(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293050 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.27

(22) Дата подачи заявки
2021.04.02

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

(54) КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛА-ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА, ВКЛЮЧАЮЩИЕ АГОНИСТЫ STING

(31) **63/004,108; 63/040,755; 63/111,820**
(32) **2020.04.02; 2020.06.18; 2020.11.10**
(33) **US**
(62) **202292813; 2021.04.02**

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

(72) Изобретатель:
Дюваль Джереми Р., Бентли Кит В., Букхалид Рагида А., Сетинбас Нанье, Деймелин Марк И., Келлеэр Юджин В., Лауинджер Тимоти Б., Томас Джошуа Д., Тоадер Дорин, Сюй Лин, Ян Липин (US)

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

(57) В изобретении предложены каркасы и конъюгаты антитела-лекарственного средства (ADC), включающие стимулятор генов интерферона (STING). В изобретении также предложено применение таких ADC в лечении, например лечении рака.

202293050 A1

202293050 A1

КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛА-ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА, ВКЛЮЧАЮЩИЕ АГОНИСТЫ STING

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной заявке на патент США 63/004,108, поданной 2 апреля 2020 года, предварительной заявке на патент США 63/040,755, поданной 18 июня 2020 года и предварительной заявке на патент США 63/111,820, поданной 10 ноября 2020 года. Содержание каждой из этих заявок настоящим включено посредством отсылки во всей своей полноте.

ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ОТСЫЛКИ

[002] Содержание текстового файла под названием "MRSN-033_001WO_SeqList.txt", который был создан 31 марта 2021 года и имеет размер 49 КБ, настоящим включено посредством отсылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Стимулятор генов интерферона (STING) представляет собой рецептор в эндоплазматическом ретикулуме, который способствует врожденному иммунному восприятию цитозольной ДНК из патогенов и собственной ДНК. STING - белок, состоящий из 378 аминокислот, который содержит три основных структурных домена: (i) N-концевой трансмембранный домен (ак 1-154); (ii) центральный глобулярный домен (ак 155-341); и (iii) C-концевой хвост (ак 342-379). STING может образовывать симметричные димеры в сочетании со своими лигандами в V-образной конформации, при этом он не покрывает полностью связанные лиганды. Агонист STING может связываться с областью кармана STING. Однако процесс активации STING легко ингибируется при некоторых тяжелых заболеваниях, что приводит к инактивации пути STING. Таким образом, скрининг и разработка мощных агонистов STING имеет большое значение для иммунотерапии рака и лечения других инфекционных заболеваний, включая, помимо прочего, ожирение, повреждение печени, сахаро-липидный обмен и вирусную инфекцию. Специфичный таргетинг иммунных путей открывает возможности для терапии рака, потенциально предлагая более высокую специфичность, чем терапевтические подходы, основанные на популяциях клеток.

[004] Конъюгаты антитела-лекарственного средства (ADC) состоят из лекарственного средства, такого как малая молекула, ковалентно связанная с антителом. Антитело представляет собой механизм таргетинга, направленный на конкретный участок воздействия. Достигнув такого участка, ADC обеспечивает высвобождение малой молекулы, лекарственного средства, что позволяет ему выполнять свою заданную функцию направленным образом, в отличие от системной диффузии по всему организму субъекта. Такой направленный подход позволяет проводить лечение лекарственным средствами, которые в ином случае потребовали бы настолько высоких доз, что они были

бы токсичными при системном введении.

[005] Ключевой особенностью врожденной иммунной системы является распознавание и элиминирование чужеродных веществ. Идентификация этих патогенных возбудителей происходит путем распознавания хозяином эволюционно консервативных микробных структур, известных как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP). Распознавание хозяином может происходить несколькими путями, такими как активация рецепторов распознавания паттерна (PRR), которые в конечном итоге приводят к событиям нижестоящей сигнализации и завершаются развитием иммунного ответа.

[006] Конъюгаты антитела-лекарственного средства согласно настоящему изобретению модулируют активность STING и, таким образом, могут оказывать благоприятное терапевтическое воздействие при лечении заболеваний, нарушений и/или состояний, при которых эффективна модуляция STING (стимулятора генов интерферона), включающих, без ограничения, воспаление, аллергические и аутоиммунные заболевания, инфекционные заболевания, рак, предраковые синдромы, а также в качестве адъювантов вакцин. Сохраняется потребность в новых иммунотерапевтических средствах для лечения заболеваний, в частности рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен конъюгат Формулы (I):

$PBRM\text{-}[A^1\text{-}(L^C)_{0\ или\ 1}\text{-}D]d_{15}$ (I)

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где:

PBRM обозначает молекулу распознавания на основе белка;

L^C, в случае присутствия, является линкерной единицей;

A^1 представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую PBRM с L^C, когда L^C присутствует, или с D, когда L^C отсутствует;

D представляет собой молекулу лекарственного средства агониста STING; и

d_{15} представляет собой целое число в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 20.

[008] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен каркас, который может применяться для конъюгирования с PBRM, где каркас имеет Формулу (II):

$A^{1'}\text{-}(L^C)_{0\ or\ 1}\text{-}D$ (II)

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где:

PBRM обозначает молекулу распознавания на основе белка;

L^C, в случае присутствия, является линкерной единицей;

$A^{1'}$ представляет собой моновалентный линкерный фрагмент, включающий функциональную группу, способную образовывать ковалентную связь с функциональной группой PBRM;

D представляет собой молекулу лекарственного средства агониста STING; и

d_{15} представляет собой целое число в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 20.

[009] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, включающая конъюгат, описанный в настоящем документе, и один или больше фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

[010] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен способ активации или повышения активности стимулятора интерфероновых генов (STING) у субъекта, включающий введение субъекту конъюгата, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

[011] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен способ предупреждения или лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

[012] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен конъюгат, описанный в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемая соль для активации или повышения активности STING у субъекта.

[013] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен конъюгат, описанный в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемая соль для предупреждения или лечения заболевания или нарушения у субъекта.

[014] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложено применение конъюгата, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного препарата для активации или повышения активности STING у субъекта.

[015] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложено применение конъюгата, описанного в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного препарата для предупреждения или лечения заболевания или нарушения у субъекта.

[016] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно известно среднему специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В описании формы единственного числа также включают множественное число, если из контекста прямо не следует иное. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие источники, указанные в настоящем документе, включены посредством отсылки. Источники, цитируемые в настоящем документе, не составляют предшествующий уровень техники по отношению к заявленному изобретению. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются лишь иллюстративными и не рассматриваются в качестве ограничения. В случае конфликта между химическими структурами и названиями

соединений, раскрытых в настоящем документе, химические структуры будут иметь преимущественную силу.

[017] Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[018] На **ФИГ. 1A** представлена зависимость конфлюентности красных объектов от времени для Конъюгата **8b-1** и Конъюгата **8f** (каждого в концентрации 100, 10 и 1 нМ) и Конъюгата **8c-1** и Соединения **1** (каждого в концентрации 100 и 10 нМ) (концентрации конъюгатой основаны на полезной нагрузке).

[019] На **ФИГ. 1B** представлена зависимость конфлюентности красных объектов от времени для Конъюгата **8l** и Соединения **1** (каждого в концентрации 100, 10 и 1 нМ) и Конъюгата **8m** (100 нМ) (концентрации конъюгатов основаны на полезной нагрузке).

[020] На **ФИГ. 2** показаны CD14-/CD3+ клетки в популяциях МКПК, обогащенных моноцитов и CD16-истощенных моноцитов.

[021] На **ФИГ. 3A** и **ФИГ. 3B** представлена зависимость конфлюентности красных объектов от времени и показан лизис STING дикого типа (sgNT-2) и нокаутных (sg#3-2) SKBR3 NucRed клеток, соответственно, при воздействии МКПК для Конъюгата **8a-3**, Конъюгата **8j**, Конъюгата **8c-2** и Соединения **1**, каждого в концентрации 100, 25, 5 и 1 нМ (концентрации конъюгатов основаны на полезной нагрузке).

[022] На **ФИГ. 4A** представлена зависимость конфлюентности красных объектов от дозозависимого ответа Конъюгата **8a-3**, Конъюгата **8-j**, трастузумаба-Fc дикого типа и трастузумаба-AAG Fc мутанта для цитотоксической активности в отношении раковых клеток SKBR3 со STING дикого типа в сокультурах раковых клеток SKBR3/МКПК.

[023] На **ФИГ. 4B** представлена зависимость конфлюентности красных объектов от дозозависимого ответа Конъюгата **8a-3**, Конъюгата **8-j**, трастузумаба-Fc дикого типа и трастузумаба-AAG Fc мутанта для цитотоксической активности в отношении раковых клеток SKBR3 с нокаутом STING в сокультурах раковых клеток SKBR3/МКПК.

[024] На **ФИГ. 5A** представлена зависимость изменения конфлюентности красных объектов для раковых клеток OVCAR3-NucRed от времени под действием МКПК для Конъюгата **8b-1** и Соединения **1** при 20 и при 4 нМ (концентрация конъюгата основана на концентрации полезной нагрузки).

[025] На **ФИГ. 5B** представлена зависимость изменения конфлюэнтности красных объектов для раковых клеток OVCAR3-NucRed от времени обогащенными моноцитами для конъюгата **8b-1** и Соединения **1** 20 и при 4 нМ (концентрация конъюгата основана на концентрации полезной нагрузки).

[026] На **ФИГ. 5C** представлена зависимость изменения конфлюэнтности красных объектов для раковых клеток OVCAR3-NucRed от времени под действием CD16-истощенных моноцитов для Конъюгата **8b-1** и Соединения **1** при 20 и при 4 нМ (концентрация конъюгата основана на концентрации полезной нагрузки).

[027] **ФИГ. 6** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая

эффективность трастузумаба (3/0 мг/кг), агониста STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгата **8c-1** (1/0,04 мг/кг или 3/0,12 мг/кг), Конъюгата **8a-1** (1/0,03 мг/кг или 3/0,09 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в ксенотрансплантатной модели SKOV3 на мышах.

[028] На **ФИГ. 7A-7H** показаны уровни цитокинов - мышиного CXCL-10 (IP-10; **ФИГ. 7A**), IL-6 (**ФИГ. 7B**), ФНОα (**ФИГ. 7C**), IFNγ (**ФИГ. 7D**), CXCL1 (KC) (**ФИГ. 7E**), MIG (**ФИГ. 7F**), MIP-1a (**ФИГ. 7G**) и RANTES (**ФИГ. 7H**), в зависимости от времени после введения агониста STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгата **8c-1** (3/0,12 мг/кг) или Конъюгата **8a-1** (3/0,09 мг/кг) (все дозы указаны по антителу/полезной нагрузке) в мышиной модели SKOV3. Вставки на каждом графике указывают уровни цитокинов, индуцированные Конъюгатом **8a-1** и Конъюгатом **8c-1** в сравнении с носителем.

[029] На **ФИГ. 8A-8C** показаны уровни мРНК мышиного CXCL10 (**ФИГ. 8A**), Интерферона-β (**ФИГ. 8B**) и IL-6 (**ФИГ. 8C**) в ксенотрансплантатной модели SKOV3 на мышах через 12 ч и 72 ч после введения Конъюгата **8c-1** (3/0,12 мг/кг), Конъюгата **8a-1** (3/0,09 мг/кг), Конъюгата **8c-1** (3/0,12 мг/кг) или Конъюгата **8a-1** (3/0,09 мг/кг) (все дозы указаны по антителу/полезной нагрузке).

[030] **ФИГ. 9** представляет собой иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание на CD45 кроличьим моноклональным антителом против CD45 через 12 и 72 часа для Конъюгата **8a-1** (3/0,09 мг/кг), Конъюгата **8c-1** (3/0,12 мг/кг) или носителя.

[031] **ФИГ. 10** представляет собой график, на котором показаны концентрации общего антитела и конъюгированного лекарственного средства в циркулирующей плазме после введения Конъюгата **8a-1** (3/0,1 мг/кг) (доза приведена по антителу/полезной нагрузке) мышам CB.17 SCID.

[032] На **ФИГ. 11** показано действие нейтрализующих антител IFNλ1 (IL29) или IFNλ2 (IL28A) (10, 2, 0,4, 0,08 мкг/мл) в отношении цитотоксической активности Конъюгата **8a-3** (1 нМ или 0,1 нМ, в зависимости от полезной нагрузки) в сокультурах раковых клеток и МКПК.

[033] **ФИГ. 12** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность агониста STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгата **8c-1** (3/0,12 мг/кг), Конъюгата **8b-1** (3/0,09 мг/кг) или Конъюгата **8f** (3/0,12 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в ксенотрансплантате OVCAR3 у мыши.

[034] **ФИГ. 13** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **8d-2** (3/0,1 мг/кг) или Конъюгата **8e** (3/0,1 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в ксенотрансплантате OVCAR3 у мыши.

[035] **ФИГ. 14** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность агониста STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгата **8c-1** (1/0,04 мг/кг) или Конъюгата **8h** (1/0,04 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в ксенотрансплантате трижды негативного рака молочной железы у мышей.

[036] **ФИГ. 15A** представляет собой график, на котором показана

противоопухолевая эффективность Конъюгата **8d-3** (1/0,04 мг/кг) или Конъюгата **8g** (0,88/0,04 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в модели рака толстой кишки на сингенных мышах.

[037] На **ФИГ. 15B** показаны кривые выживаемости Каплана-Мейера для Конъюгата **8d-3** (1/0,04 мг/кг) или Конъюгата **8g** (0,88/0,04 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в модели рака толстой кишки на сингенных мышах.

[038] **ФИГ. 16A** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **8g** (0,9/0,04 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) у отдельных мышей в модели рака толстой кишки на сингенных мышах.

[039] **ФИГ. 16B** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **8g** (0,9/0,04 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) при повторном введении сингенных мышиных клеток рака толстой кишки.

[040] **ФИГ. 16C** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **8g** (0,9/0,04 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) при повторном введении сингенных мышиных клеток рака легкого.

[041] **ФИГ. 17** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность агониста STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгата **8d-3** (5,5/0,18 мг/кг) или Конъюгата **8i** (3,2/0,18 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в сингенной мышиной эмбриональной модели рака.

[042] **ФИГ. 18** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **20a** (3/0,09 мг/кг), Конъюгата **34a** (3/0,11 мг/кг), Конъюгата **34** (3/0,11 мг/кг) или Конъюгата **20-1** (3/0,10 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в ксенотрансплантате SKOV3 у мыши.

[043] **ФИГ. 19** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **28** (0,3/0,01 мг/кг или 1/0,03 мг/кг), Конъюгата **29** (0,2/0,01 мг/кг или 0,8/0,02 мг/кг), Конъюгата **8-2** (0,3/0,01 мг/кг или 1/0,04 мг/кг), Конъюгата **25** (0,3/0,01 мг/кг или 1/0,04 мг/кг) или Конъюгата **45** (0,3/0,01 мг/кг или 1/0,04 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в ксенотрансплантате SKOV3 у мыши.

[044] **ФИГ. 20** - график, на котором показана противоопухолевая эффективность агониста STING diABZI (1,5 мг/кг q3dx3 или 0,128 мг/кг qdx1), Соединения **30** (1,5 мг/кг q3dx3 или 0,128 мг/кг qdx1), Конъюгата **32b-2** (3,42/0,128 мг/кг qdx1), XMT-1519 (3,00 мг/кг qdx1), Конъюгата **32-5** (0,100/0,004, 0,300/0,013, 1,00/0,042 или 3,00/0,128 мг/кг qdx1), Конъюгата **32e** (1,00/0,039 или 3,00/0,117 мг/кг qdx1)) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в ксенотрансплантате SKOV3 у мыши.

[045] **ФИГ. 21A** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **8d-3** (1/0,04 мг/кг) или Конъюгата **8k**

(0,9/0,04 мг/кг) в модели на сингенных мышах.

[046] На **ФИГ. 21B** показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **8d-3** (1/0,04 мг/кг) в модели на сингенных мышах у отдельных мышей.

[047] На **ФИГ. 21C** показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **8k** (0,9/0,04 мг/кг) в модели на сингенных мышах у отдельных мышей.

[048] **ФИГ. 22** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **8c-2** (3,17/0,10 мг/кг), Конъюгата **8a-2** (2,7/0,10 мг/кг или 0,81/0,03 мг/кг), Конъюгата **8j** (2,71/0,10 мг/кг или 0,81/0,03 мг/кг) или агониста STING diABZI IV (0/5 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в ксенотрансплантате SKOV3 у мыши.

[049] **ФИГ. 23** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **32b-1** (3,39/0,10 мг/кг), Конъюгата **32a** (0,93/0,03 или 3,12/0,10 мг/кг), Конъюгата **32c** (2,12/0,10 мг/кг), Конъюгата **32d** (2,20/0,10 мг/кг) или агониста STING diABZI IV (0/5 мг/кг) (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке) в ксенотрансплантате OVCAR3 у мыши.

[050] **ФИГ. 24** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность комбинации ADC ритуксимаба AF-HPA (0,75/0,023 мг/кг) и Конъюгата **8c-2** (4,0/0,126 мг/кг); ADC XMT-1535 AF-HPA (0,75/0,024 мг/кг); Конъюгата **8b-2** (2,0/0,071 или 4,0/0,142 мг/кг); комбинации ADC XMT-1535 AF-HPA (0,75/0,024 мг/кг) и Конъюгата **8c-2** (4,0/0,126 мг/кг); комбинации ADC ритуксимаба AF-HPA (0,75/0,023 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (4,0/0,142 мг/кг); комбинации ADC ритуксимаба AF-HPA (0,75/0,023 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (2,0/0,071 мг/кг); комбинации ADC XMT-1535 AF-HPA (0,75/0,024 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (4,0/0,142 мг/кг); комбинации ADC XMT-1535 AF-HPA (0,75/0,024 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (2,0/0,071 мг/кг); комбинация ADC XMT-1535 AF-HPA (0,75/0,024 мг/кг) и XMT-1535 (4,0/0 мг/кг); или XMT-1535 (4,75/0 мг/кг) в ксенотрансплантате OVCAR3 у мыши.

[051] **ФИГ. 25** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность Конъюгата **32b** (0,85/0,03 мг/кг), Конъюгата **32-2** (0,90/0,03 мг/кг), Конъюгата **88** (0,87/0,03 мг/кг), Конъюгата **85** (2,87/0,03 мг/кг). /0,10 мг/кг), Конъюгата **92** (2,36/0,10 мг/кг), Конъюгата **100** (2,23/0,10 мг/кг), Конъюгата **89** (0,99/0,030 мг/кг), Конъюгата **85a** (2,59/0,10 мг/кг), Конъюгата **93** (2,85/0,10 мг/кг) или Конъюгата **101** (2,70/0,10 мг/кг) в модели ксенотрансплантата SKOV3 у мыши.

[052] **ФИГ. 26** представляет собой график, на котором показана противоопухолевая эффективность носителя, Конъюгата **28** (0,99/0,0325 мг/кг) или Конъюгата **62** (0,92/0,0325 мг/кг) в модели ксенотрансплантата SKOV3 у мыши.

[053] **ФИГ. 27** представляет собой график, на котором показаны концентрации конъюгированного лекарственного средства в циркулирующей плазме после введения Конъюгата **28** (3,0/0,10 мг/кг) или Конъюгата **62** (2,84/0,10 мг/кг) (доза приведена в виде антитела/полезной нагрузки) мышам CB.17 SCID.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[054] В настоящем изобретении предложены новые конъюгаты антитела-лекарственного средства, способы синтеза для получения таких конъюгатов или каркасов, фармацевтические композиции, содержащие их, а также различные применения конъюгатов.

Определения

[055] Химические названия, представленные для промежуточных соединений и/или соединений согласно изобретению, описанных в настоящем документе, могут относиться к любой из таутомерных форм таких соединений (в некоторых случаях такие альтернативные названия представлены вместе с экспериментальными). Следует понимать, что любая ссылка на названное соединение (промежуточное соединение или соединение согласно изобретению) или структурно изображенное соединение (промежуточное соединение или соединение согласно изобретению) охватывает все таутомерные формы, включая цвиттерионные формы таких соединений и любые их смеси.

[056] Следует понимать, что термины "В некоторых вариантах осуществления", "В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения" и "В некоторых вариантах осуществления соединения согласно настоящему изобретению" могут использоваться взаимозаменяемо, в соответствующих случаях.

[057] Термин "приблизительно", "примерно" или "приближенный" при использовании в сочетании с числовым значением означает, что включен набор или диапазон значений. В некоторых вариантах осуществления "приблизительно X" включает диапазон значений, которые составляют ±25%, ±20%, ±15%, ±10%, ±5%, ±2%, ±1%, ±0,5%, ±0,2% или ±0,1% от X, где X является числовым значением. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые на 5% больше или меньше указанного значения. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые на 2% больше или меньше указанного значения. В некоторых вариантах осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые на 1% больше или меньше указанного значения.

[058] Перечисление диапазонов значений предназначено просто для использования в качестве сокращенного метода ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если в настоящем документе не указано иное, при этом каждое отдельное значение включено в настоящее описание, как если бы оно было отдельно указано в настоящем документе. Диапазон при использовании в настоящем документе, если не указано иное, включает две границы такого диапазона. В некоторых вариантах осуществления оба выражения "x представляет собой целое число от 1 до 6" и "x представляет собой целое число от 1 до 6" означают "x равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6", т.е. термины "от X до Y" и "диапазон от X до Y" включают X и Y, а также целые числа между ними.

[059] Термин "антитело" в настоящем документе используется в самом широком

смысле и охватывает различные структуры антител, включающие, без ограничения ими, моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, если они проявляют требуемую антигенсвязывающую активность. Нумерация аминокислот антител соответствует EU индексу Кэбата (см. Kabat, E.A., et al., Sequences of Protein of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)).

[060] Термин "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличающейся от интактного антитела, которая включает часть интактного антитела и которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения перечисленными, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифичные антитела, полученные из фрагментов антител.

[061] Термин "антитело, которое связывается с тем же эпитопом", что и референсное антитело, при использовании в настоящем документе относится к антителу, которое блокирует связывание референсного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или больше, и наоборот, референсное антитело блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или больше. Иллюстративный конкурентный анализ представлен в настоящем документе.

[062] Термин "класс" антитела относится к типу константного домена или константной области, который имеет содержащая ее тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, причем некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на субклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA^1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α, δ, ε, γ и μ соответственно.

[063] Термин "моноклональное антитело" при использовании в настоящем документе относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны и/или связывают один и тот же эпитоп, за исключением возможных вариантных антител, например, содержащих природные мутации или мутации, возникающие при получении препарата моноклонального антитела, причем такие варианты обычно присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело в препарате моноклонального антитела направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, определение "моноклональный" указывает на признак, что антитело получено из по существу из гомогенной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными способами, включающими, без ограничения, метод гибридом, метод рекомбинантных ДНК, методы

фагового дисплея и методы с применением трансгенных животных, содержащих все или часть человеческих локусов иммуноглобулинов, при этом такие способы и другие иллюстративные способы получения моноклональных антител описаны в настоящем документе.

[064] Термин "эпитоп" относится к конкретному участку на молекуле антигена, с которым связывается антитело.

[065] Термин "молекула распознавания на основе белка" или "PBRM" относится к молекуле, которая распознает и связывается с маркером или рецептором клеточной поверхности, таким как трансмембранный белок, иммобилизованный на поверхности белок или протеогликан. В некоторых вариантах осуществления PBRM содержит цистеин, введенный с помощью методов генной инженерии. Примеры PBRM включают, без ограничения, антитела, пептиды, липокалины, белки, пептиды или пептидомиметики и т.п. Молекула распознавания на основе белка, помимо направления конъюгата на конкретную клетку, ткань или место, также может оказывать некоторое терапевтическое действие, такое как антипролиферативную (цитостатическую и/или цитотоксическую) активность в отношении клетки-мишени или пути. Молекула распознавания на основе белка включает или может быть сконструирована таким образом, чтобы включать по меньшей мере одну химически реакционноспособную группу, такую как -COOH, первичный амин, вторичный амин -NHR, -SH или химически реакционноспособный аминокислотный остаток или боковые цепи, такие как, например, тирозин, гистидин, цистеин или лизин. В некоторых вариантах осуществления PBRM может быть лигандом (LG) или направляющей группой, которая специфично связывается или образует комплекс с молекулой клеточной поверхности, такой как рецептор клеточной поверхности или антиген, для данной популяции клеток-мишеней. После специфического связывания или образования комплекса лиганда с его рецептором клетка может захватывать лиганд или конъюгат лиганда-лекарственного средства, который затем интернализуется в клетку. При использовании в настоящем документе лиганд, который "специфично связывается или образует комплекс" или "направленно взаимодействует" с молекулой клеточной поверхности, предпочтительно связывается с молекулой клеточной поверхности за счет межмолекулярных сил. В некоторых вариантах осуществления лиганд может предпочтительно связываться с молекулой клеточной поверхности с Kd меньше чем приблизительно 50 нМ, меньше чем приблизительно 5 нМ или меньше чем 500 пМ. Методы измерения аффинности связывания лиганда с молекулой клеточной поверхности хорошо известны; например, один из подходящих методов называется поверхностным плазмонным резонансом (SPR). В некоторых вариантах осуществления лиганд используется для направленной доставки и не оказывает заметного терапевтического

действия отдельно от лекарственного средства, которое он доставляет. В некоторых вариантах осуществления лиганд действует как направляющий компонент и как терапевтическое или иммуномодулирующее средство (например, для усиления активности активного лекарственного средства или пролекарства). При использовании в настоящем документе термин "единица ПЭГ" относится к субъединице полиэтиленгликоля, имеющей формулу . В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает несколько субъединиц ПЭГ.

[066] Термин "алкил" при использовании в настоящем документе представляет собой насыщенную, линейную или разветвленную углеводородную группу, содержащую определенное число атомов углерода. Термин "C_1-C_6 алкил" или "C_{1-6} алкил" относится к метильной группе или нормальной или разветвленной алкильной группе, содержащей от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкилов включают, без ограничения, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, пентил и гексил.

[067] Термин "галоген(алкил)" при использовании в настоящем документе представляет собой насыщенную, нормальную или разветвленную углеводородную группу, содержащую определенное число (n) атомов углерода и один или больше (до 2n+1) атомов галогена. Примеры "галоген(C_{1-4} алкильных)" групп включают, без ограничения, $-CF_3$ (трифторметил), $-CCl_3$ (трихлорметил), 1,1-дифторэтил, 2,2,2-трифторэтил и гексафторизопропил.

[068] Термин "алкенил" при использовании в настоящем документе относится к углеводородной группе с нормальной или разветвленной цепью, содержащей определенное число атомов углерода и по меньшей мере от 1 до 3 углерод-углеродных двойных связей. Примеры включают этенил и пропенил.

[069] Термин "алкинил" при использовании в настоящем документе относится к углеводородной группе с нормальной или разветвленной цепью, содержащей определенное число атомов углерода и по меньшей мере 1 и до 3 тройных углерод-углеродных связей. Примеры включают этинил и пропинил.

[070] Термин "алкокси-" или "(алкил)окси-" при использовании в настоящем документе относится к "алкил-окси-" группе, включающей алкильную группу, содержащую определенное число атомов углерода, присоединенную через соединительный атом кислорода. Примеры "C_{1-4} алкокси-" или "(C_{1-4} алкил)окси-" групп включают, без ограничения, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, втор-бутокси и трет-бутокси.

[071] Термин "галоген(алкокси)-" при использовании в настоящем документе представляет собой насыщенную углеводородную группу с нормальной или разветвленной цепью, содержащую определенное число (n) атомов углерода и один или больше (до 2n+1) атомов галогена, присоединенную через соединительный атом кислорода. Примеры "галоген(C_{1-4} алкокси)-" групп включают, без ограничения, $-OCHF_2$

(дифторметокси), $-OCF_3$ (трифторметокси), $-OCH_2CF_3$ (трифторэтокси) и $-OCH(CF_3)_2$ (гексафторизопропокси).

[072] Термин "амино" при использовании в настоящем документе относится к заместителю, включающему по меньшей мере один атом азота. В частности, в термин "амино" включены NH_2, $-NH(C_{1-4}$ алкил), алкиламино или (C_{1-4} алкил)амино- или (C_{1-4} алкил)(C_{1-4} алкил)амино- или диалкиламино, амид-, карбамид-, мочевина и сульфамидные заместители.

[073] Термин "карбоциклическая группа или остаток" при использовании в настоящем документе относится к циклической группе или остатку, где члены кольца представляют собой атомы углерода, которая может быть насыщенной, частично ненасыщенной (неароматической) или полностью ненасыщенной (ароматической).

[074] Термин "циклоалкил" при использовании в настоящем документе относится к неароматической, насыщенной углеводородной кольцевой группе, содержащей определенное число атомов углерода в кольце. Например, термин "C_{3-6} циклоалкил" относится к циклической группе, содержащей от трех до шести атомов углерода в кольце. Примеры "C_{3-6} циклоалкильных" групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

[075] Термин "арил" при использовании в настоящем документе относится к группе с ароматичностью, включая "сопряженные" или мультициклические системы с одним или больше ароматическими кольцами, которые не содержат гетероатома в кольцевой структуре. Термин "арил" включает одновалентные и двухвалентные группы. Примеры арильных групп включают, без ограничения, фенил, бифенил, нафтил и т.п. В некоторых вариантах осуществления арил представляет собой фенил.

[076] Термин "гетероциклическая группа или остаток" при использовании в настоящем документе относится к циклической группе или остатку, имеющим в качестве членов кольца атомы по меньшей мере двух разных элементов, причем циклическая группа или остаток могут быть насыщенными, частично ненасыщенными (неароматическими) или полностью ненасыщенными (ароматическими).

[077] Термин "гетероатом" при использовании в настоящем документе относится к атому азота, серы или кислорода, например, атому азота или атому кислорода.

[078] Термин "гетероциклоалкил" при использовании в настоящем документе относится к неароматической, моноциклической или бициклической группе, включающей 3-10 атомов в кольце и включающей один или больше (обычно один или два) гетероатомов в кольце, независимо выбранных из кислорода, серы и азота. Положением присоединения гетероциклоалкильной группы может быть любой подходящий атом углерода или азота.

[079] Термин "гетероарил" при использовании в настоящем документе относится к ароматической моноциклической или бициклической группе, включающей от 5 до 10 атомов в кольце, включая от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, где по меньшей мере часть группы является ароматической. Например,

данный термин охватывает бициклические гетероциклические арильные группы, включающие либо фенильное кольцо, сконденсированное с гетероциклической группой, либо гетероарильное кольцо, сконденсированное с карбоциклической группой. Положением присоединения гетероарильной группы может быть любой подходящий атом углерода или азота.

[080] Термины "галоген" и "гало" при использовании в настоящем документе относятся к радикалу галогена, например, к заместителю фтору, хлору, брому или иоду.

[081] Термин "оксо" при использовании в настоящем документе относится к кислородсодержащей группе с двойной связью; например, если она присоединена непосредственно к атому углерода, образуется карбонильная группа (C=O).

[082] Термин "гидрокси" или "гидроксил" при использовании в настоящем документе служит для обозначения радикала -OH.

[083] Термин "циано" при использовании в настоящем документе относится к нитрильной группе, -C≡N.

[084] Термин "необязательно замещенный" при использовании в настоящем документе указывает, что группа (такая как алкильная, циклоалкильная, алкокси, гетероциклоалкильная, арильная или гетероарильная группа) или кольцо, или остаток могут быть незамещенными, или группа, кольцо или остаток могут быть замещены одним или более заместителями. В случае, когда группы могут быть выбраны из ряда альтернативных групп, выбранные группы могут быть одинаковыми или разными. Подходящие заместители могут включать, например, алкил, алкенил, алкинил, галоген, гидроксил, алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, алкоксикарбонилокси, арилоксикарбонилокси, карбоксилат, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, фосфат, фосфонато, фосфинато, амино (в том числе алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (в том числе алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрил, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонато, сульфамоил, сульфонамидо, нитро, трифторметил, циано, азидо, гетероциклил, алкиларил или ароматический или гетероароматический остаток.

[085] Термин "независимо" при использовании в настоящем документе означает, что в случае, когда больше одного заместителя выбраны из ряда возможных заместителей, эти заместители могут быть одинаковыми или разными.

[086] Термин "фармацевтически приемлемый" при использовании в настоящем документе относится к таким соединениям, конъюгатам, материалам, композициям и лекарственным формам, которые, в рамках обоснованного врачебного мнения, подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения или другой проблемы или осложнения, соизмеримых с разумным соотношением пользы/риска.

[087] При использовании в настоящем документе термин "лечение" или "лечить"

описывает тактику ведения и уход за пациентом с целью борьбы с заболеванием, состоянием или нарушением и включает введение соединения согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли, полиморфной формы или сольвата для облегчения симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения или для устранения заболевания, состояния или нарушения. Термин "лечить" также может включать обработку клетки in vitro или животной модели.

[088] При использовании в настоящем документе термин "предупреждение", "предотвращать" или "защищающий от" описывает уменьшение или устранение появления симптомов или осложнений такого заболевания, состояния или нарушения.

[089] Термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, наиболее предпочтительно человеку, который являлся объектом лечения, наблюдения или эксперимента.

[090] Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного соединения или фармацевтического средства, включая конъюгат согласно изобретению, который вызывает биологический или медицинский ответ в тканевой системе животного или человека, который необходим исследователю, ветеринару, врачу или другому медработнику, и который включает облегчение или частичное облегчение симптомов заболевания, синдрома, состояния или нарушения, подвергаемого лечению.

[091] Терапевтически "эффективное количество" подразумевает такое количество конъюгата, которое при введении пациенту, нуждающемуся в таком лечении, является достаточным для эффективного лечения или предупреждения, как определено в настоящем документе. Количество данного конъюгата, которое будет соответствовать такому количеству, будет изменяться в зависимости от таких факторов, как конкретный конъюгат (например, активность (pIC50), эффективность (EC50) и биологический период полувыведения конкретного конъюгата), патологическое состояние и его тяжесть, индивидуальные характеристики (например, возраст, размер и вес) пациента, нуждающегося в лечении, однако, тем не менее, может быть определено стандартным способом специалистом в данной области. Аналогичным образом, продолжительность лечения и период введения (период между дозами и время введения доз, например, до/во время/после еды) конъюгата будут изменяться в зависимости от индивидуальных характеристик млекопитающего, нуждающегося в лечении (например, веса), конкретного конъюгата и его свойств (например, фармакокинетических свойств), заболевания или нарушения и его тяжести, а также конкретной композиции и используемого способа, однако, тем не менее, может быть определено специалистом в данной области.

[092] Термин "композиция" относится к продукту, который включает указанные ингредиенты в терапевтически эффективных количествах, а также к любому продукту, полученному напрямую или не напрямую из комбинаций указанных ингредиентов в указанных количествах.

[093] При использовании в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" означает вспомогательное вещество, которое

может использоваться при изготовлении фармацевтической композиции, которое в целом является безопасным, нетоксичным и не оказывает ни биологического, ни иного нежелательного воздействия, и включает вспомогательное вещество, подходящее для применения в ветеринарии, а также для фармацевтического медицинского применения. "Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" при использовании в описании и формуле изобретения, включает одно и больше одного такого вспомогательного вещества.

[094] Термин "агонист STING" при использовании в настоящем документе относится к соединению или фрагменту, способному взаимодействовать с STING, например, при связывании со STING и/или путем индукции нижестоящей сигнальной трансдукции (например, характеризуемой активацией молекул, ассоциированных с функцией STING). Это включает прямое фосфорилирование STING, IRF3 и/или NF-kB, и также может включать STAT6. В некоторых вариантах осуществления активация пути STING приводит к повышению продукции интерферонов типа 1 (в основном, IFN-a и IFN-b) и/или экспрессии интерферон-стимулируемых генов.

[095] Термин "фрагмент лекарственного средства агониста STING" при использовании в настоящем документе относится к фрагменту, полученному из агониста STING и способному взаимодействовать со STING. В некоторых вариантах осуществления агонист STING представляет собой фрагмент, полученный из агониста STING, что позволяет связывать такой фрагмент с остальной частью конъюгата согласно настоящему изобретению.

[096] Конъюгаты согласно изобретению могут применяться в способах лечения или уменьшения тяжести вирусной инфекции, заболевании, синдроме, состоянии или нарушении, на которое воздействует агонизм STING. Такие способы включают, состоят из и/или состоят по существу из введения субъекту, в том числе животному, млекопитающему и человеку, нуждающемуся в таком лечении, уменьшении тяжести и/или профилактике, терапевтически эффективного количества конъюгата согласно изобретению или его энантиомера, диастереомера, сольвата или фармацевтически приемлемой соли.

[097] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты согласно изобретению или их энантиомер, диастереомер, сольват или фармацевтически приемлемая солевая форма могут применяться для лечения или уменьшения тяжести заболеваний, синдромов, состояний или нарушений, таких как меланома, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легкого, фибросаркома и гепатит В.

[098] Термины "конъюгат(ы) согласно изобретению" или "конъюгат(ы) согласно настоящему изобретению" при использовании в настоящем документе означают конъюгат, как определено в настоящем документе, в любой форме, то есть любой таутомерной форме, любой изомерной форме, любой солевой или несолевой форме (например, в виде свободной кислоты или основания или в виде соли, в частности, соответствующей фармацевтически приемлемой соли) и любой физической форме

(например, включающей нетвердые формы (например, жидкие или полутвердые формы) и твердые формы (например, аморфные или кристаллические формы, определенные полиморфные формы, сольватные формы, включая гидратные формы (например, моно-, ди- и полугидраты)) и смеси различных форм).

[099] Таким образом, в настоящее изобретение включены конъюгаты, раскрытые в настоящем документе, в любой солевой или несолевой форме и в любой физической форме, а также смеси различных форм. Хотя они включены в настоящее изобретение, следует понимать, что конъюгаты согласно настоящему изобретению, в любой солевой или несолевой форме и в любой своей физической форме могут обладать различными уровнями активности, различной биодоступностью и различными технологическими свойствами в целях производства составов.

[100] При использовании в настоящем документе выражения "один или больше из A, B или C", "один или больше A, B или C", "один или больше из A, B и C", "один или больше A, B и C", "выбранный из группы, состоящей из A, B и C", "выбранный из A, B и C" и т.п. используются взаимозаменяемо, и все они относятся к выбору из группы состоящий из A, B и/или C, т.е. одного или больше A, одного или больше B, одного или больше C или любой их комбинации, если не указано иное.

[101] Следует понимать, что во всем тексте описания, если композиции описаны как имеющие, включающие или содержащие определенные компоненты, предполагается, что композиции также состоят по существу из или состоят из перечисленных компонентов. Аналогичным образом, если способы или процессы описываются как имеющие, включающие или содержащие определенные этапы процесса, процессы также состоят по существу или состоят из перечисленных этапов обработки. Кроме того, следует понимать, что порядок этапов или порядок выполнения некоторых действий не имеет значения, пока изобретение остается действующим. Более того, два или больше этапов или действий могут выполнять одновременно.

[102] Все проценты и соотношения, используемые в настоящем документе, если не указано иное, приведены по весу. Другие характеристики и преимущества настоящего изобретения очевидны из различных примеров. Представленные примеры иллюстрируют различные компоненты и методологию, полезные при практическом применении настоящего изобретения. Примеры не ограничивают заявленное изобретение. На основе настоящего изобретения специалист в данной области сумеет определить и применить другие компоненты и методологию, полезные для практического применения настоящего изобретения.

[103] Все публикации и патентные документы, цитируемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством отсылки, как если бы каждая такая публикация или документ были специально и индивидуально указаны для включения в настоящий документ посредством отсылки. Цитирование публикаций и патентных документов не следует рассматривать в качестве допущения того, что какой-либо из них составляет известный уровень техники, а также того, что это составляет

какое-либо допущение в отношении их содержания или даты. Далее изобретение будет описано посредством письменного описания, при этом для специалистов в данной области будет очевидно, что изобретение может быть реализовано на практике в различных вариантах осуществления, и что приведенное выше описание и приведенные ниже примеры предназначены для иллюстрации, а не ограничения формулы изобретения, которая следует ниже.

Конъюгаты и каркасы согласно настоящему изобретению

[104] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен конъюгат Формулы (I):

$PBRM\text{-}[A^1\text{-}(L^C)_{0\ или\ 1}\text{-}D]d_{15}$ (I)

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где:

PBRM обозначает молекулу распознавания на основе белка;

L^C, в случае присутствия, является линкерной единицей;

A^1 представляет собой двухвалентный линкерный фрагмент, соединяющий PBRM с L^C, когда L^C присутствует, или с D, когда L^C отсутствует;

D представляет собой молекулу лекарственного средства агониста STING; и

d_{15} представляет собой целое число в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 20.

[105] В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет Формулу (I-A):

$PBRM\text{-}[A^1\text{-}D]d_{15}$ (I-A)

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[106] В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет Формулу (I-B):

$PBRM\text{-}[A^1\text{-}L^C\text{-}D]d_{15}$ (I-B)

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[107] В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет Формулу (I-B'):

(I-B')

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[108] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены каркасы, которые могут применяться для конъюгирования с PBRM, где каркас имеет Формулу (II):

$A^{1'}\text{-}(L^C)_{0\ или\ 1}\text{-}D$ (II)

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где:

PBRM обозначает молекулу распознавания на основе белка;

L^C, в случае присутствия, является линкерной единицей;

$A^{1'}$ представляет собой моновалентный линкерный фрагмент, включающий функциональную группу, способную образовывать ковалентную связь с функциональной группой PBRM; и

D представляет собой молекулу лекарственного средства агониста STING.

[109] В некоторых вариантах осуществления каркас имеет Формулу (II-A):

$A^{1'}$-D (II-A)

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[110] В некоторых вариантах осуществления каркас имеет Формулу (II-B):

$A^{1'}$-LC-D (II-B)

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[111] В некоторых вариантах осуществления каркас имеет Формулу (II-B'):

(II-B')

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[112] Следует понимать, что для конъюгата любой из Формул (I), (I-A), (I-B), (I-B'), (II), (II-A), (II-B) или (II-B'), или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, каждая из переменных PBRM, L^C, A^1, T^1, M^A, L^D, D и d_{15} может быть, в соответствующих случаях, выбрана из групп, описанных в настоящем документе, при этом любая группа, описанная в настоящем документе для любой из переменных PBRM, L^C, A^1, T^1, M^A, L^D, D и d_{15} может быть объединена, в соответствующих случаях, с любой группой, описанной в настоящем документе для одной или больше из остальных переменных PBRM, L^C, A^1, T^1, M^A, L^D, D и d_{15}.

Переменная d_{15}

[113] В некоторых вариантах осуществления d_{15} представляет собой целое число в пределах от приблизительно 2 до приблизительно 14, от приблизительно 2 до приблизительно 12, от приблизительно 2 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 8, от приблизительно 2 до приблизительно 6, от приблизительно 2 до приблизительно 4, от приблизительно 4 до приблизительно 10, от приблизительно 4 до приблизительно 8, от приблизительно 4 до приблизительно 6, от приблизительно 6 до приблизительно 14, от приблизительно 6 до приблизительно 12, от приблизительно 6 до приблизительно 10, от приблизительно 6 до приблизительно 8, от приблизительно 8 до приблизительно 14, от приблизительно 8 до приблизительно 12 или от приблизительно 8 до приблизительно 10.

[114] В некоторых вариантах осуществления d_{15} представляет собой целое число в пределах от приблизительно 2 до приблизительно 8.

[115] В некоторых вариантах осуществления d_{15} равно 2, 4, 6 или 8. В некоторых вариантах осуществления d_{15} равно 6 или 8.

[116] В некоторых вариантах осуществления d_{15} равно 8. В некоторых вариантах осуществления d_{15} равно 6.

Переменные A^1 и $A^{1'}$

[117] В некоторых вариантах осуществления каждый A^1 независимо представляет собой двухвалентный линкерный фрагмент, соединяющий PBRM с L^C, когда L^C присутствует, или с D, когда L^C отсутствует.

