, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:185;

(c) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:187, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:188; или

(d) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:186, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:188.

163. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A)



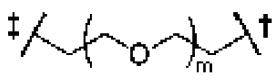
(A),

где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

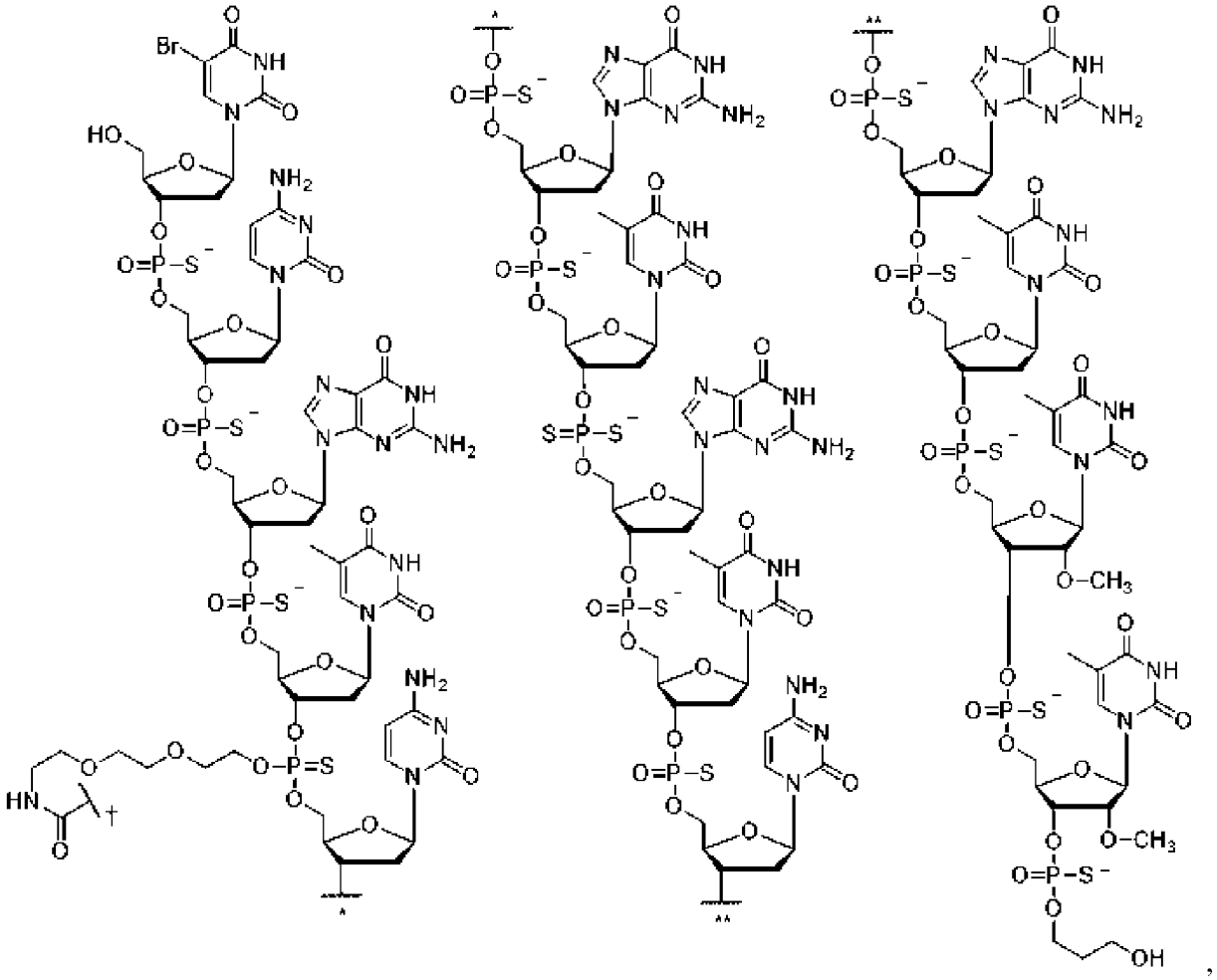
каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу



,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где ‡ указывает точку присоединения к P, и ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру



,

где * и ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида, и † указывает точку присоединения к линкеру L;

где Ab содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL).

164. Конъюгат по п. 163, где каждая Q-метка независимо содержит RPQGF (SEQ ID NO: 47), RPQGFPP (SEQ ID NO: 48) или RPQGFGPP (SEQ ID NO: 49).

165. Конъюгат по п. 164, где каждая Q-метка представляет собой RPQGFGPP (SEQ ID NO: 49).

166. Конъюгат по любому из пп. 163-165, где 1 или 2 Q-метки связаны с антителом

или его антигенсвязывающим фрагментом.

167. Конъюгат по любому из пп. 163-166, где Q-метка связана с С-концом тяжелой цепи антитела.

168. Конъюгат по любому из пп. 163-167, где:

(a) антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(b) антитело содержит Fc область IgG1 человека дикого типа;

(c) антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(d) антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замену D265A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(e) антитело содержит Fc область IgG2 человека дикого типа;

(f) антитело содержит Fc область IgG2 человека, содержащую замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или

(g) антитело содержит Fc область IgG4 человека, содержащую замену S228P, нумерацию аминокислот в соответствии с индексом EU.

169. Конъюгат по любому из пп. 163-168, где m представляет собой целое число от примерно 20 до примерно 25.

170. Конъюгат по п. 169, где m равно 24.

171. Конъюгат по любому из пп. 163-170, где конъюгат имеет DAR, равный 1 или 2.

172. Конъюгат по любому из пп. 163-171, где конъюгат связывается с CD22 человека, экспрессированным на поверхности В-клетки.

173. Конъюгат по п. 172, где:

(a) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116, и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120;

(b) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:114, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:189, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116, и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:117, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:119, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120;

(c) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:113, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:115, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116, и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:118, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:177, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120; или

(d) VH домен содержит CDR-H1, содержащую последовательность SEQ ID NO:114, CDR-H2, содержащую последовательность SEQ ID NO:189, и CDR-H3, содержащую последовательность SEQ ID NO:116, и VL домен содержит CDR-L1, содержащую последовательность SEQ ID NO:118, CDR-L2, содержащую последовательность SEQ ID NO:177, и CDR-L3, содержащую последовательность SEQ ID NO:120.

174. Конъюгат по п. 172 или п. 173, где:

(a) VH домен содержит последовательность SEQ ID NO:65, и VL домен содержит последовательность SEQ ID NO:87; или

(b) VH домен содержит последовательность SEQ ID NO:65, и VL домен содержит последовательность SEQ ID NO:73.

175. Конъюгат по любому из пп. 172-174, где:

(a) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:179, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:181;

(b) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:180, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:181;

(c) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:179, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:182; или

(d) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:180, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:182.

176. Конъюгат по любому из пп. 163-171, где конъюгат связывается с Her2 человека, экспрессированным на поверхности опухолевой клетки.

177. Конъюгат по п. 176, где:

(a) VH домен содержит последовательность SEQ ID NO:168, и VL домен содержит последовательность SEQ ID NO:169; или

(b) VH домен содержит последовательность SEQ ID NO:170, и VL домен содержит последовательность SEQ ID NO:171.

178. Конъюгат по п. 177, где:

(a) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:184, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:185;

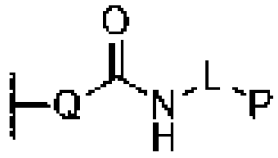
(b) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:183, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:185;

(c) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:187, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:188; или

(d) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:186, и легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:188.

179. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47); где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; где один из двух пептидов Q-

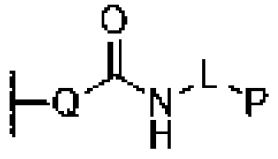
метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A):


(A),

где 〰 указывает точку присоединения Q к антителу (Ab).

180. Конъюгат, содержащий антитело (Ab), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки, содержащие пептидную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47); где каждый из пептидов Q-метки связан с C-концом одной из тяжелых цепей антитела; и где, по меньшей мере, один из пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом (P) посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкера (L), как показано на **ФИГ. 16A** или **ФИГ. 16B.**

181. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), содержащими последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A)

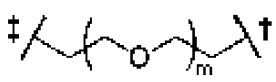

(A),

где:

〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab)

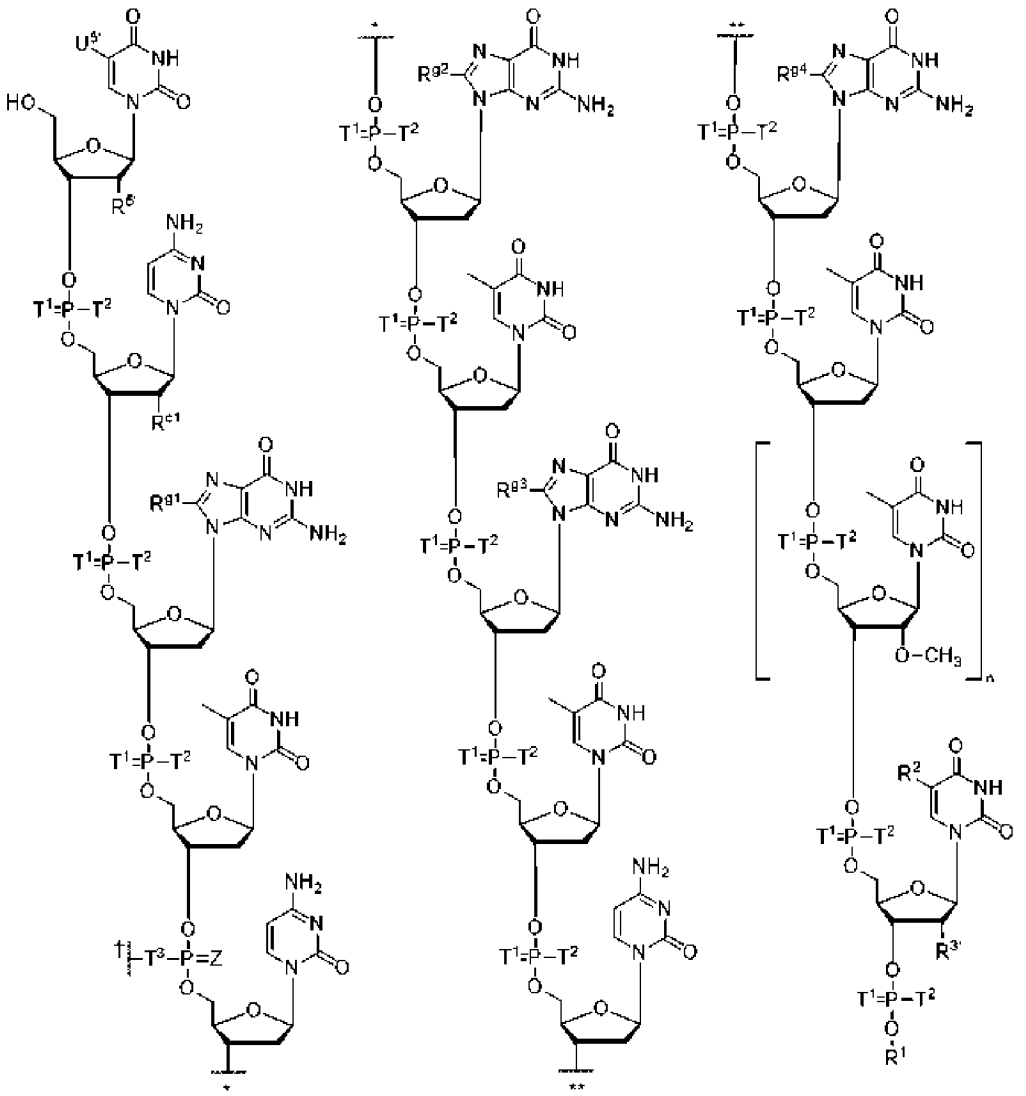
каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу


,

где m представляет собой целое число в диапазоне от примерно 0 до примерно 50, и где 〰 † указывает точку присоединения к P, и 〰 ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, связанного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид, имеющий структуру

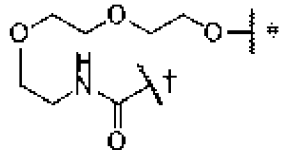


где ~~~ * и ~~~ ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида, и ~~~ † указывает точку присоединения к линкеру L;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

при условии, что каждый P содержит одну или две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S, и одна или две пары геминальных T^1 и T^2 находятся между нуклеозидными остатками 2 и 3, между нуклеозидными остатками 3 и 4, между нуклеозидными остатками 5 и 6, между нуклеозидными остатками 6 и 7, между нуклеозидными остатками 7 и 8, между нуклеозидными остатками 8 и 9, между нуклеозидными остатками 9 и 10 или между нуклеозидными остатками 10 и 11;

T^3 представляет собой группу , где ~~~ † указывает на точку присоединения к L, и где ~~~ # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H;

R^{c1} представляет собой -H;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -метил; и

п равно 1,

где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает опухолеассоциированный антиген.

182. Конъюгат по п. 181, где опухолеассоциированный антиген экспрессируется раковой клеткой.

183. Конъюгат по п. 181, где опухолеассоциированный антиген экспрессируется стромальной клеткой, ассоциированной с раком.

184. Конъюгат по п. 181, где опухолеассоциированный антиген выбран из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD45R (B220), CD49, CD52, CD56, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD93, CD123, CD138, CD163, CD205, CD206, CD274, CD303 и CD304, альфа-рецептора фолиевой кислоты, бета-рецептора фолиевой кислоты, мезотелина, PSMA, Her-2, EGFR, CLDN18.2, 5T4, CD47, нектина 4, рецептора трансферрина, интегрина, крипто, EphA2, AGS-5, AGS-16, CanAg, EpCAM, рецептора IL4, рецептора IL2, Lewis Y, GPNMB, DLL3, GCC, GPA33, тканевого фактора (TF), PD-L1 и Trop2.

185. Конъюгат по любому из пп. 181-184, где рак представляет собой рак молочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, меланому, лимфому или лейкоз.

186. Конъюгат по любому из пп. 181-185, где каждая Q-метка независимо содержит RPQGF (SEQ ID NO:47), RPQGFPP (SEQ ID NO:48) или RPQGFGPP (SEQ ID NO:49).

187. Конъюгат по любому из пп. 181-186, где каждая Q-метка представляет собой RPQGFGPP (SEQ ID NO: 49).

188. Конъюгат по любому из пп. 181-187, где указанное антитело содержит две тяжелые цепи антитела и две легкие цепи антитела, и где одна Q-метка присоединена к одной или обеим тяжелым цепям антитела.

189. Конъюгат по любому из пп. 181-188, где Q-метка связана с C-концом тяжелой цепи антитела.

190. Конъюгат по любому из пп. 181-188, где Q-метка находится в Fc домене.

191. Конъюгат по любому из пп. 181-190, где:

(a) антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(b) антитело содержит Fc область IgG1 человека дикого типа;

(c) антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(d) антитело содержит Fc область IgG1 человека, содержащую замену D265A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(e) антитело содержит Fc область IgG2 человека дикого типа;

(f) антитело содержит Fc область IgG2 человека, содержащую замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или

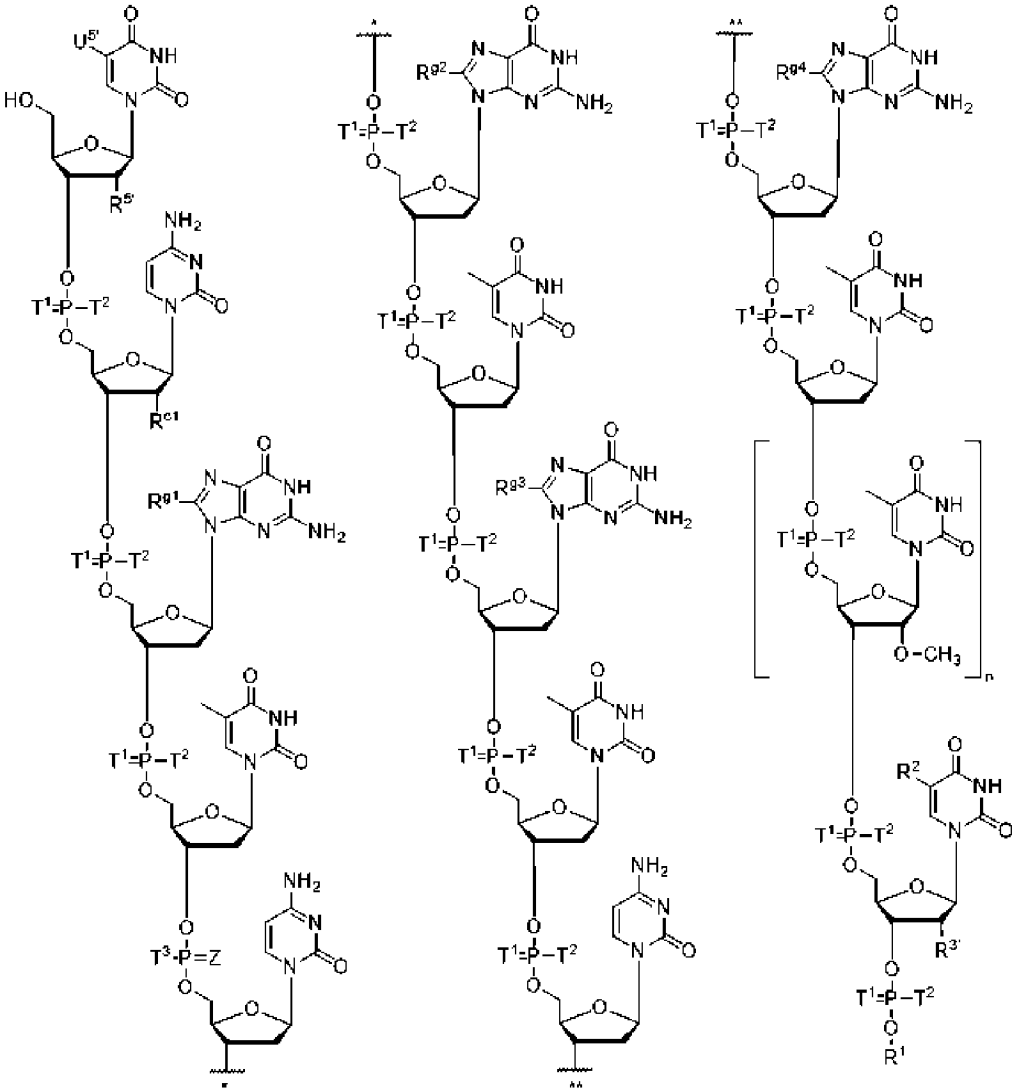
(g) антитело содержит Fc область IgG4 человека, содержащую замену S228P, нумерация аминокислот в соответствии с индексом EU.

192. Конъюгат по любому из пп. 181-191, где m представляет собой целое число от примерно 20 до примерно 25.

193. Конъюгат по любому из пп. 181-192, где m равно 24.

194. Конъюгат по любому из пп. 181-193, где конъюгат имеет DAR, равный 1 или 2.

195. Иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C):



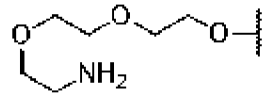
(C),

где

〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;

T^3 представляет собой группу , где m представляет собой целое число от 0 до 50, и где 〰 указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

196. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 195, где Z представляет собой S.

197. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 195 или п. 196, где указанный олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

198. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-197, где указанный олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

199. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-198, где $R^{5'}$ представляет собой H.

200. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-198, где $R^{5'}$ представляет собой метокси.

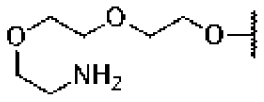
201. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-200, где R^{c1} представляет собой H.

202. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-200, где R^{c1} представляет собой метокси.

203. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-202, где R^2 представляет собой метил.

204. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-202, где R^2 представляет собой H.

205. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-204, где T^3

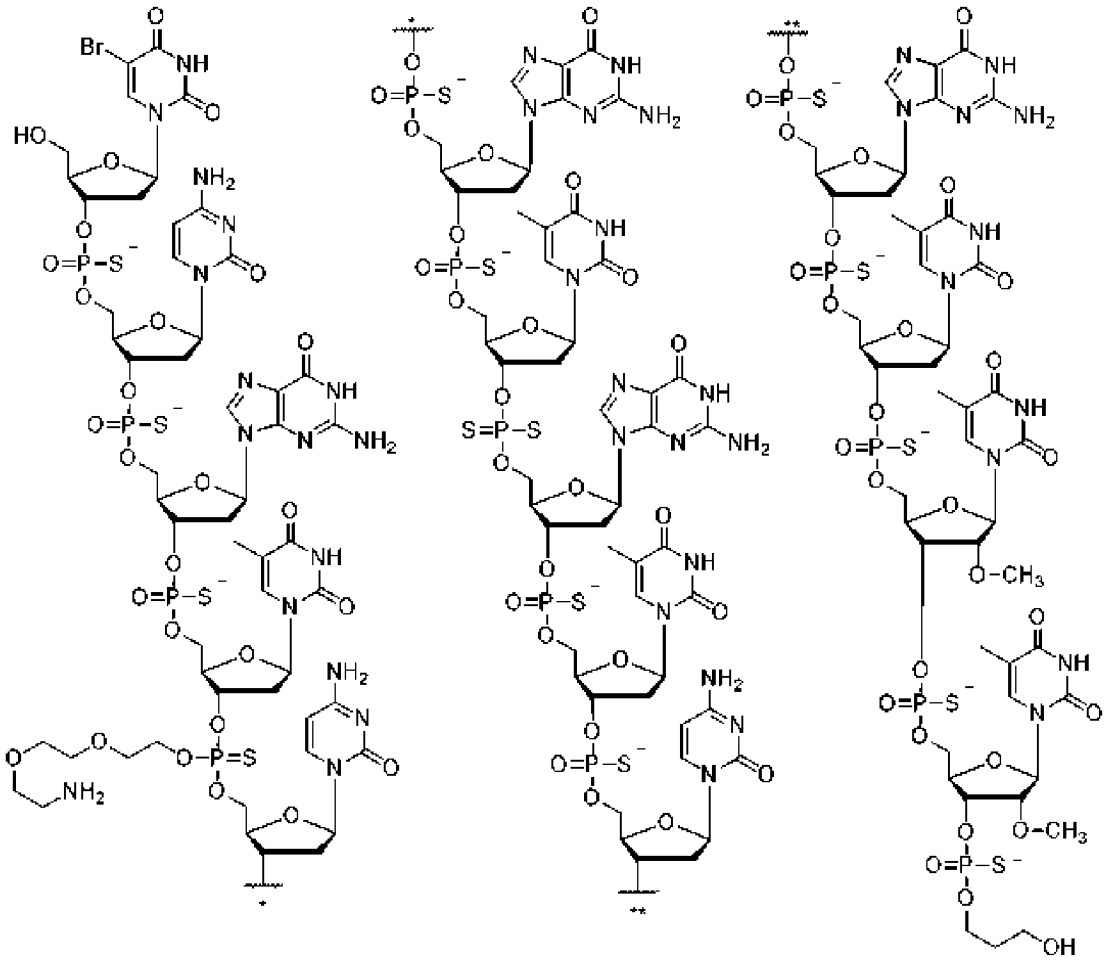
представляет собой  .

206. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-205, где $U^{5'}$ представляет собой галоген.

207. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 206, где $U^{5'}$ представляет собой бром.

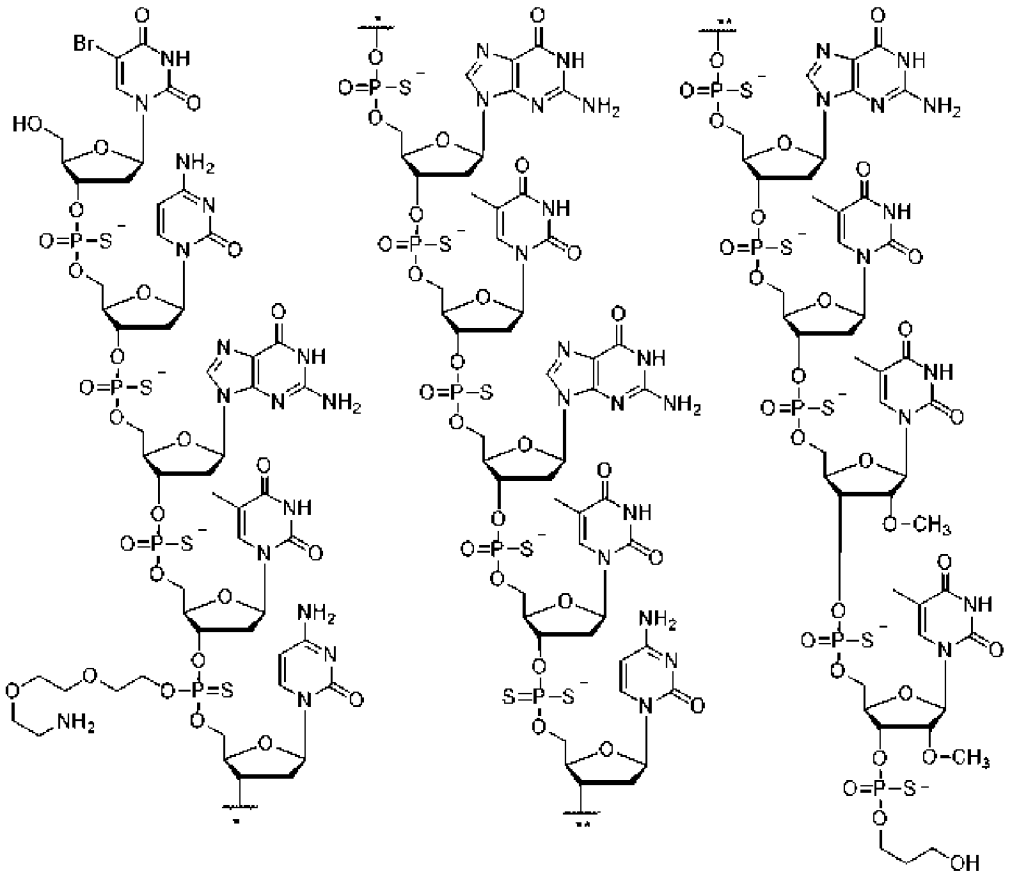
208. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-205, где $U^{5'}$ представляет собой -H.

209. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 195, где указанный олигонуклеотид представляет собой

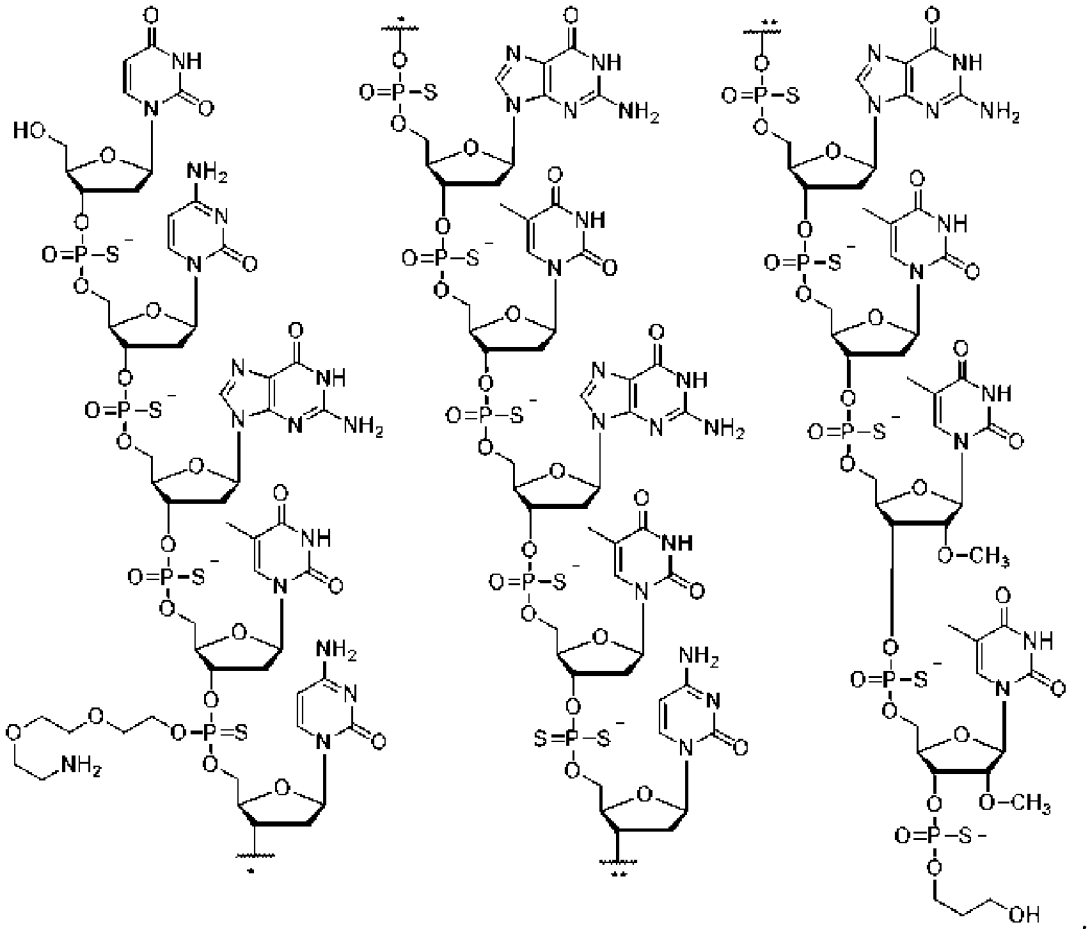


.

210. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 195, где указанный олигонуклеотид представляет собой

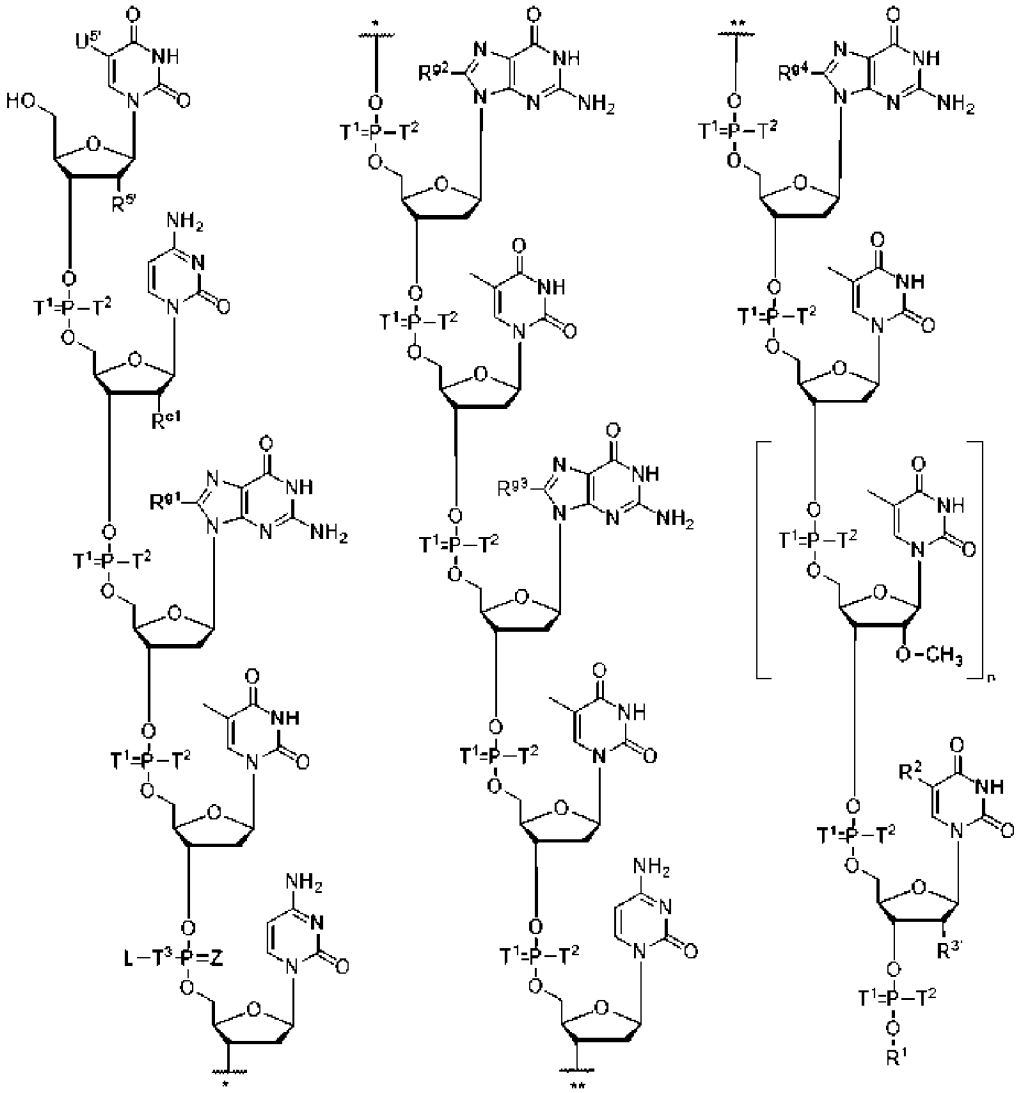


211. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 195, где указанный олигонуклеотид представляет собой



212. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 195, где указанный олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 10,** или его фармацевтически приемлемая соль.

213. Иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D):



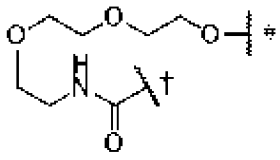
(D),

где

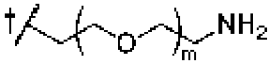
〰 * и 〰 ** обозначают точки присоединения внутри олигонуклеотида;

каждый T^1 независимо представляет собой O или S;

каждый T^2 представляет собой S^-;



T^3 представляет собой группу , где 〰 † указывает на точку присоединения к L, и где 〰 # указывает на точку присоединения к остальной части олигонуклеотида;



L представляет собой группу , где m представляет собой целое

число от 0 до 50, и где ~~~ † указывает точку присоединения к остальной части олигонуклеотида через T^3;

Z представляет собой O или S;

$U^{5'}$ представляет собой -H или галоген;

$R^{5'}$ представляет собой -H или метокси;

R^{c1} представляет собой -H или метокси;

R^{g1}, R^{g2}, R^{g3} и R^{g4} представляют собой H;

$R^{3'}$ представляет собой метокси;

R^1 представляет собой $-(CH_2)_3-OH$;

R^2 представляет собой -H или метил; и

n представляет собой целое число от 0 до 2,

или его фармацевтически приемлемая соль.

214. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 213, где Z представляет собой S.

215. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 213 или п. 214, где указанный олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, одну пару геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

216. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-215, где указанный олигонуклеотид содержит, по меньшей мере, две пары геминальных T^1 и T^2, где T^1 представляет собой S, и T^2 представляет собой S^-.

217. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-216, где $R^{5'}$ представляет собой H.

218. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-216, где $R^{5'}$ представляет собой метокси.

219. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-218, где R^{c1} представляет собой H.

220. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-218, где R^{c1} представляет собой метокси.

221. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-220, где R^2 представляет собой метил.

222. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-220, где R^2 представляет собой H.

223. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-222, где m представляет собой целое число от 20 до 25.

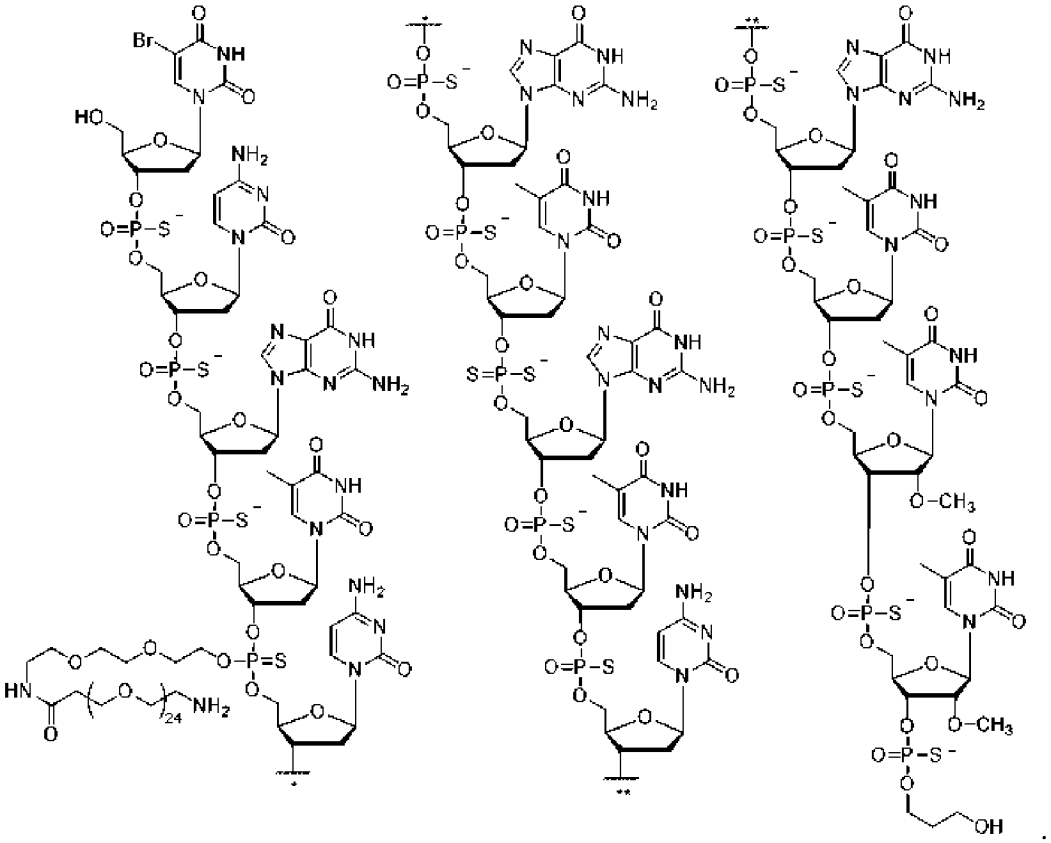
224. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-223, где $U^{5'}$ представляет собой галоген.

225. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 224, где $U^{5'}$ представляет собой бром.

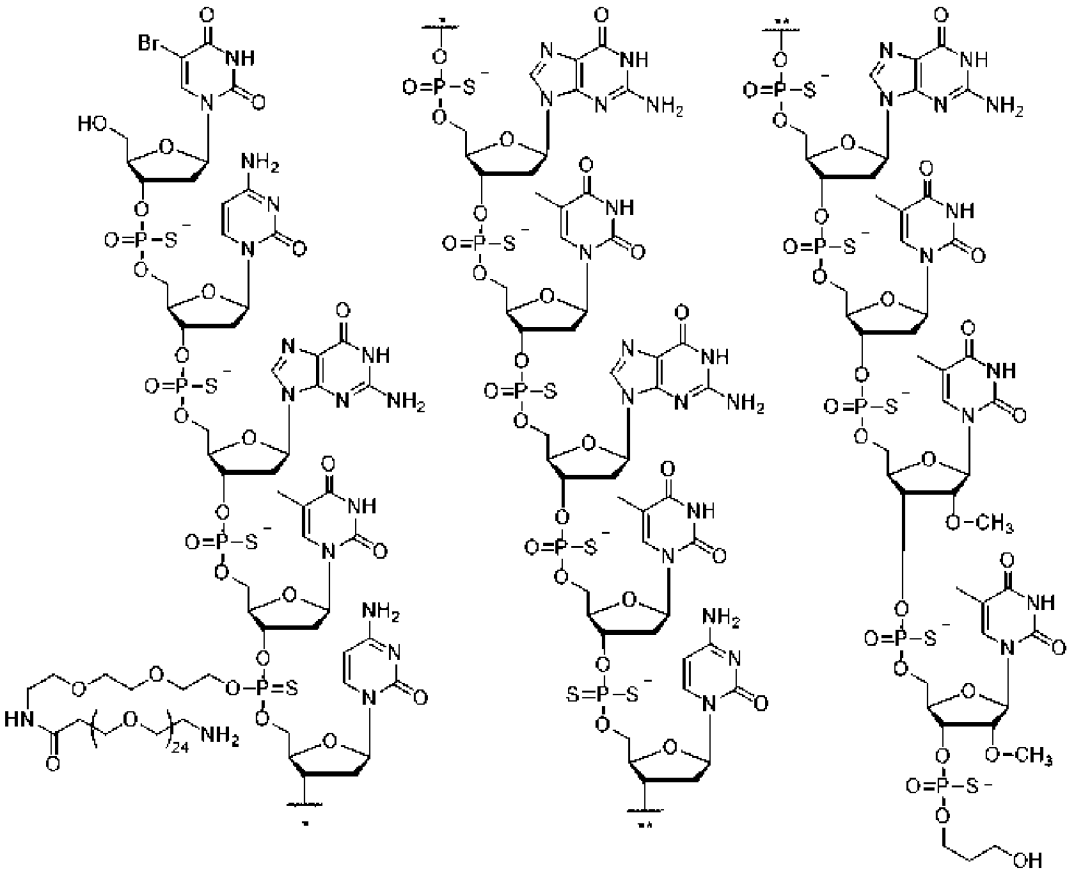
226. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 213-223, где $U^{5'}$ представляет собой -H.

227. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 213, где указанный

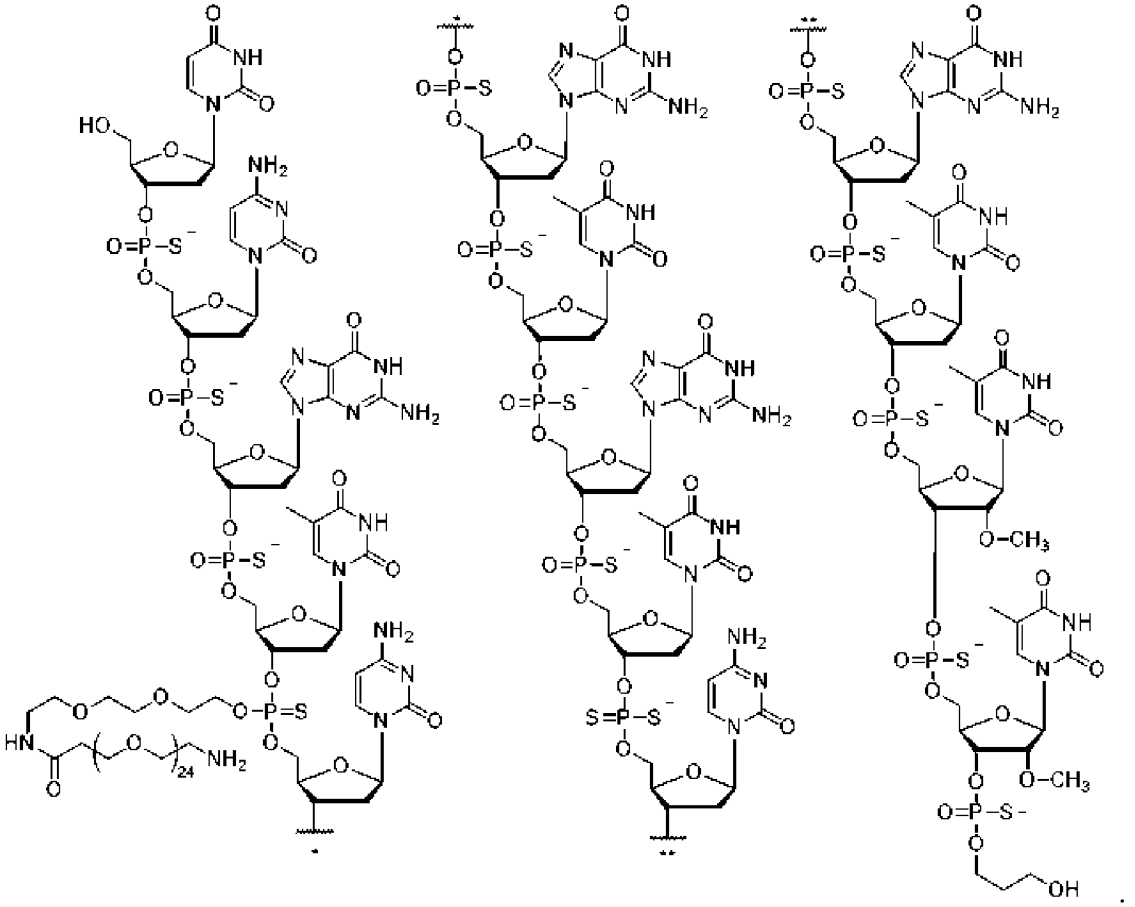
олигонуклеотид представляет собой



228. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 213, где указанный олигонуклеотид представляет собой



229. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 213, где указанный олигонуклеотид представляет собой



230. Иммуномодулирующий олигонуклеотид по п. 213, где указанный олигонуклеотид выбран из группы, состоящей из олигонуклеотидов, указанных в ***таблице* 12,** или его фармацевтически приемлемая соль.

