

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042613**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|--|---|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.06 | (51) Int. Cl. <i>A61K 31/7048</i> (2006.01)
<i>A61K 31/7052</i> (2006.01)
<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>A61K 45/06</i> (2006.01)
<i>C07H 17/08</i> (2006.01)
<i>A61P 37/04</i> (2006.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
<i>A61P 31/12</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
202092271 | |
| (22) Дата подачи заявки
2019.03.25 | |

(54) **КОМБИНАЦИИ МАКРОЛИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ИНГИБИТОРОВ
КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ИММУНИТЕТА**

- | | |
|--|--|
| (31) 18163703.4; 18163705.9 | (56) WO-A1-2017004267
US-A1-2011028417
EP-A2-0254534
WO-A2-2005054265
WO-A2-2005054266
WO-A1-2015112800
WO-A1-2018153960
WO-A1-2018153954 |
| (32) 2018.03.23 | |
| (33) EP | |
| (43) 2021.02.01 | |
| (86) PCT/EP2019/057364 | |
| (87) WO 2019/180265 2019.09.26 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЙЭСАР ИММЬЮН СИСТЕМ
РЕГЬЮЛЕЙШН ХОЛДИНГ АБ
(ПАБЛ) (SE) | |
| (72) Изобретатель:
Винквист Ола (SE) | |
| (74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU) | |

-
- (57) В изобретении предусмотрены комбинации иммуностимулирующих макролидов с ингибиторами контрольных точек иммунитета. Комбинации обладают синергическим действием и могут применяться при лечении вирусных заболеваний и рака.

В1

042613

042613
В1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение касается комбинаций ингибиторов контрольных точек иммунитета и макролидов, способных стимулировать иммунную систему, называемых иммунолидами. Изобретение касается комбинаций как таковых и комбинаций для применения в медицине, особенно при иммунотерапевтическом лечении рака и при лечении таких вирусных заболеваний, как ВИЧ.

Уровень техники

Раковые клетки характеризуются огромным количеством генетических мутаций и эпигенетических изменений, которые приводят к появлению большого количества специфических для рака антигенов. Эти антигены выявляются Т-клетками, которые используют антигены, чтобы отличить предраковые и/или раковые клетки от их нормальных аналогов и вызвать специфичный для рака иммунный ответ. Амплитуда и качество опосредованного Т-клетками иммунного ответа в норме регулируется контрольными точками иммунитета, которые можно определить как стимулирующие и ингибирующие молекулы и/или молекулярные пути, действующие для увеличения или уменьшения, соответственно, степени ответа. При нормальных физиологических условиях контрольные точки иммунитета имеют решающее значение для предотвращения аутоиммунитета и защиты тканей от повреждения в результате патогенных инфекций. Однако раковые клетки могут использовать нарушения регуляции белков контрольных точек иммунитета как способ достижения иммунорезистентности.

Один подход к запуску опосредованных Т-клетками противоопухолевых иммунных ответов был обозначен как "блокировка контрольных точек", имея в виду блокирование или ингибирование ингибиторных контрольных точек иммунитета, используемых раковыми клетками. Поскольку многие контрольные точки иммунитета запускаются при взаимодействиях лиганд-рецептор, то эти контрольные точки могут блокироваться антителами или модулироваться рекомбинантными формами данных лигандов и/или рецепторов.

Несколько контрольных точек иммунитета, по отдельности либо в комбинации, существенны в плане усиления опосредованных Т-клетками противоопухолевых иммунных ответов. К ним относятся, без ограничения, связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4 (CTLA4, также известен как CD152), белок 1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1, также известен как CD279), лиганд-1 PD-1 (PD-L1, также известен как B7-H1 и CD274), лиганд-2 PD-1 (PD-L2, также известен как B7-DC и CD-273), Т-клеточный мембранный белок 3 (TIM3, также известен как HAVcr2), аденозиновый A2a-рецептор (A2aR), ген активации лимфоцитов 3 (LAG3, также известен как CD 223), и B7-H3 (также известен как CD276), B7-H4 (также известен как B7-S1, B7X и VCTN1), 2B4 (также известен как CD244) и аттенюатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA, также известен как CD272). Кроме того, в научной и патентной литературе можно найти и другие примеры соответствующих контрольных точек иммунитета, и они также входят в рамки настоящего изобретения.

Хотя ингибирование контрольных точек иммунитета применимо для усиления опосредованного Т-клетками противоопухолевого иммунитета, авторы настоящего изобретения предполагают, что сочетание ингибирования контрольных точек иммунитета с одним или несколькими дополнительными механизмами дальнейшего усиления активации Т-клеток обеспечит даже лучшие противоопухолевые эффекты. При этом авторы настоящего изобретения осознали, что макролиды обладают иммуностимулирующим противораковым и иммуностимулирующим противовирусным действием, что и привело их к настоящему изобретению, использующему взаимодополняющие механизмы для улучшения режимов лечения.

Т-клетки CD4⁺ являются ключевыми медиаторами иммунного ответа, поэтому в данной области существует большая потребность в способах и средствах повышения иммунокомпетентности Т-клеток CD4⁺ у больных раком.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - структура макролидов: эритромицина А, соединения 1, соединения А, соединения В и EM703.

Фиг. 2 - повышающая регуляция CD69 в Т- и В-клетках. Обрабатывали МКПК в течение 24 ч соединением 1, соединением А и контролями на активацию - ЛПС и ИФ-γ. Измеряли экспрессию маркера ранней активации CD69 в популяции Т-клеток CD4⁺ (слева) и популяции В-клеток CD19⁺ (справа) методом проточной цитометрии. Значения представляют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), а планки погрешностей - стандартное отклонение в тройных образцах.

Фиг. 3 - повышающая регуляция HLA-A, -B, -C в Т- и В-клетках. МКПК обрабатывали в течение 24 ч соединением 1 или А и контролями на активацию - ЛПС и ИФ-γ. Измеряли экспрессию HLA-A, -B, -C в популяции Т-клеток CD4⁺ (слева) и популяции В-клеток CD19⁺ (справа) методом проточной цитометрии. Значения представляют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), а планки погрешностей - стандартное отклонение в тройных образцах.

Фиг. 4 - повышающая регуляция CD80 и HLA-DR в моноцитах крови. МКПК обрабатывали в течение 24 ч соединением 1 или А, а также контролями на активацию - ЛПС и ИФ-γ. Измеряли экспрессию CD80 и HLA-DR в клеточной популяции моноцитов методом проточной цитометрии. Значения представляют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), а планки погрешностей - стандартное отклоне-

ние в тройных образцах.

Фиг. 5 - повышающая регуляция CD80 в моноцитах крови. МКПК обрабатывали в течение 24 ч соединением 1 или А, а также контролем на активацию - ИФ- γ . Измеряли экспрессию CD80 в клеточной популяции моноцитов методом проточной цитометрии. Значения представляют среднюю интенсивность флуоресценции (MFI), а планки погрешностей - стандартное отклонение в тройных образцах.

Фиг. 6 - продукция ИЛ-10 в МКПК после стимуляции соединением 1 в течение 48 ч или 1 недели при измерении методом ELISA.

Фиг. 7 - пролиферация Т-клеток CD4 после 6-дневной стимуляции соединением 1 при измерении с помощью пролиферационного красителя CellTrace violet (Invitrogen) и проточной цитометрии. В качестве контроля использовали необработанные клетки (UNT) или соединение А.

Фиг. 8 - повышающая регуляция α -рецептора ИЛ-7 (CD127) в ЦМВ-специфичных Т-клетках CD8 после инкубации с соединением 1 при измерении методом проточной цитометрии.

Фиг. 9 - секреция γ -интерферона (при измерении методом цитометрического анализа на шариках) из МКПК (от донора ЦМВ⁺) при культивировании с пептидами ЦМВ в присутствии или в отсутствие соединения 1 или А в течение 5 дней.

Фиг. 10 - секреция γ -интерферона (при измерении методом цитометрического анализа на шариках) из макрофагов при стимуляции указанным соединением в течение 48 ч.

Фиг. 11 - секреция хемокина RANTES (при измерении методом цитометрического анализа на шариках) из МКПК или макрофагов при стимуляции указанным соединением в течение 48 ч.

Фиг. 12 - секреция IL12p70 (при измерении методом цитометрического анализа на шариках) из МКПК или макрофагов при стимуляции указанным соединением в течение 48 ч.

Фиг. 13 - секреция IL1b (при измерении методом цитометрического анализа на шариках) из МКПК, макрофагов или Т-клеток CD4 при стимуляции указанным соединением в течение 48 ч.

Фиг. 14 - содержание клеток CD25^{high} в крови мышей C57bl/6, которым за 24 ч до этого вводили указанную дозу соединения 1. Экспрессию CD25 измеряли методом проточной цитометрии.

Фиг. 15 - содержание клеток МНС класса I^{high} CD11b⁺ в селезенке 3 отдельных мышей C57bl/6, которым за 24 ч до этого вводили указанную дозу соединения 1. Экспрессию МНС класса I и CD11b измеряли методом проточной цитометрии.

Фиг. 16 - синергический эффект между блокадой анти-PD-1 и ISR397. Мышам C57BL/6J подкожно инокулировали клетки меланомы B16-F10, а затем обрабатывали анти-PD-1 (темные кружки), анти-PD-1 + ISR397 (темные квадраты) или оставляли без обработки (темные треугольники). Представлены объемы опухолей при измерении на 3, 8, 11, 15, 18-й день.

Фиг. 17 - синергический эффект между блокадой анти-PD-1 и ISR397. Мышам C57BL/6J подкожно инокулировали клетки меланомы B16-F10, а затем либо оставляли без обработки (розовые), обрабатывали анти-PD-1 (фиолетовые) или обрабатывали анти-PD-1 + ISR397 (красные). Представлены объемы опухолей при измерении по окончании эксперимента (день 18).

Фиг. 18 - синергический эффект между блокадой анти-PD-1 и ISR397. Мышам C57BL/6J подкожно инокулировали клетки меланомы B16-F10, а затем обрабатывали анти-PD-1 (темные кружки), анти-PD-1 + ISR397 (темные квадраты) или оставляли без обработки (темные треугольники). Представлены объемы опухолей при измерении на 3, 8, 11, 15, 18-й день.

Фиг. 19 - схема предполагаемого механизма действия ISR397 (соединения 1).

Введение в изобретение

Макролиды типа эритромицина и азитромицина уже много лет применяются для лечения бактериальных инфекций. Эритромицин представляет собой поликетидный макролид природного происхождения, образующийся при ферментации актиномицета *Saccharopolyspora erythraea*. Азитромицин является полусинтетическим азалидным производным эритромицина. Существует множество ссылок, описывающих антибактериальную активность таких макролидов, как эритромицин. Этот антибактериальный механизм осуществляется за счет связывания молекулы с Р-сайтом на бактериальной рибосоме 50S, тем самым препятствуя связыванию тРНК.

Во многих работах описано получение аналогов эритромицина посредством полусинтеза и биосинтетической инженерии. В частности, были описаны методы полусинтетического удаления гликозильных групп на эритромицине, дезозамине/кладинозе и микарозе. Также были описаны методы биотрансформации с целью добавления альтернативных гликозильных групп к агликону эритромицина (например, см. Gaisser et al., 2000; Schell et al., 2008; и WO 2001/079520). Однако главной целью этих опубликованных работ было получение антибактериальных аналогов эритромицина.

В WO 2007/004267 раскрыты способы и композиции для лечения солидных опухолей путем введения композиций, включающих наночастицы, содержащие ингибитор mTOR и альбумин, в комбинации с композициями, содержащими второе терапевтическое средство.

В WO 2016/100882 раскрыта комбинация, содержащая иммуномодулятор и второе терапевтическое средство для применения при лечении рака, причем иммуномодулятор является ингибитором молекулы контрольной точки иммунитета.

Раскрытие сущности изобретения

Настоящее изобретение касается комбинаций макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета для улучшения лечения, особенно при раке и при таких раковых заболеваниях, при которых стимуляция иммунной системы принесет пользу.

Иммуностимулирующее действие таких макролидов, которые лишены антибактериальной активности, ранее не отмечалось. Неожиданно оказалось, что соединения по изобретению типа соединения 1 (фиг. 8) обладают сильным иммуностимулирующим действием на некоторые типы клеток иммунной системы. После 24-48 ч стимуляции *in vitro* мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) соединением 1 при 1 мкМ на Т-клетках CD4⁺ и В-клетках повышался уровень маркера активации CD69 (фиг. 1). Также наблюдалось повышение уровня молекул МНС класса I (HLA-ABC) на Т- и В-клетках (фиг. 2), что означает действие на презентацию ими вирусных антигенов. Стимуляция моноцитов в популяции МКПК соединением 1 вела к повышению уровня костимулирующей молекулы CD80, а также антигенпрезентирующей молекулы МНС класса II (HLA-DR) (фиг. 3). Моноциты, дифференцировавшиеся в макрофаги, также проявляли повышение уровня CD80 в ответ на стимуляцию соединением 1 (фиг. 4). Кроме того, МКПК после стимуляции соединением 1 проявляли изменение профиля цитокинов с повышением продукции иммуносупрессивного цитокина ИЛ-10, что указывает на иммуноингибирующее действие при определенных условиях. Дальнейший анализ иммунологического эффекта соединения 1 показал изменение профиля вызванной цитокинами пролиферации Т-клеток после 6-дневной стимуляции при измерении методом проточной цитометрии (фиг. 6). Кроме того, была затронута соединением 1 и вирусоспецифичная пролиферация Т-клеток. МКПК от инфицированных цитомегаловирусом (ЦМВ) доноров при культивировании в присутствии антигена ЦМВ и соединения 1 проявляли изменение фенотипа активированных ЦМВ-специфичных Т-клеток CD8⁺ с повышением экспрессии α -рецептора ИЛ-7 (CD127) (фиг. 7). CD127 имеет решающее значение для гомеостаза, дифференцировки и функции Т-клеток, а снижение экспрессии коррелирует с тяжестью заболевания при ВИЧ и других хронических вирусных заболеваниях (Crawley et al., 2012).

Таким образом, соединение 1 обладает неожиданной способностью специфически активировать и модифицировать иммунный ответ, воздействуя на презентацию антигена, костимуляцию и активацию и пролиферацию Т-клеток. Во многих представленных здесь примерах в качестве отрицательного контроля включали соединение 2 (фиг. 8), другой родственный аналог макролида эритромицина с измененным гликозилированием, ранее описанный в Schell et al., 2008 (как соединение 20), так как оно почти или совсем не проявляло активности при анализах.

Макролиды, используемые в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунитета, максимизируют модулирующие эффекты на иммунную систему и в то же время сводят к минимуму терапевтически нежелательные прямые антибактериальные эффекты.

Итак, настоящее изобретение касается комбинаций макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета. Комбинации применимы для профилактики и лечения рака. Предполагается, что комбинация макролида и ингибитора контрольных точек иммунитета приведет к усилению противоопухолевого эффекта за счет сочетания иммуностимулирующего действия макролида со снятием торможения иммунной системы, опосредованного ингибитором контрольной точки.

Макролиды, применимые для таких комбинаций, включают макролиды формулы (I) (см. отдельный абзац), но не ограничиваются этим. Представляющие интерес специфические ингибиторы контрольных точек иммунитета включают средства, выбранные из ингибиторов CTLA4, ингибиторов PD-1, ингибиторов PD-L1, ингибиторов PD-L2, ингибиторов LAG3, ингибиторов B7-H3 и ингибиторов CMTM6, но не ограничиваются ими. В отдельном абзаце приведены примеры ингибиторов контрольных точек иммунитета, подходящих для применения в комбинации с макролидами.

Особенно интересные комбинации макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета включают такие комбинации, в которых макролиды выбраны из описанных здесь соединений. Особый интерес представляют комбинации макролидов из числа соединений, приведенных здесь со структурными формулами, включая соединение 1 (ISC397), и ингибиторов контрольных точек иммунитета, выбранных из ингибиторов PD-1, PD-L1 и CTLA-4, как-то ISC397 + PD-1, ISC397 + PD-L1 или ISC397 + CTLA-4 или ISC397 + PD-1 + CTLA-4 или ISC397 + PD-L1 + CTLA-4.

Комбинации макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета могут быть в виде фармацевтических композиций, содержащих макролид, ингибитор контрольной точки иммунитета и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей, или же в виде двух фармацевтических композиций, причем одна композиция содержит макролид и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей, а другая композиция содержит ингибитор контрольной точки иммунитета и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей. В последнем случае две композиции могут предназначаться для одного и того же или разных способов введения.