[118] В некоторых вариантах осуществления каждый A^1 независимо представляет собой:

;

;

или

;

где:

R^7 представляет собой -O-, $-NR^8$, -(C_1-C_{10} алкил)-, -(C_1-C_{10} алкенил)-, -(C_1-C_{10} алкинил)-, -(C_3-C_8 циклоалкил)-, -арил-, -O-(C_1-C_8 алкил)-, -O-(C_1-C_{10} алкенил)-, -O-(C_1-C_{10} алкинил)-, -(C_1-C_{10} алкил)-(C_3-C_8 циклоалкил)-, -(C_1-C_{10} алкил)-арил-, -(C_2-C_{10} алкенил)-(C_3-C_8 циклоалкил)-, -(C_2-C_{10} алкенил)-арил-, -(C_2-C_{10} алкинил)-(C_3-C_8 циклоалкил)-, -(C_2-C_{10} алкинил)-арил-, -(C_3-C_8 циклоалкил)-(C_1-C_{10} алкил)-, -арил-(C_1-C_{10} алкил)-, -(C_3-C_8 циклоалкил)-(C_2-C_{10} алкенил)-, -арил-(C_2-C_{10} алкенил)-, -(C_3-C_8 циклоалкил)-(C_2-C_{10} алкинил)-, -арил-(C_2-C_{10} алкинил)-, -(3-8-членный гетероциклоалкил)-, -(5-8-членный гетероарил)-, -(C_1-C_{10} алкил)-(3-8-членный гетероциклоалкил)-, -(C_1-C_{10} алкил)-(5-8-членный гетероарил)-, -(C_2-C_{10} алкенил)-(3-8-членный гетероциклоалкил)-, -(C_2-C_{10} алкенил)-(5-8-членный гетероарил)-, -(C_2-C_{10} алкинил)-(3-8-членный гетероциклоалкил)-, -(C_2-C_{10} алкинил)-(5-8-членный гетероарил)-, -(3-8-членный гетероциклоалкил)-(C_1-C_{10} алкил)-, -(5-8-членный гетероарил)-(C_1-C_{10} алкил)-, -(3-8-членный гетероциклоалкил)-(C_2-C_{10} алкенил)-, -(5-8-членный гетероарил)-(C_2-C_{10} алкенил)-, -(5-8-членный гетероарил)-(C_2-C_{10} алкинил)-, -(5-8-членный гетероарил)-(C_2-C_{10} алкинил)-, -O-C(O)-$(CH_2CH_2O)_r$-$(CH_2)_2$-, -$(CH_2CH_2O)_r$- или -$(CH_2CH_2O)_r$-$(CH_2)_2$-, где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероциклоалкил или гетероарил необязательно замещен;

R^8 представляет собой H, гидрокси или C_{1-4} алкил;

r является целым числом в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 12; и

* обозначает присоединие к PBRM, а ** обозначает присоединие к L^C, когда L^C присутствует, или к D, когда L^C отсутствует.

[119] В некоторых вариантах осуществления R^7 представляет собой -O-, $-NR^8$, -(C_1-C_{10} алкил)-, -(C_3-C_8 циклоалкил)-, -арил-, -O-(C_1-C_8 алкил)-, -(C_1-C_{10} алкил)-арил-, -арил-(C_1-C_{10} алкил)-, -(C_1-C_{10} алкил)-(C_3-C_8 циклоалкил)-, -(C_3-C_8 циклоалкил)-(C_1-C_{10} алкил)-, -(3-8-членный гетероциклоалкил)-, -(5-8-членный гетероарил)-, -(C_1-C_{10} алкил)-(3-8-членный гетероциклоалкил)-, -(C_1-C_{10} алкил)-(5-8-членный гетероарил)-, -(3-8-членный гетероциклоалкил)-(C_1-C_{10} алкил)-, -(5-8-членный гетероарил)-(C_1-C_{10} алкил)-, -O-C(O)-$(CH_2CH_2O)_r$-$(CH_2)_2$-, -$(CH_2CH_2O)_r$- или -$(CH_2CH_2O)_r$-$(CH_2)_2$-.

[120] В некоторых вариантах осуществления R^7 представляет собой -(C_1-C_{10}

алкил)-, -O-(C_1-C_8 алкил)-, -$(CH_2CH_2O)_r$-, -O-C(O)-$(CH_2CH_2O)_r$-$(CH_2)_2$- или -$(CH_2CH_2O)_r$-$(CH_2)_2$-.

[121] В некоторых вариантах осуществления R^7 представляет собой -O-, -NH, -$N(CH_3)$, -CH_2-, -$(CH_2)_2$-, -$(CH_2)_5$-, -O-C(O)-$(CH_2CH_2O)_6$-$(CH_2)_2$-, -(CH_2CH_2O)-$(CH_2)_2$-, -$(CH_2CH_2O)_2$-$(CH_2)_2$-, -$(CH_2CH_2O)_4$-$(CH_2)_2$- или -$(CH_2CH_2O)_6$-$(CH_2)_2$-.

[122] В некоторых вариантах осуществления каждый A^1 независимо представляет собой:

где R^8 представляет собой H, гидрокси или C_{1-4} алкил; r является целым числом в пределах от приблизительно 4 до приблизительно 6; и * обозначает присоединение к PBRM, а ** обозначает присоединение к L^C, когда L^C присутствует, или к D, когда L^C отсутствует.

[123] Следует понимать, что каждый A^1, до связывания с PBRM, независимо соответствует моновалентной группе $A^{1'}$.

[124] В некоторых вариантах осуществления каждый $A^{1'}$ независимо представляет собой:

где R^7, R^8 и r имеют значение, описанное в настоящем документе; и ** обозначает присоединение к L^C, когда L^C присутствует, или к D, когда L^C отсутствует.

[125] В некоторых вариантах осуществления каждый $A^{1'}$ независимо представляет собой:

;

;

или

;

где:

r является целым числом в пределах от приблизительно 4 до приблизительно 6; и

** обозначает присоединение к L^C, когда L^C присутствует, или к D, когда L^C отсутствует.

Переменная L^C

[126] В некоторых вариантах осуществления, каждый L^C, в случае присутствия, независимо представляет собой:

где:

обозначает присоединение к A^1, и ## обозначает присоединение к D;

M^A, в случае присутствия, представляет собой пептидный фрагмент, включающий по меньшей мере две аминокислоты;

T^1, в случае присутствия, представляет собой гидрофильную группу; и

L^D представляет собой двухвалентный линкерный фрагмент, соединяющей D с M^A, когда M^A присутствует, или с A^1, когда M^A отсутствует.

[127] В некоторых вариантах осуществления каждый L^D включает по меньшей мере одну расщепляемую связь, при этом, когда связь разрывается, D высвобождается в активной форме, оказывая свое предполагаемое терапевтическое действие.

[128] В некоторых вариантах осуществления каждый L^C, в случае присутствия, независимо представляет собой .

[129] В некоторых вариантах осуществления каждый L^C, в случае присутствия, независимо представляет собой .

Переменная L^D

[130] В некоторых вариантах осуществления каждый L^D независимо представляет собой двухвалентный линкерный фрагмент, соединяющий D с M^A, когда M^A присутствует, или с A^1, когда M^A отсутствует.

[131] В некоторых вариантах осуществления каждый L^D включает по меньшей мере одну расщепляемую связь, при этом, когда такая связь расщепляется, D высвобождается в активной форме, оказывая свое предполагаемое терапевтическое действие.

[132] В некоторых вариантах осуществления L^D включает одну расщепляемую связь. В некоторых вариантах осуществления L^D включает множество участков расщепления или связей.

[133] Следует понимать, что каждый L^D, перед связыванием с D, независимо соответствует моновалентному фрагменту $L^{D'}$.

[134] В некоторых вариантах осуществления $L^{D'}$ включает функциональную группу, способную образовывать расщепляемую связь. Функциональные группы, способные образовывать расщепляемую связь, могут включать, например, сульфгидрильные группы для образования дисульфидных связей, альдегидные, кетоновые или гидразиновые группы для образования гидразоновых связей, гидроксиламиновые группы для образования оксимных связей, карбоксильные или аминогруппы для образования пептидных связей, карбоксильные или гидроксигруппы для образования эфирных связей и сахара для образования гликозидных связей.

[135] В некоторых вариантах осуществления каждый L^D включает дисульфидную связь, которая может расщепляться в результате дисульфидного обмена, кислотолабильная связь, которая может расщепляться при кислотном pH, и/или связи, которые способны расщепляться под действием гидролаз. В некоторых вариантах осуществления L^D включает карбаматную связь (т.е. -O-C(O)-NR-, где R является водородом или алкилом и т.п.).

[136] В некоторых вариантах осуществления структура и последовательность расщепляемой связи в L^D могут быть такими, что связь расщепляется под действием ферментов, присутствующих на сайте-мишени. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая связь может расщепляться по другим механизмам.

[137] В некоторых вариантах осуществления структура и последовательность расщепляемых связей в L^D могут быть такими, что связи расщепляются под действием ферментов, присутствующих на сайте-мишени. В некоторых вариантах осуществления расщепляемые связи могут расщепляться по другим механизмам.

[138] В некоторых вариантах осуществления расщепляемая(ые) связь(и) может ферментативно расщепляться одним или более ферментами, включая опухолеассоциированную протеазу, с высвобождением Единицы лекарственного средства или D, где конъюгат согласно настоящему изобретению или промежуточное соединение, или его каркас, протонируется in vivo при высвобождении с образованием Единицы лекарственного средства или D.

[139] В некоторых вариантах осуществления каждый L^D представляет собой

, где:

[140] L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-[$(CH_2CH_2O)_p$-$(CH_2)_{0-2}]_q$-C(O)-, -NH-(C_1-C_6 алкил)-O-C(O)- или -NH-[$(CH_2CH_2O)_p$-$(CH_2)_{0-2}]_q$-C(O)-NH-(C_1-C_6 алкил)-O-C(O)-, где p является целым числом в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 20, и q является целым числом в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 10;

каждый W независимо является природной или неприродной аминокислотной единицей;

w является целым числом в пределах от приблизительно 0 до приблизительно 12;

*** обозначает присоединение к M^A, когда M^A присутствует, или к A^1, когда M^A отсутствует; и

**** обозначает присоединение к D.

[141] В некоторых вариантах осуществления каждый L^D независимо представляет собой ***–L^E–**** . В некоторых вариантах осуществления каждый L^D независимо представляет собой ***–W_w–**** . В некоторых вариантах осуществления каждый L^D независимо представляет собой ***–L^E–W_w–**** .

[142] В некоторых вариантах осуществления L^E включает по меньшей мере одну единицу ПЭГ.

[143] В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 1 субъединицу, по меньшей мере 2 субъединицы, по меньшей мере 3 субъединицы, по меньшей мере 4 субъединицы, по меньшей мере 5 субъединиц или по меньшей мере 6 субъединиц. В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 4 субъединицы, по меньшей мере 3 субъединицы, по меньшей мере 2 субъединицы или по меньшей мере 1 субъединицу. В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 1 субъединицу. В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 2 субъединицы.

[144] В некоторых вариантах осуществления p является целым числом в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 15, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 9, от приблизительно 1 до приблизительно 8, от приблизительно 1 до приблизительно 7, от приблизительно 1 до приблизительно 6 или от приблизительно 1 до приблизительно 5.

[145] В некоторых вариантах осуществления p является целым числом в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 6. В некоторых вариантах осуществления p является целым числом в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 4. В некоторых вариантах осуществления p является целым числом в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 2.

[146] В некоторых вариантах осуществления p равно 2.

[147] В некоторых вариантах осуществления q является целым числом в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 15, от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 9, от приблизительно 1 до приблизительно 8, от приблизительно 1 до приблизительно 7, от приблизительно 1 до приблизительно 6 или от приблизительно 1 до приблизительно 5.

[148] В некоторых вариантах осуществления q равно 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления q равно 2.

[149] В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-$(CH_2CH_2O)_{1-4}$-$(CH_2)_2$-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-$(CH_2CH_2O)_2$-$(CH_2)_2$-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-$(CH_2CH_2O)_3$-$(CH_2)_{0-2}$-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-$(CH_2CH_2O)_3$-$(CH_2)_1$-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-$(CH_2CH_2O)_3$-$(CH_2)_2$-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-CH_2CH_2O-$(CH_2)_{0-2}$-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-CH_2CH_2O-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-(C_1-C_6 алкил)-O-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-CH_2-$CH(CH_3)$-O-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-[$(CH_2CH_2O)_{1-4}$-$(CH_2)_2$-C(O)-NH-(C_1-C_6 алкил)-O-C(O)-. В некоторых вариантах осуществления L^E, в случае присутствия, представляет собой -NH-CH_2CH_2O-$(CH_2)_2$-C(O)-NH-$(CH_2)_2$-O-C(O)-.

[150] В некоторых вариантах осуществления w является целым числом в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 12 (например, 1-6 или 1-4, или 1-3, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12).

[151] В некоторых вариантах осуществления w равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления w равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[152] В некоторых вариантах осуществления w равно 1. В некоторых вариантах осуществления w равно 2. В некоторых вариантах осуществления w равно 3.

[153] В некоторых вариантах осуществления каждый W независимо является природной или неприродной аминокислотой и/или D или L-изомером.

[154] В некоторых вариантах осуществления каждый W независимо является альфа, бета или гамма-аминокислотой, которая является природной или неприродной.

[155] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один W является природной аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один W является неприродной аминокислотой.

[156] В некоторых вариантах осуществления W_w не включает природные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления W_w не включает неприродные аминокислоты.

[157] В некоторых вариантах осуществления W_w включает природную аминокислоту, связанную с неприродной аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления W_w включает природную аминокислоту, связанную с D-изомером природной аминокислоты.

[158] В некоторых вариантах осуществления W_w представляет собой дипептид, например, -Val-Cit, -Phe-Lys-, -Val-Ala- или Glu-Ala-.

[159] В некоторых вариантах осуществления W_w представляет собой монопептидную, дипептидную, трипептидную, тетрапептидную, пентапептидную, гексапептидную, гептапептидную, октапептидную, нонапептидную, декапептидную, недекапептидную или додекпептидную единицу.

[160] В некоторых вариантах осуществления W_w представляет собой пептид (например, пептид из 1-12 аминокислот), который конъюгирован непосредственно с D. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой одну аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой дипептид. В некоторых вариантах осуществления пептид представляет собой трипептид.

[161] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в W_w независимо выбрана из аланина, β-аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, пролина, триптофана, валина, цистеина, метионина, селеноцистеина, орнитина, пеницилламина, аминоалкановой кислоты, аминоалкиновой кислоты, аминоалкандиовой кислоты, аминобензойной кислоты, амино-гетероцикло-алкановой кислоты, гетероцикло-карбоновой кислоты, цитруллина, статина, диаминоалкановой кислоты и их производных.

[162] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в W_w независимо выбрана из аланина, β-аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, пролина, триптофана, валина, цитруллина и их производных.

[163] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в W_w независимо выбрана из протеиногенной и непротеиногенной аминокислот.

[164] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в W_w независимо выбрана из L или D изомеров следующих аминокислот: аланина, β-аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, цистеина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, метионина, серина, тирозина, треонина, триптофана, пролина, орнитина, пеницилламина, аминоалкиновой кислоты, аминоалкандиовой кислоты, гетероцикло-карбоновой кислоты, цитруллина, статина, диаминоалкановой кислоты, валина, цитруллина и их производных.

[165] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в W_w независимо представляет собой цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, орнитин, лизин, серин, треонин, глицин, глутамин, аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую

кислоту, селеноцистеин, пролин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, валин, цитруллин или аланин.

[166] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в W_w независимо выбрана из L-изомеров следующих аминокислот: аланина, β-аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, триптофана, цитруллина и валина.

[167] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в W_w независимо выбрана из D-изомеров следующих аминокислот: аланина, β-аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, триптофана, цитруллина и валина.

[168] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в W_w представляет собой аланин, β-аланин, глицин, глутаминовую кислоту, изоглутаминовую кислоту, изоаспарагиновую кислоту, валин, цитруллин или аспарагиновую кислоту.

[169] В некоторых вариантах осуществления W_w включает β-аланин. В некоторых вариантах осуществления W включает (β-аланин)-(аланин). В некоторых вариантах осуществления W_w включает (β-аланин) и, необязательно, глутаминовую кислоту, изоглутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, изоаспарагиновую кислоту, валин, (валин)-(аланин), (аланин)-(аланин) или (валин)-(цитруллин).

[170] В некоторых вариантах осуществления W_w включает (глутаминовую кислоту)-(аланин).

[171] В некоторых вариантах осуществления W_w включает глутаминовую кислоту и, необязательно, аланин, глицин, изоглутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, изоаспарагиновую кислоту, валин, (валин)-(аланин), (аланин)-(аланин) или (валин)-(цитруллин).

[172] В некоторых вариантах осуществления W_w включает 2,3-диаминопропановую кислоту. В некоторых вариантах осуществления W_w включает (R)-2,3-диаминопропановую кислоту. В некоторых вариантах осуществления W_w включает глутаминовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления W_w включает (глутаминовую кислоту)-(аланин). В некоторых вариантах осуществления W_w включает (глутаминовую кислоту)-(глицин)-(аланин).

[173] В некоторых вариантах осуществления W_w включает L-глутаминовую кислоту, D-глутаминовую кислоту, (L-глутаминовую кислоту)-(L-аланин), (L-глутаминовую кислоту)-(D-аланин), (D-глутаминовую кислоту)-(L-аланин), (D-глутаминовую кислоту)-(D-аланин), (L-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(L-аланин), D-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(D-аланин), (L-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(D-аланин) или (D-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(L-аланин).

[174] В некоторых вариантах осуществления W_w включает карбаматную связь в дополнение к одной или больше аминокислотам.

[175] В некоторых вариантах осуществления L^D (например, W_w) является селективной в отношении ферментативного расщепления (например, конкретным ферментом). В некоторых вариантах осуществления конкретным ферментом является опухолеассоциированной протеазой.

[176] В некоторых вариантах осуществления L^D (например, W_w) включает связь, расщепление которой катализируется протеазой катепсином B, катепсином C, катепсином D или плазмином.

[177] В некоторых вариантах осуществления L^D включает сайт расщепления сахара.

[178] В некоторых вариантах осуществления L^D включает остаток сахара (Su), связанный через кислород гликозидной связи с саморасщепляющейся группой.

[179] В некоторых вариантах осуществления "саморасщепляющаяся группа" может быть трифункциональной химической группой, которая способна к ковалентному соединению трех расположенных отдельно химических групп (т.е. остатка сахара (через гликозидную связь), единицы лекарственного средства (напрямую или ненапрямую) и M^A (напрямую или ненапрямую), когда M^A присутствует, или A^1, когда M^A отсутствует.

[180] В некоторых вариантах осуществления гликозидная связь может расщепляться в целевом сайте, инициируя последовательность реакций саморасщепления, которая приводит к высвобождению лекарственного средства.

[181] В некоторых вариантах осуществления каждый L^D, в случае присутствия, независимо представляет собой:

(1) ;	(2) ;
(3) ;	(4) ;
(5) ;	(6) ;
(7) ;	(8) ;
(9) ;	(10) ;
(11) ;	(12) ;
(13) ;	(14) ;
(15) ;	(16) ;
(17) ;	(18) ;

(19) ;	(20) ;
(21) ;	(22) ;
(23) ;	(24) ;
(25) ;	(26) ;
(27) ;	(28) ;
(29) ;	(30) ;
(31) ;	(32) ;
(33) ;	(34) или
(35) ;	

где: *** обозначает присоединение к M^A, когда M^A присутствует, или к A^1, когда M^A отсутствует; и **** обозначает присоединение к D.

[182] В некоторых вариантах осуществления каждый L^D, в случае присутствия, независимо представляет собой:

(1) ;	(2) ;
(3) ;	(4) ;

(5) ;	(6) или
(7) ;	

где: *** обозначает присоединение к M^A, when M^A присутствует, или к A^1, когда M^A отсутствует; и **** обозначает присоединение к D.

[183] В некоторых вариантах осуществления каждый L^D, в случае присутствия, независимо представляет собой:

где: *** обозначает присоединение к M^A, и **** обозначает присоединение к D.

Переменная M^A

[184] В некоторых вариантах осуществления M^A включает пептидный фрагмент по меньшей мере из двух аминокислот.

[185] В некоторых вариантах осуществления аминокислота обозначается в настоящем документе как "АК", а аминокислоты - как "аминок-ты".

[186] В некоторых вариантах осуществления M^A является фрагментом, который способен образоовывать ковалентную связь с-L^D-D единицей и допускает присоединение множества лекарственных средств.

[187] В некоторых вариантах осуществления M^A включает одну АК единицу или содержит две или больше АК единиц (например, от 2 до 10, от 2 до 6 или 2, 3, 4, 5 или 6) где каждая АК единица независимо представляет собой природную или неприродную аминокислоту, аминоспирт, аминоальдегид, диамин, полиамин или их комбинации.

[188] В некоторых вариантах осуществления, чтобы иметь необходимое количество присоединений, по меньшей мере одна из АК единиц должна иметь функционализированную боковую цепь, обеспечивающую присоединение -L^D-D единицы. В некоторых вариантах осуществления типичные функционализированные АК единицы (например, аминокислоты, аминоспирты или аминоальдегиды) включают, например, азидо- или алкин-функционализированные АК единицы (например, аминокислоту, аминоспирт или аминоальдегид, модифицированные так, что они содержат азидную группу или алкиновую группу).

[189] В некоторых вариантах осуществления M^A включает 2-12 АК единиц. В некоторых вариантах осуществления M^A включает 2-10 АК единиц. В некоторых вариантах осуществления M^A включает 2-6 АК единиц. В некоторых вариантах осуществления M^A включает 2, 3, 4, 5 или 6 АК единиц.

[190] В некоторых вариантах осуществления M^A содержит 2 АК единицы. В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент содержит 3 АК единицы. В

некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент содержит 4 АК единицы. В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент содержит 5 АК единиц. В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент содержит 6 АК единиц.

[191] В некоторых вариантах осуществления присоединение внутри M^A или с другими компонентами конъюгата, промежуточного соединения или каркаса может осуществляться, например, через амино, карбокси или другие функциональные группы.

[192] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в M^A может быть независимо D или L изомером тиолсодержащей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в M^A может быть независимо D-изомером тиолсодержащей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в M^A может быть независимо L-изомером тиолсодержащей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления тиолсодержащей аминокислотой может быть, например, цистеин, гомоцистеин или пеницилламин.

[193] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в M^A может быть независимо L или D изомером следующих аминокислот: аланина (включая β-аланин), аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, цистеина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, метионина, серина, тирозина, треонина, триптофана, пролина, орнитина, пеницилламина, аминоалкиновой кислоты, аминоалкандиовой кислоты, гетероцикло-карбоновой кислоты, цитруллина, статина, диаминоалкановой кислоты, их стереоизомером или производными.

[194] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в M^A независимо представляет собой цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, орнитин, лизин, серин, треонин, глицин, глутамин, аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, селеноцистеин, пролин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, валин, аланин или их стереоизомеры.

[195] В некоторых вариантах осуществления M^A включает монопептид, дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. В некоторых вариантах осуществления M^A включает пентапептид.

[196] В некоторых вариантах осуществления M^A включает по меньшей мере приблизительно пять аминокислот (например, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления M^A включает по большей мере приблизительно десять аминокислот.

[197] В некоторых вариантах осуществления каждая аминокислота в M^A независимо является глицином, серином, глутамином, лизином, аспарагиновой кислотой и цистеином.

[198] В некоторых вариантах осуществления M^A включает по меньшей мере четыре глицина и по меньшей мере одну глутаминовую кислоту, например, $(глицин)_4$ и глутаминовую кислоту, где глутаминовая кислота присутствует в любом положении в пептидной цепи, такой как, например, (глутаминовая кислота)-$(глицин)_4$; (глицин)-(глутаминовая кислота)-$(глицин)_3$; $(глицин)_2$-(глутаминовая кислота)-$(глицин)_2$; $(глицин)_3$-

(глутаминовая кислота)-(глицин); или (глицин)$_4$-(глутаминовая кислота).

[199] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)4-(глутаминовую кислоту). В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент включает (глутаминовую кислоту)-(глицин)$_4$.

[200] В некоторых вариантах осуществления M^A включает по меньшей мере четыре глицина и по меньшей мере один серин, например, (глицин)$_4$ и серин, где серин присутствует в любом положении в пептидной цепи, такой как, например, (серин)-(глицин)$_4$; (глицин)-(серин)-(глицин)$_3$; (глицин)$_2$-(серин)-(глицин)$_2$; (глицин)$_3$-(серин)-(глицин); или (глицин)$_4$-(серин).

[201] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)$_4$-(серин). В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент включает (серин)-(глицин)$_4$.

[202] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (β-аланин)-(глицин)$_4$-(серин), где серин присутствует в любом положении в пептидной цепи, такой как, например, (β-аланин)-(серин)-(глицин)$_4$; (β-аланин)-(глицин)-(серин)-(глицин)$_3$; (β-аланин)-(глицин)$_2$-(серин)-(глицин)$_2$; (β-аланин)-(глицин)$_3$-(серин)-(глицин); или (β-аланин)-(глицин)$_4$-(серин).

[203] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)$_4$-(серин)-(глутаминовую кислоту), где серин присутствует в любом положении в пептидной цепи, такой как, например, (серин)-(глицин)$_4$-(глутаминовая кислота); (глицин)-(серин)-(глицин)$_3$-(глутаминовая кислота); (глицин)$_2$-(серин)-(глицин)$_2$-(глутаминовая кислота); (глицин)$_3$-(серин)-(глицин)-(глутаминовая кислота); или (глицин)$_4$-(серин)-(глутаминовая кислота). В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент включает (β-аланин)-(глицин)$_4$-(серин)-(глутаминовую кислоту), где серин присутствует в любом положении в пептидной цепи, такой как, например, (β-аланин)-(серин)-(глицин)$_4$-(глутаминовая кислота); (β-аланин)-(глицин)-(серин)-(глицин)$_3$-(глутаминовая кислота); (β-аланин)-(глицин)$_2$-(серин)-(глицин)$_2$-(глутаминовая кислота); (β-аланин)-(глицин)$_3$-(серин)-(глицин)-(глутаминовая кислота); или (β-аланин)-(глицин)$_4$-(серин)-(глутаминовая кислота).

[204] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)$_4$-(серин). В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент включает (серин)-(глицин)$_4$.

[205] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (β-аланин)-(глицин)$_4$-(серин), где серин присутствует в любом положении в пептидной цепи.

[206] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)$_4$-(серин)-(глутаминовую кислоту), где серин присутствует в любом положении в пептидной цепи.

[207] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (β-аланин)-(глицин)$_4$-(серин)-(глутаминовую кислоту), где серин присутствует в любом положении в пептидной цепи.

[208] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глутаминовую кислоту)-(глицин)$_{1-4}$, где: M^A присоединен к A^1 через одну из глутаминовой кислоты; M^A присоединен к T^1 через глицин; и M^A присоединен к L^D через глутаминовую кислоту.

[209] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[210] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глутаминовую кислоту)-(глицин)$_4$, где: M^A присоединен к A^1 через глутаминовую кислоту; M^A присоединен к T^1 через один из глицинов; и M^A присоединен к L^D через глутаминовую кислоту.

[211] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[212] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глутаминовую кислоту)-(глицин), где: M^A присоединен к A^1 через глутаминовую кислоту; M^A присоединен к T^1 через глицин; и M^A присоединен к L^D через глутаминовую кислоту.

[213] В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент включает

.

[214] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)$_{1-4}$-(глутаминовую кислоту), где M^A присоединен к A^1 через один из глицинов; M^A присоединен к T^1 через глутаминовую кислоту; и M^A присоединен к L^D через глутаминовую кислоту.

[215] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[216] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)$_4$-(глутаминовую кислоту), где: M^A присоединен к A^1 через глутаминовую кислоту; M^A присоединен к T^1 через глицин; и M^A присоединен к L^D через глутаминовую кислоту.

[217] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[218] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)-(глутаминовую кислоту), где: M^A присоединен к A^1 через глицин; M^A присоединен к T^1 через

глутаминовую кислоту; и M^A присоединен к L^D через глутаминовую кислоту.

[219] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[220] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)$_{1-4}$-(серин), где: M^A присоединен к A^1 через один из глицинов; M^A присоединен к T^1 через серин; и M^A присоединен к L^D через серин.

[221] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[222] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)-(серин), где: M^A присоединен к A^1 через глицин; M^A присоединен к T^1 через серин; и M^A присоединен к L^D через серин.

[223] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[224] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (глицин)$_4$-(серин), где: M^A присоединен к A^1 через один из глицинов; M^A присоединен к T^1 через серин; и M^A присоединен к L^D через серин.

[225] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[226] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (серин)-(глицин)$_{1-4}$, где: M^A присоединен к A^1 через серин; M^A присоединен к T^1 через один из глицина; и M^A присоединен к L^D через серин.

[227] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[228] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (серин)-(глицин)$_4$, где: M^A присоединен к A^1 через серин; M^A присоединен к T^1 через один из глицинов; и M^A присоединен к L^D через серин.

[229] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[230] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (серин)-(глицин), где: M^A присоединен к A^1 через серин; M^A присоединен к T^1 через один глицин; и M^A присоединен к L^D через серин.

[231] В некоторых вариантах осуществления M^A включает .

[232] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (β-аланин)-(глицин)$_{1-4}$-(серин), где: M^A присоединен к A^1 через β-аланин; M^A присоединен к T^1 через серин; и M^A присоединен к L^D через серин.

[233] В некоторых вариантах осуществления M^A включает

.

[234] В некоторых вариантах осуществления M^A включает (β-аланин)-(глицин)$_4$-(серин), где: M^A присоединен к A^1 через β-аланин; M^A присоединен к T^1 через серин; и M^A присоединен к L^D через серин.

[235] В некоторых вариантах осуществления M^A включает

.

[236] В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент включает (β-аланин)-(глицин)-(глутаминовую кислоту), где: пептидный фрагмент присоединен к L^3, в случае присутствия, или к L^M, когда L^3 отсутствует, через β-аланин; пептидный фрагмент присоединен к T^1, в случае присутствия, через глутаминовую кислоту; и пептидный фрагмент присоединен к L^D, в случае присутствия, через глутаминовую кислоту.

[237] В некоторых вариантах осуществления пептидный фрагмент включает

.

[238] Следует понимать, что в вариантах осуществления M^A, * обозначает присоединение к A^1, ** обозначает присоединение к T^1, и *** обозначает присоединение к L^D.

Гидрофильная группа (переменная T^1)

[239] В некоторых вариантах осуществления гидрофильная группа, включенная в конъюгаты или каркасы согласно изобретению, представляет собой водорастворимый и по существу неантигенный полимер. Примеры гидрофильной группы включают, без ограничения, полиспирты, простые полиэфиры, полианионы, поликатионы, полифосфорные кислоты, полиамины, полисахариды, полигидроксисоединения,

полилизины и их производные. В некоторых вариантах осуществления один конец гидрофильной группы может быть функционализирован таким образом, чтобы его можно было ковалентно присоединить к линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A) посредством нерасщепляемой связи или через расщепляемую связь. В некоторых вариантах осуществления функционализация может быть выполнена, например, посредством амина, тиола, NHS сложного эфира, малеимида, алкина, азида, карбонила или другой функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления другой конец (или концы) гидрофильной группы будет свободным и несвязанным. В некоторых вариантах осуществления термин "несвязанный" означает, что гидрофильная группа не будет присоединена к другому фрагменту, такому как D или единица лекарственного средства, или другим компонентам конъюгатов или каркасов согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления свободный и несвязанный конец гидрофильной группы может включать метокси, карбоновую кислоту, спирт или другую подходящую функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления метокси, карбокси, спиртовую или другую подходящую функциональную группу, которая служит в качестве кэпа для конца или концов гидрофильной группы.

[240] В некоторых вариантах осуществления расщепляемая связь относится к связи, которая практически не подвергается расщеплению во время циркуляции в плазме, но чувствительна к расщеплению во внутриклеточном или внутриопухолевом окружении. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемая связь представляет собой такую связь, которая практически не подвергается расщеплению в какой-либо биологической среде. В некоторых вариантах осуществления примерами расщепляемых связей являются химический гидролиз гидразона, восстановление дисульфида и ферментативное расщепление пептидной связи или гликозидной связи. В некоторых вариантах осуществления иллюстративные присоединения гидрофильной группы производят через амидные связи, простые эфирные связи, сложноэфирные связи, гидразоновые связи, оксимные связи, дисульфидные связи, пептидные связи или триазольные связи. В некоторых вариантах осуществления присоединение гидрофильной группы к линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A) осуществляется посредством амидной связи.

[241] В некоторых вариантах осуществления, где конъюгат или каркас согласно изобретению включает больше одной гидрофильной группы, множество гидрофильных групп могут быть одинаковыми или разными химические группами (например, гидрофильными группами с разной молекулярной массой, количеством субъединиц или химической структурой). В некоторых вариантах осуществления множество гидрофильных групп могут быть присоединены к линкеру M^A на одном сайте связывания или на разных сайтах.

[242] В некоторых вариантах осуществления добавление гидрофильной группы может оказывать два потенциальных воздействия на фармакокинетику получаемого в результате конъюгата. В некоторых вариантах осуществления желаемое воздействие представляет собой снижение клиренса (и, как следствие, увеличение системного

воздействия), которое возникает в результате уменьшения неспецифических взаимодействий, вызванных экспонированными гидрофобными элементами лекарственного средства или лекарственного средства-линкера. В некоторых вариантах осуществления нежелательным воздействием является уменьшение объема и скорости распределения, которое может возникнуть в результате увеличения молекулярной массы конъюгата. В некоторых вариантах осуществления увеличение молекулярной массы гидрофильной группы увеличивает гидродинамический радиус конъюгата, что приводит к снижению диффузионной способности, что может снижать способность конъюгата проникать в опухоль. Из-за этих двух конкурирующих фармакокинетических эффектов может быть предпочтительным использовать достаточно большую гидрофильную группу, чтобы уменьшить клиренс конъюгата, тем самым увеличивая концентрацию в плазме, но не настолько большую, чтобы значительно уменьшить его диффузионную способность, что может снизить способность конъюгата достигать предполагаемой целевой популяции клеток.

[243] В некоторых вариантах осуществления гидрофильная группа включает, без ограничения, сахароспирт (также известный как полиспирт, многоатомный спирт, альдит или глицит, такой как инозит, глицерин, эритрит, треитол, арабит, ксилит, рибит, галактит, маннит, сорбит и т.п.) или его производное (например, аминополиспирт), углевод (например, сахарид), поливиниловый спирт, полимер на основе углевода (например, декстраны), гидроксипропилметакриламид (ГПМА), полиалкиленоксид и/или их сополимер.

[244] В некоторых вариантах осуществления T^1 включает множество гидроксильных ("-OH") групп, такие как группы, включающие моносахариды, олигосахариды, полисахариды и т.п.

[245] В некоторых вариантах осуществления T^1 включает множество $-(CR_{58}OH)-$ групп, где R_{58} представляет собой -H или C_{1-8} алкил.

[246] В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой -OH или $-\overset{\xi}{\xi}NH-R_{60}-(CR_{58}OH)_{n1}-R_{61}$, где:

n_1 является целым числом от 0 до приблизительно 6;

каждый R_{58} независимо представляет собой -H или C_{1-8} алкил;

R_{60} является связью, C_{1-6} алкильным линкером или $-CHR_{59}-$, где R_{59} представляет собой -H, C_{1-8} алкил, циклоалкил или арилалкил;

R_{61} представляет собой CH_2OR_{62}, $COOR_{62}$, $-(CH_2)_{n2}COOR_{62}$ или гетероциклоалкил, замещенный одним или больше гидроксилами;

R_{62} представляет собой -H или C_{1-8} алкил; и

n_2 является целым числом от 1 до приблизительно 5.

[247] В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой -OH. В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой $-\overset{\xi}{\xi}NH-R_{60}-(CR_{58}OH)_{n1}-R_{61}$.

[248] В некоторых вариантах осуществления R_{58} представляет собой -H; R_{60} является связью или C_{1-6} алкильным линкером; n_1 является целым числом от 1 до приблизительно 6; и R_{61} представляет собой CH_2OH или COOH.

[249] В некоторых вариантах осуществления R_{58} представляет собой -H; R_{60} представляет собой $-CHR_{59}-$; n_1 равно 0; и R_{61} представляет собой гетероциклоалкил, замещенный одним или больше гидроксилами, например, моносахарид.

[250] В некоторых вариантах осуществления T^1 включает глюкозиламин, диамин или триамин.

[251] В некоторых вариантах осуществления T^1 включает один или больше следующих структур или их стереоизомер:

(1) $-NH-(CHOH)_{n1}-R_{59}$;	(2) ;	(3) ;
(4) ;	(5) ;	(6) ;
(7) ;	(8)	(9) ;
(10) ;	(11) ;	(12) ;
(13)	(14) ;	(15) ;
(16) ;	(17) ;	(18) ;
(19) ;	или (20) ;	

где: R_{59} представляет собой -H, C_{1-8} алкил, циклоалкил или арилалкил; n_1 является целым числом от 1 до приблизительно 6; n_2 является целым числом от 1 до приблизительно 5; и n_3 является целым числом от приблизительно 1 до приблизительно 3.

[252] Следует понимать, что в настоящем документе рассматриваются все стереохимические формы гидрофильных групп. Например, в представленной выше

формуле гидрофильная группа может быть получена из рибозы, ксилозы, глюкозы, маннозы, галактозы или другого сахара и может сохранить стереохимические конфигурации боковых гидроксильных и алкильных групп, присутствующих на этих молекулах.

[253] Нужно понимать, что в предыдущих формулах также предусмотрены различные дезоксисоединения. Например, для гидрофильных групп предусмотрены один или больше следующих признаков, где это применимо.

[254] В некоторых вариантах осуществления n_3 равно 2 или 3.

[255] В некоторых вариантах осуществления n_1 равно 1, 2 или 3.

[256] В некоторых вариантах осуществления n_2 равно 1.

[257] В некоторых вариантах осуществления R_{59} является водородом.

[258] В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой . В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой . В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой .

[259] В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой , где

n_4 является целым числом от 1 до приблизительно 25;

каждый R_{63} независимо представляет собой -H или C_{1-8} алкил;

R_{64} является связью или C_{1-8} алкильным линкером;

R_{65} представляет собой -H, C_{1-8} алкил, $-(CH_2)_{n2}COOR_{62}$, или $-(CH_2)_{n2}COR_{66}$;

R_{62} представляет собой H или C_{1-8} алкил;

R_{66} представляет собой H, , ,

,

,

или

; и

n_2 является целым числом от 1 до приблизительно 5.

[260] В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой

:

где R_{67} представляет собой: (1) -OH;

(2) ;	(3) ;
(4) ;	(5) ;
(6) или	(7) ;

где n_4 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 20, от приблизительно 4 до приблизительно 16, от приблизительно 6 до приблизительно 12, от приблизительно 8 до приблизительно 12.

[261] В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой

.

[262] В некоторых вариантах осуществления n_4 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 20, от приблизительно 4 до приблизительно 16, от приблизительно 6 до приблизительно 12, от приблизительно 8 до приблизительно 12.

[263] В некоторых вариантах осуществления n_4 равно 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

[264] В некоторых вариантах осуществления n_4 равно 8 или 12.

[265] В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой

или

, где n_4 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 24, от приблизительно 4 до приблизительно 16, от приблизительно 6 до приблизительно 12, от приблизительно 8 до приблизительно 12.

[266] В некоторых вариантах осуществления n_4 равно 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

[267] В некоторых вариантах осуществления n_4 равно 8 или 12. В некоторых вариантах осуществления n_4 равно 8.

[268] В некоторых вариантах осуществления T^1 представляет собой

, где n_4 равно 8.

[269] В некоторых вариантах осуществления T^1 включает простой полиэфир, например, полиалкиленгликоль (ПАО). ПАО включает, без ограничения, полимеры низших алкиленоксидов, в частности, полимеры этиленоксида, такие как, например, пропиленоксид, полипропиленгликоли, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиоксиэтиленированные полиолы, их сополимеры и блок-сополимеры.

[270] В некоторых вариантах осуществления полиалкиленгликоль представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), включающий, без ограничения, полидисперсный ПЭГ, монодисперсный ПЭГ и дискретный ПЭГ. Полидисперсные ПЭГ представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные ПЭГ обычно очищены из гетерогенных смесей и, следовательно, имеют одинаковую длину цепи и молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления единицы ПЭГ представляют собой дискретные ПЭГ, образующие единую молекулу с определенной и заданной длиной цепи. В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоль представляет собой мПЭГ.

[271] В некоторых вариантах осуществления T^1 включает единицу ПЭГ, которая включает одну или больше цепей ПЭГ. Цепи ПЭГ могут быть соединены друг с другом, например, в линейной, разветвленной или звездообразной конфигурации. Единица ПЭГ, помимо включения повторяющихся субъединиц ПЭГ, также может включать материал, не относящийся к ПЭГ (например, для облегчения связывания нескольких цепей ПЭГ друг с другом или для облегчения связывания с аминокислотой). Не относящийся к ПЭГ материал относится к атомам в цепи ПЭГ, которые не являются частью повторяющихся субъединиц $-CH_2CH_2O-$. В некоторых вариантах осуществления цепь ПЭГ может включать две мономерные цепи ПЭГ, соединенные друг с другом посредством не относящихся к ПЭГ элементов. В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ

может включать две линейные цепи ПЭГ, присоединенные к центральному ядру, которое присоединяется к аминокислоте (т.е. сама единица ПЭГ является разветвленной).

[272] Единица ПЭГ может быть ковалентно связана с линкером M^A (например, с аминокислотой в линкере M^A) через реакционноспособную группу. Реакционноспособные группы представляют собой группы, с которыми может быть связана активированная молекула ПЭГ (например, свободная амино- или карбоксильная группа). В некоторых вариантах осуществления N-концевые аминокислоты и лизины (K) содержат свободную аминогруппу; и C-концевые аминокислотные остатки содержат свободную карбоксильную группу. Сульфгидрильные группы (например, присутствующие на остатках цистеина) также могут использоваться в качестве реакционноспособной группы для присоединения ПЭГ.

[273] В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ может быть присоединена к линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A) при использовании метоксилированного ПЭГ ("мПЭГ"), имеющего различные реакционноспособные группы, включающие, без ограничения, сукцинимидилсукцинат (SS), сукцинимидилкарбонат (SC), мПЭГ-имидат, пара-нитрофенилкарбонат (NPC), сукцинимидилпропионат (SPA) и цианурхлорид. Примеры мПЭГ включают, без ограничения перечисленными, мПЭГ-сукцинимидилсукцинат (мПЭГ-СС), мПЭГ$_2$-сукцинимидилсукцинат (мПЭГ$_2$-СС), мПЭГ-сукцинимидилкарбонат (мПЭГ-СК), мПЭГ$_2$-сукцинимидилкарбонат (мПЭГ$_2$-СК), мПЭГ-имидат, мПЭГ-пара-нитрофенилкарбонат (мПЭГ-NPC), мПЭГ-имидат, мПЭГ$_2$-пара-нитрофенилкарбонат (мПЭГ$_2$-NPC), мПЭГ-сукцинимидилпропионат (мПЭГ-SPA), мПЭГ$_2$-сукцинимидилпропионат (мПЭГ$_2$-SPA), мПЭГ-N-гидроксисукцинимид (мПЭГ-NHS), мПЭГ$_2$-N-гидроксисукцинимид (мПЭГ$_2$-NHS), мПЭГ-цианурхлорид, мПЭГ$_2$-цианурхлорид, мПЭГ$_2$-лизинол-NPC и мПЭГ$_2$-Lys-NHS. Может использоваться широкий набор видов ПЭГ, и по существу может использоваться любой подходящий реакционноспособный ПЭГ-реагент. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный ПЭГ-реагент будет приводить к образованию карбаматной или амидной связи при присоединении к многофункциональному линкеру или линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A). Реакционноспособные ПЭГ-реагенты включают, без ограничения ими, мПЭГ$_2$-N-гидроксисукцинимид (мПЭГ$_2$-NHS), бифункциональный ПЭГ-пропиональдегид (мПЭГ$_2$-ALD), многоцепочечный ПЭГ, малеимид-содержащий ПЭГ (мПЭГ(MAL)2, мПЭГ$_2$(MAL)), мПЭГ-NH2, мПЭГ-сукцинимидилпропионат (мПЭГ-SPA), сукцинимид мПЭГ-бутановой кислоты (мПЭГ-SBA), мПЭГ-тиоэфиры, мПЭГ-двойные сложные эфиры, мПЭГ-BTC, мПЭГ-ButyrALD, мПЭГ-ацетальдегид диэтилацеталь (мПЭГ-ACET), гетерофункциональные ПЭГ (например, NH_2-ПЭГ-COOH, Boc-ПЭГ-NHS, Fmoc-ПЭГ-NHS, NHS-ПЭГ-винилсульфон (NHS-ПЭГ-VS) или NHS-ПЭГ-MAL), ПЭГ-акрилаты (ACRL-ПЭГ-NHS), ПЭГ-фосфолипиды (например, мПЭГ-DSPE), многолучевые ПЭГ серии SUNBRITE™, включая различные ПЭГ на основе глицерина, активированные с помощью химических методов, выбранных специалистами в данной области, любые ПЭГ, активированные SUNBRITE (в

том числе, без ограничения, карбокси-ПЭГ, p-NP-ПЭГ, трезил-ПЭГ, альдегидные ПЭГ, ацеталь-ПЭГ, амино-ПЭГ, тиол-ПЭГ, малеимидо-ПЭГ, гидроксил-ПЭГ-амин, амино-ПЭГ-СООК, гидроксил-ПЭГ-альдегид, ПЭГ по типу ангидрида карбоновой кислоты, функционализированный ПЭГ-фосфолипид, а также другие подобные и/или подходящие реакционноспособные ПЭГ.