231. Иммуномодулирующий олигонуклеотид, выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 10** и ***таблицы* 12,** или его фармацевтически приемлемая соль.

232. Конъюгат, содержащий белок, по меньшей мере, одну последовательность пептида Q-метки, содержащую глутаминовый остаток, и, по меньшей мере, один иммуномодулирующий олигонуклеотид, где последовательность пептида Q-метки является природной или синтетической, и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с Q-меткой через амидную связь с глутаминовым остатком, где, по меньшей мере, одна последовательность пептида Q-метки выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-55.

233. Конъюгат по п. 232, где иммуномодулирующий олигонуклеотид имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 10** и ***таблицы* 12.**

234. Конъюгат по п. 232 или 233, где белок представляет собой антитело, содержащее вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), и где VH содержит последовательность SEQ ID NO: 56; и VL содержит

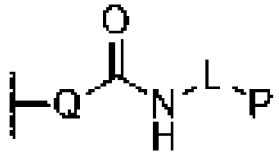
последовательность SEQ ID NO: 57.

235. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-194 или любому из пп. 232-234.

236. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-231.

237. Набор, содержащий конъюгат по любому из пп. 1-194 или любому из пп. 232-234, и инструкции по применению конъюгата.

238. Способ получения конъюгата, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q) содержащим аминокислотную последовательность RPQGF (SEQ ID NO:47), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),


(A),

где:

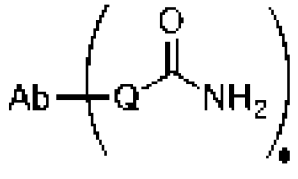
〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо содержит последовательность пептида Q-метки RPQGF (SEQ ID NO:47);

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

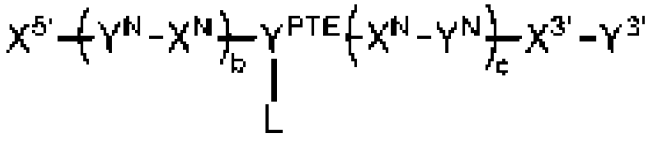
каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид;

включающий контакт соединения формулы (B)


(B),

где Ab и Q имеют значения, определенные для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или несколькими иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где каждый P независимо имеет следующую формулу:


,

где

$X^{5'}$ представляет собой 5' концевой нуклеозид;

$X^{3'}$ представляет собой 3' концевой нуклеозид;

Y^{PTE} представляет собой межнуклеозидный фосфотриэфир;

$Y^{3'}$ представляет собой концевой фосфотриэфир;

каждый X^N независимо представляет собой нуклеозид;

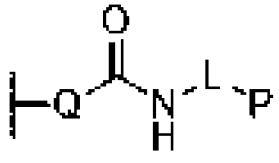
каждый Y^N независимо представляет собой межнуклеозидный линкер;

каждый b и c независимо представляет собой целое число от 1 до 25; при условии, что сумма b и c равна по меньшей мере, 5; и

L представляет собой линкерную группу, содержащий концевой амин,

в присутствии трансглутаминазы.

239. Способ получения конъюгата, содержащего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab) и один или несколько иммуномодулирующих олигонуклеотидов (P), где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с одним или несколькими пептидами Q-метки (Q), и где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид связан с пептидом Q-метки посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L), как показано в формуле (A),



(A),

где:

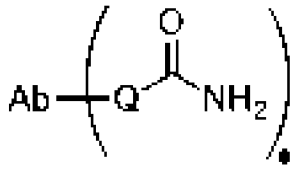
〰 указывает место присоединения каждого Q к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (Ab);

каждый Q независимо представляет собой пептид Q-метки, содержащий, по меньшей мере, один глутаминовый остаток;

каждый L независимо представляет собой связь или линкерную группу, соединенную с Q через амидную связь с глутаминовым остатком; и

каждый P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид;

включающий контакт соединения формулы (B)



(B),

где Ab и Q имеют значения, определенные для формулы (A) выше, и e представляет собой целое число от 1 до 20,

с одним или более иммуномодулирующими олигонуклеотидами P, где каждый олигонуклеотид P независимо представляет собой иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (C) по любому из пп. 195-212 или иммуномодулирующий олигонуклеотид формулы (D) по любому из пп. 213-231,

в присутствии трансглутаминазы.

240. Способ по п. 238 или п. 239, где каждый иммуномодулирующий олигонуклеотид независимо представляет собой олигонуклеотид формулы (C) или формулы (D), выбранный из группы, состоящей из олигонуклеотидов из ***таблицы* 10** и ***таблицы* 12.**

241. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD22, где указанное антитело или его фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где VH домен содержит последовательность VH домена, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 64-67; и

где VL домен содержит последовательность VL домена, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 68-91.

242. Антитело по п. 241, где указанное антитело представляет собой Fab, F(ab')2, Fab'-SH, Fv, scFv, однодоменное антитело, антитело с одной тяжелой цепью или одной легкой цепью или фрагмент антитела.

243. Антитело по п. 241, где указанное антитело содержит Fc область.

244. Антитело по п. 243, где Fc область представляет собой Fc область человека, выбранную из группы, состоящей из Fc области IgG1, Fc области IgG2 и Fc области IgG4.

245. Антитело по п. 244, где Fc область представляет собой Fc область IgG1, IgG2 или IgG4 человека дикого типа.

246. Антитело по п. 244, где Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые уменьшают связывание с C1q.

247. Антитело по п. 244, где Fc область представляет собой Fc область человека, содержащую одну или несколько аминокислотных замен, которые снижают эффекторную функцию, по сравнению с Fc областью человека, где отсутствует(ют) аминокислотная(ые) замена(ы).

248. Антитело по п. 244, где Fc область представляет собой:

(a) Fc область IgG1 человека, содержащую замены L234A, L235A и/или G237A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU;

(b) Fc область IgG2 человека, содержащую замены A330S и/или P331S, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU; или

(c) Fc область IgG4 человека, содержащую замены S228P и/или L235E, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

249. Антитело по п. 247 или п. 248, где Fc область дополнительно содержит замену N297A, нумерация аминокислотных положений в соответствии с индексом EU.

250. Антитело по п. 243, где указанное антитело дополнительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 92-110.

251. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи

антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

252. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:180; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

253. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:180; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:34; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

254. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:34; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

255. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи

антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

256. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:182; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:179; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

257. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:185; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:184; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

258. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:185; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:183; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

259. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи

антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:185; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:184; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

260. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:187; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

261. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:186; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:35; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

262. Конъюгат, содержащий антитело (Ab) и иммуномодулирующий олигонуклеотид (P), где антитело содержит две легкие цепи антитела, две тяжелые цепи антитела и два пептида Q-метки; где каждая из легких цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:188; где каждая из тяжелых цепей антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:187; где иммуномодулирующий олигонуклеотид содержит последовательность SEQ ID NO:163; где каждый из пептидов Q-метки (Q) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:49; и где, по меньшей мере, один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом посредством амидной связи с глутаминовым остатком пептида Q-метки и линкером (L).

263. Конъюгат по любому из пп. 251-262, где один из двух пептидов Q-метки связан с иммуномодулирующим олигонуклеотидом.

264. Конъюгат по любому из пп. 251-262, содержащий два иммуномодулирующих олигонуклеотида, где каждый из двух пептидов Q-метки связан с одним из двух иммуномодулирующих олигонуклеотидов.

265. Конъюгат по любому из пп. 261-264, где линкер содержит линкерную группу , где m представляет собой целое число 24, и где ~~~ † указывает точку присоединения к P, и ~~~ ‡ указывает точку присоединения к остальной части конъюгата, соединенного с Q через амидную связь с глутаминовым остатком.

266. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-194 или по любому из пп. 232-234 и 251-265, или антитело по любому из пп. 241-250, и фармацевтически приемлемый носитель.

267. Способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-194 или любому из пп. 232-234 и 251-265, антитела по любому из пп. 241-250, или фармацевтической композиции по п. 235 или п. 266.

268. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуномодулирующий олигонуклеотид по любому из пп. 195-231 и фармацевтически приемлемый носитель.

269. Способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества иммуномодулирующего олигонуклеотида по любому из пп. 195-231 или фармацевтической композиции по п. 236 или п. 268.

270. Способ по п. 267 или п. 269, где рак представляет собой В-клеточный рак.

271. Способ по п. 267 или п. 269, где рак представляет собой рак молочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак головы и шеи, меланому, лимфому или лейкоз.

272. Способ по любому из пп. 267 и 269-271, где указанное антитело или конъюгат специфически связывает антиген, экспрессируемый раком или стромой, ассоциированной с раком.

273. Антитело, которое связывается с CD22 человека, где указанное антитело содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, где тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:179 или 180, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:181 или 182.

274. Антитело по п. 273, где:

(a) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:179, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:181; или

(b) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:179, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:182.

275. Антитело по п. 273, где:

(a) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:180, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:181; или

(b) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:180, и легкая

цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:182.

276. Антитело, которое связывается с Her2 человека, где указанное антитело содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, где тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO: 183, 184, 186 или 187, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:185 или 188.

277. Антитело по п. 276, где:

(a) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:183, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:185;

(b) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:184, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:185;

(c) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:186, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:185; или

(d) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:187, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:185.

278. Антитело по п. 276, где:

(a) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:183, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:188;

(b) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:184, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:188;

(c) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:186, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:188; или

(d) тяжелая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:187, и легкая цепь антитела содержит последовательность SEQ ID NO:188.

279. Способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества: (a) ингибитора иммунной контрольной точки и (b) конъюгата по любому из пп. 1-15, 25-96, 106-159, 162-175 и 179-194, или любому из пп. 232-234 и 251-265, или фармацевтической композиции по п.235 или п.266; где рак является трудно поддающимся лечению или резистентным к ингибитору иммунной контрольной точки при введении в отсутствие конъюгата; и где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD22 человека.

280. Способ по п. 279, где ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1.

281. Способ по п. 280, где ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.

282. Способ по любому из пп. 279-281, где введение приводит к уменьшению роста, размера и/или объема рака.

283. Способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-15, 25-96, 106-159, 162-175 и 179-194, или любому из пп. 232-234 и 251-265 или фармацевтической композиции по п. 235 или п. 266; где введение приводит к активации B-клеток у индивидуума.

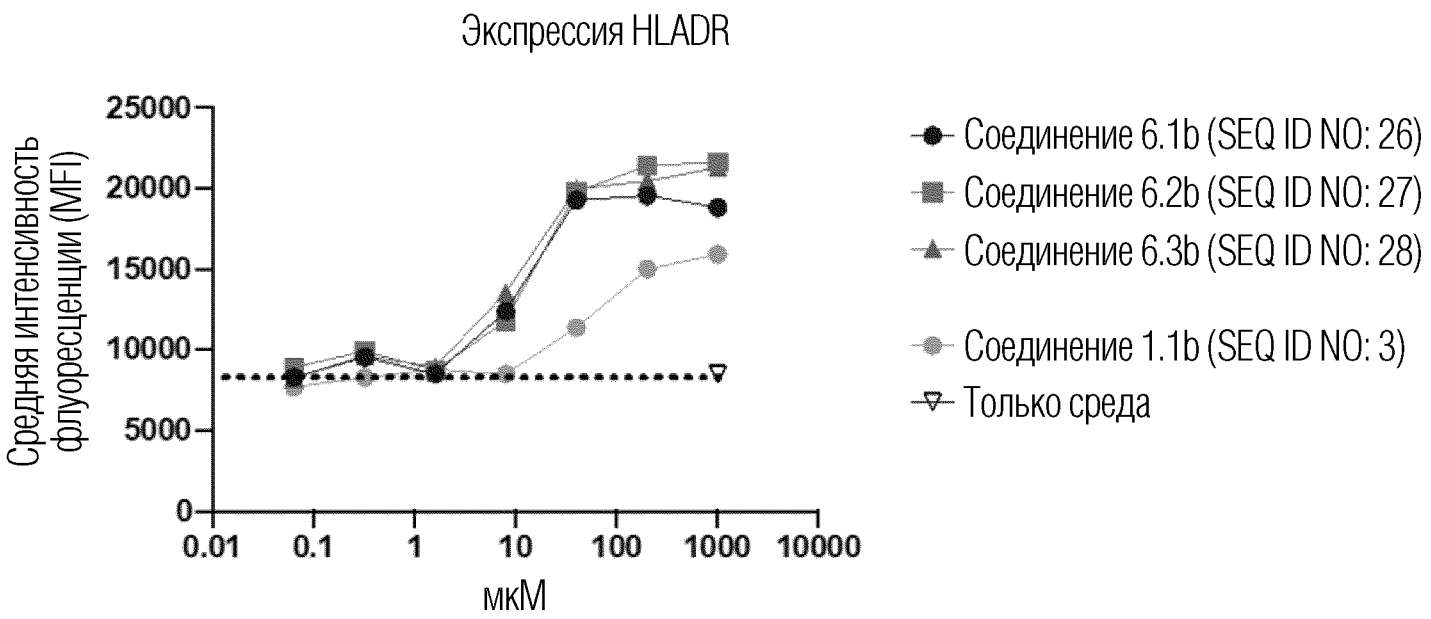
284. Способ по п. 283, где введение приводит к уменьшению роста, размера и/или объема рака.

285. Способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-15, 25-96, 106-159, 162-175 и 179-194, или любому из пп. 232-234 и 251-265 или фармацевтической композиции по п. 235 или п. 266; где рак выбран из группы, состоящей из плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), почечно-клеточной карциномы (RCC), рака желудка, гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), рака пищевода, рака шейки матки, плоскоклеточного рака шейки матки, карциномы из клеток Меркле, рака эндометрия, рака яичников, рака поджелудочной железы, меланомы, меланомы кожи, саркомы, колоректального рака, рака молочной железы, мелкоклеточного рака легкого (SCLC), плоскоклеточного рака кожи и уротелиальной карциномы.

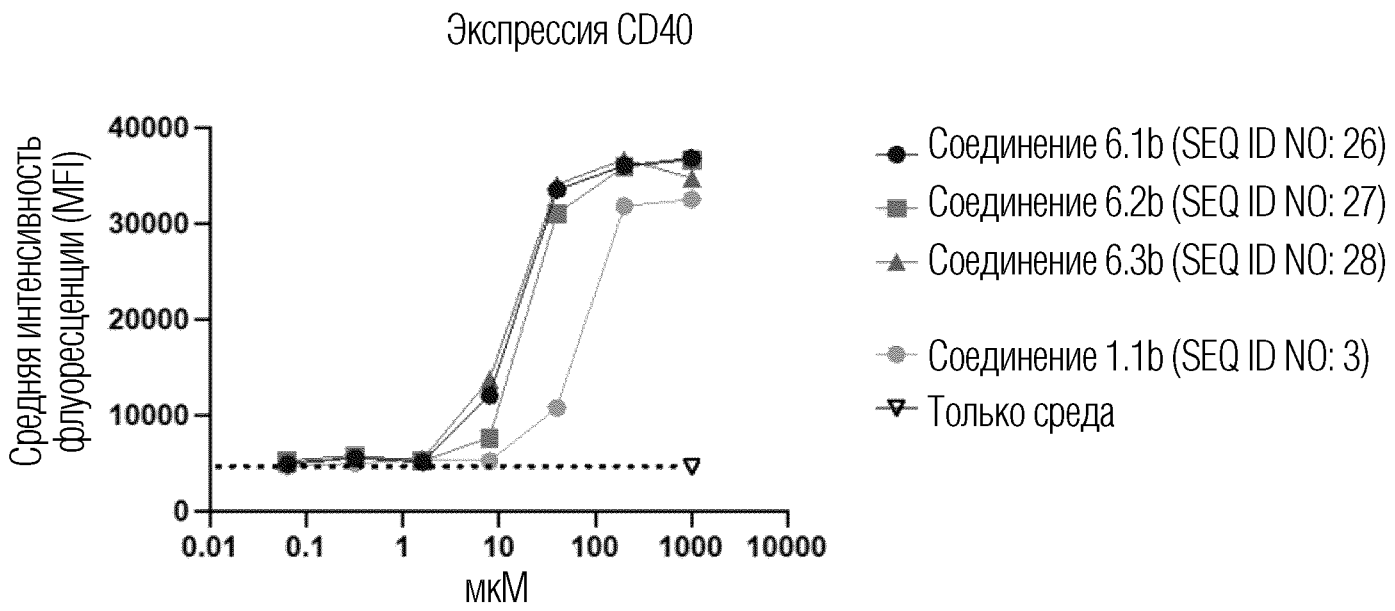
286. Способ лечения рака, связанного с В-клетками, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-15, 25-96, 106-159, 162-175 и 179-194, или любому из пп. 232-234 и 251-265, или фармацевтической композиции по п. 235 или п. 266; где рак выбран из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза (ALL), волосатоклеточного лейкоза и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL).

287. Способ лечения рака, включающий введение индивидууму эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-4, 16-85, 97-155, 160-171 и 176-194 или любому из пп. 251-265 или фармацевтической композиции по п. 235 или п. 266; где рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, уротелиального рака и рака желудка.

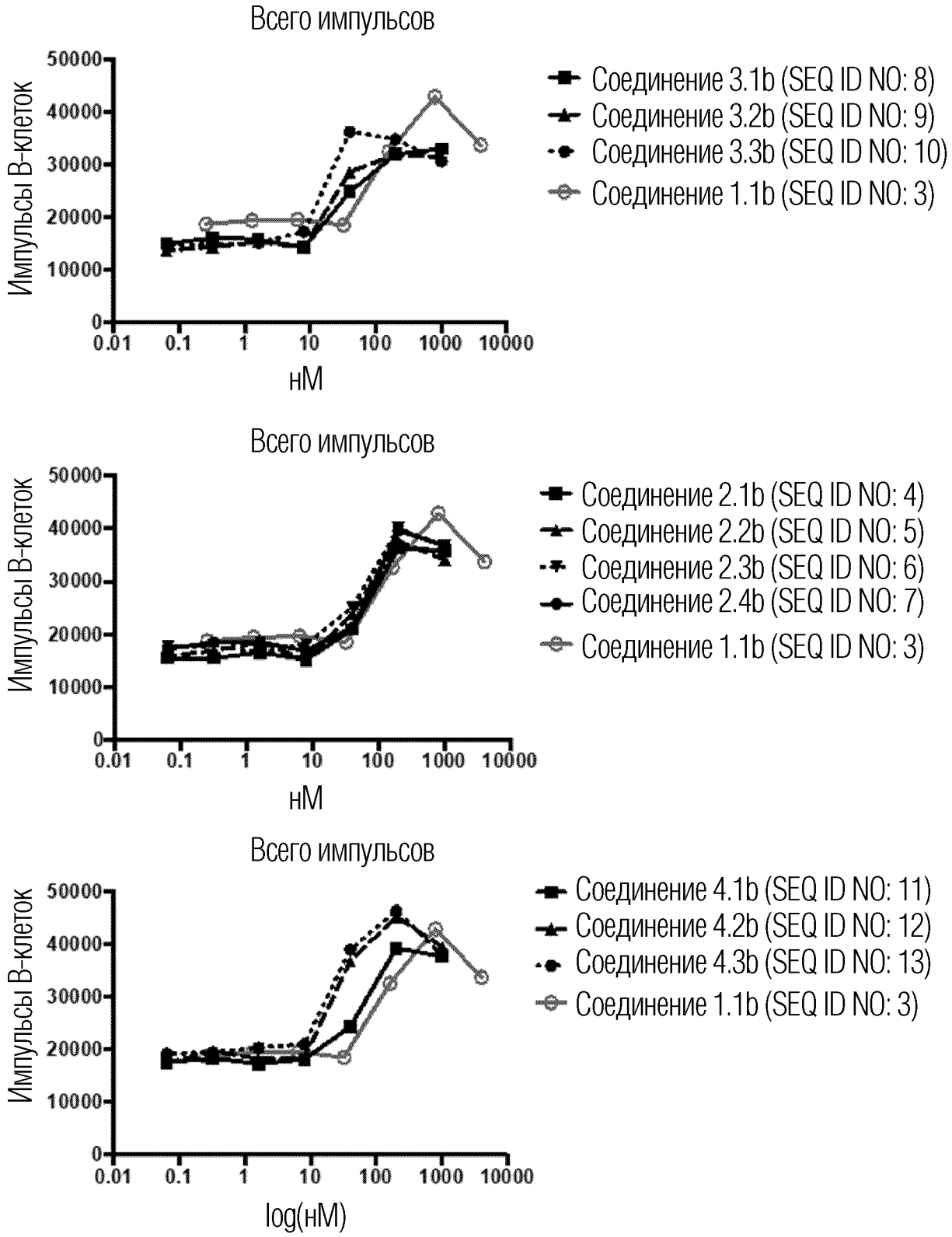
По доверенности


Экспрессия HLADR
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
мкМ
Соединение 6.1b (SEQ ID NO: 26)
Соединение 6.2b (SEQ ID NO: 27)
Соединение 6.3b (SEQ ID NO: 28)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)
Только среда

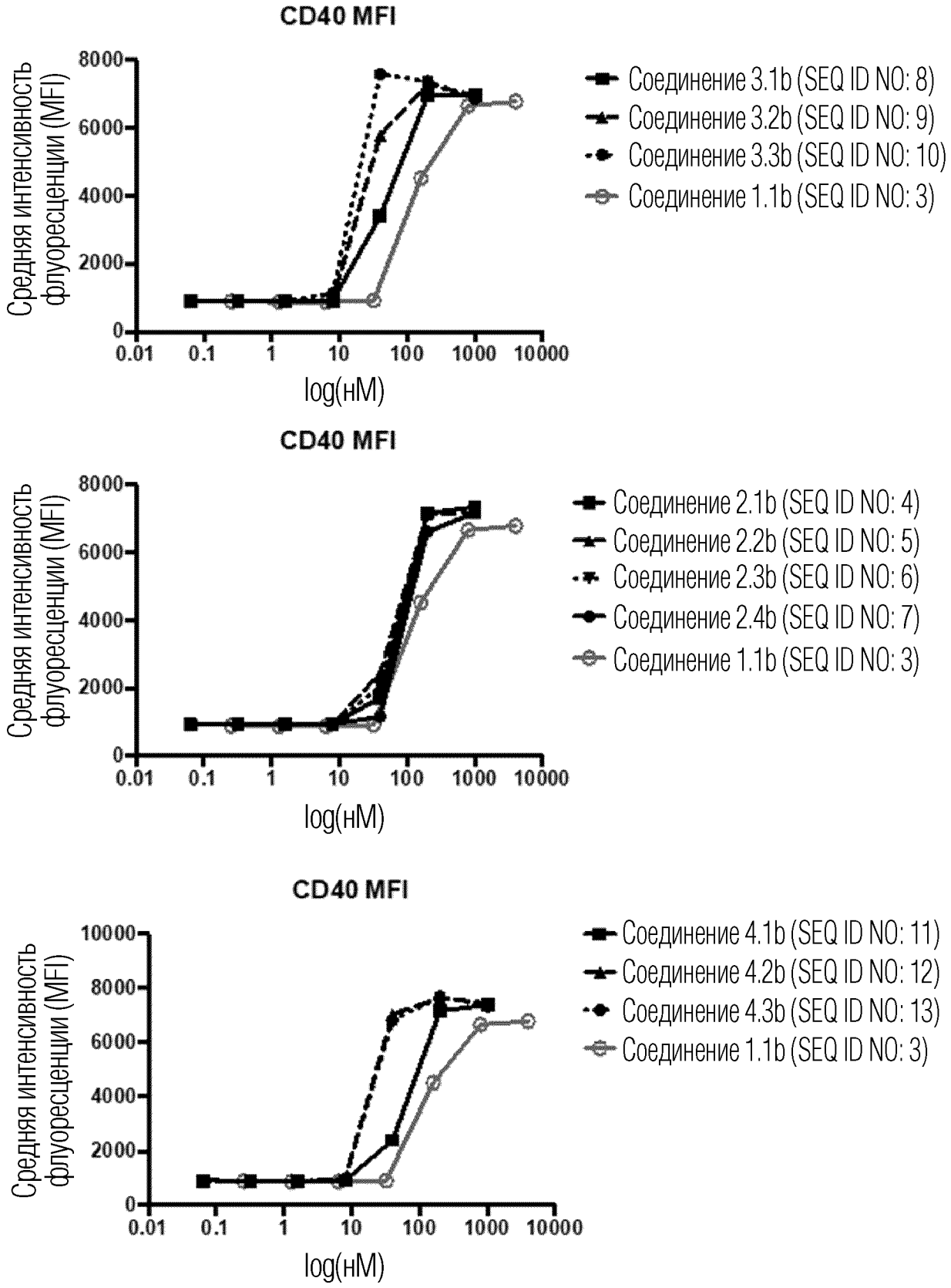
ФИГ. 1А


Экспрессия CD40
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
мкМ
Соединение 6.1b (SEQ ID NO: 26)
Соединение 6.2b (SEQ ID NO: 27)
Соединение 6.3b (SEQ ID NO: 28)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)
Только среда

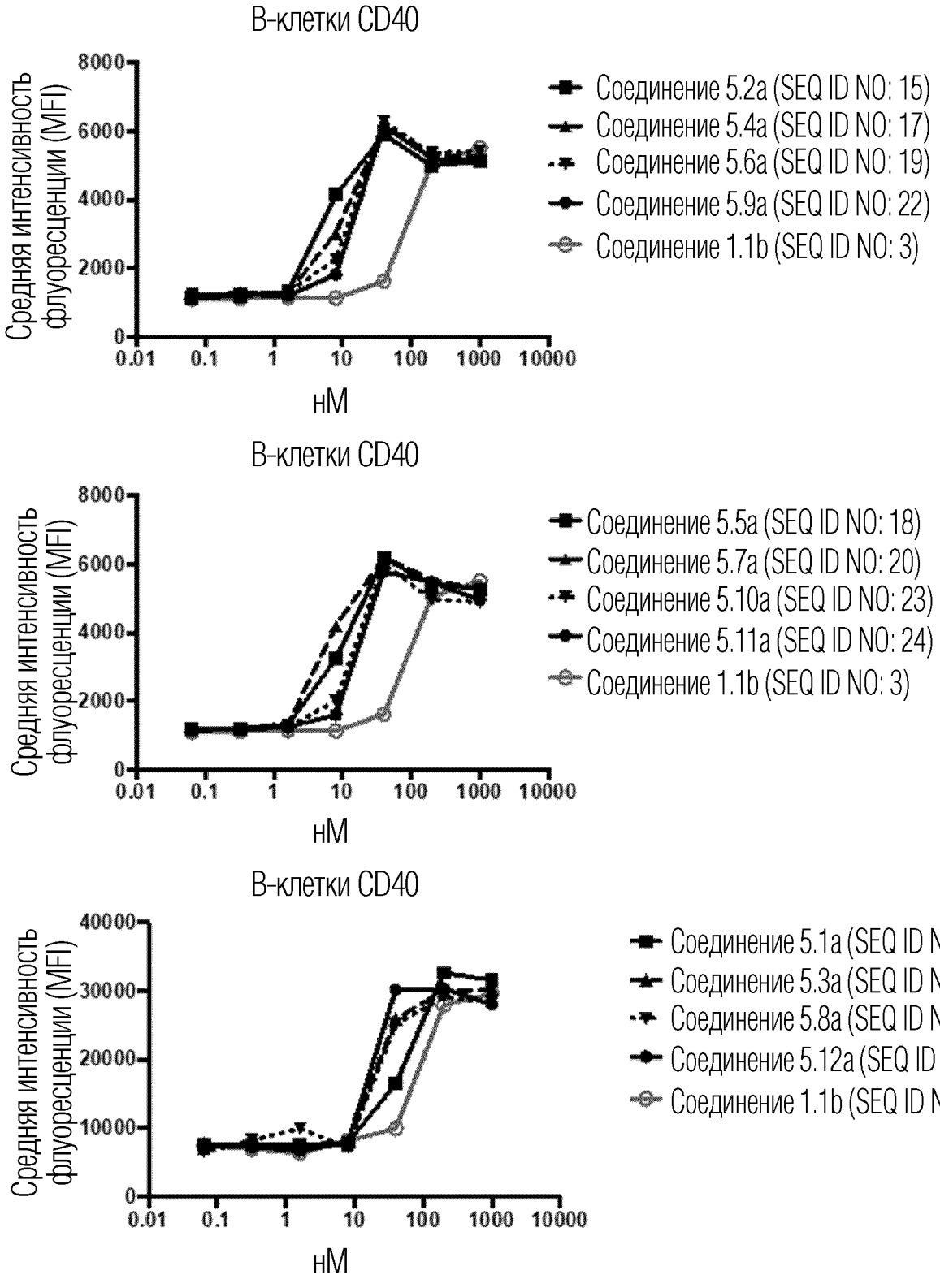
ФИГ. 1B


Всего импульсов
Импульсы В-клеток
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нМ
Соединение 3.1b (SEQ ID NO: 8)
Соединение 3.2b (SEQ ID NO: 9)
Соединение 3.3b (SEQ ID NO: 10)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)
Всего импульсов
Импульсы В-клеток
нМ
Соединение 2.1b (SEQ ID NO: 4)
Соединение 2.2b (SEQ ID NO: 5)
Соединение 2.3b (SEQ ID NO: 6)
Соединение 2.4b (SEQ ID NO: 7)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)
Всего импульсов
Импульсы В-клеток
log(нМ)
Соединение 4.1b (SEQ ID NO: 11)
Соединение 4.2b (SEQ ID NO: 12)
Соединение 4.3b (SEQ ID NO: 13)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)

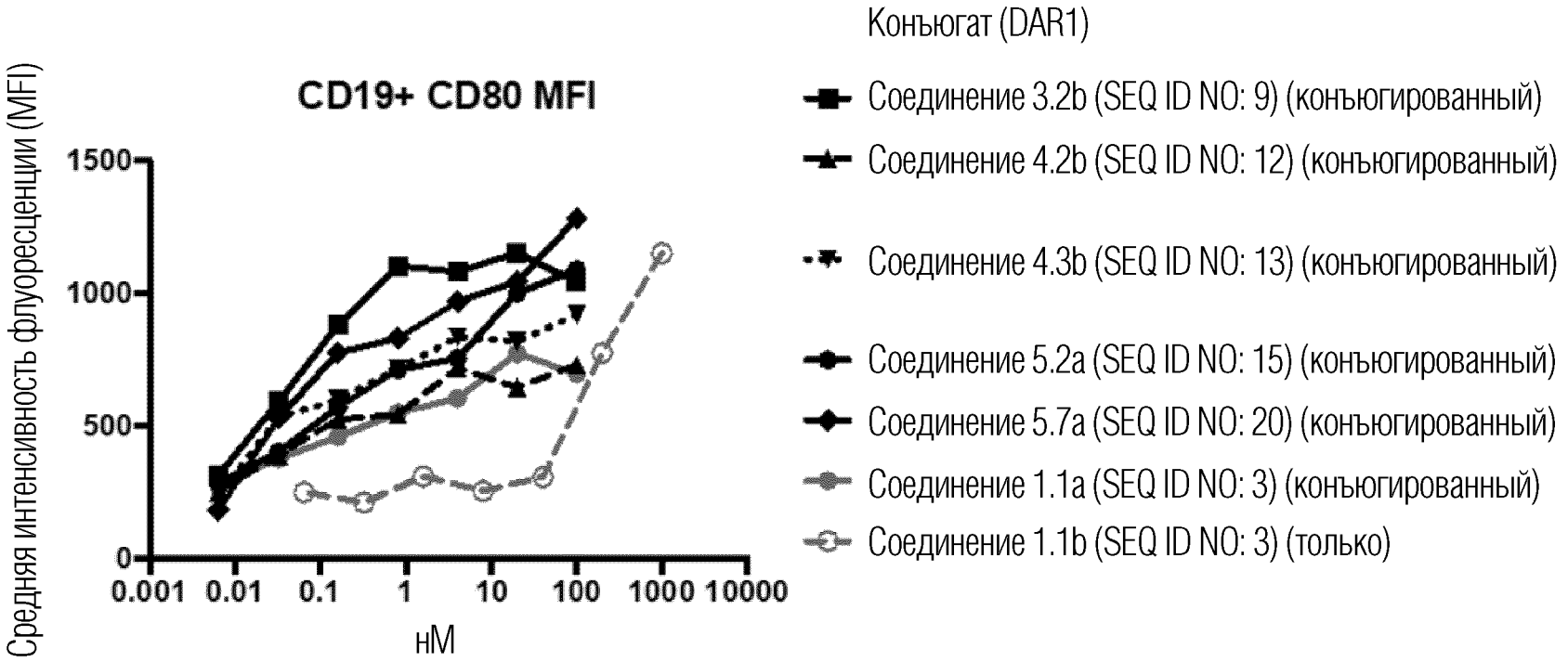
ФИГ. 2А


CD40 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
log(нМ)
Соединение 3.1b (SEQ ID NO: 8)
Соединение 3.2b (SEQ ID NO: 9)
Соединение 3.3b (SEQ ID NO: 10)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)
CD40 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
log(нМ)
Соединение 2.1b (SEQ ID NO: 4)
Соединение 2.2b (SEQ ID NO: 5)
Соединение 2.3b (SEQ ID NO: 6)
Соединение 2.4b (SEQ ID NO: 7)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)
CD40 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
log(нМ)
Соединение 4.1b (SEQ ID NO: 11)
Соединение 4.2b (SEQ ID NO: 12)
Соединение 4.3b (SEQ ID NO: 13)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)

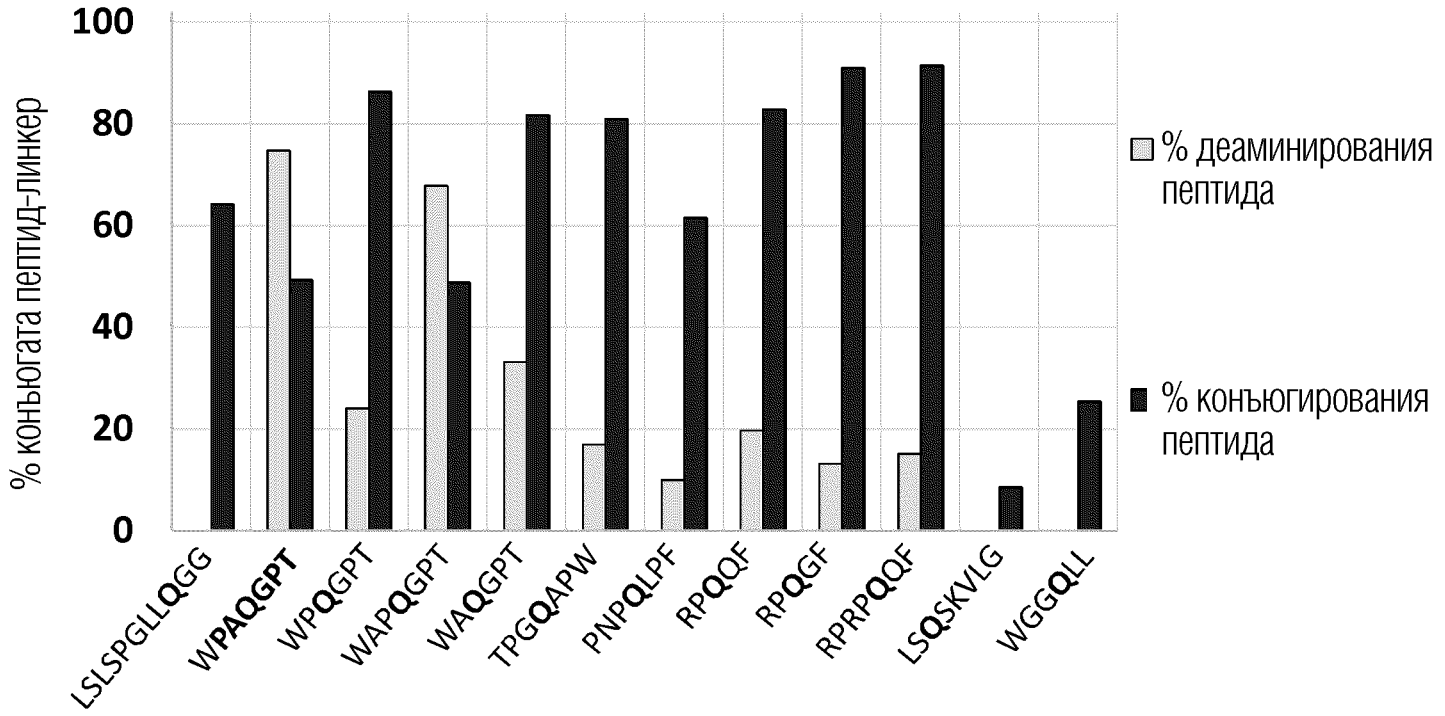
ФИГ. 2B


B-клетки CD40
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нМ
Соединение 5.2a (SEQ ID NO: 15)
Соединение 5.4a (SEQ ID NO: 17)
Соединение 5.6a (SEQ ID NO: 19)
Соединение 5.9a (SEQ ID NO: 22)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)
B-клетки CD40
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нМ
Соединение 5.5a (SEQ ID NO: 18)
Соединение 5.7a (SEQ ID NO: 20)
Соединение 5.10a (SEQ ID NO: 23)
Соединение 5.11a (SEQ ID NO: 24)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)
B-клетки CD40
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нМ
Соединение 5.1a (SEQ ID NO: 14)
Соединение 5.3a (SEQ ID NO: 16)
Соединение 5.8a (SEQ ID NO: 21)
Соединение 5.12a (SEQ ID NO: 25)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3)

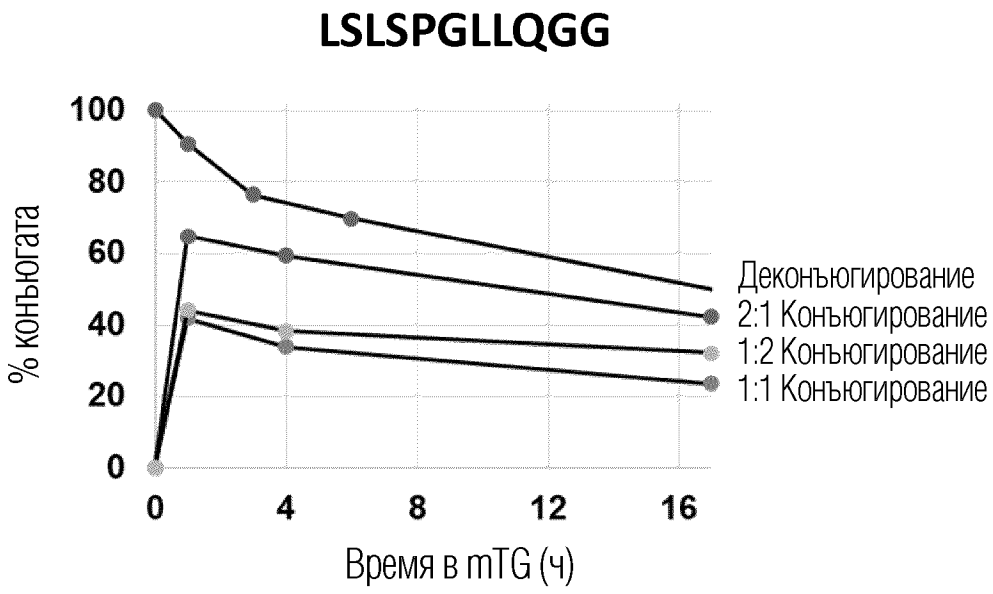
ФИГ. 2C


CD19+ CD80 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
1500
1000
500
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нМ
Конъюгат (DAR1)
Соединение 3.2b (SEQ ID NO: 9) (конъюгированный)
Соединение 4.2b (SEQ ID NO: 12) (конъюгированный)
Соединение 4.3b (SEQ ID NO: 13) (конъюгированный)
Соединение 5.2a (SEQ ID NO: 15) (конъюгированный)
Соединение 5.7a (SEQ ID NO: 20) (конъюгированный)
Соединение 1.1a (SEQ ID NO: 3) (конъюгированный)
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3) (только)

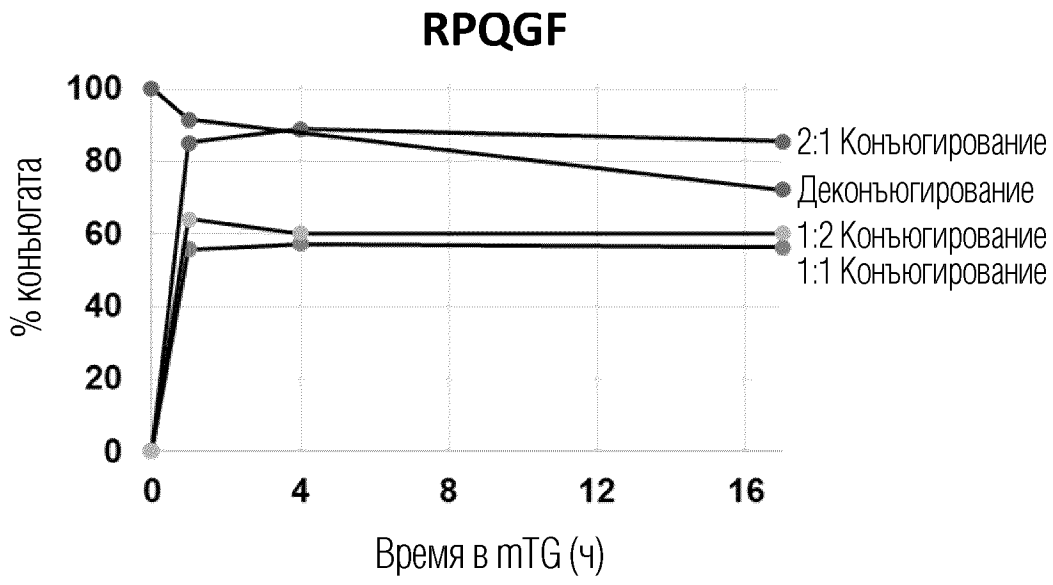
ФИГ. 2D


% конъюгата пептид-линкер
100
80
60
40
20
0
LSLSPGLLQGG
WPAQGPT
WPQGPT
WAPQGPT
WAQGPT
TPGQAPW
PNPQLPF
RPQQF
RPQGF
RPRPQQF
LSQSKVLG
WGGQLL
% деаминирования пептида
% конъюгирования пептида

ФИГ. 3

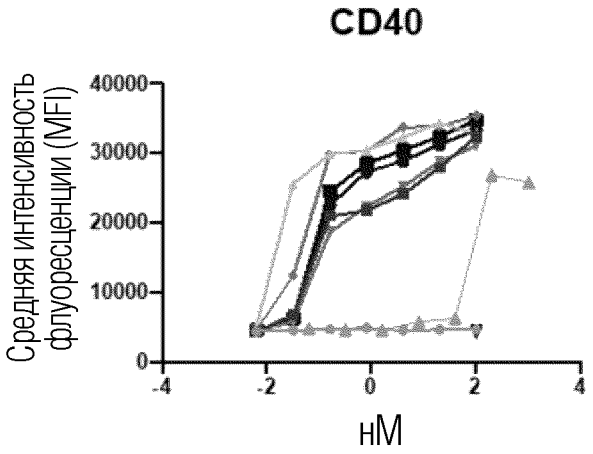

LSLSPGLLQGG
100
80
60
40
20
0
% конъюгата
0
4
8
12
16
Время в mTG (ч)
Деконъюгирование
2:1 Конъюгирование
1:2 Конъюгирование
1:1 Конъюгирование