С другой стороны, комбинации макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета могут быть в виде косметических композиций, содержащих макролид, ингибитор контрольной точки иммунитета и один или несколько косметически приемлемых наполнителей.

Комбинации макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета также могут быть в виде

фармацевтических наборов, содержащих в одной упаковке:

- i) первую композицию, содержащую макролид,
- ii) вторую композицию, содержащую ингибитор контрольной точки иммунитета, и
- iii) инструкции по применению.

Общее применение комбинаций по изобретению

Комбинации макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета применимы в медицине и/или косметике. Комбинации макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета представляют особый интерес для применения в медицине. Возможные применения включают способы лечения или профилактики соответствующих форм рака, которые включают введение нуждающемуся в этом человеку или животному терапевтически эффективного количества комбинации макролида и ингибитора контрольной точки иммунитета.

Изобретением также предусмотрен способ лечения или профилактики рака, который включает введение нуждающемуся в этом человеку или животному терапевтически эффективного количества комбинации по любому из описанных здесь пунктов формулы изобретения и воплощений.

Комбинации макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета, включая фармацевтические композиции и фармацевтические наборы, содержащие данные комбинации, предусматриваются как полезные для профилактики и лечения любых форм рака, включая, без ограничения, рак надпочечников, анальный рак, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак костей, опухоли головного мозга/ЦНС, рак молочной железы, болезнь Кастанья, рак шейки матки, рак толстой кишки/прямой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаз, рак желчного пузыря, карциномы желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальные стромальные опухоли (GIST), трофобластическую болезнь, болезнь Ходжкина, саркому Капоши, рак почек, рак гортани и подглоточника, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, рак печени, мелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, легочные карциномы, лимфому, злокачественную мезотелиому, множественную миелому, миелодиспластический синдром, рак носовой полости и околоносовых пазух, рак носоглотки, нейробластома, неходжкинскую лимфому, рак ротовой полости и ротоглотки, остеосаркому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак полового члена, опухоли гипофиза, рак простаты, ретинобластома, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, базально-клеточный и плоскоклеточный рак кожи, меланому, рак кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, рак желудка, рак яичек, рак тимуса, рак щитовидной железы, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрёма и опухоль Вильмса.

Приведенные здесь комбинации по изобретению также могут применяться для лечения таких заболеваний, расстройств и симптомов, при которых полезна стимуляция иммунного ответа, как-то при лечении пациентов, инфицированных вирусными агентами или страдающих вирусными заболеваниями типа ВИЧ, аденовируса, альфавируса, арбовируса, болезни Борна, буньявируса, калицивируса, остроконечной кондиломы, коронавируса, вируса Коксаки, цитомегаловируса, вируса лихорадки Денге, контактиозной эктимы, вируса Эпштейна-Барра, инфекционной эритемы, хантавируса, вирусной геморрагической лихорадки, вирусного гепатита, вируса простого герпеса, вируса ветряной оспы, инфекционного мононуклеоза, гриппа, вируса лихорадки Ласса, кори, свинки, контактиозного моллюска, парамиксовируса, флеботомной лихорадки, вируса полиомы, лихорадки Rift Valley, краснухи, медленных вирусных заболеваний, оспы, подострого склерозирующего панэнцефалита, онковирусных инфекций, вируса Западного Нила, вируса желтой лихорадки, вируса бешенства и респираторного синцитиального вируса. В данном контексте особый интерес представляет ВИЧ.

Описанные здесь макролиды могут применяться в медицине, медицинских исследованиях или при производстве композиций для такого применения. Соответственно, когда в дальнейшем термин "макролиды" применяется в связи с медицинским применением или фармацевтической композицией, то предполагается, что он также включает соединения формулы (I). В частности, описанное здесь медицинское применение макролидов формулы (I) включает соединения, у которых, когда R_1 означает Et, то R_2 означает сахарид по формуле (II), R_{13} означает OH, R_{14} означает H, R_a означает H, R_4 означает Me, R_5 означает H, R_6 означает OH, R_7 означает H, R_8 означает $NR_{11}R_{12}$, R_9 означает H, R_{10} означает H и X означает C=O.

Макролиды по формуле (I) разработаны так, чтобы минимизировать прямое антибактериальное действие, но сосредоточиться на иммуноактивирующих свойствах. При добавлении соединений по изобретению в культуры бактерий *E. coli*, *S. salivarius*, *L. casei*, *B. longum* или *M. luteus* совсем или почти не отмечается антибактериальное действие. Преимущество наличия соединений с отдельными иммуностимулирующими свойствами, затрагивающими клетки хозяина, заключается в том, что предотвращается развитие устойчивости у бактерий. Кроме того, предотвращается хорошо известный побочный эффект макролидов на кишечную микробиоту, с риском чрезмерного роста *Clostridium difficile*, вызывающих диарею и псевдомембранозный колит. У многих вирусов и раковых заболеваний возникли механизмы во избежание иммунологического распознавания, т.е. подавления экспрессии HLA, чтобы избежать обнаружения Т-клетками. Механизм соединений по изобретению основывается на активации и повышении экспрессии молекул HLA на инфицированных клетках. Молекулы HLA захватывают и презентуют пептиды, происходящие из внутриклеточных возбудителей инфекций, с тем, чтобы предоставить сигнал

распознавания для Т-клеток, позволяющий устранять инфицированные клетки.

Преимущественные свойства соединений формулы (I) по сравнению с известными макролидами могут включать одно или несколько из следующего:

- снижение прямого антибактериального действия,
- улучшение стимуляции МНС класса I,
- улучшение иммуномодуляции,
- улучшение активации антигенпрезентирующих клеток,
- улучшение Т-клеточных ответов,
- улучшение противоопухолевых ответов,
- улучшение противовирусного действия,
- улучшение презентации антигенов МНС класса II.

Фармацевтические композиции, содержащие комбинации по изобретению Настоящим изобретением также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие комбинации по изобретению вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

Комбинации макролидов и ингибиторов контрольных точек иммунитета могут быть в виде фармацевтических композиций, содержащих макролид, ингибитор контрольной точки иммунитета и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей, или же в виде двух фармацевтических композиций, причем одна композиция содержит макролид и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей, а другая композиция содержит ингибитор контрольной точки иммунитета и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей. В последнем случае две композиции могут предназначаться для одного и того же или для разных способов введения.

Комбинации по изобретению либо их лекарственные формы можно вводить любым традиционным способом, например, но без ограничения, их можно вводить парентерально, перорально, наружно или через слизистую (в том числе буккально, сублингвально, трансдермально, вагинально, ректально, интраназально, в глаза и т.п.), через медицинское устройство (например, стент) или путем ингаляции. Лечение может состоять из однократного введения или множества введений в течение периода времени.

Каждое соединение (т.е. макролид и ингибитор контрольной точки, соответственно) или композицию, содержащую соединение, можно вводить индивидуальными способами введения и в различных формах. Причем частота введения может быть не одинаковой.

Схема дозировки макролидов и ингибиторов контрольных точек может варьироваться в зависимости от свойств рассматриваемого соединения или композиции. Схема дозировки может состоять из однократного введения комбинации или же двух композиций, каждая из которых содержит либо макролид, либо ингибитор контрольной точки. Схема дозировки также может представлять собой множество введений в течение одного или нескольких периодов времени. Введение может проводиться один раз в день, два раза в день, три раза в день, четыре раза в день, менее часто или более часто, в зависимости от конкретного применения, подлежащего лечению заболевания, физического состояния и характеристик (типа пола, веса и возраста) пациента, подлежащего лечению. Лечение также может проводиться путем непрерывного введения, такого, например, как внутривенное введение через капельницу, либо в виде депо или формы с замедленным высвобождением.

Хотя комбинации по изобретению можно вводить как они есть, однако предпочтительно представить их в виде лекарственной формы вместе с одним или несколькими приемлемыми носителями. Носители должны быть "приемлемыми" в том смысле, чтобы они были совместимы с соединением по изобретению и не причиняли вреда их получателям. Примеры подходящих носителей описаны более подробно ниже.

Фармацевтические композиции для удобства могут быть представлены в подходящей дозовой форме, включая стандартные дозовые формы, и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармации. Такие методы включают стадию смешивания соединения по изобретению с одним или несколькими наполнителями. В общем, фармацевтические композиции получают путем равномерного и тесного объединения соединений по изобретению с наполнителями, а затем, если нужно, формирования полученной композиции, например, в виде таблеток.

Комбинации по изобретению обычно вводят любым стандартным способом введения, обычно перорально или же парентерально, в виде лекарственных форм, включающих активные ингредиенты, необязательно в виде нетоксичных солей с органическими или неорганическими кислотами или основаниями, в фармацевтически приемлемой дозированной лекарственной форме. В зависимости от заболевания и пациента, подлежащего лечению, а также способа введения композиции можно вводить в различных дозах и/или с различной частотой.

Фармацевтические композиции должны быть стабильными в условиях производства и хранения; а при необходимости их следует предохранять от загрязняющего действия таких микроорганизмов, как бактерии и грибки. В случае жидких форм типа растворов, дисперсий, эмульсий и суспензий носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль или жидкий полиэтиленгликоль), растительные масла и их подходящие смеси.

Например, комбинации по изобретению можно вводить перорально, буккально или сублингвально в виде таблеток, капсул, пленок, вагинальных суппозиториев, эликсиров, растворов, эмульсий или суспензий, которые могут содержать ароматизаторы или красители.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде дискретных единиц типа капсул, облаток или таблеток, каждая из которых содержит заданное количество активных ингредиентов; в виде нескольких единиц, например, в виде таблеток или капсул в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или же в виде жидкой эмульсии типа масло-в-воде или жидкой эмульсии типа вода-в-масле. Активный ингредиент также может быть представлен в виде шарика, кашки или пасты.

Растворы или суспензии комбинаций по изобретению, пригодные для перорального введения, также могут содержать один или несколько растворителей, в том числе воду, спирт, полиол и т.п., а также один или несколько наполнителей типа веществ для доведения pH, стабилизирующих веществ, поверхностно-активных веществ (ПАВ), солюбилизующих, диспергирующих веществ, консервантов, ароматизаторов и т.д. Конкретные примеры включают, например, N,N-диметилацетамид, диспергаторы, например, полисорбат 80, ПАВ и солюбилизаторы, например, полиэтиленгликоль, Phosal 50 PG (который состоит из фосфатидилхолина, соевых жирных кислот, этанола, моно/диглицеридов, пропиленгликоля и аскорбилпальмитата). Лекарственные формы по настоящему изобретению также могут быть в виде эмульсий, причем комбинации по изобретению могут присутствовать в эмульсии типа масло-в-воде или типа вода-в-масле. Масло может быть натуральным или синтетическим маслом или любым маслоподобным веществом, таким, например, как соевое масло или сафлоровое масло либо их комбинации.

Таблетки могут содержать такие наполнители, как микрокристаллическая целлюлоза, лактоза (например, моногидрат лактозы или безводная лактоза), цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновный фосфат кальция, глицин, бутилированный гидрокситолуол (E321), кросповидон, гипромеллоза, такие разрыхлители, как крахмал (предпочтительно кукурузный, картофельный или тапиоковый крахмал), натриевый гликолят крахмала, натриевую кроскармеллозу и некоторые сложные силикаты, а также такие связующие для гранулирования, как поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), макрогол 8000, сахароза, желатин и гуммиарабик. Кроме того, можно включать смазывающие вещества, такие как стеарат магния, стеариновая кислота, глицерилбегенат и тальк.

Таблетки можно получить путем прессования или формования, необязательно с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки получают путем прессования в подходящем устройстве активных ингредиентов в сыпучем виде типа порошка или гранул, необязательно смешанных со связующим (например, повидоном, желатином, гидроксипропилметилцеллюлозой), смазывающим веществом, инертным разбавителем, консервантом, разрыхлителем (например, натриевым гликолятом крахмала, прошитым повидоном, прошитой натриевой карбоксиметилцеллюлозой), поверхностно-активным или диспергирующим средством. Формованные таблетки получают путем формования в подходящем устройстве порошковой смеси соединения, смоченного инертным жидким разбавителем. Таблетки необязательно могут быть покрыты оболочкой или с насечками и составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение из них активных ингредиентов, используя, например, гидроксипропилметилцеллюлозу в различных пропорциях для обеспечения требуемого профиля высвобождения.

Твердые композиции подобного типа также могут применяться в качестве наполнителей в желатиновых капсулах. Предпочтительные эксципиенты в этом отношении включают лактозу, крахмал, целлюлозу, молочный сахар или высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Для водных суспензий и/или эликсиров комбинации по изобретению можно смешивать с различными подсластителями или ароматизаторами, красящими веществами или красителями, с эмульгирующими и/или суспендирующими средствами и с такими разбавителями, как вода, этанол, пропиленгликоль и глицерин, а также с их комбинациями.

Фармацевтические композиции по изобретению, подходящие для топического введения в рот, включают леденцы, содержащие активные ингредиенты в ароматизированной основе, обычно сахарозе и гуммиарабике или трагаканте; пастилки, содержащие активные ингредиенты в инертной основе типа желатина и глицерина или сахарозы и гуммиарабика; и жидкости для полоскания рта, содержащие активные ингредиенты в подходящем жидком носителе.

Фармацевтические композиции по изобретению, адаптированные для топического введения, могут быть составлены в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, пропитанных повязок, спреев, аэрозолей или масел, трансдермальных устройств, присыпок и т.п. Такие композиции, содержащие активное вещество, могут быть получены стандартными методами. Так, они могут также содержать совместимые стандартные носители и добавки, как-то консерванты, растворители, способствующие проникновению препарата, смягчающие средства в кремах или мазях и этанол или олеиловый спирт для лосьонов. Такие носители могут составлять от 1% до 98 композиции. Чаще всего они составляют вплоть до 80% композиции. Только для иллюстрации: крем или мазь готовят путем смешивания достаточных количеств гидрофильного материала и воды, содержащей 5-10 мас.% соединения, в достаточных количествах для получения крема или мази требуемой консистенции.

Фармацевтические композиции по изобретению, адаптированные для трансдермального введения, могут быть представлены в виде дискретных пластырей, предназначенных для сохранения тесного контакта с эпидермисом реципиента в течение длительного времени. Например, активные ингредиенты могут выделяться из пластыря посредством ионтофореза.

Для нанесения на наружные ткани, например, на рот и кожу, композиции предпочтительно наносят в виде мази или крема для местного применения. При составлении в виде мази можно использовать активные ингредиенты с парафиновой либо водорастворимой основой мази.

С другой стороны, активные ингредиенты могут быть составлены в виде крема на основе типа масло-в-воде или типа вода-в-масле.

Для парентерального введения готовятся жидкие стандартные дозовые формы, используя активные ингредиенты и стерильный носитель, например, но без ограничения, воду, спирты, полиолы, глицерин и растительные масла, а предпочтительно воду. Активные ингредиенты, в зависимости от используемого носителя и концентрации, могут быть коллоидными, суспендированными или растворенными в носителе. При приготовлении растворов активные ингредиенты можно растворить в воде для инъекций и стерилизовать фильтрованием перед заполнением в подходящие флаконы или ампулы и закупориванием.

Преимущественно такие агенты, как местные анестетики, консерванты и буферные средства, могут быть растворены в носителе. Для повышения стабильности композицию можно заморозить после заполнения флакона и удалить воду под вакуумом. Затем сухой лиофилизированный порошок закупоривают во флаконе, а для восстановления жидкости перед употреблением может поставляться сопутствующий флакон с водой для инъекций.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии. Кроме того, композиции могут быть в виде стерильных порошков для приготовления ex tempore таких стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях конечная форма для инъекций должна быть стерильной и должна быть достаточно жидкой для введения с помощью шприца.

Суспензии для парентерального введения готовят практически таким же образом, как и растворы, за исключением того, что активные ингредиенты не растворяют, а суспендируют в носителе, и стерилизация не может проводиться фильтрованием. Активные ингредиенты можно стерилизовать воздействием оксида этилена перед суспендированием в стерильном носителе. Предпочтительно в композиции включают ПАВ или смачивающее средство для облегчения равномерного распределения активных ингредиентов.

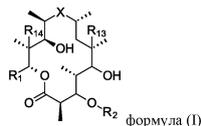
Следует иметь в виду, что наряду с ингредиентами, конкретно упомянутыми выше, составы по изобретению могут включать и другие средства, обычные в данной области с учетом типа лекарственной формы, например, те, которые подходят для перорального введения, могут включать ароматизаторы. Специалистам в данной области должно быть известно, как выбрать подходящую формулу и как ее приготовить (например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. or later). Специалистам в данной области также должно быть известно, как выбрать подходящий способ введения и дозировку.