[274] В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 6 субъединиц, по меньшей мере 7 субъединиц, по меньшей мере 8 субъединиц, по меньшей мере 9 субъединиц, по меньшей мере 10 субъединиц, по меньшей мере 11 субъединиц, по меньшей мере 12 субъединиц, по меньшей мере 13 субъединиц, по меньшей мере 14 субъединиц, по меньшей мере 15 субъединиц, по меньшей мере 16 субъединиц, по меньшей мере 17 субъединиц, по меньшей мере 18 субъединиц, по меньшей мере 19 субъединиц, по меньшей мере 20 субъединиц, по меньшей мере 21 субъединицу, по меньшей мере 22 субъединицы, по меньшей мере 23 субъединицы или по меньшей мере 24 субъединицы. В некоторых таких вариантах осуществления единица ПЭГ включает не больше чем приблизительно 72 субъединицы.

[275] В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 6 субъединиц, по меньшей мере 7 субъединиц, по меньшей мере 8 субъединиц, по меньшей мере 9 субъединиц, по меньшей мере 10 субъединиц, по меньшей мере 11 субъединиц, по меньшей мере 12 субъединиц, по меньшей мере 13 субъединиц, по меньшей мере 14 субъединиц, по меньшей мере 15 субъединиц, по меньшей мере 16 субъединиц, по меньшей мере 17 субъединиц, по меньшей мере 18 субъединиц, по меньшей мере 19 субъединиц или по меньшей мере 20 субъединиц.

[276] В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 6 субъединиц, по меньшей мере 7 субъединиц, по меньшей мере 8 субъединиц, по меньшей мере 9 субъединиц, по меньшей мере 10 субъединиц, по меньшей мере 11 субъединиц, по меньшей мере 12 субъединиц, по меньшей мере 13 субъединиц, по меньшей мере 14 субъединиц, по меньшей мере 15 субъединиц, по меньшей мере 16 субъединиц, по меньшей мере 17 субъединиц или по меньшей мере 18 субъединиц.

[277] В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 6 субъединиц, по меньшей мере 7 субъединиц, по меньшей мере 8 субъединиц, по меньшей мере 9 субъединиц, по меньшей мере 10 субъединиц, по меньшей мере 11 субъединиц или по меньшей мере 12 субъединиц.

[278] В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 8 субъединиц, по меньшей мере 9 субъединиц, по меньшей мере 10 субъединиц, по меньшей мере 11 субъединиц или по меньшей мере 12 субъединиц.

[279] В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ включает по меньшей мере 6 субъединиц, по меньшей мере 7 субъединиц или по меньшей мере 8 субъединиц.

[280] В некоторых вариантах осуществления линейная единица ПЭГ представляет собой:

(i) $-\sim-Y_{71}-(CH_2CH_2O)_{d9}-Y_{72}$;

(ii) $-\sim-Y_{71}-(CH_2CH_2O)_{d10}-Y_{73}-(CH_2CH_2O)_{d10}-Y_{72}$; или

(iii) $-\sim-Y_{71}-(CH_2CH_2O)_{d10}\left(Y_{73}-(CH_2CH_2O)_{d10}\right)_{d_{11}}Y_{72}$,

где;

$\sim$ обозначает положение присоединения к линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A);

Y_{71} является единицей присоединения ПЭГ;

Y_{72} является единицей кэпирования ПЭГ;

Y_{73} является единицей сшивания ПЭГ (т.е. для сшивания множества цепей субъединиц ПЭГ друг с другом);

d_9 является целым числом от 2 до 72;

каждое d_{10} независимо является целым числом от 1 до 72; и

d_{11} является целым числом от 2 до 5.

[281] В некоторых вариантах осуществления d_9 является целым числом от 2 до 24. В некоторых вариантах осуществления d_9 является целым числом от 4 до 24. В некоторых вариантах осуществления d_9 является целым числом от 6 до 24, от 8 до 24, от 10 до 24 или от 12 до 24.

[282] В некоторых вариантах осуществления в единице ПЭГ присутствует по меньшей мере 6 субъединиц ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления в единице ПЭГ присутствует по меньшей мере 8 субъединиц ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления в единице ПЭГ присутствует по меньшей мере 10 субъединиц ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления в единице ПЭГ присутствует по меньшей мере 12 субъединиц ПЭГ.

[283] В некоторых вариантах осуществления d_9 равно 8 или приблизительно 8, 12 или приблизительно 12, 24 или приблизительно 24.

[284] В некоторых вариантах осуществления каждый Y_{72} независимо представляет собой $-C_{1-10}$ алкил, $-C_{2-10}$ алкил-CO_2H, $-C_{2-10}$ алкил-OH, $-C_{2-10}$ алкил-NH_2, $-C_{2-10}$ алкил-$NH(C_{1-3}$ алкил) или C_{2-10} алкил-$N(C_{1-3}$ алкил$)_2$.

[285] В некоторых вариантах осуществления Y_{72} представляет собой $-C_{1-10}$ алкил, $-C_{2-10}$ алкил-CO_2H, $-C_{2-10}$ алкил-OH или $-C_{2-10}$ алкил-NH_2.

[286] В некоторых вариантах осуществления единица сшивания ПЭГ является частью единицы ПЭГ и является не относящимся к ПЭГ материалом, который обеспечивает соединение двух или больше цепей повторяющихся субъединиц CH_2CH_2O-. В некоторых вариантах осуществления единица сшивания ПЭГ Y_{73} представляет собой $-C_{2-10}$ алкил-C(O)-NH-, $-C_{2-10}$ алкил-NH-C(O)-, $-C_{2-10}$ алкил-NH-, $-C_{2-10}$ алкил-C(O)-, $-C_{2-}$

$_{10}$алкил-O- или -C_{2-10} алкил-S-.

[287] В некоторых вариантах осуществления каждый Y_{73} независимо представляет собой -C_{1-10} алкил-C(O)-NH-, -C_{1-10} алкил-NH-C(O)-, -C_{2-10} алкил-NH-, -C_{2-10} алкил-O-, -C_{1-10} алкил-S- или -C_{1-10} алкил-NH-.

[288] В некоторых вариантах осуществления единица присоединения ПЭГ является частью единицы ПЭГ и обеспечивает соединение единицы ПЭГ с линкером M^A (например, с аминокислотой в линкере M^A). В некоторых вариантах осуществления аминокислота имеет функциональную группу, которая образует связь с единицей ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления функциональные группы для присоединения единицы ПЭГ к аминокислоте включают сульфгидрильные группы для образования дисульфидных связей или тиоэфирных связей, альдегидные, кетоновые или гидразиновые группы для образования гидразонных связей, гидроксиламин для образования оксимных связей, карбоксильные или аминогруппы для образования пептидных связей, карбоксильные или гидроксильные группы для образования сложноэфирных связей, сульфокислоты для образования сульфонамидных связей, спирты для образования карбаматных связей и амины для образования сульфонамидных связей или карбаматных связей, или амидных связей. В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ может быть присоединена к аминокислоте, например, посредством дисульфидной, тиоэфирной, гидразоновой, оксимной, пептидной, сложноэфирной, сульфонамидной, карбаматной или амидной связи. В некоторых вариантах осуществления реакция присоединения единицы ПЭГ может быть реакцией циклоприсоединения, присоединения, присоединения/элиминирования или реакцией замещения, или их комбинацией, если это применимо.

[289] Примеры линейных единиц ПЭГ включают:

(i)

; (ii)

;

(iii)

;

(iv)

; и

(v)

,

где обозначает положение приложения к Мультифункциональному линкеру или линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A), и каждое d_9 независимо является целым числом от 4 до 24, от 6 до 24, от 8 до 24, от 10 до 24, от 12 до 24, от 14 до 24 или от 16 до 24.

[290] В некоторых вариантах осуществления d_9 составляет приблизительно 8, приблизительно 12 или приблизительно 24. В некоторых вариантах осуществления d_9

составляет приблизительно 8.

[291] В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ имеет массу от приблизительно 300 Да до приблизительно 5 кДа; от приблизительно 300 Да до приблизительно 4 кДа; от приблизительно 300 Да до приблизительно 3 кДа; от приблизительно 300 Да до приблизительно 2 кДа; или от приблизительно 300 Да до приблизительно 1 кДа. В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ содержит по меньшей мере 6 субъединиц или по меньшей мере 8, 10 или 12 субъединиц. В некоторых вариантах осуществления единица ПЭГ содержит по меньшей мере 6 субъединиц или по меньшей мере 8, 10 или 12 субъединиц, но не больше 24 субъединиц.

[292] В некоторых вариантах осуществления подходящие полиэтиленгликоли могут иметь свободную гидроксильную группу на каждом конце молекулы полимера или могут иметь одну гидроксильную группу, этерифицированную низшим алкилом, например, метильную группу. В некоторых вариантах осуществления подходящие полиэтиленгликоли представляют собой производные полиэтиленгликолей, имеющие этерифицируемые карбоксильные группы. В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоли доступны в продаже под торговым наименованием ПЭГ, обычно в виде смесей полимеров, характеризуемых средней молекулярной массой. В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоли имеют среднюю молекулярную массу от приблизительно 300 до приблизительно 5000. В некоторых вариантах осуществления полиэтиленгликоли имеют среднюю молекулярную массу от приблизительно 600 до приблизительно 1000.

[293] В некоторых вариантах осуществления примеры гидрофильных групп, которые подходят для конъюгатов, каркасов и способов, раскрытых в настоящем документе, можно найти, например, в US 8,367,065, колонке 13; US 8524696, колонке 6; WO 2015/057699 и WO 2014/062697, содержание которых настоящим полностью включено посредством отсылки.

Фрагмент лекарственного средства агониста STING (Переменная D)

[294] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING (D) является соединением Формулы (A):

(A)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

каждый Y_1, Y_2, Z_1 и Z_2 независимо представляет собой O, S, C или N;

каждый X_1, X_2, W_1 и W_2 независимо представляет собой C или N;

каждый X_3 и X_4 независимо представляет собой S или NR^f;

X_5 представляет собой N или CR^{A2};

X_6 представляет собой N или CR^{A1};

каждый R^3 и R^5 независимо представляет собой $-CON(R^d)(R^f)$, $-CH_2N(R^d)(R^f)$, $-N(R^d)(R^f)$, $-N(R^d)CO(R^f)$, $-CH_2N(R^d)CO(R^f)$, или один из R^3 и R^5 представляет собой $-CON(R^d)(R^f)$, $-CH_2N(R^d)(R^f)$, $-N(R^d)(R^f)$, $-N(R^d)CO(R^f)$ or $-CH_2N(R^d)CO(R^f)$, и другой из R^3 и R^5 представляет собой H,-COOH или $-CO_2$ (R^C);

R^C представляет собой C_{1-4} алкил;

каждый R^{A2} и R^{A1} независимо представляет собой H, галоген, гидрокси, амино, амино (C_{1-4} алкил)-, необязательно замещенный (C_{1-6} алкил), или необязательно замещенный (C_{1-6} алкил)окси-, где C_{1-6} алкил в указанном необязательно замещенном (C_{1-6} алкиле) или необязательно замещенный (C_{1-6} алкил)окси- необязательно замещен 1-4 заместителями, каждый из которых независимо выбран из группы, включающей гидроксил, C_{1-4} алкоксил, $-N(R^e)(R^f)$, $-CO_2(R^f)$, $-CON(R^e)(R^f)$ и -COOH;

каждый R^d независимо представляет собой H, гидрокси или C_{1-4} алкил;

R^e выбран из H, (C_{1-4} алкила), $-CO(C_{1-4}$ алкила), $-OCO(C_{1-4}$ алкила) и $-CO_2(C_{1-4}$ алкила);

каждый R^f независимо представляет собой H, гидрокси или (C_{1-4} алкил);

каждый R^{14} и R^{C2} независимо отсутствует или является C_{1-4} алкилом, где C_{1-4} алкил необязательно замещен заместителем, выбранным из галогена, $-OR^c$, $-NR^cR^d$, $-CO_2R^c$, $-CONR^cR^d$, $-SO_2NR^cR^d$ и $-OCONR^cR^d$;

каждый R^{16} и R^{C1} независимо отсутствует или представляет собой H или C_{1-4} алкил; и

каждый R^{15}, R^{17}, R^{18} или R^{19} независимо отсутствует или представляет собой H или C_{1-4} алкил, где C_{1-4} алкил необязательно замещен заместителем, выбранным из галогена, $-OR^c$, $-NR^cR^d$, $-CO_2R^c$, $-CONR^cR^d$,$-SO_2NR^cR^d$ и $-OCONR^cR^d$;

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[295] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-a):

(A-a)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

Y_1, Y_2, Z_1, Z_2, X_1, X_2, W_1, W_2, X_3, X_4, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18} и R^{19} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

R^{A2} представляет собой галоген, гидроксил, необязательно замещенный (C_{1-6} алкил), замещенный (C_{1-6} алкил)окси-, необязательно замещенный (C_{1-6} алкил)амино- или необязательно замещенный (C_{1-6} алкил)(C_{1-4} алкил)амино-, где C_{1-6} алкил в указанном необязательно замещенном (C_{1-6} алкиле) или замещенном (C_{1-6} алкил)окси- необязательно замещен 1-4 заместителями, каждый из которых независимо выбран из группы, включающей гидроксил, C_{1-4} алкоксил, $-N(R^e)(R^f)$, $-CO_2(R^f)$, $-CON(R^e)(R^f)$ и -COOH;

где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[296] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-b):

(A-b)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

Y_1, Y_2, Z_1, Z_2, X_1, X_2, W_1, W_2, X_4, X_5, X_6, R^3, R^5, R^C, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18} и R^{19} имеют значение, определенное в Формуле (A);

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[297] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-c):

(A-c)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

Y_2, Z_2, X_2, W_2, X_3, X_4, X_5, X_6, R^3, R^5, R^C, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18} и R^{19} имеют значение, определенное в Формуле (A);

где один из W_1, X_1, Y_1 и Z_1 представляет собой N, а дополнительные W_1, X_1, Y_1 и Z_1 представляют собой O, S или C;

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[298] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-d):

(A-d)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

Y_1, Y_2, Z_1, Z_2, X_1, X_2, W_1, W_2, X_3, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{A2}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18} и R^{19} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[299] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-e):

(A-e)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

Y_1, Y_2, Z_1, Z_2, X_1, X_2, X_3, W_1, W_2, R^{A1}, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18} и R^{19} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_6 представляет собой CR^{A1}; и

где: (i) R^{A1} связан с L^D через функциональную группу R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[300] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-f):

(A-f)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^C, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^f, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{C2} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A), и

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[301] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-f1):

(A-f1)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, X_3, X_4, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{16}, R^{A2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{C2} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[302] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-f2):

(A-f2)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, X_4, X_5, X_6, W_2, Y_2, Z_2 R^3, R^5, R^C, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^{C1}, R^{C2}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19} и R^f имеют значение, определенное в Формуле (A);

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[303] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-f3):

(A-f3)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, X_4, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{16}, R^{A2}, R^{C2}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[304] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-f4):

(A-f4)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, X_4, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{16}, R^{A2}, R^{C2}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей

мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[305] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-f5):

(A-f5)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{16}, R^{A2}, R^{C2}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[306] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-g):

(A-g)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_3, X_4, X_5, X_6, R_3, R_5, R^C, R^{A2}, R^{A1}, R^{C2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^d, R^e, R^f, R^{16} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

каждый Y_2 и Z_2 независимо представляет собой O, S, C или N;

каждый X_2 и W_2 независимо представляет собой C или N;

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[307] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-g1):

(A-g1)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, W_2, Y_2, Z_2, X_3, X_4, X_5, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{A2}, R^{C2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{16} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A); где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[308] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-g2):

(A-g2)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, X_4, X_5, X_6, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^C, R^{A2}, R^{A1}, R^{C2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^d, R^e, R^f, R^{16} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[309] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-g3):

(A-g3)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, X_4, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^C, R^{A2}, R^{C2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{16} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}; и

необязательно, где R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}.

[310] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-g4):

(A-g4)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, X_4, W_2, Y_2, Z_2 R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{A2}, R^{C2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{16} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[311] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-g5):

(A-g5)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_2, W_2, Y_2, Z_2, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{A2}, R^{C2}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{16} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

где: (i) R^{A2} связан с L^D через функциональную группу R^{A2}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[312] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-h):

(A-h)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_1, W_1, Y_1, Z_1, X_3, X_4, X_5, X_6, R^3, R^5, R^C, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{15}, R^{18}, R^{19}, R^{16} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A); где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[313] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-h1):

(A-h1)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_1, X_3, W_1, Y_1, Z_1, X_5, X_6, R^3, R^5, R^C, R^{A2}, R^{A1}, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{15}, R^{18}, R^{19}, R^{16} и R^{C1} имеют значение, определенное в Формуле (A);

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[314] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING является соединением Формулы (A-h2):

(A-h2)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

X_1, X_3, W_1, Y_1, Z_1, R^3, R^5, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{A2}, R^{14}, R^{15}, R^{18}, R^{19}, R^{16} и R^{C1} имеют

значение, определенное в Формуле (A);

X_5 представляет собой CR^{A2}; и

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[315] В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства агониста STING (D) является соединением Формулы (A), где соединение имеет Формулу (A-i):

(A-i)

или его пролекарством, сольватом, фармацевтически приемлемой солью или таутомером, где:

Y_1, Y_2, Z_1, Z_2, X_1, X_2, X_3, X_6, W_1, W_2, R^{A1}, R^{A2}, R^C, R^d, R^e, R^f, R^{14}, R^{C2}, R^{16}, R^{C1}, R^{15}, R^{17}, R^{18} и R^{19} имеют значение, определенное в Формуле (A); и

где: (i) по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{A2} и R^{A1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{A2} и/или R^{A1}; или (ii) по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} присутствует, и где по меньшей мере один из R^{C2} и R^{C1} связан с L^D по меньшей мере через одну функциональную группу R^{C2} и/или R^{C1}.

[316] В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент лекарственного средства агониста STING (D) независимо представляет собой:

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

или

;

где:

R^2 отсутствует или представляет собой -O- или $-NR^4-$; R^4 представляет собой H или C_{1-3} алкил; и $-\!\!\!\!\!\!\sim$ обозначает присоединение к L^D.

[317] В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент лекарственного средства агониста STING (D) независимо:

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

;

или

;

где:

R^2 отсутствует или представляет собой -O- или $-NR^4-$; R^4 представляет собой H или C_{1-3} алкил; и $-\!\!\!

;

;

;

;

или

;

где:

R^2 отсутствует или представляет собой -O- или $-NR^4-$; R^4 представляет собой H или C_{1-3} алкил; и $-\!\!\!\!\!\!\sim$ обозначает присоединение к L^D.

[319] В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент лекарственного средства агониста STING (D) независимо представляет собой:

;

;

;

или

;

где:

R^2 отсутствует или представляет собой -O- или $-NR^4-$; R^4 представляет собой H или C_{1-3} алкил; и $-\!\!\!\!\!\!\sim$ обозначает присоединение к L^D.

[320] В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент лекарственного средства агониста STING (D) независимо представляет собой:

;

или

;

где:

R^2 отсутствует или представляет собой -O- или $-NR^4-$; R^4 представляет собой H или C_{1-3} алкил; и $-\!\!\!

направлять конъюгат на клетки ретикулярной эндотелиальной или лимфатической системы или на специализированные фагоцитирующие клетки, такие как макрофаги или эозинофилы. В некоторых вариантах осуществления сам конъюгат также может быть эффективной системой доставки без необходимости специфического таргетинга.

[322] В некоторых вариантах осуществления молекула распознавания на основе белка может направлять конъюгат в участок внутри клетки, такой как, например, ядро, цитоплазма или эндосома. В некоторых вариантах осуществления молекула распознавания на основе белка может усиливать клеточное связывание с рецепторами или цитоплазматический транспорт в ядро и проникновение в ядро, или высвобождение из эндосом или других внутриклеточных везикул.

[323] В некоторых вариантах осуществления молекула распознавания на основе белка представляет собой антитело, фрагмент антитела, белок, пептид или пептидомиметик.

[324] В некоторых вариантах осуществления молекула распознавания на основе белка является антителом. В некоторых вариантах осуществления молекула распознавания на основе белка является фрагментом антитела. В некоторых вариантах осуществления молекула распознавания на основе белка является белком. В некоторых вариантах осуществления молекула распознавания на основе белка является пептидом. В некоторых вариантах осуществления молекула распознавания на основе белка является пептидомиметиком.

[325] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела является антителом или фрагментом антитела, в котором одна или больше аминокислот соответствующего исходного антитела или фрагмента антитела (например, соответствующего антитела или фрагмента антитела дикого типа) заменены цистеинами (например, цистеинами, введенными с помощью методов генной инженерии). В некоторых вариантах осуществления исходное антитело или фрагмент антитела могут быть дикого типа или мутантными.

[326] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела могут быть мутантным антителом или фрагментом антитела. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело, известное в уровне техники, создан с помощью методов генной инженерии с получением антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела (например, Fab-фрагмент антитела), известного в уровне техники, создан с помощью методов генной инженерии с получением фрагмента антитела (например, Fab-фрагмента антитела с введенным методами генной инженерии цистеином). В некоторых вариантах осуществления мутация на одном сайте Fab дает один остаток в Fab, тогда как мутация на одном сайте антитела дает две аминокислоты в полученном антителе вследствие димерной природы антитела IgG.

[327] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела сохраняет антигенсвязывающую способность своего соответствующего антитела или фрагмента антитела дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитело или

фрагмент антитела способны связываться с одним или больше антигенами для соответствующего антитела или фрагмента антитела дикого типа.

[328] В некоторых вариантах осуществления иллюстративные антитела или антитела, полученные из Fab, Fab2, scFv или фрагментов антител верблюдовых из тяжелых цепей, специфичных к маркерам клеточной поверхности, включают, без ограничения перечисленным, 5T4, AOC3, ALK, AXL, B7-H4, C242, C4.4a, CA-125, CCL11, CCR 5, CD2, CD3, CD4, CD5, CD15, CA15-3, CD18, CD19, CA19-9, CDH6, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD30, CD31, CD33, CD37, CD38, CD40, CD41, CD44, CD44 v6, CD51, CD52, CD54, CD56, CD62E, CD62P, CD62L, CD70, CD74, CD79-B, CD80, CD125, CD103, CD138, CD141, CD147, CD152, CD 154, CD326, CEA, CEACAM-5, клампинг-фактор, Clec9A, CSFR1, CTLA-4, CXCR2, DEC205, EGFR (HER1), ErbB1, ErbB2, ErbB3, EpCAM, EPHA2, EPHB2, EPHB4, FAP, FGFR (т.е. FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4), FLT3, фибронектин-EDB, рецептор фолата, GD2, GD3, GPNMB, GCC (GUCY2C), HGF, HER2, HER3, HMI.24, ICAM, ICOS-L, рецептор IGF-1, VEGFR1, EphA2, TRPV1, CFTR, gpNMB, CA9, Cripto, c-KIT, c-MET, ACE, APP, адренергический рецептор-бета 2, клацдин 3, LIV1, LY6E, Mesothelin, MUC1, MUC13, NaPi2b, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, RON, ROR1, PD-L1, PD-L2, PTK7, B7-H3, B7-B4, рецептор IL-2, рецептор IL-4, рецептор IL-13, TROP-2, frizzled-7, интегрины (включающие интегрины α_4, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_1\beta_4$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_{IIb}\beta_3$), IFN-α, IFN-γ, IgE, IgE, рецептор IGF-1, IL-1, IL-12, IL-23, IL-13, IL-22, IL-4, IL-5, IL-6, рецептор интерферона, ITGB2 (CD18), LFA-1 (CD11a), CD11b, L-селектин (CD62L), муцин, миостатин, NCA-90, NGF, PDGFRα, фосфатидилсерин, клетку карциномы предстательной железы, Pseudomonas aeruginosa, бешенство, RANKL, респираторно-синцитиальный вирус, резус-фактор, SLAMF7, сфингозин-1-фосфат, TAG-72, Т-клеточный рецептор, тенасцин C, TGF-1, TGF-β 2, TGF-β, ФНО-α, TRAIL-R1, TRAIL-R2, опухолевый антиген CTAA16.88, VEGF-A, VEGFR2, виментин и т.п.

[329] В некоторых вариантах осуществления антитела или антитело, полученное из Fab, Fab2, scFv или фрагментов антитела верблюдовых из тяжелых цепей, специфичных к маркерам клеточной поверхности, включают CA-125, C242, CD3, CD11b, CD19, CD22, CD25, CD30, CD31, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD54, CD56, CD62E, CD62P, CD62L, CD70, CD103, CD138, CD141, CD326, CEA, Clec9A, CSFR1, CTLA-4, DEC205, EGFR (HER1), ErbB2, ErbB3, FAP, фибронектин-EDB, рецептор фолата, рецептор IGF-1, GD3, GPNMB, HGF, HER2, VEGF-A, VEGFR2, VEGFR1, EphA2, EpCAM, 5T4, PTK7, TAG-72, тенасцин C, TRPV1, CFTR, gpNMB, CA9, Cripto, ТУЗ, APP, PDGFR α, фосфатидилсерин, клетки рака предстательной железы, адренергический рецептор-бета 2, клаудин 3, муцин, MUC1, NaPi2b, B7H3, B7H4, C4.4a, CEACAM-5, MUC13, TROP-2, frizzled-7, мезотелин, рецептор IL-2, рецептор IL-4, рецептор IL-13 и интегрины (включающие интегрины $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_1\beta_4$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$), тенасцин C, TRAIL-R2 и виментин.

[330] В некоторых вариантах осуществления антитела направлены к маркерам клеточной поверхности 5T4, CA-125, CEA, CDH6, CD3, CD11b, CD19, CD20, CD22, CD30,

CD33, CD40, CD44, CD51, CD 103, CTLA-4, CEACAM5, Clec9A, CSFR1, DEC205, EpCAM, HER2, EGFR (HER1), FAP, фибронектин-EDB, рецептор фолата, GCC ($GUCY_2C$), HGF, интегрин $\alpha_v\beta_3$, интегрин $\alpha_5\beta_1$, рецептор IGF-1, GD3, GPNMB, муцин, LIV1, LY6E, мезотелин, MUC1, MUC13, NaPi2b, PTK7, фосфатидилсерин, клетки рака предстательной железы, PDGFR α, TAG-72, тенасцин C, TRAIL-R2, VEGF-A и VEGFR2. В этом варианте осуществления антитела включают, без ограничения перечисленными, абаговомаб, адекатумумаб, алацизумаб, альтумомаб, анатумомаб, арцитумомаб, бавитуксимаб, бевацизумаб (Авастин®), биватузумаб, блинатумомаб, брентуксимаб, кантузумаб, катумаксомаб, капромаб, цетуксимаб, цитатузумаб, кливатузумаб, конатумумаб, дацетузумаб, эдреколомаб, эпратузумаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, фарлетузумаб, фигитумумаб, гемтузумаб, глембатумумаб, ибритумомаб, иговомаб, интетумумаб, инотузумаб, лабетузумаб, лексатумумаб, линтузумаб, лукатумумаб, матузумаб, митумомаб, наптумомаб эстафенатокс, нецитумумаб, опортузумаб, ореговомаб, панитумумаб, пемтумомаб, пертузумаб, притумумаб, ритуксимаб (Ритуксан®), рилотумумаб, робатумумаб, сатумомаб, сибротузумаб, таплитумомаб, тенатумомаб, тицилимумаб (тремелимумаб), тигатузумаб, трастузумаб (Герцептин®), тозитумомаб, тремелимимаб, тукотузумаб целмолейкин, волоциксимаб и залутумумаб.

[331] В некоторых вариантах осуществления антителами, направленными на маркеры клеточной поверхности, в случае HER2 являются пертузумаб или трастузумаб, и антителом к EGFR (HER1) является цетуксимаб или панитумумаб; и антителом к CD20 является ритуксимаб, а к VEGF-A - бевацизумаб, и антителом к CD-22 является эпратузумаб или велтузумаб, и антителом к CEA является лабетузумаб.

[332] Примеры пептидов или пептидомиметиков включают пептиды, направленные на интегрины (RGD пептиды), пептиды, направленные на рецептор ГнРГ, пептиды, направленные на рецептор ErbB2 (HER2), пептиды, направленные на простатический специфический мембранный антиген (ПСМА), направленные на рецептор липопротеинов LRP1, пептиды производные аполипопротеина ApoE, пептиды из аполипопротеина ApoA, пептиды, направленные на рецептор соматостатина, пептиды производные хлоротоксина и бомбезин.

[333] В некоторых вариантах осуществления пептиды или пептидомиметики являются пептидами, направленными на рецептор ГнРГ, и пептидами, направленными на рецептор ErbB2 (HER2).

[334] Иллюстративные белки включают инсулин, трансферрин, гамма-фрагмент фибриногена, тромбоспондин, клаудин, аполипопротеин E, молекулы Affibody, такие как, например, ABY-025, белки с анкириновыми повторами, белки с анкирин-подобными повторами и синтетические пептиды.

[335] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белка-лекарственного средства включают цитотоксины широкого спектра в комбинации с маркерами клеточной поверхности к HER2, такими как, например, пертузумаб или трастузумаб; к EGFR, такими как цетуксимаб и панитумумаб; к CEA, такими как лабетузумаб; к CD20, такими как

ритуксимаб; к VEGF-A, такими как бевацизумаб; или к CD-22, такими как эпратузумаб или велтузумаб.

[336] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белка-лекарственного средства или белковые конъюгаты, применяемые в изобретении, включают комбинации двух или больше молекул распознавания на основе белка, такие как, например, комбинацию биспецифичных антител, направленных на рецептор EGF (EGFR) на опухолевых клетках и на CD3 и CD28 на Т-клетках; комбинацию антител или антитела, полученного из фрагментов Fab, Fab2, scFv или антитела из тяжелых цепей верблюдовых, и пептидов или пептидомиметиков; комбинацию антител или антитела, полученных из Fab, Fab2, scFv или фрагментов антител верблюдовых из тяжелых цепей, и белков; комбинацию двух биспецифичных антител, таких как биспецифичные антитела к CD3-CD19 плюс CD28-CD22.

[337] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белка-лекарственного средства или белковые конъюгаты, применяемые в настоящем изобретении, включают распознающие молекулы на основе белков, которые представляют собой антитела против антигенов, такие как, например, трастузумаб, цетуксимаб, ритуксимаб, бевацизумаб, эпратузумаб, велтузумаб, лабетузумаб, B7-H4, B7-H3, CD11b, CD103, CA125, CDH6, CD33, CXCR2, CEACAM5, Clec9A, CSFR1, DEC205, EGFR, FAP, фибронектин-EDB, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GCC (GUCY2C), HER2, LIV1, LY6E, NaPi2b, c-Met, мезотелин, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PD-L1, PTK7, c-Kit, MUC1, MUC13 и 5T4.

[338] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белка-лекарственного средства или белковые конъюгаты согласно изобретению включают распознающие молекулы на основе белков, которые представляют собой антитела к CSRF1, CD11b, DEC205, clec9A, CD103, B7H4, мезотелину, PTK7, Ly6E, FAP, фибронектину-EDB, Her-2 или NaPi2b.

Антитела к NaPi2b

[339] В некоторых вариантах осуществления антитела к NaPi2b, подходящие для конъюгирования, связываются с внеклеточной областью SLC34A2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены NaPi2b-направленные моноклональные антитела, которые специфично распознают NaPi2b, также известный как натрий-зависимый белок-транспортер фосфата 2B. В некоторых вариантах осуществления антитела к NaPi2b, применяемые в конъюгатах, раскрытых в настоящем документе, способны и могут применяться для модулирования, например блокирования, ингибирования, снижения, антагонизма, нейтрализации или иного нарушения, по меньшей мере одной биологической активности NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, также включают антитела, которые связывают растворимый NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления антитела к NaPi2b специфично связываются с эпитопом на внеклеточном домене (ECD) человеческого NaPi2b. Такие антитела в совокупности именуются в настоящем документе

"NaPi2b" антителами.

[340] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты NaPi2b антитела-лекарственного средства, предложенные в настоящем документе, включают антитела, которые связываются с эпитопом NaPi2b с равновесной константой диссоциации (K_d или K_D) ≤1 мкМ (например, ≤100 нМ; ≤10 нМ; и ≤1 нМ). В некоторых вариантах осуществления антитела к NaPi2b, применяемые в конъюгатах антитела-лекарственного средства, раскрытых в настоящем документе, демонстрируют K_d в пределах от приблизительно ≤1 нМ до приблизительно 1 пМ.

[341] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты NaPi2b антитела-лекарственного средства, предложенные в настоящем документе, могут включать антитела, которые служат для модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения, антагонизма, нейтрализации или иного нарушения функциональной активности NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления функциональная активность NaPi2b включает, например, участие в абсорбции трансцеллюлярного неорганического фосфата (Pi), способствуя поддержанию гомеостаза фосфата в организме. В некоторых вариантах осуществления антитела к NaPi2b полностью или частично ингибируют функциональную активность NaPi2b путем частичного или полного модулирования, блокирования, ингибирования, снижения, антагонизма, нейтрализации или иного нарушения абсорбции трансцеллюлярного неорганического фосфата.

[342] В некоторых вариантах осуществления считается, что антитела к NaPi2b полностью модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, антагонистически действуют, нейтрализуют или иным образом нарушают функциональную активность NaPi2b, если уровень функциональной активности NaPi2b в присутствии антитела NaPi2b снижается на по меньшей мере на 95%, например, на 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, по сравнению с уровнем функциональной активности NaPi2b в отсутствие связывания с антителом NaPi2b, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления считается, что антитела к NaPi2b частично модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, антагонистически действуют, нейтрализуют или иным образом нарушают функциональную активность NaPi2b, если уровень активности NaPi2b в присутствии антитела NaPi2b снижается меньше чем на 95%, например, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или 90% по сравнению с уровнем активности NaPi2b в отсутствие связывания с антителом к NaPi2b, описанным в настоящем документе.

[343] В некоторых вариантах осуществления изобретения примеры антител, раскрытые в настоящем документе, включают антитело XMT-1535. Такие антитела проявляют специфичность в отношении человеческого NaPi2b, при этом было показано, что они ингибируют активность NaPi2b.

[344] Человеческое или гуманизированное моноклональное антитело к NaPi2b, XMT-1535, включает тяжелую цепь (HC), вариабельную область тяжелой цепи (VH), легкую цепь (LC) и вариабельную область легкой цепи (VL), как показано в аминокислотных последовательностях и соответствующих последовательностях

нуклеиновых кислот, представленных в Таблице I ниже. Вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи для каждого антитела заштрихованы в аминокислотных последовательностях ниже. Определяющие комплементарность области (CDR-области) тяжелой цепи и легкой цепи подчеркнуты в аминокислотных последовательностях, представленных ниже. Аминокислоты, охватывающие определяющие комплементарность области (CDR-области), антитела XMT-1535 раскрыты в патенте США 8,603,474.

Таблица I: Последовательности человеческого или гуманизированного моноклонального антитела к NaPi2b, XMT-1535

SEQ ID NO:	Описание последовательности
1	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи XMT-1535
2	Аминокислотная последовательность легкой цепи XMT-1535
3	Вариабельная область тяжелой цепи XMT-1535
4	Вариабельная область легкой цепи XMT-1535
5	CDRH1 XMT-1535
6	CDRH2 XMT-1535
7	CDRH3 XMT-1535
8	CDRL1 XMT-1535
9	XMT-1535 CDRL2

SEQ ID NO:	Описание последовательности
10	CDRL3 XMT-1535
11	Константная область тяжелой цепи IgG1 XMT-1535
12	Константная область легкой цепи XMT-1535
13	Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельной области тяжелой цепи XMT-1535
14	Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельной области легкой цепи XMT-1535
15	Полноразмерная последовательность NaPi2b человека

[345] Антитела, раскрытые в настоящем документе, специфично связываются с эпитопом на внеклеточном домене (ECD) NaPi2b человека.

[346] В некоторых вариантах осуществления специалистам в данной области будет известно, что без излишних экспериментов можно определить, обладает ли моноклональное антитело такой же специфичностью, что и моноклональное антитело, раскрытое в настоящем документе (например, XMT-1535, 10H1.11.4B), путем обнаружения, предотвращает ли первое антитело связывание последнего с его когнатным партнером по связыванию или с другой молекулой, которая, как известно, ассоциирована с NaPi2b. Если исследуемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом, описанным в настоящем документе, что подтверждается снижением связывания моноклонального антитела, описанного в настоящем документе, то тогда два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом.

[347] Альтернативный способ определения, обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела, описанного в настоящем документе, заключается в предварительном инкубировании описанного в настоящем документе моноклонального антитела с растворимым NaPi2b (с которым оно обычно взаимодействует), и последующем добавлении тестируемого моноклонального антитела,

чтобы определить, ингибируется ли способность тестируемого моноклонального антитела связывать NaPi2b. Если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, то тогда, по всей вероятности, оно обладает такой же или функционально эквивалентной эпитопной специфичностью, как моноклональное антитело, описанное в настоящем документе.

[348] Скрининг моноклональных антител, раскрытых в настоящем документе, также можно проводить, например, путем измерения NaPi2b-опосредованной активности и определения, способно ли тестируемое моноклональное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, уменьшать, антагонистически действовать, нейтрализовывать или иным образом препятствовать активности NaPi2b.

[349] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или больше идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 4.

[350] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

[351] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 4.

[352] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, раскрытые в настоящем документе, включают аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 2.

[353] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 9 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 10.

[354] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; CDRH2, которая включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6; CDRH3, которая включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; CDRL1, которая включает аминокислотную последовательность, которая на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%. 98%, 99% или больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; CDRL2, которая включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; и CDRL3, которая включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, на 99% или больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[355] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают одну или больше консервативных аминокислотных замен в последовательности вариабельного домена, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше консервативных замен в последовательности вариабельного домена. В некоторых вариантах осуществления такие консервативные аминокислотные замены находятся в CDR-области, например, во всех CDR в общей сложности сделано 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше консервативных замен, а в некоторых конкретных вариантах осуществления в каждой CDR последовательности может присутствовать до 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен, например, SEQ ID NO: 5-10.

[356] В некоторых вариантах осуществления специалистам в данной области техники будет известно, что без излишних экспериментов можно определить, обладает ли моноклональное антитело той же специфичностью, что и моноклональное антитело XMT-1535, путем обнаружения, предотвращает ли первое антитело связывание последнего с когнатным партнером по связыванию или другой молекулой, которая, как известно, ассоциирована с NaPi2b. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом, описанным в настоящем документе, что подтверждается снижением связывания моноклонального антитела, описанного в настоящем документе, то два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом.

[357] В некоторых вариантах осуществления альтернативный способ определения, обладает ли моноклональное антитело специфичностью описанного в настоящем документе моноклонального антитела, заключается в предварительном инкубировании моноклонального антитела, описанного в настоящем документе, с растворимым NaPi2b (с

которым оно обычно взаимодействует), и последующем добавлении тестируемого моноклонального антитела, чтобы определить, ингибируется ли способность тестируемого моноклонального антитела связывать NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления, если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, то тогда оно обладает такой же или функционально эквивалентной эпитопной специфичностью, как моноклональное антитело, раскрытое в настоящем документе.

[358] Скрининг моноклональных антител, раскрытых в настоящем документе, также может быть проведен, например, путем измерения NaPi2b-опосредованной активности и определения, способно ли тестируемое моноклональное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, уменьшать, антагонистически действовать, нейтрализовывать или иным образом препятствовать активности NaPi2b.

[359] В некоторых вариантах осуществления антитела к NaPi2b, подходящие для конъюгирования, могут быть получены и очищены с помощью хорошо известных методик, например, в WO 2009/097128, WO 2017/160754 и US 16/136,706, которые включены в настоящий документ во всей своей полноте посредством отсылки.

Антитела к HER2

[360] В некоторых вариантах осуществления подходящие для конъюгирования антитела к HER2 связывают HER2 человека в растворимой форме или в мембраносвязанной форме (т.е. при экспрессии на клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены моноклональные антитела, которые связывают HER2 и являются гуманизированными или полностью человеческими. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены моноклональные антитела, которые специфично связываются с HER2. Такие антитела в совокупности именуются в настоящем документе "HER2" антителами.

[361] В некоторых вариантах осуществления антитела к HER2, подходящие для конъюгирования, связываются с эпитопом HER2 с равновесной константой диссоциации (K_d или K_D) ≤1 мкМ (например, ≤100 нМ; ≤10 нМ; ≤1 нМ). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены моноклональные антитела, которые связывают HER2 и являются гуманизированными или полностью человеческими, например, антитела к HER2, предложенные в настоящем документе, демонстрируют K_d в пределах от приблизительно ≤1 нМ до приблизительно 1 пМ.

[362] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к HER2, раскрытые в настоящем документе, служат для модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения, антагонистического действия, нейтрализации или иного нарушения функциональной активности HER2. В некоторых вариантах осуществления функциональная активность HER2 включает, например, модуляцию активности пути PI3K-Akt. В некоторых вариантах осуществления антитела к HER2 полностью или частично ингибируют функциональную активность HER2 путем частичного или полного модулирования, блокирования, ингибирования, снижения, антагонистического действия, нейтрализации или иного напрушения активности пути PI3K-Akt. Активность пути PI3K-

Akt оценивают при использовании любого известного в данной области метода определения активности пути PI3K-Akt, включающего, помимо прочего, определение уровней фосфорилированного Akt в присутствии и в отсутствие антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытых в настоящем документе.

[363] В некоторых вариантах осуществления предполагается, что антитела к HER2 полностью модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, антагонистически действуют, нейтрализуют или иным образом препятствуют функциональной активности HER2, если уровень функциональной активности HER2 в присутствии антитела к HER2 снижен по меньшей мере на 80%, например, на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с уровнем функциональной активности HER2 в отсутствие связывания с антителом к HER2, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что антитела HER2 частично модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, антагонистически действуют, нейтрализуют или иным образом препятствуют функциональной активности HER2, если уровень активности HER2 в присутствии антитела к HER2 снижен по меньшей на 95%, например, на 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или 90% по сравнению с уровнем активности HER2 в отсутствие связывания с антителом к HER2, описанным в настоящем документе.

[364] В некоторых вариантах осуществления изобретения примеры антител, раскрытые в настоящем документе, включают антитело XMT-1519. Это антитело проявляет специфичность в отношении HER2 человека и, как было показано, ингибирует функциональную активность HER2 in vitro.

[365] Моноклональное антитело к HER-2, XMT-1519, включает тяжелую цепь (HC), вариабельную область тяжелой цепи (VH), легкую цепь (LC) и вариабельную область легкой цепи (VL), как показано в аминокислотных последовательностях и соответствующих последовательностях нуклеиновых кислот, представленных в Таблице II ниже. Вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи каждого антитела заштрихованы в аминокислотных последовательностях ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи подчеркнуты в аминокислотных последовательностях, представленных ниже.

Таблица II: Последовательности человеческого или гуманизированного моноклонального антитела к HER2, XMT-1519

SEQ ID NO:	Описание последовательности
16	Полноразмерный рецептор HER2 человека
17	Вариабельная область тяжелой цепи XMT-1519
18	Константная область тяжелой цепи IgG1 XMT-1519
19	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи XMT-1519
20	CDRH1 XMT-1519
21	CDRH2 XMT-1519
22	CDRH3 XMT-1519
23	Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельной области тяжелой цепи XMT-1519

SEQ ID NO:	Описание последовательности
24	Вариабельная область легкой цепи XMT-1519
25	Константная область легкой цепи XMT-1519
26	Аминокислотная последовательность легкой цепи XMT-1519
27	XMT-1519 CDRL1
28	XMT-1519 CDRL2
29	XMT-1519 CDRL3
30	Последовательность нуклеиновой кислоты вариабельной области легкой цепи XMT-1519
31	Внеклеточный домен (ECD) рецептора HER2 человека

[366] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем документе, специфично связываются с эпитопом на полноразмерном рецепторе HER2 человека, включающем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[367] Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем документе, специфично связываются с эпитопом на внеклеточном домене (ECD) рецептора HER2 человека, включающем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

[368] В некоторых вариантах осуществления антитела согласно настоящему изобретению демонстрируют характеристики связывания HER2, отличающиеся от антител, описанных в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, связываются с другим эпитопом HER2, так как они перекрестно блокируют связывание друг друга, но не блокируют связывание трастузумаба, пертузумаба, Fab37 или chA21 с HER2. Кроме того, в отличие от известных антител, антитела, описанные в настоящем документе, могут эффективно интернализироваться в HER2-экспрессирующие клетки без стимуляции пролиферации клеток.