ФИГ. 4A

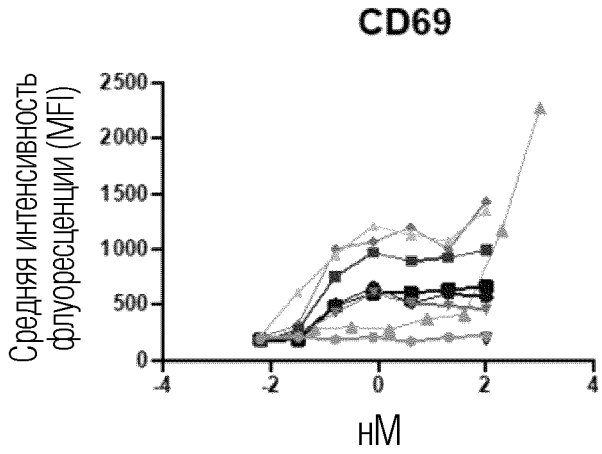

RPQGF
100
80
60
40
20
0
% конъюгата
0
4
8
12
16
Время в mTG (ч)
2:1 Конъюгирование
Деконъюгирование
1:2 Конъюгирование
1:1 Конъюгирование

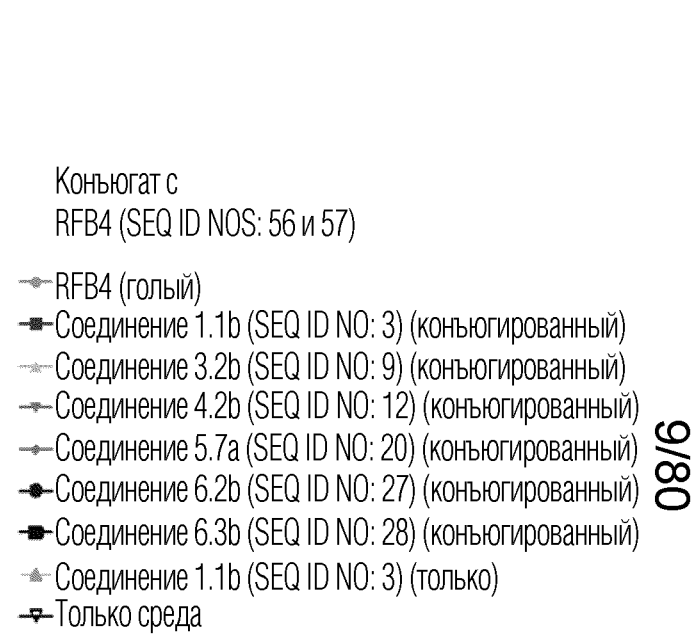
ФИГ. 4B

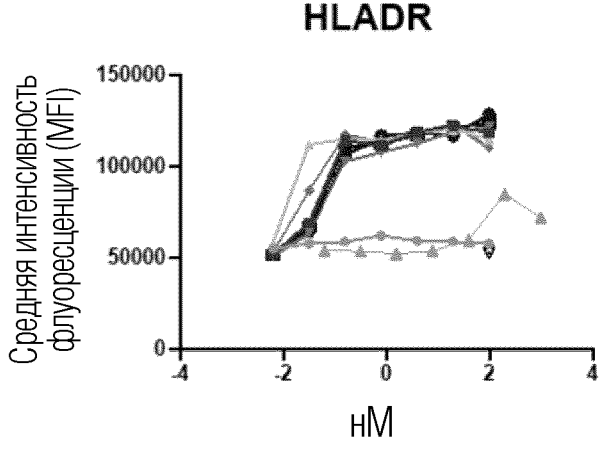
ФИГ. 5A



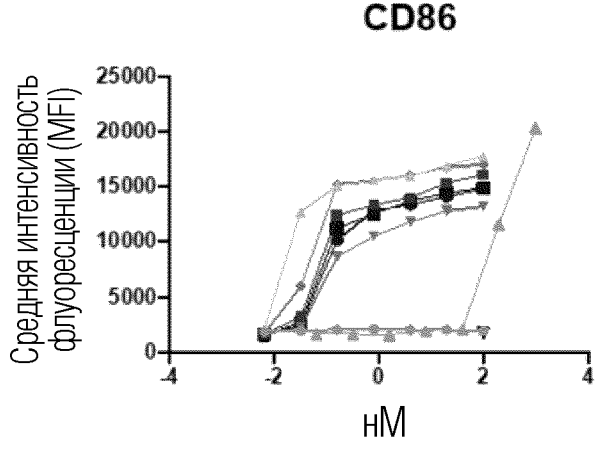
ФИГ. 5B





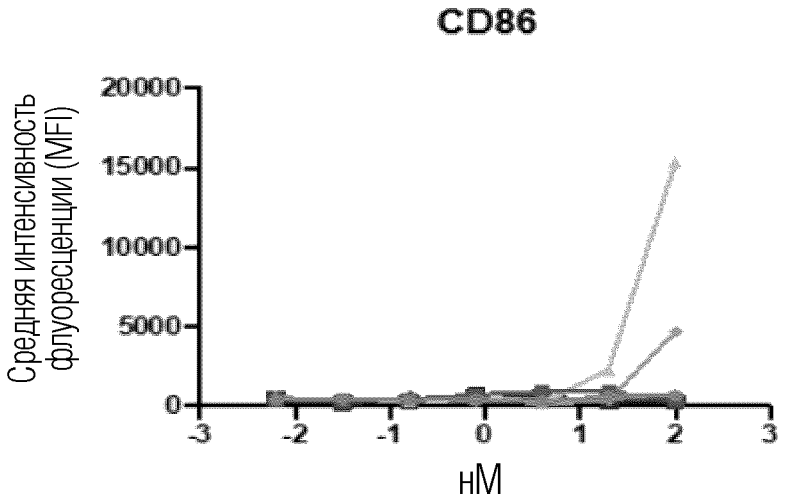


ФИГ. 5C

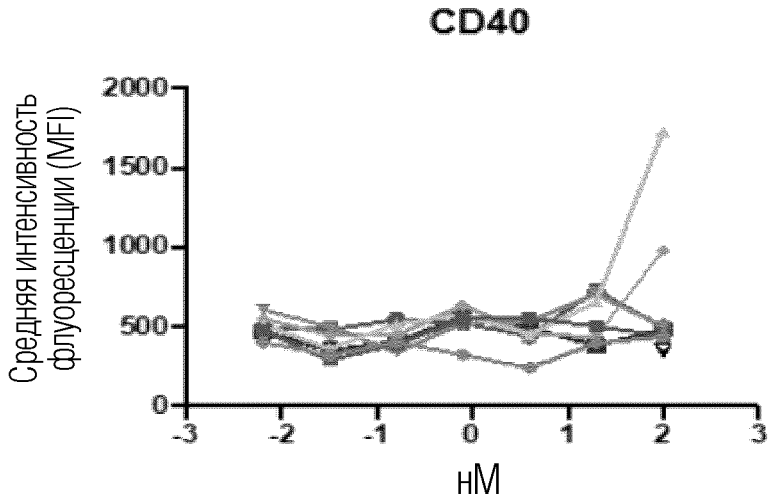


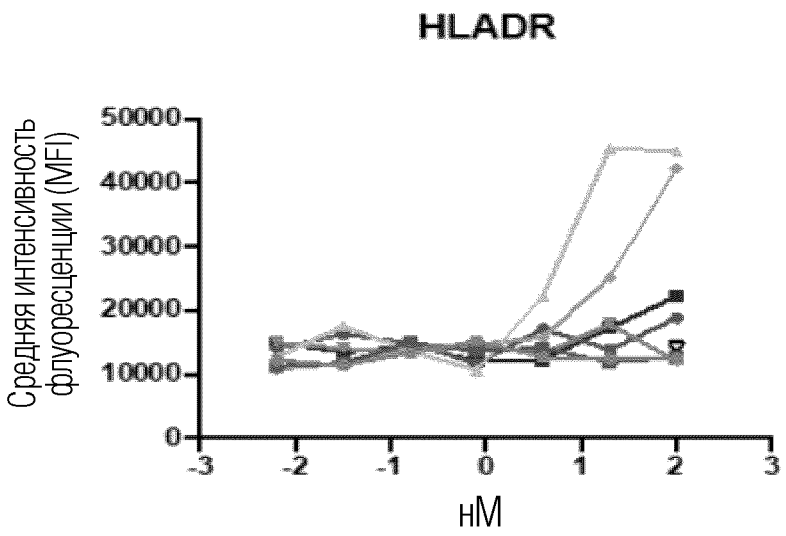
ФИГ. 5D

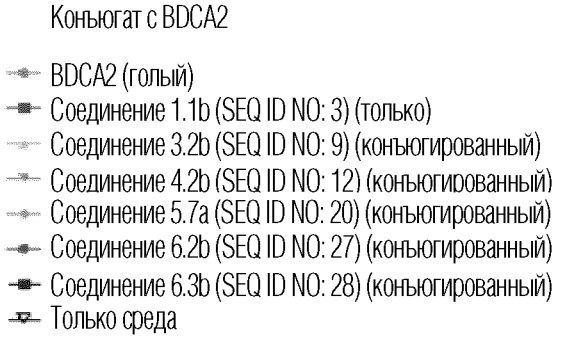
ФИГ. 6A



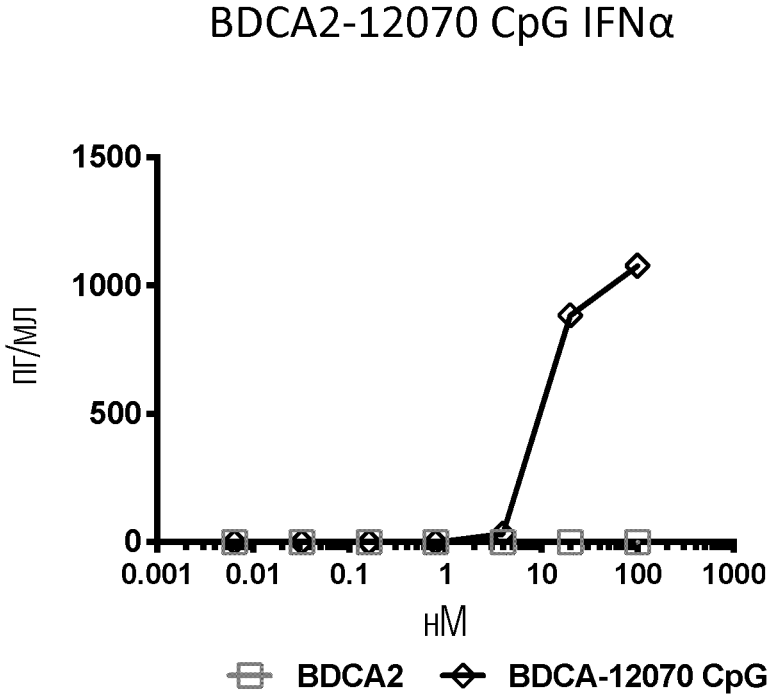
ФИГ. 6B





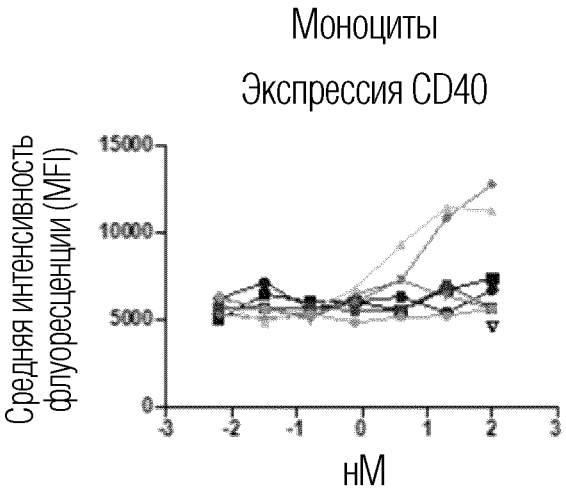


ФИГ. 6C

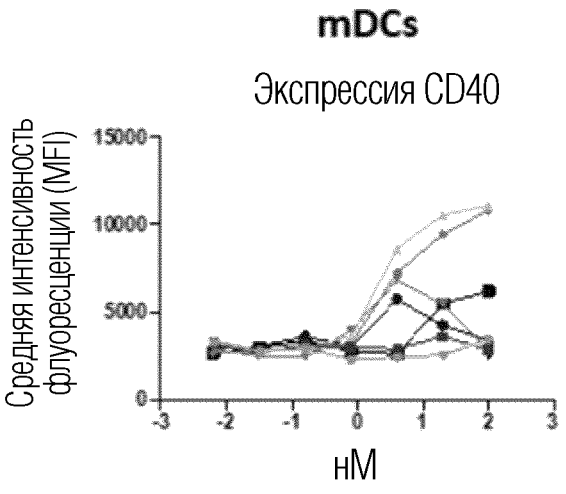

BDCA2-12070 CpG IFNα
1500
1000
500
0
пг/мл
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
нМ
BDCA2
BDCA-12070 CpG

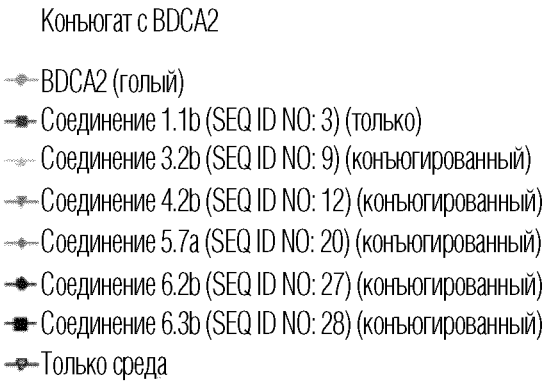
ФИГ. 6D

ФИГ. 7A

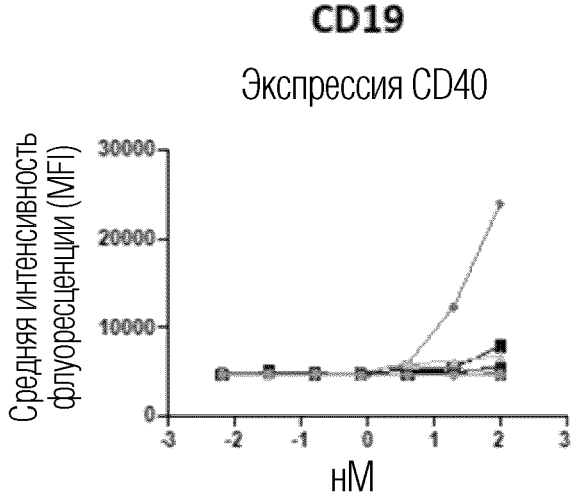


ФИГ. 7B



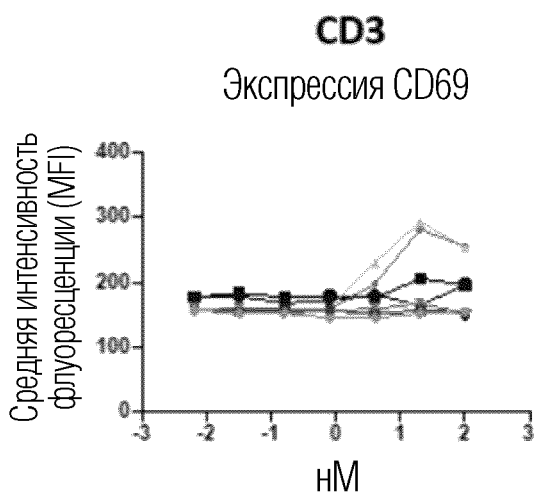


CD19

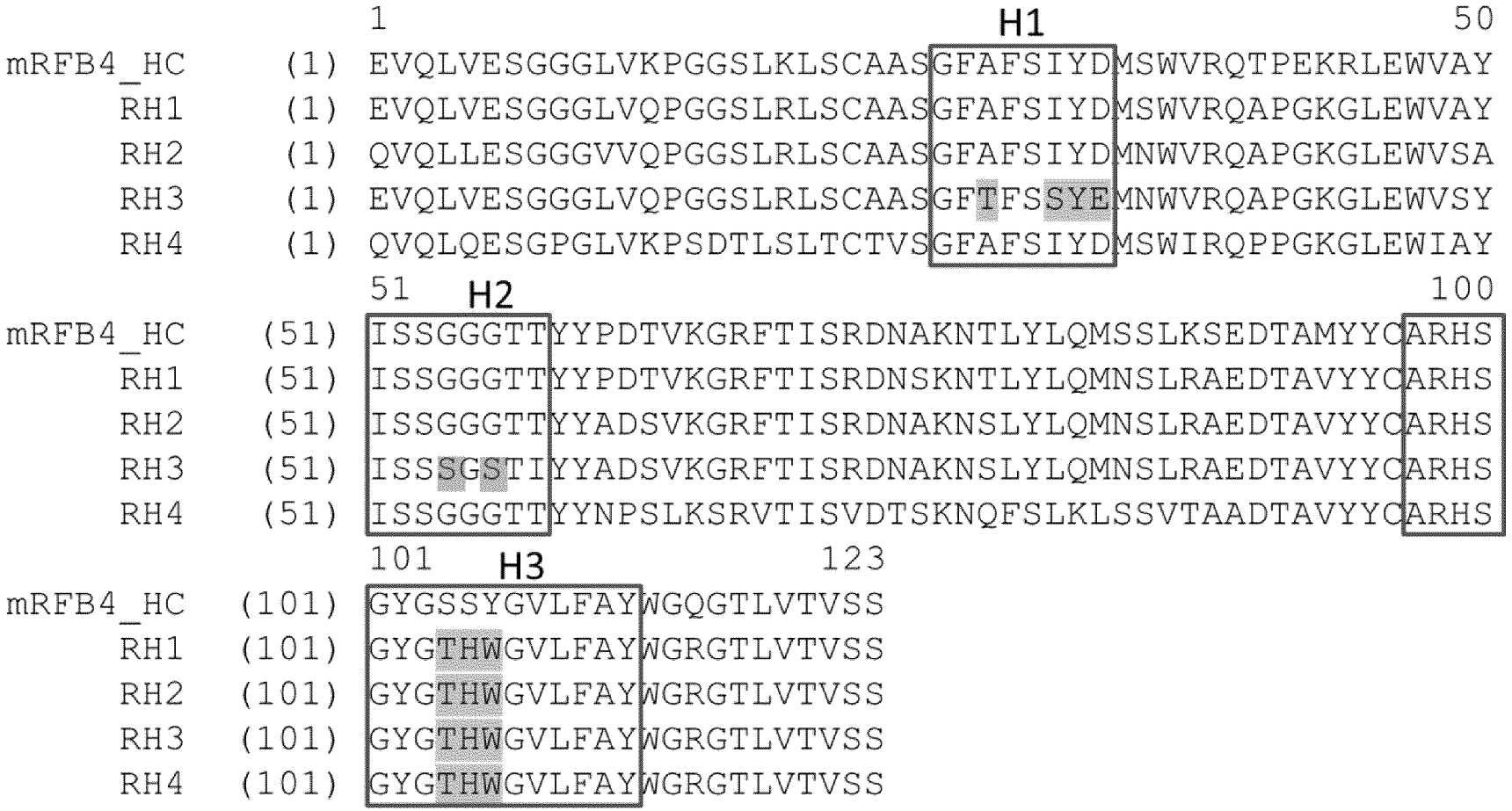


ФИГ. 7C

CD3



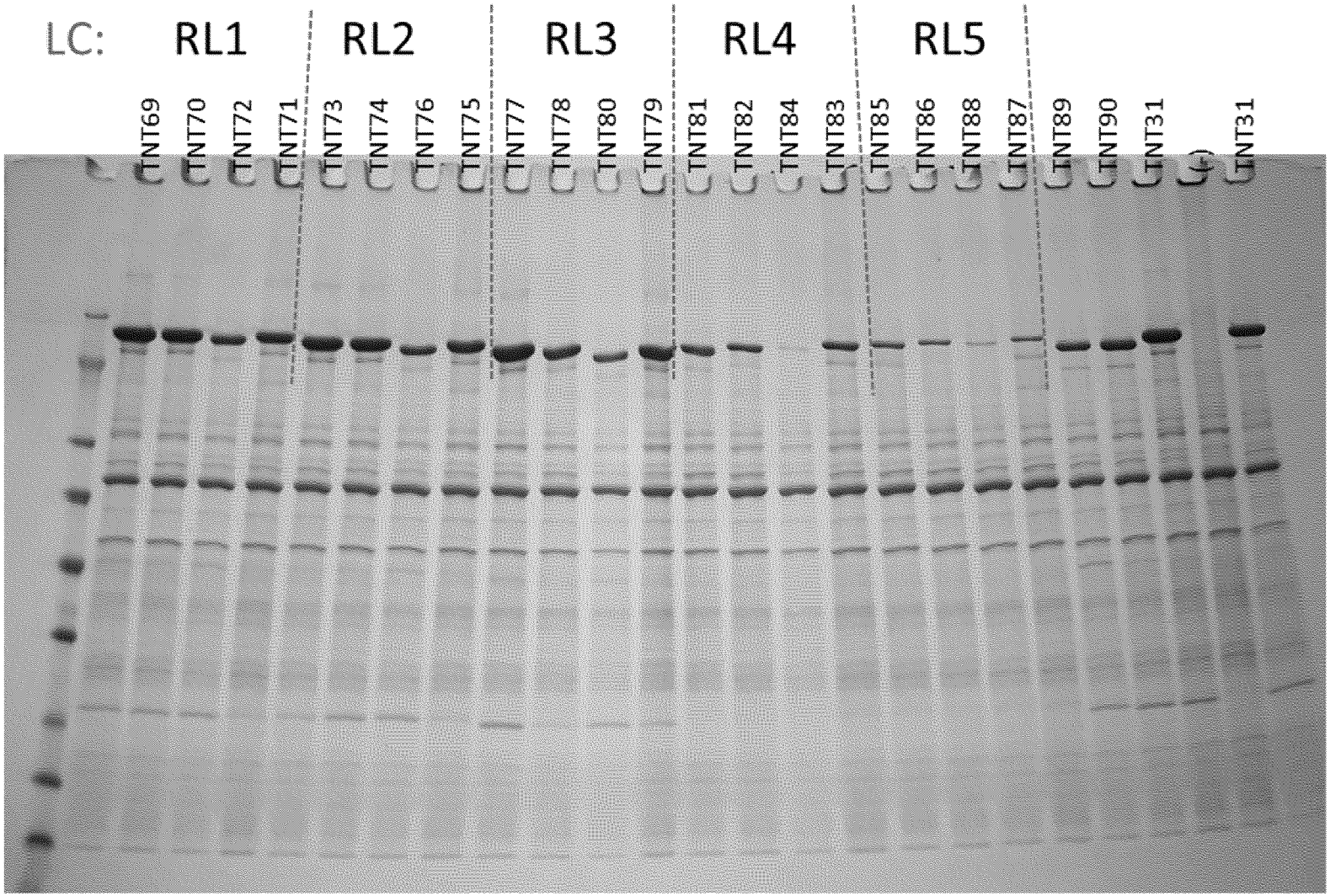
ФИГ. 7D


1
H1
50
mRFB4_HC (1) EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKRLEWVAY
RH1 (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAY
RH2 (1) QVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMNWVRQAPGKGLEWVSA
RH3 (1) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSY
RH4 (1) QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFAFSIYDMSWIRQPPGKGLEWIAY
51
H2
100
mRFB4_HC (51) ISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHS
RH1 (51) ISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHS
RH2 (51) ISSGGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHS
RH3 (51) ISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHS
RH4 (51) ISSGGGTTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHS
101
H3
123
mRFB4_HC (101) GYGSSYGVLFAYWGQGTLVTVSS
RH1 (101) GYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS
RH2 (101) GYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS
RH3 (101) GYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS
RH4 (101) GYGTHWGVLFAYWGRGTLVTVSS

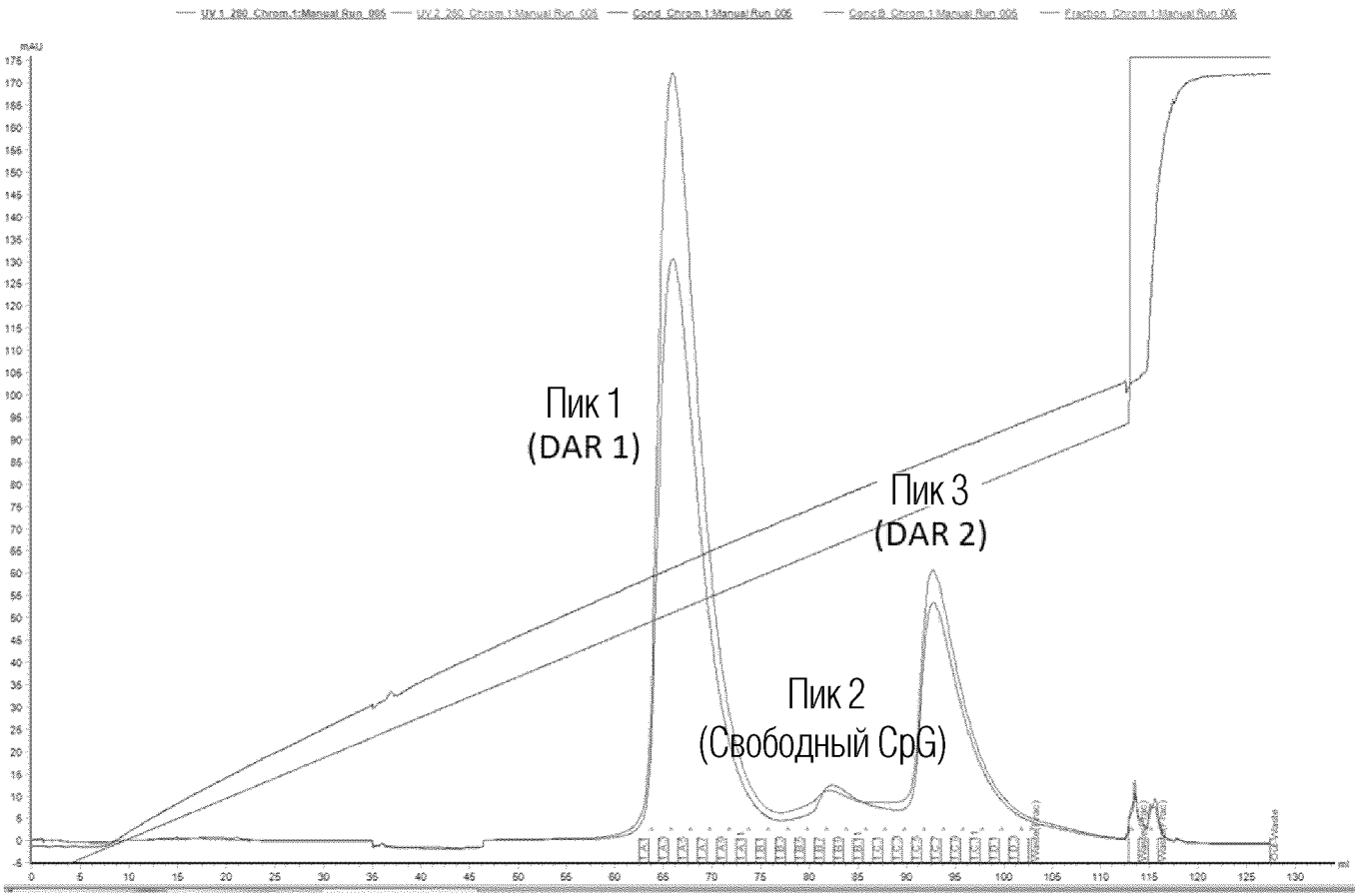
ФИГ. 8А


1
L1
50
mRFB4_LC (1) DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYY
RL1 (1) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHGYLNWYQQKPGKAPKLLIYY
RL2 (1) DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIHGYLAWYQQKPGKAPKLLIYY
RL3 (1) DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA
RL4 (1) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHGYLNWYQQKPGQAPRLLIYY
RL5 (1) DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASQDIHGYLNWYQQKPGQSPQLLIYY
51
L2
L3
100
mRFB4_LC (51) TSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGG
RL1 (51) TSILHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQ
RL2 (51) TSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQ
RL3 (51) ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQ
RL4 (51) TSILHSGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQGNTLPWTFGG
RL5 (51) TSILHSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCQQGNTLPWTFGG
101
mRFB4_LC (101) GTKLEIK
RL1 (101) GTKLEIK
RL2 (101) GTKLEIK
RL3 (101) GTKLEIK
RL4 (101) GTKLEIK
RL5 (101) GTKLEIK

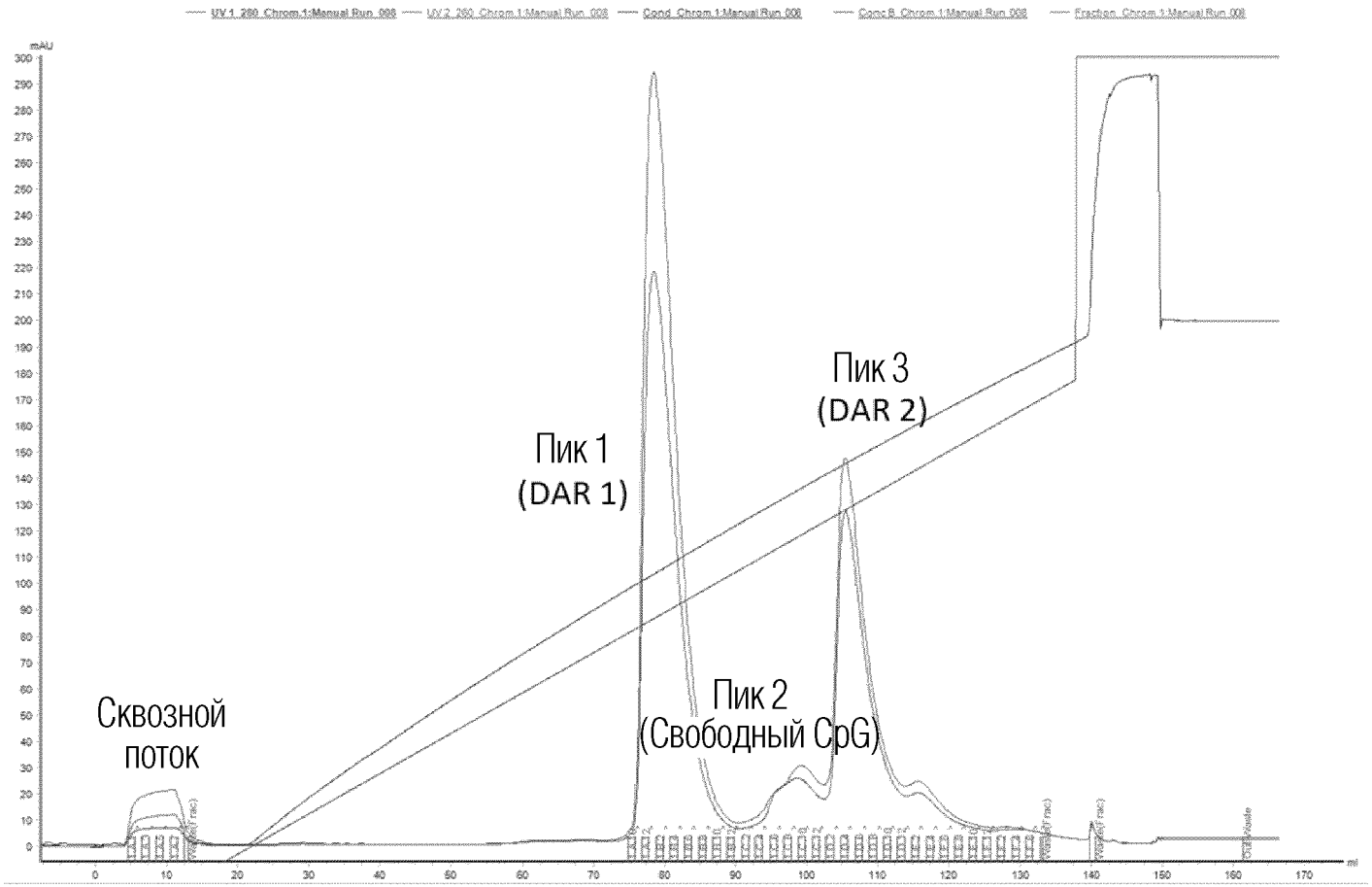
ФИГ. 8B


LC:
RL1
RL2
RL3
RL4
RL5
TNT69
TNT70
TNT72
TNT71
TNT73
TNT74
TNT76
TNT75
TNT77
TNT78
TNT80
TNT79
TNT81
TNT82
TNT84
TNT83
TNT85
TNT86
TNT88
TNT87
TNT89
TNT90
TNT31
(-)
TNT31

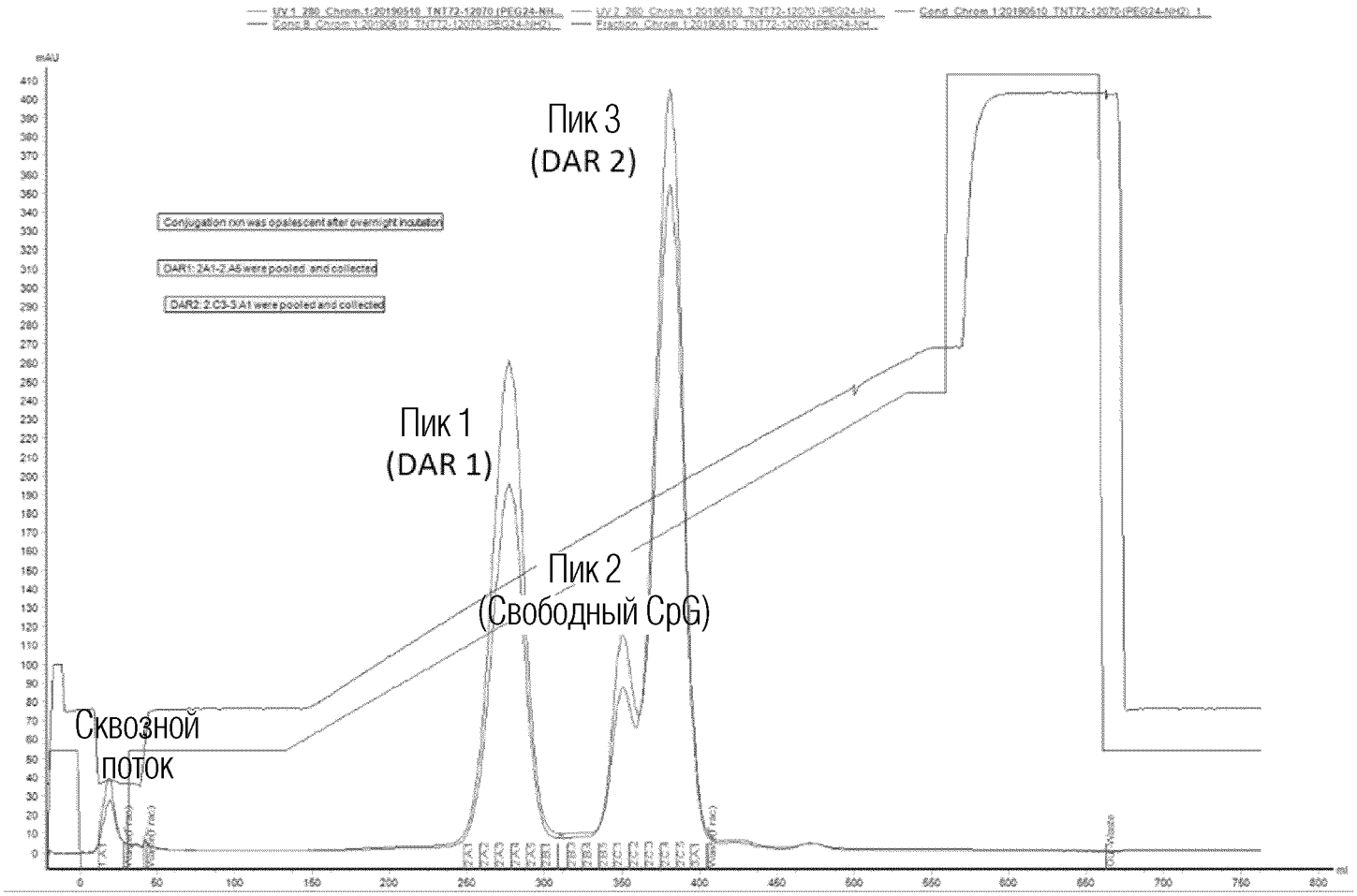
ФИГ. 9



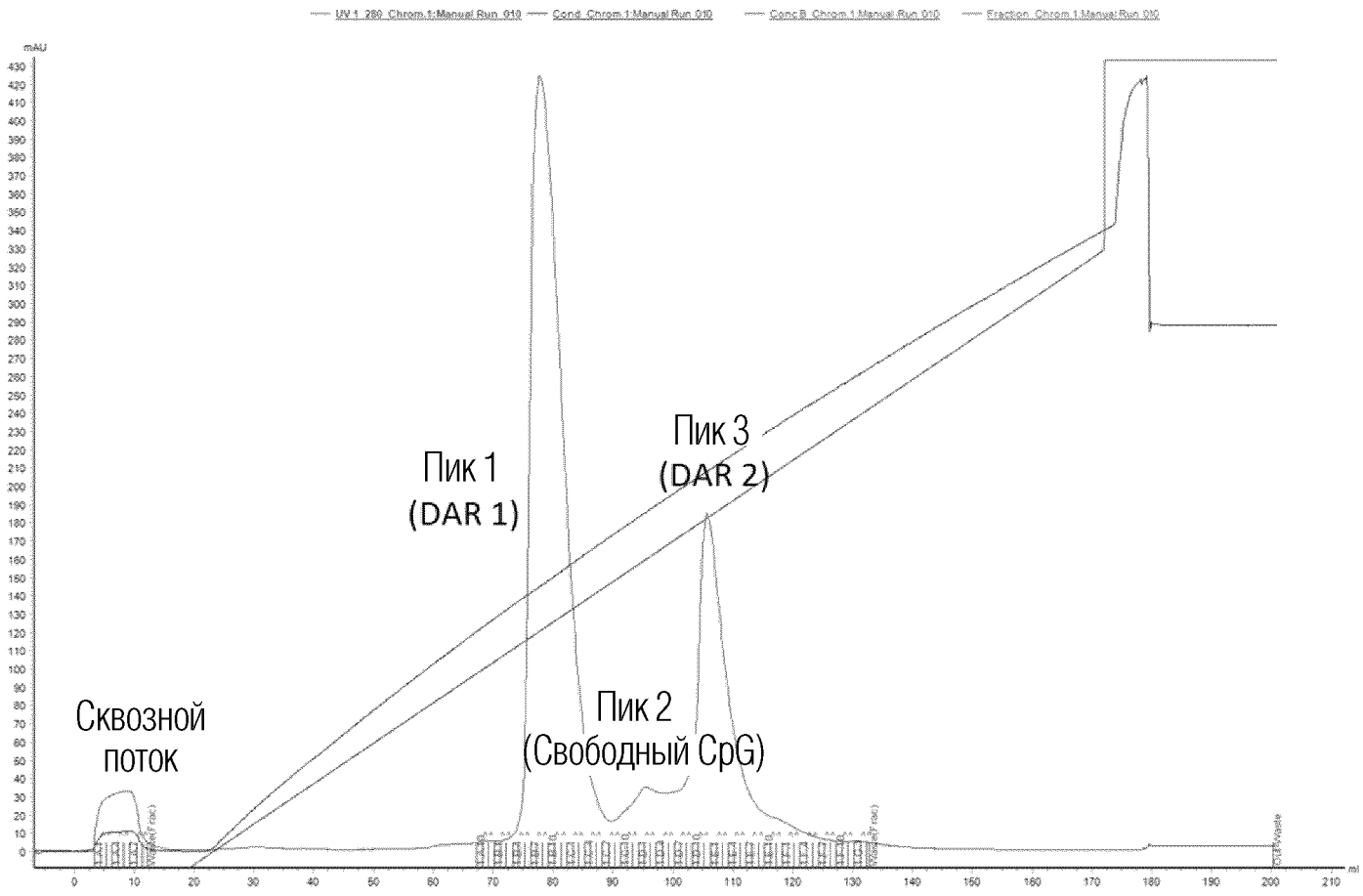
ФИГ. 10А


Пик 1
(DAR 1)
Пик 3
(DAR 2)
Пик 2
(Свободный CpG)
Сквозной
поток
mAU
ml

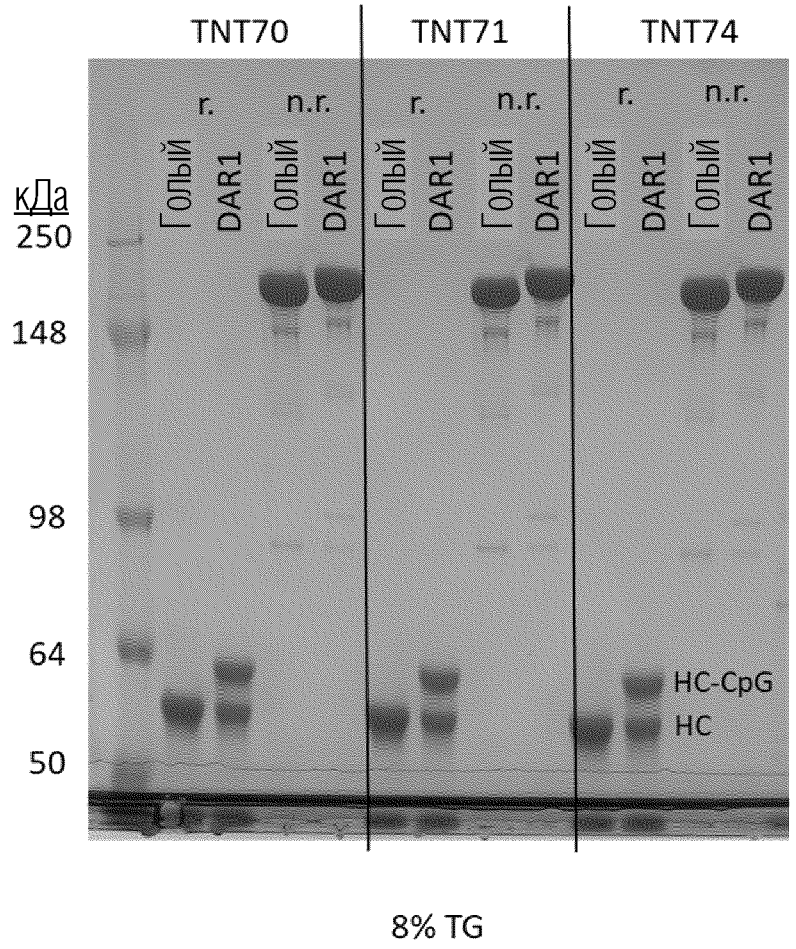
ФИГ. 10B


Пик 3
(DAR 2)
Пик 1
(DAR 1)
Пик 2
(Свободный CpG)
Сквозной
поток
Conjugation rxn was opalescent after overnight incubation
DAR1: 2A1-2 A5 were pooled and collected
DAR2: 2 C3-3 A1 were pooled and collected
mAU
ml

ФИГ. 10C


UV 1_280_Chrom.1:Manual Run_010
Cond_Chrom.1:Manual Run_010
Conc.B_Chrom.1:Manual Run_010
Fraction_Chrom.1:Manual Run_010
mAU
Пик 1
(DAR 1)
Пик 3
(DAR 2)
Пик 2
(Свободный CpG)
Сквозной
поток
ml