Специалистам в данной области должно быть известно, что оптимальное количество и интервалы между отдельными дозами комбинаций по изобретению должны определяться природой и степенью подлежащего лечению заболевания, формой, способом и местом введения, возрастом и состоянием конкретного субъекта, подлежащего лечению, и, в конечном счете, подходящие дозировки определяются врачом. Эти дозировки могут повторяться столько раз, сколько нужно. Если возникают побочные эффекты, то можно изменить или уменьшить количество и/или частоту дозирования в соответствии с обычной клинической практикой.

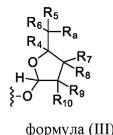
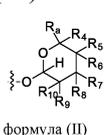
Все приведенные здесь значения в % означают % мас./мас., если по контексту не требуется иначе.

Макролиды для применения в комбинациях по изобретению.

Иммуностимулирующие макролиды для применения в комбинациях по изобретению представляют собой макролиды по формуле (I) либо их фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты, таутомеры, энантимеры или диастереомеры



где X выбран из числа C=O, -NR₃CH₂-, -CH₂NR₃-, -NR₃(C=O)-, -(C=O)NR₃-, C=NOH и -CH(OH)-, а R₂ означает сахар по формуле (II) или (III)



R₁ выбран из алкила, гетероалкила, циклоалкила, арила и гетероарила, причем алкил выбран из C₁-C₆-алкильных групп, которые необязательно разветвлены,

гетероалкил выбран из C_1 - C_6 -алкильных групп, которые необязательно разветвлены или замещены и необязательно содержат один или несколько гетероатомов,

циклоалкил выбран из циклических C_1 - C_6 -алкильных групп, которые необязательно замещены и необязательно содержат один или несколько гетероатомов,

арил выбран из необязательно замещенных C_6 -ароматических колец,

гетероарил выбран из необязательно замещенных C_1 - C_5 -ароматических колец, содержащих один или несколько гетероатомов,

причем гетероатомы выбраны из O, N, P и S,

а заместители выбраны независимо из алкила, OH, F, Cl, NH_2 , NH-алкила, NH-ацила, S-алкила, S-ацила, O-алкила и O-ацила,

причем ацил выбран из необязательно разветвленных C_1 - C_4 -ацильных групп;

R_3 выбран из H и Me,

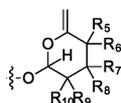
R_4 выбран из H и Me,

R_a выбран из H и $-CR_{21}R_{22}R_{23}$,

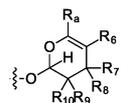
причем R_{21} , R_{22} , R_{23} , а также R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 и R_{10} выбраны независимо из H, Me, $NR_{11}R_{12}$, NO_2 и OR_{11} ,

причем R_{23} вместе с R_4 в формуле (II), R_4 вместе с R_5 в формуле (II), R_5 вместе с R_7 в формуле (II) и R_7 вместе с R_9 в формуле (II), независимо, могут соединяться такой связью, которая образует двойную связь между атомами углерода, с которыми связана каждая группа, так что:

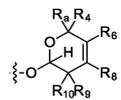
если соединяются R_{23} и R_4 с образованием двойной связи, то формула (II) может быть представлена как



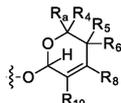
если соединяются R_4 и R_5 с образованием двойной связи, то формула (II) может быть представлена как



если соединяются R_5 и R_7 с образованием двойной связи, то формула (II) может быть представлена как

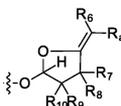


если соединяются R_7 и R_9 с образованием двойной связи, то формула (II) может быть представлена как

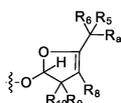


причем R_4 вместе с R_5 в формуле (III), R_4 вместе с R_7 в формуле (III) и R_7 вместе с R_9 в формуле (III), независимо, могут соединяться такой связью, которая образует двойную связь между атомами углерода, с которыми связана каждая группа, так что:

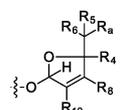
если соединяются R_4 и R_5 с образованием двойной связи, то формула (III) может быть представлена как



если соединяются R_4 и R_7 с образованием двойной связи, то формула (III) может быть представлена как



если соединяются R_7 и R_9 с образованием двойной связи, то формула (III) может быть представлена как



причем R_{21} вместе с R_{22} , R_5 вместе с R_6 , R_7 вместе с R_8 или R_9 вместе с R_{10} могут быть заменены на карбонил;

R_{11} и R_{12} выбраны независимо из H и алкила;

R_{13} выбран из H, OH и OCH_3 ;

R_{14} выбран из H и OH; и

где один из R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 или R_{10} выбран из $NR_{11}R_{12}$ и NO_2 .

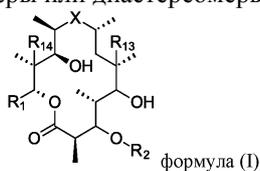
В некоторых аспектах макролиды имеют формулу (I) при условии, что:

когда R_1 означает Et, R_2 означает сахар в формуле (II), R_{13} означает H или OH, R_{14} означает H или OH, R_a означает H, R_4 означает Me, R_5 означает H, R_6 означает OH, R_7 означает H, R_8 означает $NR_{11}R_{12}$, R_9 означает H, и R_{10} означает H, то X не может быть $C=O$,

когда R_1 означает Et, R_2 означает сахар в формуле (II), R_{13} означает H или OH, R_{14} означает H или OH, R_a означает H, R_4 означает Me, R_5 означает OH, R_6 означает H, R_7 означает OH, R_8 означает Me, R_9 означает H, и R_{10} означает H, то X не может быть $C=O$,

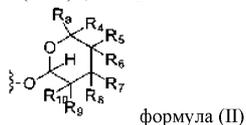
когда R_1 означает Et, R_2 означает сахар в формуле (II), R_{13} означает H или OH, R_{14} означает H или OH, R_a означает H, R_4 означает Me, R_5 означает OH, R_6 означает H, R_7 означает H, R_8 означает $NR_{11}R_{12}$, R_9 означает H, и R_{10} означает OH, то X не может быть $C=O$.

Иммуностимулирующие макролиды по формуле (I) либо их фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты, таутомеры, энантимеры или диастереомеры могут соответствовать формуле (I)



формула (I)

где X выбран из $C=O$, $-NR_3CH_2-$ и $-CH(OH)-$, а R_2 означает сахар по формуле (II)



формула (II)

R_1 выбран из алкила или циклоалкила, причем

алкил выбран из C_1 - C_6 -алкильных групп, которые необязательно разветвлены и, независимо, необязательно гидроксильированы,

циклоалкил выбран из необязательно замещенных циклических C_1 - C_6 -алкильных групп,

причем заместители выбраны из алкила и OH,

R_3 выбран из H и Me,

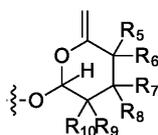
R_4 выбран из H и Me,

R_a выбран из H и $-CR_{21}R_{22}R_{23}$,

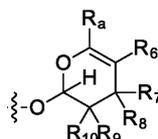
причем R_{21} , R_{22} , R_{23} , а также R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 и R_{10} выбраны независимо из H, Me, $NR_{11}R_{12}$, NO_2 и OR_{11} ,

причем R_{23} вместе с R_4 в формуле (II), R_4 вместе с R_5 в формуле (II), R_5 вместе с R_7 в формуле (II) и R_7 вместе с R_9 в формуле (II), независимо, могут соединяться такой связью, которая образует двойную связь между атомами углерода, с которыми связана каждая группа, так что:

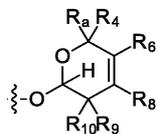
если соединяются R_{23} и R_4 с образованием двойной связи, то формула (II) может быть представлена как



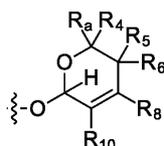
если соединяются R_4 и R_5 с образованием двойной связи, то формула (II) может быть представлена как



если соединяются R_5 и R_7 с образованием двойной связи, то формула (II) может быть представлена как



если соединяются R_7 и R_9 с образованием двойной связи, то формула (II) может быть представлена как



причем R_{21} вместе с R_{22} , R_5 вместе с R_6 , R_7 вместе с R_8 или R_9 вместе с R_{10} могут быть заменены на карбонил,

R_{11} и R_{12} выбраны независимо из H и алкила,

R_{13} выбран из H, OH и OCH_3 ,

R_{14} выбран из H и OH,

причем один из R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 или R_{10} выбран из $NR_{11}R_{12}$ и NO_2 .

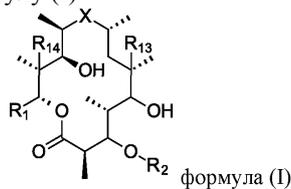
В одном аспекте вышеприведенные макролиды соответствуют формуле (I) при условии, что:

когда R_1 означает Et, R_2 означает сахар в формуле (II), R_{13} означает H или OH, R_{14} означает H или OH, R_a означает H, R_4 означает Me, R_5 означает H, R_6 означает OH, R_7 означает H, R_8 означает $NR_{11}R_{12}$, R_9 означает H и R_{10} означает H, то X не может быть $C=O$,

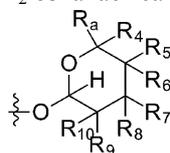
когда R_1 означает Et, R_2 означает сахар в формуле (II), R_{13} означает H или OH, R_{14} означает H или OH, R_a означает H, R_4 означает Me, R_5 означает OH, R_6 означает H, R_7 означает OH, R_8 означает Me, R_9 означает H и R_{10} означает H, то X не может быть $C=O$,

когда R_1 означает Et, R_2 означает сахар в формуле (II), R_{13} означает H или OH, R_{14} означает H или OH, R_a означает H, R_4 означает Me, R_5 означает OH, R_6 означает H, R_7 означает H, R_8 означает $NR_{11}R_{12}$, R_9 означает H и R_{10} означает OH, то X не может быть $C=O$.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения предлагается комбинация макролида и ингибитора контрольной точки иммунитета, предназначенная для использования в качестве иммуностимулятора, причем макролид имеет формулу (I)



где X выбран из $-NR_3CH_2-$, $-CH_2NR_3-$, а R_2 означает сахар формулы (II)



формула (II)

R_1 является C_1 - C_6 -алкилом, причем

C_1 - C_6 -алкил выбран из C_1 - C_6 -алкильных групп, которые необязательно разветвлены,

R_3 представляет собой Me;

R_4 выбран из H и Me;

R_a представляет собой H,

причем R_5 представляет собой OH, R_6 представляет собой H, R_7 представляет собой $NR_{11}R_{12}$, и R_8 ,

R_9 и R_{10} представляют собой H,

причем R_{11} и R_{12} выбраны независимо из H и C_1 - C_6 -алкила;

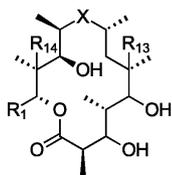
R_{13} представляет собой OH;

R_{14} выбран из H и OH;

или его фармацевтически приемлемая соль,

причем ингибитор контрольной точки иммунитета нацелен на контрольную точку иммунитета, выбранную из связанного с цитотоксическими T-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4, также известен как CD152), белка 1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1, также известен как CD279), лиганда-1 PD-1 (PD-L1, также известен как B7-H1 и CD274), лиганда-2 PD-1 (PD-L2, также известен как B7-DC и CD-273), T-клеточного мембранного белка 3 (TIM3, также известен как HAVcr2), аденозинового A2a-рецептора (A2aR), гена активации лимфоцитов 3 (LAG3, также известен как CD223), B7-H3 (также известен как CD276), B7-H4 (также известен как B7-S1, B7X и VCTN1), 2B4 (также известен как CD244), аттенуатора B- и T-лимфоцитов (BTLA, также известен как CD272) и CMTM6.

Макролиды могут быть получены способом получения соединений по формуле (I), который включает внесение агликона по формуле IV в культуру биотрансформирующего штамма, который гликозилирует в положении 3-гидроксила.



формула IV

Интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_2 выбран из L-даунозамина, L-акозамина, L-риктозамина, D-риктозамина, 4-оксо-L-ванкозамина, L-ванкозамина, D-форозамина, L-актинозамина, 3-эпи-L-ванкозамина, L-виценизамина, L-микозамина, D-микозамина, D-3-N-метил-4-O-метил-L-риктозамина, D-дедозамина, N,N-диметил-L-пирролозамина, L-мегозамин, L-ногаламина, L-родозамина, D-анголозамина, L-кедарозамина, 2'-N-метил-D-фукозамина, 3-N,N-диметил-L-эремозамина, D-равидозамина, 3-N,N-диметил-D-микозамина/D-микаминозы, 3-N-ацетил-D-равидозамина, 4-O-ацетил-D-равидозамина, 3-N-ацетил-4-O-ацетил-D-равидозамина, D-глюкозамина, N-ацетил-D-глюкозамина, L-дедозамин, D-амозамина, D-виозамина, L-авидинозамина, D-гулозамина, D-аллозамина и L-сибирозамина.

Другая интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_2 выбран из D-анголозамина, N-десметил-D-анголозамина, N-дидесметил-D-анголозамина, N-десметил-N-этил-D-анголозамина и N-дидесметил-N-диэтил-D-анголозамина.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_2 выбран из N-десметил-D-анголозамина, N-дидесметил-D-анголозамина, N-десметил-N-этил-D-анголозамина и N-дидесметил-N-диэтил-D-анголозамина.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_2 означает сахар по формуле (II), где R_a означает H, R_4 означает Me, R_5 означает H, R_6 означает OH, R_7 означает H, R_8 означает $NR_{11}R_{12}$, R_9 означает H и R_{10} означает H.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_{11} выбран из H, Me и Et, и R_{12} выбран из H, Me и Et.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_{11} означает Et и R_{12} означает Et.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_{11} означает Me, а R_{12} означает Et.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых X выбран из $C=O$, $-NR_3CH_2-$ и $-CH(OH)-$.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_1 выбран из Me, Et и циклоалкила.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_1 выбран из Me и Et.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых X выбран из $-NR_3CH_2-$ и $-CH_2NR_3-$.

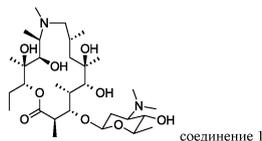
Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых один из R_5 , R_6 , R_7 или R_8 означает $NR_{11}R_{12}$.

Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_{21} , R_{22} , R_{23} , а также R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 и R_{10} выбраны независимо из H, Me, $NR_{11}R_{12}$ и OR_{11} .

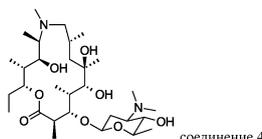
Еще одна интересная выборка макролидов представлена соединениями, в которых R_{13} и R_{14} означают OH.

Особый интерес представляют макролиды по формуле (I), где R_1 означает Et, R_2 означает сахар по формуле (II), R_{13} означает OH, R_{14} означает H, R_a означает H, R_4 означает Me, R_5 означает H, R_6 означает OH, R_7 означает H, R_8 означает $NR_{11}R_{12}$, R_9 означает H, R_{10} означает H и X означает $C=O$.

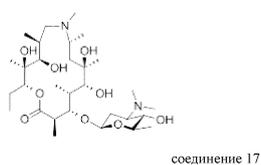
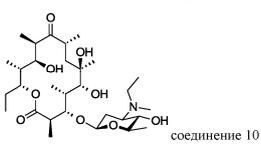
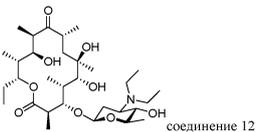
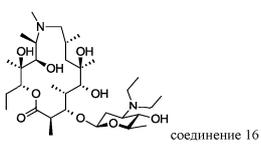
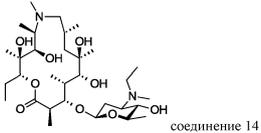
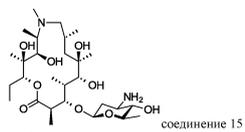
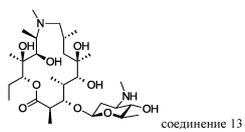
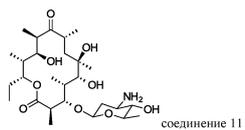
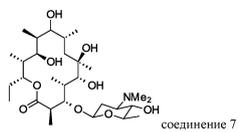
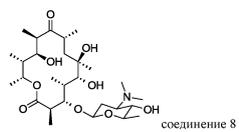
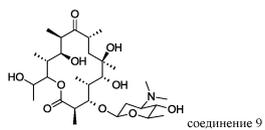
Конкретные макролиды включают

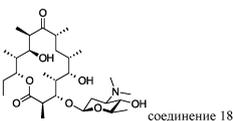
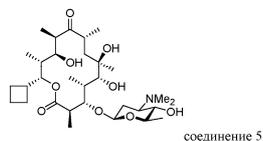
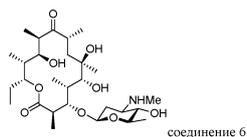


соединение 1



соединение 4





Из приведенных здесь примеров видно, что некоторые макролиды не обладают значительной антибактериальной активностью, как определено здесь.