[369] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела, которые связываются с новыми эпитопами и/или обладают другими свойствами, благоприятными для их терапевтического применения. В некоторых вариантах осуществления примеры таких свойств включают, без ограничения ими, благоприятные характеристики связывания с раковыми клетками, экспрессирующими человеческий HER2 на высоких или низких уровнях, специфичное связывание с рекомбинантным HER2 человека и яванского макака, эффективную интернализацию при связывании с HER2, высокую способность к уничтожению раковых клеток, экспрессирующих высокие или низкие уровни HER2, при введении в виде конъюгата антитела-лекарственного средства

(ADC), не оказывают существенного агонистического действия на пролиферацию раковых HER2-экспрессирующих клеток и/или обеспечивают эффективный, опосредованный антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) лизис HER2-экспрессирующих клеток, а также любую комбинацию вышеперечисленных свойств.

[370] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает остатки 452-531 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, остатки 474-553 SEQ ID NO: 16 или остатки 452-531 SEQ ID NO: 31.

[371] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают, по меньшей мере, часть N-конца домена IV рецептора HER2 человека, но не демонстрируют перекрестной конкуренции с антителом, которое связывается с эпитопом 4D5 рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, не демонстрируют перекрестной конкуренции с трастузумабом за связывание с рецептором HER2 человека, поскольку, как известно, трастузумаб связывает эпитоп 4D5 рецептора HER2 человека. При использовании в настоящем документе термин эпитоп 4D5 рецептора HER2 человека относится к аминокислотным остаткам 529-627 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, остаткам 551-649 SEQ ID NO: 16 или остаткам 529-627 SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связывают по меньшей мере один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

[372] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает остатки 452-500 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, остатки 474-522 SEQ ID NO: 16 или остатки 452-500 SEQ ID NO: 31.

[373] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает по меньшей мере один из аминокислотных остатков, выбранных из аминокислотных остатков E521, L525 и R530 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например, остатки 543, 547 и 552 SEQ ID NO: 16 и остатки 521, 525 и 530 SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает по меньшей мере два аминокислотных остатка, выбранных из аминокислотных остатков E521, L525 и R530 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично

связываются с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, аминокислотные остатки E521, L525 и R530 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления любые или все из этих антител или их антигенсвязывающих фрагментов также связывают по меньшей мере один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

[374] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются, по меньшей мере, с частью домена III и, по меньшей мере, с частью N-конца домена IV рецептора HER2 человека, но не демонстрируют перекрестную конкуренцию с моноклональным антителом Fab37 или антителом, которое связывается с эпитопом 4D5 рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, не демонстрируют перекрестной конкуренции с моноклональным антителом Fab37 и/или трастузумабом за связывание с рецептором HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связывают по меньшей мере один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

[375] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает остатки 520-531 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, остатки 542-553 SEQ ID NO: 16 или остатки 520-531 SEQ ID NO: 31.

[376] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает по меньшей мере один аминокислотный остаток, выбранный из остатков C453, H456, H473, N476, R495, G496, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например, остатков 475, 478, 495, 498, 517, 518, 519 и 521 SEQ ID NO: 16 или остатков 453, 456, 473, 476, 495, 496, 497 и 499 SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает по меньшей мере два аминокислотных остатка, по меньшей три аминокислотных остатка, по меньшей мере четыре аминокислотных остатка, по меньшей мере пять аминокислотных остатков или по меньшей мере шесть аминокислотных остатков, выбранных из аминокислотных остатков C453, H456, H473, N476, R495, G496, H497 и W499 внеклеточного домен рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, аминокислотные остатки C453, H456, H473, N476, R495, G496, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых

вариантах осуществления любые или все из этих антител или их антигенсвязывающих фрагментов также связывают по меньшей мере один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

[377] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает по меньшей мере один аминокислотный остаток, выбранный из остатков C453, H473, N476, R495, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например, остатков 475, 495, 498, 517, 519 и 521 SEQ ID NO: 16 или остатков 453, 473, 476, 495, 497 и 499 SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает по меньшей мере два аминокислотных остатка, по меньшей мере три аминокислотных остатка, по меньшей мере четыре аминокислотных остатка, по меньшей мере пять аминокислотных остатков или по меньшей мере шесть аминокислотных остатков, выбранных из аминокислотных остатков C453, H473, N476, R495, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфично связываются с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, аминокислотные остатки C453, H473, N476, R495, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления любые или все из этих антител или их антигенсвязывающих фрагментов также связывают по меньшей мере один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

[378] В некоторых вариантах осуществления эти антитела проявляют специфичность в отношении HER2 человека, и, как было показано, они модулируют, например, блокируют, ингибируют, снижают, антагонистически действуют, нейтрализуют или иным образом препятствуют пути PI3K-Akt, который способствует выживанию клеток за счет снижения уровней фосфорилированного AKT. В некоторых вариантах осуществления эти антитела интернализируются с клеточной поверхности HER2-экспрессирующих клеток со скоростью, которая является такой же или по существу аналогична скорости, с которой интернализируется трастузумаб или его биоаналог. В некоторых вариантах осуществления эти антитела и антигенсвязывающие фрагменты имеют скорость интернализации, которая составляет примерно 50% от общей поверхности, связанной в точке времени 0, после интернализации за 4 часа.

[379] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или больше идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 17, и вариабельную область

легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 24.

[380] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87% 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26.

[381] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 17 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 24.

[382] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 19 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 26.

[383] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 21, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 22, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 28 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 29.

[384] В некоторых вариантах осуществления антитела, раскрытые в настоящем документе, включают одну или больше консервативных аминокислотных замен в последовательности вариабельного домена, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше консервативных замен в последовательности вариабельного домена. В некоторых вариантах осуществления эти консервативные аминокислотные замены находятся в CDR-области, например, в общей сложности 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше консервативных замен сделаны во всех CDR-областях. В некоторых вариантах осуществления в каждой CDR последовательности может присутствовать до 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен, например, SEQ ID NO: 20-22 и 27-29.

[385] Специалистам в данной области будет известно, что можно без излишних экспериментов определить, обладает ли моноклональное антитело той же специфичностью, что и моноклональное антитело XMT-1519, путем обнаружения, препятствует ли связывание первого антитела связыванию последнего с когнатным партнером по связыванию или с другой молекулой, которая, как известно, ассоциирована с HER2. В некоторых вариантах осуществления, если тестируемое моноклональное

антитело конкурирует с моноклональным антителом, раскрытым в настоящем документе, что подтверждается снижением связывания моноклонального антитела, раскрытого в настоящем документе, то два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом.

[386] В некоторых вариантах осуществления альтернативный способ определения, обладает ли моноклональное антитело специфичностью описанного в настоящем документе моноклонального антитела, заключается в предварительном инкубировании моноклонального антитела, описанного в настоящем документе, с растворимым HER2 (с которым оно обычно взаимодействует), и последующем добавлении тестируемого моноклонального антитела, чтобы определить, ингибируется ли способность тестируемого моноклонального антитела связывать HER2. Если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, то, по всей вероятности, оно обладает такой же или функционально эквивалентной эпитопной специфичностью, как моноклональное антитело, описанное в настоящем документе.

[387] В некоторых вариантах осуществления скрининг моноклональных антител, раскрытых в настоящем документе, также можно проводить, например, путем измерения активности HER2-опосредуемого пути PI3K-Akt и определения, способно ли тестируемое моноклональное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, снижать, антагонистически действовать, нейтрализовать или иным образом препятствовать активности пути PI3K-Akt. В некоторых вариантах осуществления антитела против HER2, подходящие для конъюгирования, могут быть получены и очищены с помощью хорошо известных методик, например, в WO 2015/195917 и PCT/US 2018/019873, которые полностью включены в настоящий документ посредством отсылки.

Конъюгаты

[388] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты согласно изобретению включают один или больше случаев D, где D является агонистом STING, где в одном или больше случаев D могут быть одинаковыми или разными.

[389] В некоторых вариантах осуществления одни или более случаев PBRM присоединены к фрагменту Линкера-Лекарственного средства, где в одном или больше случаев PBRM могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления один или больше фрагментов Линкера-Лекарственного средства, которые включают один или больше случаев D, связаны с одной PBRM (например, антителом).

[390] В некоторых вариантах осуществления конъюгат согласно изобретению включает PBRM, которая имеет молекулярную массу приблизительно 40 кДа или больше (например, приблизительно 60 кДа или больше; приблизительно 80 кДа или больше; приблизительно 100 кДа или больше; приблизительно 120 кДа или больше; приблизительно 140 кДа или больше; приблизительно 160 кДа или больше; приблизительно 180 кДа или больше; или приблизительно 200 кДа или больше, или приблизительно 40-200 кДа, приблизительно 40-180 кДа, приблизительно 40-140 кДа, приблизительно 60-200 кДа, приблизительно 60-180 кДа, приблизительно 60-140 кДа,

приблизительно 80-200 кДа, приблизительно 80-180 кДа, приблизительно 80-140 кДа, приблизительно 100-200 кДа, приблизительно 100-180 кДа или приблизительно 100-140 кДа), и имеет сульфгидрильную (т.е. -SH или тиоловую) группу.

[391] В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образующихся между фрагментами Линкера-лекарственного средства и PBRM (или общее количество точек присоединения), составляет 10 или меньше (например, 8, 6, 4 или 2).

[392] В некоторых вариантах осуществления, при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, PBRM имеет молекулярную массу приблизительно 40 кДа или больше (например, приблизительно 60 кДа или больше, приблизительно 80 кДа или больше, приблизительно 100 кДа или больше, приблизительно 120 кДа или больше, приблизительно 140 кДа или больше, приблизительно 160 кДа или больше, или приблизительно 180 кДа или больше; или приблизительно 40-200 кДа, приблизительно 40-180 кДа, приблизительно 40-140 кДа, приблизительно 60-200 кДа, приблизительно 60-180 кДа, приблизительно 60-140 кДа, приблизительно 80-200 кДа, приблизительно 80-180 кДа, приблизительно 80-140 кДа, приблизительно 100-200 кДа, приблизительно 100-180 кДа или приблизительно 100-140 кДа).

[393] В некоторых вариантах осуществления, при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, PBRM имеет молекулярную массу от приблизительно 40 кДа до приблизительно 200 кДа. В некоторых вариантах осуществления, при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, PBRM имеет молекулярную массу от приблизительно 40 кДа до приблизительно 80 кДа.

[394] В некоторых вариантах осуществления, при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, PBRM имеет молекулярную массу от 40 кДа до 200 кДа. В некоторых вариантах осуществления, при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, PBRM имеет молекулярную массу от 40 кДа до 80 кДа.

[395] В некоторых вариантах осуществления PBRM в таком диапазоне молекулярных масс включают, без ограничения, например, фрагменты антител, такие как, например, Fab-фрагменты.

[396] В некоторых вариантах осуществления, при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, PBRM имеет молекулярную массу от приблизительно 60 кДа до приблизительно 120 кДа.

[397] В некоторых вариантах осуществления, при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, PBRM имеет молекулярную массу от 60 кДа до 120 кДа.

[398] В некоторых вариантах осуществления PBRM в таком диапазоне молекулярных масс включают, без ограничения, например, верблюдовых, Fab2, scFvFc и т.п.

[399] В некоторых вариантах осуществления, при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, PBRM имеет молекулярную массу от приблизительно 140 кДа до приблизительно 180 кДа.

[400] В некоторых вариантах осуществления, при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, PBRM имеет молекулярную массу от 140 кДа до 180 кДа.

[401] В некоторых вариантах осуществления PBRM в таком диапазоне молекулярных масс включают, без ограничения, например, полноразмерные антитела, такие как, IgG, IgM.

[402] В некоторых вариантах осуществления направляющие лиганды, линкеры и фрагменты лекарственных средств или пролекарств, описанные в настоящем документе, могут быть собраны с получением конъюгата или каркаса согласно изобретению, например, согласно раскрытым методам и способам. Терапевтические и направляющие конъюгаты согласно изобретению, а также способы их получения, описаны ниже посредством неограничивающего примера.

[403] В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образующихся между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM (или общее количество точек присоединения), составляет 8 или меньше.

[404] В некоторых вариантах осуществления общее количество сульфидных связей, образующихся между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM (или общее количество точек присоединения), составляет 8. В некоторых вариантах общее количество сульфидных связей, образующихся между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM (или общее количество точек присоединения), составляет 6. В некоторых вариантах общее количество сульфидных связей, образующихся между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM (или общее количество точек присоединения), составляет 5. В некоторых вариантах общее количество сульфидных связей, образующихся между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM (или общее количество точек присоединения), составляет 4. В некоторых вариантах общее количество сульфидных связей, образующихся между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM (или общее количество точек присоединения), составляет 3. В некоторых вариантах общее количество сульфидных связей, образующихся между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM (или общее количество точек присоединения), составляет 2.

[405] В некоторых вариантах осуществления отношение между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 8:1. В некоторых вариантах осуществления отношение между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 6:1. В некоторых вариантах осуществления отношение между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 4:1. В некоторых вариантах осуществления отношение между

фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM составляет от приблизительно 2:1 до приблизительно 2:1.

[406] В некоторых вариантах осуществления отношение между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM составляет от приблизительно 6:1 до приблизительно 8:1.

[407] В некоторых вариантах осуществления отношение между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM составляет приблизительно 8:1.

[408] В некоторых вариантах осуществления отношение между фрагментом Линкера-Лекарственного средства и PBRM составляет приблизительно 6:1.

[409] В некоторых вариантах осуществления изобретение также относится к фрагменту Линкера-Лекарственного средства, включающему по меньшей мере два фрагмента, где каждый фрагменту способен к конъюгированию тиоловой группы в PBRM с получением конъюгата белка-Линкера-Лекарственного средства.

[410] В некоторых вариантах осуществления одну или больше тиоловых групп PBRM получают путем восстановления белка. Затем одна или больше тиоловых групп PBRM могут реагировать с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства, которые способны к конъюгированию с тиоловой группой из PBRM с фрагментом Линкера-Лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два фрагмента, связанные с PBRM, представляют собой малеимидные группы.

[411] В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть активированы для конъюгирования с фрагментом Линкера-Лекарственного средства при обработке восстановителем, таким как DTT (реагент Клеланда, дитиотреитол) или TCEP (гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина). В некоторых вариантах осуществления полноразмерные моноклональные антитела могут быть восстановлены избытком TCEP с восстановлением дисульфидных связей (например, между цистеином, присутствующим в соответствующих исходных антителах) с получением восстановленной формы антитела. Вновь введенный и неспаренный цистеин может оставаться доступным для реакции с фрагментом Линкера-Лекарственного средства с получением конъюгатов антител согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления избыток фрагмента Линкера-Лекарственного средства добавляют для проведения конъюгировании и получения конъюгата Антитела-Лекарственного средства, и конъюгационную смесь очищают для удаления избытка промежуточного соединения Линкера-Лекарственного средства и других примесей.

[412] В некоторых вариантах осуществления при конъюгировании фрагмента Линкера-Лекарственного средства PBRM имеет молекулярную массу 40 кДа или больше (например, 60 кДа или больше; 80 кДа или больше; или 100 кДа или больше; 120 кДа или больше; 140 кДа или больше; 160 кДа или больше или 180 кДа или больше). В некоторых вариантах осуществления соотношение PBRM и фрагмента Линкера-Лекарственного средства составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8; от приблизительно 1:1

до приблизительно 1:6; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3; или от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2.

[413] PBRM в данном диапазоне молекулярных масс включают, без ограничения, например, полноразмерные антитела, такие как IgG, IgM.

[414] В некоторых вариантах осуществления при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства PBRM имеет молекулярную массу от 60 кДа до 120 кДа. В некоторых вариантах осуществления соотношение PBRM и фрагмента Линкера-Лекарственного средства составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3; или от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2.

[415] PBRM в данном диапазоне молекулярных масс включают, без ограничения, например, фрагменты антител, такие как, например, Fab2, scFcFv и верблюдовые.

[416] В некоторых вариантах осуществления при конъюгировании с одним или больше фрагментами Линкера-Лекарственного средства молекулярная масса PBRM составляет от 40 кДа до 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления соотношение PBRM и фрагмента Линкера-Лекарственного средства составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5; от 1:1 до приблизительно 1:4; от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3 или от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2.

[417] В некоторых вариантах осуществления PBRM в данном диапазоне молекулярных масс включают, без ограничения, например, фрагменты антител, такие как Fab-фрагменты.

[418] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен каркас, подходящий для конъюгировании с молекулой распознавания на основе белка (PBRM) и/или фрагментом агониста STING (D).

[419] В некоторых вариантах осуществления каждый из несущих лекарственное средство каркасов (т.е. без связи с PBRM), описанных в настоящем документе, обычно имеет индекс полидисперсности (PDI), равный 1.

[420] Конъюгаты и каркасы, раскрытые в настоящем документе, могут быть очищены (т.е. с удалением любых исходных материалов) с помощью интенсивной диафильтрации. При необходимости может быть проведена дополнительная очистка с помощью эксклюзионной хроматографии для удаления любых агрегированных конъюгатов. Как правило, очищенные конъюгаты обычно содержат меньше 5% (например, <2% вес/вес) агрегированных конъюгатов, при определении с помощью SEC; меньше 0,5% (например, <0,1% вес/вес) свободного (неконъюгированного) лекарственного средства, при определении с помощью ОФ-ВЭЖХ; меньше 1% каркасов, содержащих пептиды, несущие лекарственное средство, при определении с помощью SEC, и меньше 2% (например, <1% вес/вес) неконъюгированных PBRM, при определении

с помощью ХГВ-ВЭЖХ.

[421] В некоторых вариантах осуществления каркас выбран из каркасов, описанных в Таблице А1.

[422] В некоторых вариантах осуществления каркас выбран из каркасов, описанных в Таблице А2.

[423] В некоторых вариантах осуществления конъюгат выбран из конъюгатов, описанных в Таблице В1.

[424] В некоторых вариантах осуществления конъюгат выбран из конъюгатов, описанных в Таблице В2.

Таблица А1

Структура

где R^{14}, R^{15}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{C1}, R^{C2}, X_3, X_4, X_6, X_1, W_1, Y_1, Z_1, X_2, W_2, Y_2, Z_2 имеют значение, определенное в настоящем документе.

Таблица A2

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
			1172,55 (M+H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
1	7		1192,53 (M+2H)
			1206,58 (M+2H)
			1113,04 (M+2H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
			1220,58 (M+2H)
			1199,53 (M+2H)
			1185,56 (M+2H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
2	14		1178,54 (M+2H)
			1929,85 (M+H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
			1052,97 (M+2H)
			1218,60 (M+2)
			1354,62 (M+2H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
			1018,39 (M+2H)
			1028,97 (M+2H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
			1505,56 (M+H)
			1222,92 (M+2H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
3	18		1148,43 (M+2H)
			1205,07 (M+2H)
			1148,33 (M+2H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
			1183,63 (M+2H)
4	23		1121,06 (M+2H)
5	37		1193,48 (M+2H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
7	31		1179,21 (M+2H)
			1186,93 (M+2H)
			1188,46 (M+H)
			1466,64 (M+H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
			917,41 (M+H)
8	33		1195,47 (M+H)
			1212,60 (M+H)
			1197,50 (M+H)
			1324,40 (M+H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
			1243,24 (M+H)
			1005,22 (M+H)
9	44		1134,24 (M+H)
			1295,26 (M+H)
10	49		1049,15 (M+H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
11	51		1049,38 (M+H)
12	57		1120,41 (M+H)
13	59		1120,38 (M+H)
14	61		1120,37 (M+H)
15	63		1120,11 (M+H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
16	65		1134,19 (M+H)
17	73		1177,40 (M+H)
18	75		1177,41 (M+H)
19	77		1177,40 (M+H)
20	79		1177,44 (M+H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
21	81		1106,17 (M+H)
			1077,15 (M+H)
			1091,18 (M+H)
			1091,17 (M+H)
			1148,17 (M+H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС
			1108,12 (M+H)
			1137,15 (M+H)
			1108,14 (M+H)

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС

Пр.	Соед.	Структура	ЖХ-МС

Таблица B1

Структура

Структура
d_{15}
d_{15}
d_{15}

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

Структура

где d_{15}, R^{14}, R^{15}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{C1}, R^{C2}, X_3, X_4, X_6, X_1, W_1, Y_1, Z_1, X_2, W_2, Y_2, Z_2 имеют значение, определенное в настоящем документе.

Таблица B2

Пр.	Соед.	Структура
1	**8-1** DAR 6,1 **8-2** DAR 6,8	**XMT-1519**
1a	**8a-1** DAR 6,0 **8a-2** DAR 7,0 **8a-3** DAR 8,4	**Трастузумаб**
1b	**8b-1** DAR 5,7 **8b-2** DAR 6,6 **8b-3** DAR 6,4	**XMT-1535**

Пр.	Соед.	Структура
1c	**8c-1** DAR 7,5 **8c-2** DAR 5,8	**Паливизумаб** d_{15}
1d	**8d-1** DAR 6,8 **8d-2** DAR 6,5 **8d-3** DAR 6,0	**Паливизумаб mIgG2a** d_{15}
1e	**8e** DAR 7,0	**XMT-1535 hIgG1-mIgG2a** d_{16}

Пр.	Соед.	Структура
1f	**8f** DAR 7,4	XMT-1535 AAG
1g	**8g** DAR 7,4	Мишень D mIgG2a
1h	**8h** DAR 6,9	Мишень C hIgG1a

Пр.	Соед.	Структура
1i	**8i** DAR 10,0	Мишень E mIgG2a
1j	**8j** DAR 7,0 **8j-1** DAR 4,2	Трастузумаб AAG
1k	**8k** DAR 8,1	Трастузумаб mIgG2a

Пр.	Соед.	Структура
11	**81** DAR 4,7	
1m	8m DAR 4,5	
2	**16** DAR 5,3	

Пр.	Соед.	Структура
3	**20-1** DAR 6,0 **20-2** DAR 6,1	Трастузумаб
3a	**20a** DAR 5,5	Паливизумаб
4	**25** DAR 6,6	**XMT-1519**
5	**28** DAR 6,0	**XMT-1519**

Пр.	Соед.	Структура
6	**29** DAR 5,5	
7	**32-1** DAR 6,5 **32-2** DAR 6,4 **32-3** DAR 6,7 **32-4** DAR 8,6	
7a	**32a** DAR 6,2 **32a-1** DAR 7,4 **32a-2** DAR 8,0 **32a-3** DAR 7,5 **32a-4** DAR 8,0	

Пр.	Соед.	Структура
7b	**32b** DAR 6,8 **32b-1** DAR 5,7 **32b-2** DAR 7,2	
7c	**32c** DAR 9,1	
7d	**32d** DAR 8,8	
7e	**32e** DAR 8,8	 **32e**

Пр.	Соед.	Структура
8	**34** DAR 6,9	Трастузумаб
8a	**34a** DAR 7,0	Паливизумаб
9	**45** DAR 6,5	XMT-1519
10	**50** DAR 8,2	XMT-1519
11	**52** DAR 7,7	XMT-1519

Пр.	Соед.	Структура
12	58 DAR 6,5	
13	60-1 DAR 7,7 60-2 DAR 5,5	
14	62 DAR 6,5	
15	64 DAR 6,4	
16	66-1 DAR 7,5 66-2 DAR 5,3	

Пр.	Соед.	Структура
17	**74** DAR 6,9	
18	**76** DAR 7,5	
19	**78** DAR 7,4	
20	**80** DAR 7,5	
21	**82** DAR 5,7	

Пр.	Соед.	Структура
22	**85** DAR 6,5	
22a	**85a** DAR 7,4	
23	**88** DAR 6,6	

Пр.	Соед.	Структура
23a	**89** DAR 5,9	
23b	**89a** DAR 8,8	
23c	**89b** DAR 9,0	
24	**92** DAR 7,6	
24a	**93** DAR 6,7	

Пр.	Соед.	Структура
25	100 DAR 7,8	
25a	101 DAR 6,5	

Пр.	Соед.	Структура

Пр.	Соед.	Структура

[425] В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой:

;

;

или

;

где R^{14}, R^{15}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{C1}, R^{C2}, X_3, X_4, X_6, X_1, W_1, Y_1, Z_1, X_2, W_2, Y_2, Z_2 имеют значение, определенное в настоящем документе.

[426] В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой:

или

;

где d_{15}, R^{14}, R^{15}, R^{16}, R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{C1}, R^{C2}, X_3, X_4, X_6, X_1, W_1, Y_1, Z_1, X_2, W_2, Y_2, Z_2 имеют значение, определенное в настоящем документе.

[427] В некоторых вариантах осуществления конъюгат:

;

PBRM
d15

;

PBRM
d15

;

PBRM
d15

;

;

или

;

где d_{15} имеет значение, определенное в настоящем документе.

Фармацевтические композиции

[428] В некоторых аспектах настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, включающие конъюгат, описанный в настоящем документе, и один или больше фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ.

[429] Фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты согласно настоящему изобретению, могут быть изготовлены общеизвестным способом, например, с помощью обычных процессов смешивания, растворения, гранулирования, дражирования, растирания, эмульгирования, инкапсулирования, включения или лиофилизации. Фармацевтические композиции могут быть изготовлены стандартным способом при использовании одного или больше фармацевтически приемлемых носителей, включающих вспомогательные вещества и/или добавки, которые облегчают обработку конъюгатов с получением препаратов, которые можно применять фармацевтически. Конечно, подходящий состав зависит от выбранного пути введения.

[430] Фармацевтические композиции, пригодные для инъекций, включают стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. В случае внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF,

Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящими смесями. Нужную текучесть можно поддерживать, например, при использовании покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и при использовании поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические вещества, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит и сорбит, и хлорид натрия. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций можно обеспечить при включении в композицию вещества, которое задерживает всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[431] Стерильные растворы для инъекций можно изготавливать путем включения конъюгатов в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии изготавливают путем включения конъюгатов в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций способами изготовления являются вакуумная сушка и лиофильная сушка, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из его предварительно простерилизованного фильтрованием раствора.

[432] Композиции для перорального применения обычно включают инертный разбавитель или пищевой фармацевтически приемлемый носитель. Они могут быть заключены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. В целях перорального терапевтического введения конъюгаты могут быть объединены с вспомогательными веществами и могут использоваться в форме таблеток, пастилок или капсул. Композиции для перорального применения также могут быть изготовлены с использованием жидкого носителя для применения в качестве ополаскивателя полости рта, где конъюгаты в жидком носителе применяют перорально, полощут рот, сплевывают или проглатывают. Фармацевтически совместимые связующие вещества и/или вспомогательные материалы могут быть включены в качестве компонента композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений аналогичной природы: связующее, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; вспомогательное вещество, такое как крахмал или

лактоза, разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; скользящее вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или вкусоароматическое вещество, такое как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

[433] Для введения путем ингаляции конъюгаты доставляют в виде аэрозольного спрея из контейнера под давлением или дозатора, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или небулайзера.

[434] Системное введение также может осуществляться чресслизистым или чрескожным способом. Для чресслизистого или чрескожного введения в составе используются пенетранты, соответствующие барьеру, который требуется преодолеть. Такие пенетранты широко известны в данной области и включают, например, средства для чресслизистого введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Чресслизистое введение можно осуществлять с помощью назальных спреев или суппозиториев. Для чрескожного введения конъюгаты изготавливают в форме мазей, бальзамов, гелей или кремов, как обычно известно в данной области.

[435] Конъюгаты могут быть изготовлены с фармацевтически приемлемыми носителями, которые будут предохранять конъюгаты от быстрого выведения из организма, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут использоваться биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы изготовления таких составов будут очевидными для специалистов в данной области.

[436] Может быть особенно выгодным изготовление композиций для перорального или парентерального применения в виде стандартных доз для удобства введения и однородности дозировки. Единичная лекарственная форма при использовании в настоящем документе относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъекта, подлежащего лечению; каждая единица, содержащая заданное количество конъюгатов, может быть рассчитана на получение требуемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм согласно изобретению продиктована уникальными характеристиками конъюгатов и конкретным достигаемым терапевтическим эффектом и напрямую зависит от этого.

[437] В терапевтических применениях дозы фармацевтических композиций, применяемых в соответствии с изобретением, изменяются в зависимости от средства, возраста, веса и клинического состояния пациента-реципиента, а также от опыта и мнения медработника или практикующего специалиста, проводящего терапию, помимо прочих факторов, влияющих на выбранную дозировку. Как правило, доза должна быть достаточной, чтобы вызывать замедление развития и, предпочтительно, регрессию симптомов заболевания, а также предпочтительно полную регрессию заболевания.

[438] Следует понимать, что фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, упаковку или дозатор вместе с инструкциями по применению.

Способы применения

[439] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата, раскрытого в настоящем документе.

[440] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата, раскрытого в настоящем документе.

[441] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ активации или повышения активности STING у субъекта, включающий введение субъекту конъюгата, раскрытого в настоящем документе.

[442] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту эффективного количества конъюгата, раскрытого в настоящем документе.

[443] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат, раскрытый в настоящем документе, для применения при лечении или предупреждении заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

[444] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат, раскрытый в настоящем документе, для применения при лечении заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

[445] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен конъюгат, раскрытый в настоящем документе, для лечения STING-опосредованного заболевания или нарушения у субъекта.

[446] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

[447] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, в производстве лекарственного препарата для лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

[448] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, в производстве лекарственного препарата для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

[449] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, в производстве лекарственного препарата для лечения STING-опосредованного заболевания или

нарушения у субъекта.

[450] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, в производстве лекарственного препарата для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

[451] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта.

[452] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта.

[453] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, для лечения STING-опосредованного заболевания или нарушения у субъекта.

[454] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

[455] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят конъюгат, раскрытый в настоящем документе.

[456] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного конъюгата согласно изобретению, где указанный конъюгат высвобождает одно или больше терапевтических средств при биодеградации.

[457] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества по меньшей мере одного конъюгата согласно изобретению, где указанный конъюгат высвобождает одно или больше терапевтических средств при биодеградации.

[458] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конъюгат представляет собой конъюгат антитела-агониста STING. В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является рак.

[459] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены способы лечения или предупреждения STING-опосредованных заболеваний и нарушений. Примеры заболеваний/нарушений включают, без ограничения этим, рак, инфекционное заболевание (например, ВИЧ, ВГВ, ВГС, ВПЧ и грипп) и адъювант вакцины.

[460] В некоторых вариантах осуществления путь STING может индуцировать противоопухолевый иммунитет путем апрегуляции IFNβ и интерферон-стимулируемых генов (ISG) во многих типах клеток в опухолях в ответ на агонистические, цитозольные нуклеиновые кислоты.

[461] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен

конъюгат, раскрытый в настоящем документе, для применения в качестве адъюванта вакцины. Соответственно, также предложена иммуногенная композиция или адъювант вакцины, включающие конъюгат, раскрытый в настоящем документе.

[462] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, включающая конъюгат, раскрытый в настоящем документе, и одно или больше иммуностимулирующих средств.

[463] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, в производстве вакцины. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложено применение конъюгата, раскрытого в настоящем документе, для производства иммуногенной композиции или вакцинной композиции, включающей антиген или антигенную композицию, для лечения или предупреждения заболевания.

[464] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения или предупреждения заболевания, включающий введение субъекту-человеку, страдающему заболеванием или подверженному риску заболевания, иммуногенной композиции или вакцинной композиции, включающей антиген или антигенную композицию и конъюгат, раскрытый в настоящем документе.

[465] В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой воспаление, аутоиммунное заболевание, аллергическое заболевание, инфекционное заболевание, ВИЧ-инфекцию, СПИД, ВГС-инфекцию, грипп или инфекцию, вызванную вирусом папилломы человека (ВПЧ). Спектр таких заболеваний известен квалифицированному в данной области специалисту. В некоторых вариантах осуществления такие заболевания описаны в заявке PCT/US2020/044538, содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

[466] При использовании в настоящем документе термины "рак", "новообразование" и "опухоль" используются попеременно и, в форме единственного или множественного числа, относятся к клеткам, которые подверглись злокачественной трансформации, которая делает их патологическими для организма хозяина. Первичные раковые клетки можно легко отличить от нераковых клеток с помощью хорошо известных методов, в частности, гистологического исследования. Определение раковой клетки, используемое в настоящем документе, включает не только первичную раковую клетку, но и любую клетку, полученную из раковой клетки-предшественника. Это включает метастазировавшие раковые клетки, а также культуры и линии клеток in vitro, полученные из раковых клеток. При упоминании типа рака, который обычно проявляется в виде солидной опухоли, "клинически обнаруживаемой" опухолью является опухоль, которая обнаруживается по опухолевой массе; например, с помощью таких процедур, как компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), рентгеновское исследование, ультразвуковое исследования или пальпация при физикальном обследовании, и/или которая обнаруживается по экспрессии одного или больше онкоспецифических антигенов в образце, полученном у пациента. Опухоли могут быть

гемопоэтическими (гемологическими или связанными с клетками крови) злокачественными опухолями, например, опухолями, происходящими из клеток крови или иммунных клеток, которые могут называться "жидкими опухолями". Конкретные примеры клинических состояний, основанных на гемологических опухолях, включают лейкозы, такие как хронический миелоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и острый лимфоцитарный лейкоз; плазмоклеточные злокачественные новообразования, такие как множественная миелома, МГНЗ и макроглобулинемия Вальденстрема; лимфомы, такие как неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина; и т.п.

[467] В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является предраковый синдром.

[468] Конъюгат согласно настоящему изобретению может применяться для лечения воспаления любых тканей и органов тела, включая скелетно-мышечное воспаление, воспаление сосудов, воспаление нервов, воспаление пищеварительной системы, воспаление глаз, воспаление репродуктивной системы и другие воспаления. Спектр таких заболеваний известен квалифицированному специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления такие заболевания описаны в заявке PCT/US2020/044538, содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

[469] Примеры раковых заболеваний и состояний, при которых конъюгат согласн настоящему изобретению может оказывать потенциально благоприятное противоопухолевое действие, включают, без ограничения перечисленными, злокачественные опухоли легкого, костей, поджелудочной железы, кожи, головы, шеи, матки, яичников, желудка, толстой кишки, молочной железы, пищевода, желчных протоков, тонкой кишки, кишечника, эндокринной системы, щитовидной железы, паращитовидной железы, надпочечника, уретры, предстательной железы, полового члена, яичка, мочеточника или уротелия, мочевого пузыря, почки или печени; рак прямой кишки; рак анальной области; карциномы фаллопиевых труб, эндометрия, шейки матки, влагалища, вульвы, почечной лоханки, почечно-клеточные карциномы; саркому мягких тканей; миксому; рабдомиому; фиброму; липому; тератому; холангиокарциному; гепатобластому; ангиосаркому; гемангиому; гепатому; фибросаркому; хондросаркому; миелому; хронический или острый лейкоз; лимфоцитарные лимфомы; первичную лимфому ЦНС; неоплазии ЦНС; опухоли оси позвоночника; плоскоклеточный рак; синовиальную саркому; злокачественные мезотелиомы плевры; глиому ствола головного мозга; аденому гипофиза; бронхиальную аденому; хондроматозную гамартому; мезотелиому; болезнь Ходжкина или комбинацию одной или больше из вышеперечисленных форм рака.

[470] В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой солидную опухоль. В одном аспекте опухоль выбрана из рака головы и шеи, рака желудка, меланомы, почечно-клеточного рака (ПКР), рака пищевода, рака

желчевыводящих путей, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака предстательной железы, колоректального рака (КРР), рака толстой кишки, рака яичника, рака эндометрия, рака уротелия, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, папиллярного рака щитовидной железы, папиллярного почечно-клеточного рака, холангиокарциномы, рака протоков слюнных желез, рака почки, рака шейки матки и рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления человек имеет жидкую опухоль, такую как диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ), множественная миелома, хронический лимфобластный лейкоз (ХЛЛ), фолликулярная лимфома, острый миелоидный лейкоз и хронический миелогенный лейкоз. В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является рак кожи (например, немеланомный рак кожи, плоскоклеточная карцинома, базально-клеточная карцинома) или актинический кератоз. В дополнение к полевому эффекту для устранения поверхностного рака кожи конъюгат согласно настоящему изобретению может предотвращать развитие последующих форм рака кожи и предракового актинического кератоза у субъектов, прошедших лечение.

[471] В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является рак мочевого пузыря, рак молочной железы, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак желудка, рак пищевода, рак желчевыводящих путей, уротелиальный рак, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника или рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак пищевода, рак желчных путей, рак эндометрия, уротелиальный рак или немелкоклеточный рак легкого.

[472] В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с амплификацией/оверэкспрессией HER2 или рак молочной железы с низким уровнем HER2.

[473] В некоторых вариантах осуществления рак эндометрия представляет собой серозный рак эндометрия.

[474] Конъюгат согласно настоящему изобретению также может применяться при лечении одного или более заболеваний, которые поражаюи млекопитающих и характеризуются клеточной пролиферацией в области нарушений, связанных с неоваскуляризацией и/или проницаемостью сосудов, фиброзными нарушениями и метаболическими нарушениями. Спектр таких заболеваний хорошо известен квалифицированному специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления такие заболевания описаны в заявке PCT/US2020/044538, содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

[475] В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением являются нейродегенеративные заболевания. Примеры нейродегенеративных заболеваний включают, без ограничения перечисленными, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (БАС). Спектр таких заболеваний хорошо известен квалифицированному специалисту в данной

области. В некоторых вариантах осуществления такие заболевания описаны в предварительных заявках на патент США 62/882,081, 62/944,643 и 62/982,935, содержание которых включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

[476] В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является инфекционное заболевание, которое представляет собой любое заболевание, спровоцированное или совпавшее с инфекцией, вызванной патогеном, происходящим из бактерий, происходящим из семейств ДНК-вирусов или семейств РНК-вирусов. Спектр таких заболеваний будет хорошо известен квалифицированному специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления такие заболевания описаны в заявке PCT/US2020/044538, содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки во всей своей полноте.

[477] Конъюгаты согласно настоящему изобретению могут применяться отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами. В качестве модуляторов иммунного ответа конъюгаты согласно настоящему изобретению также могут применяться в монотерапии или в комбинации с другим терапевтическим средством при лечении заболеваний и состояний, при которых эффективна модуляция STING. Таким образом, комбинированная терапия согласно настоящему изобретению включает введение конъюгата согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере одного другого терапевтически активного средства. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия в соответствии с настоящим изобретением включает введение по меньшей мере одного конъюгата согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере одного другого терапевтического средства. Конъюгат(ы) согласно настоящему изобретению и его фармацевтически приемлемые соли, а также другое терапевтическое средство(а) можно вводить вместе в одной фармацевтической композиции или по отдельности, при этом в случае раздельного введения это может осуществляться одновременно или последовательно, в любом порядке. Количества конъюгата(ов) согласно настоящему изобретению и его фармацевтически приемлемых солей, а также другого терапевтического средства (средств) и относительное время введения подбирают для достижения требуемого комбинированного терапевтического эффекта. Таким образом, в дополнительном аспекте предложена комбинация, включающая конъюгат согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль вместе с одним или больше другими терапевтическими средствами.

[478] Конъюгат согласно настоящему изобретению и его фармацевтически приемлемые соли можно применять в комбинации с одним или больше другими терапевтическими средствами, которые могут применяться, например, для предупреждения или лечения аллергического заболевания, воспалительного заболевания или аутоиммунного заболевания; антигенной иммунотерапии, антигистаминных средств, стероидов, НПВС, бронхолитиков, метотрексата, модуляторов лейкотриенов, терапии с применением моноклональных антител, рецепторной терапии или антиген-

неспецифической иммунотерапии.

[479] Конъюгат согласно настоящему изобретению и его фармацевтически приемлемые соли можно применять в комбинации с лучевой терапией и/или хирургическим вмешательством, и/или, по меньшей мере, с одним другим терапевтическим средством, которое может применяться при лечении рака и предраковых синдромов. В комбинации может использоваться любое противоопухолевое средство, антимикротубулиновое средство, антимитотическое средство, гормон, аналоги гормонов, ингибитор пути сигнальной трансдукции, протеинтирозинкиназа или антиангиогенное терапевтическое средство. Спектр других таких терапевтических средств будет хорошо известен квалифицированному специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления другое терапевтическое средство описано в заявке PCT/US2020/044538, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[480] Средства, применяемые в иммунотерапевтических схемах, терапевтические средства, применяемые в проапоптотических схемах, или ингибиторы сигнализации клеточного цикла также могут применяться в комбинации с конъюгатом согласно настоящему изобретению.

[481] В некоторых вариантах осуществления комбинация согласно настоящему изобретению включает конъюгат согласно настоящему изобретению или его соль, в частности, его фармацевтически приемлемую соль, и по меньшей мере одно противоопухолевое средство, антимикротубулиновое средство, антимитотическое средство, гормон, аналоги гормонов, ингибитор пути сигнальной трансдукции, протеинтирозинкиназу или антиангиогенное терапевтическое средство или их комбинацию.

[482] Дополнительными примерами других терапевтических средств (например, противоопухолевого средства) для применения в комбинации или совместном введении с конъюгатом согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой солью являются иммуномодуляторы.

[483] В некоторых вариантах осуществления комбинация согласно настоящему изобретению включает конъюгат согласно настоящему изобретению или его соль, в частности, его фармацевтически приемлемую соль, и по меньшей мере один иммуномодулятор или по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство.

[484] При использовании в настоящем документе термин "иммуномодуляторы" относится к любому веществу, включая моноклональные антитела, которое воздействует на иммунную систему. Иммуномодуляторы могут применяться в качестве противоопухолевых средств для лечения рака. Например, иммуномодуляторы включают, без ограничения, антитела против CTLA-4 и антитела против PD-1. Другие иммуномодуляторы включают, без ограничения, антитела к ICOS, антитела к OX-40, антитела к PD-L1, антитела к LAG3, антитела к TIM-3, антитела к 41BB и антитела к GITR.

[485] Дополнительными примерами других терапевтических средств (противоопухолевого средства) для применения в комбинации или совместном введении с конъюгатом согласно настоящему изобретению являются средства против PD-L1 (т.е. антитела против PD-L1) или антагонисты PD-1.

[486] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения человека, нуждающегося в этом, включающие введение конъюгата согласно настоящему изобретению или его соли и по меньшей мере одного иммуномодулятора. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор выбран из антитела-агониста ICOS, антитела к OX-40 и антитела к PD-1. В некоторых вариантах осуществления человек имеет рак. Также в настоящем документе предложено применение конъюгата согласно настоящему изобретению или его соли в комбинации по меньшей мере с одним иммуномодулятором для лечения человека, нуждающегося в этом.

[487] При использовании в настоящем документе термин "иммуностимулирующее средство" относится к любому средству, которое может стимулировать иммунную систему. При использовании в настоящем документе иммуностимулирующие средства включают, без ограничения, адъюванты вакцин, такие как агонисты Toll-подобных рецепторов, блокаторы контрольных точек Т-клеток, такие как мАт к PD-1 и CTL4, и агонисты контрольных точек Т-клеток, такие как агонистические мАт к OX-40 и ICOS. При использовании в настоящем документе термин "иммуностимулирующее средство" относится к любому средству, которое может стимулировать иммунную систему. При использовании в настоящем документе иммуностимулирующие средства включают, без ограничения, адъюванты вакцин.

[488] Термин "Toll-подобный рецептор" (или "TLR") при использовании в настоящем документе относится к представителю семейства белков Toll-подобных рецепторов или их фрагменту, которые распознают микробный продукт и/или инициируют адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления TLR активирует дендритную клетку (ДК). Toll-подобные рецепторы (TLR) представляют собой семейство рецепторов распознавания паттерна, которые первоначально были идентифицированы как сенсоры врожденной иммунной системы, которые распознают микробные патогены. TLR-рецепторы распознают различные структуры в микроорганизмах, часто называемые "PAMP" (патоген-ассоциированными молекулярными паттернами). Связывание лиганда с TLR-рецепторами запускает каскад внутриклеточных сигнальных путей, которые индуцируют продукцию факторов, задействованных в воспалении и иммунитете.

[489] В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующее средство для применения в комбинации с конъюгатом согласно настоящему изобретению является агонистом TLR4.

[490] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения человека, нуждающегося в этом, включающие введение конъюгата согласно настоящему изобретению или его соли и по меньшей мере одного

иммуностимулирующего средства. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующим средством является агонист TLR4. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующим средством является AGP. В некоторых вариантах осуществления человек имеет рак. Также в настоящем документе предложено применение конъюгата согласно настоящему изобретению или его соли в комбинации по меньшей мере с одним иммуностимулирующим средством для лечения человека, нуждающегося в этом.