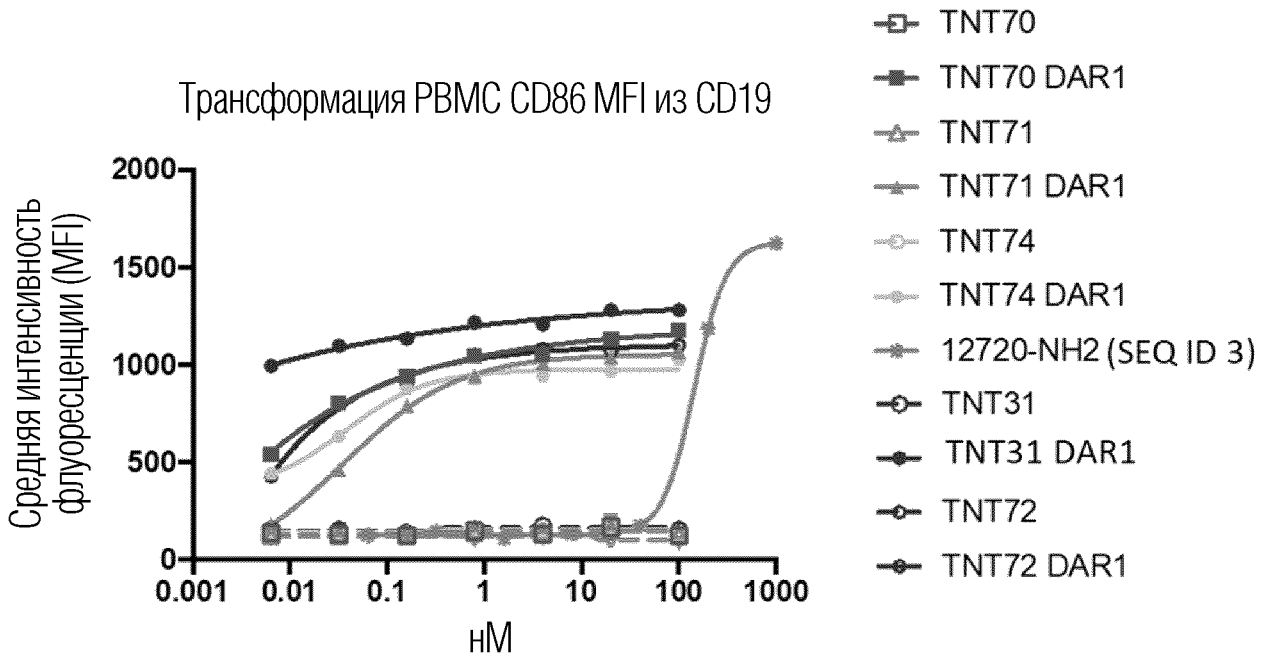
ФИГ. 10D



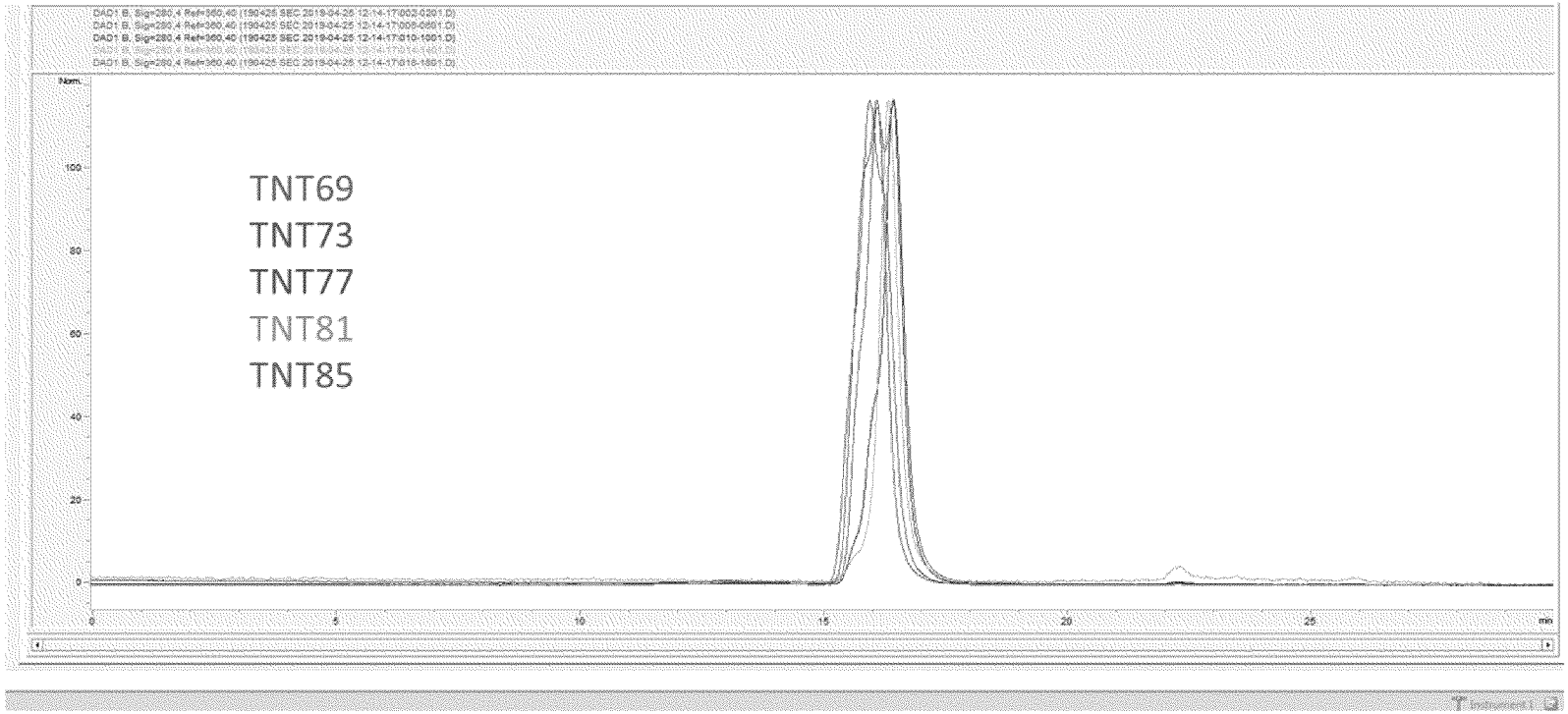
г. = восстановленный

н.г. = не восстановленный

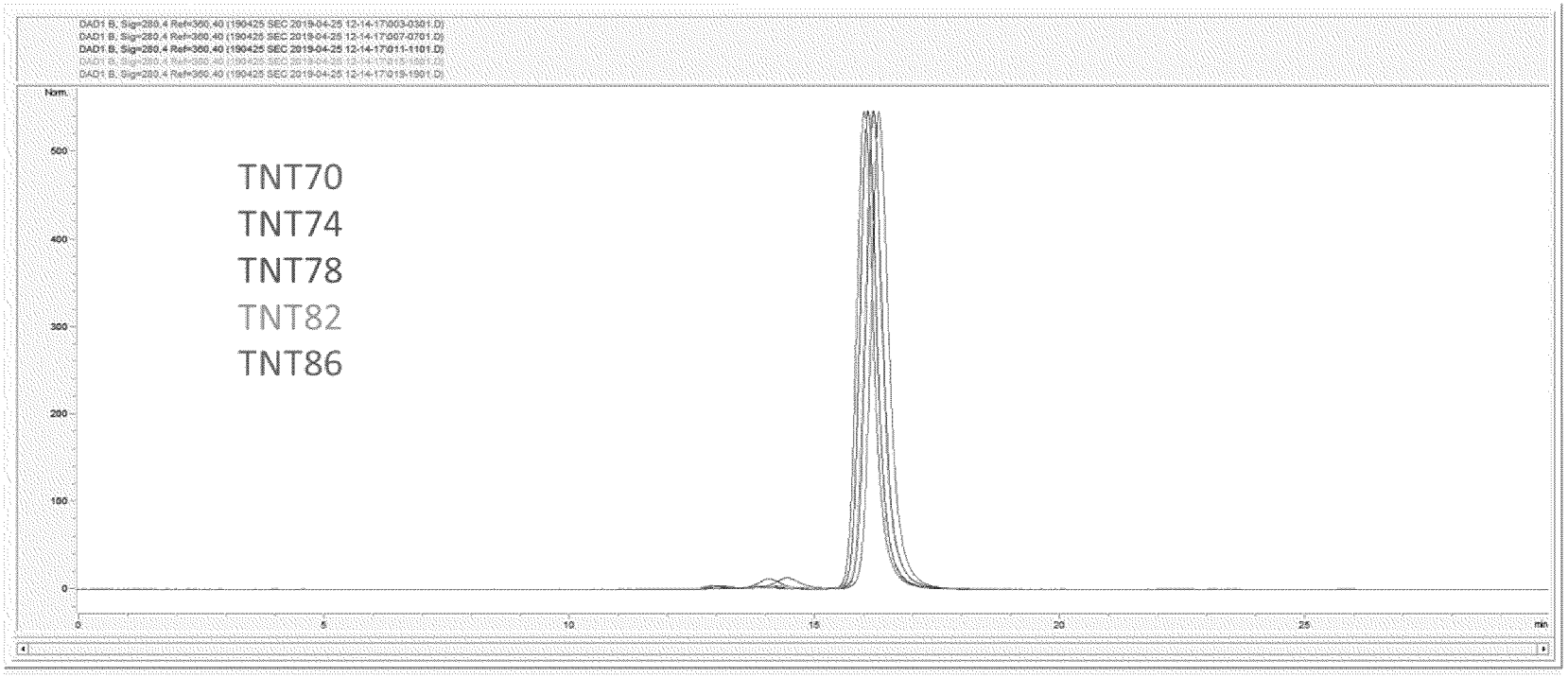
ФИГ. 10E


Трансформация PBMC CD86 MFI из CD19
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
2000
1500
1000
500
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
нМ
TNT70
TNT70 DAR1
TNT71
TNT71 DAR1
TNT74
TNT74 DAR1
12720-NH2 (SEQ ID 3)
TNT31
TNT31 DAR1
TNT72
TNT72 DAR1

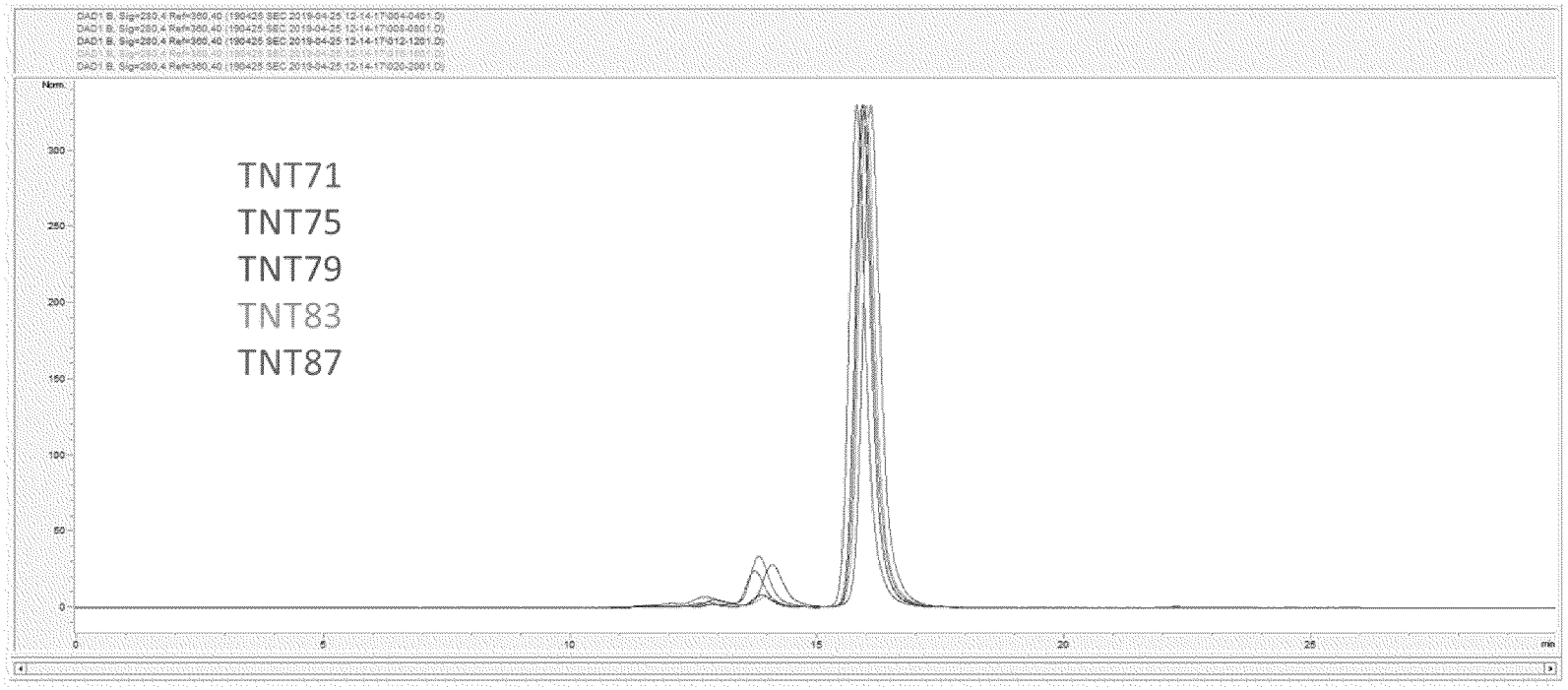
ФИГ. 11


DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\002-0201.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\006-0601.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\010-1001.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\014-1401.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\018-1801.D)
Norm.
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
min
TNT69
TNT73
TNT77
TNT81
TNT85

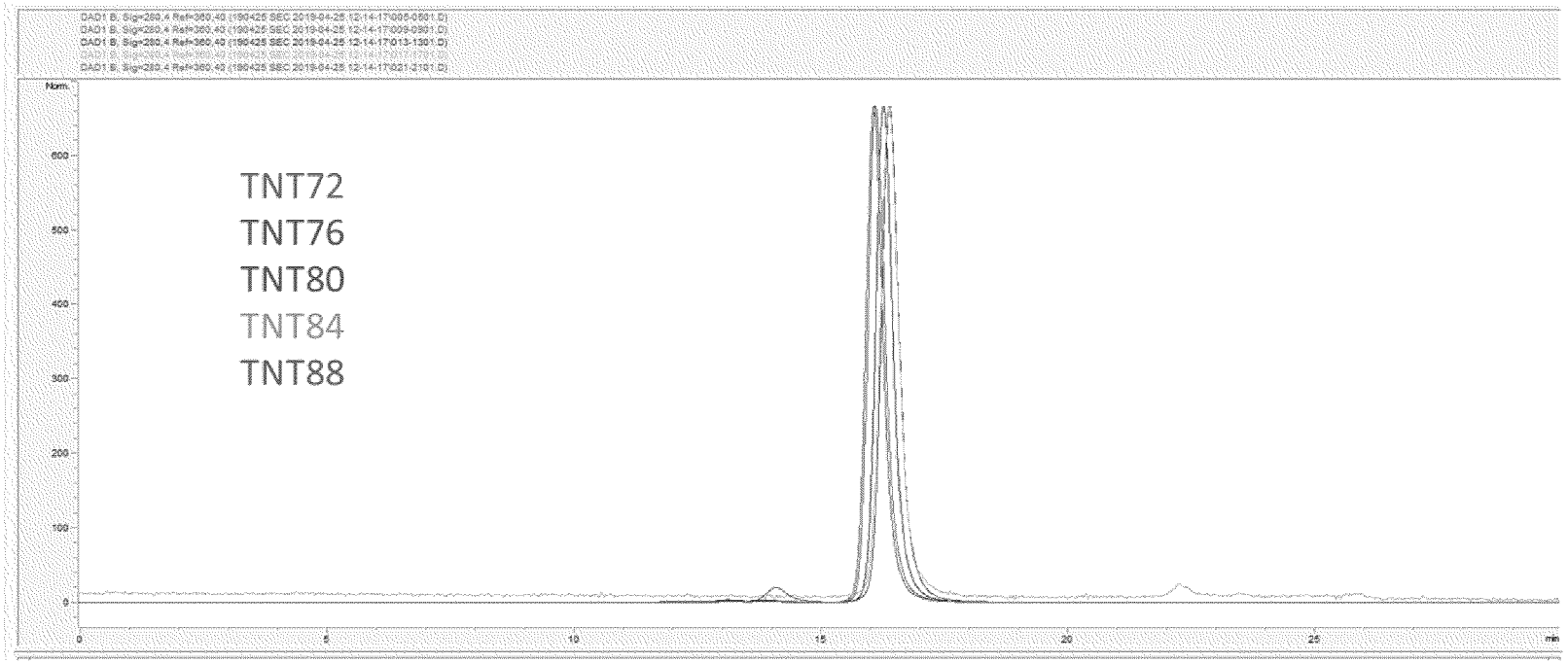
ФИГ. 12А


DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\003-0301.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\007-0701.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\011-1101.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\015-1501.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\019-1901.D)
Norm.
500
400
300
200
100
0
TNT70
TNT74
TNT78
TNT82
TNT86
0
5
10
15
20
25
min

ФИГ. 12B


DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\004-0401.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\008-0801.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\012-1201.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\020-2001.D)
Norm.
300
250
200
150
100
50
0
TNT71
TNT75
TNT79
TNT83
TNT87
0
5
10
15
20
25
min

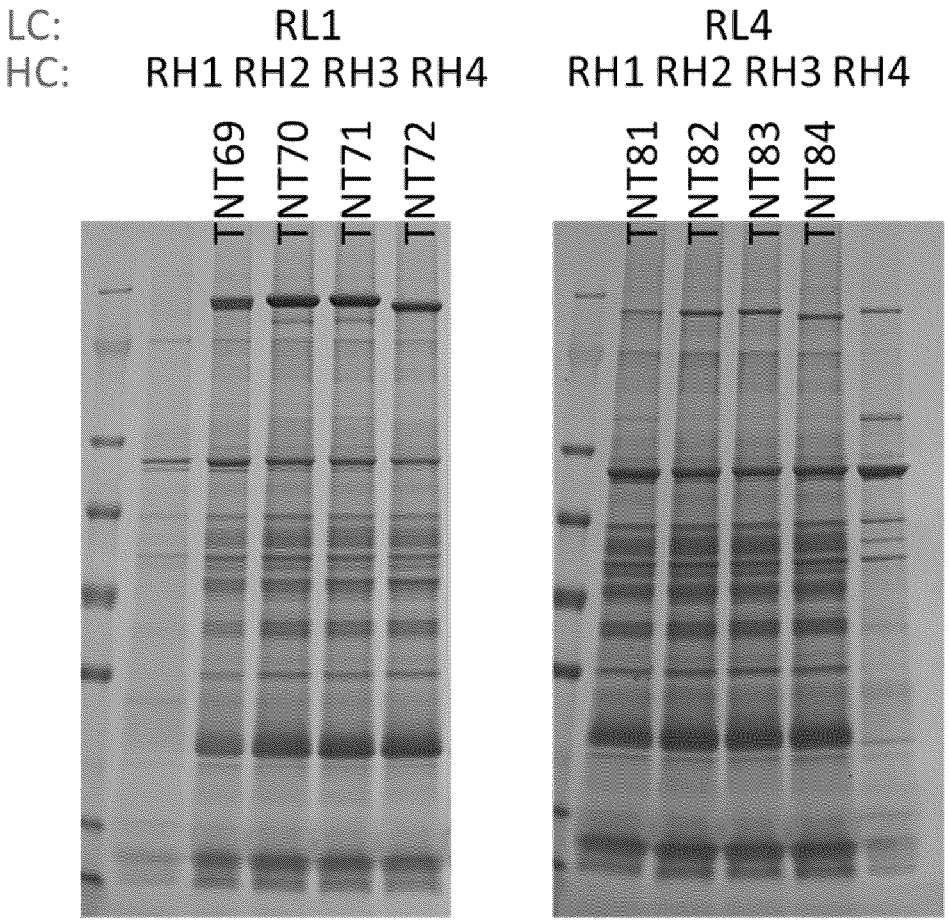
ФИГ. 12C


DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\005-0501.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\009-0901.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\013-1301.D)
DAD1 B, Sig=280,4 Ref=360,40 (190425 SEC 2019-04-25 12-14-17\021-2101.D)
Norm.
600
500
400
300
200
100
0
TNT72
TNT76
TNT80
TNT84
TNT88
0
5
10
15
20
25
min

ФИГ. 12D

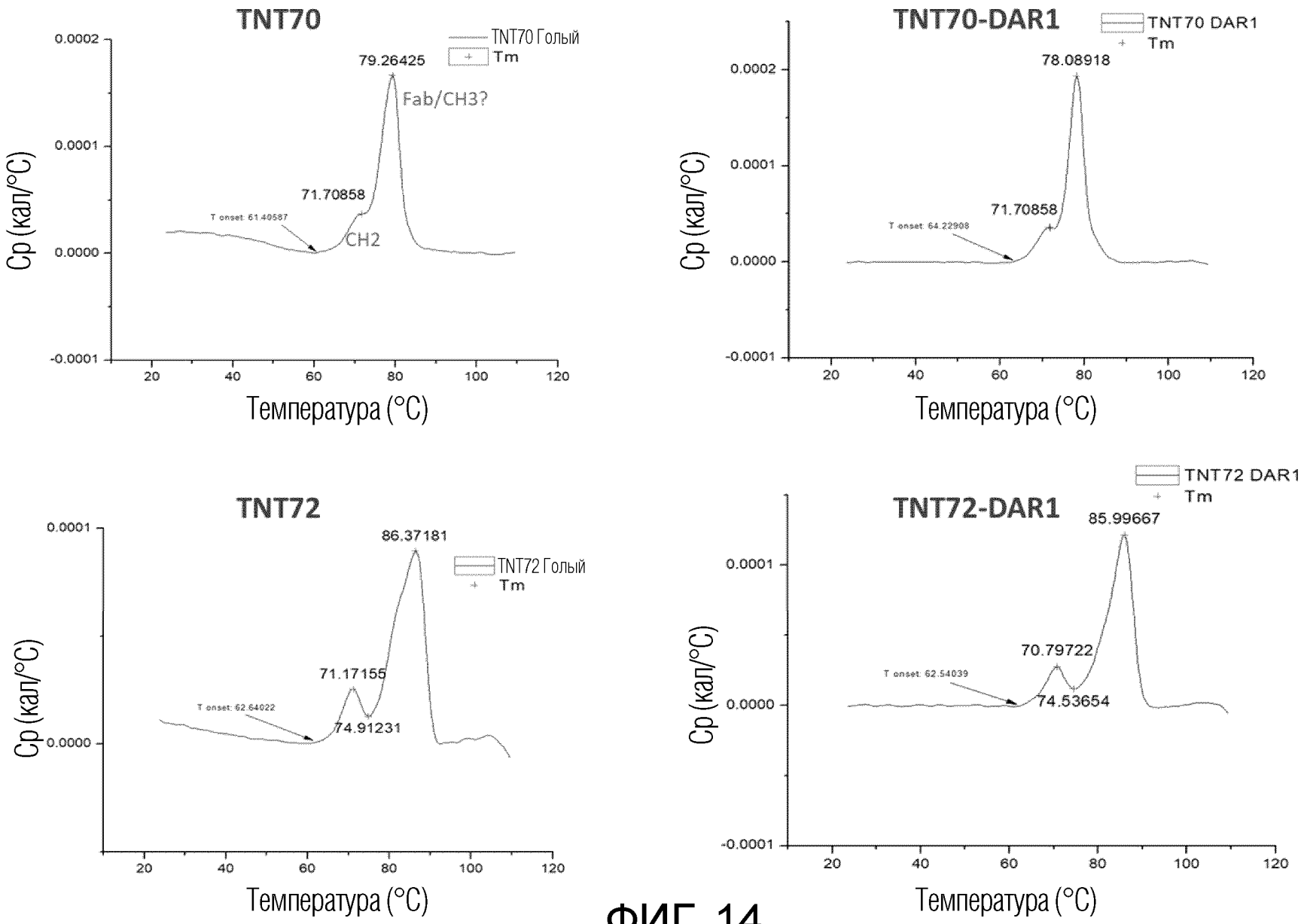
Образец	HC	LC	Экспрессия (Expi293)	Экспрессия (CHO)	% HMW	% мономера	спаривания VH/VL	CD22 KD (нМ)	Связывание у яванского макака
TNT69	RH1	RL1	100	65	ND	Двойной пик	HV3/KV1	0.6	Высокое
TNT73	RH1	RL2	95		ND	Широкий пик	HV3/KV1	14	Среднее
TNT77	RH1	RL3	100		ND	Широкий пик	HV3/KV1	10	Среднее
TNT81	RH1	RL4	35	10	ND	Широкий пик	HV3/KV3	0.7	Высокое
TNT85	RH1	RL5	10		ND	Широкий пик	HV3/KV2	1.3	Высокое
TNT70	**RH2**	**RL1**	95	100	**3.3**	**96.7**	**HV3/KV1**	**0.4**	Высокое
TNT74	**RH2**	**RL2**	95		**5.0**	**95.0**	**HV3/KV1**	**16**	Низкое
TNT78	**RH2**	**RL3**	70		**2.4**	**97.7**	**HV3/KV1**	**25**	Низкое
TNT82	**RH2**	**RL4**	35	20	**2.6**	**97.4**	**HV3/KV3**	**0.9**	Высокое
TNT86	RH2	RL5	10		1.6	98.4	HV3/KV2	1.1	Высокое
TNT71	RH3	RL1	75	100	12.5	87.5	HV3/KV1	0.3	Высокое
TNT75	RH3	RL2	75		10.2	89.8	HV3/KV1	30	Высокое
TNT79	RH3	RL3	70		4.3	95.7	HV3/KV1	23	Среднее
TNT83	RH3	RL4	35	20	4.8	95.2	HV3/KV3	6	Высокое
TNT87	RH3	RL5	10		15.1	84.9	HV3/KV2	0.7	Высокое
TNT72	RH4	RL1	50	65	0.9	99.1	HV4/KV1	0.7	Высокое
TNT76	RH4	RL2	50		1.0	99.0	HV4/KV1	30	Низкое
TNT80	RH4	RL3	35		1.1	98.9	HV4/KV1	23	Низкое
TNT84	RH4	RL4	5	20	0.0	100.0	HV4/KV3	2.5	Среднее
TNT88	RH4	RL5	5		4.6	95.4	HV4/KV2	1.3	Высокое

ФИГ. 13А

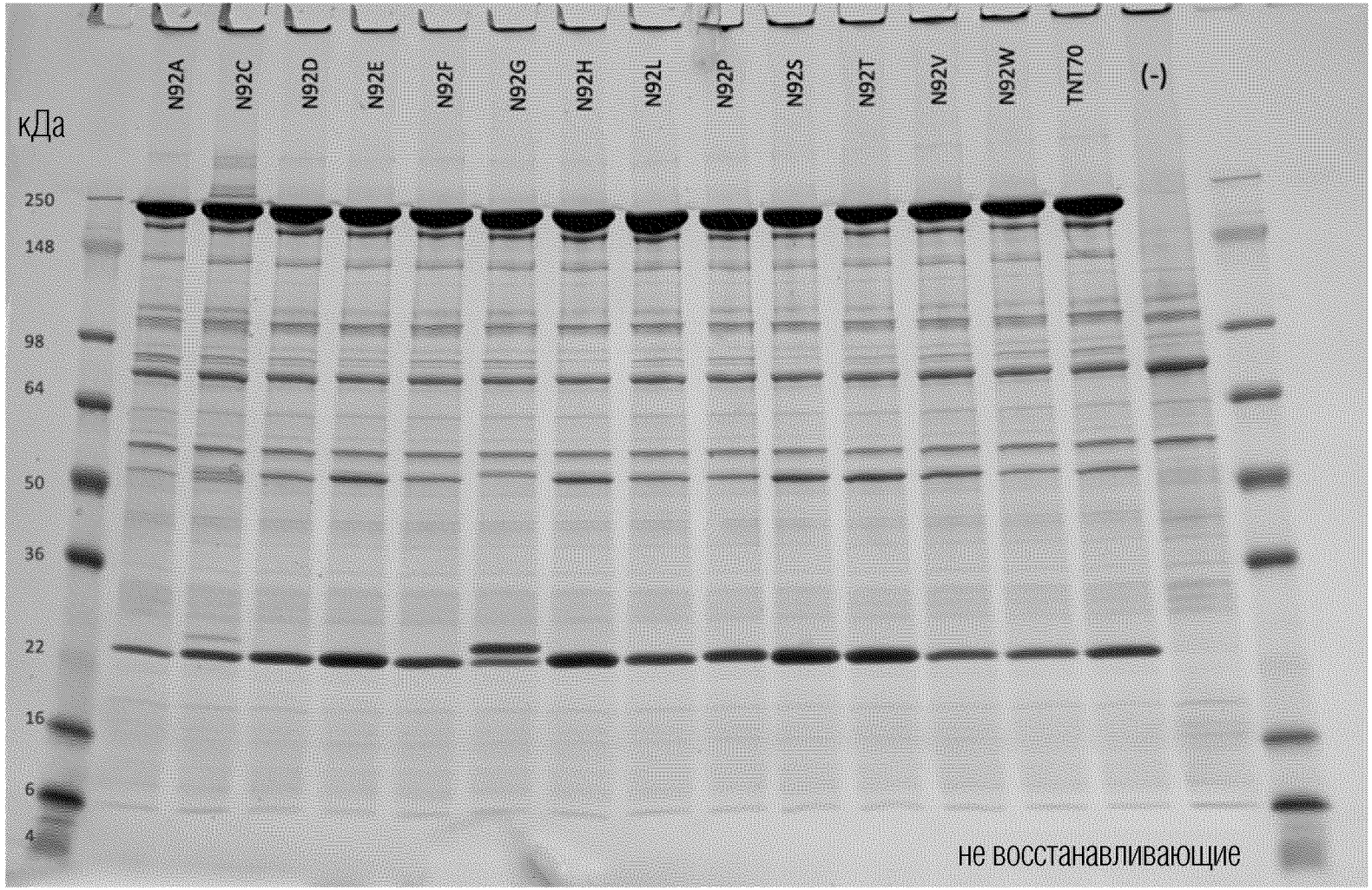


Образец	HC	LC	Экспрессия (Expi293)	Экспрессия (CHO)
TNT69	RH1	RL1	100	65
TNT73	RH1	RL2	95	
TNT77	RH1	RL3	100	
TNT81	RH1	RL4	35	10
TNT85	RH1	RL5	10	
TNT70	**RH2**	**RL1**	95	100
TNT74	**RH2**	**RL2**	95	
TNT78	**RH2**	**RL3**	70	
TNT82	**RH2**	**RL4**	35	20
TNT86	RH2	RL5	10	
TNT71	RH3	RL1	75	100
TNT75	RH3	RL2	75	
TNT79	RH3	RL3	70	
TNT83	RH3	RL4	35	20
TNT87	RH3	RL5	10	
TNT72	RH4	RL1	50	65
TNT76	RH4	RL2	50	
TNT80	RH4	RL3	35	
TNT84	RH4	RL4	5	20
TNT88	RH4	RL5	5	

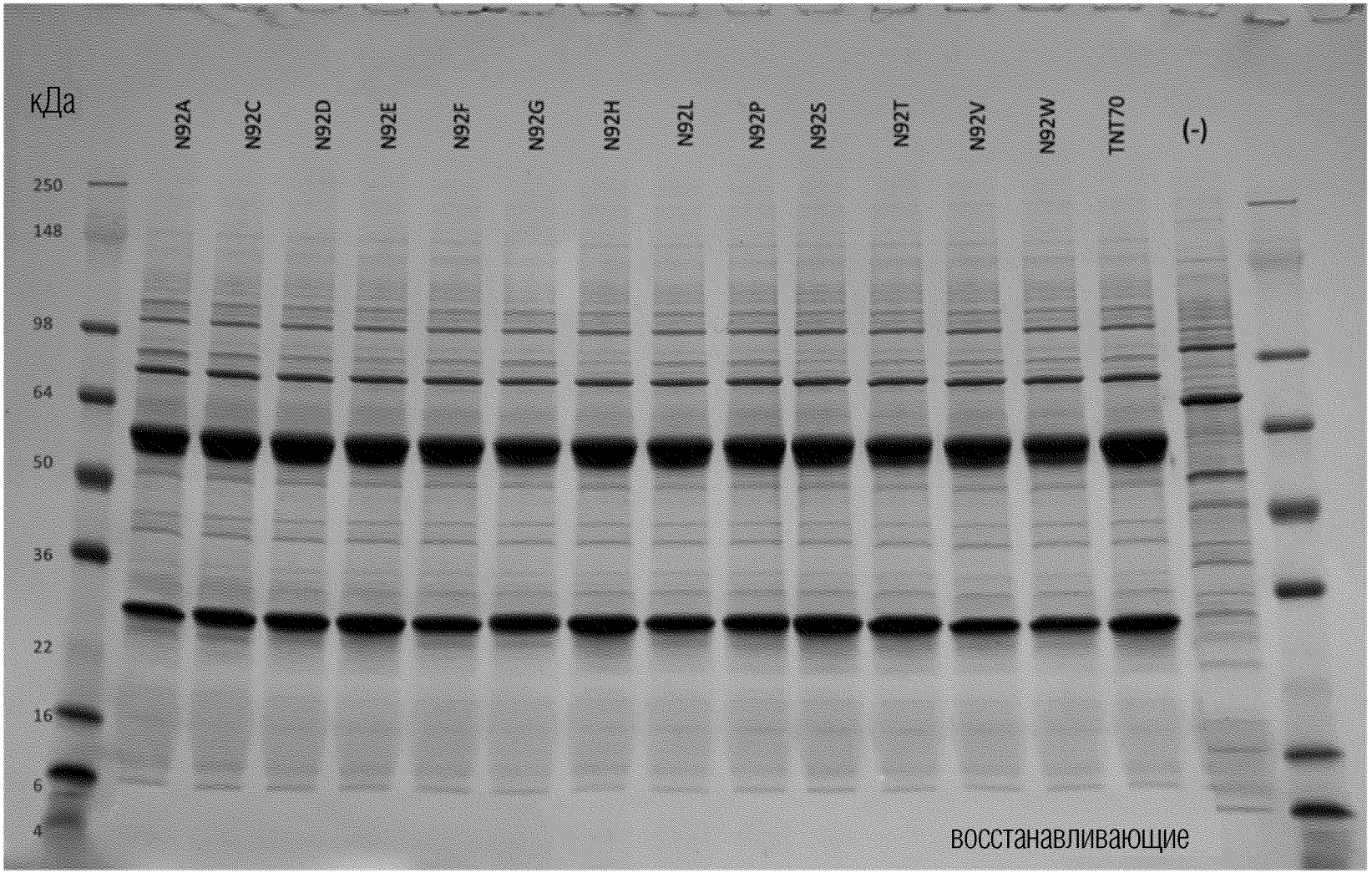
ФИГ. 13B


TNT70
TNT70 Голый
Tm
79.26425
Fab/CH3?
71.70858
CH2
T onset: 61.40587
Cp (кал/°C)
Температура (°C)
TNT70-DAR1
TNT70 DAR1
Tm
78.08918
71.70858
T onset: 64.22908
TNT72
TNT72 Голый
Tm
86.37181
71.17155
74.91231
T onset: 62.64022
TNT72-DAR1
TNT72 DAR1
Tm
85.99667
70.79722
74.53654
T onset: 62.54039

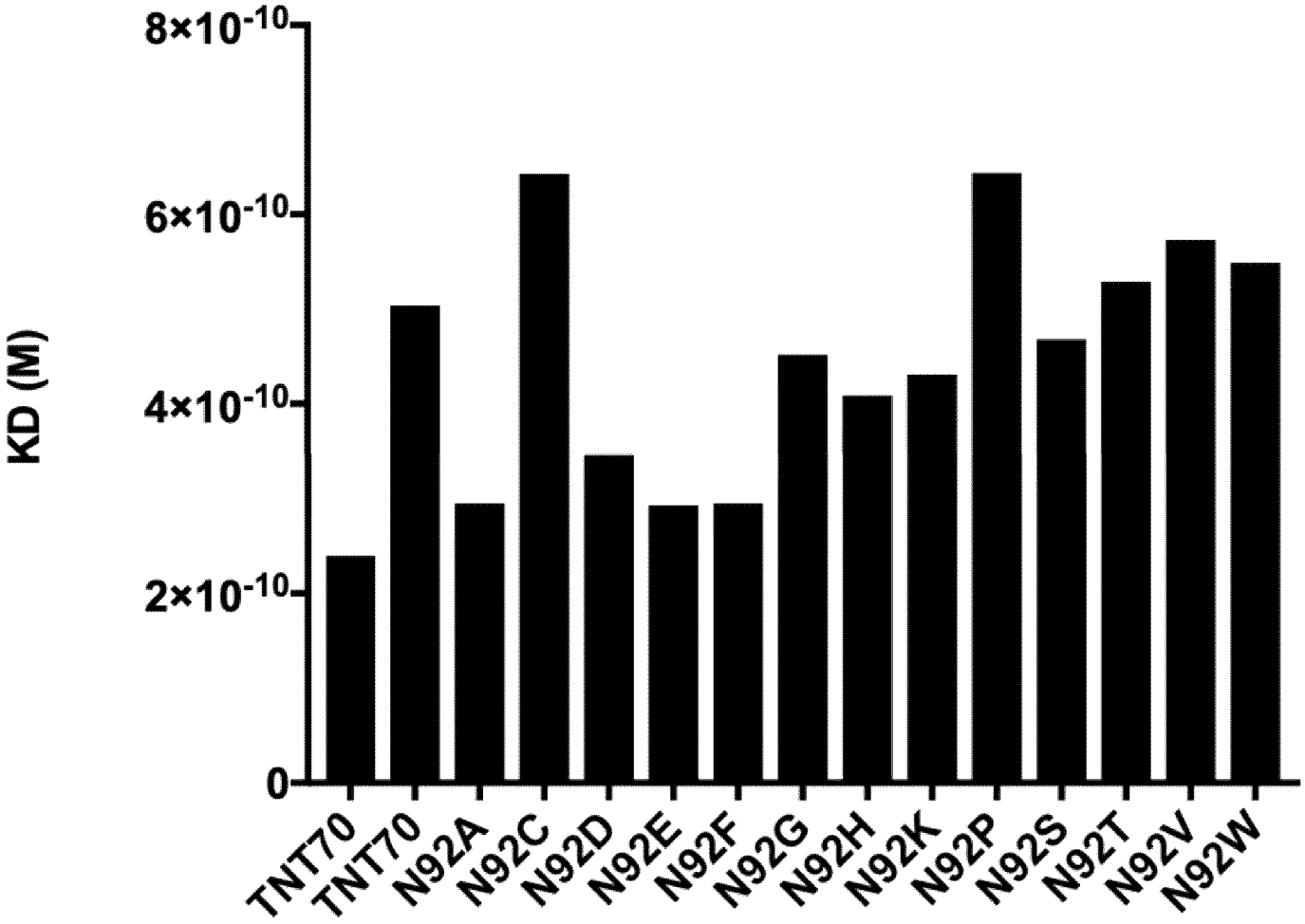
ФИГ. 14


кДа
N92A
N92C
N92D
N92E
N92F
N92G
N92H
N92L
N92P
N92S
N92T
N92V
N92W
TNT70
(-)
250
148
98
64
50
36
22
16
6
4
не восстанавливающие

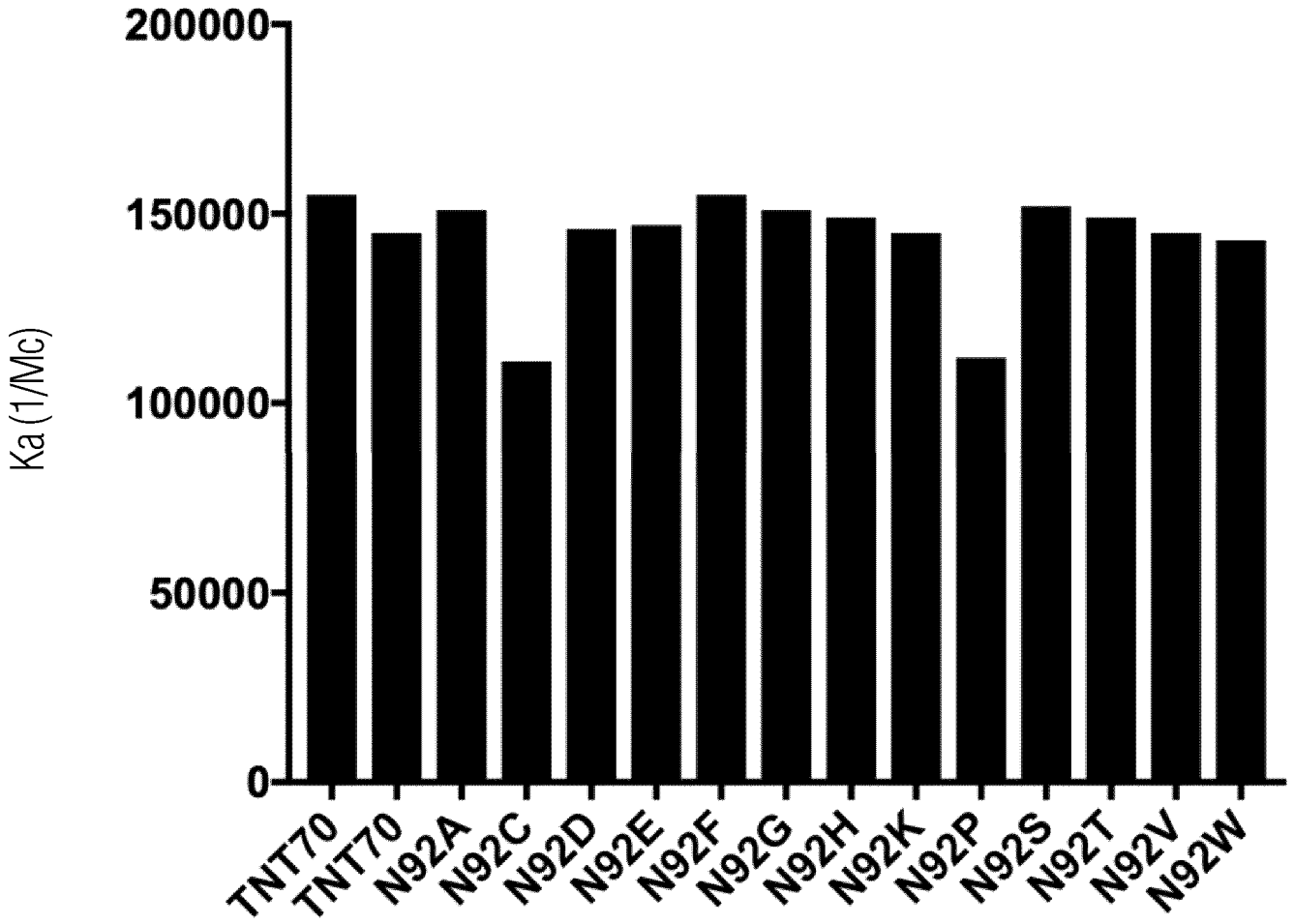
ФИГ. 15A


кДа
N92A
N92C
N92D
N92E
N92F
N92G
N92H
N92L
N92P
N92S
N92T
N92V
N92W
TNT70
(-)
250
148
98
64
50
36
22
16
6
4
восстанавливающие