Общие методы получения макролидов по формуле (I).

Специалистам должно быть понятно, что макролиды по формуле (I) могут быть получены известными методами и различными способами. Приведенные ниже способы просто иллюстрируют некоторые методы, которые можно использовать для получения соединений по формуле (I).

Если для биотрансформации требуется агликон, то его можно получить разными способами. Азитромицин и эритромицин легкодоступны и считаются подходящими отправными точками. Микароза/кладиноза и/или дезозамин удаляются химическими методами типа расщепления гликозидов. Вкратце, в одном методе сахара можно удалить путем обработки кислотой. Чтобы облегчить удаление аминсахара, сначала необходимо окислить диметиламин с образованием N-оксида, который затем удаляется при пиролизе. Затем можно удалить образовавшиеся 5-O/3-O-сахара путем кислотного разложения. Подходящий метод описан LeMahieu et al., 1974 и Djokic et al., 1988. Наконец, соединение подвергается биотрансформации с помощью бактериального штамма, который присоединяет аминсахар.

Другой способ получения подходящих агликонов - ферментация и выделение из подходящего блокированного мутанта. Например, эритронолид В (3а) можно получить путем ферментации штаммов *S. erythraea* с заблокированным гликозилированием типа штаммов и процессов, описанных, например, в U.S. 3127315 (например, NRRL2361, NRRL2360, NRRL2359 и NRRL2338), Gaisser et al., 2000 (например, *S. erythraea* DM ABV ΔCIII). Вкратце, ферментация проводится известными в данной области способами. Как правило, готовят посевную культуру и переносят в производственную ёмкость. Фаза производства длится от 4 до 10 дней, а организм выращивают между 24 и 30°C при соответствующем перемешивании и аэрации. Затем можно выделить агликон посредством экстракции и очистки.

Если агликон или соединение по изобретению содержит аминсахар или какой-либо другой третичный амин и его получают путем ферментации, то необходимо экстрагировать бактериальный бульон и очистить соединение. Обычно бактериальный бульон доводят до pH от 8 до 10, в идеале 9,5. Затем бульон можно экстрагировать подходящим органическим растворителем. Такой растворитель не должен смешиваться с водой и в идеале им является этилацетат, метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ) или растворитель с аналогичными свойствами. Бульон и растворитель смешивают, в идеале перемешивают в течение определенного времени, например, 30 мин или 1 ч. Затем разделяют фазы и удаляют органические экстракты. Таким способом бульон можно экстрагировать несколько раз, в идеале - два или три раза. Затем объединенные органические экстракты упаривают *in vacuo*. Остаток растворяют или суспендируют в слабокислом водном растворителе. Обычно это водный раствор хлорида аммония. Затем его экстрагируют не смешивающимся с водой органическим растворителем типа этилацетата несколько раз, в идеале 2 или 3 раза. Собирают полученный водный слой и доводят до pH между 8 и 10, в идеале 9,0. Затем полученный водный слой экстрагируют не смешивающимся с водой органическим растворителем типа этилацетата несколько раз, в идеале 2 или 3 раза. Органические экстракты объединяют и упаривают *in vacuo*, получая неочищенный экстракт, обогащенный целевым соединением, требующим дополнительной очистки.

Очистка соединения может проводиться посредством хроматографии или (пере) кристаллизации, и требуемые методы хорошо известны специалистам в данной области. Если требуется хроматография на силикагеле в нормальной фазе, а агликон или соединение по изобретению содержит аминсахар или другой третичный амин, то будет полезно добавить щелочной модификатор в подвижную фазу. Например, при хроматографии на силикагеле в нормальной фазе для элюирования можно использовать систему гексана, этилацетата, метанола с добавлением 0-5% водного гидроксида аммония. В идеале добавляют 2% водного гидроксида аммония. После биотрансформации и неизрасходованный агликон, и соединение по изобретению можно очистить по отдельности из одного и того же сырого экстракта, используя подходящую систему растворителей. Если нужна дополнительная очистка, то её необязательно можно проводить методом препаративной ВЭЖХ.

Восстановительное аминирование для алкилирования первичных или вторичных аминов хорошо известно специалистам в данной области. Амин смешивают в растворителе с альдегидом или кетоном и добавляют восстановитель. Возникающий при реакции амина с карбонилем имин или полуаминаль можно затем восстановить боргидридом натрия, получая, например, алкилированный амин. Боргидрид натрия может восстанавливать и другие присутствующие карбонильные группы, например, кетоны. В тех случаях, когда еще присутствует кетон, предпочтительней использовать такой восстановитель, который более специфичен к протонированным имидам, типа цианоборгидрида натрия, хотя специалистам в данной области должно быть ясно, что для нахождения оптимальных условий может потребоваться проверка различных восстановителей, растворителей, температуры и времени реакции.

Ингибиторы контрольных точек для применения в комбинациях по изобретению.

В связи с настоящим изобретением представляют интерес известные сейчас ингибиторы контрольных точек, а также еще не идентифицированные ингибиторы контрольных точек. Так, представляют интерес средства из числа ингибиторов CTLA4, таких как ипилимумаб и тремелимумаб, или из числа ингибиторов PD-1, таких как пембролизумаб (MK3475), ниволумаб (MDX-1106), пидолизумаб (CT-011), AMP-224, или из числа ингибиторов PD-L1, таких как атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб, MDX-1105, антител против PD-1 (клон RMP 1-14 от Merck, Johnson, Roche или Astra), или из числа ингибиторов PD-L2, или из числа ингибиторов LAG3, таких как IMP321, или из числа ингибиторов B7-H3, таких как эноблитузумаб и MGD009, или из числа CMTM6.

Особый интерес представляют такие ингибиторы контрольных точек иммунитета, как ипилимумаб, пембролизумаб, ниволумаб, атезолизумаб, авелумаб и дурвалумаб.

Еще больший интерес представляют ингибиторы контрольных точек иммунитета из числа ингибиторов PD-1.

Однако в научной и патентной литературе можно найти и другие примеры ингибиторов контрольных точек иммунитета, которые также входят в рамки настоящего изобретения.

Определения

Формы единственного числа применяются здесь в отношении одного или более чем одного (т.е. по меньшей мере одного) из грамматических значений объекта. В качестве примера "аналог" означает один аналог или более чем один аналог.

В настоящем изобретении термин "прямой антибактериальный эффект" относится к антибактериальной активности эритромицина и аналогов, которая возникает при связывании с бактериальным комплексом рРНК. Этот эффект не требует присутствия каких-либо компонентов иммунной системы хозяина и поэтому проявляется при стандартных антибактериальных анализах типа определения минимальной ингибирующей концентрации (MIC) *in vitro* и анализа ингибирования методом дисков.

В настоящем изобретении термин "без существенной антибактериальной активности" служит для обозначения того, что соединение по изобретению имеет значение MIC >64 мкг/мл при тестировании его в соответствии с приведенным здесь примером 13 на антибактериальную активность в отношении *E. coli*, *S. salivarius*, *L. casei* и *B. longum*.

В настоящем изобретении термин "иммуностимулятор" служит для обозначения таких соединений, которые активируют иммунную систему.

В настоящем изобретении выражение "ингибитор контрольной точки иммунитета нацелен на контрольную точку иммунитета" означает то, что он блокирует сигнализацию контрольной точки.

В настоящем изобретении термин "алкил" относится к любым прямым или разветвленным цепям, состоящим только из sp^3 -гибридизованных атомов углерода, полностью насыщенных атомами водорода, таким, например, как $-C_nH_{2n+1}$ для алкилов с прямой цепью, где n может составлять от 1 до 6, таким, например, как метил, этил, пропил, изопропил, n -бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, n -пентил, неопентил, изопентил, гексил или изогексил. При этом алкил также может быть замещенным.

Термин "гетероалкил" в настоящем изобретении обозначает группу типа $-X-C_{1-6}$ алкила при использовании по отдельности либо в комбинации, причем C_{1-6} алкил уже определен выше, а X означает O, S, NH или N-алкил. Примерами линейных гетероалкильных групп являются метокси, этокси, пропокси, бутокси, пентокси и гексокси. Примерами разветвленных гетероалкилов являются изопропокси, втор-бутокси, трет-бутокси, изопентокси и изогексокси. Примерами циклических гетероалкилов являются циклопропилокси, циклобутилокси, циклопентилокси и циклогексилокси. При этом гетероалкил также может быть замещенным.

В настоящем изобретении термин "циклоалкил" относится к углеродным цепям с циклической/кольцевой структурой по общей формуле $-C_nH_{2n-1}$, где n составляет от 3 до 6, таким, например, как циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил и т.п. При этом циклоалкил также может быть замещен или содержать гетероатом (O, S, NH или N-алкил) в циклической структуре.

Термин "арил" в настоящем изобретении служит для обозначения карбоциклических ароматических кольцевых систем. Предусматривается, что арилы также включают частично гидрогенизированные производные карбоциклических систем, перечисленных ниже.

Термин "гетероарил" в настоящем изобретении включает гетероциклические ненасыщенные кольцевые системы, содержащие один или несколько гетероатомов из числа азота, кислорода и серы, как-то

фурил, тиенил, пирролил, а также предусматривается, что они включают частично гидрогенизированные производные гетероциклических систем, перечисленные ниже.

Термины "арил" и "гетероарил" в настоящем изобретении означают такие арилы, которые необязательно могут быть незамещенными или моно-, ди- или тризамещенными, либо такие гетероарилы, которые необязательно могут быть незамещенными или моно-, ди- или тризамещенными. Примеры "ариллов" и "гетероариллов" включают, без ограничения, фенил, бифенил, инденил, нафтил (1-нафтил, 2-нафтил), N-гидрокситетразолил, N-гидрокситриазолил, N-гидроксимимдазолил, антраценил (1-антраценил, 2-антраценил, 3-антраценил), фенантренил, флуоренил, пенталенил, азуленил, бифениленил, тиофенил (1-тиенил, 2-тиенил), фурил (1-фурил, 2-фурил), фуранил, тиофенил, изоксазолил, изотиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, пиранил, пиридазинил, пиразинил, 1,2,3-триазинил, 1,2,4-триазинил, 1,3,5-триазинил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, тетразолил, тиадазинил, индолил, изоиндолил, бензофуранил, бензотиофенил (тианафенил), индолил, оксадиазолил, изоксазолил, хиначолинил, флуоренил, ксантенил, изоиндалин, бензгидрил, акридинил, бензизоксазолил, пуринил, хиначолинил, хинолизинил, хинолинил, изохинолинил, хиноксалинил, нафтиридинил, фтеридинил, азепинил, диазепинил, пирролил (2-пирролил), пиразолил (3-пиразолил), 5-тиофен-2-ил-2Н-пиразол-3-ил, имидазолил (1-имидазолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, 5-имидазолил), триазолил (1,2,3-триазол-1-ил, 1,2,3-триазол-2-ил, 1,2,3-триазол-4-ил, 1,2,4-триазол-3-ил), оксазолил (2-оксазолил, 4-оксазолил, 5-оксазолил), тиазолил (2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил), пиридил (2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил), пиримидинил (2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, 6-пиримидинил), пиразинил, пиридазинил (3-пиридазинил, 4-пиридазинил, 5-пиридазинил), изохинолил (1-изохинолил, 3-изохинолил, 4-изохинолил, 5-изохинолил, 6-изохинолил, 7-изохинолил, 8-изохинолил), хинолил (2-хинолил, 3-хинолил, 4-хинолил, 5-хинолил, 6-хинолил, 7-хинолил, 8-хинолил), бензо[b]фуранил (2-бензо[b]фуранил, 3-бензо[b]фуранил, 4-бензо[b]фуранил, 5-бензо[b]фуранил, 6-бензо[b]фуранил, 7-бензо[b]фуранил), 2,3-дигидробензо[b]фуранил (2-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 3-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 4-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 5-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 6-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 7-(2,3-дигидробензо[b]фуранил)), бензо[b]тиофенил (2-бензо[b]тиофенил, 3-бензо[b]тиофенил, 4-бензо[b]тиофенил, 5-бензо[b]тиофенил, 6-бензо[b]тиофенил, 7-бензо[b]тиофенил), 2,3-дигидробензо[b]тиофенил (2-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 3-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 4-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 5-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 6-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 7-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил)), индолил (1-индолил, 2-индолил, 3-индолил, 4-индолил, 5-индолил, 6-индолил, 7-индолил), индазолил (1-индазолил, 2-индазолил, 3-индазолил, 4-индазолил, 5-индазолил, 6-индазолил, 7-индазолил), бензимидазолил (1-бензимидазолил, 2-бензимидазолил, 4-бензимидазолил, 5-бензимидазолил, 6-бензимидазолил, 7-бензимидазолил, 8-бензимидазолил), бензоксазолил (1-бензоксазолил, 2-бензоксазолил), бензотиазолил (1-бензотиазолил, 2-бензотиазолил, 4-бензотиазолил, 5-бензотиазолил, 6-бензотиазолил, 7-бензотиазолил), карбазолил (1-карбазолил, 2-карбазолил, 3-карбазолил, 4-карбазолил). Неограничительные примеры частично гидрогенизированных производных: 1,2,3,4-тетрагидронафтил, 1,4-дигидронафтил, пирролинил, пиразолинил, индолинил, оксазолидинил, оксазолинил, оксазепинил и др.

Фармацевтически приемлемые соли соединений по изобретению включают обычные соли, образованные из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот или оснований, а также соли четвертичных аммониевых соединений с кислотами. Более конкретные примеры подходящих солей с кислотами включают соли соляной, бромистоводородной, серной, фосфорной, азотной, хлорной, фумаровой, уксусной, пропионовой, янтарной, гликолевой, муравьиной, молочной, малеиновой, винной, лимонной, пальмитиновой, малоновой, гидроксималеиновой, фенилуксусной, глутаминовой, бензойной, салициловой, толуолсульфоновой, метансульфоновой, нафталин-2-сульфоновой, бензолсульфоновой, гидроксинафтойной, йодистоводородной, яблочной, стеариновой, танниновой кислоты и др. Другие кислоты типа щавелевой, хотя сами по себе не являются фармацевтически приемлемыми, могут быть полезными при получении солей, применимых в качестве промежуточных продуктов при получении соединений по изобретению и их фармацевтически приемлемых солей. Более конкретные примеры подходящих солей оснований включают соли натрия, лития, калия, магния, алюминия, кальция, цинка, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, холина, диэтаноламина, этилендиамина, N-метилглюкамина и прокаина.

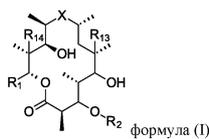
Далее изобретение будет описано в виде следующих неограничительных воплощений.

Вариант 1. Комбинация макролида и ингибитора контрольной точки иммунитета.

Вариант 2. Комбинация по варианту 1, при этом макролид не обладает значительной антибактериальной активностью.

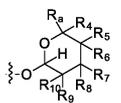
Вариант 3. Комбинация по варианту 2, при этом макролид имеет значение MIC >64 мкг/мл при тестировании в соответствии с тестом на антибактериальную активность, описанным в примере 13.