[491] В дополнение к иммуностимулирующим средствам, описанным выше, композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно включать другие терапевтические средства, которые благодаря своей адъювантной природе могут стимулировать ответ иммунной системы на раковые антигены, присутствующие на инактивированной опухолевой клетке(ах). Такие адъюванты включают, без ограничения, липиды, липосомы, инактивированные бактерии, которые индуцируют врожденный иммунитет (например, инактивированные или аттенуированные Listeria monocytogenes), композиции, которые опосредуют активацию врожденного иммунитета посредством (NOD)-подобных рецепторов (NLR), индуцируемый ретиноевой кислотой ген (RIG)-I-подобных рецепторов (RLR) и/или лектиновых рецепторов С-типа (CLR).

[492] Благодаря своим адъювантным качествам агонисты TLR можно применять в комбинациях с другими вакцинами, адъювантами и/или иммуномодуляторами и можно комбинировать в различных комбинациях. В некоторых вариантах осуществления конъюгат согласно настоящему изобретению связывается со STING и индуцирует STING-зависимую активацию TBKI, при этом инактивированная опухолевая клетка, которая экспрессирует и секретирует один или более цитокинов, которые стимулируют индукцию, рекрутинг и/или созревание ДК, как описано в настоящем документе, может быть введена вместе с одним или больше агонистами TLR в терапевтических целях.

[493] Другими активными ингредиентами (противоопухолевыми средствами) для применения в комбинации или совместном введении с конъюгатом согласно настоящему изобретению являются ингибиторы IDO.

[494] В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгат согласно настоящему изобретению может применяться в комбинации по меньшей мере с одним другим терапевтическим средством, пригодным для предупреждения или лечения инфекционных заболеваний, бактериальных инфекций, вирусных инфекций, ассоциированных с саркомой Капоши герпесвирусных инфекций, туберкулезных инфекций, хламидиоза, малярийной инфекции, стафилококковых инфекций, бокового амиотрофического склероза (БАС), рассеянного склероза, системной красной волчанки и подобных волчаночных нарушений, псориаза или синдрома Шегрена,

[495] Конъюгаты согласно настоящему изобретению можно вводить любым подходящим способом введения, в том числе путем системного введения и наружного применения. Системное введение включает пероральное введение, парентеральное введение, чрескожное введение, ректальное введение и введение путем ингаляции.

Парентеральное введение относится к путям введения, отличным от энтерального, чрескожного или ингаляционного, и обычно выполняется путем инъекции или инфузии. Парентеральное введение включает внутривенную, внутримышечную и подкожную инъекцию или инфузию. Ингаляция относится к введению в легкие пациента независимо от вдыхания через рот или через носовые ходы. Наружное применение включает нанесение на кожу.

[496] В дополнение к описанным выше путям введения, подходящим для лечения онкологии, фармацевтические композиции могут быть адаптированы для введения путем внутриопухолевой или околоопухолевой инъекции. Ожидается, что внутриопухолевая или околоопухолевая инъекция конъюгата согласно настоящему изобретению непосредственно в одиночную солидную опухоль или рядом с ней вызовет иммунный ответ, который сможет атаковать и разрушать раковые клетки по всему телу, существенно уменьшая, а в некоторых случаях навсегда устраняя опухоль у больного субъекта. Активация иммунной системы таким способом для уничтожения опухолей в удаленном участке широко известна как абскопальный эффект и была продемонстрирована на животных с применением нескольких терапевтических методов. Еще одним преимуществом местного, внутриопухолевого или околоопухолевого введения является возможность достижения эквивалентной эффективности при гораздо более низких дозах, что сводит к минимуму или устраняет нежелательные явления, которые могут наблюдаться при гораздо более высоких системных дозах.

[497] Конъюгаты согласно настоящему изобретению можно вводить однократно или в соответствии со схемой применения, в которой несколько доз вводят с различными интервалами времени в течение заданного периода времени. Например, дозы могут вводить один, два, три или четыре раза в сутки. Дозы могут вводить до тех пор, пока не будет достигнут требуемый терапевтический эффект, или в течение неопределенного времени, для поддержания требуемого терапевтического эффекта. Подходящие схемы применения конъюгата согласно настоящему изобретению зависят от фармакокинетических свойств такого конъюгата, таких как абсорбция, распределение и период полувыведения, которые могут быть определены специалистом в данной области. Кроме того, подходящие схемы применения, включая продолжительность таких схем применения, для конъюгата согласно настоящему изобретению зависят от заболевания или нарушения, подлежащего лечению, тяжести заболевания или нарушения, подлежащего лечению, возраста и физического состояния пациента, подлежащего лечению, истории болезни пациента, подлежащего лечению, характера сопутствующей терапии, требуемого терапевтического эффекта и подобных факторов в рамках компетенции и опыта квалифицированного специалиста. Кроме того, квалифицированным специалистам будет понятно, что подходящие схемы применения могут требовать коррекции с учетом ответа отдельного пациента на схему применения или с течением времени, когда меняются потребности отдельного пациента. Общие суточные дозы составляют от 1 до 2000 мг, предпочтительно общие суточные дозы составляют от 1 до

250 мг.

[498] Для применения в терапии конъюгаты согласно изобретению обычно, но не обязательно, включают в состав фармацевтической композиции перед введением пациенту. Таким образом, изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим конъюгат согласно изобретению и по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[499] Фармацевтические композиции согласно изобретению могут быть изготовлены и упакованы в недозированной форме или в стандартной лекарственной форме. Например, при пероральном применении можно вводить одну или больше таблеток или капсул. Доза фармацевтической композиции содержит, по меньшей мере, терапевтически эффективное количество конъюгата согласно настоящему изобретению (т.е. конъюгата согласно настоящему изобретению или его соли, в частности, его фармацевтически приемлемой соли). При изготовлении в виде стандартной лекарственной формы фармацевтические композиции могут содержать от 1 мг до 1000 мг конъюгата согласно настоящему изобретению.

[500] Как предусмотрено в настоящем документе, стандартные лекарственные формы (фармацевтические композиции), включающие от 1 мг до 1000 мг конъюгата согласно изобретению, могут вводить один, два, три или четыре раза в день, предпочтительно один, два или три раза в день, и более предпочтительно один или два раза в день, для лечения STING-опосредованного заболевания или нарушения.

[501] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению обычно содержат один конъюгат согласно настоящему изобретению. Однако в некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат больше одного конъюгата согласно изобретению. Кроме того, фармацевтические композиции согласно изобретению необязательно могут дополнительно включать одно или больше дополнительных терапевтических средств (например, фармацевтически активных конъюгатов).

[502] При использовании в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" относится к фармацевтически приемлемому материалу, композиции или носителю, которые участвуют в придании формы или консистенции фармацевтической композиции. Каждое вспомогательное вещество должно быть совместимо с другими ингредиентами фармацевтической композиции при смешивании, чтобы избежать взаимодействий, которые могут существенно снизить эффективность конъюгата согласно изобретению при введении пациенту, и взаимодействий, которые могут привести к получению фармацевтических композиций, которые не являются фармацевтически приемлемыми. Кроме того, каждое вспомогательное вещество, безусловно, должно обладать достаточно высокой чистотой, чтобы быть фармацевтически приемлемым.

[503] Конъюгаты согласно изобретению и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или вспомогательные вещества обычно включают в состав

лекарственной формы, предназначенной для введения пациенту требуемым путем введения. Стандартные лекарственные формы включают формы, предназначенные для: (1) перорального введения, такие как таблетки, капсулы, каплеты, пилюли, пастилки, порошки, сиропы, настойки, суспензии, растворы, эмульсии, саше и облатки; (2) парентерального введения, такие как стерильные растворы, суспензии и порошки для восстановления; (3) чрескожного введения, такие как трансдермальные пластыри; (4) ректального введения, такие как суппозитории; (5) ингаляции, такие как аэрозоли и растворы; и (6) наружного применения, такие как кремы, мази, лосьоны, растворы, пасты, спреи, пены и гели.

[504] Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества будут изменяться в зависимости от конкретной выбранной лекарственной формы. Кроме того, подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут быть выбраны по конкретной функции, которую они могут выполнять в композиции. Например, некоторые фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут быть выбраны из-за своей способности облегчать производство однородных дозированных форм. Некоторые фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут быть выбраны из-за своей способности облегчать получение стабильных лекарственных форм. Некоторые фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут быть выбраны из-за своей способности облегчать перенос или транспорт конъюгата или конъюгатов согласно изобретению после введения пациенту из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Некоторые фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут быть выбраны из-за своей способности улучшать соблюдение пациентом режима лечения.

[505] Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают следующие типы вспомогательных веществ: разбавители, наполнители, связующие вещества, разрыхлители, смазывающие вещества, скользящие вещества, гранулирующие вещества, вещества для получения покрытия, смачивающие вещества, растворители, сорастворители, суспендирующие вещества, эмульгаторы, подсластители, ароматизаторы, корригенты, красители, вещества, предотвращающие слеживание, увлажнители, хелатообразователи, пластификаторы, вещества, повышающие вязкость, антиоксиданты, консерванты, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества и буферные вещества. Квалифицированному специалисту будет известно, что некоторые фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут выполнять больше одной функции и могут выполнять альтернативные функции в зависимости от того, какое количество вспомогательного вещества присутствует в составе, и какие другие ингредиенты присутствуют в составе.

[506] Квалифицированные специалисты обладают знаниями и навыками в данной области, позволяющими им подбирать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества в соответствующих количествах для применения в изобретении. Кроме того, специалистам доступен ряд ресурсов, которые описывают

фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и которые могут быть полезными при выборе подходящих фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ. Примеры включают Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company), The Handbook of Pharmaceutical Additives (Gower Publishing Limited), и The Handbook of Pharmaceutical Excipients (the American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Press).

[507] В одном аспекте изобретение направлено на твердую лекарственную форму для перорального применения, такую как таблетка или капсула, включающая эффективное количество конъюгата согласно изобретению и разбавитель или наполнитель. Твердая лекарственная форма для перорального применения может дополнительно включать разрыхлитель или смазывающее вещество.

[508] Следует понимать, что конъюгаты согласно настоящему изобретению также могут быть включены в состав вакцин в качестве адъювантов для модулирования их активности. Такие композиции могут содержать антитело(а) или фрагмент(ы) антитела или антигенный компонент, необязательно вместе с одним или больше другими компонентами с адъювантной активностью.

[509] Некоторые соединения и/или конъюгаты согласно настоящему изобретению могут быть мощными иммуномодуляторами, и, соответственно, при обращении с ними следует соблюдать осторожность. После описания изобретения, следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не ограничения.

[510] В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет Формулу BB:

;

(**BB**)

где конъюгат включает антитело XMT-1519, которое включает определяющую комплементарность область 1 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH1), включающую аминокислотную последовательность FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 20); определяющую комплементарность область 2 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH2), включающую аминокислотную последовательность YISSSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 21); определяющую комплементарность область 3 вариабельной области

тяжелой цепи (CDRH3), включающую аминокислотную последовательность GGHGYFDL (SEQ ID NO: 22); и определяющую комплементарность область 1 вариабельной области легкой цепи (CDRL1), включающую аминокислотную последовательность RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 27); определяющую комплементарность область 2 вариабельной области легкой цепи (CDRL2), включающую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 28); и определяющую комплементарность область 3 вариабельной области легкой цепи (CDRL3), включающую аминокислотную последовательность QQYHHSPLT (SEQ ID NO: 29), и d_{15} равно приблизительно 8.

[511] В некоторых вариантах осуществления конъюгат имеет Формулу CC:

(**CC**)

где конъюгат включает антитело XMT-1535, включающее: CDRH1, включающую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, включающую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); CDRH3, включающую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, включающую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, включающую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); CDRL3, включающую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10), и d_{15} равно приблизительно 8.

[512] В некоторых вариантах осуществления конъюгат Формулы BB или Формулы CC может применяться для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающего введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата Формулы BB или Формулы CC. В некоторых вариантах осуществления заболеванием или нарушением является рак.

[513] В некоторых вариантах осуществления, для конъюгата формулы BB, рак представляет собой рак молочной железы, рак желудка, колоректальный рак, рак пищевода, рак желчевыводящих путей, рак эндометрия, уротелиальный рак или немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с амплификацией/оверэкспрессией

HER2 или рак молочной железы с низким уровнем HER2. В некоторых вариантах осуществления рак эндометрия представляет собой серозный рак эндометрия.

[514] В некоторых вариантах осуществления конъюгат формулы CC может применяться для лечения опухоли, экспрессирующей NaPi2b, у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления NaPi2b-экспрессирующая опухоль представляет собой рак яичника, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), папиллярный рак щитовидной железы, рак эндометрия, холангиокарциному, папиллярный почечно-клеточный рак, светлоклеточный рак почки, рак молочной железы, рак почки, рак шейки матки или рак протоков слюнных желез.

[515] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект имеет эпителиальный рак яичника, рак фаллопиевой трубы, первичный рак брюшины, резистентный к препаратам платины рак яичника, неплоскоклеточный рак легкого, прогрессирующий, резистентный к препаратам радиоактивного йода, локорегионарный рецидивирующий или метастатический папиллярный рак щитовидной железы или эпителиальный рак эндометрия.

[516] В некоторых вариантах осуществления конъюгат формулы BB может применяться для лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, которое включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата формулы BB в комбинации с одним или больше терапевтическими средствами. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой иммуномодулирующее средство или иммуностимулирующее средство. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулятор представляет собой антитело против CTLA-4, антитело против PD-1, антитело к ICOS, антитело к OX-40, антитело к PD-L1, антитело к LAG3, антитело к TIM-3, антитело к 41BB или антитело к GITR.

[517] В некоторых вариантах осуществления конъюгат формулы BB может применяться для лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, которое включает введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата формулы BB в комбинации с одним или более антителами к HER2, которые связываются с другим эпитопом HER2, нежели антитело к HER2, XMT-1519. В некоторых вариантах осуществления антителом к HER2, которое связывается с эпитопом HER2, отличным от эпитопа антитела к HER2, XMT-1519, является трастузумаб, пертузумаб, Fab37 или chA21.

ПРИМЕРЫ

[518] Следующие примеры иллюстрируют изобретение. Эти примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения, а скорее служат руководством для специалиста в данной области по получению и применению соединений, композиций и способов согласно настоящему изобретению. Хотя описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалиста в данной области будет очевидно, что могут быть сделаны различные изменения и модификации без отступления от сущности и объема изобретения.

[519] Следует понимать, что некоторые соединения согласно изобретению могут быть сильнодействующими иммуномодуляторами, и, соответственно, при обращении с ними следует соблюдать осторожность.

[520] Реакции, описанные в настоящем документе, могут применяться для получения Соединений согласно изобретению, содержащих множество различных групп-заместителей (например, R^1, R^2 и т.д.), как определено в настоящем документе. Квалифицированному специалисту будет понятно, что если конкретный заместитель не совместим со способами синтеза, описанными в настоящем документе, такой заместитель может быть защищен подходящей защитной группой, которая устойчива в условиях реакции. Подходящие защитные группы и способы защиты и снятия защиты с различных заместителей с использованием таких подходящих защитных групп хорошо известны специалистам в данной области; соответствующие примеры можно найти в справочнике T. W. Greene 'Protective Groups in Organic Synthesis' (4th edition, J. Wiley and Sons, 2006). Если не указано иное, все исходные материалы были получены от коммерческих поставщиков и использовались без дополнительной очистки.

Сокращения

[521] Следующие сокращения используются в схемах реакций и примерах синтеза, представленных ниже. Данный список не является исчерпывающим списком сокращений, используемых в настоящей заявке, поскольку дополнительные стандартные сокращения, которые хорошо известны специалистам в области органического синтеза, также могут использоваться в схемах синтеза и примерах.

ACN	Ацетонитрил
CDI	1,1'-Карбонилдиимидазол
ДЦК	N,N′-Дициклогексилкарбодиимид
ДХМ	Дихлорметан
DIPEA	N,N-Диизопропилэтиламин
ДМА	Диметилацетамид
ДМФА	Диметилформамид
DMPA	Диметилолпропионовая кислота
ЭРИ	Электрораспылительная ионизация
HATU	Гексафторфосфат 2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония
ХГВ	Хроматография гидрофобного взаимодействия
HOBt	Гидроксибензотриазол
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
MeOH	Метанол
SEC	Эксклюзионная хроматография
ТФУ	Трифторуксусная кислота
ТГФ	Тетрагидрофуран
PyBOP	Гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)-трипирролидинофосфония

Общая информация

[522] Все реагенты были приобретены у соответствующих поставщиков, если не указано иное.

[523] Агонист STING diABZI получали, как описано в Ramanjulu et al (Nature, 564(7736):439-443 (2018)).

[524] XMT-1535 (антитело против NaPi2b) раскрыто в одновременно рассматриваемой заявке US 15/457,574, поданной 13 марта 2017 года, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством отсылки. XMT-1519 (антитело против Her2) раскрыто в патенте США 9,555,112 от 31 января 2017 года и патенте США 9,738,720 от 22 августа 2017 года, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством отсылки.

[525] AF-HPA ADC XMT-1535, DAR 5,9, и AF-HPA ADC Ритуксимаб, DAR 5.5, получали, как описано в одновременно рассматриваемой заявке US 62/958,916, поданной 9 января 2020 года, и US 63/040,735, поданной 18 июня 2020 года, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством отсылки.

[526] Очистку ВЭЖХ проводили на полупрепаративной колонке Phenomenex Gemini, 5 мкм, C18 110 Å, 250×10 мм.

[527] Если это применимо, содержание лекарственного средства в конъюгатах определяли спектрофотометрически, в ином случае с помощью ОФ-ВЭЖХ или ЖХ/МС, как для количественного определения содержания лекарственного средства.

[528] Содержание белка в конъюгатах антитела-лекарственного средства определяли спектрофотометрически или с помощью ИФА.

[529] Конъюгаты антитела-лекарственного средства, несущие лекарственное средство каркасы или каркасы антител очищали (т.е. удаляли остаточное непрореагировавшее лекарственное средство, неконъюгированное антитело, ферменты или исходные материалы) путем интенсивной диафильтрации, хроматографии на керамическом гидроксиапатите (CHT) или ХГВ, как требовалось. При необходимости проводили дополнительную очистку с помощью SEC или ХГВ для удаления агрегированных конъюгатов антитела-лекарственного средства. Как правило, очищенные конъюгаты антитела-лекарственного средства содержали <5% (вес/вес) (например, <2% (вес/вес)) агрегированных конъюгатов антитела-лекарственного средства, согласно SEC; <0,5% (вес/вес) (например, <0,1% (вес/вес)) свободного (неконъюгированного) лекарственного средства, согласно ОФ-ВЭЖХ и/или ЖХ-МС/МС; <1% (вес/вес) свободного конъюгата лекарственного средства, согласно SEC и/или ОФ-ВЭЖХ; и <10% (вес/вес) (например, <1% (вес/вес)) неконъюгированного антитела или фрагментов антител, согласно ХГВ-ВЭЖХ и/или ОФ-ВЭЖХ. Восстановленные или частично восстановленные антитела получали с использованием методик, описанных в литературе, см., например, Francisco et al. , Blood 102 (4): 1458-1465 (2003). Общую концентрацию лекарственного средства (конъюгированного и неконъюгированного) определяли с помощью УФ-Вид спектрофотометрии или ОФ-ВЭЖХ.

[530] Для определения концентрации свободного лекарственного средства в

биологическом образце подкисленный образец обрабатывали ацетонитрилом. Свободное лекарственное средство экстрагировали и исследовали супернатант в ацетонитриле. Для определения концентрации конъюгированного агониста STING в доклиническом образце образец подвергали иммунозахвату с использованием магнитных гранул с антителом против человеческого Fc с последующим полным щелочным гидролизом. Супернатант в ацетонитриле, содержащий высвобожденное лекарственное средство, анализировали с помощью ЖХ-МС/МС. Общее количество антител в доклинических образцах измеряли с помощью иммуноанализа MSD ECL.

[531] Анализ свободного лекарственного средства проводили с помощью ОФ-ВЭЖХ при использовании колонки C-4 и градиента в ацетонитриле. Площади пиков MRM на тандемной масс-спектрометрии интегрировали и сравнивали со стандартными образцами ауристатина F (AF) и гидроксипропиламида ауристатина F (AF-HPA). Метод является количественным для AF-HPA и AF в гомогенатах плазмы и тканей и линейным в диапазоне концентраций от 0,1 до 150 нг/мл. Общее количество лекарственного средства, высвобождаемого после гидролиза NaOH, измеряли в тех же условиях в динамическом диапазоне от 1 нг/мл до 5000 нг/мл. Общие стандарты антител находились в пределах от 0,009 мкг/мл до 20 мкг/мл.

[532] Отношение лекарственного средства к антителу (DAR) определяли путем измерения абсорбции конъюгатов. Значение DAR вычисляли при использовании соответствующих молярных коэффициентов экстинкции антитела и полезной нагрузки - агониста STING.

[533] Опухоли измеряли два раза в неделю с помощью цифровых штангенциркулей, и объемы опухолей вычисляли по формуле: объем опухоли ($мм^3$)=(ширина^2×длина)/2. Массу тела регистрировали ежедневно в течение первой недели и затем два раза в неделю. Животные оставались в исследовании, пока объем отдельной опухоли не достигал ≥1000 $мм^3$, ≥1500 $мм^3$ или как указано. Процентное изменение массы тела вычисляли по формуле: изменение массы тела (%)=((масса тела$^{день\ исследования\ X}$ - масса тела$^{день\ исследования\ 1}$)/масса тела$^{день\ исследования\ 1}$)*100. Объемы опухолей представлены как среднее ±стандартная ошибка среднего (SEM). Ингибирование роста опухоли (%TGI) определяли как процентное различие средних объемов опухоли (MTV) между обработанной и контрольной группами. Размер опухоли измеряли в течение каждого исследования эффективности для определения ингибирования роста опухоли (TGI). Процент регрессии опухоли вычисляли по формуле: % регрессии=(1-(средний объем опухоли^{конечный})/(средний объем опухоли$^{день\ 1}$))*100. Частичный ответ (PR) определяется как объем опухоли 50% или меньше для объема в день 1 в трех последовательных измерениях и больше или равный 13,5 $мм^3$ по меньшей мере в одном из трех измерений. Полный ответ (CR) определяется как объем опухоли меньше 13,5 $мм^3$ в трех последовательных измерениях. Безопухолевую выживаемость (TFS) классифицировали как наличие CR в конце исследования.

Пример 1: Синтез XMT-1519 Конъюгата 8

[534] **Часть A**: К смеси Соединения **1** (полученного, как описано в WO2017175147A1, 0,5 г, 0,64 ммоль), Boc-L-Аланина (0,242 г, 1,28 ммоль), DMAP (7,8 мг, 0,064 ммоль) и ДЦК (0,264 г, 1,28 ммоль) добавляли ДМФА (2 мл). Суспензию перемешивали в течение ночи при комнатной температуре, после чего раствор концентрировали, а остаток очищали на силикагеле (0-40% MeOH в ДХМ), с получением Соединения **2** в виде светло-желтого твердого вещества (0,52 г, выход 85%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{46}H_{58}N_{13}O_{10}$ $[M+H]^+$: 952,4; определено 952,4.

[535] **Часть B**: К суспензии Соединения **2** (0,52 г, 0,55 ммоль) в диоксане (10 мл) добавляли 4H HCl (2 мл, 8,19 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего суспензию концентрировали и использовали без дополнительной очистки в следующей стадии. Соединение **3** получали в виде белого

твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{41}H_{50}N_{13}O_8$ [M+H]: 852,4; определено 852,3.

[536] **Часть C**: К раствору Соединения **3** (0,586 г, 0,661 ммоль) в ДМФА (5 мл) добавляли 2,2-диметил-4-оксо-3,8,11-триокса-5-азатетрадекан-14-овой кислоты (0,202 г, 0,727 ммоль) с последующим добавлением DIPEA (0,230 мл, 1,322 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 минут, после чего добавляли HATU (0,376 г, 0,992 ммоль) и HOBt (0,153 г, 0,992 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Добавляли дополнительную аликвоту DIPEA (0,460 мл, 2,6 ммоль). Еще через 1 час реакционную смесь концентрировали до масла. Остаток очищали на силикагеле (0-40% MeOH в ДХМ) с получением Соединения **4** (0,9 г, выход >95%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{53}H_{71}N_{14}O_{13}$ $[M+H]^+$: 1111,5; определено 1111,5.

[537] **Часть D**: К суспензии Соединения **4** (0,9 г, 0,810 ммоль) в диоксане (10 мл) добавляли 4H HCl (3,04 мл, 12,15 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Суспензию концентрировали с получением Соединения **5** в виде бесцветного твердого вещества (0,56 г, выход 66,0%). ЭРИ-МС, Вычисл. для $C_{48}H_{63}N_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$: 1011,5; определено 1011,4.

[538] **Часть E**: К раствору Каркаса **6** (100 мг, 0,072 ммоль, полученного, как описано в PCT/US2018/06719) и Соединения **5** (72,7 мг, 0,072 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавляли PyBOP (37,5 мг, 0,072 ммоль) и DIPEA (0,075 мл, 0,431 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 2 ч, затем раствор концентрировали, а остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (0-80% ACN в воде) с получением Соединения **7** (109 мг, выход 64%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{103}H_{156}N_{24}O_{41}$ $[M+2H]^{2+}$: 1192,5; определено 1192,5.

[539] **Часть F**: К раствору XMT-1519 (10 мг, 0,069 мкмоль) в буфер 50 мМ HEPES, 1 мМ ЭДТА, pH 7, добавляли TCEP (0,059 мг, 0,207 мкмоль) и смесь перемешивали на шейкере при 37°C в течение 90 минут. К восстановленному антителу добавляли Соединение **7** (0,987 мг, 0,414 мкмоль в 200 мкл ДМА). Полученную смесь перемешивали на шейкере при 37°C в течение 60 минут. Реакцию останвливали цистеином (15 эквивалентов, 0,125 мг, 1,035 мкмоль в 125 мкл 50 мМ HEPES, 1 мМ ЭДТА, pH 7) и центрифугировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученный Конъюгат **8** очищали с помощью СНТ хроматографии или ультрафильтрации. Характеристики конъюгатов антитела-лекарственного средства 8-1 и 8-2 приведены ниже. Конъюгаты 8-1 и 8-2 были получены, как описано, за исключением того, что в синтезе 8-2 использовали более высокое соотношение TCEP:мАт по сравнению с 8-1 (4:1 против 3:1), а также более высокое соотношение Соединения 7 и мАт (8:1 против 6:1).

Конъюгат	**DAR**
8-1	6,1
8-2	6,8

Пример 1a: Синтез конъюгата трастузумаба 8a

8a

[540] Конъюгат **8a** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Трастузумаб. Характеристики конъюгатов антитела-лекарственного средства **8a-1**, **8a-2** и **8a-3** приведены ниже.

Конъюгат	**DAR**
8a-1	6,0
8a-2	7,0
8a-3	8,4

Пример 1b: Синтез конъюгата XMT-1535 8b, DAR 5,7

8b

[541] Конъюгат **8b** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали XMT-1535. Характеристики конъюгатов антитела-лекарственного средства **8b-1**, **8b-2** и **8b-3** приведены ниже.

Конъюгат	**DAR**
8b-1	5,7
8b-2	6,6
8b-3	6,4

Пример 1c: Синтез конъюгата Паливизумаба 8c

8c

[542] Конъюгат **8c** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб. Характеристики конъюгатов антитела-лекарственного средства **8c-1** и **8c-2** приведены ниже.

Конъюгат	**DAR**
8c-1	7,5
8c-2	5,8

Пример 1d: Синтез конъюгата Паливизумаба mIgG2a 8d

8d

[543] Конъюгат **8d** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб mIgG2a. Характеристики конъюгатов антитела-лекарственного средства **8d-1**, **8d-2** и **8d-3** приведены ниже.

Конъюгат	**DAR**
8d-1	6,8
8d-2	6,5
8d-3	6,0

Пример 1e: Синтез Конъюгата XMT-1535 hIgG1-mIgG2a 8e, DAR 7,0

8e

[544] Конъюгат **8e** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали XMT-1535 mIgG2a. Очищенный Конъюгат **8e** имел отношение агониста STING к XMT-1535 hIgG1-mIgG2a 7,0.

Пример 1f: Синтез конъюгата XMT-1535 AAG 8f, DAR 7,4

8f

[545] Конъюгат **8f** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали XMT-1535 AAG. Очищенный Конъюгат **8f** имел отношение агониста STING к XMT-1535 AAG 7,4.

Пример 1g: Синтез конъюгата мишень D mIgG2a 8g, DAR 7.4

8g

[546] Конъюгат **8g** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Мишень D mIgG2a. Очищенный Конъюгат **8g** имел отношение агониста STING к Мишень D_mIgG2a 7,4.

Пример 1h: Синтез конъюгата Мишень C hIgG1a 8h, DAR 6,9

8h

[547] Конъюгат **8h** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Мишень C hIgG1a. Очищенный Конъюгат **8g** имел отношение агониста STING к Мишень C hIgG1a 6,9.

Пример 1i: Синтез конъюгата Мишень E mIgG2a 8i, DAR 10,0

8i

[548] Конъюгат **8i** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Мишень E mIgG2a. Очищенный Конъюгат **8g** имел отношение агониста STING к Мишень E mIgG2a 10,0.

Пример 1j: Синтез конъюгата Трастузумаба AAG 8j, DAR 7,0

8j

[549] Конъюгат **8j** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Трастузумаб AAG.

[550] Характеристики конъюгатов **8j** и **8j-1** приведены ниже.

Конъюгат	**DAR**
8j	7,0
8j-1	4,2

Пример 1k: Синтез конъюгата Трастузумаб mIgG2a 8k, DAR 8,1

8k

[551] Конъюгат **8k** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Трастузумаб mIgG2a. Очищенный конъюгат **8k** имел отношение агониста STING к Трастузумабу mIgG2a 8,1.

Пример 1l: Синтез конъюгата XMT-1535 8l, DAR 4,7

8l

[552] Конъюгат **8l** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали XMT-1535, и 2-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этокси)-уксусная кислота была включена в структуру соединения вместо (3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)пропаноил)-L-аланина. Очищенный конъюгат 8l имет отношение агониста STING к XMT-1535 4,7.

Пример 1m: Синтез конъюгата Паливизумаб 8m, DAR 4,5

8m

[553] Конъюгат **8m** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб, и 2-(2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)-этокси)уксусная кислота была включена в структуру соединения вместо (3-(2-(2-аминоэтокси)этокси)пропаноил)-L-аланина. Очищенный конъюгат **8m** имел отношение агониста STING к Паливизумабу 4,5.

Пример 2: Синтез конъюгата XMT-1519 16, DAR 5,3

[554] **Часть A**: К раствору Соединения **9** (0.100 г, 0,429 ммоль) в ТГФ (5 мл) добавляли HATU (0,196 г, 0,514 ммоль) и HOBt (0,079 г, 0,514 ммоль), реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 мин, после чего добавляли 2-(бензилокси)этан-1-амин (0,0648 мг, 0,429 ммоль) и DIPEA (0,112 мл, 0,643 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, раствор концентрировали, а

остаток очищали на силикагеле (0-10% MeOH в ДХМ) с получением Соединения **10** (0,2 г, выход 100%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для: $C_{19}H_{30}N_2O_5Na$ ($[M+Na]^+$): вычисл. 389,2; определено 389,2.

[555] **Часть B**: Раствор Соединения **10** (150 мг, 0,409 ммоль) в EtOH (10 мл) дегазировали N_2, после чего добавляли Pd-C (43,6 мг, 0,409 ммоль). Затем смесь дегазировали H_2. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре под H_2 (1 атм) в течение ночи. Твердую фазу отфильтровывали через слой Целита и концентрировали фильтрат с получением Соединения **11**. Неочищенное Соединение **11** использовали в следующей стадии без дополнительной очистки. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для: $C_{12}H_{24}N_2O_5Na$ [(M+Na] +): вычисл. 299,2; определено 299,2.

[556] **Часть C**: В колбу объемом 100 мл, содержащую остаток Соединения **11** (128 мг, 0,463 ммоль) и N,N-диметилпиридин-4-амин (11,32 мг, 0,093 ммоль), пропускали аргон, а затем добавляли триэтиламин (129 мкл, 0,926 ммоль), ацетонитрил (1,544 мл) и ДМФА (0,772 мл). Реакционную смесь охлаждали до 0°C и перемешивали в течение 5 мин с последующим добавлением 4-нитрофенил-хлорформиата (140 мг, 0,695 ммоль) и перемешивали полученную смесь при 20°C в течение 2 ч, после чего концентрировали до масла. Остаток очищали над силикагелем (0-100% этилацетата в гексане) с получением Соединения **12** (50 мг, выход 24%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для: $C_{14}H_{19}N_3O_7$ $[(M-Boc+H]^+)$: вычисл. 342,2; определено 342,1.

[557] **Часть D**: К раствору Соединения **12** (50 мг, 0,113 ммоль) и Соединения **1** (36,9 мг, 0,047 ммоль) добавляли DMAP (1,153 мг, 9,44 мкмоль) в ДМФА (500 мкл). Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 3 ч, после чего добавляли Соединение **12** (50 мг, 0,113 ммоль). Реакционную смесь перемешивали еще в течение 3 ч, а затем охлаждали до комнатной температуры. Смесь концентрировали, а остаток очищали над силикагелем (0-30% MeOH в ДХМ) с получением Соединения **13** (20 мг, выход 39%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для: $C_{51}H_{67}N_{14}O_{13}$ $[(M+H)]^+$: вычисл. 1083,4; определено 1083,5.

[558] **Часть E**: К раствору Соединения **13** (20 мг, 0,047 ммоль) в ДХМ (0,5 мл) добавляли ТФУ (0,1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, затем концентрировали с получением Соединения **14** (10 мг, выход 55%) в виде твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{46}H_{59}N_{14}O_{11}$ $[M+H]^+$: вычисл. 983,4; определено 983,5.

[559] **Часть F**: К раствору Каркаса **6** (14,15 мг, 10,17 мкмоль) и Соединения **14** (10 мг, 10,17 мкмоль) в ДМФА (1 мл) добавляли HATU (4,64 мг, 0,012 ммоль), HOAt (1,881 мг, 0,012 ммоль) и DIPEA (0,018 мл, 0,102 ммоль). Реакционную смесь, перемешивали при комнатной температуре 2 ч, после чего концентрировали, а остаток очищали с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ (0-80% ACN в воде) с получением Каркаса **15** (20 мг, выход 83%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для: $C_{101}H_{152}N_{24}O_{41}$ ($[M+2H]^{2+}$): вычисл. 1178,7; определено 1178,59.0.

[560] **Часть G**: Раствор XMT-1519 (10 мг, 0,069 мкмоль) конъюгировали с

Каркасом **15** ((0,823 мг, 0,347 мкмоль в 200 мкл ДМА), как описано в Примере 1. Очищенный конъюгат **16** имел отношение агониста STING к XMT-1519 5,3.

Пример 3: Синтез конъюгата трастузумаба 20

[561] **Часть A**: Раствор Boc-Ala-Ala-OH (67 мг, 256 мкмоль), CDI (70 мг, 435 мкмоль) и ДМФА (2 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 23 ч. Затем добавляли Соединение **1a** (полученное, как описано в WO2017175147A1, 100 мг, 128 мкмоль) и DIPEA (67 мкл, 384 мкмоль) и перемешивали реакцию при комнатной температуре в течение 23 ч. Реакционную смесь концентрировали, а остаток хроматографировали на силикагеле (элюент 0-20% MeOH-ДХМ). Продукт, Соединение **17**, выделяли в виде желтой пены (109 мг, выход 83%). ЭРИ-МС m/zi, Вычисл. для $C_{49}H_{64}N_{15}O_{10}$ $[M+H]^+$: 1022,5; определено 1022,4.

[562] **Часть B**: Смесь Соединения **17** (108 мг, 106 мкмоль) и 2M HCl-диоксана (6 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали, а остаток сушили в глубоком вакууме с получением Соединения 18 в виде почти белой пены (103 мг, колич.). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{44}H_{56}N_{15}O_8$ [M+H]: 922,4; определено 922,4.

[563] **Часть C**: Смесь Соединения **18** (80 мг, 84 мкмоль), Каркаса **6** (117 мг, 84 мкмоль), HOAt (12 мг, 84 мкмоль), DiPEA (59 мкл, 336 мкмоль) и ДМФА (3 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин, после чего добавляли HATU (42 мг, 109 мкмоль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 20 ч. Затем реакционную смесь концентрировали и хроматографировали в обращенной фазе (элюент 10-100% ACN-вода с 0,1% HCOOH). Каркас **19** выделяли в виде белого рыхлого твердого вещества (35 мг, выход 18%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{99}H_{149}N_{25}O_{38}$ $[M+2H]^{2+}$: вычисл. 1148,0; определено 1148,4.

[564] **Часть D**: Трастузумаб (10 мг, 0,067 мкмоль) конъюгировали с Каркасом **19** (1,237 мг, 0,539 мкмоль в 200 мкл ДМА), как описано в Примере 1, с последующей очисткой с помощью СНТ хроматографии II типа, с получением Конъюгата **20**. Характеристики конъюгатов антитела-лекарственного средства 20-1 и 20-2 приведены ниже.

Конъюгат	**DAR**
20-1	6,0
20-2	6,1

Пример 3a: Синтез конъюгата Паливизумаба 20a, DAR 5,5

[565] Конъюгат **20a** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб. Очищенный Конъюгат **20a** имел отношение агониста STING к Паливизумабу 5,5.

Пример 4: Синтез конъюгата трастузумаба 25, DAR 6,6

[566] **Часть A**: К смеси Соединения **21** (полученного, как описано в US 62/982,935, 38 мг, 0,047 ммоль) и трет-бутил-(S)-(2-гидроксипропил)карбамата (9,85 мг, 0,056 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавляли гидрохлорид 3-(этилимино)метилен)амино)-N,N-диметилпропан-1-амина (13,48 мг, 0,070 ммоль), HOBt (10,77 мг, 0,070 ммоль), DIPEA (0,016 мл, 0,094 ммоль) и DMAP (5,73 мг, 0,047 ммоль). Затем суспензию перемешивали в течение 2 дней при комнатной температуре. Смесь концентрировали с получением остатка, который очищали на силикагеле (0-30% MeOH в ДХМ) с получением Соединенияя 22 в виде светло-желтого твердого вещества (20 мг, выход 44%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{47}H_{58}N_{11}O_{12}$ $[M+H]^+$: вычисл. 968,4; определено 968,3.

[567] **Часть B**: К суспензии Соединения **22** (20 мг, 0,021 ммоль) в диоксане (4 мл) добавляли 4H HCl (0,52 мл, 8,19 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч, концентрировали и использовали без очистки в следующей стадии. Продукт, Соединение **23** (17 мг, выход 95%), представляло собой белое твердое вещество. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{42}H_{50}N_{11}O_{10}$ $[M+H]^+$: 868,3; определено 868,4.

[568] **Часть C**: К раствору Соединения **23** (17 мг, 0,020 ммоль) и Каркаса **6** (32,1

мг, 0,023 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавляли PyBOP (15,3 мг, 0,03 ммоль) и DIPEA (0,034 мл, 0,196 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 2 ч, концентрировали с получением остатка, который очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ (0-80% ACN в воде) с получением Каркаса **24** (26 мг, выход 59%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{97}H_{143}N_{21}O_{40}$ $[M+2H]^{2+}$: 1120,98; определено 1121,06.

[569] **Часть D**: Антитело XMT-1519 (5 мг, 0,0347 мкмоль) конъюгировали с Каркасом **24** (0,622 мг, 0,278 мкмоль), как описано в Примере 1. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью колоночной CHT хроматографии с получением Конъюгата **25** (3,19 мг, выход 64%). Очищенный Конъюгат 25 имел отношени агониста STING к XMT-1519 6,6.

Пример 5: Синтез Конъюгата XMT-1519 28, DAR 6,0

[570] **Часть A**: Соединение **26** было получено, как описано в Примере 1, за исключением того, что **26** (полученное, как описано в US 62/982,935) использовали вместо Соединения **1**. Соединение **27** получали в виде бесцветного твердого вещества (71,0 мг, выход 40%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{103}H_{154}N_{22}O_{43}$ $[M+2H]^{2+}$: 1193,52; определено 1193,48

[571] **Часть B**: Конъюгат **28** получали, как описано в Примере 1, с получением Конъюгата **28**. Очищенный Конъюгат **28** имел отношение агониста STING к XMT-1519

6,0.

Пример 6: Синтез конъюгата XMT-1519 29, DAR 5,5

[572] Конъюгат **28** (6,5 мг) приготавливали в PBS, pH 8, с 3 циклами концентрирования и разведения при использовании ультрафильтрационной колонки с MWCO 30 кДа. Затем конъюгат с таким измененным составом инкубировали при 37°C в течение 24 ч и меняли буфер на трегалозный буфер с pH 5,5. Размыкание цикла подтверждали с помощью ЖХМС анализа тяжелой и легкой цепи после восстановления антитела. Наблюдали хорошее разделение между разными формами легкой цепи: неконъюгированной, конъюгированной с интактным сукцинимидом и конъюгированной с сукцинимидом с разомкнутым циклом. Размыкание цикла также можно было наблюдать в соответствующих формах тяжелой цепи, но разделение между различными формами было слабым. Поэтому степень размыкания цикла оценивали, ориентируясь на формы легкой цепи. Используя такой подход, процент продукта с разомкнутым циклом в Конъюгате **29** относительно интактного сукцинимида оценили равным 94%. Конъюгат **29** имел отношение агониста STING к XMT-1519 5,5.

Пример 7: Синтез конъюгата XMT-1519 32-1, DAR 6,5

[573] **Часть A**: Каркас **31** был получен, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо Соединения **1** использовали Соединение **30** (полученное, как описано в US 62/982,935). Каркас **31** был получен в виде бесцветного твердого вещества (9 мг, выход 8%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{101}H_{151}N_{23}O_{42}$ $[M+2H]^{2+}$: 1179,02; определено 1179,21.

[574] **Часть B**: Конъюгаты **32-1**, **32-2**, **32-3** и **32-4** были получены, как описано в Примере 1, с получением указанного в заголовке конъюгата. Очищенные Конъюгаты **32-1**, **32-2**, **32-3**, **32-4** и **32-5** имели отношение агониста STING к XMT-1519, описанное в таблице ниже. Конъюгат **32-5** имел концентрацию мАт >10 мг/мл, содержал <1% неконъюгированного мАт и <1% высокомолекулярных продуктов.

Конъюгат	**DAR**
32-1	6,5
32-2	6,4
32-3	6,7
32-4	8,6
32-5	8,1

Пример 7a: Синтез конъюгата XMT-1535 32a, DAR 6,2

32a

[575] Конъюгаты **32a**, **32a-1**, **32a-2**, **32a-3** и **32a-4** были получены и подвергнуты анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали XMT-1535. Очищенные Конъюгаты **32a**, **32a-1**, **32a-2**, **32a-3** и **32a-4** имели отношение агониста STING к XMT-1535, описанное в таблице ниже.

Конъюгат	**DAR**
32a	6,2
32a-1	7,4
32a-2	8,0
32a-3	7,5
32a-4	8,0

Пример 7b: Синтез конъюгата Паливизумаба 32b, DAR 6,8

32b

[576] Конъюгаты **32b**, **32b-1** и **32b-2** были получены и подвергнуты анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб. Очищенные Конъюгаты **32b**, **32b-1** и **32b-2** имели отношение агониста STING к Паливизумабу, описанное в таблице ниже.

Конъюгат	**DAR**
32b	6,8
32b-1	5,7
32b-2	7,2

Пример 7c: Синтез конъюгата Паливизумаба mIgG2a 32c, DAR 9,1

32c

[577] Конъюгат **32c** был получен и подвергнут анализу, как описано выше в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб mIgG2a. Очищенный Конъюгат **32c** имел отношение агониста STING к Паливизумабу 9,1.

Пример 7d: Синтез конъюгата XMT-1535 mIgG2a 32d, DAR 8,8

32d

[578] Конъюгат **32d** был получен и подвергнут анализу, как описано выше в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали XMT-1535 mIgG2a. Очищенный Конъюгат **32d** имел отношение агониста STING к XMT-1535 mIgG2a 8,8.

Пример 7e: Синтез конъюгата XMT-1519 AAG 32e, DAR 7,4

32e

[579] Конъюгат **32e** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали XMT-1519 AAG. Очищенный Конъюгат **32e** имел отношение агониста STING к XMT-1519 AAG 7,4.