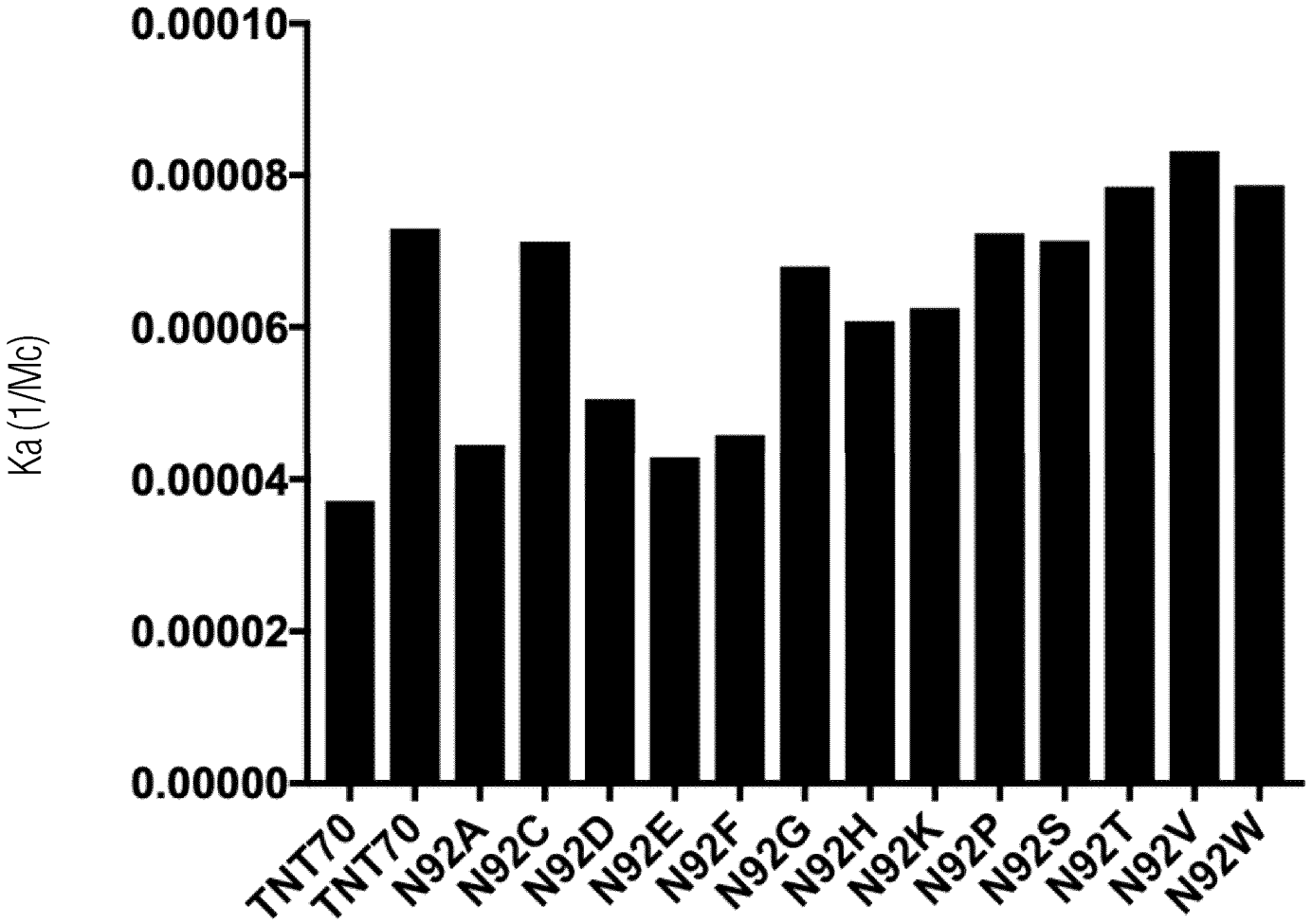
ФИГ. 15B


KD (M)
8×10-10
6×10-10
4×10-10
2×10-10
0
TNT70
TNT70
N92A
N92C
N92D
N92E
N92F
N92G
N92H
N92K
N92P
N92S
N92T
N92V
N92W

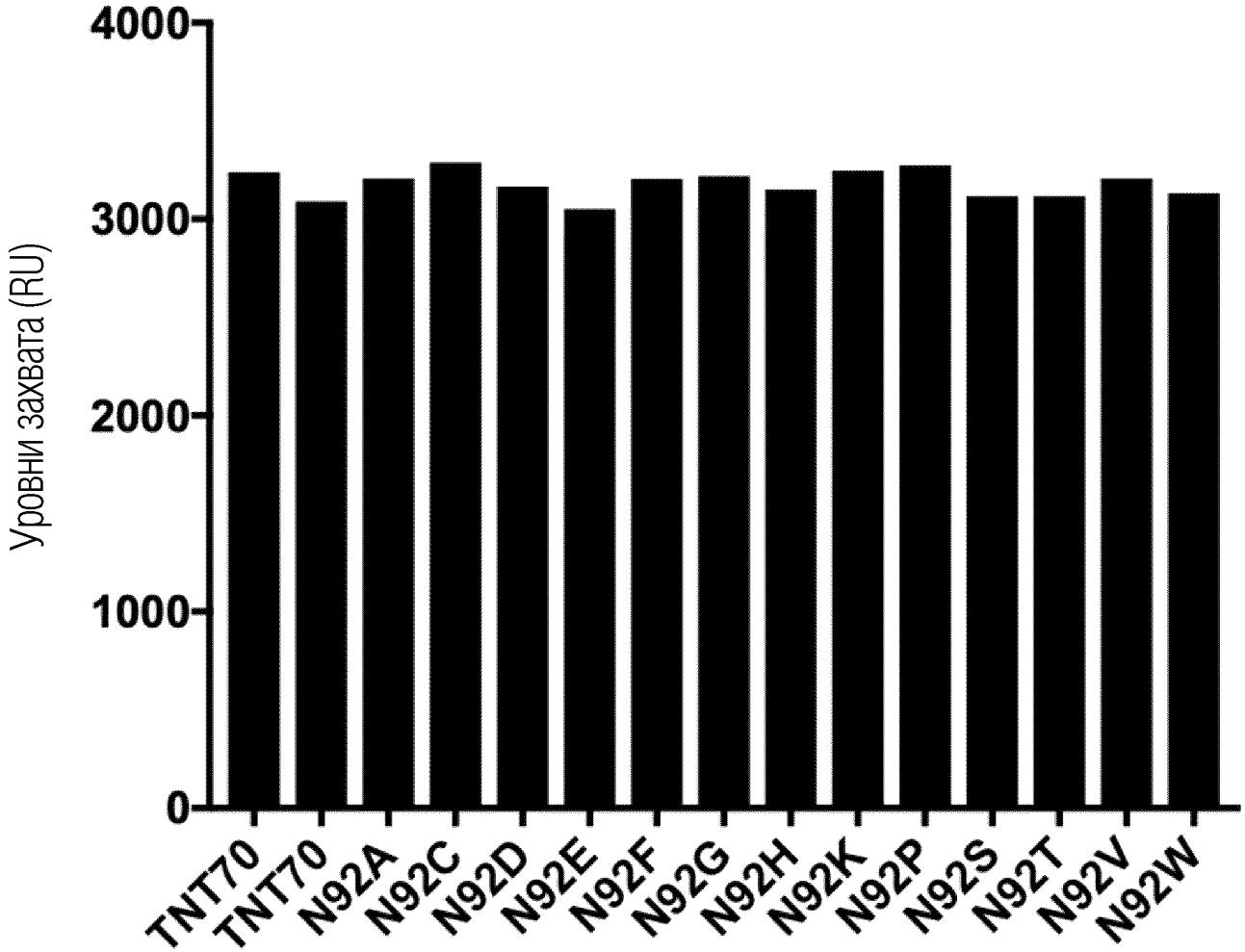
ФИГ. 15C


200000
150000
100000
50000
0
Ka (1/Mc)
TNT70
TNT70
N92A
N92C
N92D
N92E
N92F
N92G
N92H
N92K
N92P
N92S
N92T
N92V
N92W

ФИГ. 15D

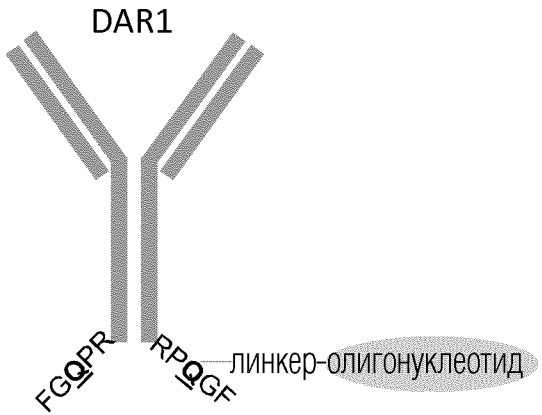

0.00010
0.00008
0.00006
0.00004
0.00002
0.00000
Ka (1/Mc)
TNT70
TNT70
N92A
N92C
N92D
N92E
N92F
N92G
N92H
N92K
N92P
N92S
N92T
N92V
N92W

ФИГ. 15E

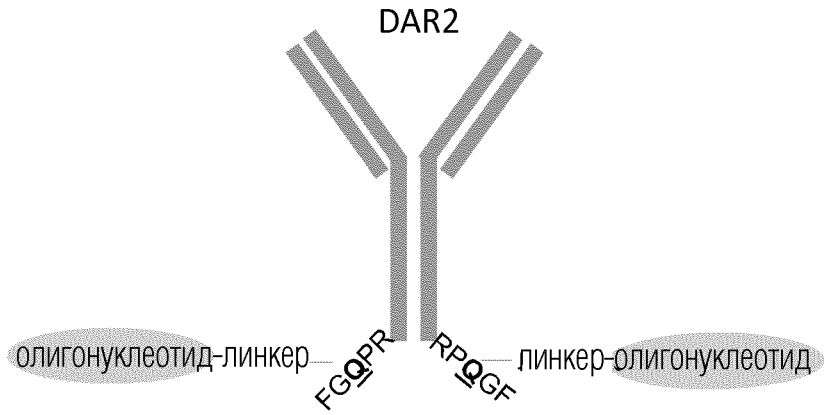

Уровни захвата (RU)
4000
3000
2000
1000
0
TNT70
TNT70
N92A
N92C
N92D
N92E
N92F
N92G
N92H
N92K
N92P
N92S
N92T
N92V
N92W

ФИГ. 15F

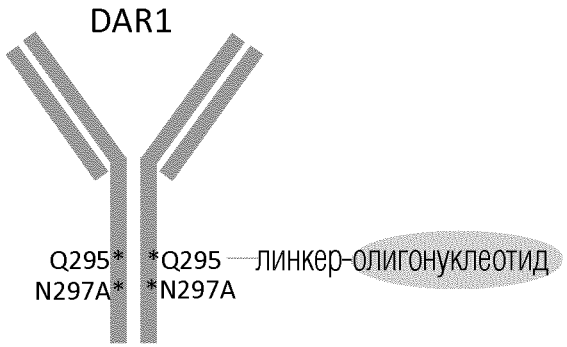
ФИГ. 16A. Сконструированная Q-метка (RPQGF)



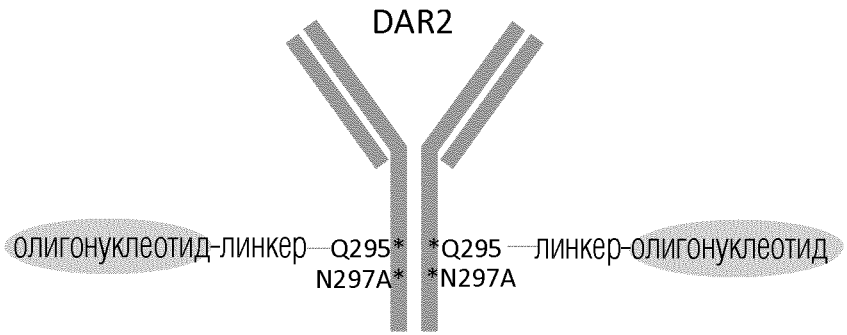
ФИГ. 16B. Сконструированная Q-метка (RPQGF)

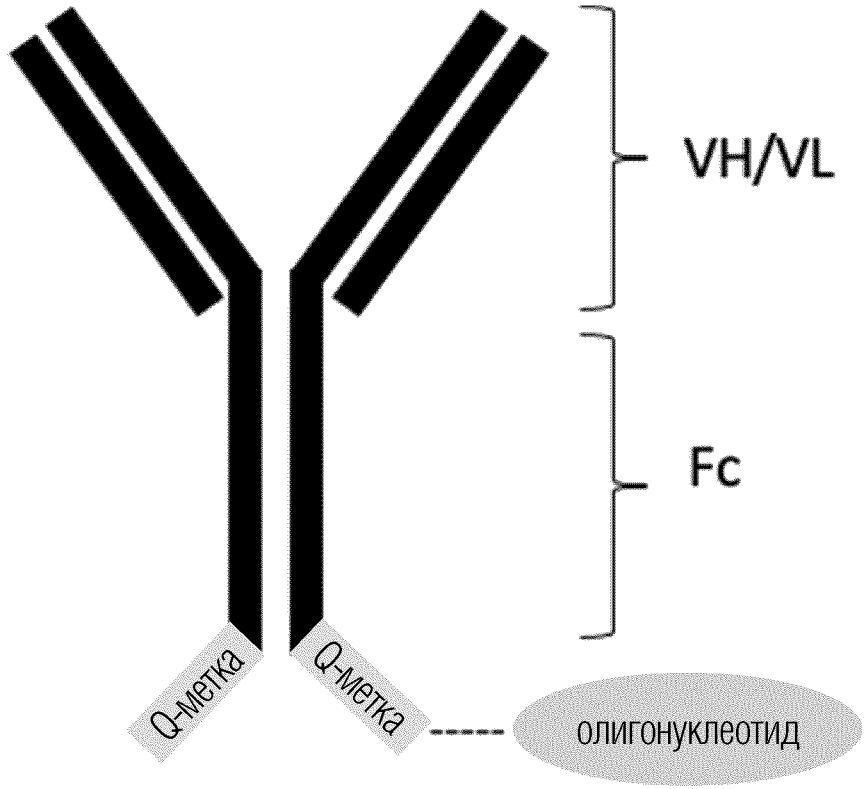


ФИГ. 16C. Q-метка, существующая в природе

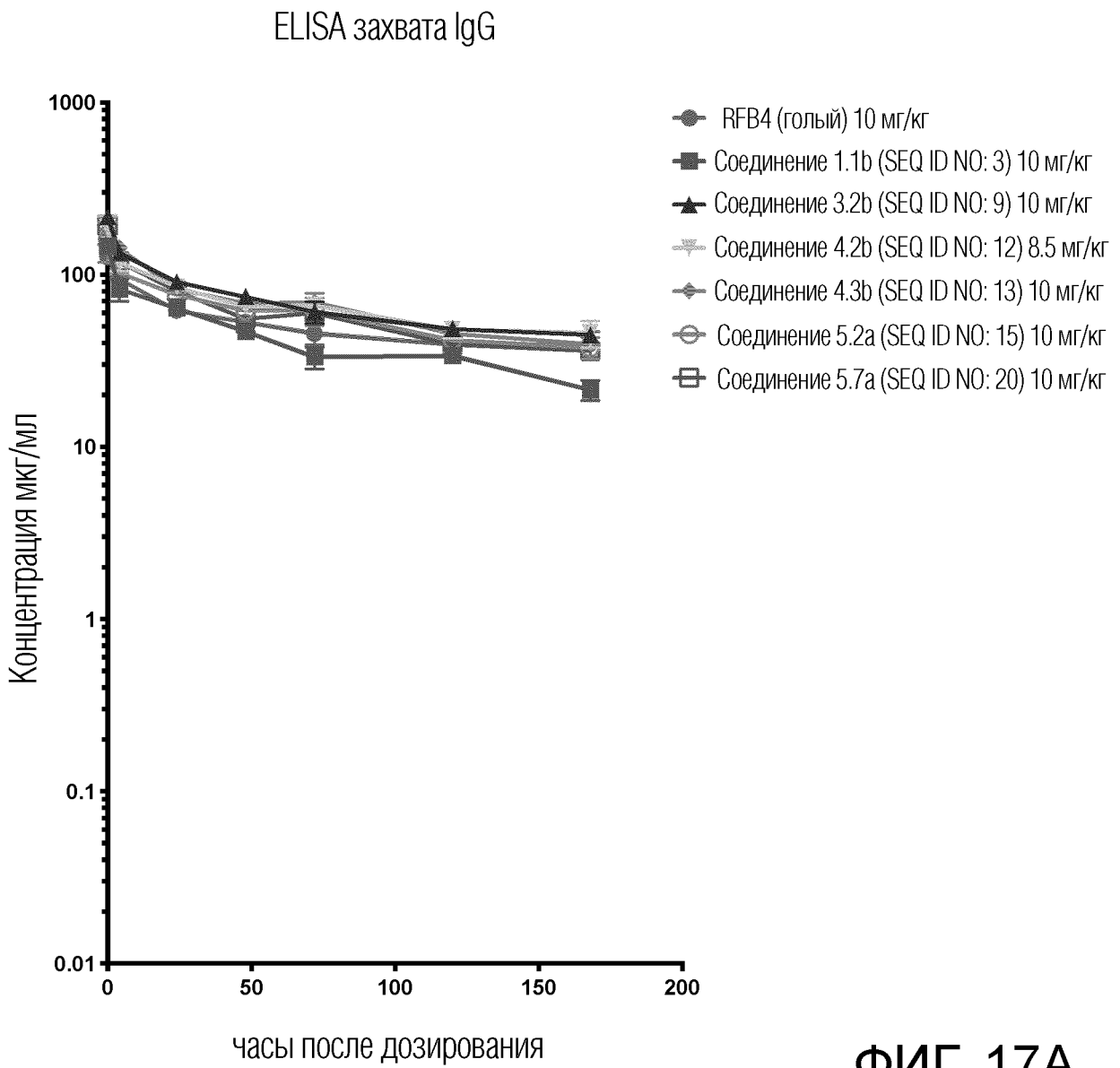


ФИГ. 16D. Q-метка, существующая в природе

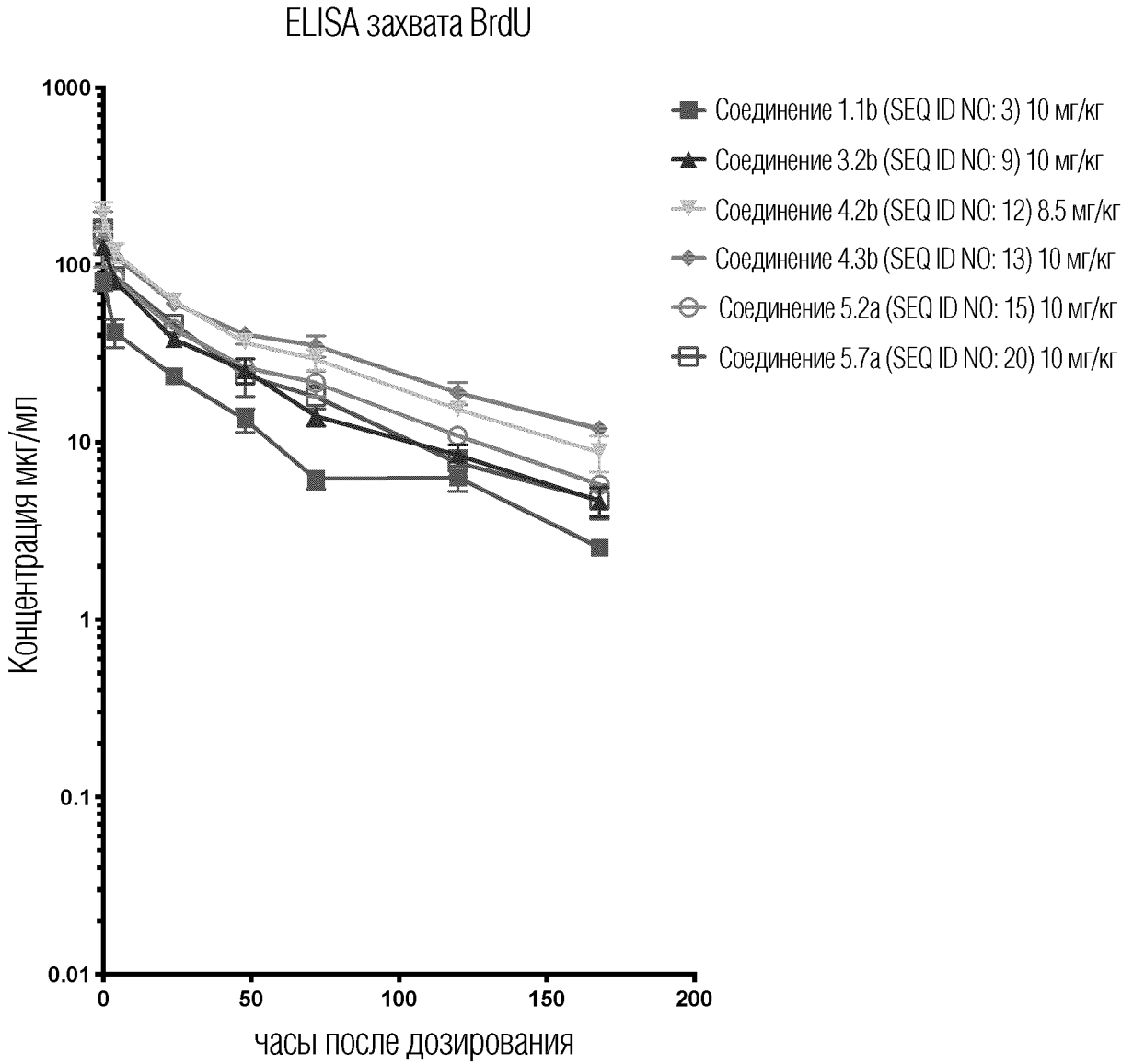




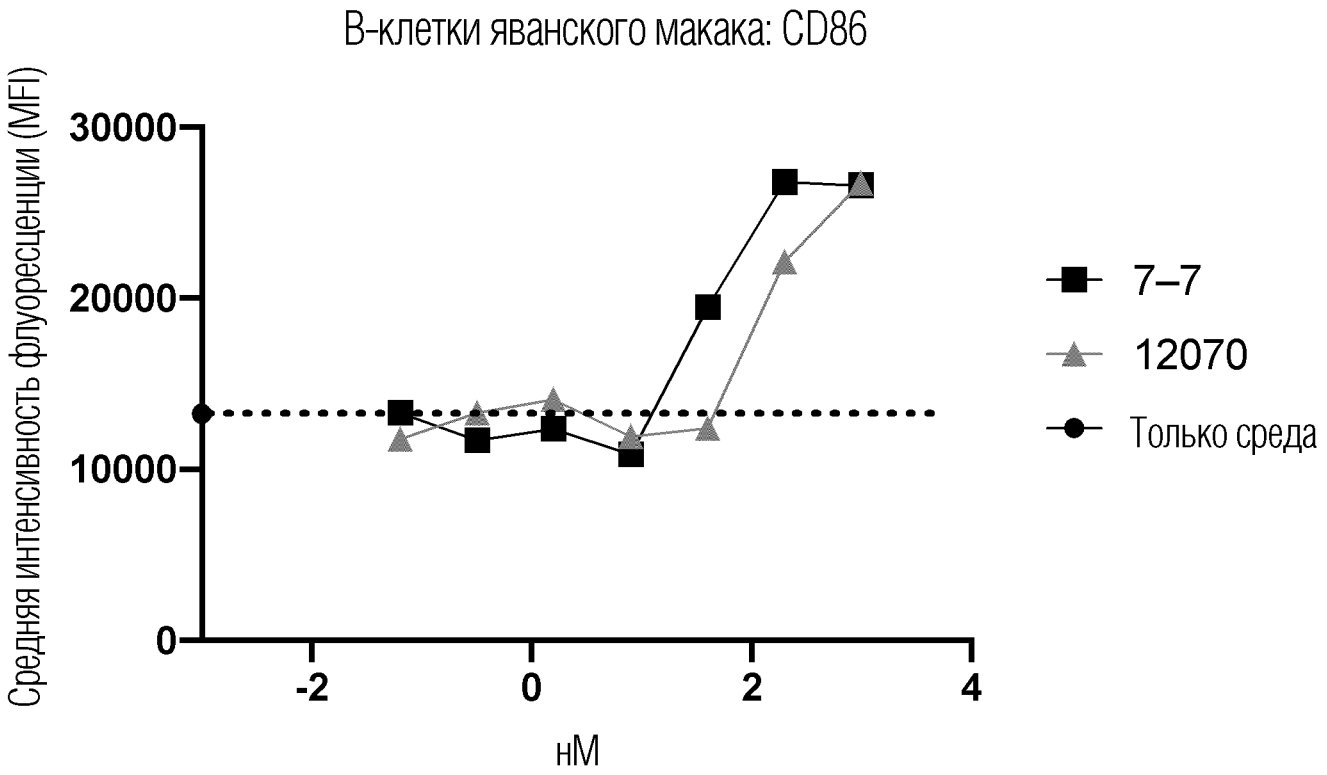
ФИГ. 16E


ELISA захвата IgG
1000
100
10
1
0.1
0.01
Концентрация мкг/мл
0
50
100
150
200
часы после дозирования
RFB4 (голый) 10 мг/кг
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3) 10 мг/кг
Соединение 3.2b (SEQ ID NO: 9) 10 мг/кг
Соединение 4.2b (SEQ ID NO: 12) 8.5 мг/кг
Соединение 4.3b (SEQ ID NO: 13) 10 мг/кг
Соединение 5.2a (SEQ ID NO: 15) 10 мг/кг
Соединение 5.7a (SEQ ID NO: 20) 10 мг/кг

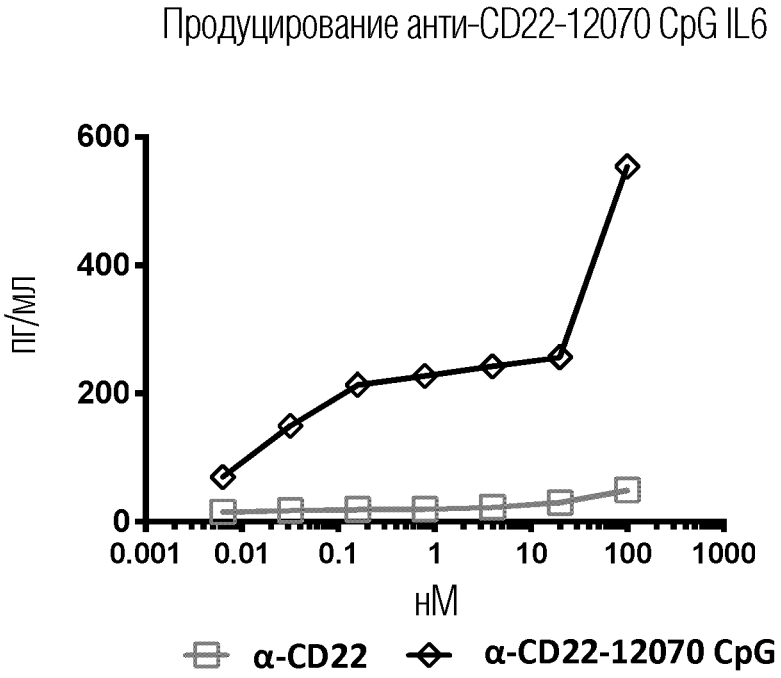
ФИГ. 17A


ELISA захвата BrdU
Концентрация мкг/мл
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
50
100
150
200
часы после дозирования
Соединение 1.1b (SEQ ID NO: 3) 10 мг/кг
Соединение 3.2b (SEQ ID NO: 9) 10 мг/кг
Соединение 4.2b (SEQ ID NO: 12) 8.5 мг/кг
Соединение 4.3b (SEQ ID NO: 13) 10 мг/кг
Соединение 5.2a (SEQ ID NO: 15) 10 мг/кг
Соединение 5.7a (SEQ ID NO: 20) 10 мг/кг

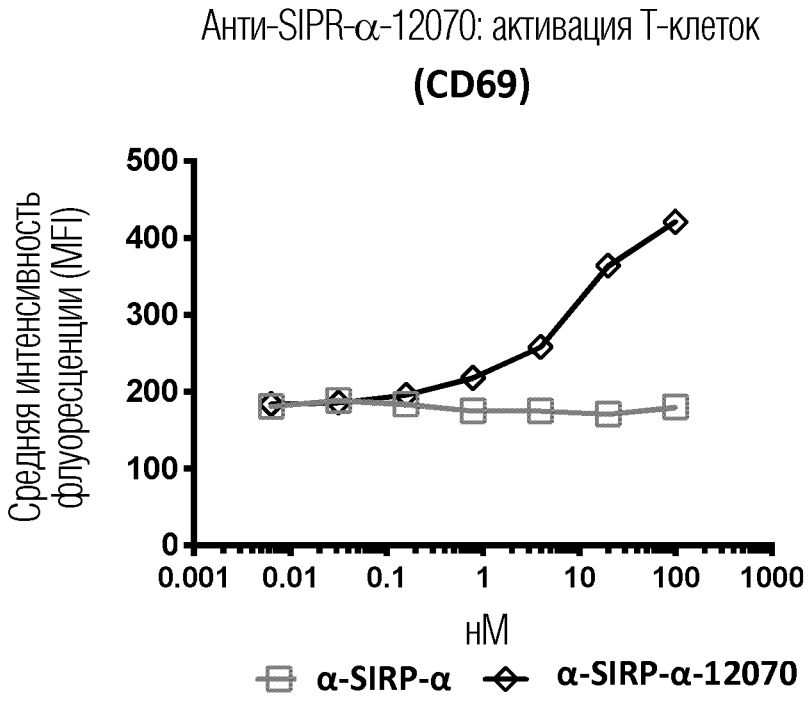
ФИГ. 17B


B-клетки яванского макака: CD86
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
30000
20000
10000
0
-2
0
2
4
нМ
7–7
12070
Только среда

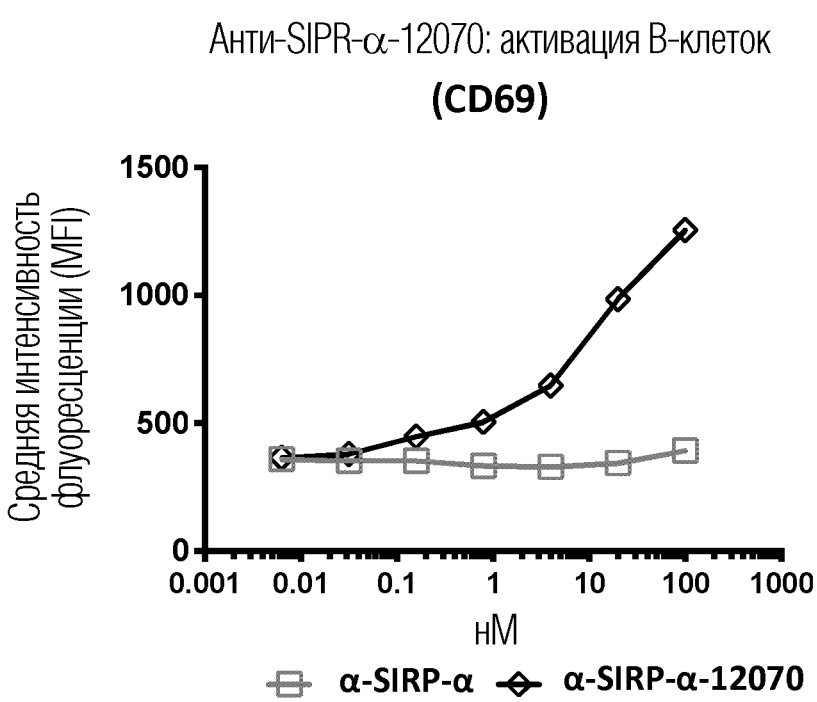
ФИГ. 18


Продуцирование анти-CD22-12070 CpG IL6
600
400
200
0
пг/мл
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
нМ
α-CD22
α-CD22-12070 CpG