Вариант 4. Комбинация макролида и ингибитора контрольной точки иммунитета по любому из предыдущих вариантов, при этом макролид имеет формулу (I)

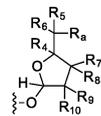


формула (I)

где X выбран из числа C=O, -NR₃CH₂-, -CH₂NR₃-, -NR₃(C=O)-, -(C=O)NR₃-, C=NOH и -CH(OH)-, а R₂ означает сахар по формуле (II) или (III)



формула (II)



формула (III)

R₁ выбран из алкила, гетероалкила, циклоалкила, арила и гетероарила, причем алкил выбран из C₁-C₆-алкильных групп, которые необязательно разветвлены, гетероалкил выбран из C₁-C₆-алкильных групп, которые необязательно разветвлены или замещены и необязательно содержат один или несколько гетероатомов,

циклоалкил выбран из циклических C₁-C₆-алкильных групп, которые необязательно замещены и необязательно содержат один или несколько гетероатомов, арил выбран из необязательно замещенных C₆-ароматических колец, гетероарил выбран из необязательно замещенных C₁-C₅-ароматических колец, содержащих один или несколько гетероатомов,

причем гетероатомы выбраны из O, N, P и S,

где заместители выбраны независимо из алкила, OH, F, Cl, NH₂, NH-алкила, NH-ацила, S-алкила, S-ацила, O-алкила и O-ацила,

причем ацил выбран из необязательно разветвленных C₁-C₄-ацильных групп;

R₃ выбран из H и Me;

R₄ выбран из H и Me;

R_a выбран из H и -CR₂₁R₂₂R₂₃,

причем R₂₁, R₂₂, R₂₃, а также R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ и R₁₀ выбраны независимо из H, Me, NR₁₁R₁₂, NO₂ и OR₁₁,

причем R₂₃ вместе с R₄ в формуле (II), R₄ вместе с R₅ в формуле (II), R₅ вместе с R₇ в формуле (II) и R₇ вместе с R₉ в формуле (II), независимо, могут соединяться такой связью, которая образует двойную связь между атомами углерода, с которыми связана каждая группа,

причем R₂₁ вместе с R₂₂, R₅ вместе с R₆, R₇ вместе с R₈ или R₉ вместе с R₁₀ могут быть заменены на карбонил;

R₁₁ и R₁₂ выбраны независимо из H и алкила;

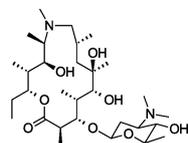
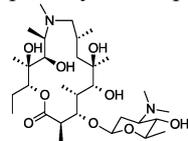
R₁₃ выбран из H, OH и OCH₃;

R₁₄ выбран из H и OH;

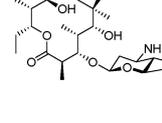
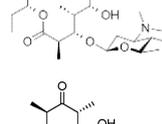
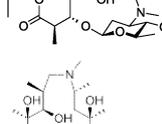
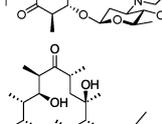
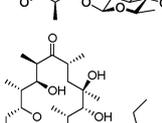
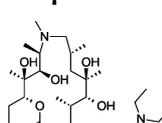
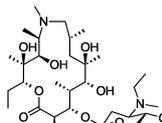
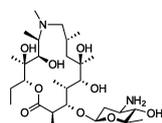
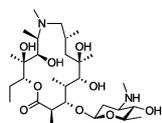
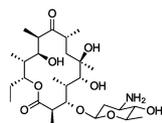
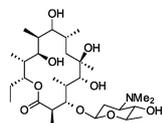
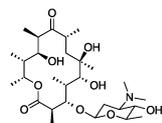
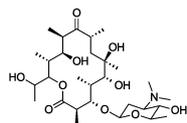
причем один из R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ или R₁₀ выбран из NR₁₁R₁₂ и NO₂;

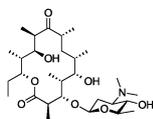
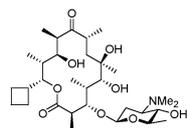
либо его фармацевтически приемлемая соль.

Вариант 5. Комбинация по любому из предыдущих вариантов, при этом макролид выбран из



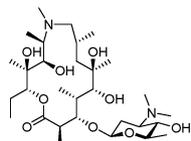
042613





либо их фармацевтически приемлемых солей.

Вариант 6. Комбинация по любому из предыдущих вариантов, при этом макролид представляет собой

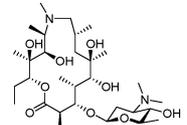


либо его фармацевтически приемлемую соль.

Вариант 7. Комбинация по любому из предыдущих вариантов, при этом ингибитор контрольной точки иммунитета нацелен на контрольную точку иммунитета, выбранную из связанного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4, также известен как CD152), белка 1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1, также известен как CD279), лиганда-1 PD-1 (PD-L1, также известен как B7-H1 и CD274), лиганда-2 PD-1 (PD-L2, также известен как B7-DC и CD-273), Т-клеточного мембранного белка 3 (TIM3, также известен как HAVcr2), аденозинового A2a-рецептора (A2aR), гена активации лимфоцитов 3 (LAG3, также известен как CD223), B7-H3 (также известен как CD276), B7-H4 (также известен как B7-S1, B7X и VCTN1), 2B4 (также известен как CD244), аттенюатора В- и Т-лимфоцитов (BTLA, также известен как CD272) и CMTM6.

Вариант 8. Комбинация по любому из предыдущих вариантов, при этом ингибитор контрольной точки иммунитета выбран из ингибиторов CTLA4, ингибиторов PD-1, ингибиторов PD-L1, ингибиторов PD-L2, ингибиторов TIM3, ингибиторов A2aR, ингибиторов LAG3, ингибиторов B7-H3, ингибиторов B7-H4, ингибиторов 2B4, ингибиторов BTLA и ингибиторов CMTM6.

Вариант 9. Комбинация по варианту 8, при этом макролид представляет собой



либо его фармацевтически приемлемую соль, а ингибитором контрольной точки иммунитета является ингибитор PD-1.

Вариант 10. Комбинация по любому из предыдущих вариантов, при этом ингибитор контрольной точки иммунитета выбран из ипилимумаба, тремелиумаба, пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба, AMP-224, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, MDX-1105, IMP321, эноблитузумаба и MGD009.

Вариант 11. Комбинация по варианту 10, при этом ингибитор контрольной точки иммунитета выбран из ипилимумаба, пембролизумаба, ниволумаба, атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

Вариант 12. Комбинация по любому из предыдущих вариантов в виде двух фармацевтических композиций, причем одна композиция содержит макролид и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей, а другая композиция содержит ингибитор контрольной точки иммунитета и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей.

Вариант 13. Комбинация по варианту 12, при этом две фармацевтические композиции предназначены для одного и того же или для разных способов введения.

Вариант 14. Комбинация по любому из вариантов 1-13 для применения в медицине.

Вариант 15. Комбинация по варианту 14 для применения в качестве иммуностимулятора.

Вариант 16. Комбинация по любому из вариантов 14 и 15 для применения при лечении рака.

Вариант 17. Комбинация по варианту 16, при этом рак выбран из рака надпочечников, анального рака, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака костей, опухоли головного мозга/ЦНС, рака молочной железы, болезни Кастрмана, рака шейки матки, рака толстой кишки/прямой кишки, рака эндометрия, рака пищевода, рака глаз, рака желчного пузыря, карциноидов желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST), трофобластической болезни, болезни Ходжкина, саркомы Капоши, рака почек, рака гортани и подглоточника, острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, хронического миеломоноцитарного лейкоза, рака печени, немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, легочных карциноидов, лимфомы, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, рака носовой полости и околоносовых пазух, рака носоглотки, ней-

робластомы, неходжкинской лимфомы, рака ротовой полости и ротоглотки, остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака полового члена, опухоли гипофиза, рака простаты, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, базально-клеточного и плоскоклеточного рака кожи, меланомы, рака кожи из клеток Меркеля, рака тонкой кишки, рака желудка, рака яичек, рака тимуса, рака щитовидной железы, саркомы матки, рака влагалища, рака вульвы, макроглобулинемии Вальденстрёма и опухоли Вильмса.

Вариант 18. Комбинация по любому из вариантов 14-15 для применения при лечении вирусного заболевания.

Вариант 19. Комбинация по варианту 18, при этом вирусное заболевание выбрано из ВИЧ, аденовируса, альфавируса, арбовируса, болезни Борна, буньявируса, калицивируса, остроконечной кондиломы, коронавируса, вируса Коксаки, цитомегаловируса, вируса лихорадки Денге, контактиозной эктимы, вируса Эпштейна-Барра, инфекционной эритемы, хантавируса, вирусной геморрагической лихорадки, вирусного гепатита, вируса простого герпеса, вируса ветряной оспы, инфекционного мононуклеоза, гриппа, вируса лихорадки Ласса, кори, свинки, контактиозного моллюска, парамиксовируса, флеботомной лихорадки, вируса полиомы, лихорадки Rift Valley, краснухи, медленных вирусных заболеваний, оспы, подострого склерозирующего панэнцефалита, онковиральных инфекций, вируса Западного Нила, вируса желтой лихорадки, вируса бешенства и респираторного синцитиального вируса.

Вариант 20. Фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию по любому из вариантов 1-13 и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей.

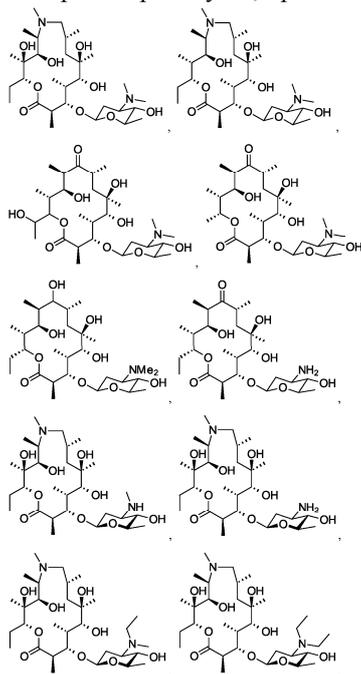
Вариант 21. Фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию по любому из вариантов 14-19 и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей.

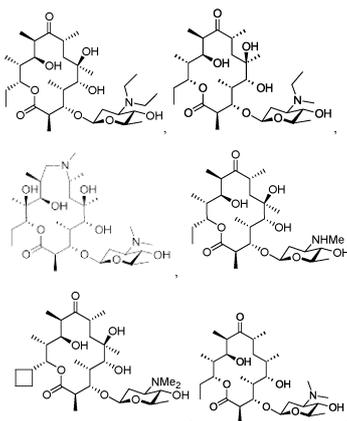
Вариант 22. Фармацевтический набор, содержащий в одной упаковке:

- i) первую композицию, содержащую макролид,
- ii) вторую композицию, содержащую ингибитор контрольной точки иммунитета, и
- iii) инструкции по применению,

для применения при лечении или профилактике рака.

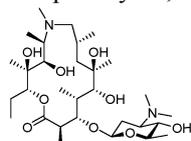
Вариант 23. Фармацевтический набор по варианту 22, при этом макролид выбран из





либо их фармацевтически приемлемых солей.

Вариант 24. Фармацевтический набор по варианту 21, при этом макролид представляет собой



либо его фармацевтически приемлемую соль,

Вариант 25. Способ лечения или профилактики рака, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту, человеку или животному терапевтически эффективного количества комбинации по любому из вариантов 1-13.

Экспериментальная часть

Материалы.

Если не указано иначе, все реагенты, используемые в приведенных ниже примерах, получены из коммерческих источников. Примеры поставщиков азитромицина В включают Santa Cruz Biotechnology (Texas, США) и Toronto Research Chemicals (Toronto, Канада).

Антитела.

Антитела против CD80 с V450, против CD69 с PE, против HLA-DR с APC-R700, против CD127 с APC и против HLA-A,B,C с FITC приобретали у BD Biosciences. CellTrace Violet для анализа пролиферации Т-клеток приобретали у Invitrogen. Антитела для ELISA приобретали у BD Biosciences.

Среда.

RPMI-1640 (Invitrogen) с добавлением 25 мМ HEPES, L-глутамина, пирувата натрия, 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco), 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Общие биологические методы.

Действие соединений по изобретению на иммуностимуляцию можно тестировать по одному или нескольким из описанных ниже методов.

Общий анализ соединений.

Анализ соединений - растворимость и стабильность в растворе.

Анализ ферментационных бульонов и соединений.

Порцию ферментационного бульона, полученного, как описано ниже, энергично встряхивали в течение 30 мин с равным объемом этилацетата, а затем разделяли центрифугированием, или же растворяли выделенные соединения в смеси метанол:вода (9:1, 0,1 мг/мл), а затем разделяли центрифугированием. Супернатанты анализировали методами жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией и проводили хроматографию на дезактивированном щелочью обратнофазном диоксиде кремния Luna C18 (с размером частиц 5 мкм) на колонке Luna ВЭЖХ (250 × 4,6 мм; Phenomenex, Macclesfield, UK) с нагреванием при 40°C. Система для ВЭЖХ Agilent 1100, состоящая из четверичного насоса, автоматического пробоотборника, термостата для колонки и детектора с диодной матрицей, была подключена к MS Bruker Esquire с ионной ловушкой.

Подвижная фаза А = 0,1% муравьиной кислоты в воде.

Подвижная фаза В = 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Градиент: Т = 0 мин, В = 50%; Т = 4,5 мин, В = 50%; Т = 7 мин, В = 100%; Т = 10,5 мин, В = 100%; Т = 10,75 мин, В = 50%; Т = 13 мин, В = 50%.

Соединения идентифицировали методами жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией и количественно определяли методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией по внутреннему стандарту.

Анализ экспрессии маркеров методом проточной цитометрии.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека от здоровых доноров выделяли центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque. Клетки культивировали в полной среде RPMI-

1640 (Invitrogen) с добавлением 25 мМ HEPES, L-глутамин, пирувата натрия (Sigma), 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Nyclone) в течение 24-72 ч при 37°C, 5% CO₂ и стимулировали при возрастающих концентрациях соединения 1 и 2. Затем клетки промывали ФСБ и окрашивали с помощью моноклональных антител, специфичных для маркеров клеточной поверхности (BD Pharmingen), а затем анализировали методом проточной цитометрии на проточном цитометре BD FACS Canto II. Все образцы тестировали в двух повторах.

Цитомегаловирусные (ЦМВ) культуры.

Выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека от здоровых ЦМВ-положительных доноров центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque. Метили МКПК с помощью 5 мкМ CellTrace Violet (Invitrogen) в ФСБ в течение 15 мин, а затем промывали полной средой для культивирования клеток. Помеченные МКПК культивировали в присутствии библиотеки пептидов, охватывающей белок pp65 ЦМВ (1 мкг/мл пептидов, JPT), в среде AIM-V (Invitrogen) с добавлением L-глутамин, пирувата натрия (Sigma), 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Nyclone) в течение 6-8 дней при 37°C, 5% CO₂. Определяли пролиферацию клеток методом проточной цитометрии на проточном цитометре BD FACS Canto II.

ELISA.

Измеряли ИЛ-10 в супернатантах стандартным сэндвич-методом ELISA (все антитела от BD Biosciences) после 48 ч или 7 дней инкубации с 2,5 мкМ соединения 1 и 100 ед./мл ИЛ-2 (Miltenyi Biotechnologies) в полной среде RPMI при 37°C, 5% CO₂.

Анализ TLR2.

Тестировали образцы и контроли в двух повторах на клетках рекомбинантной линии HEK-293-TLR методом анализа клеток-репортеров на фирме Invivogen при их стандартных условиях анализа. Клетки этой линии функционально гиперэкспрессируют белок TLR2 человека, а также репортерный ген, которым является секретируемая щелочная фосфатаза (SEAP). Продукция этого репортерного гена управляется индуцибельным промотором NFκB. Результаты по активации клеток репортерной линии TLR представлены в виде значений оптической плотности (OD).

Для стимуляции клеток репортерной линии hTLR2 использовали по 20 мкл каждого исследуемого препарата в конечном объеме реакции 200 мкл. Образцы тестировали в двух повторах по меньшей мере при двух исследуемых концентрациях - 20 и 10 мкМ.

Оценка проницаемости клеток (в двух направлениях).

Вносили 10 мкМ исследуемого препарата на апикальную (А) поверхность монослоя клеток Caco-2 (в буфере HBSS с 0,3% DMSO и 5 мкМ LY при 37°C) и измеряли проникновение соединения в базолатеральный (В) отсек после 90-минутной инкубации. Это же проделывали и в обратном направлении (от базолатерального к апикальному) для исследования активного транспорта. Для определения уровня исследуемых и стандартных контрольных соединений использовали жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией. Рассчитывали коэффициент оттока путем деления проницаемости от В до А на проницаемость от А до В:

$$\text{проницаемость препарата } P_{\text{app}} = (VA/(\text{площадь} \times \text{время})) \times ([\text{препарат}] \text{ у получателя}/([\text{препарат}] \text{ у источника, донора}) \times \text{коэффициент разбавления}).$$

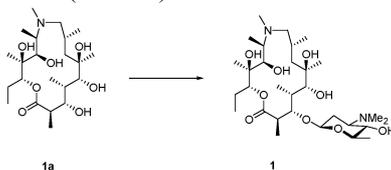
Оценка метаболической стабильности (анализ стабильности в микросомах).

Измеряли скорость метаболизма в микросомах следующим образом.