Пример 7-1: Альтернативный синтез Соединения 31

[580] **Часть A**: Соединение **30** (полученное, как описано в US 62/982,935) (500 мг, 0,663 ммоль, 1 экв.), Boc-ПЭГ2-Ala-OH (0,693 г, 1,99 ммоль, 3 экв.), EDC-HCl (381 мг, 1,99 ммоль, 3 экв.) и DMAP (243 мг, 1,99 ммоль) смешивали во флаконе под воздухом в ДМФА (26,5 мл). Реакция завершилась через 3 часа. Смесь гасили AcOH (0,76 мл, 10 экв.), концентрировали и очищали на силикагеле (ДХМ:MeOH) с получением Соединения **30a** в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{51}H_{66}N_{13}O_{14}$ $[M+H]^+$: 1084,5; определено 1084,4.

[581] **Часть B**: Соединение **30a** (0,663 ммоль) суспендировали в диоксане (10 мл) в

колбе под воздухом. Добавляли HCl (4M в диоксане, 6 мл) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь концентрировали с получением белого твердого вещества. Твердое вещество растворяли в чистой воде и очищали с помощью обращенно-фазовой хроматографии (0-25% ACN в воде) с получением Соединения **30b** (444 мг, 77%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{46}H_{58}N_{13}O_{12}$ $[M+H]^+$: 984,4; определено 984,2.

[582] **Часть C**: К раствору Каркаса **6** (450 мг, 0,32 ммоль, полученного, как описано в PCT/US2018/06719) и Соединения **30b** (350 мг, 0,072 ммоль) в ДМФА (6,5 мл) добавляли PyBOP (185 мг, 0,36 ммоль) и триэтиламин (0,23 мл, 1,62 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 15 минут, гасили AcOH (0,23 мл, 3,99 ммоль) и очищали с помощью обращенно-фазовой очистки (0-40% ACN в воде с 0,1% уксусной кислоты) с получением Соединения **31** (408 мг, выход 55%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{101}H_{151}N_{23}O_{42}$ $[M+2H]^{2+}$: 1179,52; определено 1179,27.

Пример 8: Синтез конъюгата трастузумаба 34, DAR 6,9

[583] **Часть A**: К раствору Соединения **1a** (полученного, как описано в WO2017175147A1, 0,030 г, 0,038 ммоль) в ДМФА (1,5 мл), добавляли N-этил-N-изопропилпропан-2-амин (0,067 мл, 0,385 ммоль). Раствор перемешивали в течение 5 минут при комнатной температуре с последующим добавлением 2,5-диоксопирролидин-1-ил-1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,6,9,12,15,18-гексаоксогенэйкозан-21-оата (0,027 г, 0,050 ммоль) в ДМФА (0,5 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем добавляли уксусную кислоту (0,1 мл) с последующей очисткой на препаративной колонке ВЭЖХ (C18, 21,2 мм ×100 мм), 10-100% MeCN (0,1% HOAc) в H_2O (0,1% HOAc, 20 мин. градиент), с получением Каркаса **33** (0,006 г, выход 13,05%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{57}H_{75}N_{14}O_{15}$ $[M+H]^+$: вычисл. 1195,55; определено 1195,47.

[584] **Часть B**: Трастузумаб (10 мг, 0,069 мкмоль) конъюгировали с Каркасом **33** (0,658 мг, 0,550 мкмоль в ДМА), как описано в Примере 1. Неочищенный Конъюгат **34** очищали с помощью СНТ хроматографии II типа. Очищенный Конъюгат **34** имел

отношение агониста STING к Трастузумабу 6,9.

Пример 8a: Синтез конъюгата Паливизумаба 34a, DAR 7,0

[585] Конъюгат **34a** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 8, за исключением того, что вместо Трастузумаба использовали Паливизумаб. Очищенный Конъюгат **34a** имел отношение агониста STING к Паливизумабу 7,0.

Пример 9: Синтез конъюгата XMT-1519 45, DAR 6,5

[586] **Часть A**: К смеси Соединения **35** (400 мг, 1688 мкмоль) и t-бутилацетат (8 мл) добавляли 70% $HClO_4$ (302 мг, 2,11 ммоль). Затем полученный раствор перемешивали

при комнатной температуре в течение 21 ч, после чего нейтрализовали насыщ. раствором $NaHCO_3$. Водную фазу промывали EtOAc (2×), а затем объединенную органическую фазу промывали насыщенным солевым раствором, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали с получением Соединения **36** в виде мутного масла (530 мг, колич.). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{16}H_{24}N_1O_4$ $[M+H]^+$: 294,2; определено 294,2.

[587] **Часть B**: Смесь Соединения **36** (279 мг, 782 мкмоль), Соединения **37** (370 мг, 938 мкмоль), HOAt (128 мг, 938 мкмоль), DIPEA (409 мкл, 2,35 ммоль) и ДМФА (4 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин, затем добавляли HATU (416 мг, 1095 мкмоль) и перемешивали реакцию при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Затем реакционную смесь концентрировали, а остаток хроматографировали на силикагеле (элюент 20-100% EtOAc/смесь гексанов). Соединение **38** выделяли в виде белого рыхлого вещества (254 мг, 362 мкмоль, выход 46%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{39}H_{48}N_2O_9$ $[M+H]^+$: 702,3; определено 702,4.

[588] **Часть C**: Смесь Соединения **38** (254 мг, 362 мкмоль), MeOH и катализатора 10% Pd-C (на 6 мл) (50 мг) перемешивали под H_2 (1 атм) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем реакционную смесь фильтровали и концентрировали фильтрат с получением Соединения 39 в виде прозрачного масла (214 мг, выход 97%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{32}H_{42}N_3O_9$ $[M+H]^+$: 612,3; определено 612,3.

[589] **Часть D**: Смесь Соединения **39** (58 мг, 64 мкмоль), Соединения 40 (полученного, как описано в US 62/982,935, 47 мг, 77 мкмоль), HOAt (10 мг, 77 мкмоль), DiPEA (56 мкл, 320 мкл) и ДМФА (2 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем добавляли HATU (36 мг, 96 мкмоль) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 16 ч, после чего концентрировали с получением Соединения **41** в виде желтого масла (90 мг, колич.). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{70}H_{83}N_{14}O_{16}$ $[M+H]^+$: 1375,6; определено 1375,4.

[590] **Часть E**: Раствор Соединения **41** (90 мг, 64 мкмоль) в 20% пиперидине в ДМФА (2 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем реакционную смесь концентрировали и хроматографировали на силикагеле (элюент 0-40% MeOH-ДХМ) с получением Соединения **42** в виде желтого масла (30 мг, выход 41%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{55}H_{73}N_{14}O_{14}$ [M+H]: 1153,5; определено 1153,4.

[591] **Часть F**: Раствор Соединения **42** (30 мг, 37 мкмоль), 2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)ацетата (8 мг, 44 мкмоль), ТЭА (7 мкл, 74 мкмоль) и ДМФА (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 17 ч. Затем реакционную смесь концентрировали с получением Каркаса **43** в виде желтого масла (40 мг, колич.). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{61}H_{76}N_{15}O_{17}$ $[M+H]^+$: 1290,6; определено 1290,3.

[592] **Часть G**: Раствор Каркаса **43** (30 мг, 26 мкмоль) в 10% ТФУ-ДХМ (2 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем реакционную смесь концентрировали, а остаток хроматографировали ВЭЖХ (элюент 10-100% ACN-вода с 0,1% HCOOH). Каркас **44** выделяли в виде почти белого рыхлого вещества (6 мг, выход 20%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{52}H_{60}N_{15}O_{15}$ $[M+H]^+$: 1134,4; определено 1134,2.

[593] **Часть H**: Конъюгат **45** был получен, как описано в Примере 1, за исключением того, что использовали 4 эквив. TCEP. Очищенный Конъюгат **45** имел отношение агониста STING к XMT-1519 6,5.

Пример 10: Синтез конъюгата XMT-1519 50, DAR 8,2

[594] **Часть A**: Смесь Соединения **26** (полученного, как описано в US 62/982,935, 50 мг, 64 мкмоль), Fmoc-D-глутамат-O-tBu (54 мг, 128 мкмоль), ДЦК (26 мг, 128 мкмоль), DMAP (1 мг, 6 мкмоль) и ДМФА (2 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 17 ч. Реакционную смесь концентрировали и использовали в следующей стадии без очистки. Соединение **46** было получено в виде желтого масла (135 мг). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{62}H_{68}N_{11}O_{14}$ $[M+H]^+$: 1190,5; определено 1190,3.

[595] **Часть B**: Смесь Соединения **46** (135 мг, 64 мкмоль) и 33% ТЭА в ДМФА (2,4 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 4,5 ч. Реакционную смесь концентрировали, а остаток очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ хроматографии (элюент 10-100% ACN-вода с 0,1% HCOOH). Соединение **47** выделяли в виде желтого порошка (27 мг, выход 44%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{47}H_{58}N_{11}O_{12}$ $[M+H]^+$: 968,4; определено 968,2.

[596] **Часть C**: Раствор Соединения **47** (25 мг, 26 мкмоль), 2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)ацетата (8 мг, 31 мкмоль), ТЭА (11 мкл, 78 мкмоль) и ДМФА (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали и использовали в следующей стадии без очистки. Каркас **48** было получен в виде желтого масла (40 мг, колич.). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{53}H_{61}N_{12}O_{15}$ $[M+H]^+$: 1105,4; определено 1105,2.

[597] **Часть D**: Раствор Каркаса **48** (40 мг, 24 мкмоль) и 15% ТФУ в ДХМ (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем реакционную смесь концентрировали и хроматографировали ВЭЖХ (элюент 10-100% ACN-вода с 0,1% HCOOH). Каркас **49** выделяли в виде белого рыхлого вещества (5 мг, выход 20%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{49}H_{53}N_{12}O_{15}$ $[M+H]^+$: 1049,4; определено 1049,2.

[598] **Часть E**: XMT-1519 (10 мг, 0,069 мкмоль) конъюгировали с Каркасом **49**, как описано в Примере 1. Конъюгат **50** очищали с помощью СНТ хроматографии II типа.

Очищенный Конъюгат **50** имел отношение агониста STING к XMT-1519 8,2.

Пример 11: Синтез конъюгата XMT-1519 52, DAR 7,7

[599] Конъюгат **52** получали из Каркаса **51**, как описано в Примере 10, за исключением того, что вместо Fmoc-D-Glu(O-tBu) использовали Fmoc-L-Glu(O-tBu). Очищенный Конъюгат **52** имел отношение агониста STING к XMT-1519 7,7.

Пример 12: Синтез конъюгата XMT-1519 58, DAR 6,5

[600] **Часть A**: К смеси Соединения **26** (полученного, как описано в US 62/982,935, 0,105 г, 0,134 ммоль), Boc-L-Аланина (50,8 мг, 0,268 ммоль), DMAP (50,8 мг, 0,067 ммоль) и ДЦК (0,111 г, 0,537 ммоль) добавляли ДМФА (2 мл). Затем суспензию перемешивали 2 дня при комнатной температуре. Смесь концентрировали и очищали на силикагеле (0-40% MeOH в ДХМ) с получением Соединения **53** в виде светло-желтого твердого вещества (0,102 г, выход 80%). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{46}H_{56}N_{11}O_{12}$ $[M+H]^+$: 954,4; определено

954,4.

[601] **Часть B**: К суспензии Соединения **53** (0,102 г, 0,107 ммоль) в диоксане (10 мл) добавляли 4H HCl (0,508 мл, 2,031 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем суспензию концентрировали и использовали в следующей стадии без очистки. Соединение **54** получали в виде светло-желтого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{41}H_{48}N_{11}O_{10}$ $[M+H]^+$: 854,3; определено 854,3.

[602] **Часть C**: К раствору Соединения **54** (0,015 г, 0,017 ммоль) в ДМФА (1 мл) добавляли Boc-D-Glu(Otu)-OH (7,67 мг, 0,025 ммоль) с последующим добавлением DIPEA (0,026 мл, 0,152 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем добавляли PyBOP (13,15 мг, 0,025 ммоль), перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1 ч, концентрировали, а остаток очищали на силикагеле (0-30% MeOH в ДХМ) с получением Соединения **55** (11 мг, выход 57,3%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{55}H_{71}N_{12}O_{15}$ $[M+H]^+$: 1139,5; определено 1139,5.

[603] **Часть D**: К суспензии Соединения **55** (11 мг, 0,00966 ммоль) в диоксане (3 мл) добавляли 4H HCl (0,241 мл, 0,966 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Суспензию концентрировали и использовали в следующей стадии без очистки. Соединение **56** получали в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{46}H_{55}N_{12}O_{13}$ $[M+H]^+$: 983,4; определено 983,4.

[604] **Часть E**: К раствору Соединения **56** (9,5 мг, 0,00966 ммоль) в ДМФА (3 мл) добавляли DIEA (8,44 мкл, 0,048 ммоль) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)ацетат (3,17 мг, 0,013 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, нейтрализовали до pH 6-7 с использованием HOAc, затем очищали с помощью препаративной ОФ-ВЭЖХ (0-75% ACN в воде) с получением Каркаса **57** (3,3 мг, выход 31%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{52}H_{58}N_{13}O_{16}$ $[M+H]^+$: 1120,4; определено 1120,4.

[605] **Часть F**: XMT-1519 (10 мг, 0,069 мкмоль) конъюгировали с Каркасом **57** (0,700 мг, 0,625 мкмоль в 200 мкл ДМА), как описано в Примере 1. Конъюгат **58** очищали с помощью СНТ хроматографии II типа. Очищенный Конъюгат **58** имел отношение агониста STING к XMT-1519 6,5.

Пример 13: Синтез конъюгата XMT-1519 60

[606] Конъюгат **60** получали из **59**, как описано в Примере 12, за исключением

того, что вместо Boc-D-Glu-O-tBu использовали Boc-L-Glu(Otu)-OH. Характеристики конъюгатов антитела-лекарственного средства **60-1** и **60-2** приведены ниже.

Конъюгат	**DAR**
60-1	7,7
60-2	5,5

Пример 14: Синтез конъюгата XMT-1519 62, DAR 6,5

[607] Конъюгат **62** получали из Каркаса **61**, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо Boc-D-Glu-O-tBu использовали Boc-L-Glu(Otu)-OH, и вместо Boc-L-Ala использовали Boc-D-Ala. Очищенный Конъюгат **62** имел отношение агониста STING к XMT-1519 6,5.

Пример 15: Синтез конъюгата XMT-1519 64, DAR 6,4

[608] Конъюгат **64** получали из Каркаса **63**, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо Boc-L-Ala использовали Boc-D-Ala. Очищенный Конъюгат **64** имел отношение агониста STING к XMT-1519 6,4.

Пример 16: Синтез конъюгата XMT-1519 66

[609] Конъюгат **66** получали из Каркаса **65**, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо Boc-L-Ala использовали Boc-2-амино-2-метилпропановую кислоту. Характеристики конъюгатов антитела-лекарственного средства **66-1** и **66-2** приведены ниже.

Конъюгат	**DAR**
66-1	7,5
66-2	5,3

Пример 17: Синтез конъюгата XMT-1519 74, DAR 6,9

[610] **Часть A**: Смесь Соединения **26** (полученного, как описано в US 62/982,935, 75 мг, 0,096 ммоль), N-Boc-(D)-Ala-OH (91 мг, 0,48 ммоль), ДЦК (99 мг, 0,48 ммоль) и DMAP (1,2 мг, 9,58 мкмоль) в ДМФА (3 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем концентрировали в вакууме. Очистка на силикагеле (ДХМ:MeOH 60:40 об/об) давала Соединение **67** (82 мг, выход 90%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{46}H_{56}N_{11}O_{12}$ $[M+H]^+$: 954,40, определено: 954,43

[611] **Часть B**: К суспензии Соединения **67** (80 мг, 0,084 ммоль) в диоксане (5 мл) добавляли HCl (4M в диоксане, 0,42 мл, 1,68 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 4 ч. Смесь концентрировали в вакууме с получением Соединения **68** (72 мг, выход 100%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{41}H_{48}N_{11}O_{10}$ $[M+H]^+$: 854,35, определено: 854,38

[612] **Часть C**: К перемешиваемому раствору Соединения **68** (48 мг, 0,056 ммоль), N-Boc-глицана (15 мг, 0,084 ммоль) и PyBOP (44 мг, 0,084 ммоль) в ДМФА (3 мл) добавляли DIPEA (0,088 мл, 0,51 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 2 ч. Смесь концентрировали, а остаток очищали на силикагеле (ДХМ:MeOH 60:40 об/об) с получением Соединения **69** (53 мг, выход 93%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{48}H_{59}N_{12}O_{13}$ $[M+H]^+$: 1011,42, определено: 1011,45

[613] **Часть D**: К суспензии Соединения **69** (50 мг, 0,049 ммоль) в диоксане (5 мл) добавляли HCl (4M в диоксане, 1 мл, 20% об/об) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 2 ч, затем концентрировали с получением Соединения **70** (45 мг, выход 100%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{43}H_{51}N_{12}O_{11}$ $[M+H]^+$: 911,37, определено: 911,39

[614] **Часть E**: К перемешиваемому раствору Соединения **70** (20 мг, 0,022 ммоль), N-Boc-(D)-Glu(OtBu)-OH (10 мг, 0,033 ммоль) и PyBOP (17 мг, 0,033 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавляли DIPEA (0,03 мл, 0,22 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 2 ч. Смесь концентрировали, а остаток очищали на силикагеле (ДХМ:MeOH 60:40 об/об) с получением Соединения **71** (24 мг, выход 90%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{57}H_{74}N_{13}O_{16}$ $[M+H]^+$: 1196,53; определено: 1196,55

[615] **Часть F**: К суспензии Соединения **71** (24 мг, 0,02 ммоль) в ДХМ (5 мл) добавляли ТФУ (1 мл, 20% v/v) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 12 ч. Смесь концентрировали с получением Соединения **72** (21 мг, выход 100%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{48}H_{58}N_{13}O_{14}$ $[M+H]^+$: 1040,41; определено: 1040,23

[616] **Часть G**: К перемешиваемому раствору Соединения **72** (21 мг, 0,02 ммоль), 2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)ацетата (7,6 мг, 0,03 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавляли DIPEA (0,035 мл, 0,20 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь концентрировали, а остаток очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ с получением Каркаса **73** (4,5 мг, выход 19%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{54}H_{61}N_{14}O_{17}$ $[M+H]^+$: 1177,43; определено: 1177,40

[617] **Часть H**: Конъюгат **74** получали из Каркаса **73**, как описано в примере 12. Очищенный Конъюгат **74** имел отношение агониста STING к XMT-1519 6,9.

Пример 18: Синтез конъюгата XMT-1519 76, DAR 7.5

[618] Конъюгат **76** получали из Каркаса **75**, как описано в Примере 17, за исключением того, что вместо N-Boc-(D)-Ala-OH использовали N-Boc-(L)-Ala-OH и вместо N-Boc-(D)-Glu(OtBu)-OH использовали N-Boc-(L)-Glu(OtBu)-OH. Очищенный Конъюгат **76** имел отношение агониста STING к XMT-1519 7,5.

Пример 19: Синтез конъюгата XMT-1519 78, DAR 7,4

[619] Конъюгат **78** получали из Каркаса **70**, как описано в Примере 17, за исключением того, что вместо N-Boc-(D)-Glu(OtBu)-OH использовали N-Boc-(L)-Glu(OtBu)-OH. Очищенный Конъюгат **78** имел отношение агониста STING к XMT-1519 7,4.

Пример 20: Синтез конъюгата XMT-1519 80, DAR 7,5

[620] Конъюгат **80** получали из Каркаса **79**, как описано в Примере 17, за исключением того, что вместо N-Boc-(D)-Ala-OH использовали N-Boc-(L)-Ala-OH. Очищенный Конъюгат **80** имел отношение агониста STING к XMT-1519 7,5.

Пример 21: Синтез конъюгата XMT-1519 82, DAR 5,7

[621] Конъюгат **82** получали из Каркаса 81, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо Boc-(L)-Ala-OH использовали Boc-Глицин. Очищенный Конъюгат **81** имел отношение агониста STING к XMT-1519 5,7.

Пример 22: Синтез конъюгата XMT-1519 85, DAR 6,5

85

[622] **Часть A**: Каркас **84** получали, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо Соединения 1 использовали Соединение **83** (полученное, как описано в US 62/982,935). Каркас **84** получали в виде белого рыхлого вещества (3,3 мг, выход 0,5% в 5 стадиях). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{101}H_{148}N_{22}O_{42}S$ $[M+2H]^{2+}$: 1187,49; определено 1187,78.

[623] **Часть B**: Конъюгат **85** получали, как описано в Примере 1, с получением конъюгата, указанного в заголовке. Очищенный Конъюгат **85** имел отношение агониста STING к XMT-1519 6,5.

Пример 22a: синтез конъюгата Паливизумаба 85a, DAR 7,4

85a

[624] Конъюгат **85a** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 1, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб. Очищенный Конъюгат **85a** имел отношение агониста STING к Паливизумабу 7,4.

Пример 23: Синтез конъюгата XMT-1519 88, DAR 6,6

86 87

88

[625] **Часть A**: Каркас **87** получали, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо Соединения **26** использовали Соединение **86** (полученное, как описано в US 62/982,935). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{50}H_{55}N_{14}O_{15}$ $[M+H]^+$: 1091,4; определено 1091,2.

[626] **Часть B**: Конъюгат **88** получали, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо Каркаса **57** использовали Каркас **87**. Очищенный конъюгат имел отношение агониста STING к XMT-1519 6,6.

Пример 23a: Синтез конъюгата Паливизумаба 89, DAR 5,9

89

[627] Конъюгат **89** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб. Очищенный Конъюгат 89 имел отношение агониста STING к Паливизумабу 5,9.

Пример 23b: Синтез конъюгата CTL-48132_mIgG2a 89a, DAR 8,8

[628] Конъюгат **89a** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали CTL-48132_mIgG2a. Очищенный Конъюгат **89a** имел отношение агониста STING к CTL-48132_mIgG2a 8,8.

Пример 23c: Синтез конъюгата MFP5_mIgG2a 89b, DAR 9,0

[629] Конъюгат **89b** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали CTL-48132_mIgG2a. Очищенный Конъюгат 89b имел отношение агониста STING к MFP5_mIgG2a 9,0.

Пример 24: Синтез конъюгата XMT-1519 92, DAR 7,6

[630] **Часть A**: Каркас **91** получали, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо Соединения **26** использовали Соединение **90** (полученное, как описано в US 62/982,935). ЭРИ-МС m/z, Вычисл. для $C_{52}H_{58}N_{13}O_{15}S$ $[M+H]^+$: 1136,4; определено

1136,2.

[631] **Часть B**: Конъюгат **88** получали, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо Каркаса **57** использовали Каркас **87**. Очищенный конъюгат имел отношение агониста STING к XMT-1519 7,6.

Пример 24a: Синтез конъюгата Паливизумаба 93, DAR 6,7

93

[632] Конъюгат **93** был получен и подвергнут анализу, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб. Очищенный Конъюгат **93** имел отношение агониста STING к Паливизумабу 6,7.

Пример 25: Синтез конъюгата XMT-1519 100, DAR 7,8

[633] **Часть A**: К перемешиваемому раствору Соединения **94** (полученного, как описано в US 62/982,935, 45 мг, 0,054 ммоль) в ДМФА (3 мл) добавляли (S)-1-(Boc-амино)пропан-2-ол (19 мг, 0,11 ммоль), EDC (17 мг, 0,109 ммоль) и DMAP (3,3 мг, 0,027 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 12 часов. Реакцию концентрировали в вакууме, а остаток очищали на силикагеле (ДХМ:MeOH 60:40 об/об) с

получением **95** (49 мг, выход 92%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС: $C_{47}H_{57}N_{10}O_{12}S$ (M+H): вычисл. 985,38, определено: 985,21.

[634] **Часть B**: К перемешиваемой суспензии Соединения **95** (49 мг, 0,05 ммоль) в ДХМ (5 мл) добавляли ТФУ (1 мл, 20% об/об ДХМ) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 12 часов. Полученную смесь концентрировали с получением Соединения **96** (44 мг, выход 100%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЭРИ-МС: $C_{42}H_{49}N_{10}O_{10}S$ (M+H): вычисл. 885,33, определено: 885,18.

[635] **Часть C**: К перемешиваемому раствору Соединения **96** (50 мг, 0,05 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавляли Boc-Glu-OtBu (86 мг, 0,28 ммоль), PyBOP (118 мг, 0,23 ммоль) и DIPEA (0,12 мл, 0,68 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 30 минут. Смесь концентрировали в вакууме, а остаток очищали на силикагеле (ДХМ:MeOH 60:40 об/об) с получением Соединения **97** (45 мг, выход 77%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС: $C_{56}H_{72}N_{11}O_{15}S$ (M+H): вычисл. 1170,49, определено: 1170,29.

[636] **Часть D**: К перемешиваемой суспензии Соединения **97** (45 мг, 0,038 ммоль) в ДХМ (5 мл) добавляли ТФУ (1 мл, 20% об/об ДХМ) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 12 часов. Смесь концентрировали в вакууме с получением Соединения **98** (38 мг, выход 100%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЭРИ-МС: $C_{47}H_{56}N_{11}O_{13}S$ (M+H): вычисл. 1014,37, определено: 1014,20.

[637] **Часть E**: К перемешиваемому раствору Соединения **98** (20 мг, 0,02 ммоль) в ДМФА (2 мл) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)ацетат (5 мг, 0,02 ммоль) и DIPEA (0,034 мл, 0,20 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение 15 минут. Реакцию останавливали уксусной кислотой (0,034 мл, 1:1 об/об DIPEA) и непосредственно очищали с помощью ВЭЖХ при использовании неподвижной фазы C18 (вода:ACN) с получением Каркаса **99** (4,7 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ЭРИ-МС: $C_{53}H_{59}N_{12}O_{16}S$ (M+H): вычисл. 1151,38, определено: 1151,18.

[638] **Часть F**: Конъюгат **100** получали, как описано в Примере 12, за исключением того, что вместо Каркаса **57** использовали Каркас **99**. Очищенный конъюгат имел отношение агониста STING к XMT-1519 7,8.

Пример 25a: Синтез конъюгата Паливизумаба 101, DAR 6,5

101

[639] Конъюгат **101** получали, как описано в Примере 25, за исключением того, что

вместо XMT-1519 использовали Паливизумаб. Очищенный конъюгат имел отношение агониста STING к Паливизумабу 6,5.

Пример 26A: Активность STING-ADC с Fc дикого типа или мутантным Fc, направленная против раковых клеток, в совместных культурах раковых клеток/клеток THP1 с репортерным геном люциферазы

[640] **Создание Fc-молчащих антител к NaPi2b**: мАт против NaPi2b с модифицированной Fc-областью для устранения эффекторной функции Fc (анти-NaPi2b-(AAG)) было сконструировано с тремя мутациями в константной области тяжелой цепи - L234A, L235A и P329G (AAG; нумерация Eu Кэбата) и создано с помощью стандартной методики молекулярной биологии. Антитело экспрессировали и очищали. Вкратце, ДНК, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи антитела к NaPi2b с константной областью IgG1 человека, несущую мутации L234A, L235A и P329G, и вариабельную область легкой цепи антитела против NaPi2b с легкой цепью каппа человека, клонировали в векторы экспрессии млекопитающих. Тяжелую цепь и легкую цепь NaPi2b-(AAG) совместно экспрессировали в клетках HEK293, и антитело очищали из клеточных супернатантов с помощью стандартной аффинной хроматографии с белком A.

[641] **Индукция пути STING в иммунных клетках**. Индукцию пути STING в иммунных клетках с помощью NaPi2b-направленного STING ADC оценивали с помощью анализа в совместной культуре раковых клеток/клеток THP1-IRF3 с репортерным геном люциферазы. Клетки карциномы яичника человека OVCAR3 сеяли в 96-луночные планшеты для культур тканей CellBind (15000/лунка) и оставляли для прикрепления на 6 часов в среде RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллином/стрептомицином. В каждую лунку добавляли серию разведений (от 0,4 нМ до 100 нМ в зависимости от полезной нагрузки; 3-кратные серийные разведения в питательной среде) тестируемых препаратов: Конъюгата **8b-1**, Конъюгата **8f**, Конъюгата **8d-1** и Соединения **1**, и инкубировали планшет в течение 20 мин при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли репортерные клетки THP1-Dual (30000) и продолжали инкубирование в течение 20 часов при 37°C в увлажняемой атмосфере с 5% CO_2. Супернатанты клеточных культур (20 мкл) с каждым инкубированным образцом добавляли к ресуспендированному QUANTI-Luc (50 мкл) и сразу измеряли люминесцентный сигнал с помощью микропланшетного ридера SpectraMax M5 (Molecular Devices). Значение EC_{50} определяли по кривой зависимости доза-эффект. В Таблице 1A представлены значения EC_{50} в клетках THP1-Dual, совместно культивируемых с раковыми клетками OVCAR3.

Таблица 1A

Исследуемый препарат	**Конъюгат 8b-1**	**Конъюгат 8f**	**Конъюгат 8d-1**	**Соединение 1**
EC_{50} (нМ)	<0,05	43,3	41,8	6,8

[642] Как показано в Таблице 1A, Конъюгат **8b-1** с эффекторной функцией Fc дикого типа демонстрирует более чем 100-кратное повышение активности по сравнению со свободным агонистом, Соединением **1**, и ~1000-кратное повышение активности по

сравнению с Конъюгатом **8f** и Конъюгатом **8d-1**, подтверждая роль Fc-рецептора для активности. Показанные результаты представляют собой значения EC50 репрезентативного эксперимента.

Пример 26B: Активность STING-ADC с Fc дикого типа или мутантным Fc, направленная против раковых клеток, в совместных культурах раковых клеток/клеток THP1 с репортерным геном люциферазы.

[643] **Создание Fc-молчащих антител к HER-2**: мАт трастузумаб с модифицированной Fc-областью для устранения эффекторной функции Fc (анти-Her2-(AAG)) было сконструировано с тремя мутациями в константной области тяжелой цепи - L234A, L235A и P329G. (AAG; нумерация Eu Кэбата) и создано, как описано в Примере 26A.

[644] **Индукция пути STING в иммунных клетках**. Индукцию пути STING в иммунных клетках Her2-направленным STING ADC оценивали с помощью анализа совместного культивирования раковых клеток/ клеток THP1-IRF3 с репортерным геном люциферазы при использовании клеток карциномы молочной железы человека SKBR3, как описано в Примере 26A, с тестируемыми препаратами (Конъюгатом **8a-2**, Конъюгатом **8j**, Конъюгатом **8c-2** и Соединением **1**). В Таблице 1A представлены значения EC_{50} в клетках THP1-Dual, совместно культивируемых с раковыми клетками SKBR3.

Таблица 1B

Исследуемый препарат	**Конъюгат 8a-2**	**Конъюгат 8j**	**Конъюгат 8c-2**	**Соединение 1**
EC_{50} (нМ)	0,35	>200	>200	7,4

[645] Как показано в Таблице 1B, Конъюгат **8a-2** с эффекторной функцией Fc дикого типа демонстрирует ~50-кратное повышение активности по сравнению со свободным агонистом, Соединением **1**, и ~1000-кратное повышение активности по сравненную с Конъюгатом **8j** и Конъюгатом **8c-2**, подтверждая роль Fc-рецептора для активности. Показанные результаты являются значениями EC_{50} из репрезентативного эксперимента.

Пример 27A: Активность STING-ADC с Fc дикого типа или мутантным Fc, направленная против раковых клеток, в клетках THP1 с репортерным геном люциферазы, культивируемых на планшетах, покрытых антигеном опухолевых клеток

[646] Пептид, полученный из NaPi2b человека (QINVTVPSTANCTSPSLCWTDGIQNWTMKN), наносили на поверхность каждой лунки 96-луночного планшета путем инкубирования с пептидом (1 мкг/мл в PBS) в течение ночи при 4°C. Затем лунки промывали 1× PBS-T и блокировали при инкубировании с BSA (3% в PBS-T) в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания PBS-T (2×), PBS (1×) и питательной средой (RPMI 1640, 10% FBS, 1% пенициллин/стрептомицин, 1×) серию разведений (от 0,4 нМ до 100 нМ в зависимости от полезной нагрузки; 3-кратные серийные разведения в питательной среде) исследуемых препаратов (Конъюгата **8b-1**,

Конъюгата **8f**, Конъюгата **8c-1** и Соединения **1**) добавляли в каждую лунку и инкубировали планшет в течение 20 мин при 37°C. В каждую лунку добавляли репортерные клетки THP1-Dual (50000) и инкубировали в течение 20 часов при 37°C в увлажняемой атмосфере с 5% CO_2. Супернатанты клеточных культур (20 мкл) с каждым инкубируемым образцом добавляли к ресуспендированному QUANTI-Luc (50 мкл) и сразу измеряли люминесцентный сигнал с помощью микропланшетного ридера SpectraMax M5 (Molecular Devices). Значение EC_{50} определяли по кривой зависимости доза-эффект. В Таблице 2A представлены значения EC_{50} в клетках THP1-Dual, культивируемых на планшетах, покрытых рекомбинантным пептидом NaPi2b.

Таблица 2A

Исследуемый препарат	**Конъюгат 8b-1**	**Конъюгат 8f**	**Конъюгат 8c-1**	**Соединение 1**
EC_{50} (нМ)	<0,022	>100	18,99	5,18

[647] Как показано в Таблице 2, Конъюгат **8b-1** с Fc дикого типа демонстрирует в ~100 раз более высокую активность по сравнению с Соединением **1**. Конъюгат **8f** не обладает активностью, а конъюгат **8c-1** обладает активностью в ~1000 раз ниже по сравнению с Конъюгатом **8b-1**, подтверждая роль Fc-рецептора для активности. Показанные результаты являются значениями EC_{50} из репрезентативного эксперимента.

Пример 27B: Активность STING ADC с Fc дикого типа или мутантным Fc, направленная против раковых клеток, в клетках THP1 с репортерным геном люциферазы, культивируемых на планшетах, покрытых антигеном опухолевых клеток

[648] Пептид, полученный из белка HER2/ErbB2 человека (His-меченный, ECD, домен IV, 17,1 кДа), наносили на поверхность каждой лунки 96-луночного планшета путем инкубирования с пептидом (1 мкг/мл в PBS) в течение ночи при 4°C, и проводили анализ, как описано в Примере 27A, за исключением того, что использовали 3-кратные серийные разведения (от 0,09 нМ до 200 нМ в зависимости от полезной нагрузки) исследуемых препаратов Конъюгата **8a-3**, Конъюгата **8j**, Конъюгата **8c-2** и Соединения **1**. В Таблице 2B представлены значения EC_{50} в клетках THP1-Dual, культивируемых на планшетах, покрытых рекомбинантным белком Her2

Таблица 2B

Исследуемый препарат	**Конъюгат 8a-3**	**Конъюгат 8j**	**Конъюгат 8c-2**	**Соединение 1**
EC_{50} (нМ)	0,36	>200	>200	8,8

[649] Как показано в Таблице 2B, Конъюгат **8a-3** с Fc дикого типа демонстрировал в ~100 раз более высокую активность по сравнению с Соединением 1. Конъюгат **8j** и Конъюгат **8c-2** не обладали активностью, подтверждая роль Fc-рецептора для активности. Показанные результаты являются значениями EC_{50} из репрезентативного эксперимента.

Пример 28A: Активность NaPi2b ADC, направленного против опухолевых клеток, в совместных культурах раковых клеток/МКПК

[650] Клетки карциномы яичника человека OVCAR3, стабильно экспрессирующие

красный флуоресцентный белок mKate с локализацией сигнала в ядре, были получены путем трансдукции реагентом IncuCyte© NucLight Red Lentivirus. Стабильно трансдуцированные клетки (обозначенные как клетки OVCAR3-NucRed), которые подвергали селекции в течение двух дней на среде, содержащей пуромицин (2 мкг/мл), сеяли в 96-луночные планшеты для культур тканей (8000/лунка) и оставляли для прикрепления в течение ночи в среде RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Культуральную среду заменяли свежей средой (50 мкл). Затем исследуемые препараты (в 3× концентрации, Конъюгат **8b-1** (100, 10 и 1 нМ), Конъюгат **8f** (100, 10 и 1 нМ), Конъюгат **8c-1** (100 и 10 нМ) и Соединение **1** (100 и 10 нМ); концентрации конъюгатов основаны на полезной нагрузке) добавляли в каждую лунку со средой (50 мкл) и инкубировали планшет в течение 20 мин при 37°C. Замороженные человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) размораживали в соответствии с инструкциями поставщика и добавляли в каждую лунку (40000 МКПК в 50 мкл среды), после чего планшет помещали в прибор для визуализации живых клеток IncuCyte© в термостате (37°C, 5% O_2) и сканировали каждые 4 часа в течение 2 дней. Количество красных объектов (раковых клеток) определяли количественно с помощью программы IncuCyte© Zoom. Конфлюентность красных объектов в каждой лунке нормализовали по собственной конфлюентности красных объектов в точке времени T=0.

[651] На ФИГ. 1A представлена зависимость конфлюентности красных объектов от времени и показана устойчивая индукция лизиса раковых клеток клетками МКПК, вызванного Конъюгатом **8b-1**, при концентрации полезной нагрузки в 100 раз ниже в сравнении с Соединением **1**. Конъюгат **8f** также проявлял активность, хотя и на более низких уровнях по сравнению с Конъюгатом 8b. Конъюгат **8c-1** обладал значительно более низкой активностью по сравнению с Конъюгатом **8b-1**.

Пример 28B: Активность NaPi2b ADC, направленного против опухолевых клеток, в совместных культурах раковых клеток/МКПК

[652] Клетки OVCAR3-NucRed сеяли в 96-луночные планшеты для культур тканей (20000/лунка) и оставляли для прикрепления на 6 часов в среде RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Культуральную среду заменяли свежей средой (50 мкл). Затем в каждую лунку со средой (50 мкл) добавляли исследуемые препараты (Конъюгат **8l** и Соединение **1** (оба в концентрации 100, 10 и 1 нМ) и Конъюгат **8m** (100 нМ); концентрации конъюгатов основаны на полезной нагрузке). Анализ проводили, как описано в Примере 28A, за исключением того, что использовали 30000 МКПК. Количество красных объектов (раковых клеток) определяли количественно при использовании программы IncuCyte© Zoom. Количество красных объектов в каждой лунке нормализовали по собственному количеству красных объектов в точке времени T=0.

[653] На **ФИГ. 1B** представлена зависимость количества красных объектов от времени и показана устойчивая индукция лизиса раковых клеток клетками МКПК, вызванного Конъюгатом **8l** при концентрации полезной нагрузки в 100 раз ниже в

сравнении с Соединением **1**. Конъюгат **8m** не обладал значимой активностью и увеличение количества красных объектов (рост клеток) в динамике было аналогично необработанному контролю. Вставка показывает, что ни один из исследуемых препаратов (100 нМ) не ингибировал рост клеток OVCAR3-NucRed в монокультурах.

Пример 29: Анализ экспрессии CD14, Fcγ рецепторов и CD3 в МКПК и выделенных субпопуляциях моноцитов методом проточной цитометрии

[654] Замороженные МКПК человека (1×10^8) размораживали и делили на аликвоты в три пробирки: одну аликвоту подвергали обогащению моноцитами человека [StemCell Technologies] ("CD16-истощенные моноциты"), одну аликвоту подвергали обогащению моноцитами человека без истощения CD16 [StemCell Technologies] ("обогащенные моноциты") и одну аликвоту не подвергали обогащению ("МКПК"). Для проточной цитометрии, клетки (50000) из каждой группы переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном лунок, в 4 повторностях, промывали PBS и окрашивали фиксируемым красителем для окраски мертвых клеток LIVE/DEAD Aqua (Molecular Probes) с последующим окрашиванием конъюгированными с флуорофором мишеньспецифичными антителами (в тройной повторности) или антителами изотипического контроля (Pacific Blue против человеческого CD14, ФИТЦ против человеческого CD3, APC/Cy7 CD16, ФЭ против человеческого CD32, ФЭ/Cy7 против человеческого CD64). Клетки фиксировали и определяли поверхностную экспрессию представляющих интерес белков с помощью проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре MACSQuant. Анализ данных выполняли с помощью программы FlowJo. В Таблице 3 приведена частота (% одиночных/живых клеток)) CD14-/CD16+, CD14+/CD16+, CD14-/CD32+, CD14+/CD32+, CD14-/CD64+, CD14+/CD64+ и CD14-/CD3+ клеток в популяциях МКПК, обогащенных моноцитов и CD16-истощенных моноцитов

Таблица 3

Популяция (%)*	**CD14+ CD16+**	**CD14- CD16+**	**CD14+ CD32+**	**CD14- CD32+**	**CD14+ CD64+**	**CD14- CD64+**	**CD14- CD3+**
МКПК	1,8±0,1	20,0±0,8	15,5±0,8	32,5±0,5	15,5±0,9	1,0±0,3	47,5±0,7
Обогащенные моноциты	4,0±0,4	23,6±1,2	5,1±1,2	20,7±0,1	41,8±0,1	2,7±0,3	3,4±0,5
CD16-истощенные моноциты	2,0±0,2	3,0±0,9	5,8±0,5	24,2±1,1	46,8±0,6	2,7±0,1	2,5±1,2

*Сортировка одиночных/живых клеток

[655] В Таблице 3 показано эффективное истощение CD3+ клеток и обогащение моноцитов, а также снижение уровней CD16-положительных клеток в CD16-истощенных моноцитах после выделения. Результаты окраски на CD64 показывают, что все CD14-положительные клетки экспрессируют CD64 (FcγRI) в МКПК, как и в субпопуляциях обогащенных моноцитов.

[656] **ФИГ. 2** демонстрирует эффективное истощение CD3+ клеток и обогащение моноцитов, а также снижение уровней CD14-положительных клеток в CD16-истощенных моноцитах после выделения.

Пример 30: Цитолитическая активность в отношении раковых клеток Fc-мутантного Her2 ADC, направленного против опухолевых клеток, в совместных культурах in vitro МКПК и клеток SKBR3 со STING дикого типа или нокаутом STING

[657] **Получение клонов STING-нокаутных одиночных клеток, экспрессирующих флуоресцентный белок mKate с ограниченным в ядре сигналом**: Клетки SKBR3 сеяли в 24-луночные планшеты (50000/лунка) и трансфицировали ненаправленной егРНК и тремя различными егРНК, ненаправленными на ген STING человека, при использовании TrueGuide™ Synthetic gRNA, TrueCut™ Cas9 Protein v2 и реагента для трансфекции Lipofectamine™ CRISPRMAX™ производства Thermo Fisher в соответствии с методикой производителя. Последовательности егРНК были следующими: sgNT (ненаправленная): AAAUGUGAGAUCAGAGUAAU; sg#3: TACTCCCTCCCAAATGCGGT; sg#4: CTCGCAGGCACTGAACATCC; и sg#5: GTTAAACGGGGTCTGGCAGCC. Через 7 дней после трансфекции одиночные клетки сортировали в 96-луночные планшеты, содержащие 100 мкл DMEM с 20% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина, и через 2-3 недели получали клоны (среды заменяли свежими один-два раза в неделю). Множественные клоны трипсинизировали и размножали для анализа экспрессии STING с помощью Вестерн-блоттинга при использовании кроличьих моноклональных антител против STING (Cell Signaling Technologies) и против β-актина (Licor). Клоны, не экспрессировавшие белок STING (как определяли с помощью Вестерн-блоттинга), отбирали по стабильной экспрессии флуоресцентного белка mKate с ядрной локализацией сигнала, как описано в Примере 28.

[658] **Анализ цитолиза**: Клетки SKBR3 со STING дикого типа (sgNT-2: ненаправленная егРНК, клон 2) и нокаутом STING (sg#3-2: егРНК #3, клон 2), экспрессирующие NucRed, сеяли в 96-луночные планшеты (15000/лунка) в RPMI с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина, а проводили анализ цитолиза клетками МКПК, как описано в Примере 29, при использовании Конъюгата **8a-3**, Конъюгата **8j**, Конъюгата **8c-2** и Соединения **1**, каждого в концентрации 100, 25, 5 и 1 нМ (концентрации конъюгатов были основаны на полезной нагрузке).

[659] На **ФИГ. 3A** и **ФИГ. 3B** показана зависимость конфлюентности красных объектов от времени и цитолиз клеток SKBR3 со STING дикого типа (sgNT-2)/МКПК в совместных культурах и нокаутных (sg#3-2) клеток SKBR3/МКПК в совместных культурах. Конъюгат **8a-3** индуцировал эффективный лизис как клеток SKBR3 со STING дикого типа, так и нокаутных клеток SKBR3 в совместных культурах с МКПК при всех протестированных дозах. Конъюгат **8j** обладал высокой активностью при 100, 25 и 5 нМ в совместных культурах клеток SKBR3 со STING дикого типа (sgNT-2)/МКПК и низкой активностью в STING-нокаутных (sg#3-2) клетках SKBR3/МКПК. Соединение **1** проявляло активность в совместных культурах клеток SKBR3 со STING дикого типа (sgNT-2)/МКПК только в концентрации 100 нМ и не проявляло активности в совместных культурах STING-нокаутных (sg#3-2) клеток SKBR3/МКПК при всех дозах. Конъюгат **8c-**

2 не обладал какой-либо активностью ни в совместных культурах клеток SKBR3 со STING дикого типа (sgNT-2)/МКПК, ни в совместных культурах STING-нокаутных (sg#3-2) клеток SKBR3/МКПК.