ФИГ. 19

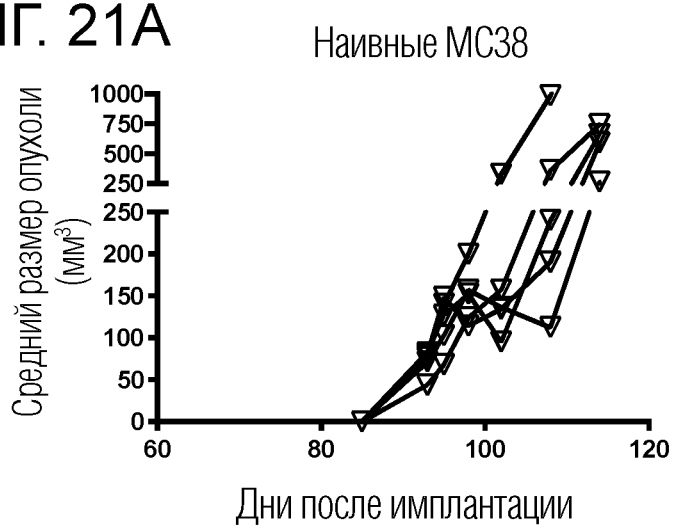


ФИГ. 20А

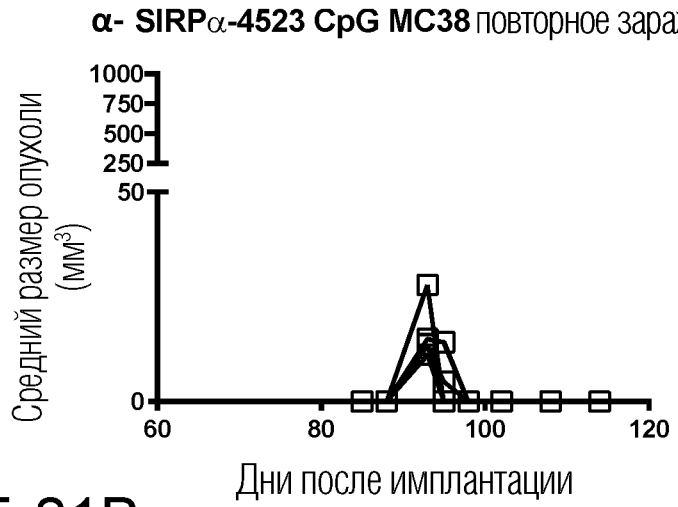


ФИГ. 20В

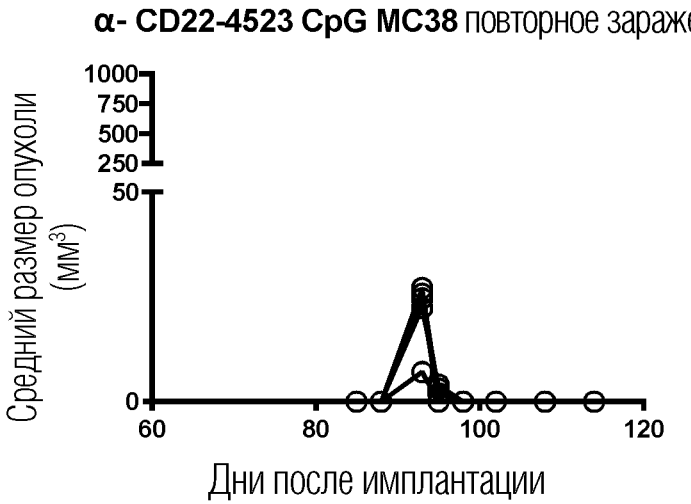
ФИГ. 21A



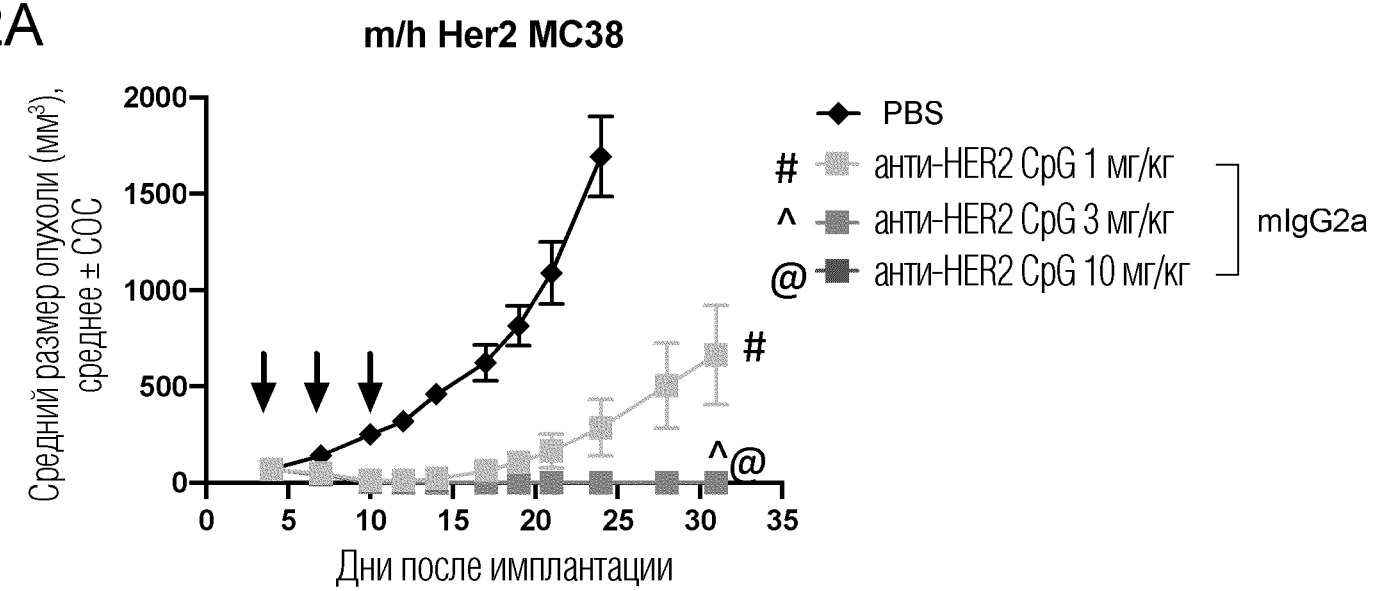
ФИГ. 21B



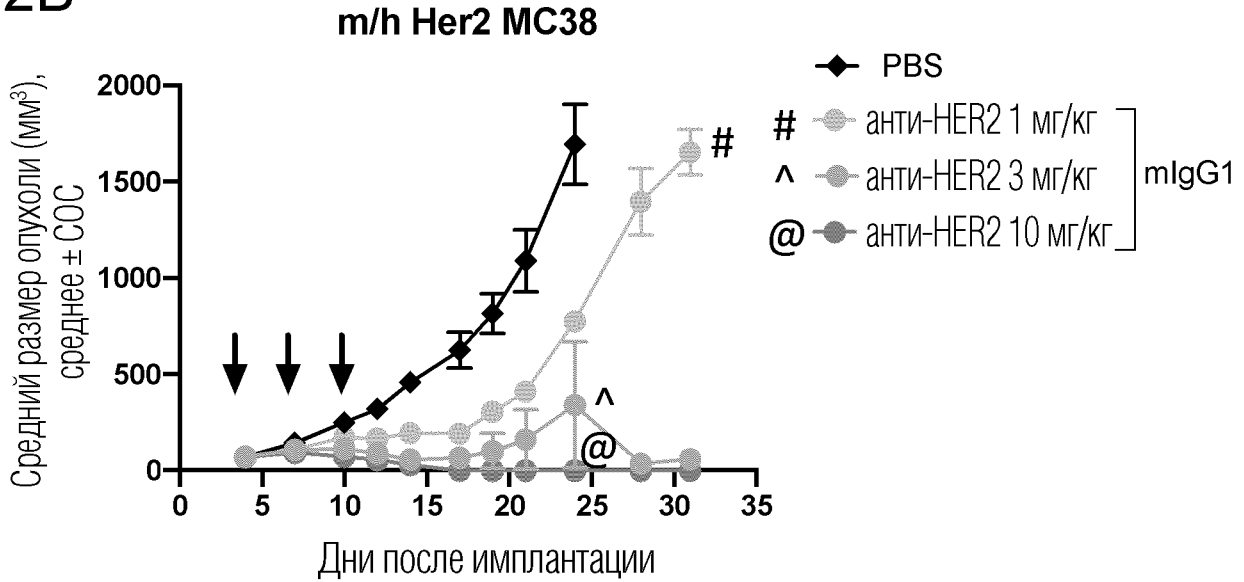
ФИГ. 21C



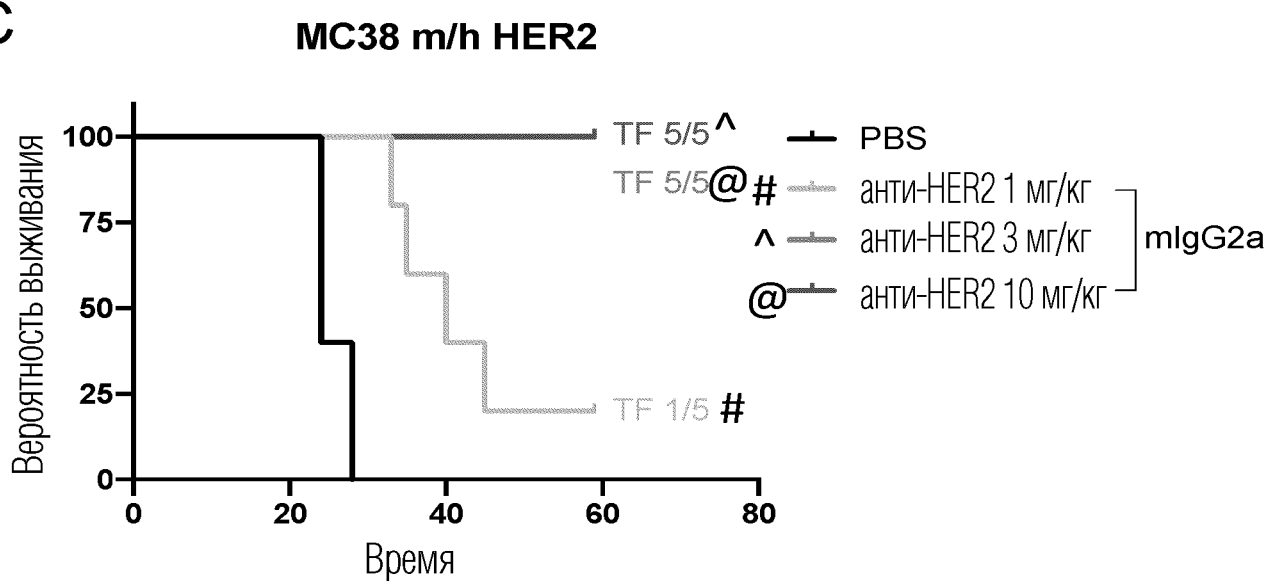
ФИГ. 22A



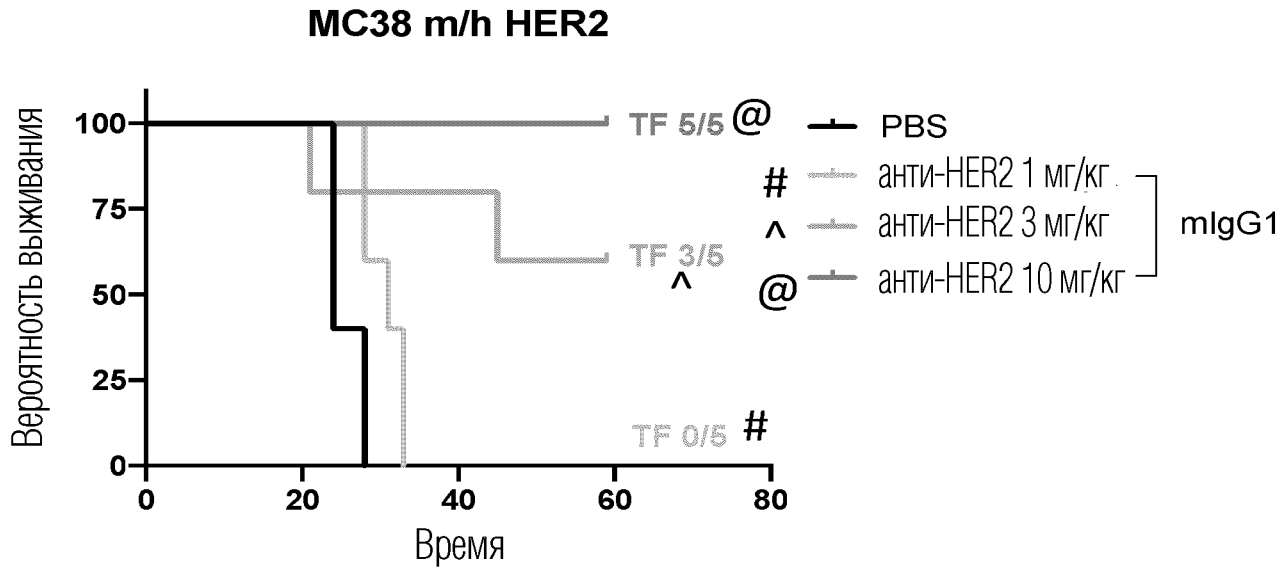
ФИГ. 22B

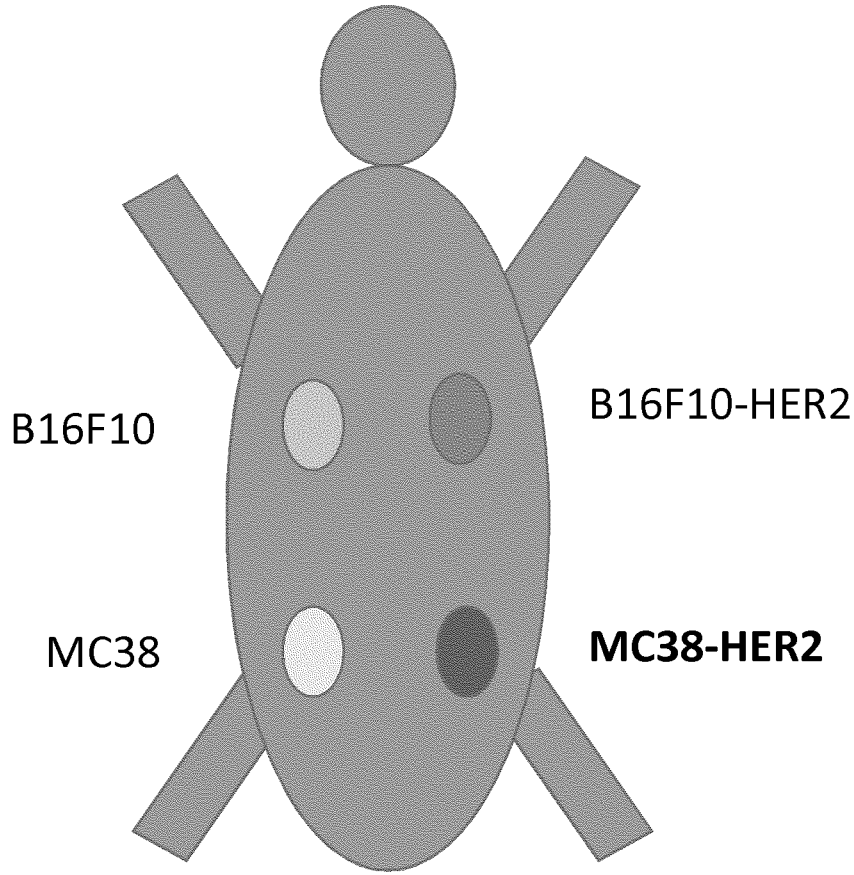


ФИГ. 22C

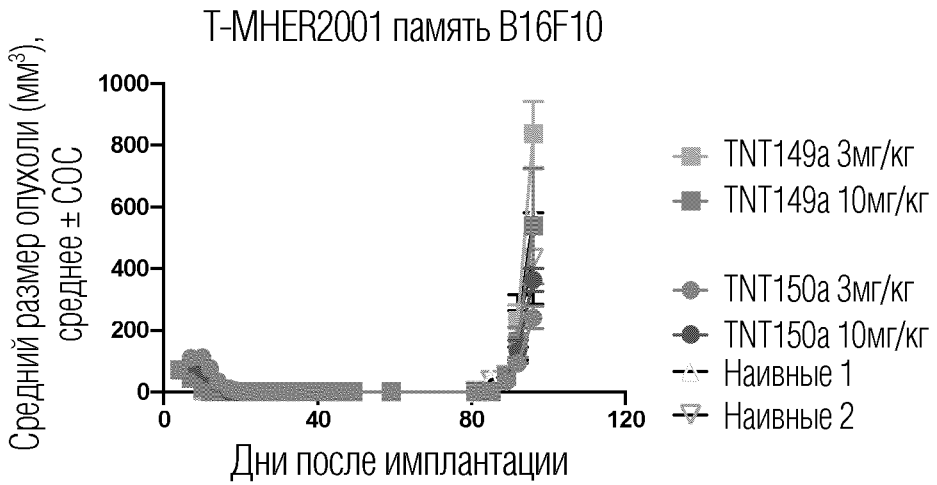


ФИГ. 22D

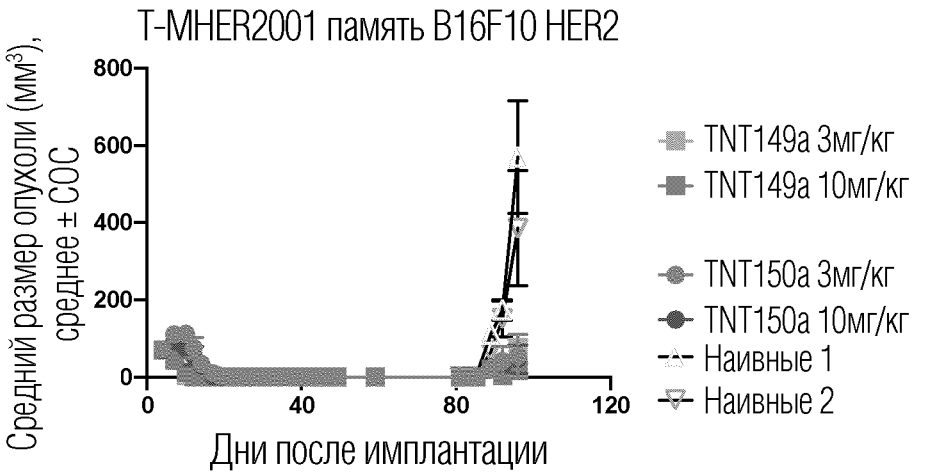




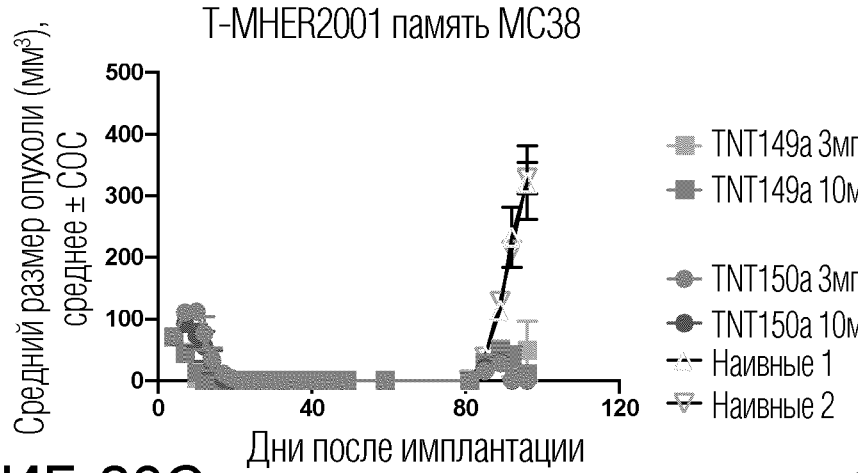
ФИГ. 23A



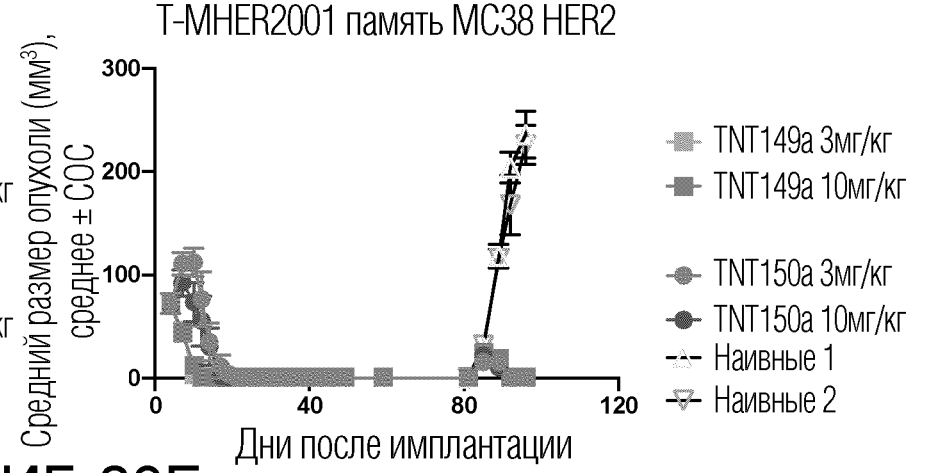
ФИГ. 23B



ФИГ. 23D

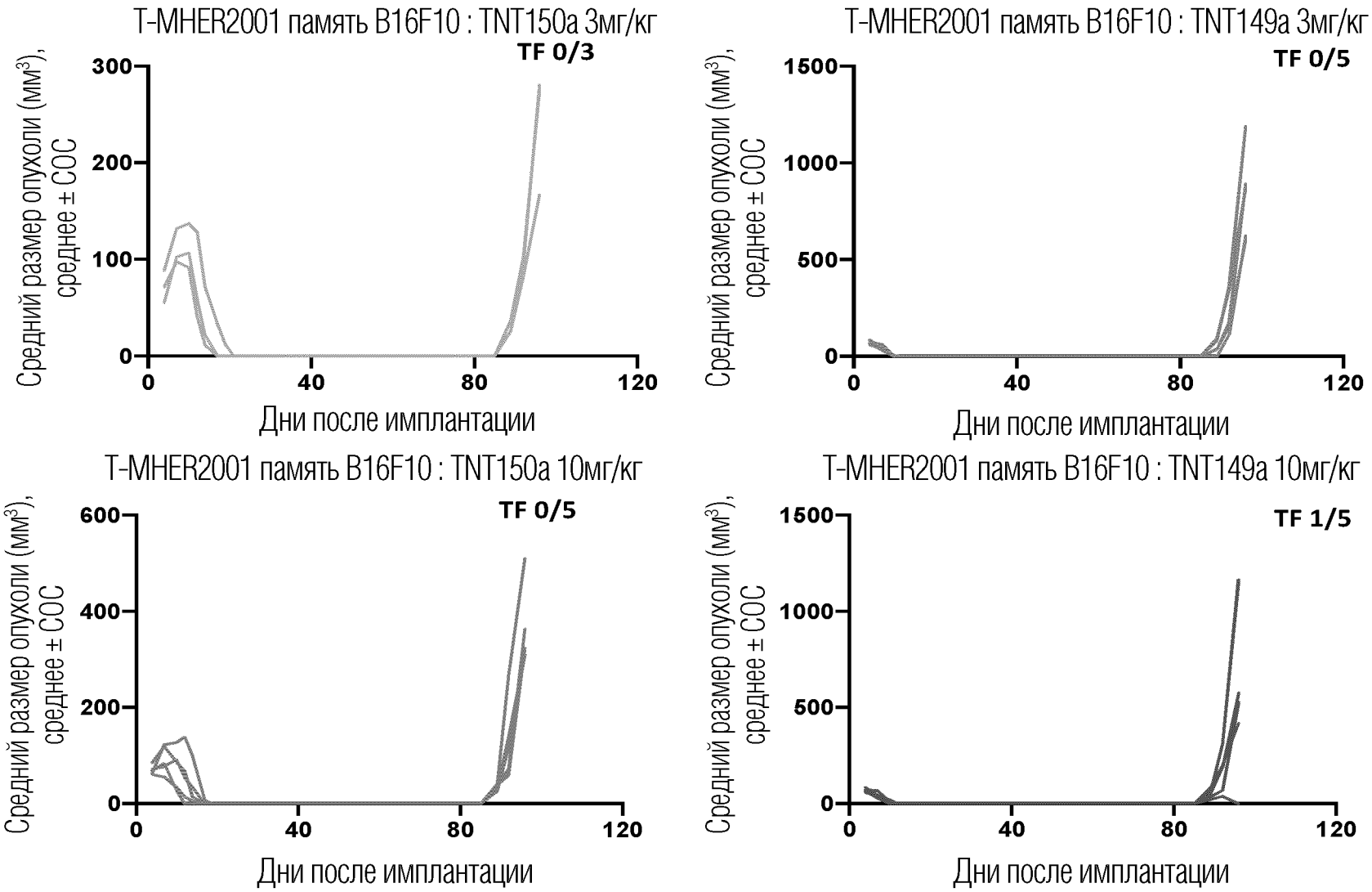


ФИГ. 23C

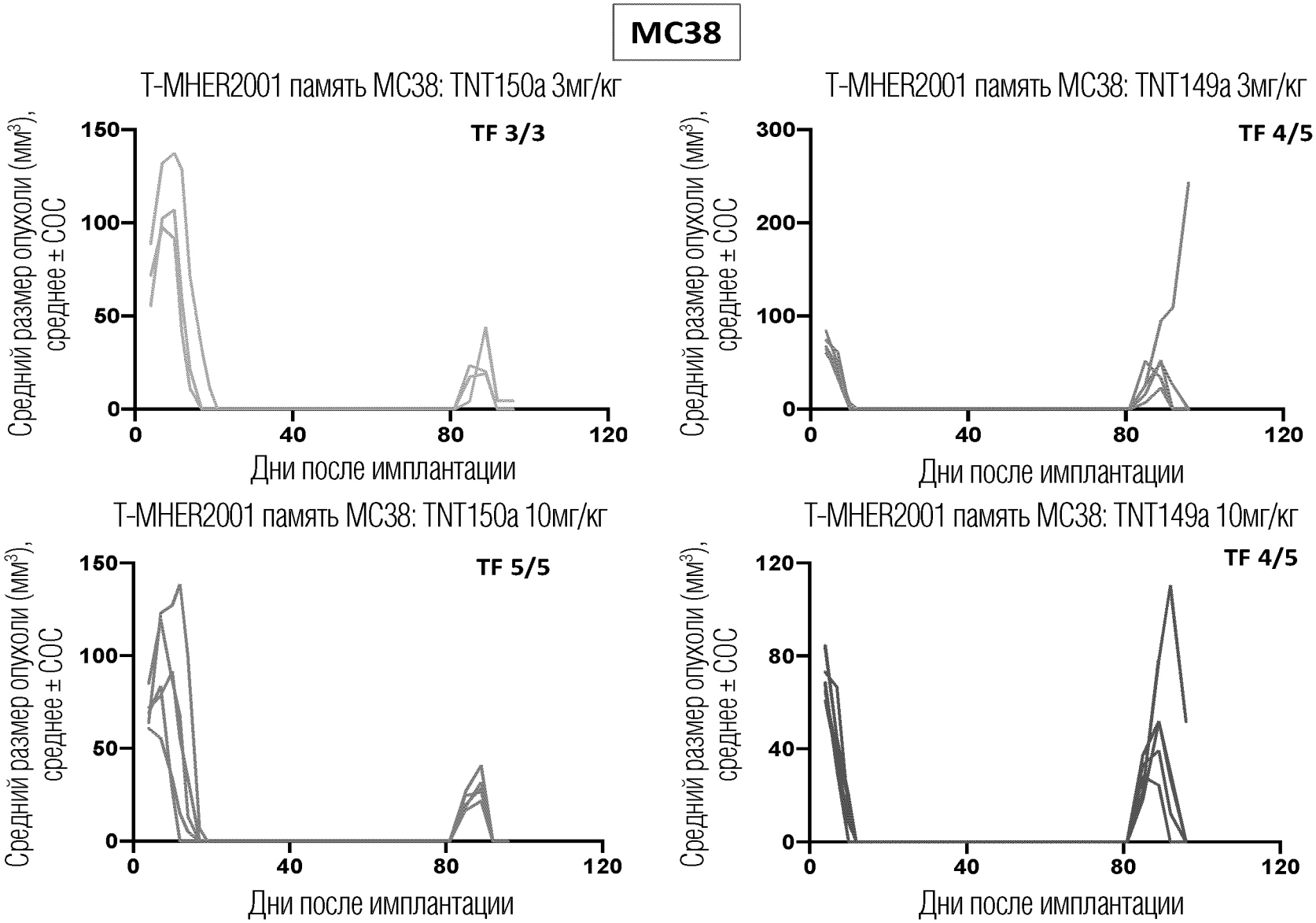


ФИГ. 23E

B16F10



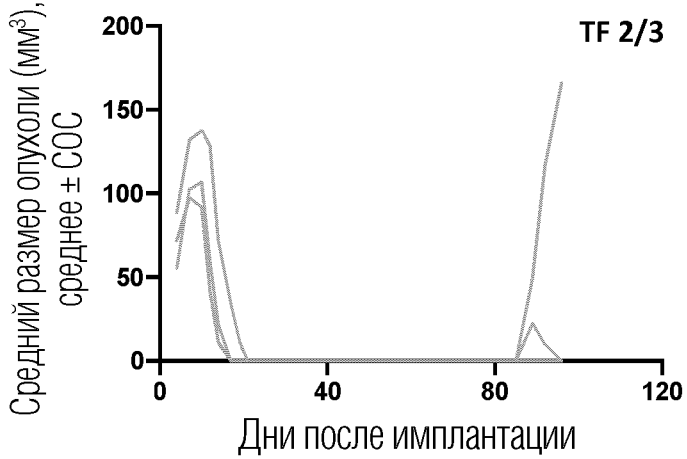
ФИГ. 23F


MC38
T-MHER2001 память MC38: TNT150a 3мг/кг
TF 3/3
Средний размер опухоли (мм3), среднее ± СОС
Дни после имплантации
T-MHER2001 память MC38: TNT149a 3мг/кг
TF 4/5
Средний размер опухоли (мм3), среднее ± СОС
Дни после имплантации
T-MHER2001 память MC38: TNT150a 10мг/кг
TF 5/5
Средний размер опухоли (мм3), среднее ± СОС
Дни после имплантации
T-MHER2001 память MC38: TNT149a 10мг/кг
TF 4/5
Средний размер опухоли (мм3), среднее ± СОС
Дни после имплантации

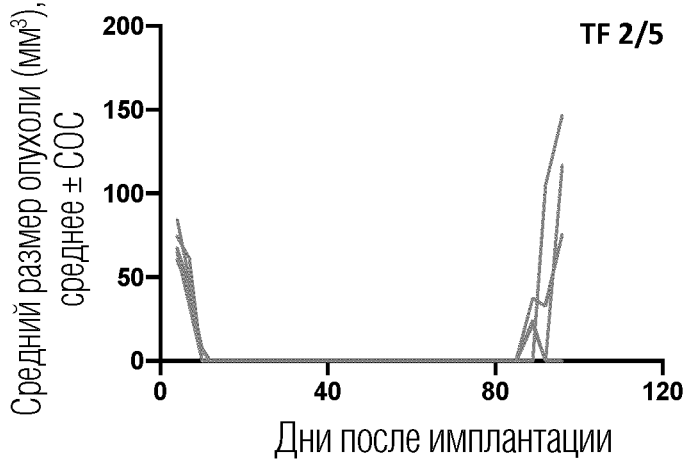
ФИГ. 23G

B16F10-HER2

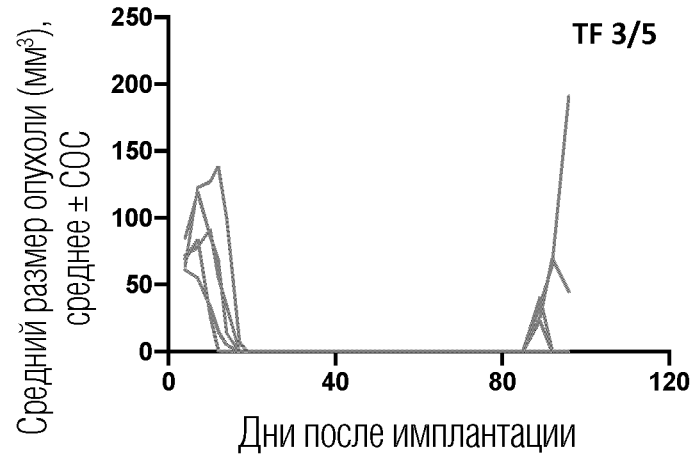
T-MHER2001 память B16F10 HER 2: TNT150a 3мг/кг



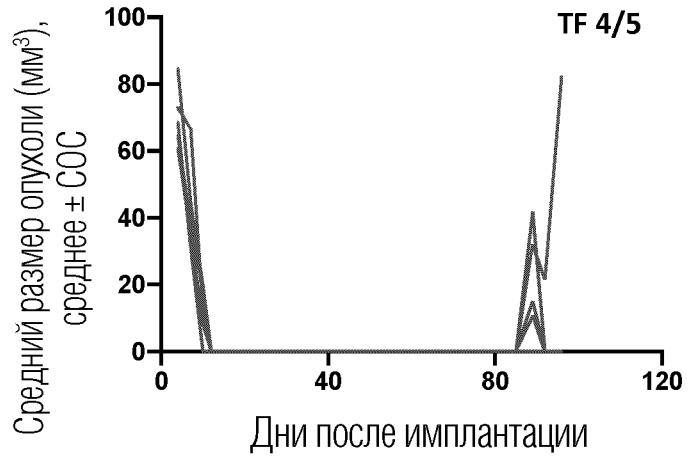
T-MHER2001 память B16F10 HER 2: TNT149a 3мг/кг



T-MHER2001 память B16F10 HER 2: TNT150a 10мг/кг

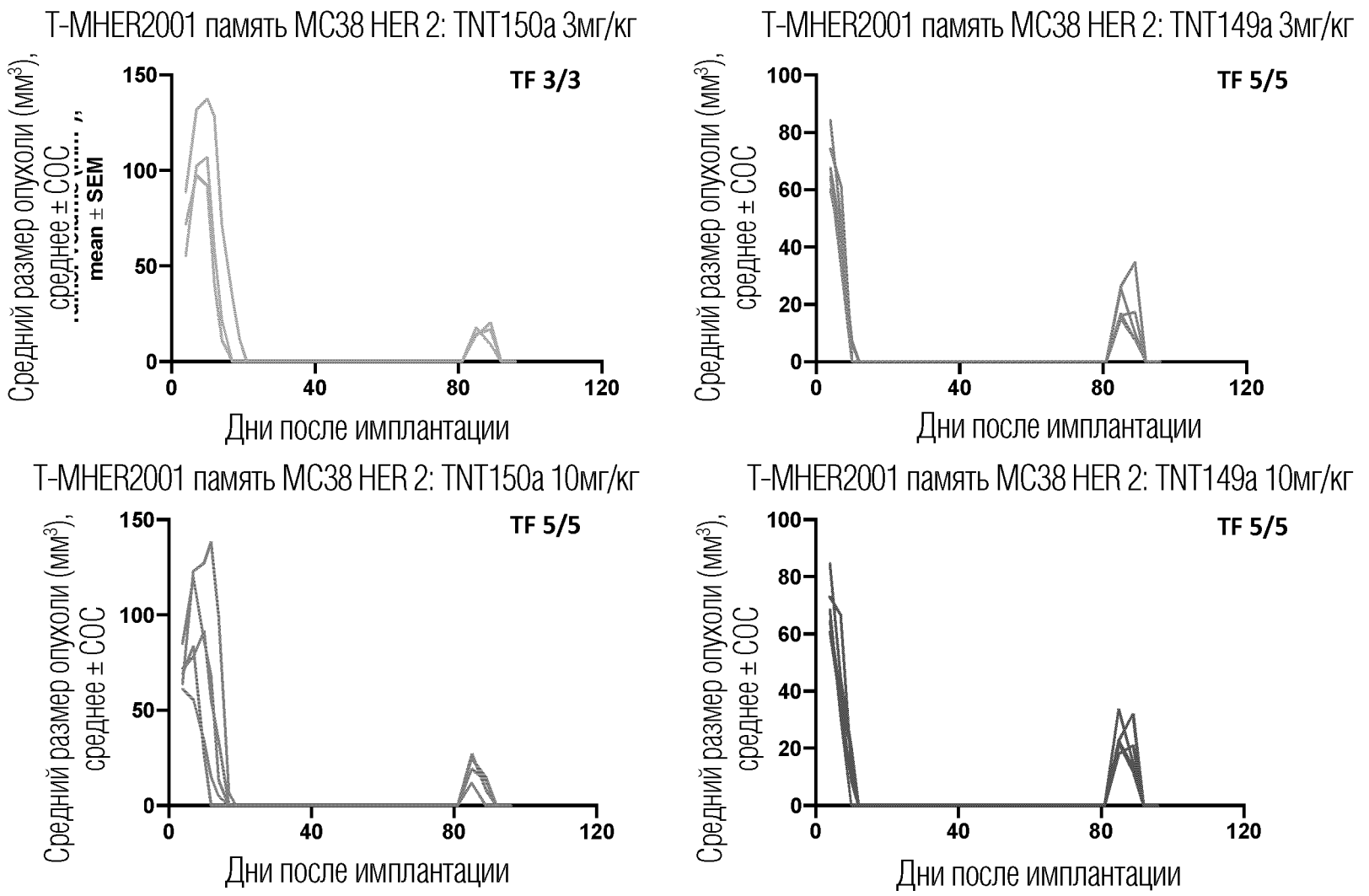


T-MHER2001 память B16F10 HER 2: TNT149a 10мг/кг



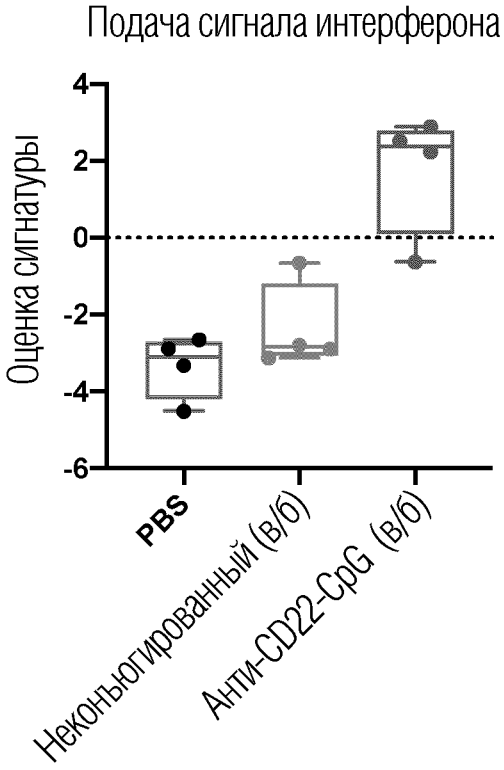
ФИГ. 23H

MC38-HER2

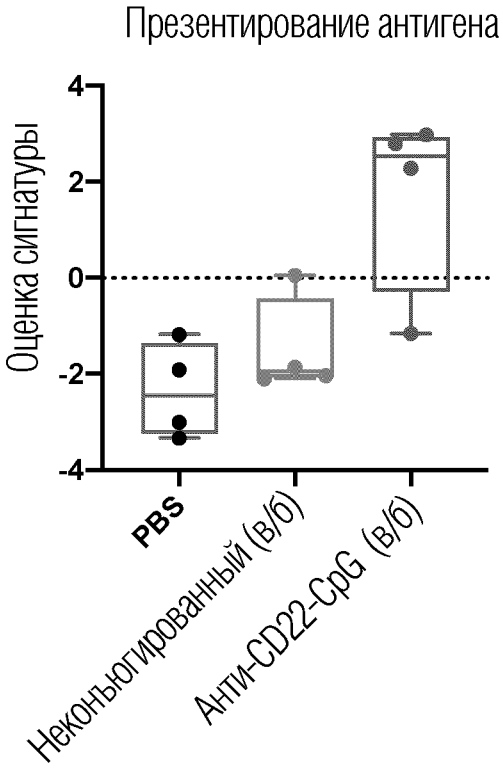


ФИГ. 23I

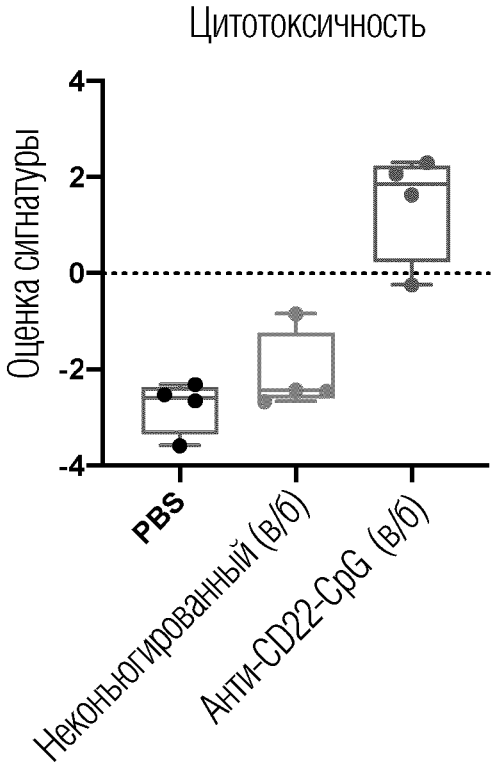
ФИГ. 24A

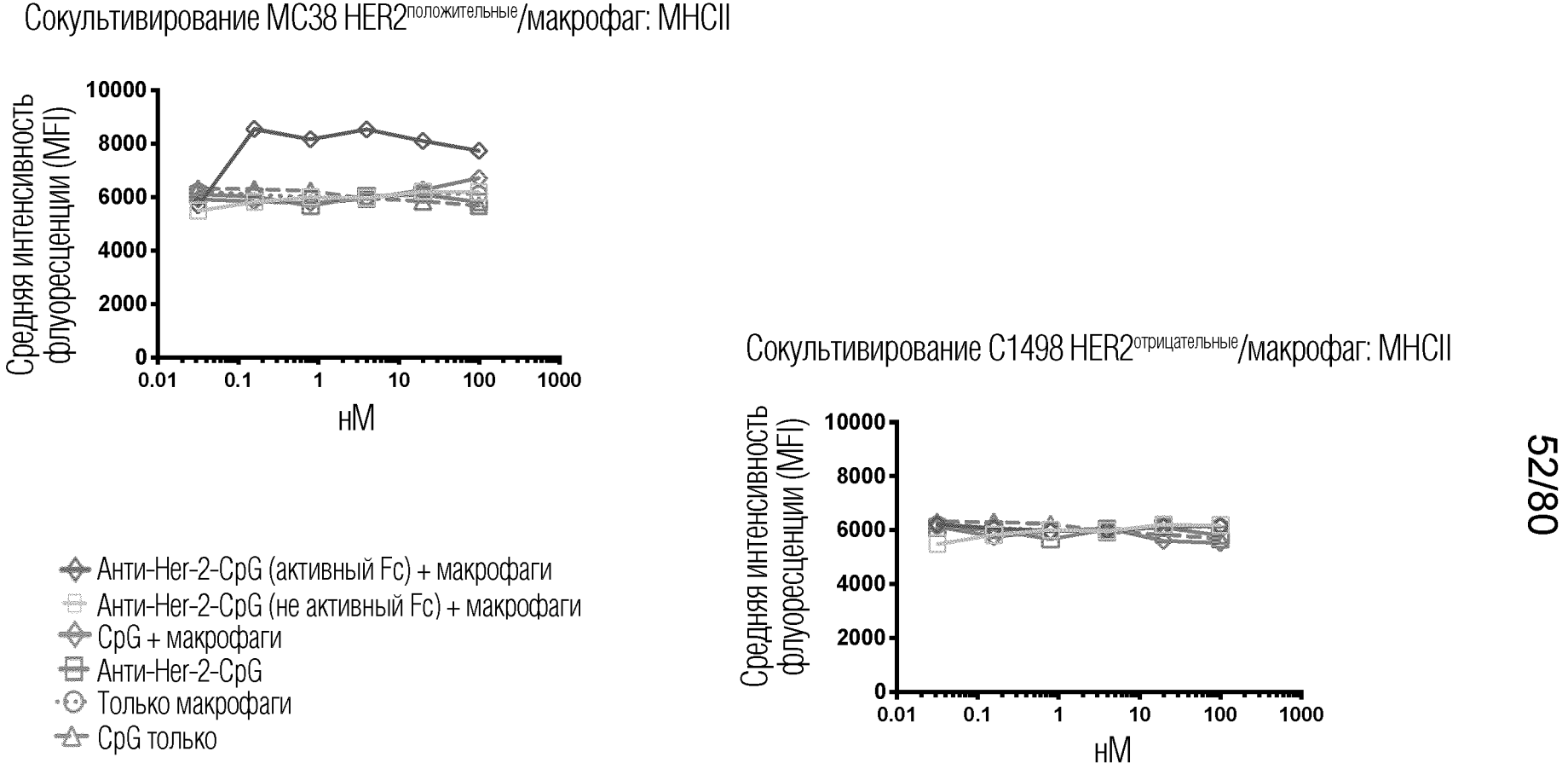


ФИГ. 24B



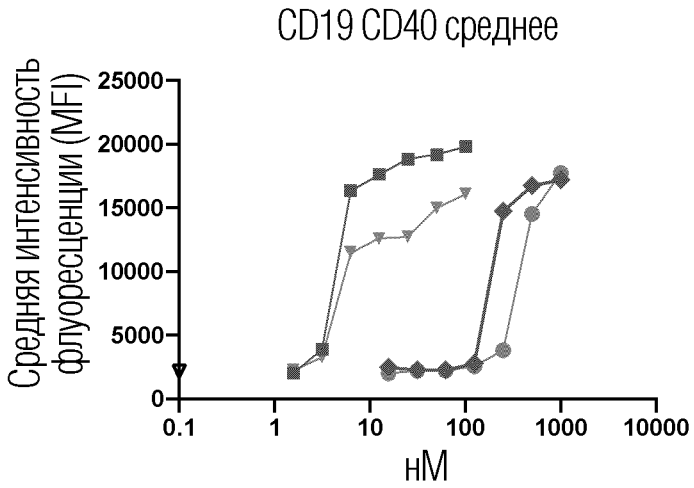
ФИГ. 24C

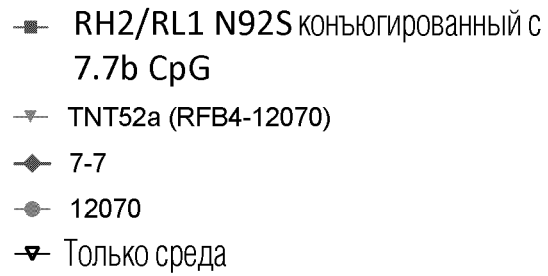


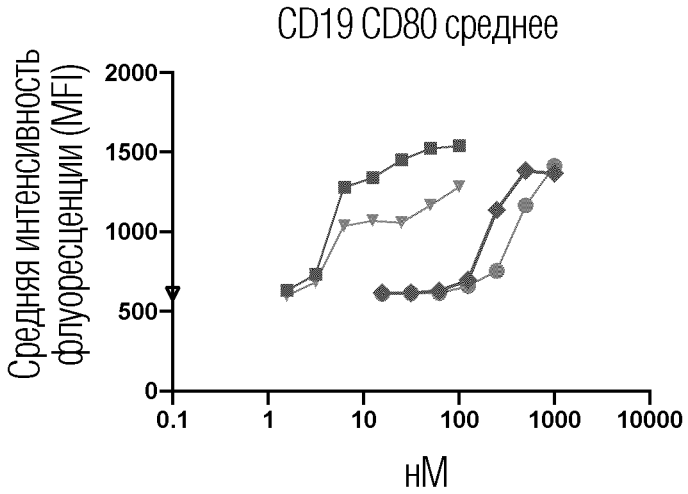

Сокультивирование MC38 HER2положительные/макрофаг: MHCII
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
нМ
Анти-Her-2-CpG (активный Fc) + макрофаги
Анти-Her-2-CpG (не активный Fc) + макрофаги
CpG + макрофаги
Анти-Her-2-CpG
Только макрофаги
CpG только
Сокультивирование C1498 HER2отрицательные/макрофаг: MHCII
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
нМ

ФИГ. 25

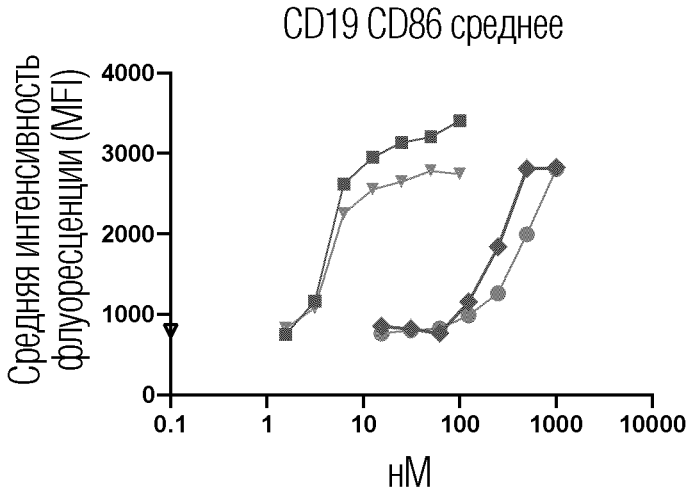
ФИГ. 26A



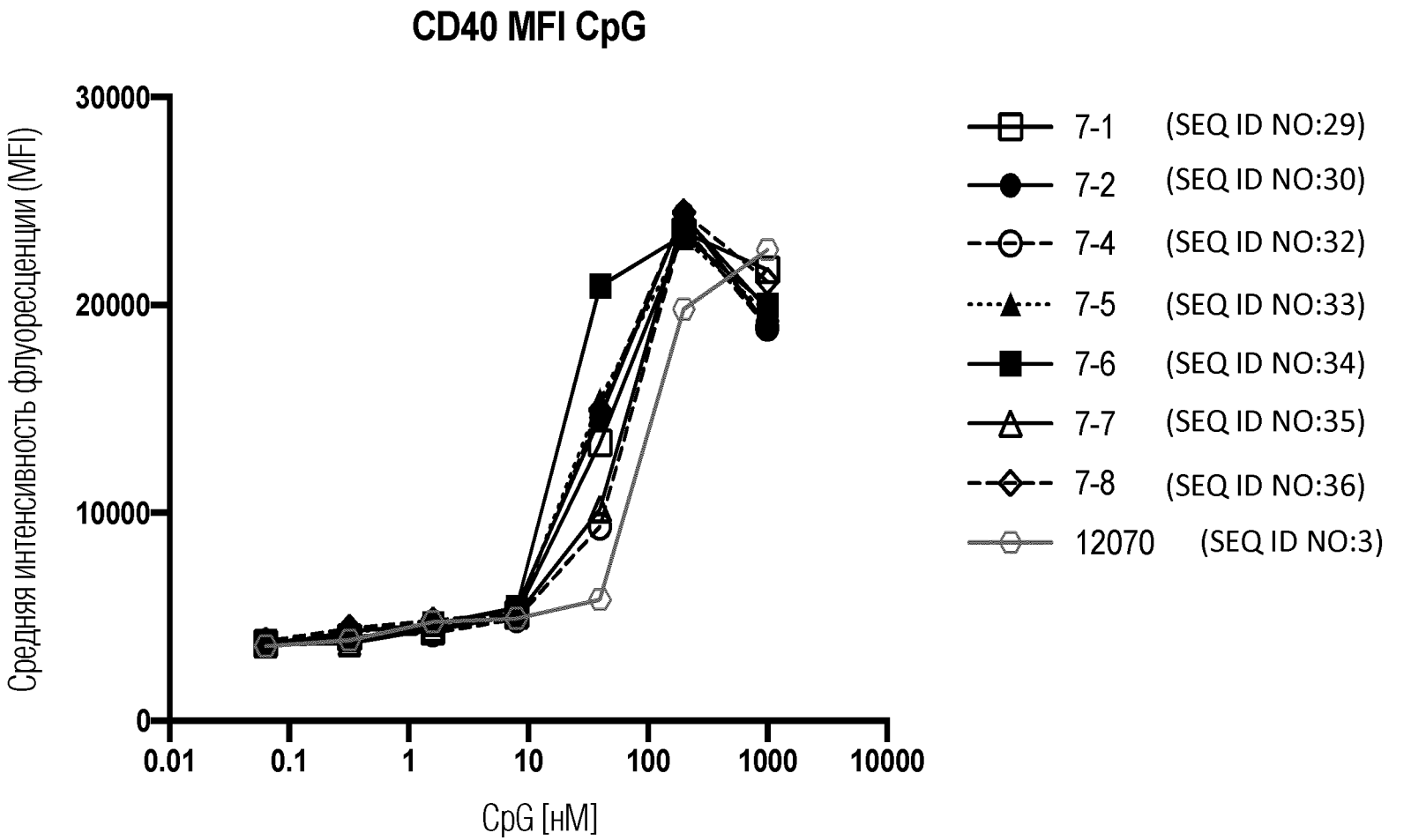




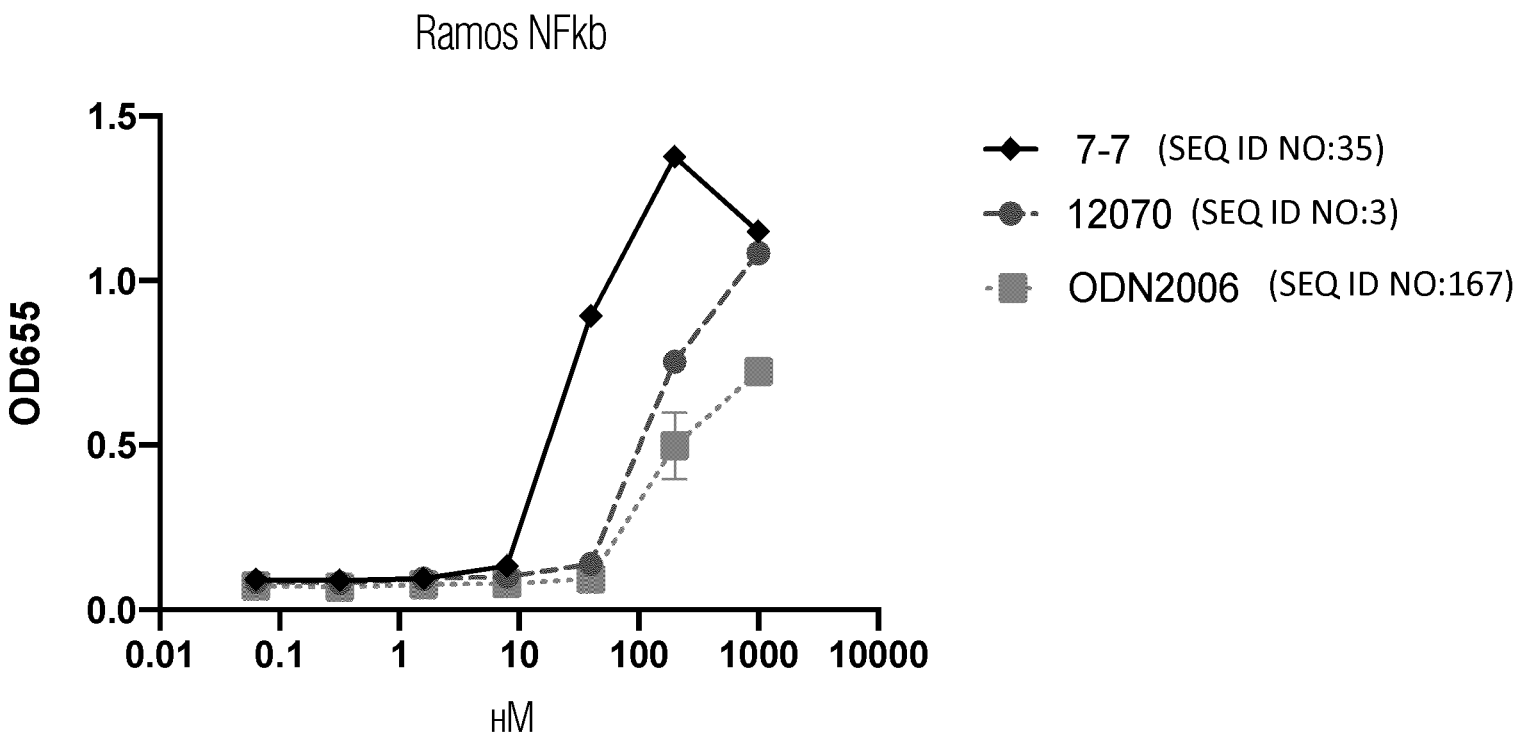
ФИГ. 26B



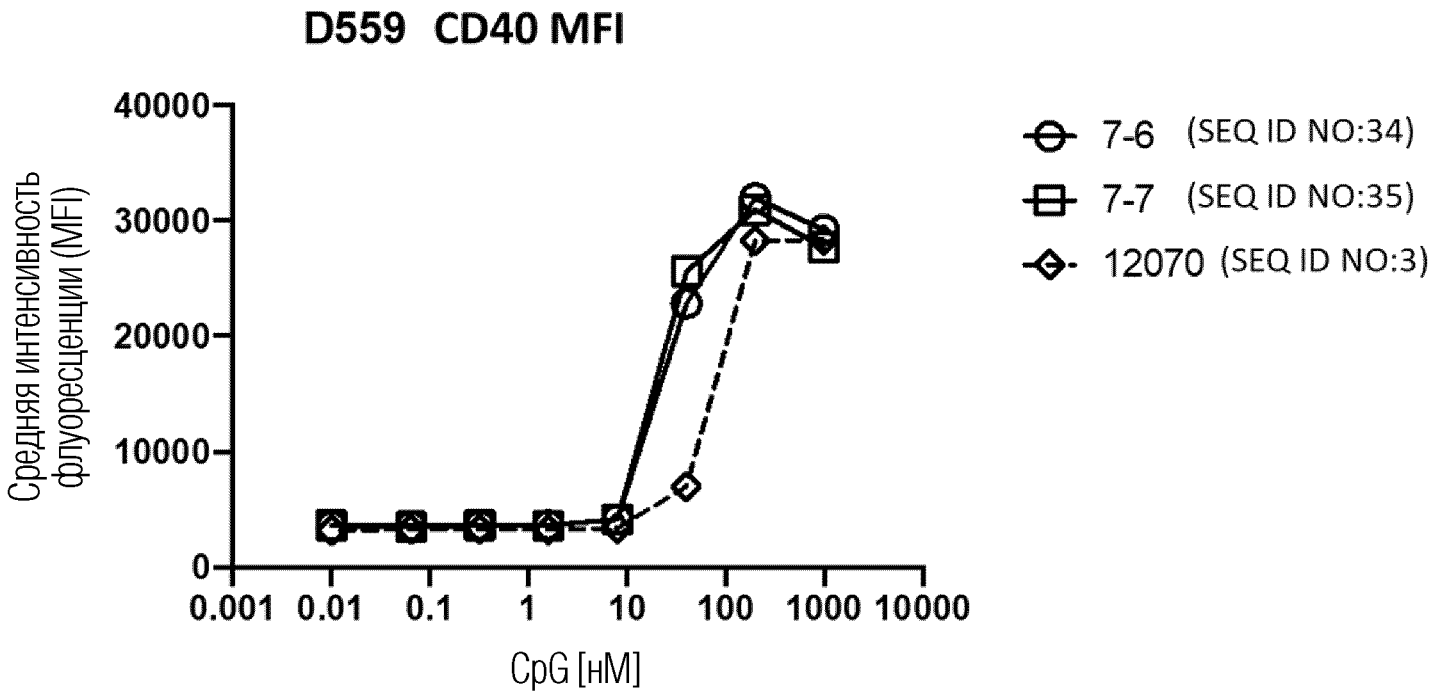
ФИГ. 26C


CD40 MFI CpG
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
CpG [нМ]
7-1 (SEQ ID NO:29)
7-2 (SEQ ID NO:30)
7-4 (SEQ ID NO:32)
7-5 (SEQ ID NO:33)
7-6 (SEQ ID NO:34)
7-7 (SEQ ID NO:35)
7-8 (SEQ ID NO:36)
12070 (SEQ ID NO:3)