Микросомы печени человека разбавляли буфером С (0,1 М калий-фосфатный буфер, 1,0 мМ EDTA, pH 7,4) до концентрации 2,5 мг/мл. Исследования стабильности микросом проводили путем внесения 30 мкл 1,5 мкМ раствора добавляемого соединения в лунки (1,5 мкл добавляемого раствора в 500 мкМ (10 мкл исходного раствора 10 мМ в DMSO в 190 мкл ACN, что дает конечную концентрацию в пробе 1 мкМ) и 18,75 мкл микросом печени 20 мг/мл в 479,75 мкл буфера С). Все образцы преинкубировали примерно 15 мин при 37°C. После этого запускали реакцию добавлением 15 мкл раствора NADPH (6 мМ) с осторожным перемешиванием. Отбирали аликвоты (40 мкл) через 0, 5, 15, 30 и 45 мин и гасили их ACN, содержащим внутренний стандарт (135 мкл). Удаляли белок центрифугированием (4000 об/мин, 15 мин) и проводили анализ образцов на планшете на концентрацию соединения методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Затем рассчитывали время полураспада стандартными методами, сравнивая концентрацию анализируемого вещества с исходным количеством.

Примеры

Пример 1. Получение соединения 1 (ISC397)



Получение агликона азитромицина (Az-AG) (1a).

Агликон азитромицина (1a) получали описанным в литературе методом (Djokic et al., 1988). Вкрат-

це, азитромицин превращают в агликон азитромицина путем кислотного удаления 3-О- и 5-О-сахаров. Для облегчения отщепления 5-О-аминосахар сначала окисляют и подвергают пиролизу.

Получение биотрансформационных штаммов, способных гликозилировать агликоны эритромицина (эритронолиды).

Получение *S. erythraea* 18A1 (pAES52).

Экспрессионную плазмиду pAES52, содержащую angAI, angAII, angCVI, ang-orf14, angMIII, angB, angMI и angMII вместе с системой экспрессии actII-ORF4 pactI/III (Rowe et al., 1998), получали следующим образом.

Аmplифицировали гены биосинтеза сахаров анголамицина из космидной библиотеки штамма *S. erythraea* ATCC23956, полученного из Американской коллекции типовых культур (Manassas, Virginia, США). Последовательность кластера биосинтетических генов была депонирована как EU038272, EU220288 и EU232693 (Schell et al., 2008).

Собирали кассету биосинтетических генов в векторе pSG144, как описано ранее (Schell et al., 2008, ESI), последовательно добавляя гены до тех пор, пока не были получены все 8 необходимых для биосинтеза сахаров, получая плазмиду pAES52.

Плазмидой pAES52 трансформировали штамм 18A1 (WO 2005/054265).

Трансформирование pAES52 в *S. erythraea* 18A1.

Плазмидой pAES52 трансформировали протопласты *S. erythraea* 18A1 стандартными методами (Kieser et al., 2000; Gaisser et al., 1997). Полученный штамм был обозначен как ISOM-4522 и депонирован в NCIMB 24 января 2017 г. под номером доступа NCIMB 42718.

Получение *S. erythraea* SGT2 (pAES54).

Экспрессионную плазмиду pAES54, содержащую angAI, angAII, angCVI, ang-orf14, angMIII, angB, angMI и angMII вместе с системой экспрессии actII-ORF4 pactI/III (Rowe et al., 1998), получали следующим образом.

Аmplифицировали гены биосинтеза сахаров анголамицина из космидной библиотеки штамма *S. erythraea* ATCC23956, полученного из Американской коллекции типовых культур (Manassas, Virginia, США). Последовательность кластера биосинтетических генов была депонирована как EU038272, EU220288 и EU232693 (Schell et al., 2008).

Собирали кассету биосинтетических генов в векторе pSG144, как описано ранее (Schell et al., 2008, ESI), последовательно добавляя гены до тех пор, пока не были получены все 8 необходимых для биосинтеза сахаров, получая плазмиду pAES52.

Получали плазмиду pAES54 путем лигирования фрагмента SpeI-NheI в 11541 п.н., содержащего систему промотора actII-ORF4 pactI/III и 8 генов ang, вырезанного из pAES52, с фрагментом XbaI-SpeI в 5087 п.н. из pGP9, содержащим ген устойчивости к апрамицину, oriC и oriT для переноса в стрептомицеты и интегразу phiBT1 с сайтом attP для интегративной трансформации (совместимые сайты NheI и XbaI удалялись при лигировании).

Затем плазмидой pAES54 трансформировали *S. erythraea* SGT2 (Gaisser et al., 2000; WO 2005/054265).

Трансформирование pAES54 в *S. erythraea* SGT2.

pAES54 переносили в *S. erythraea* SGT2 посредством конъюгации стандартными методами. Вкратце, *E. coli* ET12567 pUZ8002 трансформировали pAES54 по стандартной методике и наносили шпателем на чашку, заполненную 2TY с апрамицином (50 мкг/мл), канамицином (50 мкг/мл) и хлорамфениколом (33 мкг/мл) для отбора. Эту чашку инкубировали при 37°C в течение ночи. Колонии из неё использовали для засева свежих жидких культур 2TY, которые инкубировали при 37°C до достижения поздней логарифмической фазы. Клетки собирали, промывали, смешивали со спорами *S. erythraea* SGT2, наносили шпателем на чашки с R6 и инкубировали при 28°C. Через 24 ч на эти чашки наносили 1 мл стерильной воды, содержащей 3 мг апрамицина и 2,5 мг налидиксовой кислоты, и инкубировали при 28°C в течение дальнейших 5-7 дней. Эксконъюганты из этой чашки переносили на свежие чашки с R6, содержащим апрамицин (100 мкг/мл).

Альтернативный штамм для биотрансформации.

В качестве альтернативы можно использовать BIOT-2945 (Schell et al., 2008) в качестве штамма для биотрансформации, поскольку он также присоединяет анголозамин к эритронолидам.

Биотрансформация агликона азитромицина с получением соединения 1.

Колбы Эрленмейера (250 мл), содержащие среду SV2 (40 мл) и 8 мкл тиострептона (25 мг/мл), инокулировали 0,2 мл исходных спор штамма ISOM-4522 и инкубировали при 30°C со встряхиванием при 300 об/мин с размахом в 2,5 см в течение 48 ч.

Среда SV2

Ингредиент	Количество
Глицерин	15 г
Глюкоза	15 г
Соевый пептон А3СC	15 г
NaCl	3 г
CaCO ₃	1 г
Вода RO	до конечного объема в 1 л
Перед стерилизацией доводили до pH 7,0 с помощью 10M HCl.	
Стерилизовали автоклавированием при 121°C, 30 мин.	

Готовили стерильные закрытые крышками пробирки Falcon (50 мл), содержащие среду EryPP (7 мл), и засеивали культурой из посевной колбы (0,5 мл на 1 пробирку) без антибиотиков. Пробирки инкубировали при 30°C со встряхиванием при 300 об/мин с размахом в 2,5 см в течение 24 ч.

Среда EryPP

Ингредиент	Количество
Поджаренная соевая мука (Nutrisoy)	30
Глюкоза	50 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 г
NaCl	5 г
CaCO ₃	6 г
Вода RO	до конечного объема в 1 л
Перед стерилизацией доводили до pH 7,0 с помощью 10M HCl.	
Стерилизовали in situ в автоклаве при 121°C, 30 мин.	
После стерилизации добавляли 10 мл/л пропан-1-ола.	

Через 24 ч в каждую пробирку Falcon добавляли агликон азитромицина (0,5 мМ в DMSO, 50 мкл) и продолжали инкубацию при 300 об/мин с размахом 2,5 см в течение дальнейших 6 дней.

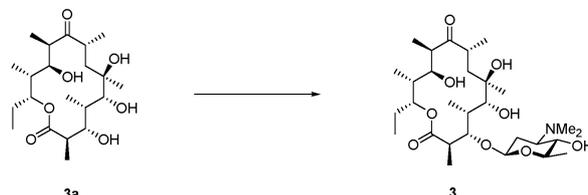
Выделение соединения 1.

Цельную культуральную среду доводили до pH 9,5 и дважды экстрагировали одним объемом этилацетата. После центрифугирования собирали органические слои путем отсасывания (3500 об/мин, 25 мин). Органические слои объединяли и упаривали in vacuo, получая коричневую смолу, содержащую соединение 1. Этот экстракт распределяли между этилацетатом (200 мл) и водным раствором хлорида аммония (20 мл 50% концентрированного раствора). После разделения органический слой экстрагировали дополнительным объемом (200 мл) водного раствора хлорида аммония. Затем объединенные водные слои доводили до pH 9,0 водным гидроксидом натрия и дважды экстрагировали одним эквивалентным объемом этилацетата. Органические слои объединяли и упаривали in vacuo, получая коричневое вещество. Затем этот экстракт наносили на колонку с диоксидом кремния и элюировали поэтапно (порциями по 500 мл) с помощью

Растворитель	Гексан	EtOAc	MeOH	Aq. NH ₄ OH
A	0,499	0,499	0	0,002
B	0,250	0,748	0	0,002
C	0	0,998	0	0,002
D	0	0,988	0,01	0,002
E	0	0,978	0,02	0,002
F	0	0,968	0,03	0,002
G	0	0,958	0,04	0,002

Соединение 1 преимущественно находилось в F и G. Эти растворители объединяли и упаривали in vacuo, получая коричневое вещество, содержащее соединение 1. Затем этот материал очищали препаративным методом ВЭЖХ (колонка C18 Gemini NX, Phenomenex с 20 мМ ацетатом аммония и ацетонитрилом в качестве растворителя). Фракции, содержащие искомое соединение, объединяли и высушивали, а затем обессоливали на картридже C18 SPE.

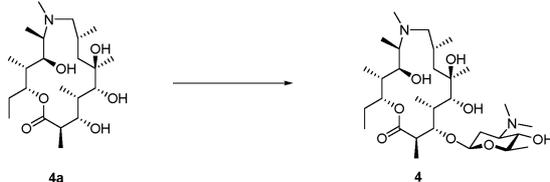
Пример 2. Получение соединения 3 (известное соединение - соответствует соединению 17 в Schell et al., 2008)



Эритронолид В (3a) может быть получен путем ферментации в штаммах *S. erythraea* с заблокированным гликозилированием типа штаммов и процессов, описанных, например, в U.S. 3,127,315 (например, NRRL2361, 2360, 2359 и 2338) или в Gaisser et al., 2000 (например, *S. erythraea* DM ABV ΔCIII).

Затем эритронолид В (3a) подвергали биотрансформации штаммом, способным присоединять англозамин к 3-гидроксилу (типа NCIMB 42718), и выделяли соединение 3 из ферментационного бульона стандартными методами.

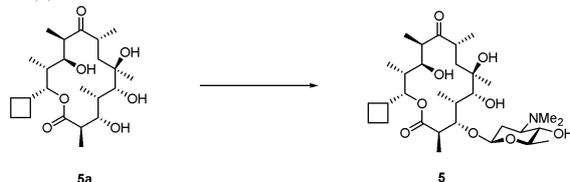
Пример 3. Получение соединения 4



Получали агликон азитромицина В (4a) путем гидролиза сахаров из азитромицина В таким же образом, как и для азитромицина А.

Затем агликон азитромицина В (4a) подвергали биотрансформации штаммом, способным присоединять англозамин к 3-гидроксилу (типа NCIMB 42718), и выделяли соединение 4 из ферментационного бульона стандартными методами.

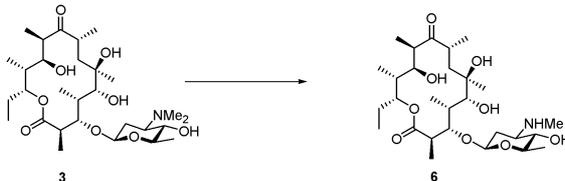
Пример 4. Получение соединения 5



Получали циклобутилэритронолид В (5a) методами, описанными в WO 98/01571. Вкратце, трансформировали *S. erythraea* DM ABV ΔCIII (Gaisser et al., 2000) с помощью pIG1 (Long et al., 2002; WO 98/01571). Ферментация полученного штамма при добавлении циклобутенкарбоновой кислоты приводила к образованию циклобутилэритронолида В (5a). Его выделяли из ферментационного бульона стандартными методами.

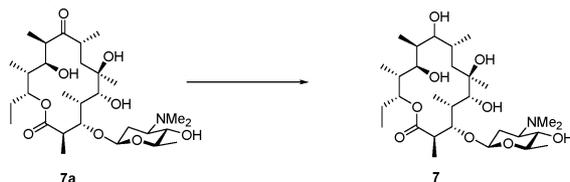
Затем циклобутилэритронолид В (5a) подвергали биотрансформации штаммом, способным присоединять англозамин к 3-гидроксилу (типа NCIMB 42718), и выделяли соединение 5 из ферментационного бульона стандартными методами.

Пример 5. Получение соединения 6



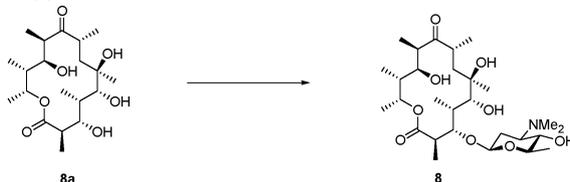
Из аминсахара соединения 3 (см. пример 2) удаляли металлическую группу путем внесения его в ферментацию ATCC 31771 и выделяли соединение 6 из ферментационного бульона стандартными методами.

Пример 6. Получение соединения 7



Соединение 3 обрабатывали боргидридом натрия в растворителе. После проведения стандартных реакций выделяли соединение 7 стандартными методами.

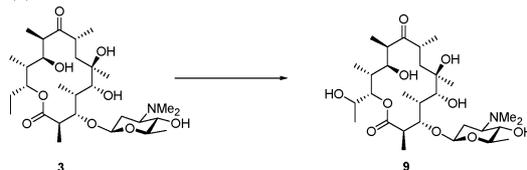
Пример 7. Получение соединения 8



Получали 14-десметилэритронолид В (8a) способами, описанными в WO 2000/00618. Вкратце, трансформировали *S. erythraea* DM ABV ΔCIII (Gaisser et al., 2000) с помощью pPFL43. Полученный штамм ферментировали типичными методами и выделяли соединение 8a посредством хроматографии.

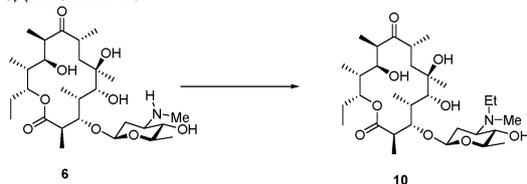
Затем 14-десметилэритронолид В (8a) подвергали биотрансформации штаммом, способным присоединять англозамин к 3-гидроксилу (типа NCIMB 42718), и выделяли соединение 8 из ферментационного бульона стандартными методами.

Пример 8. Получение соединения 9



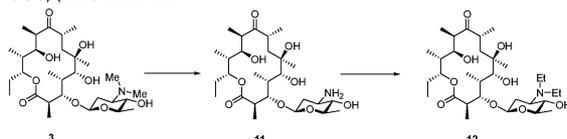
Получали 14-гидроксианголозамин-эритронолид В (9) путем внесения соединения 3 (см. пример 2) в ферментацию *S. rosei* ATCC 21250, которая присоединяет гидроксильную группу. Затем выделяли соединение 9 из ферментационного бульона стандартными методами.

Пример 9. Получение соединения 10



Растворяли соединение 6 (6,0 мг, 0,01 ммоль) растворяли в дихлорметане (1 мл) и добавляли ацетальдегид (1,0 мкл, 0,02 ммоль). Реакцию перемешивали при комнатной температуре и добавляли триацетоксиборгидрид натрия (2,1 мг, 0,01 ммоль). Реакцию перемешивали в течение 30 мин, а затем гасили добавлением концентрированного водного бикарбоната натрия (25 мл). Водный экстракт экстрагировали этилацетатом (3×25 мл). Органические экстракты объединяли, промывали концентрированным раствором NaCl и удаляли растворитель *in vacuo*. Затем очищали искомое соединение 10 методом препаративной ВЭЖХ.

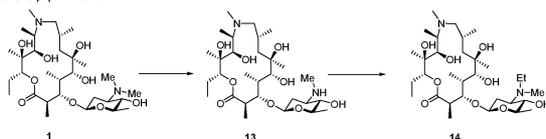
Пример 10. Получение соединения 12



Соединение 3 (см. пример 2) подвергали биотрансформации для удаления обеих метильных групп из аминоксахара путем внесения его в ферментацию ATCC 31771 и выделяли соединение 11 из ферментационного бульона стандартными методами.