Пример 30A: Активность направленного против опухолевых клеток Her2 ADC и антитела к Her2 в совместных культурах раковых клеток SKBR3 со STING дикого типа или нокаутом STING/МКПК

[660] Клетки SKBR3 со STING дикого типа (sgNT-2: ненаправленная егРНК, клон 2) и нокаутом STING (sg#3-2: егРНК #3, клон 2), экспрессирующие NucRed, культивировали совместно с МКПК и проводили анализ цитолиза, как описано в Примере 30, с использованием диапазона доз Конъюгата **8a-3**, Конъюгата **8-j** (200 нМ, на основе полезной нагрузки, 4-кратное разведение). Неконъюгированный трастузумаб с Fc дикого типа и AAG Fc-мутантный трастузумаб дозировали в зависимости от концентрации антитела, соответствующей концентрации антител Конъюгата **8a-3**. Как показано на **ФИГ. 4A** и **ФИГ. 4B**, Конъюгат **8a-3** демонстрировал эффективный лизис раковых клеток как со STING дикого типа, так и с нокаутом SKBR3, тогда как Fc-мутантный Her2-направленный ADC, Конъюгат **8-j**, демонстрировал цитолитическую активность только в совместных культурах SKBR3 со STING дикого типа, которая почти отсутствовала в совместных культурах SKBR3 с нокаутом STING. Оба антитела на основе трастузумаба как с Fc дикого типа, так и AAG мутантные антитела показали низкую активность как в совместных культурах клеток со STING дикого типа, так и нокаутных раковых клеток. Эти данные демонстрируют, что цитолитическая активность Fc-мутантного STING-ADC, направленная против раковых клеток, в совместных культурах с иммунными клетками возрастает за счет внутренней активации STING в опухолевых клетках.

Пример 31: Активность NaPi2b ADC, направленного против опухолевых клеток, в совместных культурах раковых клеток/человеческих моноцитов в отсутствие Т-клеток

[661] Клетки OVCAR3-NucRed (полученные, как описано в Примере 28) сеяли (15000/лунка) в 96-луночные планшеты для культур тканей CellBind (Corning) и оставляли для прикрепления на 6 часов в среде RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Культуральную среду заменяли свежей средой (50 мкл). Затем исследуемые препараты (Коньюгат **8b-1** и Соединение **1**, оба в концентрации 20 и 4 нМ, где концентрация конъюгата основана на концентрации полезной нагрузки) добавляли в каждую лунку со средой (50 мкл) и инкубировали планшет в течение 20 мин при 37°C. МКПК, обогащенные моноциты и CD16-истощенные моноциты получали, как описано в Примере 29. Затем в лунки с культуральной средой (50 мкл) добавляли живые МКПК (30000/лунка), обогащенные моноциты (20000/лунка) и CD16-истощенные моноциты (20000/лунка) и помещали планшет в прибор для визуализации живых клеток IncuCyte© в термостате (37°C, 5% O_2) и сканировали каждые 4 часа в течение 2 дней. Количество красных объектов (раковых клеток) определяли количественно с использованием программы IncuCyte© Zoom. Конфлюентность красных объектов в

каждой лунке нормализовали по исходной конфлюентности красных объектов в точке времени T=0. Конфлюентность красных объектов представлена в динамике на **ФИГ. 5A-5C** и показывает, что популяции моноцитов, истощенных по CD3+ Т-клеткам, обладают сравнимой цитолитической активностью в отношении раковых клеток в ответ на активность ADC, направленного против опухолевых клеток. Конъюгат **8b-1** при концентрациях полезной нагрузки 4 нМ и 20 нМ индуцировал эффективный лизис раковых клеток OVCAR3-NucRed клетками МКПК (**ФИГ. 5A**), обогащенными моноцитами (**ФИГ. 5B**) и CD16-истощенными моноцитами (**ФИГ. 5C**). Соединение **1** в концентрации 20 нМ индуцировало лизис раковых клеток только в совместных культурах обогащенных моноцитов и CD16-истощенных моноцитов.

Пример 32. Измерения in vitro человеческого CXCL10 и клеточного связывания конъюгатов антитела-лекарственного средства, направленных против HER2, с линией клеток рака молочной железы человека HCC1954

[662] Клетки рака молочной железы HCC1954 выращивали до ~80-95% конфлюентности в среде RPMI 1640 с добавкой FBS (10%) и пенициллина/стрептомицина (1%). Клетки собирали и добавляли в лунки 96-луночного планшета с плоскодонными лунками (40000/лунка) и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO_2. Затем клетки обрабатывали тестируемыми конъюгатами HER2-антитела-лекарственного средства (20 мкл), как указано в Таблице 4, в концентрациях от 1 пМ до 10 мМ, и инкубировали в течение 24 часов при 37°C, 5% CO_2. Планшеты центрифугировали (300 g, 5 минут), собирали супернатанты (100 мл) и подвергали анализу ИФА на CXCL10 человека (человеческий CXCL10/IP-10). Проявленные планшеты считывали при OD_{450} на микропланшетном ридере SpectraMax M5. Значения для каждой обработки наносили на кривую и вычисляли значения EC_{50} с помощью программы GraphPad Prism при использовании четырехпараметрической аппроксимации кривой.

[663] Для определения клеточного связывания конъюгатов HER2 антитела-лекарственного средства с клетками HCC1954 клетки выращивали до ~80-95% конфлюентности в среде RPMI 1640 с добавкой FBS (10%) и пенициллина/стрептомицина (1%). Клетки собирали и добавляли в лунки 96-луночного планшета с V-образным дном лунок (50000/лунка). Клетки осаждали (300×g, 5 минут) и ресуспендировали в растворах тестируемых конъюгатов HER2 антитела-лекарственного средства, как указано в Таблице 4, при концентрациях в пределах от 0,01 нМ до 100 нМ и инкубировали на льду в течение 3 часов. Затем клетки промывали охлажденным во льду PBS (3×), осаждали (300 g, 5 минут) и инкубировали с детектирующим антителом (козьим антителом против человеческого IgG-Alexa-647 (H+L цепь)) в течение 1 часа при 4°C. Суспензии клеток осаждали (300 g, 5 минут), 3 раза промывали охлажденным во льду PBS и фиксировали при ресуспендировании в растворе параформальдегида (2%). Затем ресуспендированные клетки подвергали анализу методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре MACS Quant. Одиночные события (10000) собирали для анализа. Гейтирование популяции и анализ средней интенсивности флуоресценции (MFI)

проводили при использовании программы FlowJo.

[664] В Таблице 4 приведены средние значения EC_{50} для связывания клеток и индукции CXCL10 в HCC1954.

Таблица 4

Исследуемые препараты	DAR	ИФА CXCL10 EC_{50} (нМ)	Связывание клеток EC_{50} (нМ)
Конъюгат **25**	6,6	0,13	ND
Конъюгат **45**	6,5	0,17	ND
Конъюгат **8-2**	6,8	0,51	ND
Конъюгат **28**	6	0,16	1,0
Конъюгат **29**	5,5	0,18	ND
Конъюгат **62**	6,5	0,20	ND
Конъюгат **64**	6,4	0,22	ND
Конъюгат **58**	6,5	2,3	ND
Конъюгат **74**	6,9	3,4	ND
Конъюгат **78**	7,4	2,7	ND
Конъюгат **28**	6	0,16	1,0
Конъюгат **82**	5,7	0,17	ND
Конъюгат **52**	7,7	0,12	2,3
Конъюгат **50-1**	7,7	0,13	ND
Конъюгат **66-2**	5,3	1,38	ND
Конъюгат **32-1**	6,5	1,23	2,4

ND=не определяли

[665] Как показано в Таблице 4, обработка клеток HCC1954 Her2-направленным конъюгатом антитела-лекарственного средства привела к суб- или низким наномолярным значениям EC_{50} для индукции CXCL10. В случае определения, значения EC_{50} для связывания Her2-направленных ADC с клетками HCC1954 также находились в низком наномолярном диапазоне.

Пример 33: Активность направленных против опухолевых клеток конъюгатов HER2 антитела-лекарственного средства в совместных культурах раковых клеток/МКПК

[666] **Цитолитическая активность в отношении раковых клеток**: Клетки рака молочной железы человека SKBR3, стабильно экспрессирующие флуоресцентный белок mKate с ядерной локализацией сигнала флуоресценции, получали, как описано в Примере 28A, и обозначали как клетки SKBR3 NucRed. По 20000 клеток (в каждую лунку) SKBR3 NucRed сеяли в 96-луночные планшеты для культур тканей и оставляли для прикрепления на 6 часов в 50 мкл среды RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Диапазон разведений (от 0,0,1 нМ до 200 нМ, на основе полезной нагрузки; 4-кратные серийные разведения в питательной среде) в 50 мкл исследуемых препаратов (Конъюгата **8a-2**, Конъюгата **8-j**, Конъюгата **8c-2** и Соединения **1**) добавляли в каждую лунку и инкубировали планшет в течение 20 мин при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли

МКПК или первичные моноциты человека (выделенные из МКПК, как описано в Примере 29) (50000) и проводили анализ, как описано в Примере 28. В Таблице 5 показаны значения IC_{50} (цитолитическая активность) тестируемых препаратов в совместных культурах раковых клеток/МКПК и выделенных первичных моноцитов человека (цитолитическая активность в отношении раковых клеток).

Таблица 5

Исследуемый препарат	Конъюгат **8a-2**	Конъюгат **8-j**	Конъюгат **8c-2**	**Соединение 1**
IC_{50} (нМ) - МКПК	0,03	0,91	NA	9,51
IC_{50} (нМ) - Моноцит	0,05	1,6	NA	8,32

[667] Как показано в Таблице 5, Конъюгат 8a-2 показал в ~300 раз и ~150 раз более высокую активность по сравнению с Соединением **1** в совместных культурах МКПК и моноцитов соответственно. Активность Конъюгата **8-j** была в ~30 и 80 раз ниже по сравнению с Конъюгатом **8a-2** в совместных культурах МКПК и моноцитов соответственно. Конъюгат **8c-2** обладал минимальной активностью как в совместных культурах с МКПК, так и с моноцитами.

[668] **Индукция CXCL10**: в Таблице 6 показаны значения EC_{50} исследуемых препаратов в совместных культурах раковых клеток/МКПК и выделенных первичных человеческих моноцитов для индукции CXCL10.

Таблица 6

Исследуемый препарат	Конъюгат **8a-2**	Конъюгат **8-j**	Конъюгат **8c-2**	**Соединение 1**
EC_{50} (нМ) - МКПК	0,06	2,35	NA	26,13
EC_{50} (нМ) - Моноцит	0,04	2,05	NA	31,10

[669] Как показано в Таблице 6, Конъюгат **8a-2** показал в ~400 раз и ~700 раз более высокую активность при индукции CXCL10 по сравнению с Соединением **1** в совместных культурах МКПК и моноцитов соответственно. Активность Конъюгата 8-j была в ~50 раз ниже по сравнению с Конъюгатом **8a-2** в совместных культурах МКПК и моноцитов. Конъюгат **8c-2** обладал минимальной активностью как в совместных культурах с МКПК, так и с моноцитами.

[670] **Индукция IFN III типа**: Совместные культуры клеток SKBR3 и МКПК были подготовлены, как описано выше, для анализа индукции интерферонов III типа в супернатантах через 24 часа после обработки с использованием набора ИФА на IL29/IL28b человека. В Таблице 7 показаны значения EC_{50} исследуемых препаратов в совместных культурах раковых клеток/МКПК для индукции IL29/IL28b (IFNλ1/λ3).

Таблица 7

Исследуемый препарат	Конъюгат **8a-2**	Конъюгат **8-j**	Конъюгат **8c-2**	**Соединение 1**
EC_{50} (нМ) - МКПК	0,08	0,54	NA	28,30

[671] Как показано в Таблице 7, Конъюгат **8a-2** показал в ~400 раз более высокую активность при индукции IL29/IL28b по сравнению с Соединением **1** в совместных

культурах с МКПК. Активность Конъюгата **8-j** была в ~6 раз ниже по сравнению с Конъюгатом **8a-2** в совместных культурах с МКПК. Конъюгат **8c-2** обладал минимальной активностью в совместных культурах с МКПК.

[672] Данные в Таблицах 7-9 демонстрируют, что мутация в Fc-области ADC, которая устраняет взаимодействия с FcγR, снижает, но не устраняет цитолитическую активность таргетных ADC против раковых клеток, что указывает на Fc-независимый вклад ADC.

Пример 34: Индукция пути STING в иммунных клетках

[673] Индукция пути STING в иммунных клетках Her2-направленным STING ADC оценивали с помощью анализа с совместным культивированием раковых клеток/клеток THP1-IRF3 с репортерным геном люциферазы. Клетки аденокарциномы яичника человека SKOV3 сеяли в 96-луночные планшеты для культивирования тканей CellBind Surface (20000/лунка) и оставляли для прикрепления на 6 часов в среде МакКоя 5а с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. В каждую лунку добавляли ряд разведений (от 0,01 нМ до 300 нМ на основе полезной нагрузки; 4-кратные серийные разведения в питательной среде) исследуемы препаратов - Конъюгата **32-5**, Конъюгата **32e** и Соединения **30**, и инкубировали планшет в течение 20 мин при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли 50000 репортерных клеток THP1-dual и продолжали инкубирование в течение 20 часов при 37°C в увлажняемой атмосфере с 5% CO_2. Супернатанты клеточных культур (20 мкл) с каждым инкубированным образцом добавляли к ресуспендированному QUANTI-Luc (50 мкл) и сразу измеряли люминесцентный сигнал IRF3 с помощью микропланшетного ридера SpectraMax M5 (Molecular Devices). Значение EC_{50} определяли по кривой зависимости доза-эффект. В Таблице 8 представлены значения EC_{50} в клетках THP1-Dual, совместно культивируемых с раковыми клетками SKOV3

Таблица 8

Исследуемый препарат	**Конъюгат 32-5**	**Конъюгат 32e**	**Соединение 30**
EC_{50} (нМ)	0,78	NA	38,51

[674] Как показано в Таблице 8, обработка совместных культур SKOV3 и THP-1 Her2-направленными ADC привела к субнаномолярным или низким наномолярным значениям EC_{50} для индукции пути STING в иммунных клетках THP-1.

Пример 35: Активность конъюгатов HER2 антитела-лекарственного средства, направленных против опухолевых клеток, в совместных культурах раковых клеток/МКПК

[675] **Индукция CXCL10**: Клетки аденокарциномы легкого человека Calu3 сеяли в 96-луночные планшеты для культур тканей и оставляли для прикрепления на ночь при 37°C, 5% CO_2 в 100 мкл питательной среды EMEM с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Питательную среду заменяли свежими средами (100 мкл). Ряд разведений (от 0,1 нМ до 200 нМ на основе полезной нагрузки; 4-кратные серийные разведения в питательной среде) исследуемых препаратов в 50 мкл (Конъюгат **32-4**, Соединение **30** и Конъюгат **32b-1**) добавляли в каждую лунку и проводили анализ, как

описано в Примере 33 - Индукция CXCL10. В Таблице 9 показаны значения EC_{50} исследуемых препаратов в культурах раковых клеток/МКПК и монокультурах раковых клеток для индукции CXCL10.

Таблица 9

Исследуемый препарат	**Конъюгат 32-4**	**Соединение 30**	**Конъюгат 32b-1**
EC_{50} (нМ) - МКПК	0,06	160,20	NA

[676] Как показано в Таблице 9, Конъюгат **32-4** демонстрировал субнаномолярную активность в сравнении с Соединением **30** в совместных культурах раковых клеток/МКПК и монокультурах соответственно. Конъюгат **32b-1** обладал минимальной активностью как в совместных культурах раковых клеток/МКПК, так и в монокультурах.

Пример 36: Активация пути STING в монокультурах раковых клеток в присутствии кондиционированных сред из необработанных культур иммунных клеток

[677] Кондиционированную среду подготавливали путем культивирования $1{,}5\times10^6$/мл МКПК (двух разных доноров), 1×10^6/мл первичных моноцитов (выделенных из МКПК от двух разных доноров, как описано в Примере 29) или 1×10^6/мл клеток THP1 в среде RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина в течение 24 часов при 37°C, 5% O2, в термостате. Супернатанты собирали и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут для удаления любых клеток. Клетки SKOV3 сеяли в 96-луночные планшеты (30000/лунка) и оставляли для прикрепления на ночь в среде RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Культуральную среду заменяли либо 100 мкл/лунка свежей среды (контроль), либо кондиционированной средой из необработанных иммунных клеток, с последующей добавкой Соединения **1** (50 мкл/лунка, конечная концентрация 100 нМ) или контрольной среды (без обработки) в каждую лунку. После инкубирования в течение 24 часов при 37°C и 5% O_2 супернатанты из 96-луночных планшетов исследовали на продукцию CXCL10 при использовании набора ИФА на CXCL10 человека. В Таблице 10 показаны значения OD450 для CXCL10, продуцируемого монокультурами раковых клеток SKOV3.

Таблица 10

Кондиционированные среды	**OD 450 Контроль (без обработки агонистом STING)**	**OD 450 + 100 нМ Соединения 1**
Нет	0,02 +/-0,028	0,16 +/-0,038
МКПК (Донор 1)	0,47 +/-0,058	2,22 +/-0,084
МКПК (Донор 2)	0,13 +/-0,019	0,83 +/-0,086
Моноцит (Донор 1)	0,04 +/-0,010	1,62 +/-0,050
Моноцит (Донор 2)	0,21 +/-0,018	0,97 +/-0,142
THP1	0,00 +/- 0,007	0,18 +/- 0,043

[678] Как показано в Таблице 10, клетки SKOV3 отвечали на обработку агонистом STING только в монокультурах, в присутствии кондиционированных сред от МКПК и первичных человеческих моноцитов, но не клеток THP1, что дает основания предполагать, что МКПК или первичные человеческие моноциты секретируют факторы,

которые могут сенсибилизировать раковые клетки к лечению агонистом STING.

Пример 37: Ответ роста опухоли на введение конъюгата HER2 антитела-лекарственного средства в SKOV3

[679] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетки рака яичника человека SKOV3 (10×10^6 клеток на мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объем опухоли составлял 63-75 мм^3 (среднее значение=65,4 мм^3/группа) (n=10/группа). Растворитель, трастузумаб (3/0 мг/кг), агонист STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгат **8c-1** (1/0,04 мг/кг или 3/0,12 мг/кг) или Конъюгат **8a-1** (1/0,03 мг/кг или 3/0,09 мг/кг) вводили внутривенно в виде однократной дозы в день 1 (все дозы вводили из расчета антитело/полезная нагрузка). Транзиторную потерю массы тела в допустимых пределах наблюдали через 2-3 дня после лечения без дополнительных клинических наблюдений в случае агониста STING diABZI (0/5 мг/кг) и Конъюгата **8c-1** (3/0,12 мг/кг). Потеря массы тела в последующие точки времени коррелировала с прогрессированием опухоли, что указывает на кахексию, вызванную в модели опухоли.

[680] На **ФИГ. 6** представлены результаты по объемам опухолей у мышей с опухолью SKOV3, получавших лечение трастузумабом, агонистом STING diABZI, Конъюгатом **8c-1**, Конъюгатом **8a-1** или растворителем. Лечение трастузумабом (3/0 мг/кг), агонистом STING diABZI (0/5 мг/кг) или Конъюгатом **8c-1** (1/0,04 мг/кг или 3/0,12 мг/кг) привело к 47,5, 36,9, 13,5 или 25,5% TGI соответственно. Лечение Конъюгатом **8a-1** (1/0,03 мг/кг или 3/0,09 мг/кг) привело к регрессии опухоли на 86,5 и 100% соответственно.

Пример 38: Цитокины сыворотки после введения конъюгата HER2 антитела-лекарственного средства в SKOV3

[681] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетки рака яичника человека SKOV3 (10×10^6 клеток на мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухолей составляли 108-172 мм^3 (среднее значение=128-131,6 мм^3). Растворитель, агонист STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгат **8c-1** (3/0,12 мг/кг) или Конъюгат **8a-1** (3/0,09 мг/кг) вводили внутривенно в день 1 (все дозы приведены из расчета антитело/полезная нагрузка, n=10 для каждой группы). Сыворотку собирали через 6, 12, 24 и 72 часа после введения дозы (n=5 на группу) и сразу замораживали в сухом льду для анализа цитокинов сыворотки. Опухоли собирали через 12 и 72 часа после введения дозы (n=5 для каждой точки времени) и изготавливали фиксированные формалином и залитые парафином (FFPE) блоки.

[682] Цитокины сыворотки (эотаксин, Г-КСФ, ГМ-КСФ, IFNγ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, CXCL10 (IP-10), CXCL1 (KC), LIF, LIX, MCP-1, M-КСФ, MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-2, RANTES, ФНОα и VEGF) исследовали с использованием панели мышиных цитокинов/хемокинов на магнитных сферах на приборе FlexMap3D Luminex. Для анализа данных использовали программу Belysa Immunoassay Curve Fitting.

[683] На **ФИГ. 7A-7H** представлены измеренные значения цитокинов в

зависимости от времени. Показаны только цитокины с измеримым увеличением по сравнению с контрольным растворителем (CXCL-10 (IP-10), IL-6, ФНОα, IFNγ, CXCL1 (KC), MIG, MIP-1α и RANTES). Вставки на каждом графике указывают уровни цитокинов, индуцированные Конъюгатом **8a-1** и Конъюгатом **8c-1** по сравнению с растворителем. Внутривенно введенный агонист STING diABZI индуцировал значительно более высокие уровни цитокинов в сыворотке, чем Конъюгат **8a-1** или Конъюгат **8c-1**, с кратными различиями в 100 раз по IL6 и до 6 раз по CXCL10. Для большинства цитокинов не было значимого различия между контролем и направленным ADC, и лишь немногие цитокины показали различие между контрольным растворителем и ADC. Шкалы по оси Y на основном графике и на вставке подчеркивают различие между агонистом STING diABZI и остальными препаратами в данном исследовании.

Пример 39A: Ответы PD после введения конъюгата HER2 антитела-лекарственного средства в SKOV3

[684] Самкам CB.17 SCID возрастом шесть недель подкожно инокулировали клетки рака яичника человека SKOV3 (10×10^6 клеток на мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 75-126 мм^3 (среднее значение=94,5-96,7 мм^3/группа). Растворитель, Конъюгат **8c-1** (3/0,12 мг/кг) или Конъюгат **8a-1** (3/0,09 мг/кг), Конъюгат **8c-1** (3/0,12 мг/кг) или Конъюгат **8a-1** (3/0,09 мг/кг) вводили внутривенно в день 1 (все дозы приведены из расчета антитело/полезная нагрузка, n=12 для каждой группы). Сыворотку собирали через 6, 12, 24 и 72 часа после введения дозы (n=6 для каждой группы) и сразу замораживали в сухом льду для анализа цитокинов сыворотки (данные не показаны). Опухоли собирали через 12 и 72 часа (n=6 для каждой группы) и фиксировали в блоках FFPE для последующей обработки.

[685] Для анализа кПЦР в реальном времени, РНК выделяли из блоков FFPE с использованием набора Qiagen Rneasy FFPE. Образцы уравнивали на основе показаний nanodrop, и кДНК, полученную с использованием мастер-микса Thermofisher SuperScript IV VILO с анализами экспрессии exDNase Enzyme Gene мышиных CXCL10, интерферона-бета и IL-6, подготавливали для анализа с использованием TaqMan Fast Advanced Master Mix. Анализы ABI мышиного интерферона-β (IFNb), IL-6 и CXCL10 использовали с GAPDH и RPL30 в качестве генов домашнего хозяйства. Уровни мРНК относительно GAPDH рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$.

[686] На **ФИГ. 8A-8C** представлены уровни мРНК мышиного CXCL10, интерферона-β и IL-6 в опухолях SKOV3, измеренные через 12 и 72 часа. Обработка Конъюгатом **8a-1** приводила к наиболее высоким уровням мРНК CXCL10, интерферона-β и IL-6 через 12 часов по сравнению с растворителем или Конъюгатом **8c-1**. В случае Конъюгата **8a-1** уровни мРНК CXCL10, интерферона-β и IL-6 снижались через 72 часа.

[687] На **ФИГ. 9** представлено иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание на CD45 срезов FFPE опухолевой ткани кроличьим моноклональным антителом против CD45 через 12 и 72 часа для Конъюгата **8a-1**, Конъюгата **8c-1** или растворителя. Как показано, наблюдали повышенную инфильтрацию CD45-положительных иммунных

клеток мыши в опухоли SKOV3 у мышей SCID через 72 часа после введения Конъюгата **8a-1**.

Пример 39B: Экспрессия генов пути STING в ксенотрансплантатах человеческой опухоли SKOV3 у мышей SCID в ответ на конъюгат HER2 антитела-лекарственного средства.

[688] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетки рака яичника человека SKOV3 и вводили Конъюгат **8a-1** (3/0,09 мг/кг), как описано в Примере 38. Опухоли собирали и приготавливали FFPE, как описано в Примере 31. РНК выделяли с использованием набора Qiagen Rneasy FFPE согласно инструкциям в наборе. По 150 нг РНК на образец исследовали на системе NanoString nCounter Max с использованием панелей nCounter PanCancer для определения иммунных профилей человека или мыши и набора nCounter Standard Master Kit. В Таблице 11 показаны log2 кратные изменения выбранных генов пути STING через 12 часов.

Таблица 11

Название гена	**Человек**		**Мышь**	
	Log2 кратное изменение	**Станд. ошибка**	**Log2 кратное изменение**	**Станд. ошибка**
CXCL10	11,7	1,11	8,02	0,482
IFNβ1	9,26	1,02	4,82	1,13
IFIT2	7,88	0,229	7,12	0,435
IFIT1	6,96	0,31	5,81	0,396
ISG15	6,67	0,36	5,79	0,382
IL6	5,94	0,749	6,36	0,647
IRF1	5,48	0,14	4,83	0,125
MX1	5,4	0,324	6,68	0,542
IFIH1	5,07	0,223	4,45	0,36
IRF7	4,1	0,322	4,72	0,403
IFNλ1	6,52	0,695	Не применимо	
IFNλ2	4,6	0,603	Не обнаружено	

[689] Как показано в Таблице 11, однократное введение Конъюгата **8a-1** приводило к заметной индукции генов пути STING как у мыши, так и у человека, что позволяет предположить, что направленные против опухоли ADC на основе агонистов STING могут индуцировать характерную для опухолей активацию пути STING в опухолях in vivo.

Пример 40: Фармакокинетический анализ Her-2-направленных для ADC у мышей CB.17 SCID

[690] Десятинедельным самкам мышей CB.17 SCID в виде однократной дозы в день 1 внутривенно вводили растворитель или Конъюгат **8a-1** (3/0,1 мг/кг) (дозы приведены из расчета антитело/полезная нагрузка, n=3 для каждой группы). Кровь периодически собирали у всех животных через 1, 24, 48, 72, 96, 168, 240 и 336 часов после лечения (n=3 для каждой группы). Цельную кровь сразу разбавляли 1:10 кислотным буфером (0,6% BSA (в/об), 5 мМ ЭДТА в 100 мл PBS+15,34 мл 10 мг/мл лимонной кислоты) до общего объема 0,1 мл. Разбавленную цельную кровь быстро замораживали в

сухом льду и хранили при -80°C до анализа на общее антитело и конъюгированное лекарственное средство.

[691] На **ФИГ. 10** представлены результаты по концентрациям общего антитела и конъюгированного лекарственного средства в циркулирующей плазме. Концентрации в плазме ~25,1 мкг/мл и ~0,46 мкг/мл были достигнуты для общего антитела и конъюгированного лекарственного средства соответственно, и соответствующий уровень клиренса составил ~6,71 мл/день/кг для общего антитела и ~20,2 мл/день/кг для конъюгированного лекарственного средства

[692] Аналогичным образом вводили Конъюгат **32-3** (1,14/0,04 мг/кг) и общее антитело и конъюгированное лекарственное средство оценивали через 0,25, 24, 72, 168, 240 и 336 часов. Данные приведены в Таблице 12.

Таблица 12

	Cmax (нг/мл)	Период полувыведения (дни)	AUC∞ (день*нг/мл)	Cl_набл (мл/день/кг)
Конъюгированное лекарственное средство	562±16	6,43±1,15	2880±468	14,2±2,51
Общее антитело	12200±1160	8,69±1,20	96300±7190	11,9±0,88

Пример 41: Экспрессия генов пути STING в совместных культурах раковых клеток SKBR3/МКПК в ответ на лечение Her2-направленным ADC на основе агониста STING.

[693] **Анализ Nanostring**: Раковые клетки сеяли (250000 клеток/лунка) в двойной повторности в 12-луночные планшеты в 0,75 мл культуральной среды (среда RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина) и оставляли для прикрепления при 37°C в термостате с 5% CO_2 на ночь. Культуральную среду удаляли и в лунки добавляли Конъюгат **8a-3** или растворитель в 0,5 мл культуральной среды в конечной концентрации 50 нМ (на основе полезной нагрузки). В каждую лунку добавляли по 500000 МКПК в 0,5 мл среды. Через 5 часов инкубирования при 37°C суспендированные клетки собирали в пробирку Eppendorf и быстро центрифугировали. Супернатант удаляли и помещали пробирку в лед. Прикрепившиеся клетки лизировали буфером для лизиса РНК и переносили на осадок суспензионных клеток. РНК экстрагировали с использованием набора Qiagen Rneasy mini в соответствии с инструкциями к набору. По 150 нг РНК на образец анализировали в системе NanoString nCounter Max с использованием панели для анализа иммунного профилиря человека nCounter Pan-cancer и набора nCounter Standard Master Kit.

[694] В Таблице 13 показаны log2-кратные изменения выбранных генов пути STING при воздействии Конъюгата **8a-3** по сравнению с обработкой растворителем (5 часов) в совместных культурах раковых клеток SKBR3 и МКПК in vitro. Обработка Конъюгатом **8a-3** в концентрации 50 нМ приводила к выраженной индукции генов пути STING и интерферонов III типа (IFNλ1 и IFNλ2), что подтверждает, что лечение

направленными против опухоли ADC на основе агонистов STING индуцирует гены пути STING, а также интерфероны III типа в совместных культурах раковых и иммунных клеток in vitro.

Таблица 13

Название гена	**Log2 кратное изменение**	**Станд. ошибка**	**P-значение**
IFNλ1	10,7	0,207	5,17E-08
IFNλ2	12,5	0,318	2,04E-07
CXCL10	7,86	0,0538	2,85E-10
IFNβ1	9,76	0,0493	6,25E-11
IFIT2	9,15	0,393	2,72E-06
IFIT1	8,08	0,0854	2,49E-09
ISG15	6,73	0,182	2,73E-07
IL6	8,55	0,382	3,32E-06
IRF1	6,99	0,171	1,65E-07
MX1	4,48	0,0876	5,41E-08
IFIH1	4,2	0,0853	6,49E-08
IRF7	3,45	0,15	2,92E-06

[695] Анализ кПЦР генов интерферона III типа: Совместные культуры SKBR3/МКПК подготавливали, как описано выше, и обрабатывали 50 нМ и 1 нМ (на основе полезной нагрузки) Конъюгата **8a-3** или Конъюгата **8c-2** в течение 5 часов. Клетки собирали и выделяли РНК, как описано выше. Анализ кПЦР проводили, как описано в Примере 39A. Анализы ABI на IFNλ1 (IL29), IFNλ2 (IL28a), и IFNλ3 (IL28b) человека использовали с GAPDH и ACTB в качестве генов домашнего хозяйства. Уровни мРНК в сравнении с GAPDH вычисляли с использованием метода $2^{-\Delta\Delta CT}$ как показано в Таблице 14.

Таблица 14

Обработка	**Относительная экспрессия мРНК**		
	IFNλ1(IL29)	**IFNλ2 (IL28a)**	**IFNλ3 (IL28b)**
Конъюгат **8a-3-50** нМ	190,5±18,9	327±2,5	27,7±1,2
Конъюгат **8a-3-1** нМ	89±1,2	201,6±32,7	29,7±2,0
Конъюгат **8c-2-50** нМ	1,8±2,5	0	0
Конъюгат **8c-2-1** нМ	0	0	0

[696] В Таблице 14 показана экспрессия мРНК интерферонов III типа по отношению к генам домашнего хозяйства в ответ на обработку направленными ADC и контрольными ADC в совместных культурах раковых клеток и МКПК. Обработка Конъюгатом **8a-3** в дозах полезной нагрузки 50 нМ и 1 нМ индуцировала выраженную активацию генов интерферона III типа. Обработка Конъюгатом **8c-2** не вызывала значимой индукции интерферонов III типа в дозах, использованных в данном эксперименте

Пример 42: Индукция интерферонов III типа в совместных культурах раковых клеток SKBR3 со STING дикого типа или нокаутом STING и МКПК

[697] Раковые клетки со STING дикого типа или нокаутом STING (как описано в

Примере 30) и МКПК в совместных культурах обрабатывали Конъюгатом **8a-3**, Конъюгатом **8j-1**, Конъюгатом **8c-2** и Соединением **1** (от 0,1 нМ до 200 нМ на основе полезной нагрузки; 4-кратные серийные разведения) и измеряли уровни цитокинов интерферонов III типа IFNλ1/IFNλ3 (IL29/IL28b), как описано в Примере 33 - Индукция интерферонов III типа.

[698] В Таблице 15 показана продукция цитокинов интерферонов III типа IFNλ1/IFNλ3 (IL29/IL28b) в совместных культурах SKBR3 со STING дикого типа или нокаутом STING и МКПК в ответ на Конъюгат **8a-3**, Конъюгат **8j-1**, Конъюгат **8c-2** и Соединение **1**.

Таблица 15

Линия раковых клеток	Конъюгат **8a-3**		Конъюгат **8j-1**		Конъюгат **8c-2**		**Соединение 1**	
	EC_{50} (нМ)	**Bmax (OD_{450})**	**EC_{50} (нМ)**	**Bmax (OD_{450})**	**EC_{50} (нМ)**	**Bmax (OD_{450})**	**EC_{50} (нМ)**	**Bmax (OD_{450})**
STING дикого типа	0,13	2,6	0,89	2,6	NA	1,8	49,3	0,5
Нокаут STING (егРНК #3)	0,19	0,7	NA	0,3	NA	0,2	NA	0
Нокаут STING (егРНК #4)	0,27	0,7	NA	0,1	NA	0,1	NA	0

[699] Конъюгат 8a-3 и Конъюгат 8j-1 вызывали эффективную продукцию цитокинов интерферонов III типа IFNλ1/IFNλ3 (IL29/IL28b) в совместных культурах клеток SKBR3 со STING дикого типа. Соединение **1** также индуцировало продукцию интерферонов III Типа IFNλ1/IFNλ3 (IL29/IL28b) в таких условиях совместного культивирования, но более низкой, в ~400 раз, концентрацией EC_{50}, тогда как Конъюгат **8c-2** не обладал никакой значимой активностью. Уровень продукции IFNλ1/IFNλ3 (IL29/28b) в совместных культурах клеток SKBR3 с нокаутом STING был заметно снижен в ответ на все обработки, что очевидно из очень низких уровней Bmax (OD450).

Пример 43A: Эффект IFNλ1 (IL29) или IFNλ2 (IL28A) нейтрализирующих антител в отношении литической активности Her2-направленного STING ADC в совместных культурах раковых клеток и МКПК

[700] **Цитотоксическая активность в отношении раковых клеток**: Совместные культуры SKBR3 и МКПК подготавливали, как описано в Примере 33 - Индукция интерферона III типа, чтобы оценить литическую активность Конъюгата **8a-3** (1 нМ или 0,1 нМ на основе полезной нагрузки) в присутствии нейтрализирующих антител к IFNλ1 (IL29) или IFNλ2 (IL28b) (10, 2, 0,4, 0,08 мкг/мл). Как показано на **ФИГ. 11** нейтрализирующее антитело к IFNλ1 в концентрации 10, 2 и 0,4 мкг/мл ингибировало цитотоксическую активность Конъюгата **8a-3** в отношении раковых клеток на уровне 0,1 нМ (на основе полезной нагрузки) в совместных культурах с МКПК. Никакого ингибирования не наблюдали с антителами к IFNλ1, когда Конъюгат **8a-3** использовали на уровне 1 нМ (на основе полезной нагрузки), нейтрализирующие антитела к IFNλ2 не ингибировали цитотоксическую активность в отношении раковых клеток, даже когда Конъюгат **8a-3** применяли в дозе 0,1 нМ.

Пример 43B: Индукция цитокинов IFNλ1/IFNλ3 (L29/28b)

[701] Такие же планшеты для анализа, как описанные в Примере 43A, использовали для анализа IFNλ1/IFNλ3 (IL29/28b) в супернатантах через 24 часа после обработки с использованием набора для ИФА IL29/28b человека, как описано в Примере 33 - Индукция интерферона III типа. В Таблице 16 показаны значения OD450, полученные при каждом условии.

Таблица 16

Конъюгат **8a-2** (нМ)	мАт к IFNλ1 (мкг/мл)	IFNλ1/IFNλ3 (IL29/28b) (OD450)
1 нМ	0	2,996±0,028
	10	1,470±0,071
	2	1,584±0,099
	0,4	1,491±0,071
	0,08	1,464±0,077
0,1 нМ	0	2,166±0,023
	10	0,034±0,014
	2	0,021±0,008
	0,4	0,048±0,011
	0,08	0,190±0,014

Пример 43C: Индукция цитокинов CXCL10, IFNβ, IL6 и ФНОα.

[702] Супернатанты из Примера 43B использовали для анализа продукции цитокинов CXCL10, IFNβ, IL6 и ФНОα при использовании панели человеческих цитокинов/хемокинов на магнитных сферах на приборе FlexMap3D Luminex. Программу для подбора кривых Belysa Immunoassay использовали для анализа данных. В Таблице 17 показаны цитокины CXCL10, IFNβ, IL6 и ФНОα, обнаруженные в супернатантах.

Таблица 17

Конъюгат 8a-2 (нМ)	**мАт к IFNλ1 (мкг/мл)**	**CXCL10 (пг/мл)**	**IFNβ (пг/мл)**	**IL6 (пг/мл)**	**ФНОα (пг/мл)**
1 нМ	0	1187±23,1	99±9,5	4228±292,0	469±86,3
	10	827±122,5	61±5,9	2191±194,3	43±5,5
	2	1106±167,9	71±9,1	2831±260,9	54±2,9
	0,4	1128±44,9	76±7,7	3735±456,2	71±9,6
	0,08	1155±34,4	104±20,6	4475±725,5	170±27,2
0,1 нМ	0	1189±7,5	32±0,9	806±117,9	52±7,4
	10	306±136,0	3±1,5	77±56,6	16±3,8
	2	325±98,2	2±0,9	27±15,4	12±0,5
	0,4	435±186,6	5±2,2	42±21,4	16±0,5
	0,08	695±173,0	15±1,6	171±14,1	22±1,0

[703] В целом эти данные демонстрируют, что продукция интерферона III типа важна для направленной в отношении опухолевых клеток активности STING-ADC, в особенности при низких концентрациях.

Пример 44: Ответ роста опухоли на введение конъюгата NaPi2b антитела-

лекарственного средства в OVCAR-3

[704] Самкам мышей CB.17 SCID возрастом пять недель подкожно инокулировали клетки OVCAR-3 (5×10^6 клеток на мышь), Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составлял 52-180 мм^3 (среднее значение: 93-94 мм^3/группа). Растворитель, агонист STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгат **8c-1** (3/0,12 мг/кг), Конъюгат **8b-1** (3/0,09 мг/кг) или Конъюгат **8f** (3/0,12 мг/кг) вводили внутривенно в виде однократной дозы в день 1 (все дозы приведены по антителу/полезной грузке, n=8 для каждой группы). Транзиторную потерю массы тела наблдали через 3-13 дней после лечения без дополнительных клинических наблюдений для агониста STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгата **8c-1**, Конъюгата **8b-1** и Конъюгата **8f**.

[705] На **ФИГ. 12** представлены результаты для мышей с опухолью OVCAR-3, получавших растворитель, агонист STING diABZI, Конъюгат **8c-1**, Конъюгат **8b-1** или Конъюгат **8f**. По сравнению с контрольным растворителем лечение Конъюгатом **8c-1** (3/0,12 мг/кг) приводило к среднему увеличению роста опухоли на 70,6%. Лечение агонистом STING diABZI (0/5 мг/кг) привело к TGI 42,7%. Лечение конъюгатом **8b-1** (3/0,09 мг/кг) привело к TGI 98,4%. Лечение конъюгатом **8f** привело к TGI 83,1%.

Пример 45: Ответ роста опухоли на введение конъюгата химерного (hIgG1-mIgG2a) NaPi2b антитела-лекарственного средства в OVCAR-3

[706] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетки рака яичника человека OVCAR-3 (5×10^6 клеток на мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составляли 53-223 мм^3 (среднее значение=112-122 мм^3/группа). Растворитель, Конъюгат **8d-2** (3/0,1 мг/кг) или Конъюгат **8e** (3/0,1 мг/кг) вводили внутривенно в день 1 (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке, n=8 для каждой группы). Транзиторную потерю массы тела в приемлемых пределах наблюдали через 3-15 дней после лечения без дополнительных клинических наблюдений для Конъюгата **8d-2** (3/0,1 мг/кг) и Конъюгат **8e** (3/0,1 мг/кг).

[707] На **ФИГ. 13** представлены результаты по объемам опухолей у мышей-носителей опухолей OVCAR-3, получавших растворитель, Конъюгат **8d-2** или Конъюгат **8e**. Лечение Конъюгатом **8d-2** (3/0,1 мг/кг) привело к TGI 37,3%. Лечение Конъюгатом **8e** (3/0,1 мг/кг) привело к TGI 95,8%.

Пример 46: Ответ роста опухоли на введение конъюгата мишень C антитела-лекарственного средства в ксенотрансплантатной модели трижды негативного рака молочной железы

[708] Самкам мышей NCr nu/nu возрастом восемь недель (Charles River Laboratories) имплантировали фрагменты опухолей трижды негативного рака молочной железы человека (ТНРМЖ) (1 мм^3), экспрессирующих Мишень C. Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составляли 63-108 мм^3 (среднее значение=80,7-82 мм^3/группа). Растворитель, агонист STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгат **8c-1** (1/0,04 мг/кг) или Конъюгат **8h** (1/0,04, мг/кг) вводили внутривенно в виде однократной дозы в день 1 (все дозы приведены по антителу/полезной нагрузке, n=9 для

каждой группы). Транзиторную потерю массы тела в приемлемых пределах наблюдали через 2 дня после лечения без дополнительных клинических наблюдений для агониста STING diABZI (0/5 мг/кг).

[709] На **ФИГ. 14** представлены результаты по объемам опухолей у мышей-носителей опухолей ТНРМЖ человека, получавших растворитель, агонист STING diABZI, Конъюгат **8c-1** или Конъюгат **8h**. Лечение агонистом STING diABZI (0/5 мг/кг) привело к TGI 52,4%. Лечение Конъюгатом **8c-1** привело к TGI 35,1%. Лечение Конъюгатом **8h** (1,1/00,4 мг/кг) привело к TGI 51,8%.

Пример 47: Ответ роста опухоли на введение конъюгата мишень D антитела-лекарственного средства при раке толстой кишки

[710] Самкам мышей C57Bl/6 возрастом семь-восемь недель в правый бок подкожно инокулировали клетки рака толстой кишки мыши (5×10^5 клеток на мышь). Животных рандомизировали в группы лечения через 10 дней после инокуляции, когда объемы опухоли составили 63-108 мм^3 (среднее значение=78 мм^3/группа). Растворитель, Конъюгат **8d-3** (1/0,04 мг/кг) или Конъюгат **8g** (0,09/0,04 мг/кг) вводили внутривенно в виде однократной дозы в день 1 (все дозы, приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы). Транзиторную потерю массы тела в приемлемых пределах наблюдали через 2 дня после лечения без дополнительных клинических наблюдений для Конъюгат **8g** (0,9/0,04 мг/кг).

[711] На **ФИГ. 15A** представлены результаты по объемам опухоли у мышей-носителей опухолей рака толстой кишки мыши, получавших растворитель, Конъюгат **8d-3** или Конъюгат **8g**. Лечение Конъюгатом **8d-3** привело к TGI 42%, тогда как лечение Конъюгатом **8g** привело к TGI 92,5%.

[712] На **ФИГ. 15B** показаны кривые выживаемости Каплана-Мейера для мышей-носителей опухолей рака толстой кишки мыши, получавших растворитель, Конъюгат **8d-3** или Конъюгат **8g**. Лечение Конъюгатом **8d-3**. Мыши, получавшие Конъюгат **8g**, демонстрировали наиболее длительную выживаемость.