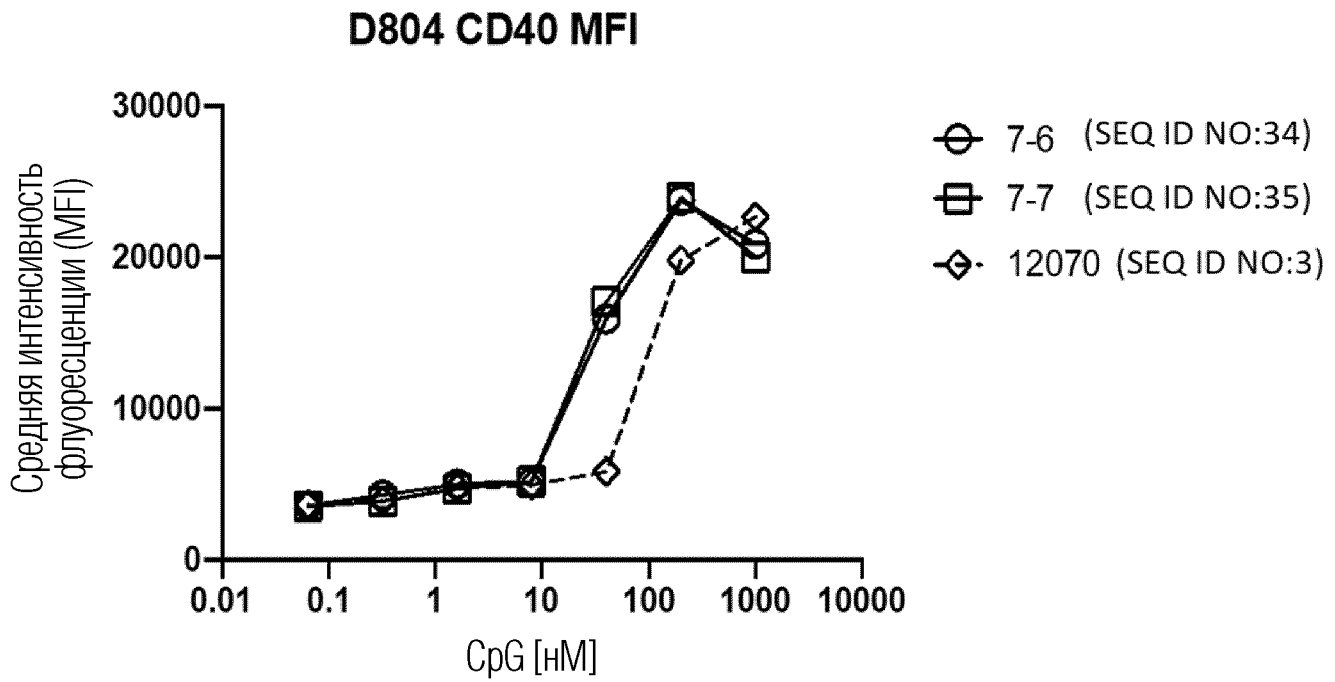
ФИГ. 27


Ramos NFkb
OD655
1.5
1.0
0.5
0.0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нМ
7-7 (SEQ ID NO:35)
12070 (SEQ ID NO:3)
ODN2006 (SEQ ID NO:167)

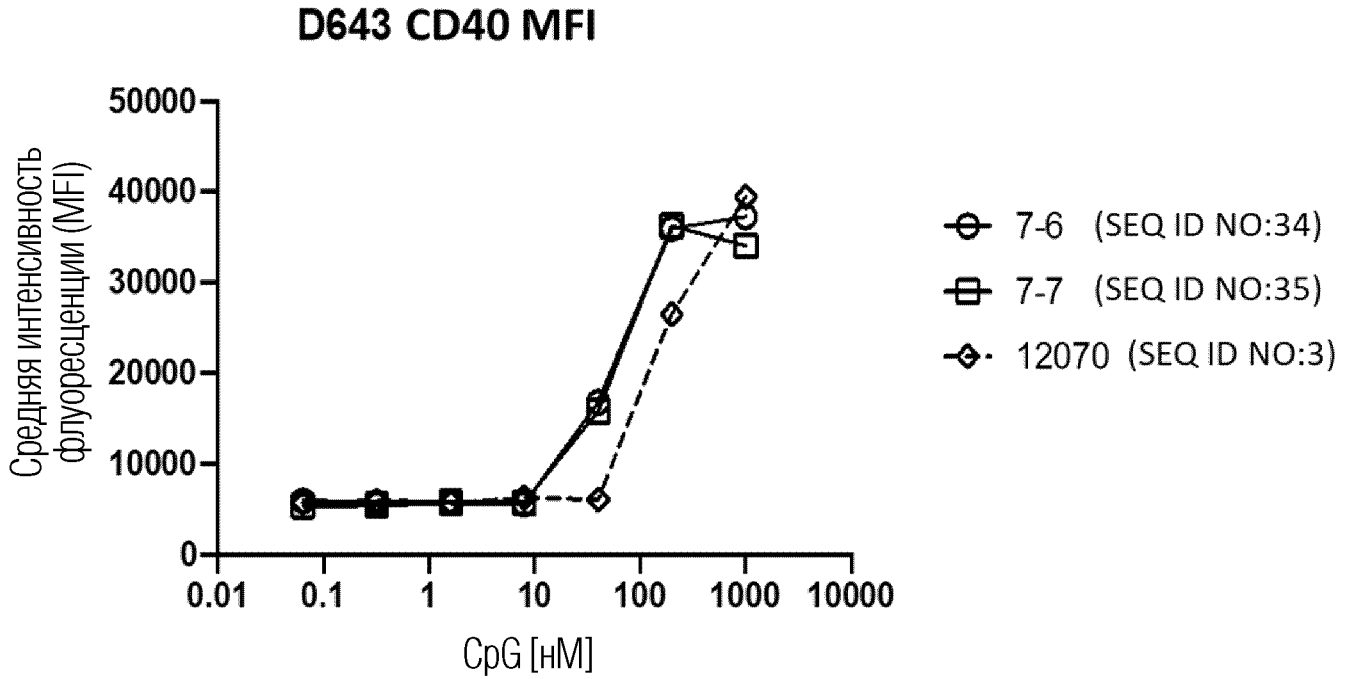
ФИГ. 28


D559 CD40 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
40000
30000
20000
10000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
CpG [нМ]
7-6 (SEQ ID NO:34)
7-7 (SEQ ID NO:35)
12070 (SEQ ID NO:3)

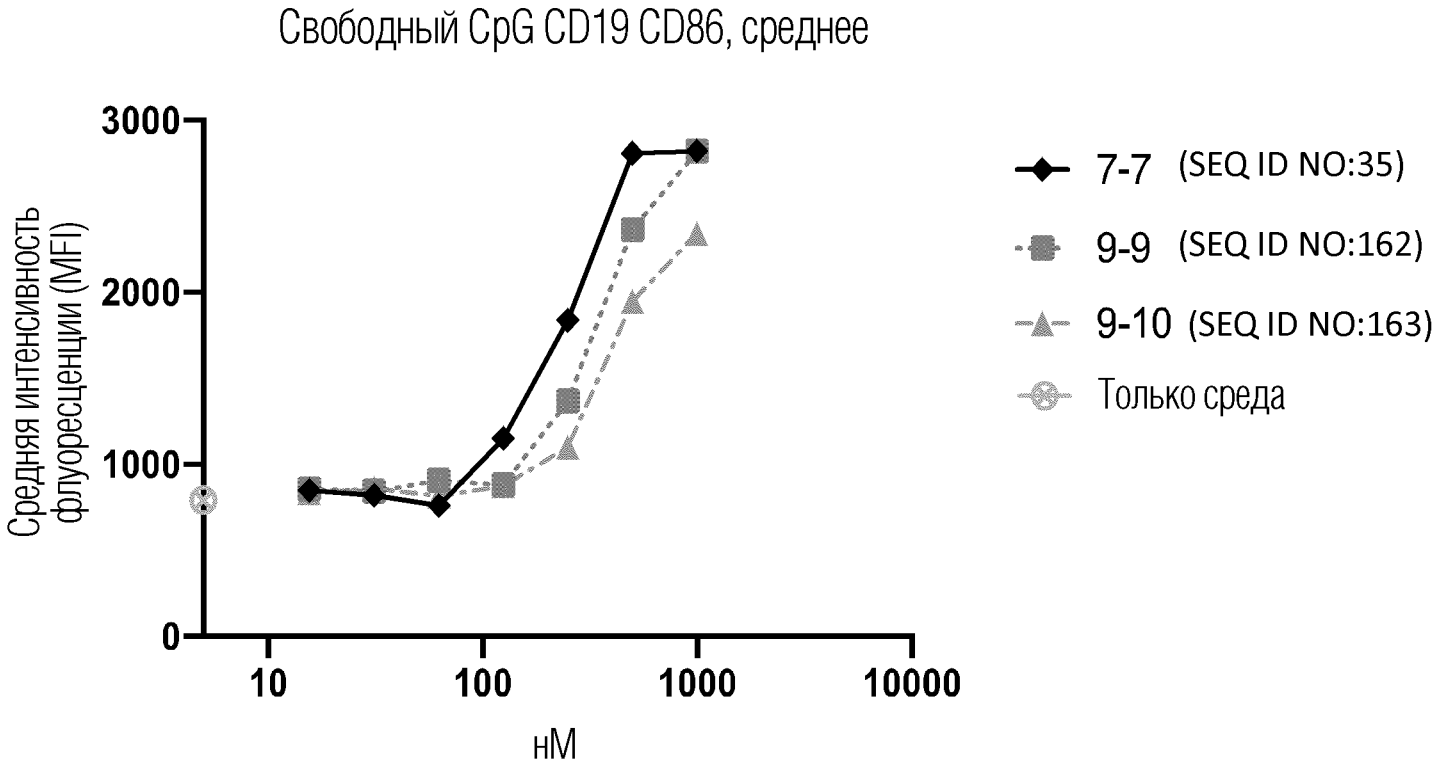
ФИГ. 29А


D804 CD40 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
CpG [нМ]
7-6 (SEQ ID NO:34)
7-7 (SEQ ID NO:35)
12070 (SEQ ID NO:3)

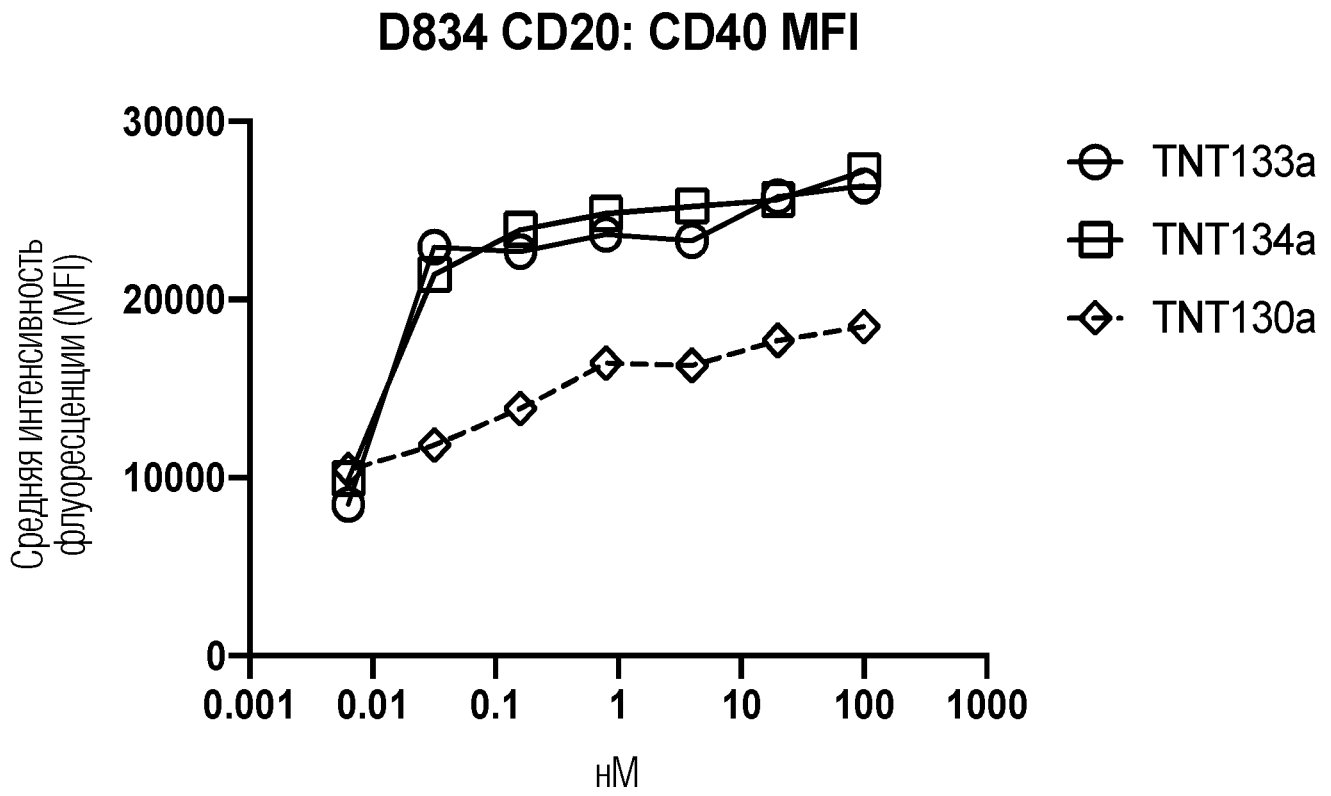
ФИГ. 29B


D643 CD40 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
CpG [нМ]
7-6 (SEQ ID NO:34)
7-7 (SEQ ID NO:35)
12070 (SEQ ID NO:3)

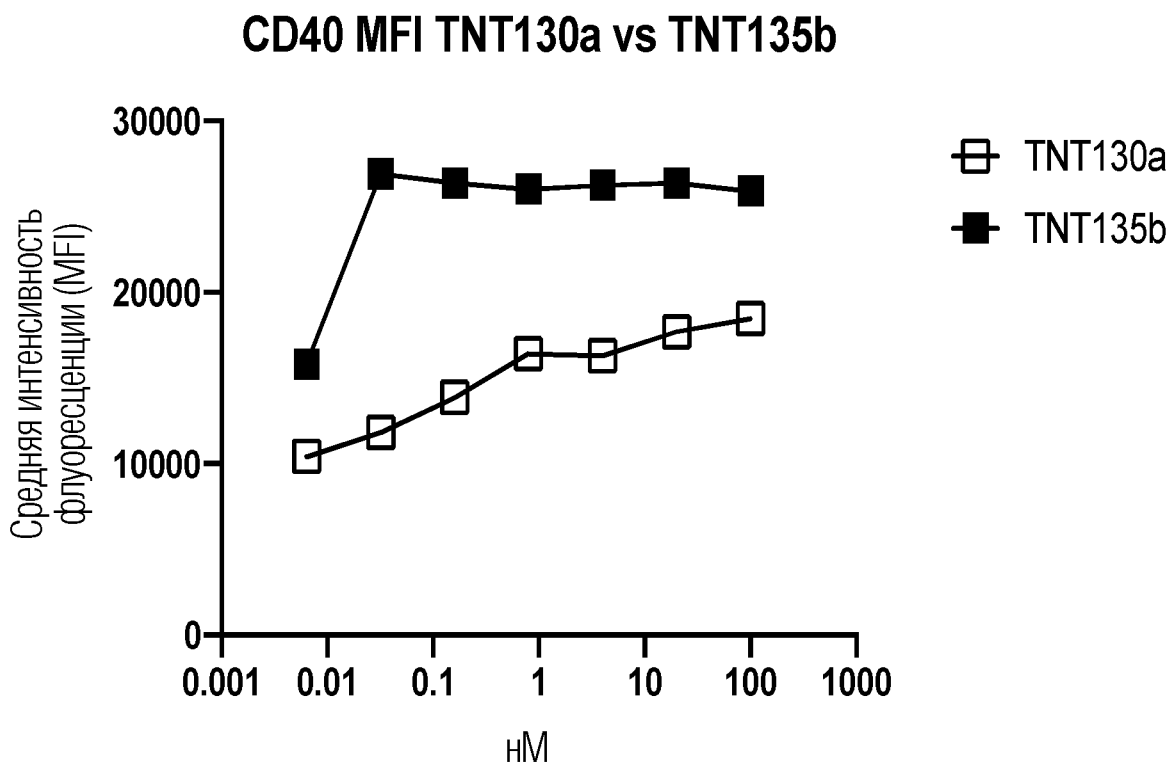
ФИГ. 29C


Свободный CpG CD19 CD86, среднее
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
3000
2000
1000
0
10
100
1000
10000
нМ
7-7 (SEQ ID NO:35)
9-9 (SEQ ID NO:162)
9-10 (SEQ ID NO:163)
Только среда

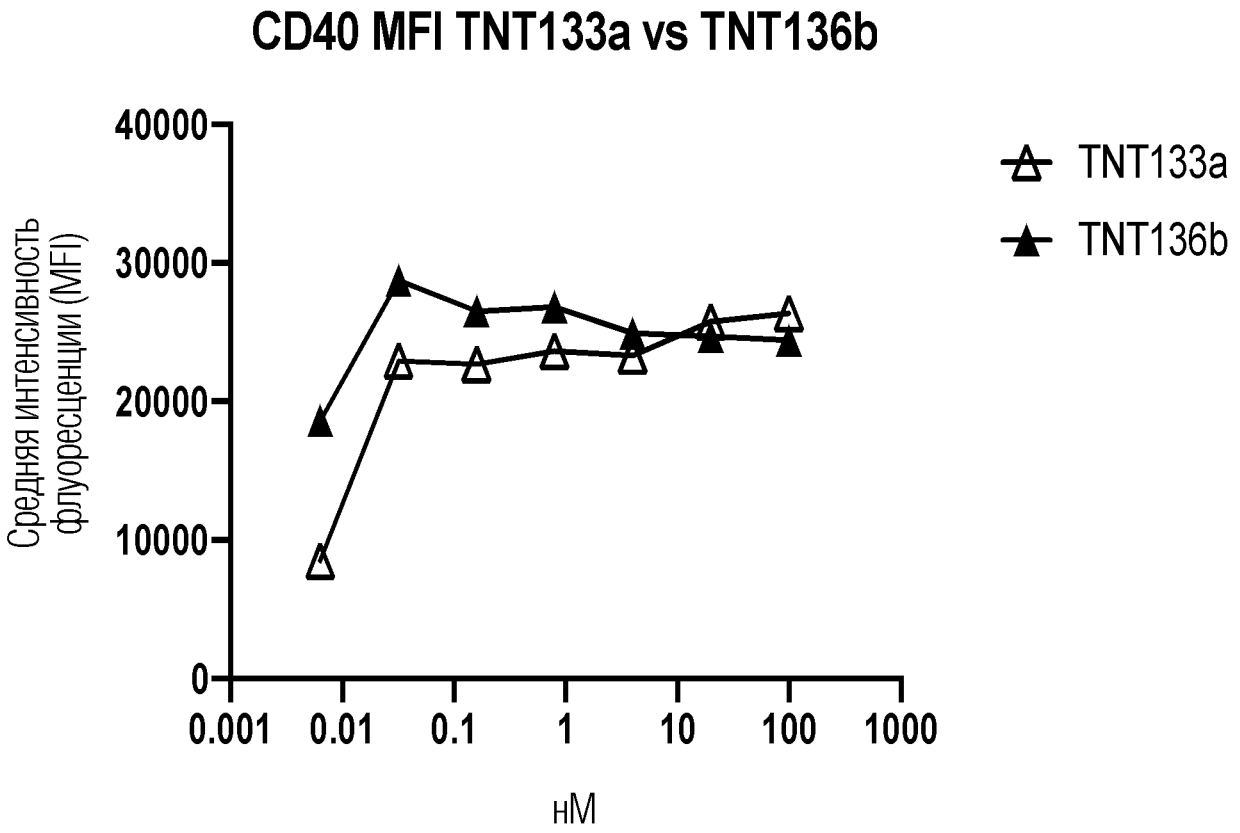
ФИГ. 30


D834 CD20: CD40 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
30000
20000
10000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
нМ
TNT133a
TNT134a
TNT130a

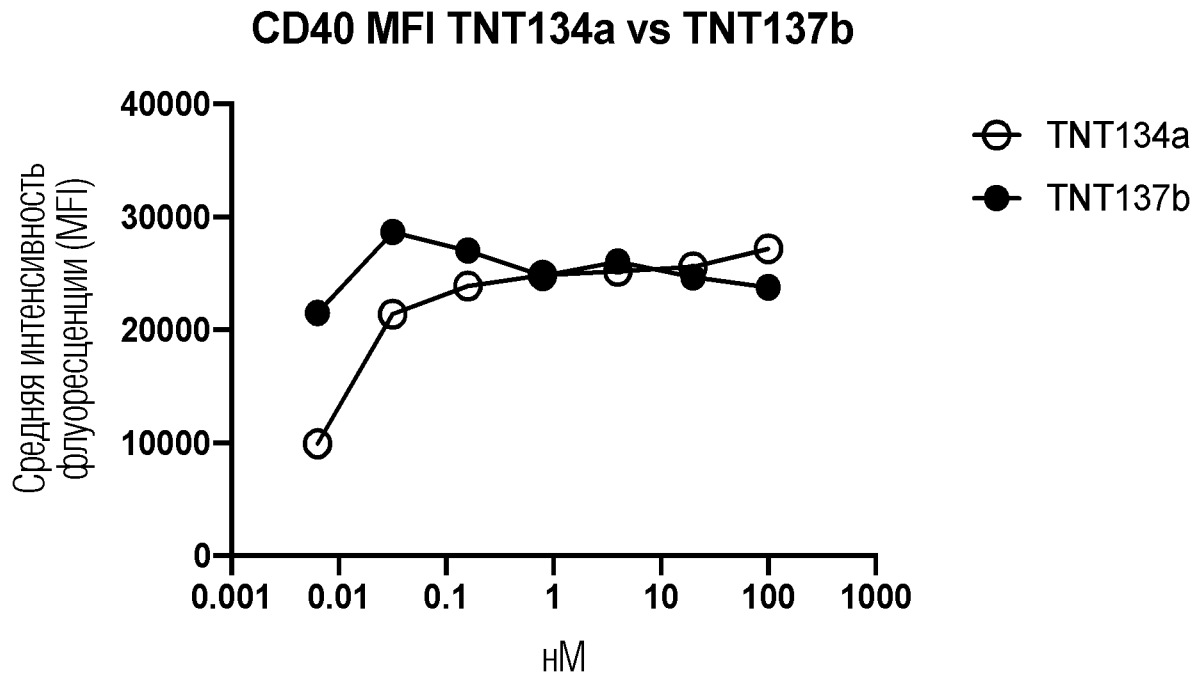
ФИГ. 31


CD40 MFI TNT130a vs TNT135b
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
30000
20000
10000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
нМ
TNT130a
TNT135b

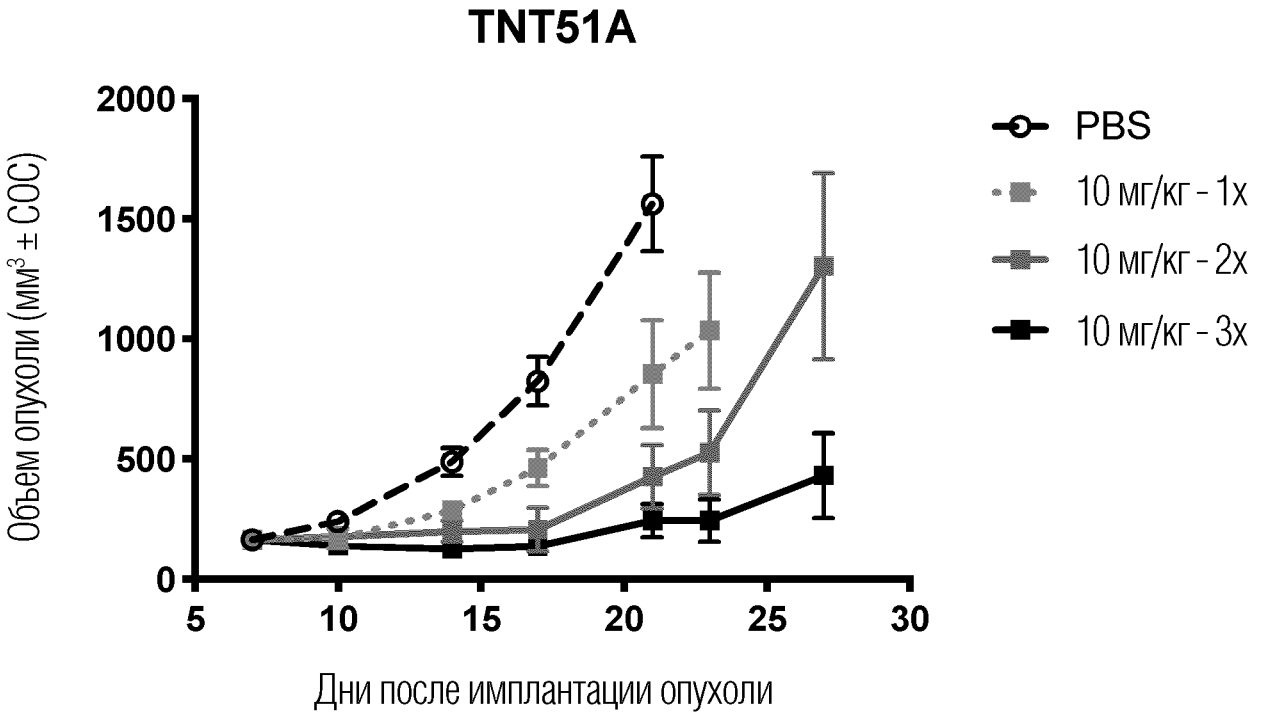
ФИГ. 32А


CD40 MFI TNT133a vs TNT136b
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
40000
30000
20000
10000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
нМ
TNT133a
TNT136b

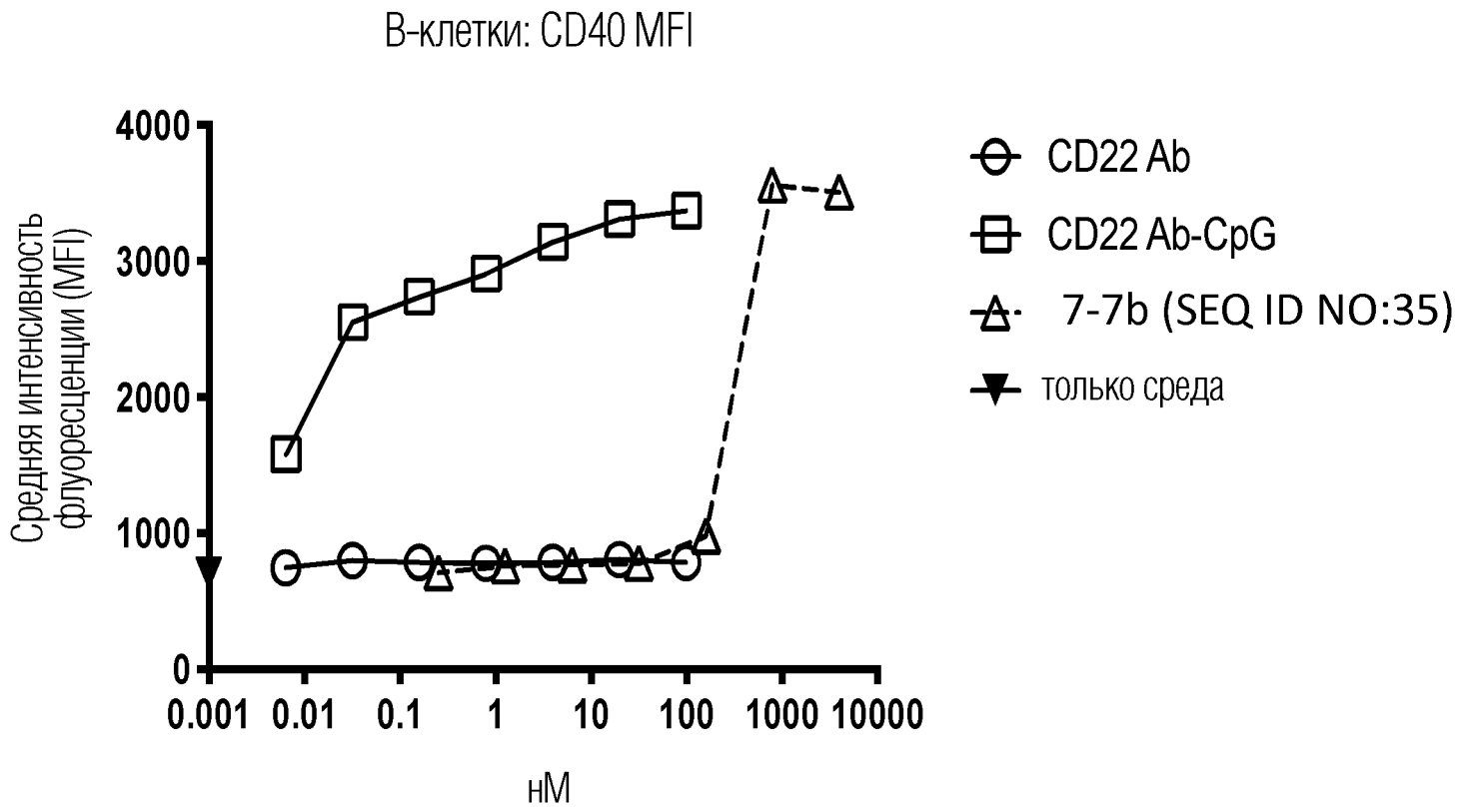
ФИГ. 32B


CD40 MFI TNT134a vs TNT137b
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
40000
30000
20000
10000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
нМ
TNT134a
TNT137b

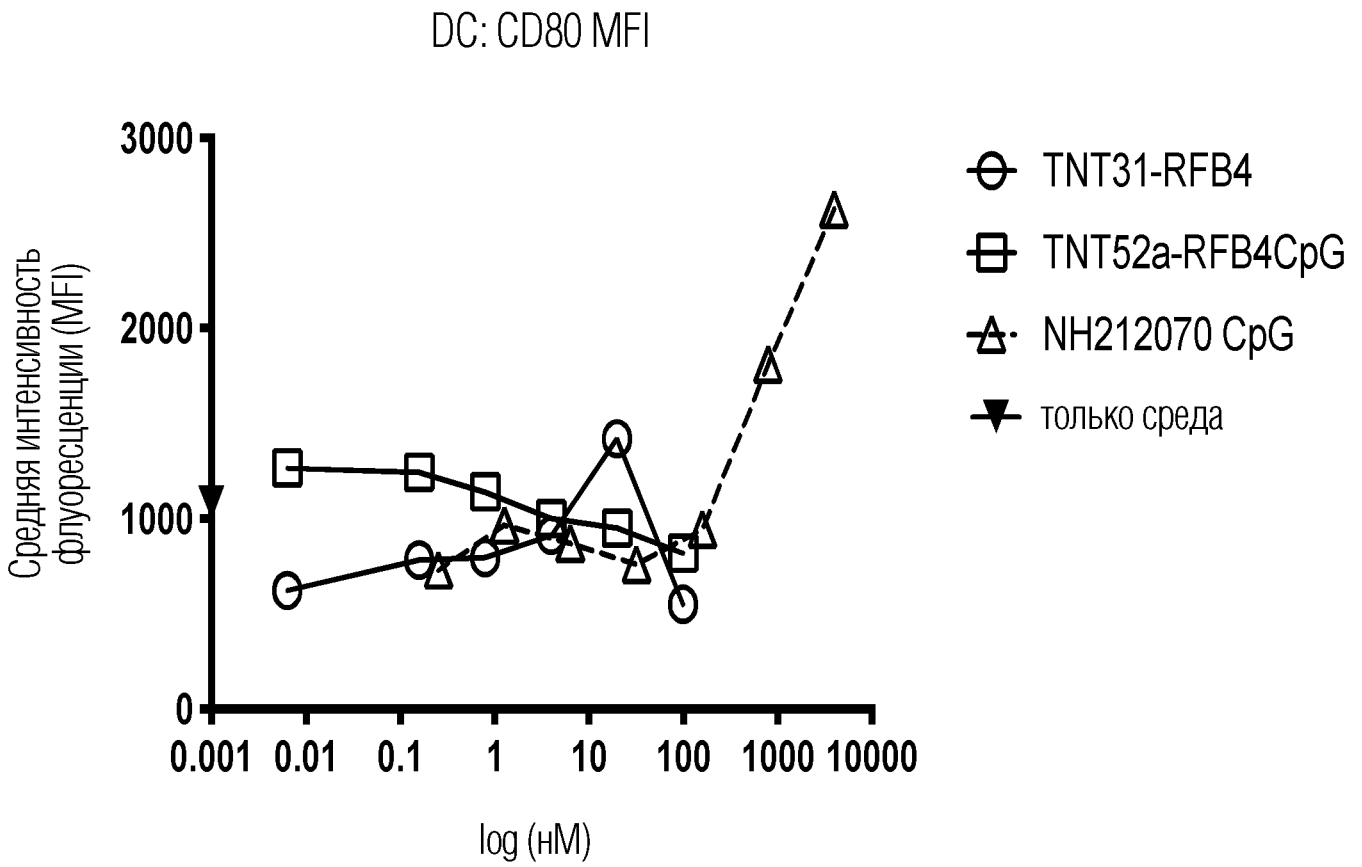
ФИГ. 32C


TNT51A
2000
1500
1000
500
0
Объем опухоли (мм³ ± СОС)
5
10
15
20
25
30
Дни после имплантации опухоли
PBS
10 мг/кг - 1х
10 мг/кг - 2х
10 мг/кг - 3х

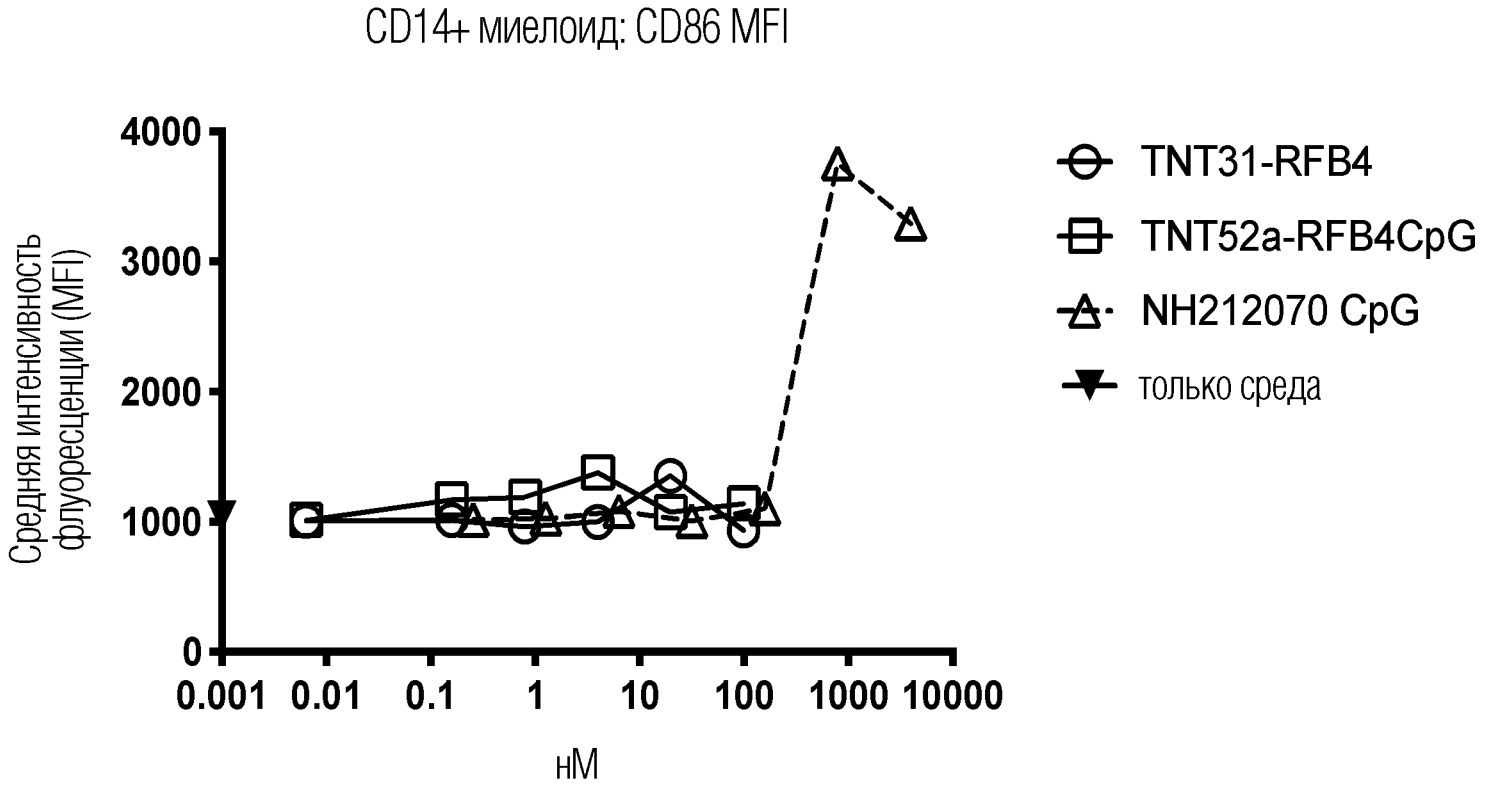
ФИГ. 33


B-клетки: CD40 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
4000
3000
2000
1000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нМ
CD22 Ab
CD22 Ab-CpG
7-7b (SEQ ID NO:35)
только среда

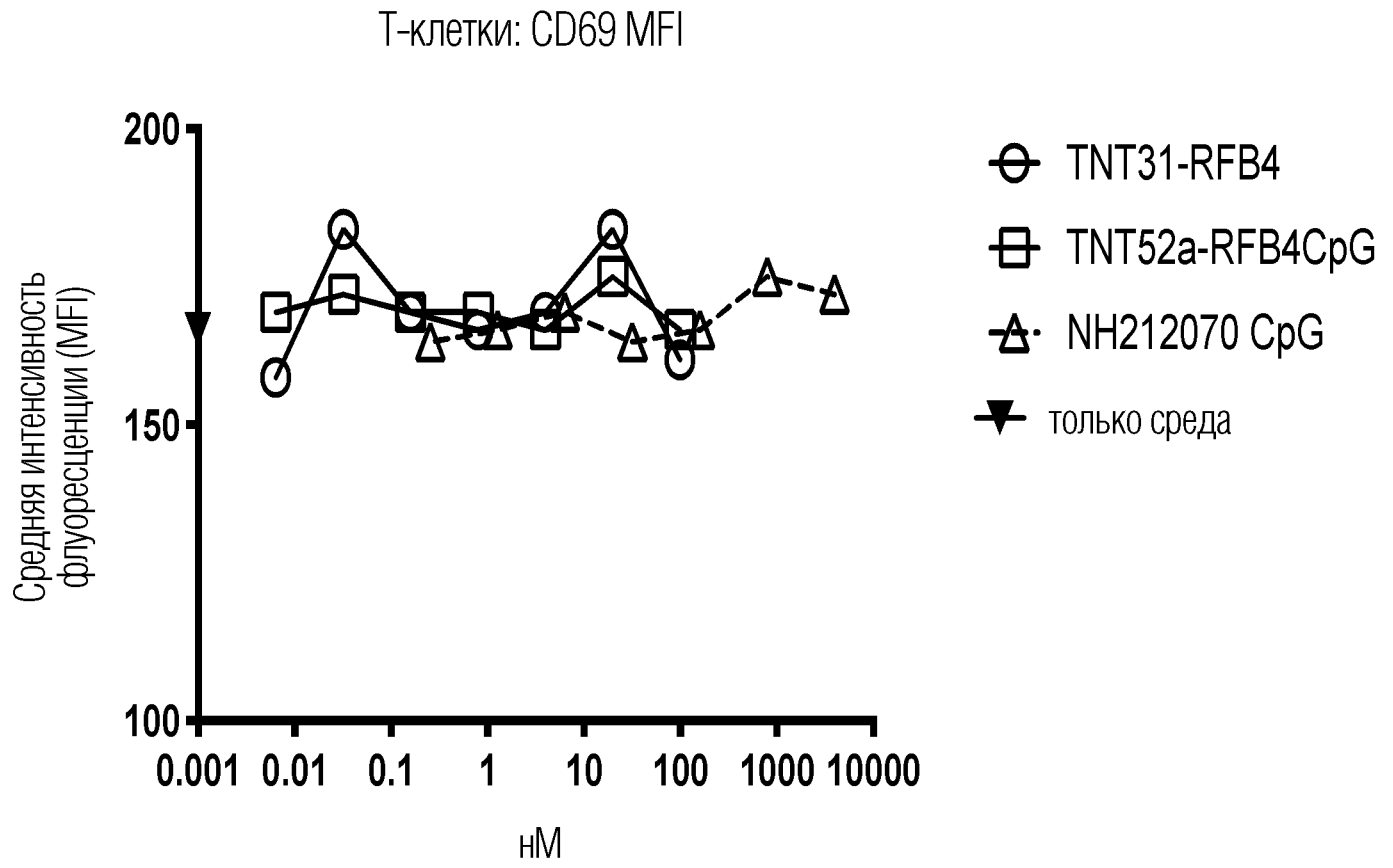
ФИГ. 34А


DC: CD80 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
3000
2000
1000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
log (нМ)
TNT31-RFB4
TNT52a-RFB4CpG
NH212070 CpG
только среда