Соединение 11 растворяли в THF и добавляли ацетальдегид. Реакцию перемешивали при комнатной температуре и добавляли цианоборгидрид натрия. Реакцию дополнительно перемешивали, а затем гасили добавлением водного бикарбоната натрия. Водный экстракт экстрагировали EtOAc (3 × эквивалентный объем). Органические экстракты объединяли, промывали насыщенным раствором NaCl и удаляли растворитель *in vacuo*. Затем очищали искомое соединение 12 стандартными методами.

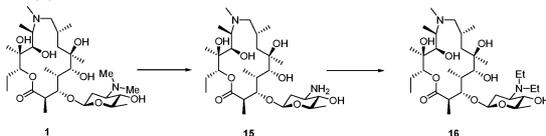
Пример 11. Получение соединения 14



Соединение 1 (см. пример 1) подвергали биотрансформации для удаления метильной группы из аминоксахара путем внесения его в ферментацию ATCC 31771 и выделяли соединение 13 из ферментационного бульона стандартными методами.

Соединение 13 растворяли в THF и добавляли ацетальдегид. Реакцию перемешивали при комнатной температуре и добавляли цианоборгидрид натрия. Реакцию дополнительно перемешивали, а затем гасили добавлением водного бикарбоната натрия. Водный экстракт экстрагировали EtOAc (3 × эквивалентный объем). Органические экстракты объединяли, промывали насыщенным раствором NaCl и удаляли растворитель *in vacuo*. Затем очищали искомое соединение 14 стандартными методами.

Пример 12. Получение соединения 16



Соединение 1 (см. пример 1) подвергали биотрансформации для удаления обеих метильных групп из аминоксахара путем внесения его в ферментацию ATCC 31771 и выделяли соединение 15 из ферментационного бульона стандартными методами.

Соединение 15 растворяли в THF и добавляли ацетальдегид. Реакцию перемешивали при комнатной температуре и добавляли цианоборгидрид натрия. Реакцию дополнительно перемешивали, а затем

гасили добавлением водного бикарбоната натрия. Водный экстракт экстрагировали EtOAc (3 × эквивалентный объем). Органические экстракты объединяли, промывали насыщенным раствором NaCl и удаляли растворитель *in vacuo*. Затем очищали искомое соединение 16 стандартными методами.

Пример 13. Оценка прямого антибактериального действия.

Определяли биоактивность макролидных соединений против 4 штаммов обычных кишечных бактерий (*Escherichia coli*, *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius*, *Lactobacillus casei* и *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) и стандартного изолята *Micrococcus luteus* из кожи млекопитающих путем определения минимальной ингибирующей концентрации (MIC). Бактериальные штаммы приобретали у DSMZ (Brunswick, Германия), за исключением *M. luteus*, который получали из NCIMB, и хранили в 20% глицерине при -80°C.

Исходные растворы (в 100% DMSO) положительных контролей (азитромицина и эритромицина) и исследуемых соединений 1 и 2 разбавляли бульоном до рабочей концентрации в 256 мкг/мл (диапазон конечных концентраций при тестировании от 128 мкг/мл до 0,00391 мкг/мл). Исходные растворы всех других соединений разбавляли бульоном до рабочей концентрации 128 мкг/мл (диапазон конечных концентраций при тестировании от 64 до 0,00195 мкг/мл).

Бактериальные штаммы культивировали в соответствующем бульоне в анаэробной камере при 37°C, за исключением *M. luteus*, который инкубировали в аэробных условиях при 37°C. 18-часовые культуры разводили бульоном до OD₅₉₅ = 0,1, а затем еще разбавляли 1:10. В 96-луночных планшетах переносили в лунки по 200 мкл рабочего раствора исследуемого соединения в двух повторах и делали серийные разведения (1:2) в бульоне. В каждую лунку вносили по 100 мкл бактериальной суспензии и тщательно перемешивали. Включали и соответствующие контроли на стерильность и инкубировали планшеты в анаэробной камере или в аэробных условиях (*M. luteus*) при 37°C в течение 18 ч. Определяли MIC как концентрацию исследуемого соединения в первой лунке без видимого роста.

Таблица 1

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
Азитромицин	<8,0 мкг/мл	<0,5 мкг/мл	<1,0 мкг/мл	>64 мкг/мл	0,125 мкг/мл
Эритромицин	>64 мкг/мл	<0,06 мкг/мл	<0,25 мкг/мл	>64 мкг/мл	<0,0625 мкг/мл
Соединение 1	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>256 мкг/мл
Соединение 4	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	
Соединение 5	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	
Соединение 6	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	
Соединение 7	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	
Соединение 8	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	
Соединение 9	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	>64 мкг/мл	
EM703					64-128 мкг/мл

Как видно из представленных в табл. 1 данных, соединения 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 не проявляют антибактериальной активности против каких-либо из исследованных бактериальных штаммов, тогда как эритромицин и азитромицин проявляют сильную активность против ряда штаммов.

Пример 14. Оценка иммуностимулирующей активности.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека от здоровых доноров выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколл-пак. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640 (Invitrogen) с добавлением 25 мМ HEPES, L-глутамин, пирувата натрия (Sigma), 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Nyclone). Клетки стимулировали в течение 24 ч (исследования 1-4) или от 48 ч до 1 недели (исследование 5) при 37°C, 5% CO₂ при возрастающих концентрациях соединения 1 или 2 в планшетах для культивирования тканей. Затем клетки извлекали из планшета, промывали ФСБ и анализировали на экспрессию специфических для клеточной поверхности маркеров и МНС класса I методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител от BD Pharmingen и проточного цитометра FACS Canto II.

В супернатантах измеряли ИЛ-10 стандартным сэндвич-методом ELISA (все антитела от BD Biosciences) после 48 ч или 7 дней инкубации с 2,5 мкМ соединения 1 и 100 ед./мл ИЛ-2 (Miltenyi Biotechnologies) в полной среде RPMI при 37°C, 5% CO₂.

Исследование 1. После 24 ч стимуляции *in vitro* мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) с помощью 1 мкМ соединения 1 (фиг. 8) возрастал уровень маркера активации CD69 в Т-клетках CD4⁺ и В-клетках (фиг. 1).

Исследование 2. Также наблюдалось повышение уровня молекул МНС класса I (HLA-ABC) на Т- и В-клетках (фиг. 2), означающее действие на презентацию вирусных антигенов.

Исследование 3. Стимуляция МКПК соединением 1 приводила к повышению уровня костимулирующей молекулы CD80, а также антигенпрезентирующих молекул МНС класса II (HLA-DR) на моноцитах (фиг. 3).

Исследование 4. В моноцитах, дифференцировавшихся в макрофаги, также повышался уровень CD80 в ответ на стимуляцию соединением 1 (фиг. 4).

Исследование 5. При стимуляции МКПК соединением 1 в течение 48 ч или 7 дней отмечалось изменение профиля цитокинов с повышением продукции иммунодепрессивного цитокина ИЛ-10 при изменении сэндвич-методом ELISA. Это указывает на иммуноингибирующее действие при определенных условиях (фиг. 5).

Исследование 6. Стимулировали МКПК соединением 1 и культивировали в среде RPMI в течение 6 дней в присутствии ИЛ-2 (Miltenyi Biotechnologies) и красителя Cell Trace Violet (Invitrogen). Измеряли пролиферацию методом проточной цитометрии. Анализ иммунологического действия соединения 1 выявил изменение профиля управляемой цитокинами пролиферации Т-клеток (фиг. 6).

Исследование 7. Соединение 1 также влияло на пролиферацию вирусоспецифичных Т-клеток. При культивировании МКПК от инфицированных цитомегаловирусом (ЦМВ) доноров в присутствии антигена ЦМВ и соединения 1 в течение 6 дней проявлялось изменение фенотипа активированных ЦМВ-специфичных Т-клеток CD8⁺ с повышением экспрессии α -рецептора ИЛ-7 (CD127) при измерении методом проточной цитометрии (фиг. 7). CD127 имеет решающее значение для гомеостаза, дифференцировки и функции Т-клеток, а снижение экспрессии коррелирует с тяжестью заболевания при ВИЧ и других хронических вирусных заболеваниях (Crawley et al., 2012).

Как видно, соединение 1 обладает неожиданной способностью специфически активировать и модифицировать иммунный ответ, действуя на презентацию антигенов, костимуляцию и активацию и пролиферацию Т-клеток. Во многих из этих исследований включали соединение 2, другой родственный аналог макролида эритромицина с измененным гликозилированием, ранее опубликованный в Schell et al., 2008 (как соединение 20), которое почти или совсем не проявляло активности при анализах.

Исследование 8. При культивировании МКПК от инфицированных ЦМВ доноров в присутствии антигена ЦМВ их оставляли без обработки либо подвергали воздействию соединения 1 или соединения 2 в течение 3 дней. Воздействие соединения 1 индуцировало секрецию высоких уровней ИФ- γ , тогда как культивирование с одним лишь антигеном или антигеном вместе с соединениями А не индуцировало секрецию ИФ- γ (фиг. 9).

Исследование 9. Макрофаги от здоровых доноров подвергали воздействию соединения 1 или 2 в течение 48 ч. Только макрофаги, подвергавшиеся воздействию соединения 1, секретировали ИФ- γ , тогда как макрофаги без обработки и макрофаги, подвергавшиеся воздействию соединения А, не секретировали ИФ- γ (фиг. 10). Следовательно, соединение 1 способно индуцировать секрецию ИФ- γ у макрофагов от здоровых доноров.

Исследование 10. МКПК и макрофаги подвергали воздействию соединения 1 или 2 в течение 2 дней (фиг. 11). Соединение 2 не влияло на базальную экспрессию RANTES в МКПК, тогда как соединение 1 индуцировало двукратное повышение уровня экспрессии. Экспрессия RANTES в макрофагах была минимальной, а соединение 1 индуцировало высокий уровень экспрессии.

Исследование 11. МКПК и макрофаги подвергали воздействию соединения 1 или 2 в течение 2 дней. МКПК и макрофаги секретировали ИЛ-12p70 в ответ на соединение 1, тогда как соединение 2 не индуцировало секрецию при сравнении с необработанными клетками (фиг. 12).

Исследование 12. МКПК, макрофаги и Т-клетки CD4⁺ подвергали воздействию соединения 1 или 2 в течение 2 дней. Соединение 1 повышало секрецию ИЛ-1 β в макрофагах и незначительно в МКПК, тогда как ИЛ-1 β в Т-клетках CD4⁺ не индуцировался (фиг. 13).

Исследование 13. Соединение 1 вводили внутривенно мышам C57bl/6 от 0,165 мг/кг до 5 мг/кг. У животных, получавших самую высокую дозу 5 мг/кг, возрастало содержание клеток CD25⁺ (фиг. 14), а также масса тела в той же группе (не показано).

Исследование 14. Соединение 1 или 2 вводили внутривенно мышам C57bl/6. Через 24 ч извлекали селезенку и оценивали экспрессию МНС класса I на спленоцитах CD11b⁺. Соединение 1 вызывало возрастание клеток спленоцитов с высокой экспрессией МНС I, тогда как в спленоцитах мышей, которым вводили соединение А, не наблюдалось никакого эффекта.

Пример 15. Оценка метаболической стабильности.

Метаболическую стабильность соединений по изобретению оценивали стандартным методом анализа стабильности в микросомах человека (см. "Общие методы"). Следует ожидать, что соединения с большим периодом полураспада будут иметь больший период полураспада после дозирования, что может быть полезно для применения в качестве "мягких лекарств", когда активное вещество быстро разлагается после попадания в организм пациента. Значения периода полураспада соединений представлены ниже в табл. 2.

Таблица 2

	$T_{1/2}$ (мин)
Азитромицин	245
Эритромицин	31
Соединение 1	108
Соединение 3	35
Соединение 4	160
Соединение 5	83
Соединение 6	109
Соединение 7	56
Соединение 8	33
Соединение 9	100
Соединение 10	31
Соединение 17	151
Соединение 18	25
Соединение 19	18
EM703	97

Видно, что многие соединения по изобретению обладают повышенной или пониженной метаболической стабильностью по сравнению с азитромицином, эритромицином и EM703 (например, см. EP 1350510).

Пример 16. Оценка проницаемости на клетках Сасо-2.

Проницаемость соединений по изобретению оценивали стандартным методом двунаправленного анализа проницаемости на клетках Сасо-2 (см. "Общие методы"). Следует ожидать, что соединения с большей проницаемостью будут лучше проникать в клетки и обладать потенциалом для эффекта, а соединения с лучшей проницаемостью и/или меньшим оттоком будут обладать большей пероральной биодоступностью. Проницаемость и коэффициенты оттока соединений представлены ниже в табл. 3.

Таблица 3

	$P_{app} \times 10^6 / \text{см} \cdot \text{сек}^{-1}$	Коэффициент оттока
Азитромицин	<0,14	>78
Соединение 1	0,32	63
Соединение 3	0,27	166
Соединение 4	0,38	49
Соединение 5	0,47	81
Соединение 8	0,46	56
Соединение 10	1,23	26
Соединение 17	0,50	39
Соединение 18	9,44	3,5
EM703	<0,15	>108

Видно, что многие соединения по изобретению обладают лучшей клеточной проницаемостью и/или меньшим оттоком по сравнению с азитромицином и EM703 (например, см., EP 1350510).

Пример 17. Оценка стимуляции TLR2.

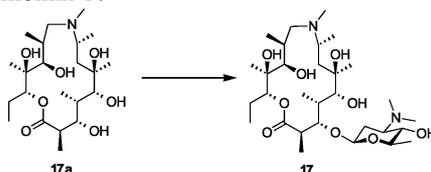
Соединения тестировали методом репортерного анализа TLR2 (см. "Общие методы"), которым измеряется стимуляция рецептора TLR2. Стимулирующее действие измеряли по повышению оптической плотности (OD) вследствие высвобождения секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP), как показано в табл. 4.

Таблица 4

	OD после добавления 20 мкМ препарата	OD после добавления 10 мкМ препарата	OD после добавления 5 мкМ препарата
Азитромицин	0,031	0,045	0,029
Эритромицин	0,045	0,065	0,035
Соединение 1	0,458	0,202	0,111
Соединение 2	0,044	0,010	0,046
Соединение 3	-0,026	-0,015	-0,043
Соединение 17	0,234	0,155	0,054
EM703	-0,033	-0,024	-0,040

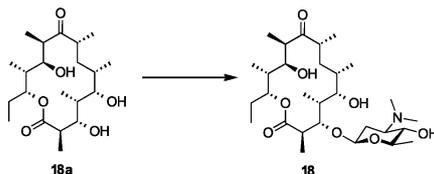
Видно, что соединение 1 стимулировало TLR2 уже при концентрации 5 мкМ, соединение 17 стимулировало TLR2 уже при концентрации 10 мкМ, тогда как эритромицин А, азитромицин и соединения 2 и 3, родственные макролидные аналоги эритромицина с измененным гликозилированием, ранее опубликованные в Schell et al., 2008 (как соединения 17 и 20), почти или совсем не проявляли стимуляции при концентрациях вплоть до 20 мкМ.

Пример 18. Получение соединения 17



Получали агликон 17а из 9-дезоксо-8а-аза-8а-метил-8а-гомоэритромицина (Wilkening, 1993) с последующим гидролизом сахаров. Затем 17а подвергали биотрансформации штаммом, способным присоединять анголозамин к 3-гидроксилу (типа NCIMB 42718), и выделяли соединение 17 из ферментационного бульона стандартными методами.

Пример 19. Получение соединения 18



6-Дезоксиэритронолид В (6-DEV, 18a) подвергали биотрансформации штаммом, способным присоединять анголозамин к 3-гидроксилу (типа NCIMB 42718), и выделяли соединение 18 из ферментационного бульона стандартными методами.

Пример 20. Изучение действия комбинации ISC397 и ингибитора контрольной точки.

Мышей C57BL/6J приобретали в Charles River Laboratories, Germany. Мышам вводили подкожно в правый задний бок 1×10^6 клеток меланомы B16-F10 под изофлурановой анестезией.

Были следующие группы обработки (по 10 мышей в группе):

- 1) антитело против PD-1 (клон RMP 1-14 от Merck, Johnson, Roche или Astra, 200 мкг на 1 дозу) в дни 1, 3, 6, 9 и 12;
- 2) антитело против PD-1 (клон RMP 1-14 от Merck, Johnson, Roche или Astra, 200 мкг на 1 дозу) в дни 1, 3, 6, 9 и 12 + ISR397 (500 мкг на 1 дозу) каждый день до окончания эксперимента;
- 3) без обработки.