Пример 48: Исследование ответа роста опухоли на введение конъюгата мишень D антитела-лекарственного средства с повторным введением опухолей

[713] Мышам без опухоли (6 из 9), ранее получавшим Конъюгат **8g** (0,9/0,04 мг/кг) из Примера 36, показанным на **ФИГ. 16A**, и подобранным по возрасту не получавшим лечение животным из Примера 38 в левый бок подкожно инокулировали клетки рака толстой кишки мыши (5×10^5 клеток на мышь), а в правый бок - клетки рака легкого мыши (1×10^6 клеток на мышь) (n=6 и 12, соответственно). Рост опухоли у мышей, ранее получавших Конъюгат **8g** (0,9/0,04 мг/кг), при повторном введении клетками рака толстой кишки мыши или клеток рака легкого мыши показан на **ФИГ. 16B** и **ФИГ. 16C** соответственно. Предыдущее лечение Конъюгатом **8g** привело к TGI 25,5% в модели рака легкого мыши и TGI 99,8% в модели рака толстой кишки мыши по сравнению с соответствующими не получавшими лечения контролями.

Пример 49: Ответ роста опухоли на введение конъюгат мишень E антитела-

лекарственного средства при эмбриональном раке

[714] Самкам мышей Balb/C подкожно инокулировали клетки эмбрионального рака мыши (5×10^5 клеток на мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 56-108 мм^3 (среднее значение=75,3-76,5 мм^3/группа). Растворитель, агонист STING diABZI (0/5 мг/кг), Конъюгат **8d-3** (5,5/0,18 мг/кг) или Конъюгат **8i** (3.2/0.18 мг/кг) вводили внутривенно в виде однократной дозы в день 1 (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы). Транзиторную потерю массы тела в приемлемых пределах наблюдали через 2 дня после лечения без дополнительных клинических наблюдений для агониста STING diABZI (0/5 мг/кг) и Конъюгата **8i** (3,2/0,18 мг/кг).

[715] На ФИГ. 17 представлены результаты по объемам опухолей у мышей-ностелей опухолей эмбрионального рака мыши, получавших растворитель, агонист STING diABZI, Конъюгат **8d-3** или Конъюгат **8i**. Лечение Конъюгатом **8d-3** (5,5/0,18 мг/кг) привело к TGI 27,5 и 66,5% соответственно. Лечение агонистом STING diABZI (0/5 мг/кг) привело к TGI 93,8%. Лечение Конъюгатом **8i** (3,2/0,18 мг/кг) привело к TGI 20,5 и 100% соответственно.

Пример 50: Ответ роста опухоли на введение конъюгата HER2 антитела-лекарственного средства при раке яичника SKOV3

[716] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетки рака яичника человека SKOV3 (10×10^6 клеток на мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 63-75 мм^3 (среднее значение=65,4 мм^3/группа). Растворитель, Конъюгат **34a** (3/0,11 мг/кг), Конъюгат **34** (3/0,11 мг/кг), Конъюгат **20a** (3/0,09 мг/кг) или Конъюгат **20-1** (3/0,10, мг/кг) вводили внутривенно в виде однократной дозы в день 1 (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы). Транзиторную потерю массы тела в приемлемых пределах наблюдали через 2-3 дня после лечения без дополнительных клинических наблюдений для Конъюгата **34a**, Конъюгата **20a**, Конъюгата **34** и Конъюгата **20-1**. Потеря массы тела в последующие точки времени коррелировала с развитием опухоли, указывая на кахексию, вызванную моделью опухоли.

[717] На ФИГ. 18 представлены результаты по объемам опухолей у мышей-носителей опухолей SKOV3, получавших растворитель, Конъюгат **34a**, Конъюгат **34**, Конъюгат **20a** или Конъюгат **20-1** (3/0,09 мг/кг). Лечение Конъюгатом **20a** (3/0,09 мг/кг) или Конъюгатом **34a** (3/0,11 мг/кг) привело к TGI 21 и 65,9% соответственно. Лечение Конъюгатом **34** (3/0,11 мг/кг) или Конъюгатом **20-1** (3/0,10 мг/кг) привело в обоих случаях к средней регрессии опухоли 100%.

Пример 51: Ответ роста опухоли на введение конъюгата HER2 антитела-лекарственного средства при раке яичника SKOV3

[718] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетками рака яичника человека SKOV3 (10×10^6 клеток на мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 88-126 мм^3 (среднее значение=112,8-113,2

мм^3/группа). Растворитель, Конъюгат **28** (0,3/0,01 мг/кг или 1/0,03 мг/кг), Конъюгат **29** (0,2/0,01 мг/кг или 0,8/0,02 мг/кг), Конъюгат **8-2** (0,3/0,01 мг/кг или 1/0,04 мг/кг), Конъюгат **25** (0,3/0,01 мг/кг или 1/0,04 мг/кг) или Конъюгат **45** (0,3/0,01 мг/кг, или 1/0,04 мг/кг) вводили внутривенно в виде однократной дозы в день 1 (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы). Транзиторную потерю массы тела в приемлемых пределах наблюдали через 3 дня после лечения без дополнительных клинических наблюдений для Конъюгата **25** (1/0,04 мг/кг). Потеря массы тела в последующие точки времени коррелировала с развитием опухоли, указывая на кахексию, вызванную моделью опухоли.

[719] На **ФИГ. 19** представлены объемы опухолей мышей-носителей опухолей SKOV3, получавших растворитель, Конъюгат **28**, Конъюгат **29**, Конъюгат **8-2**, Конъюгат **25** или Конъюгат **45**. Лечение Конъюгатом **28** (0,3/0,01 мг/кг или 1/0,03 мг/кг), Конъюгатом **29** (0,2/0,01 мг/кг или 0,8/0,02 мг/кг), Конъюгатом **8-2** (0,3/0,01 мг/кг или 1/0,04 мг/кг), Конъюгатом **25** (0,3/0,01 мг/кг) или Конъюгатом **45** (0,3/0,01 мг/кг, или 1/0,04 мг/кг) привело к TGI 17,6, 97,6, 12,1, 86,9, 10,9, 70,3, 81,9, 15,8 и 27,2% соответственно. Лечение Конъюгатом **25** (1/0,04 мг/кг) привело к средней регрессии опухоли 74,5%.

Пример 52: Ответ роста опухоли на введение конъюгата HER2 антитела-лекарственного средства при раке яичника SKOV3

[720] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетки рака яичника человека SKOV3 (10×10^6 клеток/мышь+50% Matrigel). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 63-75 мм^3 (среднее значение=67,8 мм^3/группа). Растворитель (раствор хлорида натрия, q3dx3 или q5dx5), агонист STING diABZI (1,5 мг/кг q3dx3 или 0,128 мг/кг qdx1), Соединение **30** (1,5 мг/кг q3dx3 или 0,128 мг/кг qdx1), Конъюгат **32b-2** (3,42/0,128 мг/кг qdx1), XMT-1519 (3,00 мг/кг qdx1), Конъюгат **32-5** (0,100/0,004, 0,300/0,013, 1,00/0,042 или 3,00/0,128 мг/кг qdx1), Конъюгат **32e** (1,00/0,039 или 3,00/0,117 мг/кг qdx1) во всех случаях вводили внутривенно, начиная со дня 1 (все дозы приведены в расчете на полезную нагрузку антитела, n=10 для каждой группы).

На **ФИГ. 20** представлены объемы опухолей мышей-носителей опухолей SKOV3, получавших растворитель, агонист STING diABZI, Соединение **30**, Конъюгат **32b-2**, XMT-1519, Конъюгат **32-5** или Конъюгат **32e**. Лечение Конъюгатом **32-5** в дозах 1,00/0,042 или 3,00/0,117 мг/кг привело к 10/10 полным ответам.

Пример 53: Ответ роста опухоли на введение конъюгата HER2 антитела-лекарственного средства в клетках 4T1, модифицированных для экспрессии HER2 человека

[721] Самкам мышей Balb/C подкожно инокулировали мышиные клетки рака молочной железы 4T1, модифицированные для экспрессии человеческого HER2 (4T1-hHER2) (2×10^6 клеток на мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 75-88 мм^3 (среднее значение=71,5-80,3 мм^3/группа).

Растворитель, Конъюгат **8d-3** (1/0,04 мг/кг) или Конъюгат **8k** (0,9/0,04 мг/кг) вводили внутривенно в виде однократной дозы в день 1 (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы). Транзиторную потерю массы тела в приемлемых пределах наблюдали через 2 дня после лечения без дополнительных клинических наблюдений для Конъюгата **8k** (0,9/0,04 мг/кг)

[722] На **ФИГ. 21A** представлены объемы опухолей у мышей-носителей опухолей 4T1-hHER2, получавших растворитель, Конъюгат **8d-3** (1/0,04 мг/кг) или Конъюгат **8k** (0,9/0,04 мг/кг). Лечение Конъюгатом **8d-3** (1/0,04 мг/кг) привело к TGI 85,4% (**ФИГ. 21B**). Лечение Конъюгатом **8k** (0,9/0,04 мг/кг) привело к средней регрессии опухоли 93,2%, при этом 8 из 10 животных в конце исследования не имели опухолей (**ФИГ. 21C**).

Пример 54: Ответ роста опухоли на введение конъюгата Fc-мутантного HER2 антитела-лекарственного средства при раке яичника SKOV3

[723] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетки рака яичника человека SKOV3 (10×10^6 клеток/мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 63-75 мм^3 (среднее значение=72,6 мм^3/группа). Растворитель, Конъюгат **8c-2** (3,17/0,10 мг/кг), Конъюгат **8a-2** (2,7/0,10 мг/кг или 0,81/0,03 мг/кг), Конъюгат **8j** (2,71/0,10 мг/кг или 0,81/0,03 мг/кг) или агонист STING diABZI IV (0/5 мг/кг) вводили внутривенно в день 1 (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы).

[724] На **ФИГ. 22** представлены объемы опухолей у мышей-носителей опухолей SKOV3, получавших Конъюгат **8c-2**, Конъюгат **8a-2**, Конъюгат **8j** или агонист STING diABZI IV. Лечение Конъюгатом **8a-2** (2,70/0,10 мг/кг) привело к 10 CR и 10 TFS. Лечение Конъюгатом **8a-2** (0,81/0,030 мг/кг) привело к 2 PR, 8CR и 3 TFS. Лечение Конъюгатом **8j** (2,71/0,10 мг/кг) привело к 2 PR и 6 CR. Лечение Конъюгатом **8j** (0,81/0,03 мг/кг) привело к 3 PR и 1 CR. Лечение агонистом STING diABZI IV (0/5 мг/кг) привело к 7 PR.

Пример 55: In vitro связывание конъюгата NaPi2b антитела-лекарственного средства с клетками рака яичника человека

[725] Клетки OVCAR3 выращивали до ~80-95% конфлюентности в питательной среде RPMI 1640 с добавкой FBS (20%) и пенициллина/стрептомицина (1%). Клетки собирали и добавляли в лунки 96-луночного планшета с U-образными лунками (50,000/лунка). Клетки центрифугировали (300×g, 5 минут) и ресуспендировали в растворах исследуемых препаратов, как указано в Таблице 18, в концентрациях, изменяющихся в пределах от 0,01 нМ до 300 нМ, и инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем клетки промывали охлажденным во льду PBS (3×), центрифугировали (300 g, 5 минут), и инкубировали с детектирующим антителом (козьим антителом-Alexa-647 против человеческого IgG (H+L цепь) в течение 1 часа при 4°C. Суспензии клеток центрифугировали (300 g, 5 минут), 3 раза промывали охлажденным во льду PBS и фиксировали при ресуспендировании в растворе параформальдегида (1%). Затем ресуспендированные клетки подвергали анализу методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре MACS Quant. Одиночные события (10000) собирали для

анализа. Гейтирование популяции и анализ средней интенсивности флуоресценции (MFI) проводили при использовании программного обеспечения MACS Quant. В Таблице 18 приведены средние значения EC_{50} для связывания с клетками.

Таблица 18

Исследуемые препараты	DAR	Связывание клеток EC_{50} (нМ)
Конъюгат **60-1**	6,2	3,33
Конъюгат **32d**	8,8	2,99
Конъюгат **32b-1**	5,7	ND
Конъюгат **8b-3**	6,4	8,13
XMT-1535	NA	4,29
XMT-1535	NA	3,74
XMT-1535 mIgG2a	NA	4,13
Контроль IgG человека	NA	ND

ND=не определяли; NA=не применимо

[726] Как показано в Таблице 18, значения EC_{50} для связывания NaPi2b ADC с клетками OVCAR3 находились в низком наномолярном диапазоне, тогда как изотипический контроль не связывался с клетками OVCAR3.

Пример 56: Функциональная активность NaPi2b биоконъюгатов в анализе совместных культур клеток рака яичника человека OVCAR3 и репортерных клеток THP1

[727] Индукцию пути STING в иммунных клетках, вызванную NaPi2b-направленным STING ADC, оценивали в анализе совместных культур раковых клеток/клеток THP1-IRF3 с репортерным геном люциферазы. Клетки карциномы яичника человека OVCAR3 сеяли в 96-луночные планшеты для культур тканей CellBind (20000/лунка) и оставляли для прикрепления на 6 часов в среде RPMI с 20% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. В каждую лунку добавляли ряд разведений (от 0,01 нМ до 300 нМ на основе полезной нагрузки; 3-кратные серийные разведения в питательной среде) исследуемых препаратов и инкубировали планшет в течение 20 мин при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли по 50000 репортерных клеток THP1-Dual и продолжали инкубирование в течение 20 часов при 37°C, 5% CO_2. Супернатанты клеточных культур (20 мкл) с каждым инкубированным образцом добавляли к ресуспендированному QUANTI-Luc (50 мкл) и сразу измеряли люминесцентный сигнал с помощью микропланшетного ридера SpectraMax M5 (Molecular Devices). Значение EC_{50} определяли по кривой зависимости доза-эффект. В Таблице 19 представлены значения EC_{50} в клетках THP1-Dual, совместно культивируемых с раковыми клетками OVCAR3

Таблица 19

Исследуемый препарат	**Конъюгат 32a**	**Конъюгат 32d**	**Конъюгат 32c**	**Конъюгат 32b-1**	**Конъюгат 8b-3**
EC_{50} (нМ)	0,29	0,47	NA	NA	0,21

[728] Как показано в Таблице 19, обработка совместных культур OVCAR3 и THP-1 конъюгатами NaPi2b-ADC приводила к субнаномолярным значениям EC_{50} для индукции пути STING в иммунных клетках THP-1, тогда как изотипический контроль не обладал активностью.

Пример 57: Ответ роста опухоли на введение конъюгата NaPi2b антитела-лекарственного средства в OVCAR-3

[729] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетками рака яичника человека OVCAR-3 (5×10^6 клеток/мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 56-122 мм^3 (среднее значение=83,9-84,7 мм^3/группа) Растворитель, Конъюгат **32b-1** (3,39/0,10 мг/кг), Конъюгат **32a** (0,93/0,03 или 3,12/0,10 мг/кг), Конъюгат **32c** (2,12/0,10 мг/кг), Конъюгат **32d** (2,20/0,10 мг/кг) или агонист STING diABZI IV (0/5 мг/кг) вводили внутривенно в день 1 (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы).

[730] На **ФИГ. 23** представлены результаты по объемам опухолей у мышей-носителей опухолей OVCAR-3, получавших Конъюгат **32b-1**, Конъюгат **32a**, Конъюгат **32c**, Конъюгат **32d** или агонист STING diABZI IV.

Пример 58: Ответ роста опухоли на введение Конъюгата STING NaPi2b антитела-лекарственного средства в комбинации с Конъюгатом AF-HPA NaPi2b антитела-лекарственного средства в OVCAR-3

[731] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетками рака яичника человека OVCAR-3 (5×10^6 клеток/мышей). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 68-247 мм^3 (среднее значение=148-148,2 мм^3/группа). Растворитель; комбинацию Ритуксимаба AF-HPA ADC (0,75/0,023 мг/кг) и Конъюгата **8c-2** (4,0/0,126 мг/кг); XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг); Конъюгата **8b-2** (2,0/0,071 или 4,0/0,142 мг/кг); комбинацию XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг) и Конъюгата **8c-2** (4,0/0,126 мг/кг); комбинацию Ритуксимаба AF-HPA ADC (0,75/0,023 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (4,0/0,142 мг/кг); комбинацию Ритуксимаба AF-HPA ADC (0,75/0,023 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (2,0/0,071 мг/кг); комбинацию XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (4,0/0,142 мг/кг); комбинацию XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (2,0/0,071 мг/кг); комбинацию XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг) и XMT-1535 (4,0/0 мг/кг); или XMT-1535 (4,75/0 мг/кг) вводили внутривенно в день 1 (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы).

[732] На **ФИГ. 24** представлены результаты по объемам опухолей у мышей-носителей опухолей OVCAR-3, получавших растворитель; комбинацию Ритуксимаба AF-HPA ADC и Конъюгата **8c-2**; XMT-1535 AF-HPA ADC; Конъюгат **8b-2**; комбинацию XMT-1535 AF-HPA ADC и Конъюгата **8c-2**; комбинацию Ритуксимаба AF-HPA ADC и Конъюгата **8b-2**; комбинацию Ритуксимаба AF-HPA ADC и Конъюгата **8b-2**; комбинацию XMT-1535 AF-HPA ADC и Конъюгата **8b-2**; комбинацию XMT-1535 AF-HPA ADC и Конъюгата **8b-2**; комбинацию XMT-1535 AF-HPA ADC и XMT-1535; или XMT-1535. Все

расчеты основаны на значениях, полученных в день 22. Лечение комбинацией Ритуксимаба AF-HPA ADC (0,75/0,023 мг/кг) и Конъюгата **8c-2** (4,0/0,126 мг/кг) привело к TGI 25,1% (n=10). Лечение XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг) привело к TGI 71,6% (n=9) и среднему уменьшению опухоли 71,2% (n=1). Лечение Конъюгатом **8b-2** (4,0/0,142 мг/кг) привело к TGI 72,9% (n=9) и среднему уменьшению опухоли 48% (n=1). Лечение Конъюгатом **8b-2** (2,0/0,071 мг/кг) привело к TGI 59,8% (n=10). Лечение комбинацией XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг) и Конъюгата **8c-2** (4,0/0,126 мг/кг) привело к TGI 85,1% (n=9) и среднему уменьшению опухоли 24,6% (n=1). Лечение комбинацией Ритуксимаба AF-HPA ADC (0,75/0,023 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (4,0/0,142 мг/кг) привело к TGI 61,7% (n=10). Лечение комбинацией Ритуксимаба AF-HPA ADC (0,74/0,023 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (2,0/0,071 мг/кг) привело к TGI 55,7% (n=10). Лечение комбинацией XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (4,0/0,142 мг/кг) привело к TGI 95,2% (n=4) и среднему уменьшению опухоли 60,5% (n=6). Лечение комбинацией XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг) и Конъюгата **8b-2** (2,0/0,071 мг/кг) привело к TGI 98,2% (n=8) и среднему уменьшению опухоли 17,8% (n=2). Лечение комбинацией XMT-1535 AF-HPA ADC (0,75/0,024 мг/кг) и XMT-1535 (4,00/0 мг/кг) привело к TGI 68,2% (n=9) и среднему уменьшению опухоли 23,7% (n=1). Лечение XMT-1535 (4,75/0 мг/кг) привело к TGI 0,6% (n=10).

Пример 59: Ответ роста опухоли на введение конъюгата HER2 антитела-лекарственного средства при раке яичника SKOV3

[733] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетками рака яичника человека SKOV3 (10×10^6 клеток/мышь). Животных рандомизировали в группы лечения, когда объемы опухоли составили 75-100 мм^3 (среднее значение=84-85 мм^3/группа). Растворитель, Конъюгат **32b** (0,85/0,03 мг/кг), Конъюгат **32-2** (0,90/0,03 мг/кг), Конъюгат **88** (0,87/0,03 мг/кг), Конъюгат **85** (2,87/0,10 мг/кг), Конъюгат **92** (2,36/0,10 мг/кг), Конъюгат **100** (2,23/0,10 мг/кг), Конъюгат **89** (0,99/0,030 мг/кг), Конъюгат **85a** (2,59/0,10 мг/кг), Конъюгат **93** (2,85/0,10 мг/кг) или Конъюгат **101** (2,70/0,10, мг/кг) вводили внутривенно в день 1 (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы).

[734] На **ФИГ. 25** представлены результаты по объемам опухолей у мышей-носителей опухолей SKOV3, получавших Конъюгат **32b**, Конъюгат **32-2**, Конъюгат **88**, Конъюгат **85**, Конъюгат **92**, Конъюгат **100**, Конъюгат **89**, Конъюгат **85a**, Конъюгат **93** или Конъюгат **101**. Лечение Конъюгатом **32-2** (0,90/0,03 мг/кг) привело к 1 PR, 9 CR и 5 TFS. Лечение Конъюгатом **88** (0,87/0,03 мг/кг) привело к 6 CR и 4 TFS. Лечение Конъюгатом **85** (2,87/0,10 мг/кг) привело к 9 CR и 8 TFS. Лечение Конъюгатом **100** (2,23/0,10 мг/кг) привело к 1 PR.

Пример 60: Ответ роста опухоли на введение конъюгата HER2 антитела-лекарственного средства в SKOV3

[735] Самкам мышей CB.17 SCID подкожно инокулировали клетки рака яичника человека SKOV3 (10×10^6 клеток/мышь). Животных рандомизировали в группы лечения,

когда объемы опухоли составили 75-144 мм^3 (среднее значение=112-114 мм^3/группа) (n=10/группа). Растворитель, Конъюгат **28** (0,99/0,0325 мг/кг) или Конъюгат **62** (0,9/0,0325 мг/кг) вводили внутривенно в день 1 (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=10 для каждой группы).

[736] На **ФИГ. 26** представлены результаты по объемам опухолей у мышей-носителей опухолей SKOV3, получавших растворитель, Конъюгат **28** или Конъюгат **62** (HER2-направленный). Лечение Конъюгатом **28** (0,99/0,0325 мг/кг) привело к 1 PR, 8 CR и 5 TFS. Лечение Конъюгатом **62** (0,92/0,0325 мг/кг) привело к 2 PR, 7 CR и 4 TFS.

Пример 61: Фармакокинетика конъюгатов HER2 антитела-лекарственного средства в SKOV3

[737] Самкам мышей CB.17 SCID делали однократную внутривенную инъекцию растворителяа, Конъюгта **28** (3,0/0,10 мг/кг) или Конъюгата **62** (2,84/0,10 мг/кг) (все дозы приведены из расчета на антитело/полезную нагрузку, n=4 для каждой группы). Плазму собирали через 15 минут, 1, 6, 24, 48, 72, 96, 168 и 336 часов после лечения. Плазму разводили 1:10 в 1,33 мг/мл лимонной кислоте до общего объема 0,1 мл. Разбавленную плазму быстро замораживали в сухом льду и хранили при -80°C до анализа ФК.

[738] На **ФИГ. 27** представлены результаты по концентрациям конъюгированного лекарственного средства в циркулирующей плазме. Концентрации в плазме ~2,5 мкг/мл и ~1,8 мкг/мл были достигнуты для Конъюгата **28** и Конъюгата **62** соответственно, и соответствующая скорость выведения ~9,05 мл/день/кг и ~14,6 мл/день/кг соответственно.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[739] Подробности одного или больше вариантов осуществления изобретения представлены в прилагаемом описании выше. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут использоваться при практической реализации или тестировании настоящего изобретения, способы и материалы описаны ниже. Другие признаки, объекты и преимущества изобретения будут очевидны из описания и формулы изобретения. В описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно известно среднему специалисту в области, к которой относится настоящее изобретение. Все патенты и публикации, цитируемые в настоящем описании, включены посредством отсылки.

[740] Предыдущее описание было представлено лишь в целях иллюстрации и не служит для ограничения изобретения точной раскрытой формой, которое ограничено только прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитела- лекарственного средства (ADC), представляющий собой

или его фармацевтически приемлемая соль,

где конъюгат включает антитело XMT-1519, которое включает определяющую комплементарность область 1 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH1), включающую аминокислотную последовательность FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 20); определяющую комплементарность область 2 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH2), включающую аминокислотную последовательность YISSSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 21); определяющую комплементарность область 3 вариабельной области тяжелой цепи (CDRH3), включающую аминокислотную последовательность GGHGYFDL (SEQ ID NO: 22); и определяющую комплементарность область 1 вариабельной области легкой цепи (CDRL1), включающую аминокислотную последовательность RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 27); определяющую комплементарность область 2 вариабельной области легкой цепи (CDRL2), включающую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 28); и определяющую комплементарность область 3 вариабельной области легкой цепи (CDRL3), включающую аминокислотную последовательность QQYHHSPLT (SEQ ID NO: 29), и d_{15} представляет собой целое число в пределах от приблизительно 1 до приблизительно 20.

2. Конъюгат по п.1, где антитело XMT-1519 включает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 17 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 24.

3. Конъюгат по п.1, где антитело XMT-1519 включает аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 19 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 26.

4. Конъюгат по п.1, где d_{15} представляет собой целое число в пределах от приблизительно 2 до приблизительно 14.

5. Конъюгат по п.1, где d_{15} представляет собой целое число в пределах от приблизительно 2 до приблизительно 8.

6. Конъюгат по п.1, где d_{15} представляет собой приблизительно 2, приблизительно 4, приблизительно 6 или приблизительно 8.

7. Конъюгат по п.1, где d_{15} представляет собой целое число в пределах от приблизительно 6 до приблизительно 10.

8. Конъюгат по п.1, где d_{15} равен приблизительно 6.

9. Конъюгат по п.1, где d_{15} равен приблизительно 7.

10. Конъюгат по п.1, где d_{15} равен приблизительно 8.

11. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат по любому из предыдущих пп., и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей или наполнителей.

12. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат по любому из предыдущих пп., и по меньшей мере один иммуномодулятор или по меньшей мере одно иммуностимулирующее средство.

13. Способ активации или повышения активности стимулятора генов интерферона (STING) у субъекта, включающий введение субъекту конъюгата по любому из предыдущих пп. или его фармацевтически приемлемой соли.

14. Способ предупреждения или лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата по любому из предыдущих пп. или его фармацевтически приемлемой соли.

15. Конъюгат по любому из предыдущих пп. или его фармацевтически приемлемая соль для активации или повышения активности стимулятора генов интерферона (STING) у субъекта.

16. Конъюгат по любому из предыдущих пп. или его фармацевтически приемлемая соль для предупреждения или лечения заболевания или нарушения у субъекта.

17. Применение конъюгата по любому из предыдущих пп. или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного препарата для активации или повышения активности стимулятора генов интерферона (STING) у субъекта.

18. Применение конъюгата по любому из предыдущих пп. или его фармацевтически приемлемой соли в производстве лекарственного препарата для предупреждения или лечения заболевания или нарушения у субъекта.

19. Способ, конъюгат для применения или применение по любому из предыдущих пп., где заболевание или нарушение ассоциировано с агонизмом STING.

20. Способ, конъюгат для применения или применение по любому из предыдущих пп., где заболеванием или нарушением является рак.

21. Способ, конъюгат для применения или применение по любому из предыдущих пп., где заболеванием или нарушением является рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак желудка, плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома, рак легкого, рак яичника, рак пищевода, рак желчных протоков, уротелиальный рак, рак шейки матки, папиллярный рак щитовидной железы, папиллярный почечно-клеточный рак, холангиокарцинома, рак протоков слюнных желез, рак почки или рак поджелудочной железы.

22. Способ, конъюгат для применения или применение по любому из предыдущих пп., где заболеванием или нарушением является рак молочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак желудка или рак легкого.

По доверенности

20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
0
20
40
60
80
100
% конфлюентности красных объектов
Часы после обработки
Контроль (необработанный)
Конъюгат 8c-1 (10 нМ)
Конъюгат 8c-1 (100 нМ)
Соединение 1 (10 нМ)
Конъюгат 8f (1 нМ)
Соединение 1 (100 нМ)
Конъюгат 8f (100,10 нМ)
Конъюгат 8b (100,10, 1 нМ)

ФИГ. 1A

Монокультура
Число красных объектов (нормализованное по T=0)
Часы после обработки
Конъюгат 8l, 100 нМ
Конъюгат 8l, 10 нМ
Конъюгат 8l, 1 нМ
Соединение 1, 100 нМ
Соединение 1, 10 нМ
Соединение 1, 1 нМ
Конъюгат 8m, 100 нМ
Контроль (необработанный)

ФИГ. 1B

МКПК
Обогащенные моноциты
CD16-истощенные моноциты
VioBlue- CD14
ФИТЦ-CD3
Q1
15.2
Q2
0.50
Q4
35.1
Q3
49.2
Q1
43.5
Q2
0.45
Q4
52.1
Q3
3.90
Q1
48.3
Q2
0.50
Q4
49.1
Q3
2.08

ФИГ. 2

Совместные культуры SKBR3-STING дикого типа/МКПК
% конфлюентности красных объектов
Часы после обработки
Конъюгат 8c-2 (100 нМ)
Соединение 1 (5 нМ)
Конъюгат 8j (1 нМ)
Соединение 1 (25 нМ)
Конъюгат 8j (5 нМ)
Соединение 1 (100 нМ)
Конъюгат 8j (100, 25 нМ)
Конъюгат 8a-3 (100, 25, 5, 1 нМ)

ФИГ. 3A

Совместные культуры SKBR3-STING нокаут/МКПК
% конфлюентности красных объектов
Часы после обработки
Конъюгат 8c-2 (100 нМ)
Соединение 1 (100, 25 нМ)
Конъюгат 8j (100, 25, 5, 1 нМ)
Конъюгат 8a-2 (100, 25, 5, 1 нМ)

ФИГ. 3B

Совместные культуры раковых клеток
со STING дикого типа/МКПК
% конфлюентности красных
объектов через 84 ч
(нормализованный по T=0 ч)
40
20
0
-20
0.01
1
100
Полезная нагрузка (нМ)
Конъюгат 8a-3
Конъюгат 8j
Трастузумаб с Fc wt
Трастузумаб с мутантным Fc AAG

ФИГ. 4A

Совместные культуры STING-
нокаутных раковых клеток/МКПК
% конфлюентности красных
объектов через 84 ч
(нормализованный по T=0 ч)
40
20
0
-20
0.01
1
100
Полезная нагрузка (нМ)
Конъюгат 8a-3
Конъюгат 8-j
Трастузумаб с Fc wt
Трастузумаб с мутантным Fc AAG

ФИГ. 4B

Совместные культуры МКПК/раковых клеток
Конфлюентность красных объектов
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
-4000
0
10
20
30
40
Часы после обработки
Контроль (необработанный)
Конъюгат 8b, 20 нМ
Конъюгат 8b, 4 нМ
Соединение 1, 20 нМ
Соединение 1, 4 нМ

ФИГ. 5А

Совместные культуры обогащенных моноцитов/раковых клеток
Конфлюентность красных объектов
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
-4000
0
10
20
30
40
Часы после обработки
Контроль (необработанный)
Коньюгат 8b-1, 20 нМ
Коньюгат 8b-1, 4 нМ
Соединение 1, 20 нМ
Соединение 1, 4 нМ

ФИГ. 5B

Совместные культуры CD16-истощенных моноцитов/раковых клеток
Конфлюентность красных объектов
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
-4000
0
10
20
30
40
Часы после обработки
Контроль (необработанный)
Конъюгат 8b-1, 20 нМ
Конъюгат 8b-1, 4 нМ
Соединение 1, 20 нМ
Соединение 1, 4 нМ

ФИГ. 5C

Растворитель

Агонист STING diABZI, 0/5 мг/кг

Конъюгат 8c-1, 1/0,04 мг/кг

Конъюгат 8c-1, 3/0,12 мг/кг

Трастузумаб 3/0 мг/кг

Конъюгат 8a-1, 1/0,03 мг/кг

Конъюгат 8a-1, 3/0,09 мг/кг

ФИГ. 6

CXCL-10 (IP-10)
пг/мл
6000
4000
2000
0
0
20
40
60
80
Время (часы)
Растворитель
Коньюгат 8a-1
Коньюгат 8c-1
агонист STING diABZI
1000
800
600
400
200
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)

ФИГ. 7A

IL-6
пг/мл
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
20
40
60
80
Время (часы)
Растворитель
Коньюгат 8a-1
Коньюгат 8c-1
агонист STING diABZI
600
400
200
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)

ФИГ. 7B

ФНО-α
пг/мл
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
Время (часы)
Растворитель
Коньюгат 8a-1
Коньюгат 8c-1
агонист STING diABZI
15
10
5
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)

ФИГ. 7C

IFNγ
пг/мл
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
Время (часы)
Растворитель
Коньюгат 8a-1
Коньюгат 8c-1
агонист STING diABZI
80
60
40
20
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)

ФИГ. 7D

CXCL1 (KC)
Растворитель
Коньюгат 8a-1
Коньюгат 8c-1
агонист STING diABZI
пг/мл
6000
4000
2000
0
0
20
40
60
80
Время (часы)
400
300
200
100
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)

ФИГ. 7E

MIG
Растворитель
Коньюгат 8a-1
Коньюгат 8c-1
агонист STING diABZI
пг/мл
15000
10000
5000
0
0
20
40
60
80
Время (часы)
2000
1500
1000
500
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)

ФИГ. 7F

MIP-1a
15000
10000
5000
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)
1500
1000
500
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)
Растворитель
Коньюгат 8a-1
Коньюгат 8c-1
агонист STING diABZI

ФИГ. 7G

RANTES
5000
4000
3000
2000
1000
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)
80
60
40
20
0
пг/мл
0
20
40
60
80
Время (часы)
Растворитель
Коньюгат 8a-1
Коньюгат 8c-1
агонист STING diABZI

ФИГ. 7H

mCXCL10
Экспрессия мРНК
(нормализованная по GAPDH)
25
20
15
10
5
0
Растворитель 12H
Коньюгат 8a-1 12H
Коньюгат 8c-1 12H
Растворитель 72H
Коньюгат 8a-1 72H
Коньюгат 8c-1 72H

ФИГ. 8A

IFN-β
Экспрессия мРНК
(нормализованная по GAPDH)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Растворитель 12H
Коньюгат 8a-1 12H
Коньюгат 8c-1 12H
Растворитель 72H
Коньюгат 8a-1 72H
Коньюгат 8c-1 72H

ФИГ. 8B

IL-6
Экспрессия мРНК
(нормализованная по GAPDH)
8
6
4
2
0
Растворитель 12H
Коньюгат 8a-1 12H
Коньюгат 8c-1 12H
Растворитель 72H
Коньюгат 8a-1 72H
Коньюгат 8c-1 72H

ФИГ. 8C

ФИГ. 9

Концентрация в плазме
Конъюгат 8а-1
Концентрация [нг/мл]
Среднее +/- SD
100000
10000
1000
100
10
0
5
10
15
Общее антитело
Конъюгированное лекарственное средство
Время (дни)

ФИГ. 10

Действие нейтрализующих антител к IFNλ1 (IL29) или к IFNλ2 (IL28A) в сокультурах раковых клеток и PBMC

ФИГ. 11

Растворитель

Агонист STING diABZI, 0/5 мг/кг

Конъюгат 8c-1, 3/0,12 мг/кг

Конъюгат 8b-1, 3/0,09 мг/кг

Конъюгат 8f, 3/0,12 мг/кг

ФИГ. 12

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
84
Дни в исследовании
Растворитель
Конъюгат 8d-2, 3/0,1 мг/кг
Конъюгат 8e, 3/0,1 мг/кг

ФИГ. 13

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
Дни в исследовании
Растворитель
Агонист STING diABZI, 0/5 мг/кг
Конъюгат 8c-1, 1,0/0,04 мг/кг
Конъюгат 8h, 1,0/0,04 мг/кг

ФИГ. 14

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
Дни в исследовании
Растворитель
Конъюгат 8d-3, 1,09/0,04 мг/кг
Конъюгат 8g, 0,88/0,04 мг/кг

ФИГ. 15А

Процент (%) с опухолями <1000 мм³
100
75
50
25
0
0
7
14
21
28
35
42
49
Дни в исследовании
Растворитель
Конъюгат 8d-3, 1/0,04 мг/кг
Конъюгат 8g 0,88/0,04 мг/кг

ФИГ. 15B

Объем опухоли (мм³)
4000
3000
2000
1000
0
0
7
14
21
28
35
42
49
Дни в исследовании
Коньюгат 8g, 0,9/0,04 мг/кг

ФИГ. 16А

ФИГ. 16B

ФИГ. 16C

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
Дни в исследовании
Растворитель
Конъюгат 8d-3, 5,5/0,18 мг/кг
Конъюгат 8i, 3,2/0,18 мг/кг
Агонист STING diABZI, 0/5 мг/кг

ФИГ. 17

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
Дни в исследовании
Растворитель
Конъюгат 20a, 3/0,09 мг/кг
Конъюгат 34a, 3/0,11 мг/кг
Конъюгат 34, 3/0,11 мг/кг
Конъюгат 20-1, 3/0,10 мг/кг

ФИГ. 18

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
Дни в исследовании
Растворитель
Конъюгат 28, 0,3/0,01 мг/кг
Конъюгат 29, 0,2/0,01 мг/кг
Конъюгат 8-2, 0,3/0,01 мг/кг
Конъюгат 25, 0,3/0,01 мг/кг
Конъюгат 45, 0,3/0,01 мг/кг
Конъюгат 45, 1/0,04 мг/кг
Конъюгат 25, 1/0,04 мг/кг
Конъюгат 8-2, 1/0,04 мг/кг
Конъюгат 29, 0,8/0,02 мг/кг
Конъюгат 28, 1,0/0,03 мг/кг

ФИГ. 19

Растворитель
Агонист STING diABZI, 1,5 мг/кг q3dx3
Соединение 30, 1,5 мг/кг q3dx3
Агонист STING diABZI, 0,128 мг/кг
Соединение 30, 0,128 мг/кг
Конъюгат 32b-2, 3,42/0,128 мг/кг
XMT-1519, 3,00 мг/кг
Конъюгат 32-5, 0,100/0,004 мг/кг
Конъюгат 32-5, 0,300/0,013 мг/кг
Конъюгат 32-5, 1,00/0,042 мг/кг
Конъюгат 32-5, 3,00/0,128 мг/кг
Конъюгат 32e, 1,00/0,039 мг/кг
Конъюгат 32e, 3,00/0,117 мг/кг

ФИГ. 20

ФИГ. 21A

Индивидуальные кривые

ФИГ. 21B

ФИГ. 21C

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
Дни в исследовании
Растворитель
Конъюгат 8c-2, 3,17/0,10 мг/кг
Конъюгат 8a-2, 2,70/0,10 мг/кг
Конъюгат 8a-2, 0,81/0,03 мг/кг
Конъюгат 8j, 2,71/0,10 мг/кг
Конъюгат 8j, 0,81/0,03 мг/кг
Агонист STING diABZI IV, 0/5 мг/кг

ФИГ. 22

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
49
Дни в исследовании
Растворитель
Агонист STING diABZI IV, 0/5 мг/кг
Конъюгат 32b-1, 3,39/0,10 мг/кг
Конъюгат 32a, 3,12/0,10 мг/кг
Конъюгат 32a, 0,93/0,03 мг/кг
Конъюгат 32d, 2,20/0,10 мг/кг
Конъюгат 32c, 2,12/0,10 мг/кг

ФИГ. 23

- Растворитель
- Ритуксимаб AF-HPA ADC, 0,75/0,023 мг/кг + Конъюгат 8c-2, 4,0/0,126 мг/кг
- XMT-1535 AF-HPA ADC, 0,75/0,024 мг/кг
- Конъюгат 8b-2, 4,0/0,142 мг/кг
- Конъюгат 8b-2, 2,0/0,071 мг/кг
- XMT-1535 AF-HPA ADC, 0,75/0,024 мг/кг + Конъюгат 8c-2, 4,0/0,126 мг/кг
- Ритуксимаб AF-HPA ADC, 0,75/0,023 мг/кг + Конъюгат 8b-2, 4,0/0,142 мг/кг
- Ритуксимаб AF-HPA ADC, 0,75/0,023 мг/кг + Конъюгат 8b-2, 2,0/0,071 мг/кг
- XMT-1535 AF-HPA ADC, 0,75/0,024 мг/кг + Конъюгат 8b-2, 4,0/0,142 мг/кг
- XMT-1535 AF-HPA ADC, 0,75/0,024 мг/кг + Конъюгат 8b-2, 2,0/0,071 мг/кг
- XMT-1535 AF-HPA ADC, 0,75/0,024 мг/кг + XMT-1535, 4,0/0 мг/кг
- XMT-1535, 4,75/0 мг/кг

ФИГ. 24

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
Дни в исследовании
Растворитель
Конъюгат 32b, 0,85/0,03 мг/кг
Конъюгат 89, 0,99/0,03 мг/кг
Конъюгат 85a, 2,59/0,10 мг/кг
Конъюгат 93, 2,85/0,10 мг/кг
Конъюгат 101, 2,70/0,10 мг/кг
Конъюгат 32-2, 0,90/0,030 мг/кг
Конъюгат 88, 0,87/0,03 мг/кг
Конъюгат 85, 2,87/0,10 мг/кг
Конъюгат 92, 2,36/0,10 мг/кг
Конъюгат 100, 2,23/0,10 мг/кг

ФИГ. 25

Средний объем опухоли ±SEM (мм³)
1000
500
0
0 7 14 21 28 35 42 49 56 63 70 77
Дни в исследовании
Растворитель
Коньюгат 28, 0,99/0,0325 мг/кг
Коньюгат 62, 0,92/0,0325 мг/кг

ФИГ. 26

Концентрация (нг/мл)
10000
1000
100
0 5 10 15
Номинальное время (дни)
Коньюгат 28, 0,098 мг/кг
Коньюгат 62, 0,11 мг/кг

ФИГ. 27

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MRSN033001WO	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US2021/025556	International filing date *(day/month/year)* 2 April 2021 (02-04-2021)	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 2 April 2020 (02-04-2020)
Applicant MERSANA THERAPEUTICS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____ , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.
2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)
3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)
4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority
6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 20
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/025556

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/025556

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K47/68 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/200812 A1 (NOVARTIS AG [CH]; ADURO BIOTECH INC [US]; DUBENSKY THOMAS W JR [US]) 1 November 2018 (2018-11-01)	1-8,19, 20,32-42
Y	claims 1-7, 25, 27, 36-38, 40-44, 54, 55	1-46

X	US 2017/298139 A1 (THOMPSON PETER ARMSTRONG [US] ET AL) 19 October 2017 (2017-10-19)	1-9,19, 20,32, 34-42
Y	paragraphs [0329], [0332] - [0339], [0368], [0395]	1-46

Y	WO 2018/160538 A1 (MERSANA THERAPEUTICS INC [US]; MILLENNIUM PHARM INC [US]) 7 September 2018 (2018-09-07) claim 1; example 1	1-46

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 June 2021	01/07/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Birikaki, Lemonia

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/025556

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/098269 A2 (MERSANA THERAPEUTICS INC [US]) 31 May 2018 (2018-05-31) claims 1-57 -----	1-46
Y	WO 2019/069275 A1 (GLAXOSMITHKLINE IP DEV LTD [GB]) 11 April 2019 (2019-04-11) examples 1-12 -----	1-46

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/025556

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018200812 A1	01-11-2018	AR 113224 A1	19-02-2020
		CN 110799218 A	14-02-2020
		EP 3615080 A1	04-03-2020
		JP 2020517700 A	18-06-2020
		WO 2018200812 A1	01-11-2018
US 2017298139 A1	19-10-2017	US 2017158772 A1	08-06-2017
		US 2017298139 A1	19-10-2017
		US 2021139604 A1	13-05-2021
WO 2018160538 A1	07-09-2018	TW 201834697 A	01-10-2018
		US 2018271996 A1	27-09-2018
		WO 2018160538 A1	07-09-2018
WO 2018098269 A2	31-05-2018	AU 2017363246 A1	16-05-2019
		BR 112019008854 A2	09-07-2019
		CA 3041559 A1	31-05-2018
		CN 110234357 A	13-09-2019
		EP 3544635 A2	02-10-2019
		JP 2020510669 A	09-04-2020
		KR 20190087535 A	24-07-2019
		TW 201827082 A	01-08-2018
		US 2018154018 A1	07-06-2018
		WO 2018098269 A2	31-05-2018
WO 2019069275 A1	11-04-2019	BR 112020006761 A2	06-10-2020
		CA 3078309 A1	11-04-2019
		CN 111194214 A	22-05-2020
		EP 3691640 A1	12-08-2020
		JP 2020536105 A	10-12-2020
		US 2020330556 A1	22-10-2020
		WO 2019069275 A1	11-04-2019