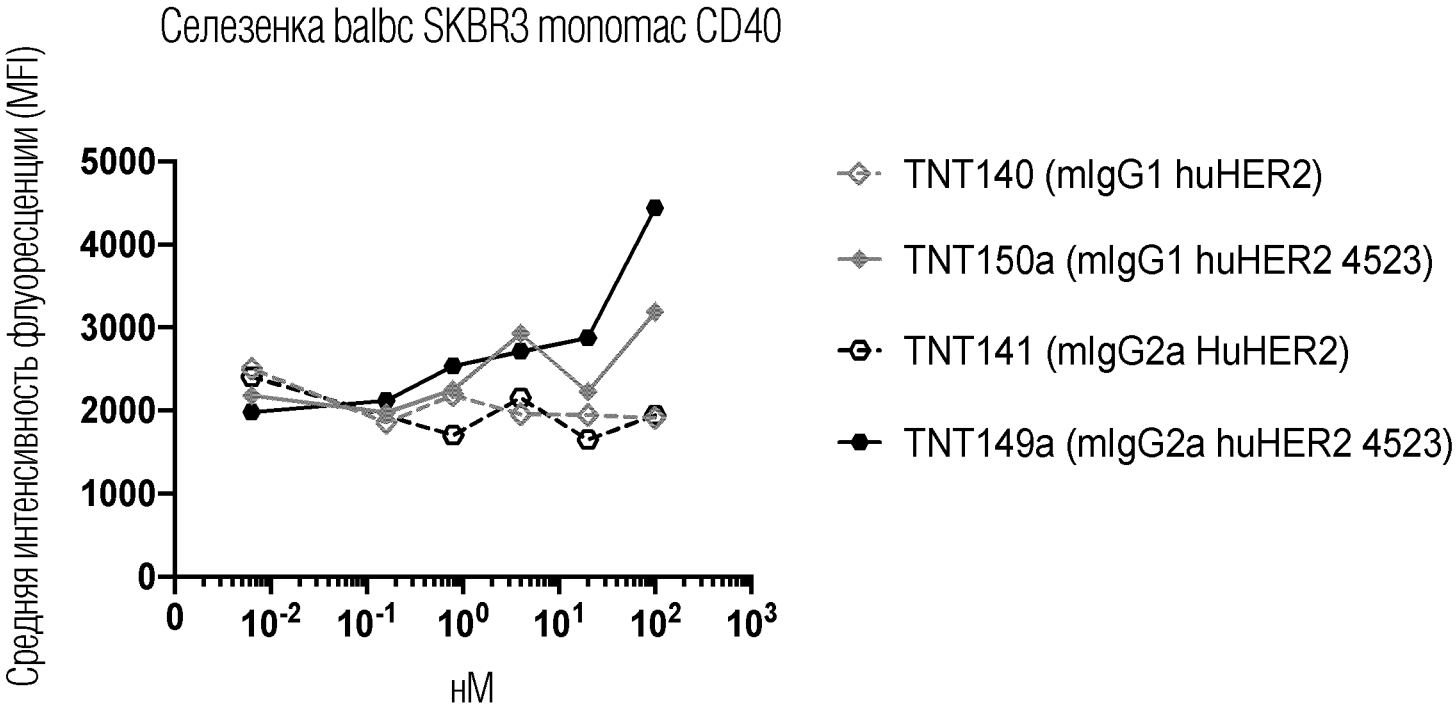
ФИГ. 34B


CD14+ миелоид: CD86 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
4000
3000
2000
1000
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нМ
TNT31-RFB4
TNT52a-RFB4CpG
NH212070 CpG
только среда

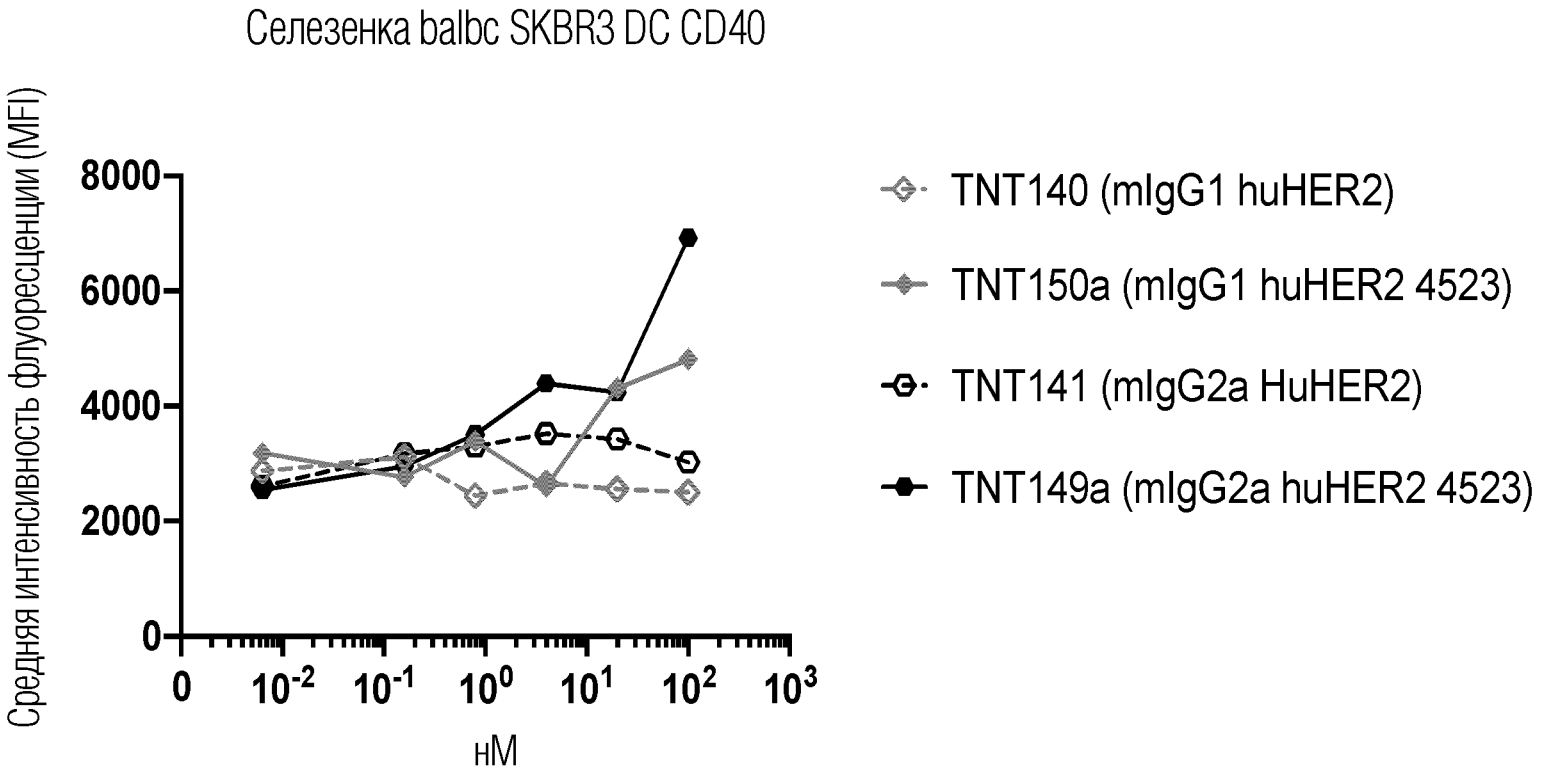
ФИГ. 34C


Т-клетки: CD69 MFI
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
200
150
100
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
нМ
TNT31-RFB4
TNT52a-RFB4CpG
NH212070 CpG
только среда

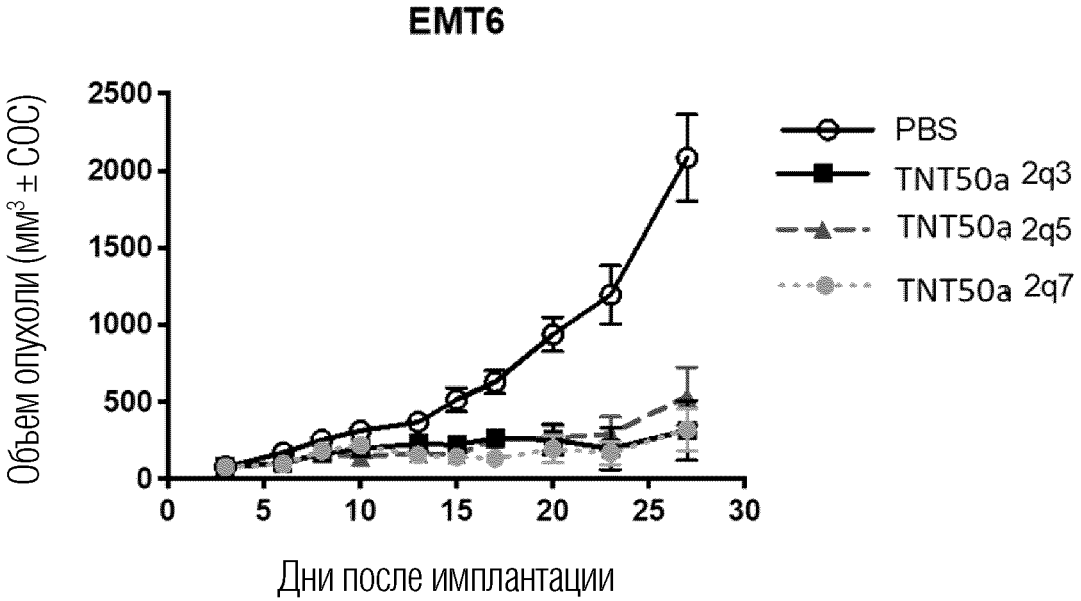
ФИГ. 34D


Селезенка balbc SKBR3 monomac CD40
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10-2
10-1
100
101
102
103
нМ
TNT140 (mIgG1 huHER2)
TNT150a (mIgG1 huHER2 4523)
TNT141 (mIgG2a HuHER2)
TNT149a (mIgG2a huHER2 4523)

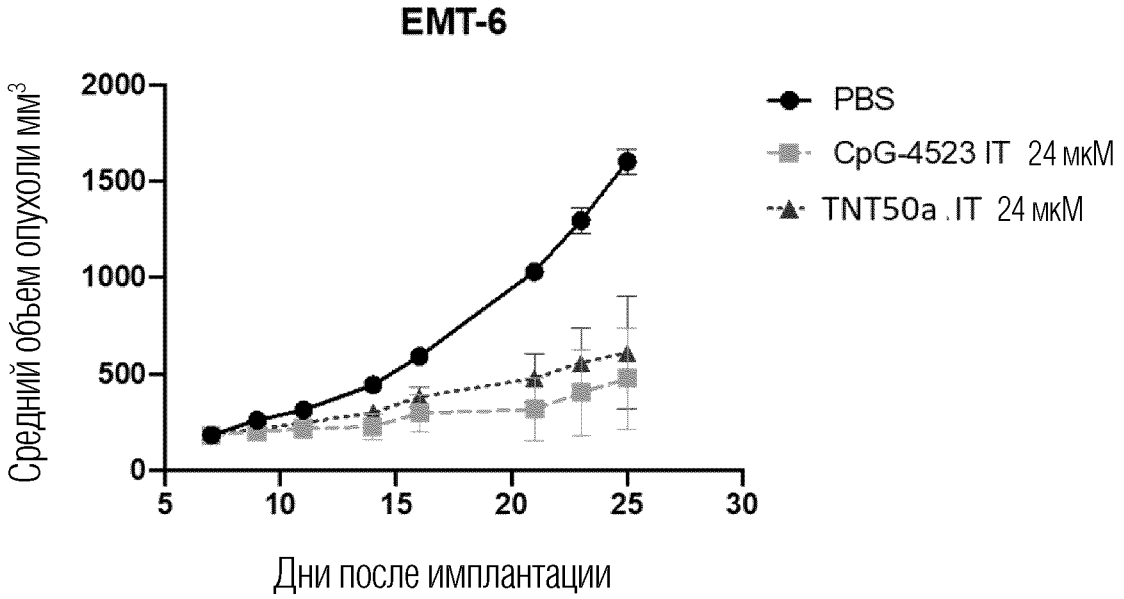
ФИГ. 35А


Селезенка balbc SKBR3 DC CD40
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)
8000
6000
4000
2000
0
0
10-2
10-1
100
101
102
103
нМ
TNT140 (mIgG1 huHER2)
TNT150a (mIgG1 huHER2 4523)
TNT141 (mIgG2a HuHER2)
TNT149a (mIgG2a huHER2 4523)

ФИГ. 35B

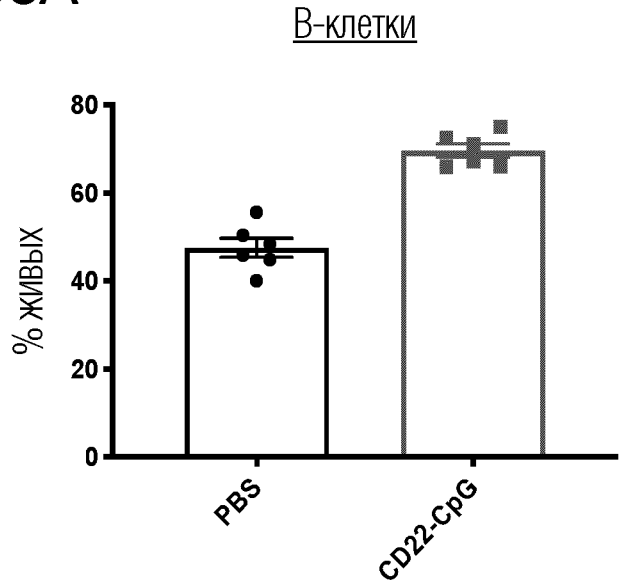

EMT6
Объем опухоли (мм³ ± СОС)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
Дни после имплантации
PBS
TNT50a 2q3
TNT50a 2q5
TNT50a 2q7

ФИГ. 36

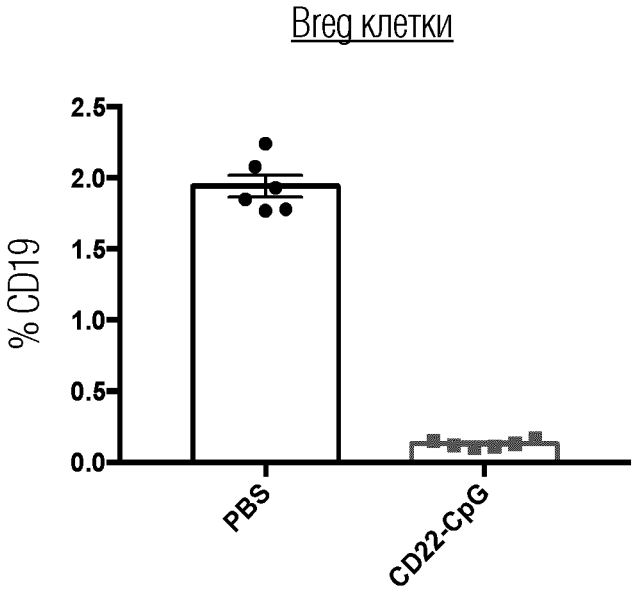

EMT-6
Средний объем опухоли мм3
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
30
Дни после имплантации
PBS
CpG-4523 IT 24 мкМ
TNT50a .IT 24 мкМ

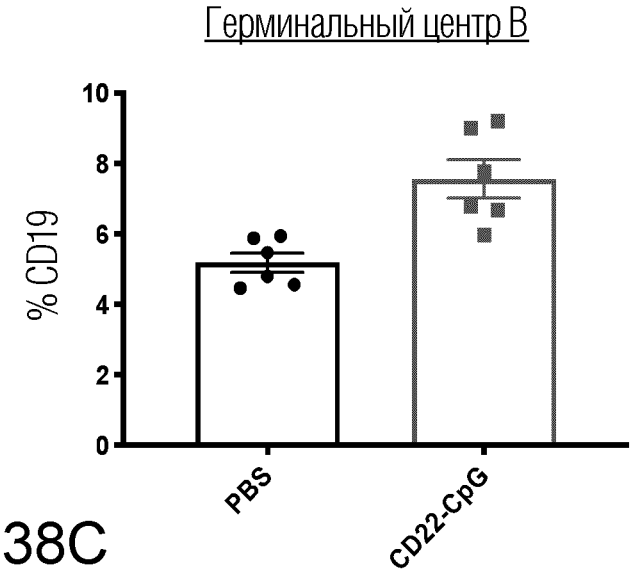
ФИГ. 37

ФИГ. 38A

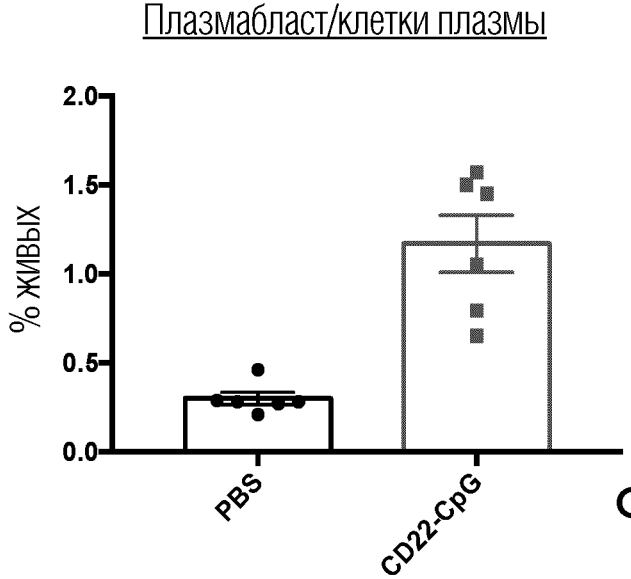


ФИГ. 38B



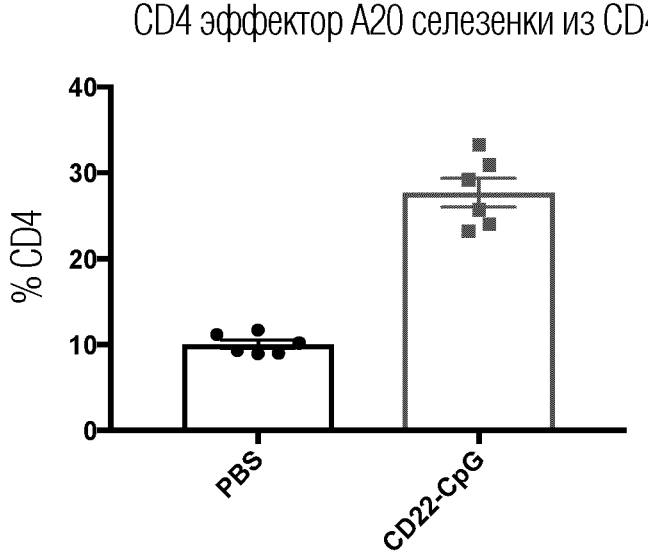


ФИГ. 38C

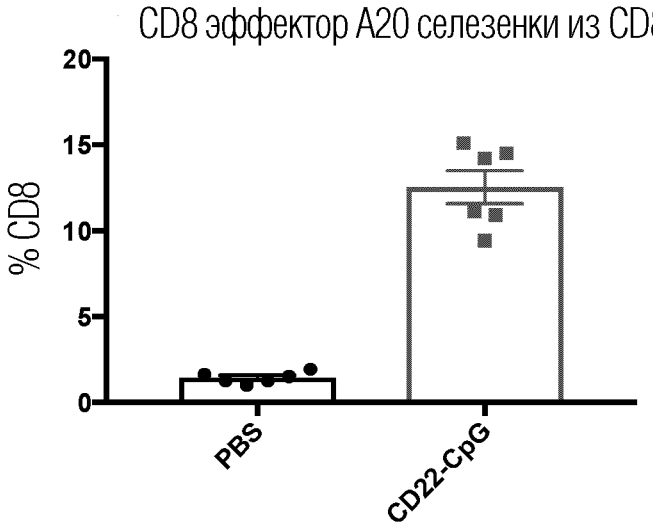


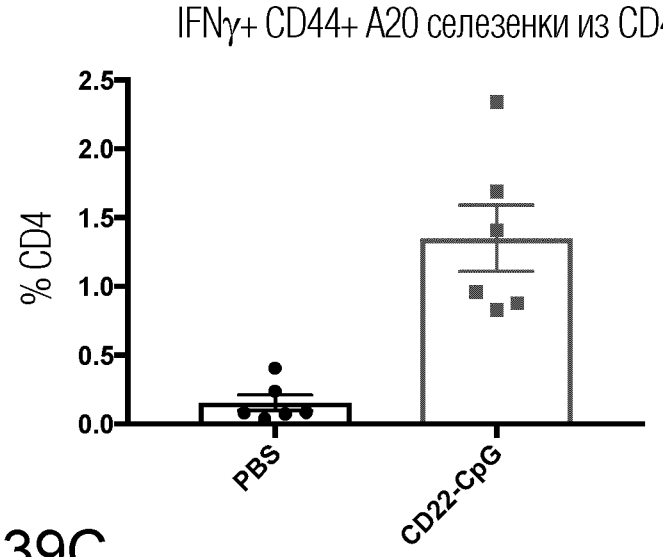
ФИГ. 38D

ФИГ. 39A

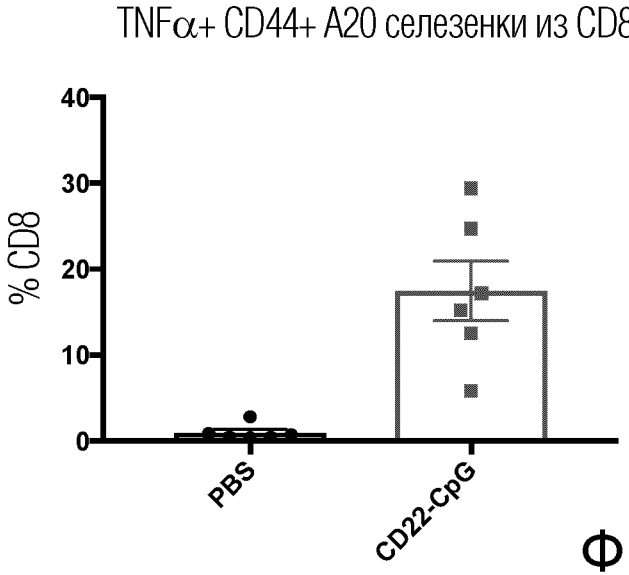


ФИГ. 39B



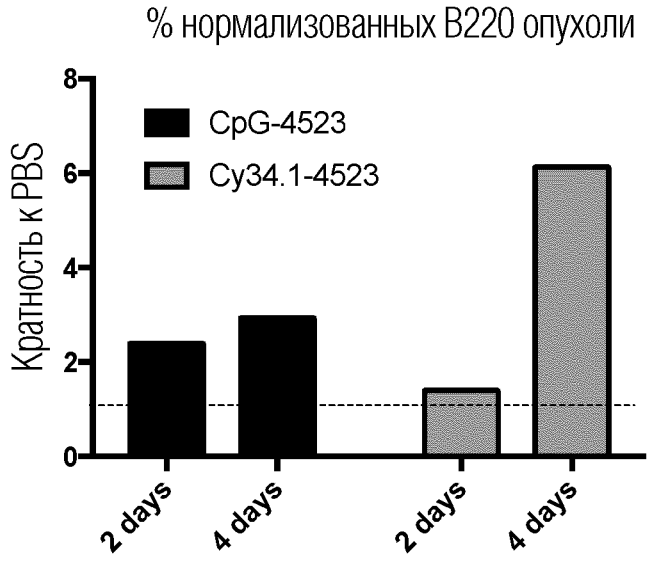


ФИГ. 39C

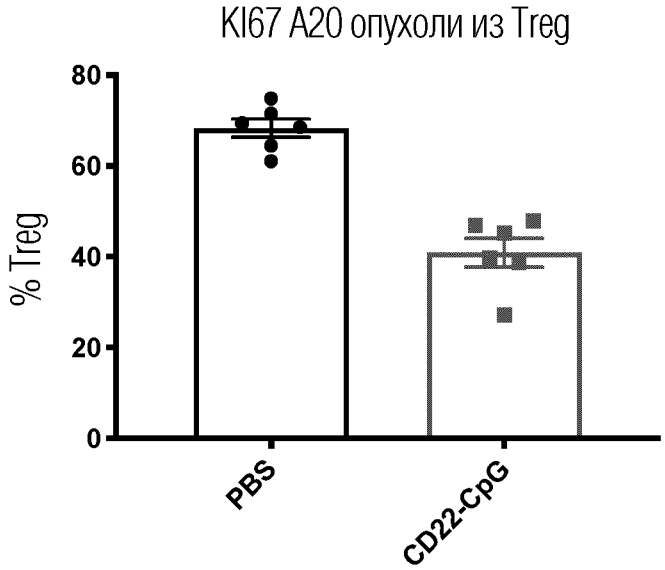


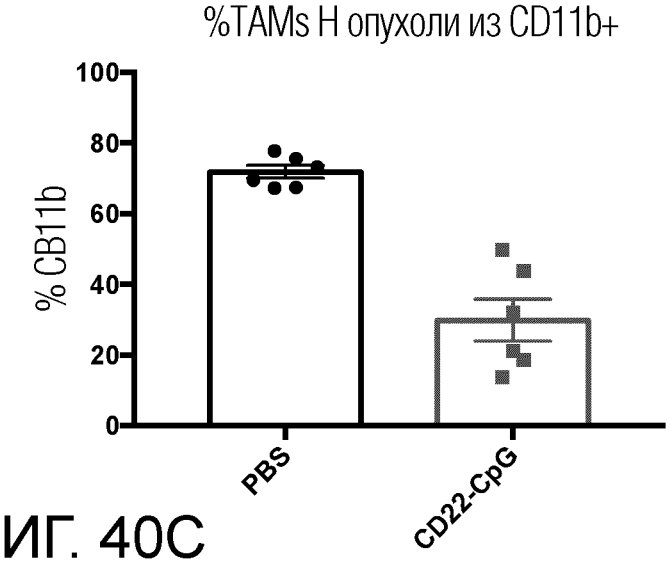
ФИГ. 39D

ФИГ. 40A

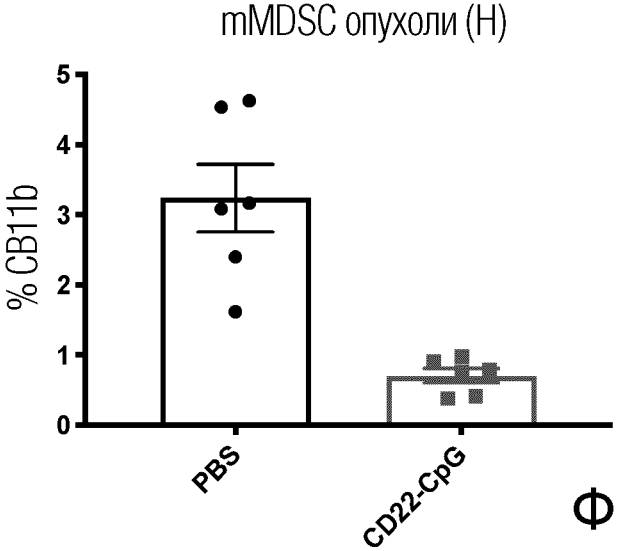


ФИГ. 40B



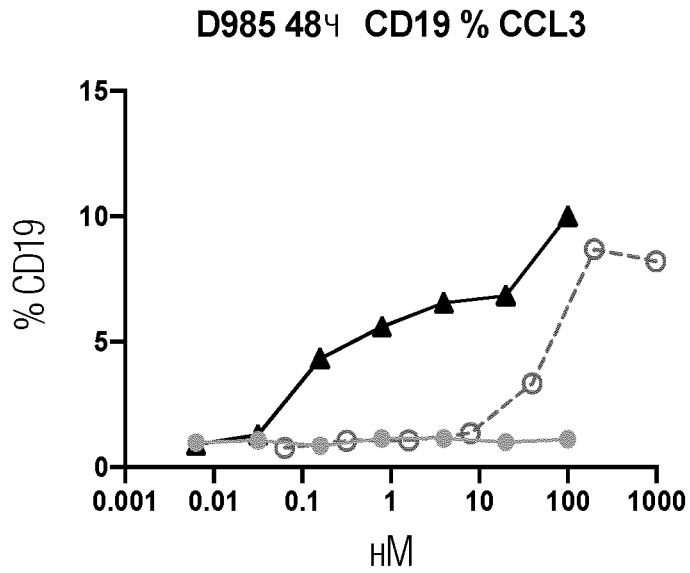


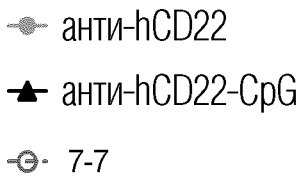
ФИГ. 40C

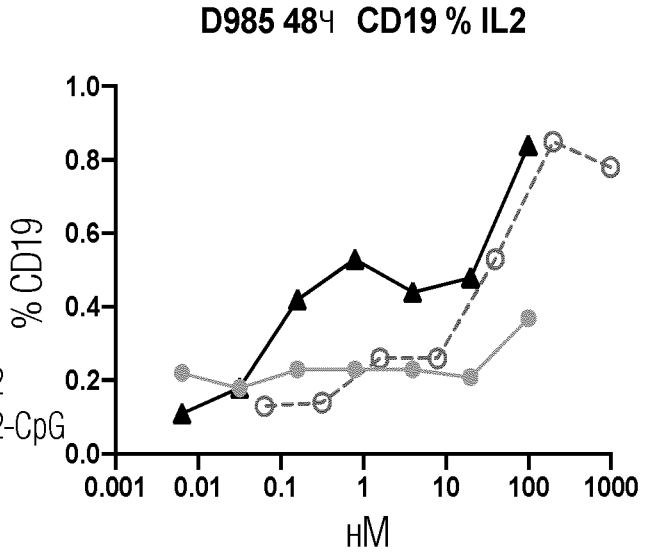


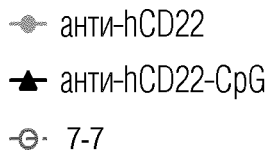
ФИГ. 40D

ФИГ. 41A

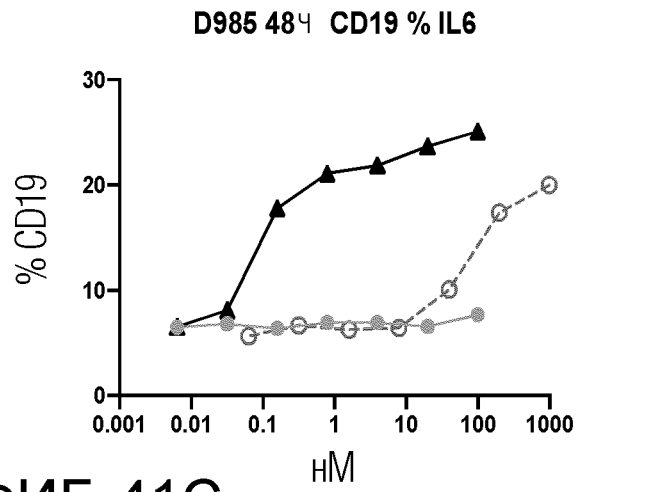


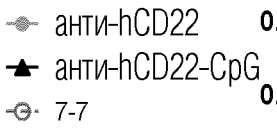




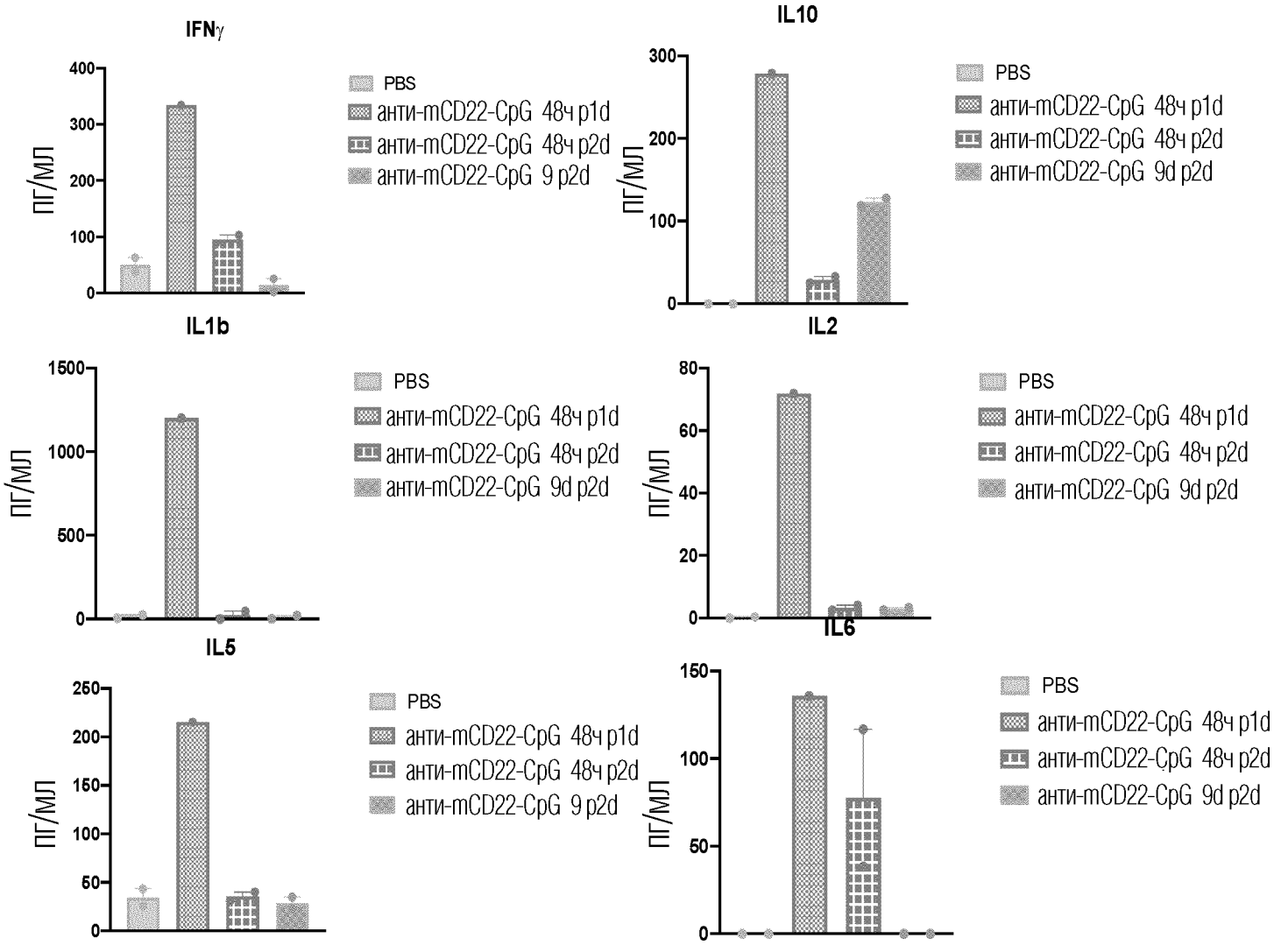


ФИГ. 41B

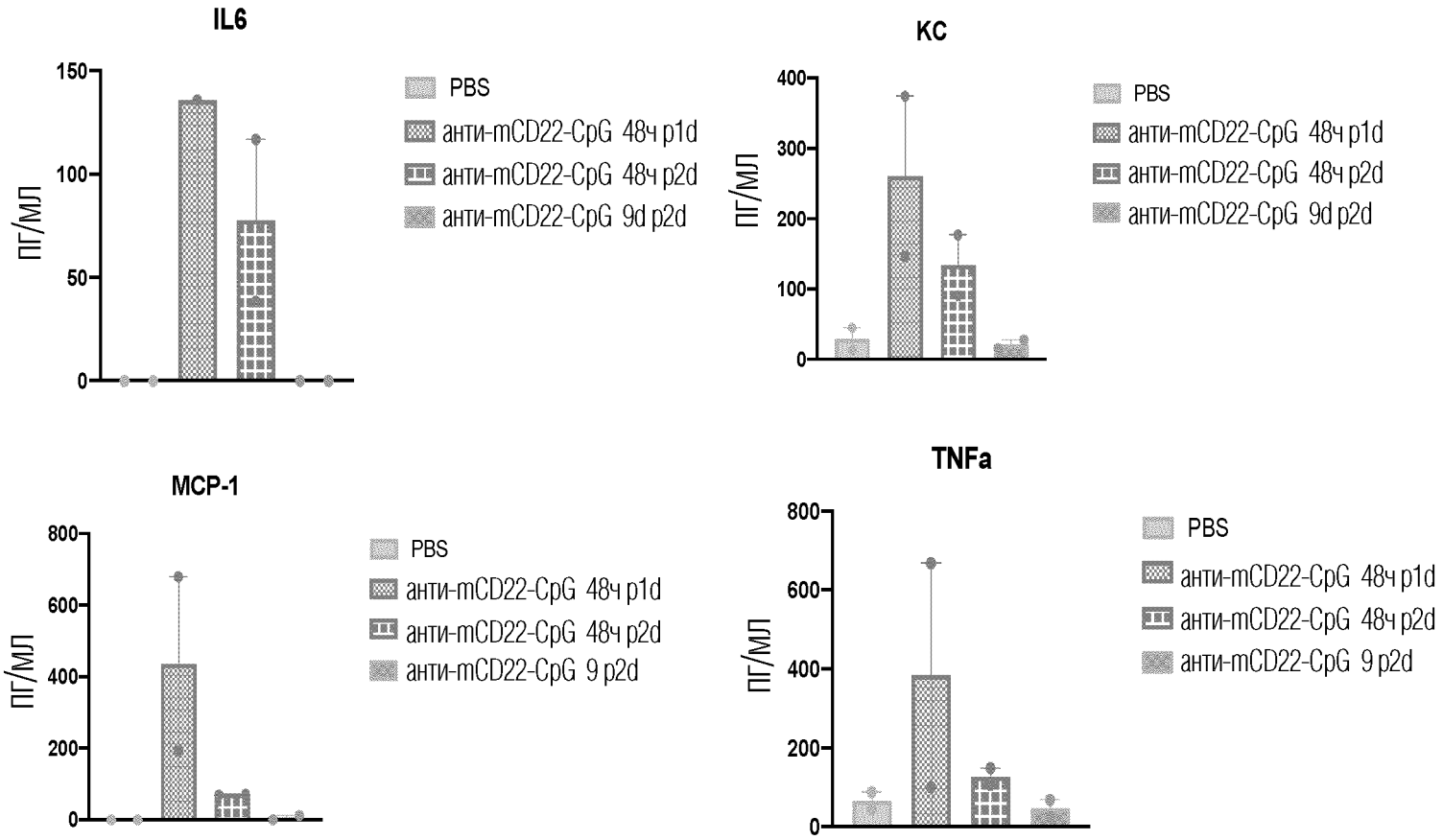




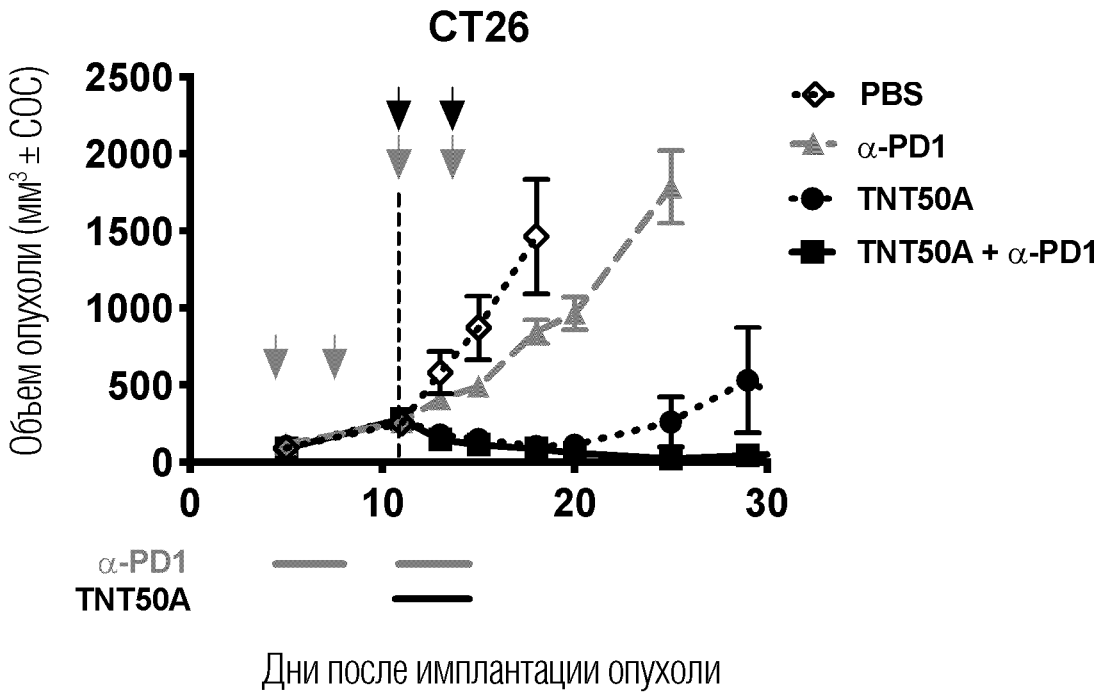
ФИГ. 41C


IFNγ
ПГ/МЛ
400
300
200
100
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9 p2d
IL10
ПГ/МЛ
300
200
100
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9d p2d
IL1b
ПГ/МЛ
1500
1000
500
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9d p2d
IL2
ПГ/МЛ
80
60
40
20
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9d p2d
IL5
ПГ/МЛ
250
200
150
100
50
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9 p2d
IL6
ПГ/МЛ
150
100
50
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9d p2d

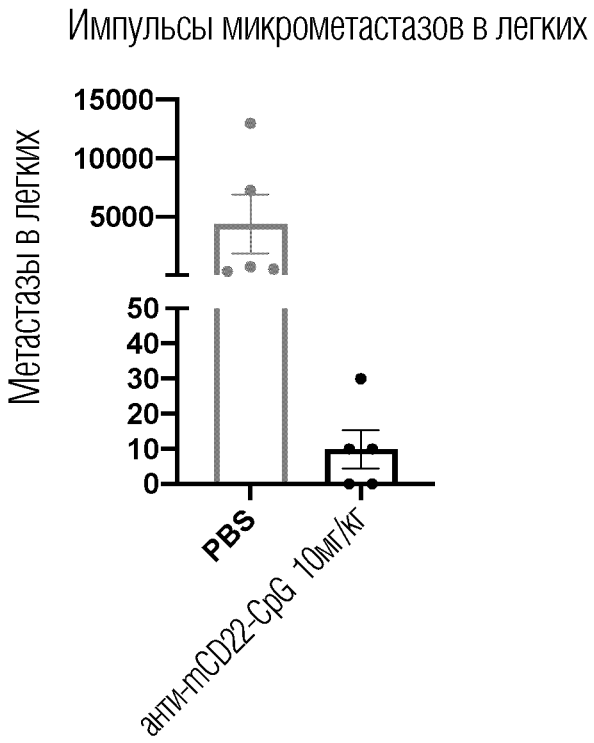
ФИГ. 42А


IL6
ПГ/МЛ
150
100
50
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9d p2d
KC
ПГ/МЛ
400
300
200
100
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9d p2d
MCP-1
ПГ/МЛ
800
600
400
200
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9 p2d
TNFa
ПГ/МЛ
800
600
400
200
0
PBS
анти-mCD22-CpG 48ч p1d
анти-mCD22-CpG 48ч p2d
анти-mCD22-CpG 9 p2d

ФИГ. 42B


CT26
Объем опухоли (мм³ ± СОС)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
PBS
α-PD1
TNT50A
TNT50A + α-PD1
α-PD1
TNT50A
Дни после имплантации опухоли

ФИГ. 43


Импульсы микрометастазов в легких
Метастазы в легких
15000
10000
5000
50
40
30
20
10
0
PBS
анти-mCD22-CpG 10мг/кг

ФИГ. 44