Все соединения вводили внутривенно. Каждый день измеряли объем опухолей, а состояние здоровья животных отмечали два раза в день. Животных забивали, если опухоли достигали 2 мл или если было плохое состояние здоровья. Эксперимент завершали на 18-й день, и всех мышей забивали путем смещения шейных позвонков.

Результаты представлены на фиг. 16-19.

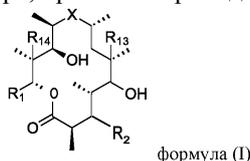
Список литературы

- Kieser et al., 2000. Practical Streptomyces Genetics. Published by the John Innes Foundation.
- Crawley et al. The influence of HIV on CD127 expression and its potential implications for ИЛ-7 therapy. *Semin. Immunol.* 2012 Jun, 24(3):231-40.
- Gaisser et al. Analysis of seven genes from the eryAI-eryK region of the erythromycin biosynthetic gene cluster in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.*, 1997 Oct, 256(3): 239-51.
- Gaisser et al. A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Micro.*, 2000, 36(2):391-401.
- Schell et al. Engineered biosynthesis of hybrid macrolide polyketides containing D-angolosamine и D-mycaminose moieties. *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 6:3315-3327.
- LeMahieu et al. Glycosidic cleavage reactions on erythromycin A. Preparation of Erythronolide A. *J. Med. Chem.*, 1974, 17(9):953-956.
- Djokic et al. Erythromycin Series. Part 13. Synthesis and structure elucidation of 10-dihydro-10-deoxo-11-methyl-11-azaerythromycin A. *J. Chem. Res. (S)*, 1988, 5:152-153.
- Glansdorp et al. Using chemical probes to investigate the sub-inhibitory effects of azithromycin. *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 208(6): 4120-4124.
- Rowe et al. Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes. *Gene* 1998 Aug 17, 216(1):215-23.
- Long et al. Engineering specificity of starter unit selection by the erythromycin-producing polyketide synthase. *Mol. Microbiol.* 2002 Mar, 43(5):1215-25.
- Wilkening et al. The synthesis of novel 8a-aza-8a-homoerythromycin derivatives via the Beckmann rearrangement of (9Z)-erythromycin A oxime. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1993, 3(6): 1287-1292.

Все ссылки, приведенные в изобретении, включая патенты и патентные заявки, включены сюда путем отсылок во всей полноте.

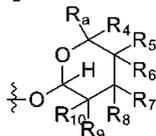
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Комбинация макролида и ингибитора контрольной точки иммунитета, предназначенная для использования в качестве иммуностимулятора, причем макролид имеет формулу (I)



формула (I)

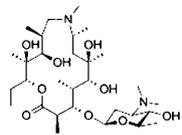
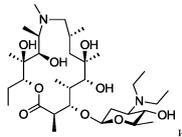
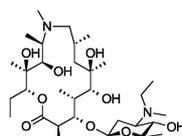
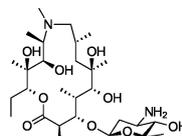
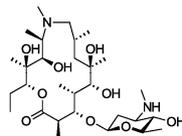
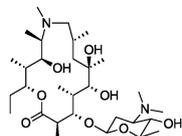
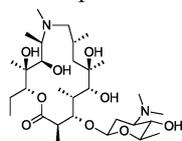
где X выбран из $-\text{NR}_3\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{NR}_3-$, а R_2 означает сахар формулы (II)



формула (II)

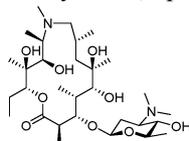
R_1 является C_1 - C_6 -алкилом, причем C_1 - C_6 -алкил выбран из C_1 - C_6 -алкильных групп, которые необязательно разветвлены;
 R_3 представляет собой Me;
 R_4 выбран из H и Me;
 R_a представляет собой H,
 причем R_5 представляет собой OH, R_6 представляет собой H, R_7 представляет собой $\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$ и R_8 , R_9 и R_{10} представляют собой H,
 причем R_{11} и R_{12} выбраны независимо из H и C_1 - C_6 -алкила;
 R_{13} представляет собой OH;
 R_{14} выбран из H и OH,
 или его фармацевтически приемлемая соль,
 причем ингибитор контрольной точки иммунитета нацелен на контрольную точку иммунитета, выбранную из связанного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4, также известен как CD152), белка 1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1, также известен как CD279), лиганда-1 PD-1 (PD-L1, также известен как B7-H1 и CD274), лиганда-2 PD-1 (PD-L2, также известен как B7-DC и CD-273), Т-клеточного мембранного белка 3 (TIM3, также известен как HAVcr2), аденозинового A2a-рецептора (A2aR), гена активации лимфоцитов 3 (LAG3, также известен как CD223), B7-H3 (также известен как CD276), B7-H4 (также известен как B7-S1, B7X и VCTN1), 2B4 (также известен как CD244), аттенюатора В- и Т-лимфоцитов (VTLA, также известен как CD272) и CMTM6.

2. Комбинация по п. 1, при этом макролид выбран из



или их фармацевтически приемлемых солей.

3. Комбинация по любому из предыдущих пунктов, при этом макролид представляет собой



либо его фармацевтически приемлемую соль.

4. Комбинация по любому из предыдущих пунктов, при этом ингибитор контрольной точки иммунитета выбран из ингибиторов CTLA4, ингибиторов PD-1, ингибиторов PD-L1, ингибиторов PD-L2, ингибиторов TIM3, ингибиторов A2aR, ингибиторов LAG3, ингибиторов B7-H3, ингибиторов B7-H4, ингибиторов 2B4, ингибиторов BTLA и ингибиторов CMTM6.

5. Комбинация по любому из предыдущих пунктов, при этом ингибитор контрольной точки иммунитета выбран из ипилимумаба, тремелимумаба, пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба, AMP-224, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, MDX-1105, IMP321, эноблитузумаба и MGD009.

6. Комбинация по п.5, при этом ингибитор контрольной точки иммунитета выбран из ипилимумаба, пембролизумаба, ниволумаба, атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

7. Комбинация по любому из предыдущих пунктов в виде двух фармацевтических композиций, причем одна композиция содержит макролид и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей, а другая композиция содержит ингибитор контрольной точки иммунитета и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей.

8. Комбинация по п.7, при этом две фармацевтические композиции предназначены для одного и того же или для разных способов введения.

9. Комбинация по п.1, предназначенная для лечения рака.

10. Комбинация по п.1, предназначенная для лечения вирусного заболевания.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая комбинацию по любому из пп.1-6 и один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей.

12. Применение фармацевтической композиции по п.11 для лечения рака или вирусного заболевания.

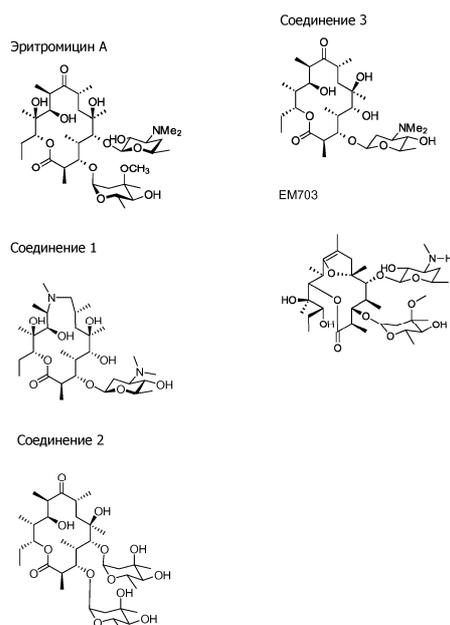
13. Применение фармацевтического набора, содержащего в одной упаковке:

i) первую композицию, содержащую макролид, где макролид соответствует определению, приведенному в любом из пп.1-3,

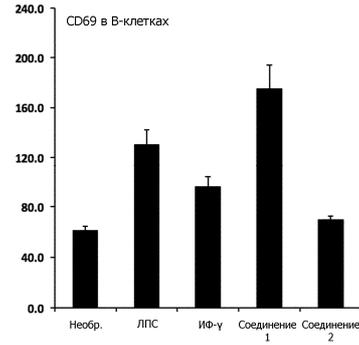
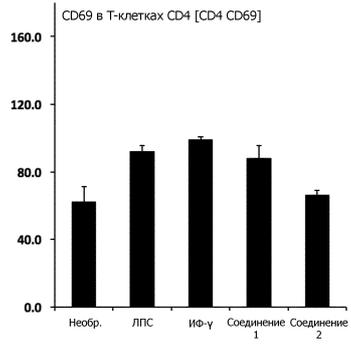
ii) вторую композицию, содержащую ингибитор контрольной точки иммунитета, где ингибитор контрольной точки иммунитета соответствует определению, приведенному в любом из пп.1, 4-6, и

iii) инструкции по применению,

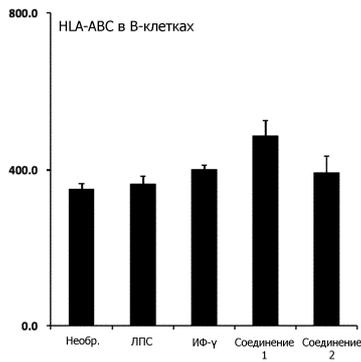
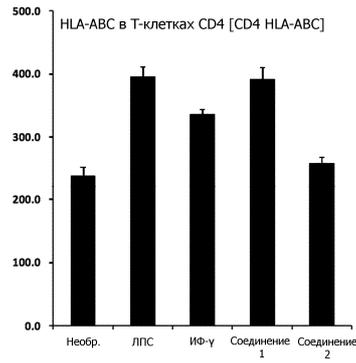
для лечения или профилактики рака.



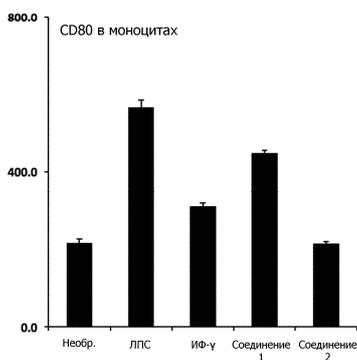
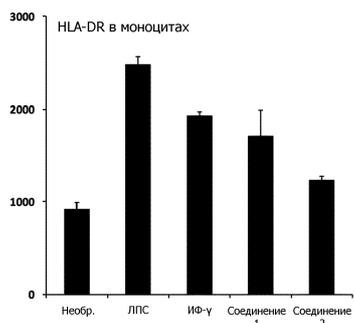
Фиг. 1



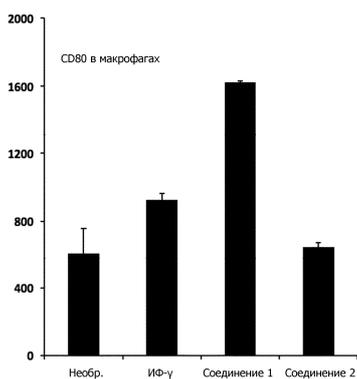
Фиг. 2



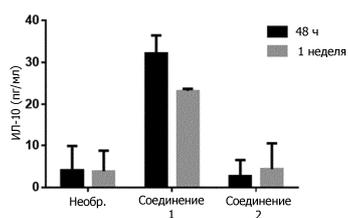
Фиг. 3



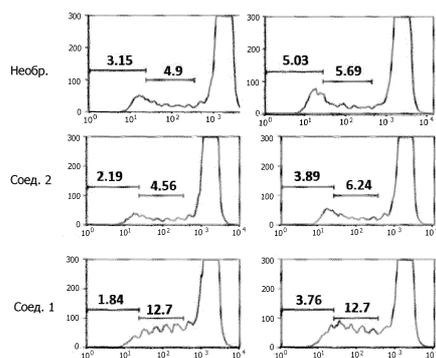
Фиг. 4



Фиг. 5

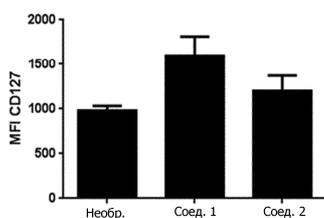
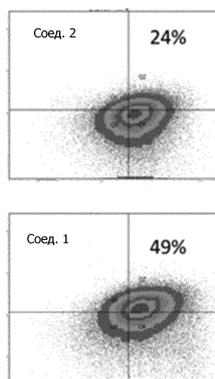


Фиг. 6

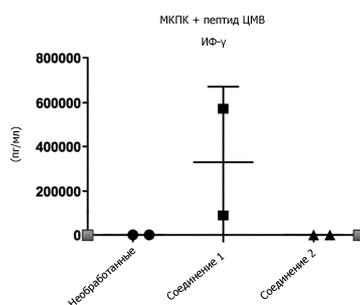


Фиг. 7

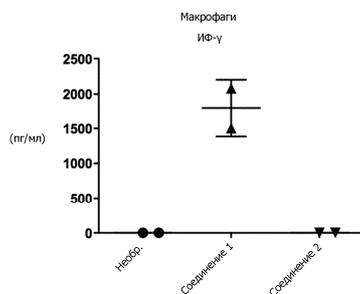
042613



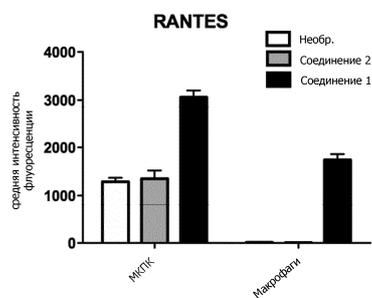
Фиг. 8



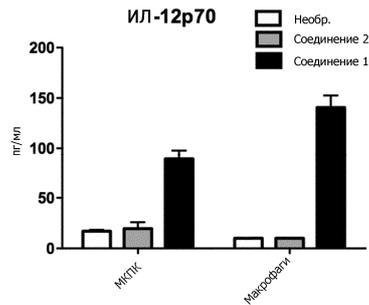
Фиг. 9



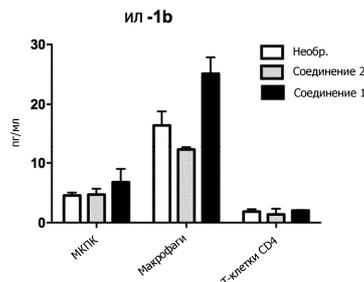
Фиг. 10



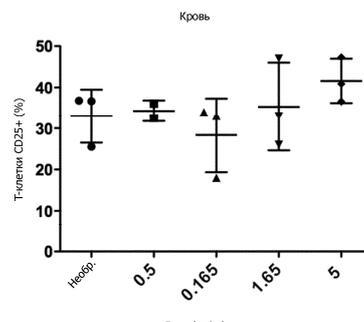
Фиг. 11



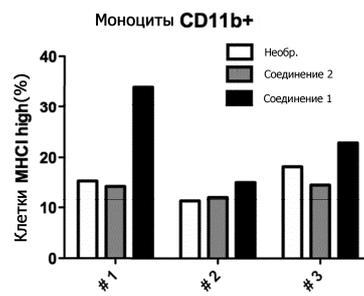
Фиг. 12



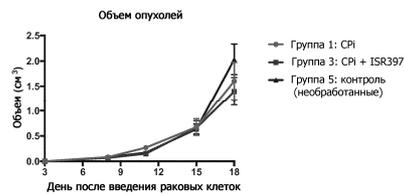
Фиг. 13



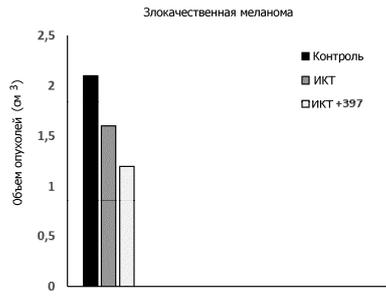
Фиг. 14



Фиг. 15

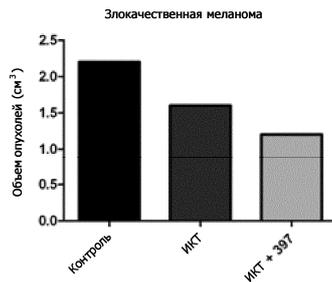


Фиг. 16



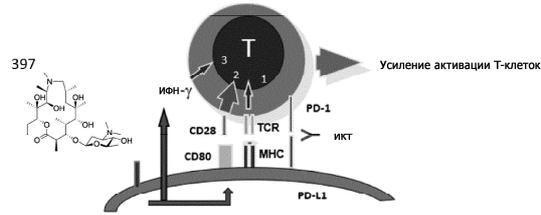
Фиг. 17

ISR397 + ингибитор контрольной точки против PD-1: лучшее подавление роста опухолей



Фиг. 18

ISR397 обеспечивает усиление сигналов 2 и 3 и тем самым усиливает эффект блокирования контрольной точки



Макрофаг
Фиг. 19